

Rapport annuel d'activité

2014

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

**Année d'exercice
2013**

Résumé analytique

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

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

Cette année de fonctionnement a été une année de collaboration accrue entre les partenaires du CNR et d'intense mise en place de nouvelles études et de nouvelles techniques. Elle a vu en particulier : la mise en place d'études évaluant les méthodes alternatives au prélèvement veineux pour le dépistage, le diagnostic et le monitoring des infections par le VHC ou le VHB ; la poursuite de l'enquête COQUELICOT et la fin de la surveillance nationale des patients atteints d'hépatite chronique B nouvellement pris en charge dans les Pôles de Référence et Réseaux Hépatites. L'enquête COQUELICOT est une enquête de séroprévalence du VIH et des hépatites virales B et C et de séro-incidence du VIH et du VHC chez des usagers de drogues ayant sniffé ou s'étant injecté au moins une fois au cours de leur existence. Cette année a également permis au CNR d'évaluer de nouvelles techniques (optimisation de la recherche d'anticorps et de génome viral à partir de buvards, tests rapides pour la détection des anticorps anti-VHC et test rapide pour la détection d'AgHBs). Ces technologies sont essentielles à la réalisation des études en cours (étude TROD VHC chez les patients mono-infectés, enquête COQUELICOT).

Les activités d'expertise et de surveillance du laboratoire associé consacré aux hépatites virales en transfusion sanguine se sont poursuivies, en particulier l'évaluation des trousse de quantification de l'AgHBs. Trois réactifs commerciaux (HBsAg Architect Abbott, HBsAg Quant Liaison XL Dia Sorin, HBsAg II Quant Elecsys Roche) ont été évalués. Malgré quelques divergences qui, toutefois, n'ont pas nécessairement de conséquences cliniques, il existe une bonne corrélation entre les trousse de quantification de l'AgHBs disponibles à ce jour. L'impact sur les dosages, des génotypes (notamment les génotypes C, F et H) et des substitutions du déterminant "a" émergeant naturellement au cours de l'infection, impose cependant une certaine vigilance. En cas de doute, le recours à des trousse de différents fournisseurs doit être recommandé. Nous avons également participé à l'établissement du premier standard international pour les marqueurs HBe du VHB et l'antigène de capsid du VHC.

Le laboratoire associé du virus de l'hépatite delta a développé intensément ses collaborations nationales et internationales avec la mise en place d'un contrôle de qualité national et international impliquant plus de 25 laboratoires internationaux. D'autre part, une étude évaluant les performances de trousse commerciales pour la quantification de l'ARN du VHD a été réalisée. Il a été montré que les trousse sous-estimaient de façon très importante, voire ne détectaient pas des échantillons pourtant fortement positifs. Il s'agissait essentiellement d'échantillons africains. Un partenariat public/privé dans le cadre du développement d'une trousse de quantification de l'ARN du VHD a été opéré.

Rapport annuel d'activité

2014

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

Année d'exercice

2013

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

1. Missions et organisation du CNR

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

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

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

La coopération se poursuit également avec l'ensemble des partenaires institutionnels et privés impliqués dans la surveillance ou associés à des événements épidémiologiques liés à l'activité du CNR des Hépatites Virales B, C et delta (hôpitaux, cliniques, laboratoires d'analyse, laboratoires de recherche, etc).

Les activités des trois laboratoires constituant le CNR (le CNR coordonnateur et les deux laboratoires associés) sont organisées afin de remplir l'intégralité des missions confiées dans

le cadre du cahier des charges de l'appel d'offres des CNR, dans le cadre d'une étroite collaboration entre les trois laboratoires constituant. Les missions confiées au CNR sont les suivantes et seront détaillées dans l'Annexe 1 :

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

2. Activités d'expertise

2.1. Evolution des techniques au cours de l'année 2013

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

Techniques développées ou en développement

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

(Centres d'Information et de Dépistage Anonyme et Gratuit), les structures de prévention ou les structures associatives, voire au domicile du patient (autotest). Le papier filtre ou buvard (DBS, *dried blood spot*) permet de recueillir le sang et de le conserver sous forme desséchée. De nombreuses analyses peuvent être envisagées à partir de ce support (moléculaires, sérologiques et pharmacologiques). Les techniques de biologie moléculaire pour la détection voire la quantification des génomes viraux (ARN du VHC) à partir de sang total déposé sur buvard ont été développées au cours de l'année 2013. Nous avons en projet de développer des techniques similaires pour la détection et la quantification de l'ADN du VHB. D'autre part, en collaboration avec le Dr Christophe RODRIGUEZ, les tests de génotypage et d'étude de la résistance des virus d'hépatites B et C fondés sur le séquençage haut débit seront progressivement implémentés dans le cadre du CNR. Nous développons également une technique de biologie moléculaire permettant la détermination du génotype de résistance des patients nouvellement pris en charge pour leur hépatite chronique C. En particulier, pour les patients de génotype 1a où il est important de connaître le type d'acide aminé présent à la position 80. En effet, les études de phase 3 étudiant l'efficacité et la tolérance du siméprevir (antiprotéase de 1^{ère} génération, 2^{ème} vague) ont montré un taux de RVS significativement plus faible chez des patients de génotype 1a ayant une lysine en position 80 par rapport aux patients infectés par un virus possédant une glutamine à cette position (58% versus 75%-85% chez les patients naïfs de traitement).

Travaux d'évaluation des techniques (réactifs et trousse)

Performances du nouveau test rapide (TROD) DRW HBsAg v2.0 pour la détection de l'antigène de surface (AgHBs) du VHB dans différentes populations. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de l'INTS. L'objectif était d'évaluer les caractéristiques intrinsèques et la performance clinique du nouveau TROD DRW-HBsAg v2.0 (Diagnostics for the Real World™, Ltd, UK) dans des populations variées incluant des porteurs chroniques de l'AgHBs, des sujets présentant une hépatite aiguë sévère d'étiologie inconnue et des femmes enceintes dont le statut vis-à-vis du VHB n'était pas connu au moment de l'accouchement. La limite de détection clinique du test était de $0,30 \pm 0,07$ UI/mL à $0,97 \pm 0,26$ UI/mL, selon le génotype du VHB. Sa spécificité était de 98,8% chez les individus séronégatifs pour l'AgHBs, 98,7% chez les individus AgHBs-négatif ayant une hépatite sévère

d'étiologie inconnue et 97,8% chez les femmes enceintes séronégatives pour l'AgHBs au moment de l'accouchement. La sensibilité clinique de ce test était respectivement de 100,0%, 96,3% et 95,2% chez les individus atteints d'hépatite chronique B, les individus AgHBs-positif ayant une hépatite sévère et les femmes enceintes Ag-HBs-positif. La présence de substitutions amino acidiques dans la région hydrophile majeure (MHR) n'avait pas d'influence sur la détection de l'AgHBs par le test DRW HBsAg v2.0.

Au total, ce nouveau test est rapide, simple et suffisamment sensible pour être utilisé dans des populations à faible et fort risque d'infection par le VHB (Chevaliez et al., J Clin Virol 2014).

Intérêts cliniques de la quantification de l'antigène de capsid chez des patients atteints d'hépatite chronique C. L'antigène de capsid a été proposé comme un marqueur indirect de la réplication virale. La détection et la quantification de l'antigène de capsid peuvent être en théorie utilisés à la place des techniques de biologie moléculaire (DGV) pour le diagnostic et le suivi de l'hépatite chronique C. En effet, l'antigène de capsid du VHC peut être facilement détecté et quantifié à l'aide d'une méthode sérologique type CMIA (*chemiluminescent microparticle immunoassay*) sur l'automate Architect (Abbott). L'objectif de cette étude était d'évaluer les performances cliniques de la trousse Abbott (HCV Ag Architect) pour la détection et la quantification de l'antigène de capsid chez des patients atteints d'hépatite chronique C. Plus de 500 individus ont été inclus dans cette étude : 171 individus séronégatifs pour le VHC (groupe A : absence d'anticorps anti-VHC et d'ARN détectable), 26 patients ayant une infection résolue (groupe B : présence des anticorps anti-VHC en l'absence d'ARN VHC détectable), et 317 patients atteints d'hépatite chronique C (groupe C). Les individus du groupe C avaient des anticorps anti-VHC et un ARN détectable et quantifiable [charge virale moyenne : $5,80 \pm 0,80$ Log UI/mL avec *m2000* (Abbott Diagnostics, Chicago, IL) et $6,00 \pm 0,90$ Log UI/mL avec Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV v2.0 (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA)]. La spécificité de la trousse HCV Ag Architect était de 100% (IC95% : 97,8%-100%). Les titres de l'antigène de capsid évalués chez des patients naïfs de traitement infectés par différents génotypes du VHC (1-4) étaient comparables quel que soit le génotype (**Figure 1**). La limite de détection de 3 fmol/L correspondaient approximativement à 1 000 UI/mL d'ARN VHC, et ce quelle que soit la trousse de PCR en temps réel utilisée. Le titre de l'antigène de capsid était positivement corrélé à la charge

virale VHC (respectivement, $r=0,89$ and $r=0,88$ pour les trousse de PCR en temps réel *m2000* et *CAP/CTM 2.0*, $p<0,001$) (**Figure 2**).

Au total la trousse HCV Ag Architect était spécifique et le test était facile à réaliser. Cela pourrait représenter un outil pour le dépistage, le diagnostic et le monitoring, en particulier avec le développement des thérapeutiques antivirales sans interféron qui ne nécessite pas une sensibilité analytique élevée.

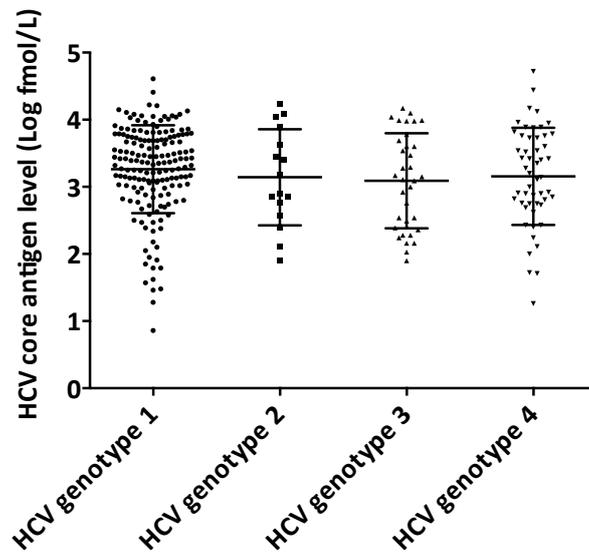


Figure 1. Titre de l'antigène de capside (Log fmol/L) en fonction du génotype (1 à 4) chez des patients naïfs de traitement (groupe C).

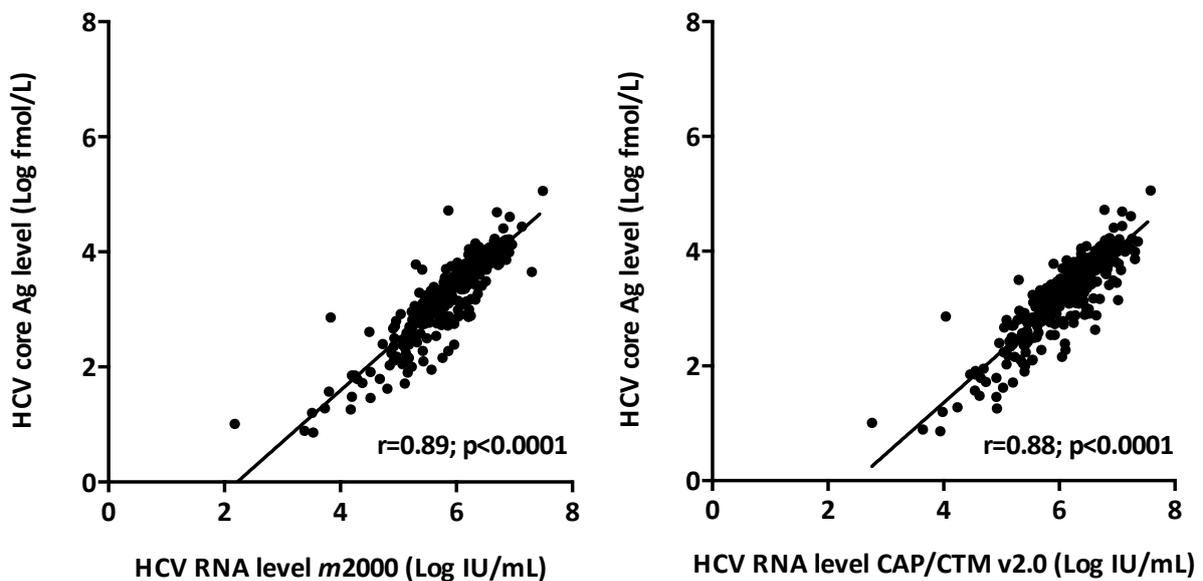


Figure 2. Corrélation des valeurs d'antigène de capsid du VHC mesurées par la plate-forme Architect (Abbott) avec les valeurs mesurées sur les mêmes échantillons avec les plates-formes de PCR en temps réel *m2000* (Abbott) (A) et CAP/CTM 2.0 (Roche) (B) chez 311 patients (groupe C) infectés par un génotype 1 (n=188), 2 (n=16), 3 (n=40), 4 (n=61), 5 (n=3) ou 6 (n=4).

Evaluation des performances cliniques des tests rapides d'orientation diagnostique (TROD) pour la détection des anticorps anti-VHC. Au total, 533 individus ont été recrutés sur une période de 14 mois (septembre 2012 – novembre 2013) dans 2 centres [service d'Hépatologie et de Gastroentérologie, hôpital Henri Mondor, service d'Hépatologie et de Gastroentérologie, Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil (CHIC)]. Quarante quatre patients ont été exclus en raison de critères d'exclusion [16 individus AgHBs-positif, 2 individus séropositifs pour le VIH et 26 individus séropositifs pour le VHC mais non répliquants (ARN VHC <12 UI/mL)]. Le groupe A comprenait 318 patients atteints d'hépatite chronique C (63,5% de sexe masculin, âgés de 56 ans), tous avaient des anticorps anti-VHC (signal/cutoff moyen : 27.0±4,3) et un ARN détectable (niveau moyen d'ARN du VHC : 5,80±0,80 Log UI/mL; intervalle : 1,80-7,50). Une grande majorité d'entre eux (94,7%) étaient naïfs de tout traitement. La répartition des génotypes était : 189 patients infectés par un génotype 1, 16 par un génotype 2, 40 par un génotype 3, 61 par un génotype 4, 3 par un génotype 5 et 4 par un génotype 6. Le groupe B comprenait 171 individus séronégatifs pour le VHC (absence d'anticorps anti-VHC et d'ARN viral indétectable). L'âge médian des individus du groupe B était de 41 ans et 40,4% étaient des hommes. Quatre TRODs ont été réalisés chez chacun des sujets : 1 test rapide à partir du liquide cravicaire [OraQuick[®] HCV Rapid Antibody Test (OraSure Technologies, Inc,)] et 3 tests [(OraQuick[®] HCV Rapid Antibody Test, TOYO[®] anti-HCV (TÜRKLAB TIBBI MALZEMELER SAN. TIC. A.S., Turquie) et Labmen[®] HCV test (TÜRKLAB TIBBI MALZEMELER SAN. TIC. A.S., Turquie)] à partir du sang total capillaire prélevé au bout du doigt après auto piqûre.

Les performances (spécificité, sensibilité, VPP, VPN) sont présentées dans le **Tableau 1**. A partir du sang total, la spécificité (Sp) était excellente (98,2%-100%). La valeur prédictive positive (VPP) était de 100% pour les tests OraQuick[®] et Labmen[®] et de 99,0% pour le test Toyo[®]. La sensibilité (Se) variait de 62,7% à 99,4% selon le test considéré. Une sensibilité plus élevée était observée avec le test OraQuick[®] (99,4%; IC95% : 97,7%-99,9%) en comparaison du test Toyo[®] (96,2%; IC95% : 93,3%-98,0%) et du test Labmen[®] (62,7%; IC95% : 54,8%-

69,5%). Les valeurs prédictives négatives (VPN) étaient respectivement de 98,4%, 93,1% et 49,6% pour les tests Oraquick[®], Toyo[®] et Labmen[®]. A partir du liquide cravculaire, la Sp du test OraQuick[®] était de 100% (IC95% : 97,9%-100%). La Se était satisfaisante (98,2%; IC95% : 95,9%-99,1%). La VPP et VPN étaient respectivement de 100% et 96,6%. (article soumis)

Tableau 1 : Performances des TROD

	Specificity (95%CI)	Sensitivity (95%CI)	PPV	NPV
Capillary whole blood				
OraQuick [®] HCV Rapid Antibody Test	100% (97.9%-100%)	99.4% (97.7%-99.9%)	100%	98.4%
Toyo [®] anti-HCV test	98.2% (94.8%-99.4%)	96.2% (93.3%-98.0%)	99.0%	93.1%
Labmen [®] HCV test	100% (94.4%-100%)	62.7% (54.8%-69.5%)	100%	49.6%
Oral fluid				
OraQuick [®] HCV Rapid Antibody Test	100% (97.9%-100%)	98.2 (95.9%-99.1%)	100%	96.6%

Evaluation du papier buvard (DBS) pour le dépistage, le diagnostic et le monitoring de l'infection par le VHC. L'intérêt du buvard (DBS) pour la réalisation d'analyses virologiques (sérologiques, moléculaires ou pharmacologiques) a été montré dans l'infection par le VIH. L'objectif de cette étude était d'évaluer les performances du buvard pour la détection des anticorps anti-VHC, la quantification de l'antigène de capsid et de l'ARN du VHC. Un total de 529 patients comprenant 183 séronégatifs et 346 séropositifs pour le VHC a été inclus. Les anticorps anti-VHC ont été détectés à l'aide d'une technique ELISA automatisée de 3^{ème} génération (anti-HCV Vitros, Ortho Clinical Diagnostics). L'ARN du VHC a été quantifié à l'aide de 2 techniques de PCR en temps réel (*m2000* et *CAP/CTM 2.0*). L'antigène de capsid a été quantifié à l'aide de la trousse HCV Ag Architect. Parmi les 529 buvards, les valeurs moyennes (\pm DS) du ratio signal/seuil pour la détection des anticorps anti-VHC étaient respectivement de 13,3 \pm 7,2 et 0,1 \pm 0,2 chez les sujets séropositifs et

séronégatifs pour le VHC. Une valeur seuil de 0,2 était associée à une spécificité de 98,9% (IC95% : 96,1%-99,7%) et une sensibilité de 99,1% (IC95% : 97,4%-99,7%). Seuls 3 buvards étaient faussement négatifs pour la détection des anticorps anti-VHC (**Figure 3**). La charge virale évaluée à partir de DBS était positivement corrélée à la charge virale sérique, quelle que soit la trousse de PCR en temps réel (respectivement, $r=0,87$ and $r=0,89$ pour la trousse *m2000* et CAP/CTM 2.0, $p<0,001$) (**Figure 4**). La différence moyenne de charge virale évaluée à partir du sérum et du sang total était respectivement de $1,76\pm 0,33$ et $1,57\pm 0,30$ Log IU/mL avec la trousse *m2000* et CAP/CTM 2.0. La mesure de la quantité d'antigène de capside évaluée sur DBS était positivement corrélée à la valeur sérique ($r=0,56$; $p<0,001$).

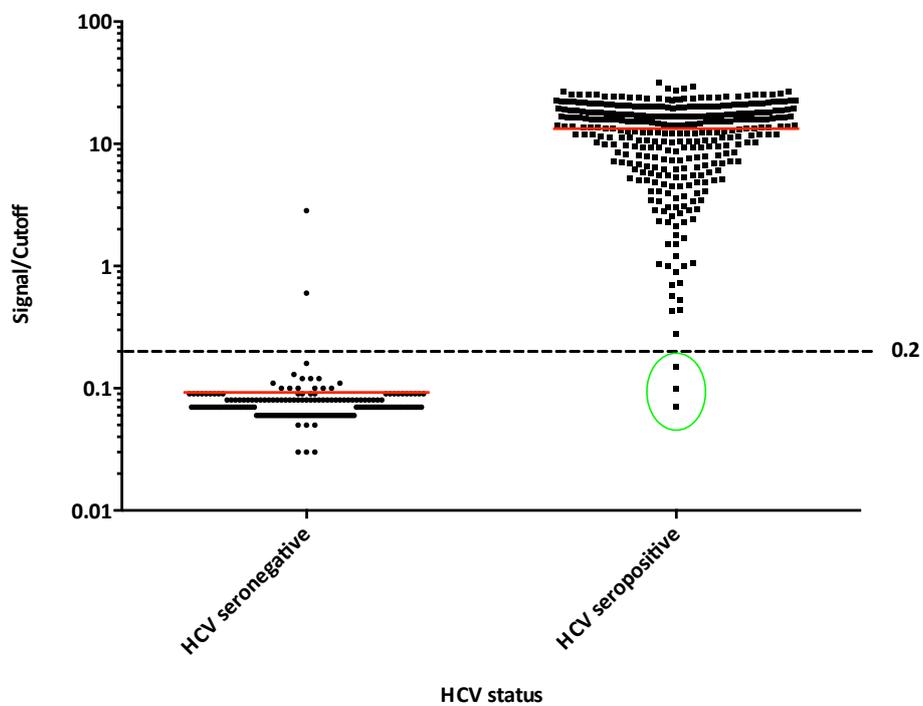


Figure 3 : Valeurs des ratios signal/seuil en fonction du statut sérologique vis-à-vis du VHC

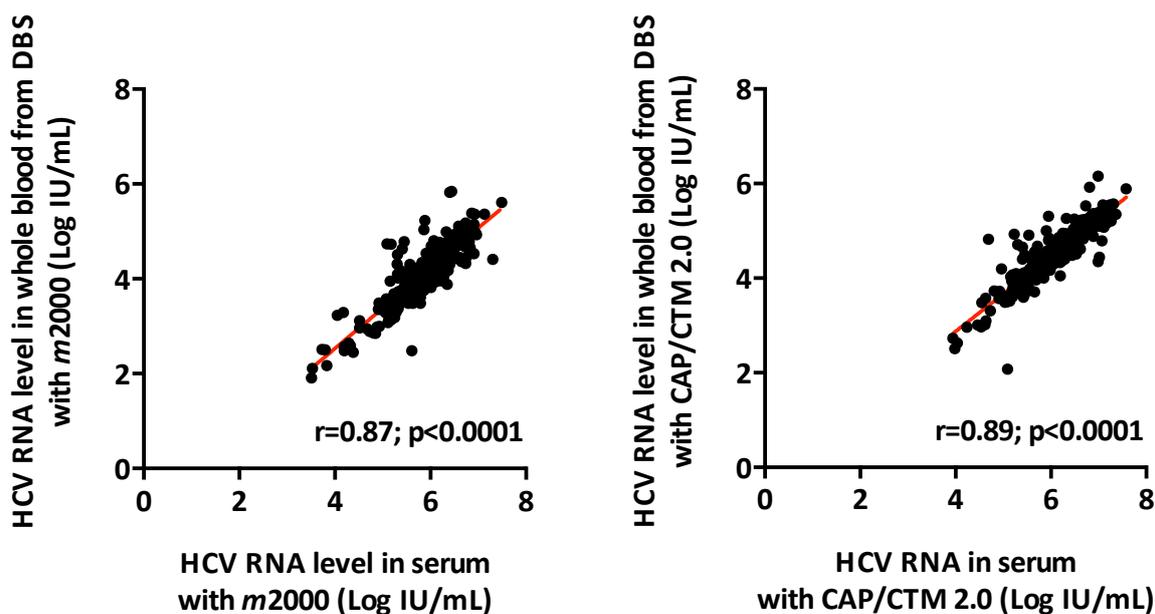


Figure 4 : Corrélation des valeurs d'ARN du VHC déterminées à partir de sang total déposé sur DBS et celles déterminées à partir du sérum, mesurées par les plates-formes de PCR en temps réel *m2000* (A) et *CAP/CTM96 2.0* (B).

Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Aucune technique n'a été transférée à d'autres laboratoires au cours de l'exercice 2013.

2.2. Activité d'expertise de l'année 2013

Nombre de souches ou prélèvements réceptionnés

Au total, le nombre de prélèvements envoyés au CNR a été de 117. Ces prélèvements provenaient exclusivement de laboratoires hospitaliers français.

Nombre de souches testées pour leur sensibilité aux antiviraux

Au cours de l'année 2013, plusieurs recherches de mutations de résistance aux analogues nucléos(t)idiques utilisés dans le traitement de l'hépatite chronique B ont été réalisées par le CNR dans le cadre d'un échec thérapeutique secondaire (10 demandes au total). Ces demandes émanaient d'hôpitaux parisiens (Robert Debré et Henri Mondor) pour

2 d'entre elles et les 8 autres venaient des hôpitaux de Caen, Clermont-Ferrand et Nevers. Un seul patient coinfecté VIH-VHB abritait une population virale majoritaire ayant des substitutions amino acidiques aux positions 80, 180 et 204 capables de conférer une résistance à la lamivudine, à l'emtricitabine et une diminution de sensibilité à l'entecavir.

Au cours de l'année 2013, aucune recherche de mutations de résistance aux antiprotéases de 1^{ère} génération 1^{ère} vague (boceprevir et telaprevir) utilisés dans le traitement de l'hépatite chronique C a été réalisée par le CNR.

3. Activités de surveillance

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

Surveillance de l'hépatite chronique B au sein des Pôles de Référence. Parmi les 2845 patients nouvellement pris en charge pour leur hépatite chronique B à travers les Pôles de Référence et Réseaux hépatites (59% d'hommes, d'âge moyen 36,0 ans, dont 19% nés dans un pays de faible endémicité et 81% dans un pays de forte ou moyenne endémicité), 620 individus ont été inclus dans le volet virologique de l'étude. La grande majorité d'entre eux (93,2%) étaient infectés par un virus mutant de la région pré-C/C (AgHBe-négatif), proportion plus importante que celle rapportée dans l'étude de Zarski et *al.* en 2006 (Zarski et al., J Hepatol 2006). A la prise en charge, les médianes du titre de l'AgHBs et de la charge virale (ADN du VHB) étaient respectivement de 3,15 Log₁₀ UI/mL et 3,60 Log₁₀ UI/mL. Environ, 64% des patients avaient un ADN du VHB inférieur à 2000 UI/mL et 15.8% avaient un ADN indétectable (<1,2 Log IU/mL). Le génotype viral a été déterminé chez 461 patients. Les génotypes D (33,8%), E (27,6%) et A (25,4%) étaient les plus fréquents. Le titre de l'AgHBs sérique était positivement corrélé à la charge virale, et ce indépendamment du génotype viral. Le titre de l'AgHBs était également significativement associé au statut HBe. Cette corrélation était plus forte chez les patients AgHBe-positif que chez les patients AgHBe-négatif.

6.2. Surveillance de la résistance aux antiviraux

Prévalence de la résistance primaire aux analogues nucléos(t)idiques. La prévalence de la résistance primaire a été évaluée chez 386 patients nouvellement pris en charge pour leur hépatite chronique B à travers les Pôles de Référence et Réseaux Hépatites pour lesquels l'ADN du VHB était supérieur à $2 \text{ Log}_{10} \text{ IU/mL}$ à l'aide d'une méthode de séquençage à haut débit ultra-sensible (UDPS), qui permet la détection des variants viraux minoritaires (seuil de détection d'environ 1%). Les résultats sont d'ores et déjà disponibles pour 183 patients. Plus de 1 326 000 séquences ont été analysées. Au total, 75 patients (40,3%) étaient infectés par des variants minoritaires résistants aux analogues nucléos(t)idiques (RAV), qui étaient généralement présents en faibles quantités (0,3%-20%). En effet, 26,9%, 9,7%, 1,6% et 1,6% des patients abritaient des virus résistants présents en quantité respectivement, inférieure à 1%, entre 1% et 5%, entre 5% et 10%, et entre 10% et 20%. Seulement 3 patients avaient des RAV qui représentaient plus de 20% de la population virale. De plus, l'analyse par UDPS révélait la présence de 3 régions hautement variables (jusqu'à 50% de variabilité nucléotidique) ; il s'agissait des régions 121-131, 216-221 et 266-271, et ce quel que soit le génotype VHB.

Dynamiques des populations virales du VHB au cours du traitement par adefovir. Au total 7 patients traités par adefovir et ayant développé une résistance à cette molécule au cours du traitement ont été étudiés. Environ 480 000 séquences, soit en moyenne 4010 ± 843 séquences par échantillon d'une longueur moyenne de 382 ± 31 nucléotides ont été analysées à partir de 119 échantillons (15-24 échantillons par patient). L'analyse des résultats a été réalisée à l'aide des logiciels Pyromute[®] et Pyrotree[®] développés dans le laboratoire. Les substitutions amino acidiques capables de conférer la résistance aux analogues nucléos(t)idiques étaient présentes chez la majorité des patients sous la forme de populations minoritaires (**Tableau 6**). La dynamique des variants résistants à l'adefovir était complexe et différait selon les patients, du fait de différences de fitness des variants résistants. L'analyse par UDPS montrait des vagues successives de variants résistants qui portaient de nombreuses mutations comprenant à la fois des mutations de résistance à des positions connues et des mutations à des positions non encore décrites dans la littérature.

Les variants résistants à l'adefovir étaient partiellement inhibés par le lamivudine (Rodriguez et al., Hepatology 2013).

Tableau 6 : Fréquence des substitutions amino acidiques susceptibles de conférer la résistance aux analogues nucléos(t)idiques avant la mise en route du traitement par adefovir chez des sujets naïfs de traitement

	ADN du VHB (Log IU/mL)	V173L	L180M	A181V/T	T184S/A/I/ L	R202G	M204V/I	N236T
Pt-1	6,6	<	<	0,47%	<	<	0,31%	0,25%
Pt-2	7,8	<	<	0,18%	<	<	<	<
Pt-3	6,8	<	<	0,22%	<	<	0,32%	<
Pt-4	5,5	<	<	<	0,17%	<	<	<
Pt-5	7,6	<	<	0,33%	<	<	<	<
Pt-6 ¹	6,2	<	<	<	<	<	<	<
Pt-7	6,1	<	<	0,33%	<	<	<	<
	Seuil²	0,05%	0,03%	0,08%	0,15%	0,18%	0,21%	0,22%

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

²Limite de détection

Dynamiques des populations virales du VHC au cours du traitement par telaprevir.

L'étude de Phase II PROVE-2 a évalué l'activité antivirale du telaprevir, chez 320 patients naïfs de tout traitement infectés par un VHC de génotype 1, administré en combinaison à l'interféron alpha, avec ou sans ribavirine. Vingt malades ont été inclus dans le service d'Hépatologie de l'hôpital Henri Mondor et les dynamiques des variants viraux sensibles et résistants au telaprevir ont été étudiées par UDPS. Six patients (3 infectés par un VHC de sous-type 1a et 3 par un sous-type 1b) recevant le telaprevir à la dose de 750 mg toutes les 8 heures en association à l'interféron alpha-2a pégylé à la dose de 180 µg par semaine sans ribavirine pendant 12 semaines ont rechuté sous traitement (non-répondeurs) ou après l'arrêt de celui-ci (répondeurs-rechuteurs), tandis qu'un patient sous trithérapie associant le telaprevir, l'interféron alpha pégylé et la ribavirine n'a pas éliminé le virus. Des mutations de résistance aux inhibiteurs de protéase pré-existaient, généralement à des taux faibles chez la majorité des patients non encore exposés aux inhibiteurs de protéase (**Tableau 7**). Un malade abritait cependant une majorité de variants résistants au telaprevir avant même le début du traitement (mutations à la position 54, >98%). L'étude de la dynamique des variants viraux résistants au telaprevir au moment de la ré-ascension de la charge virale a été caractérisée par UDPS. Elle était complexe et caractérisée : 1) par un enrichissement progressif en populations virales résistantes au telaprevir qui portaient de nombreuses

substitutions amino acidiques comprenant à la fois des mutations de résistance à des positions connues (36, 54, 155) et des mutations à d'autres positions probablement impliquées dans le fitness du virus résistant ; 2) par une décroissance progressive et très lente des populations résistantes au traitement débutant immédiatement après l'arrêt du telaprevir et leur remplacement par des populations sensibles (Chevaliez et al., manuscrit en préparation).

Tableau 7 : Fréquence des substitutions amino acidiques susceptibles de conférer la résistance aux antiprotéases avant la mise en route du traitement chez des sujets naïfs de traitement

	Type de réponse ¹	V36A/L/M	T54A/S	V55A	Q80R/K	R155K/T/Q	A156S/T/ V	D168A/V/T/ H	I170A/T
Pt-1	NR	0,33%	0,43%	0,30%	<	<	<	<	<
Pt-2	NR	98,6%	0,27%	0,47%	<	<	0,53%	<	<
Pt-3	RR	<	<	0,23%	<	<	0,37%	<	<
Pt-4	RR	1,30%	<	<	<	<	<	<	0,30%
Pt-5	RR	0,27%	0,23%	0,27%	<	<	<	<	<
Pt-6	RR	0,30%	<	0,30%	<	<	<	<	<
Pt-7	RR	0,30%	98,17%	0,47%	0,23%	<	<	<	<
Pt-8	RVS	0,30%	0,23%	0,60%	<	<	0,37%	<	<
Pt-9	RVS	<	0,27%	0,63%	<	<	<	<	<
Pt-10	RVS	0,43%	<	0,27%	<	<	<	<	<
Pt-11	RR	0,57%	<	0,33%	<	<	0,33%	<	<
Pt-12	RVS	0,30%	0,30%	<	0,30%	<	<	<	<
Pt-13	RVS	0,40%	0,33%	0,33%	3,80%	<	<	<	0,30%
Pt-14	NR	0,23%	<	0,27%	<	<	<	<	<
Pt-15	RVS	0,30%	0,90%	0,30%	<	<	<	<	<
Pt-16	RVS	<	0,25%	0,30%	<	<	<	<	<
Pt-17	RVS	0,37%	0,23%	0,23%	<	0,80%	<	<	<
Pt-18	RVS	0,60%	0,80%	<	0,30%	<	<	<	<
Seuil²		0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%

¹Type de réponse au traitement : RVS (réponse virologique soutenue) ; RR (répondeur-rechuteur) ; NR (non répondeur)

Pt-1 à Pt-7 : bithérapie avec pegIFN et telaprevir

Pt-8 à Pt-13 : trithérapie avec pegIFN, ribavirine et telaprevir

Pt-14 à Pt-18 : bithérapie pégylée

3.3. Participation aux réseaux de surveillance

Le CNR participe à la surveillance nationale sur les hépatites B et C (LaboHEP), dont l'objectif était d'estimer l'activité de dépistage des hépatites B et C et l'incidence de l'hépatite aiguë B. Le Laboratoire de Virologie du GH Henri Mondor regroupe l'activité de dépistage des hépatites B et C de 5 hôpitaux : Henri Mondor (94), Albert Chenevier (94), Emile Roux (94), Joffre-Dupuytren (91) et Georges Clémenceau (91). En ce qui concerne le dépistage des hépatites aiguës B, 677 prélèvements avaient des IgM anti-HBc dont 6 étaient

positifs pour la première fois dans le laboratoire. Après examens des cas, 2 patients étaient des porteurs chroniques et un patient était AgHBs-négatif (suspicion d'hépatite aiguë). En ce qui concerne l'activité de dépistage B et C, respectivement 9 616 et 9 440 tests pour la détection des anticorps anti-VHC et de l'AgHBs ont été réalisés. Parmi eux, 74 étaient positifs pour la 1^{ère} fois en anticorps anti-VHC, tandis que 73 étaient positifs pour la 1^{ère} fois pour la détection de l'AgHBs.

6.3. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

HEPATHER est une cohorte observationnelle multicentrique de patients infectés par le VHB et le VHC dont l'objectif est d'améliorer la prise en charge, compte tenu des évolutions thérapeutiques récentes avec l'arrivée de nouveaux médicaments sur le marché (sofosbuvir, simeprevir, daclatasvir prévue en septembre 2014). Le nombre de patients inclus à ce jour est d'environ 10 000 (60% VHC, 34% VHB et 6% VHC-VHB). Les caractéristiques cliniques des patients inclus sont présentées dans le **Tableau 8**. Quatre axes de recherche majeurs sont greffés sur cette cohorte : Epidémiologie et Santé Publique; Thérapeutique ; Virologie dans le cadre de l'AC33 (Directeur : Pr JM PAWLITSKY) ; Anatomopathologie et physiopathologie. L'un des objectifs au sein de l'axe virologique est la mise en place d'un observatoire nationale de la résistance (cohorte NEWAVE). L'objectif principal de cet observatoire est de mesurer la résistance virologique des patients en échec de traitement aux nouvelles molécules anti-VHC. L'objectif secondaire est l'étude de la dynamique des populations virales. Cela passera par la mise en place d'une base de données centralisée et le transfert de techniques simples appliquées à l'étude de la résistance vers les laboratoires partenaires.

Tableau 8 : Caractéristiques des individus inclus dans HEPATHER (ANRS CO-22)

Caractéristiques			Cirrhose		
	VHB	VHC		VHB	VHC
Coinfection virus delta	135	19	Suspicion de cirrhose	250	883
Transplantation	127	241	Encéphalopathie	5	9
Co-morbidité hépatique			Ascite	22	63
	VHB	VHC	Varices oesophagiennes	69	227
Diabète	251	674	Score de CHILD		
Hypertriglycémie	72	146	CHILD A	77	298
Hypercholestérolémie	254	428	CHILD B	15	53
Surpoids ou obésité	651	1071	CHILD C	3	12
HTA	612	1405	Manifestations extra-hépatiques		
Insulino-réistance	24	84		VHB	VHC
Hyperferritinémie	38	133	Vascularites	1275	368
Hépatopathie auto-immune	13	41	Insuffisance rénale	74	132
Hémochromatose	21	63	Arthralgies	288	724

4. Alerte

Investigation des cas isolés et groupes de transmission

L'investigation de nombreux cas isolés et de quelques cas groupés de transmission du VHB et du VHC, en particulier dans un contexte de transmission nosocomiale de ces virus, a été réalisée au CNR. La transmission des résultats à l'InVS se fait via l'adresse suivante : noa-signalement@invs.sante.fr.

Transmission du VHC en hémodialyse. L'étude génétique et phylogénique menée au niveau de 3 régions du génome viral (portion du gène NS5B, gène codant le glycoprotéine d'enveloppe E1 et région HVR1) chez le patient source et les cas index suspectés (au nombre de 3) a montré que les séquences nucléotidiques présentaient des pourcentages d'homologie variables en fonction de la région considérée (**Tableau 9**).

Tableau 9 : Pourcentage d'homologie nucléotidique entre le cas index suspecté (Pt-1) et les cas secondaires potentiels (Pt-2, Pt-3 et Pt-4)

Patient	% d'homologie nucléotidiques	
	E1 (551 nt)	HVR1 (81 nt)
Pt-1 (cas index suspecté)	100	100
Pt-2*	95,5%-95,6%	69,1%
Pt-3*	95,5%-95,6%	65,4%
Pt-4	98,5%-98,7%	96,3%

*Pourcentage d'homologie des séquences de la région HVR1 entre Pt-2 et Pt-3 : 96,3%.

En effet, les séquences de la région E1 avaient un fort pourcentage d'homologie (95,5% à 98,7%). Si l'on considère les séquences de la région HVR1, l'homologie nucléotidique était importante entre les patients Pt-1 et Pt-4 (96,3%) d'une part et les patients Pt-2 et Pt-3 (96,3%) d'autre part. L'étude de la région E1, fondée sur l'alignement des séquences obtenues avec 52 séquences nucléotidiques de génotype 1a, disponibles dans les banques, montrait que les souches isolées des 4 patients étaient phylogéniquement très proches, et plus proches les unes des autres que de chacune des autres séquences prototypes incluses dans l'analyse (valeur de ré-échantillonnage : 86%-100%) (**Figure 5**). Lorsque l'on étudiait la région HVR1 par comparaison avec 27 séquences nucléotidiques de génotype 1a disponibles dans les banques, les souches des 4 patients formaient 2 groupes phylogéniques distincts avec des valeurs de ré-échantillonnage élevées au niveau de chaque groupe (respectivement, 96% et 99%). L'un était formé par les souches isolées des patients Pt-1 et Pt-4, l'autre par les souches isolées des patients Pt-2 et Pt-3 (**Figure 6**).

Au total, les analyses des souches de VHC issues des 4 patients suggéraient très fortement que les cas index (Pt-2, Pt-3 et Pt-4) avaient été infectés au cours d'une séance d'hémodialyse à partir du sang du patient source (Pt-1).

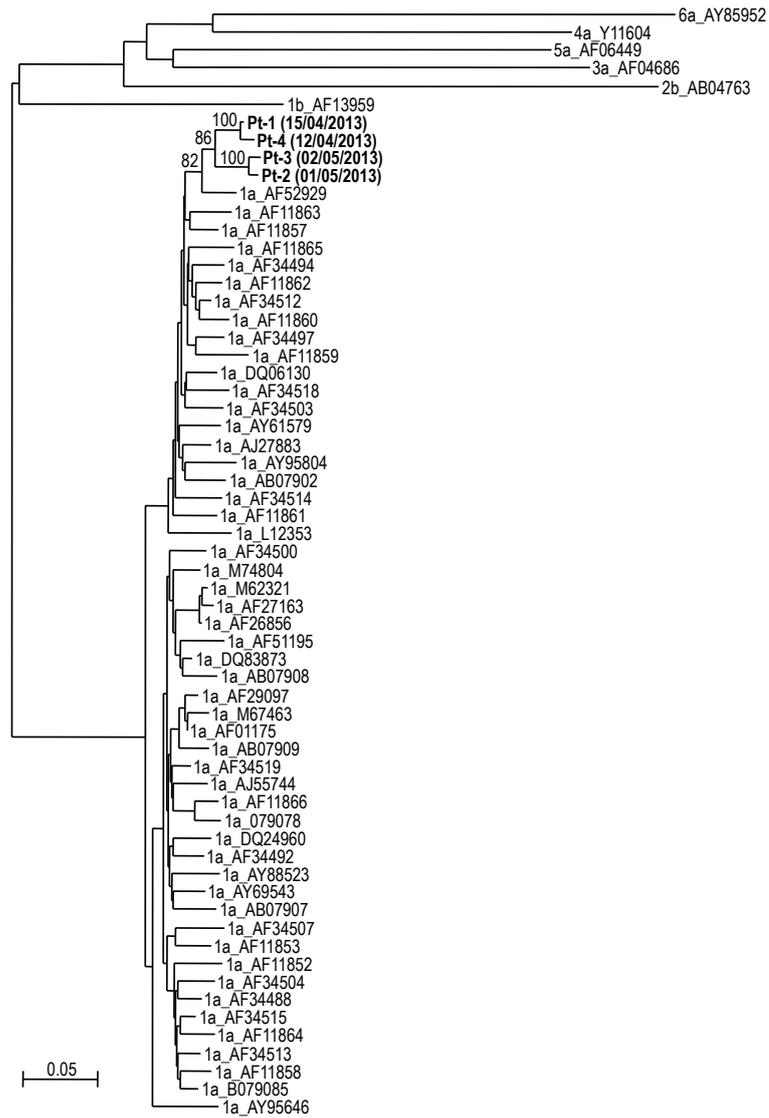


Figure 5 : Phylogénie de la région codant la glycoprotéine E1 du VHC (551 pb). Analyse réalisée par DNADIST (Phylip 3.65), Kimura 2-parameter, Ts/Tv 2.0. Les chiffres indiqués au niveau des nœuds correspondent aux pourcentages de 1 000 rééchantillonnages.

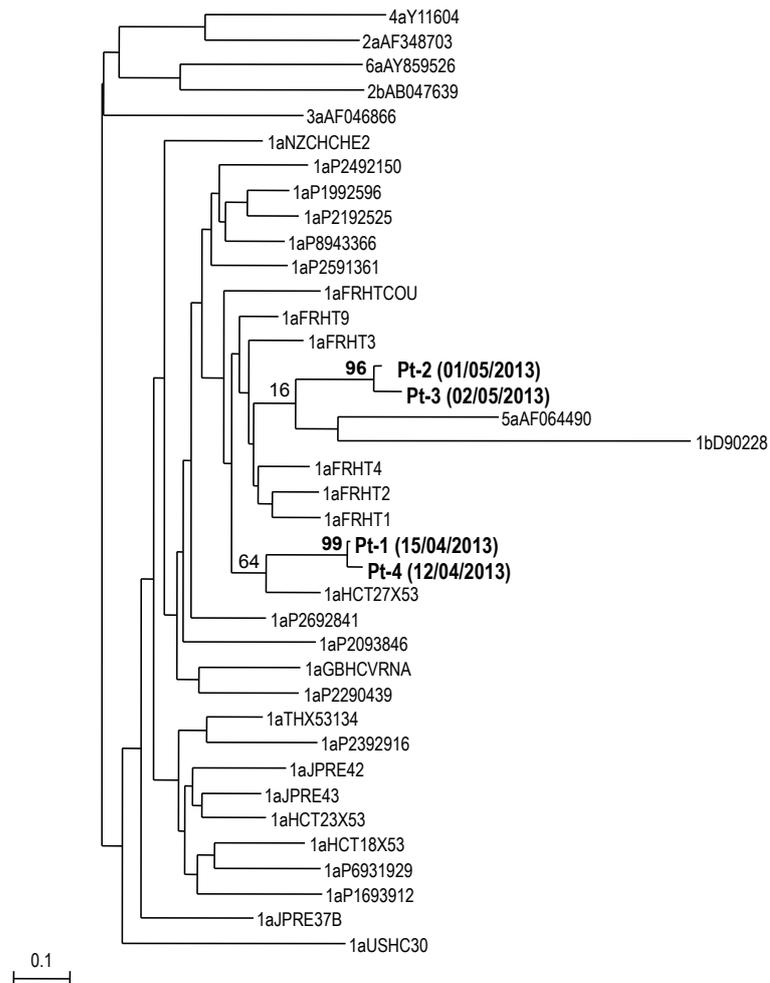


Figure 6 : Phylogénie de la région HVR1 du VHC (81 nucléotides). Analyse réalisée par DNADIST (Phylip 3.65), Kimura 2-parameter, Ts/Tv 2.0. Les chiffres indiqués au niveau des nœuds correspondent aux pourcentages de 1 000 re-échantillonnage.

Estimation de la date de contamination par le VHC chez un patient transplanté hépatique. En effet, il s'agissait d'un patient transplanté et polytransfusé, pour lequel il avait été récemment diagnostiqué une hépatite aiguë C à distance de sa greffe hépatique réalisée en mars 2010. Afin d'estimer la date de contamination, l'ensemble des prélèvements disponibles en sérothèque ont été testés. Nous avons réalisé lorsque le volume le permettait une détection des anticorps anti-VHC à l'aide de trousses de 3^{ème} génération (Vitros ECITM de chez Ortho-Clinical Diagnostics et Access HCV Ab PLUS assay de chez Bio-Rad), ainsi qu'une détection-quantification de l'ARN par une méthode de PCR en temps réel (Abbott m2000, limite de détection-quantification à 12 UI/mL ; Roche Cobas AmpliPrep Cobas

TaqMan HCV v2.0, limite de détection-quantification à 15 UI/mL). Les résultats sont présentés dans le **Tableau 10**.

Tableau 10 : Résultats des analyses virologiques, sérologiques et moléculaires.

Date de l'échantillon	Anticorps anti-VHC				ARN du VHC (Log ₁₀ UI/mL)	
	Vitros ECI™		Access HCV Ab PLUS		m2000	CAP/CTM HCV v2.0
	ratio	interprétation	ratio	interprétation		
02/06/2009	0,18	négatif				
12/01/2010	0,16	négatif				
26/02/2010	0,14	négatif				
17/03/2010	0,15	négatif			<1,1	
TRANSPLANTATION HEPATIQUE LE 18 MARS 2010						
29/03/2010	0,02	négatif				<1,2
06/04/2010	0,02	négatif	0,05	négatif		<1,2
12/04/2010					2,20	
19/04/2010	0,02	négatif	0,18	négatif	1,95	
22/02/2011 ^a	0,13	négatif			2,60	
21/04/2011 ^a						2,90
12/03/2013	20,2	Positif			5,54	
23/07/2013 ^b	22,7	Positif	8,26	Positif	5,73	

^aSang total

^bDétermination du génotype VHC par INNO Lipa v2.0 : génotype 3a

Les résultats des examens virologiques pratiqués à partir des échantillons disponibles en sérothèque ont montré la présence d'ARN du VHC à un niveau faible (aux alentours de 2 Log, quelle que soit la technique utilisée) sur l'échantillon datant du mois d'avril 2010, en l'absence d'anticorps anti-VHC. Au mois de février 2011, soit 10 mois plus tard), une légère augmentation de la charge virale était observée (ARN VHC à 2,60 Log UI/mL) toujours en l'absence d'anticorps. La valeur de la charge virale était probablement sous estimée du fait que cette dernière avait été déterminée à partir d'un échantillon de sang total congelé. Ce n'est qu'en 2013 qu'une charge virale supérieure à 5 Log (valeur habituellement observée chez la majorité des patients mono-infectés en l'absence de traitement antiviral) était mise en évidence associée cette fois-ci à la présence d'anticorps anti-VHC.

Au total, il s'agissait d'un patient qui avait été contaminé par le VHC à une date antérieure au 12 avril, date à laquelle de l'ARN viral était détecté.

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

Enseignements

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

- . Cours magistraux sur les hépatites A, B, C, D, E et entérovirus
- . Cas cliniques

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

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

Enseignement aux étudiants de DFGSM3 de la faculté de Médecine de Créteil (Université Paris-Est-Créteil, UPEC)

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

Enseignement aux étudiants de DCEM4 de la faculté de Médecine de Créteil (Université Paris-Est-Créteil, UPEC)

- . Cours magistral de virologie clinique

Enseignement dans le cadre du Master M2 de la Faculté de Pharmacie, Mention Ecologie microbienne, Pathogénie des microorganismes et Anti-infectieux : "Variabilité génétique et hépatite C, résistance à l'interféron", Faculté de Pharmacie, Université Paris 11.

Enseignement dans le cadre du Master M2 Biologie-Santé, Mention Adaptation des Virus et ATNC à leur Environnement : "Les quasiespèces virales : exemple du VHC", Université de Versailles St Quentin en Yvelines.

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

Enseignement de la virologie aux internes et aux externes du Département de Virologie, Bactériologie - Hygiène et Mycologie – Parasitologie

Formation aux professionnels de santé

1. Diagnostic de l'infection virale C dans la sang capillaire et le liquide cravculaire à l'aide de TROD". Journée Nationale de Lutte Contre les Hépatites B et C, Paris, 30 mai 2013.
2. "Vers un traitement plus précoce des hépatites B?". ACP Hépatite B, Paris, 4 avril 2013.

Accueil de stagiaire

Ana Flavia PIRES (Brésil)

Babacar FAYE (Dakar, Sénégal)

Activités d'expertise auprès des organismes de tutelles

- . Membre du groupe de travail sur les tests rapides d'orientation diagnostique (TROD) auprès de la DGS
- . Membre du comité de suivi et de prospective du plan national de lutte contre les hépatites B et C, en tant que personne qualifiée
- . Membre des groupes d'experts pour le Rapport sur les Hépatites Virales B et C et coordination du groupe sur les tests virologiques et sur du groupe sur le recherche sur les hépatites virales (rapport Dhumeaux 2014)
- . Audition par le groupe de travail " Place des tests rapides d'orientation diagnostique (TROD) dans la stratégie de dépistage de l'hépatite C" de la HAS.
- . Audition par l'ANSM à propos de la mise en place des ATU pour les médicaments du traitement de l'hépatite chronique C (simeprevir, dacaltasvir)

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

6.1. Activité de recherche

Etude de la variabilité génétique naturelle et associée à la chimiothérapie antivirale des virus d'hépatite B et C

Etude des mécanismes moléculaires d'action de la ribavirine au cours du traitement de l'hépatite chronique C. La ribavirine est un analogue nucléosidique de la guanosine à large spectre antiviral. Au cours de l'hépatite chronique C, elle est un élément essentiel du traitement antiviral. En effet, elle augmente très significativement les taux de guérison de l'infection chronique par le VHC lorsqu'elle est administrée en combinaison à des antiviraux directs (antiprotéases, antipolymérase) en présence ou non d'interféron (IFN) pégylé. Le principal mode d'action de la ribavirine est de prévenir les rechutes en accélérant la clairance ou la guérison des cellules infectées dans un contexte de blocage efficace de la production de virus (Bronowicki et al., 2006). Les mécanismes d'action moléculaire de la ribavirine restent cependant inconnus. Plusieurs hypothèses ont été formulées [inhibition directe de la polymérase virale (protéine NS5B), inhibition de l'inosine monophosphate deshydrogénase (IMPDH), effet mutagène, propriétés immunomodulatrices, modulation des gènes induits par l'IFN]. Le rôle prépondérant d'aucun de ces mécanismes n'a cependant été confirmé au cours du traitement de l'hépatite chronique C.

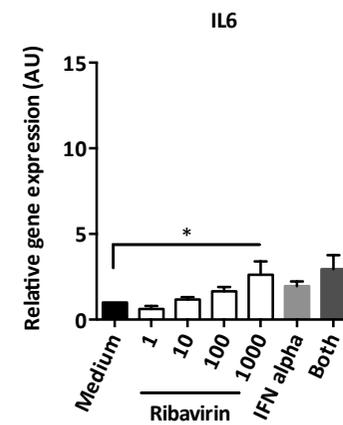
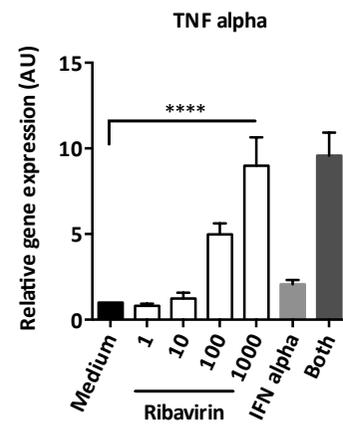
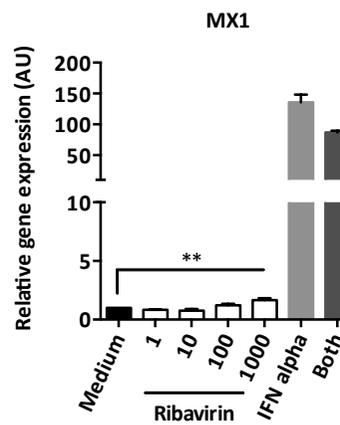
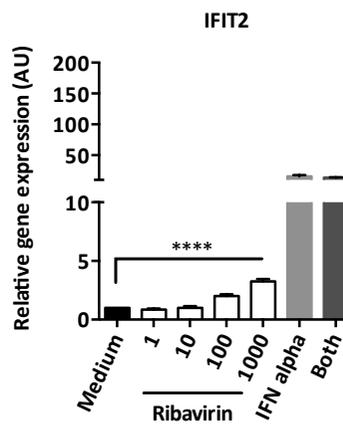
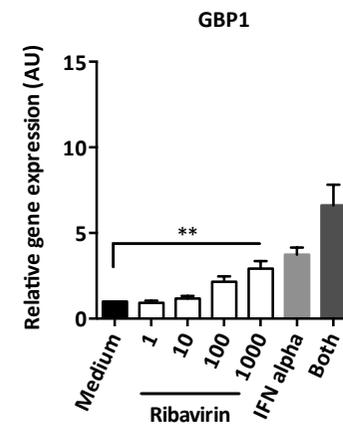
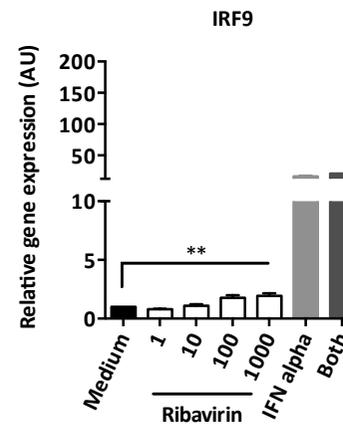
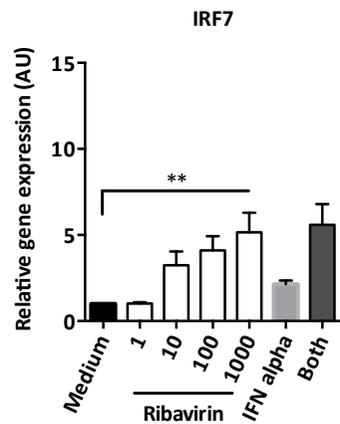
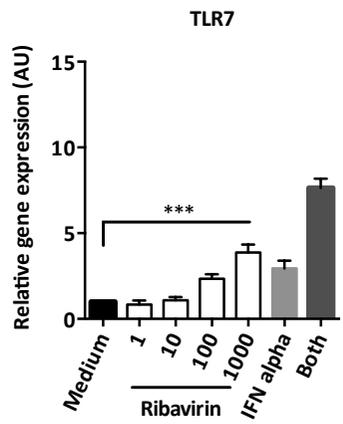
Le but de ce travail était de comprendre le mécanisme moléculaire d'action de la ribavirine dans l'infection virale C *in vitro* à l'aide de différents modèles cellulaires : lignées humaines d'hépatomes, et cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Ces dernières sont des cellules clés de la réponse immune car elles sécrètent de grandes quantités d'IFN de type I.

L'analyse de l'expression génique dans des cellules hépatocytaires immortalisées (Huh7) non infectés et traités par la ribavirine a montré une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la réponse à l'interféron. Il s'agissait des gènes codant le TLR7 (*Toll-*

like Receptors), l'IRF7 (*Interferon Regulatory Factor*), l'IRF9, TNF (*Tumor Necrosis Factor*) alpha et l'IL6 (**Figure 7**). Différentes concentrations de ribavirine (0, 1, 10, 100 et 1000 µg/mL) et différents temps (0, 30 min, 2 h, 8 h, 24 h et 48 h) ont été testés. L'effet observé était dose-dépendant. L'effet maximum était observé 24 heures post-traitement. Des effets additifs, voire synergiques ont été obtenus par traitement des cellules Huh7 par la ribavirine (100 et 1000 µg/mL) en association à l'interféron alpha à la dose de 100 UI/mL. L'effet observé était d'autant plus important que la concentration en ribavirine augmentait d'un facteur 10. Afin d'élucider comment la ribavirine était capable d'affecter la transcription de certaines gènes, nous avons évalué l'effet de la ribavirine sur l'activation de l'IRF7 et de NFκB (*Nuclear Factor kappa B*), 2 facteurs de transcription qui jouent un rôle majeur dans l'amplification de la voie de signalisation de l'IFN. Des cellules Huh7 ont été traitées par différentes doses de ribavirine (0, 10, 100 et 1000 µg/mL) pendant 24 heures. La quantification des facteurs de transcription nucléaires (IRF7 et NFκB) a été réalisée au moyen d'une trousse commerciale standardisée (TransAM™ IRF7 et TransAM™ NFκB). Chaque puit de la microplaque est recouvert avec un oligonucléotide contenant un site consensus de liaison spécifique de l'IRF7 ou de NFκB. Les facteurs de transcription activés sont alors quantifiés par spectrophotométrie. La ribavirine était capable d'induire l'activation du facteur de transcription NFκB (**Figure 8**). L'effet observé était dose-dépendant. La ribavirine n'avait aucun effet sur l'activation de l'IRF7. Bien que NFκB puisse jouer un rôle majeur à travers l'amplification de la voie de signalisation de l'IFN, la production d'IFN est initiée par la reconnaissance d'un TLR. La ribavirine avait un effet sur l'expression du gène codant le TLR7. En utilisant des cellules HEK (*Human Embryonic Kidney cells*) exprimant le TLR7 et un gène rapporteur inducible (SEAP codant la phosphatase alcaline), nous avons montré que la ribavirine activait sélectivement le TLR7 et ce, de façon dose-dépendante (**Figure 9**). De plus, le traitement des cellules par l'imiquimod ou la loxoribine (agonistes puissants du TLR7) en présence de ribavirine augmentait significativement l'activité du TLR7. La stimulation du TLR7 par la ribavirine induisait la sécrétion de cytokines telles que l'IFN de type I dans des cellules humaines d'hépatomes.

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

signalisation de l'IFN. Ce travail a fait l'objet de communications à des congrès internationaux (EASL et AASLD) et est en cours de finalisation pour l'écriture d'un article.



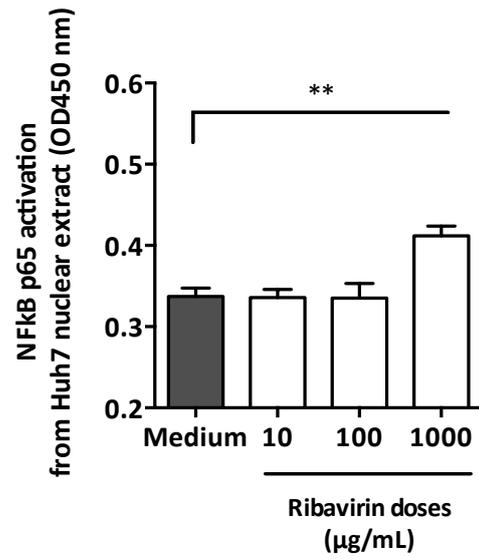
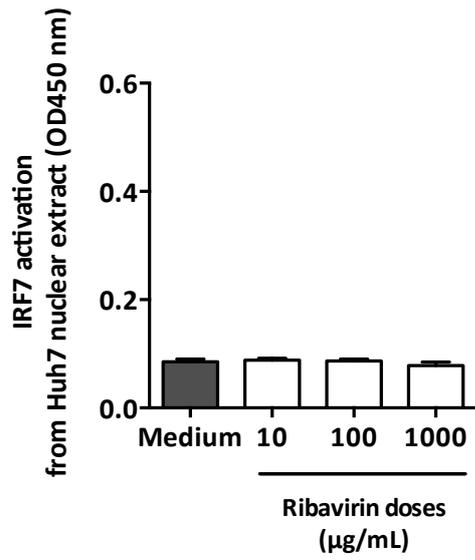
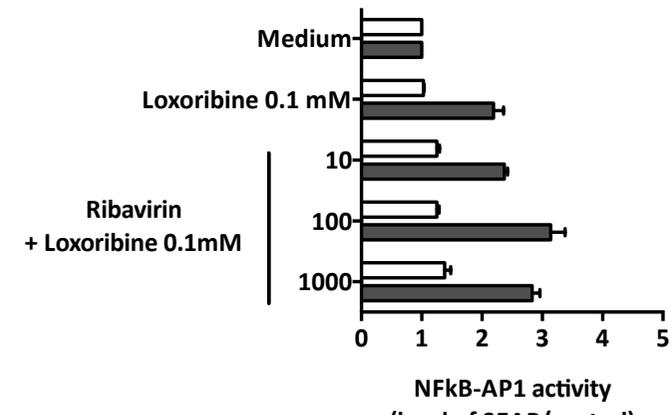
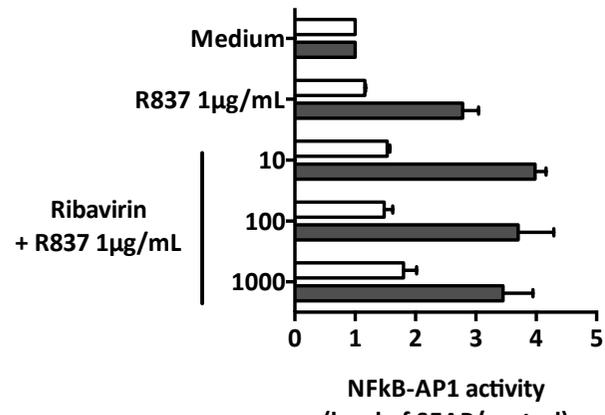
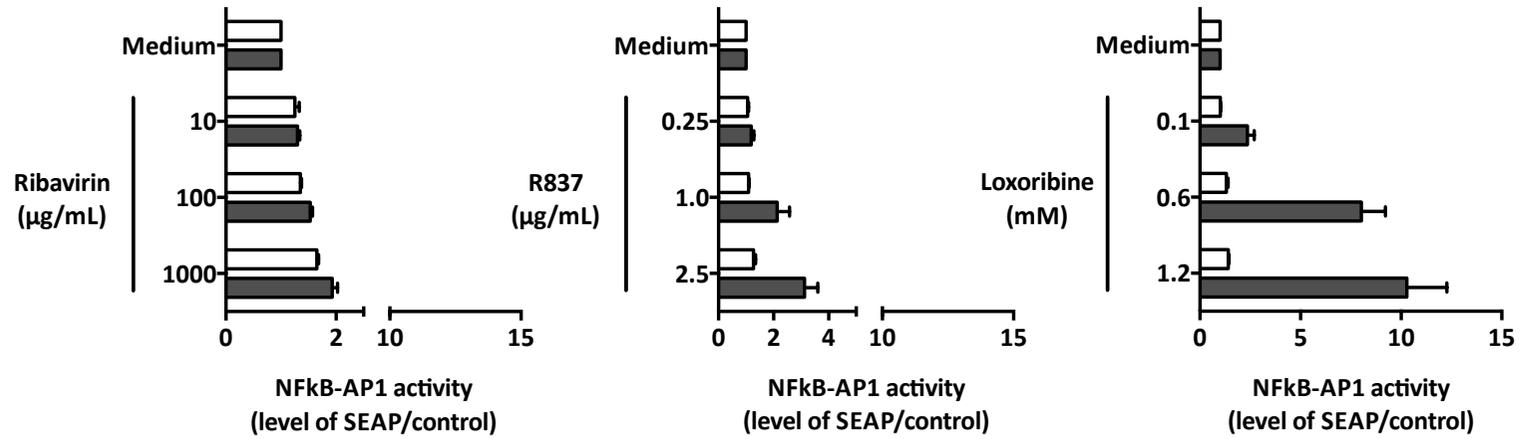


Figure 8 : Quantification de l'activation des facteurs de transcription IRF7 (A) et NFκB (B) après traitement de cellules Huh7 par la ribavirine (0, 10, 100 et 1000 µg/mL) pendant 24 heures.

□ HEK-Null cells ■ HEK-TLR7 cells



Dynamiques des populations virales du VHB au cours du traitement par adefovir.

Ce travail présenté dans la section “surveillance de la résistance aux antiviraux” a fait l’objet d’une publication en 2013 dans HEPATOLOGY (Rodriguez et al.,).

Dynamiques des populations virales du VHC au cours du traitement par telaprevir.

Ce travail présenté dans la section surveillance de la résistance aux antiviraux est en cours de finalisation pour l’écriture d’un article.

Autres activités de recherche du laboratoire

Le laboratoire développe de nombreuses autres activités de recherche. Sur le plan clinique, en collaboration avec le service d’Hépatologie de l’hôpital Henri Mondor, le laboratoire a mis en place et participe actuellement à environ une vingtaine de protocoles cliniques testant l’efficacité et la tolérance de nouvelles molécules utilisées dans le traitement de l’hépatite C.

L’équipe de recherche “Physiologie et Thérapeutique des Hépatites Virales Chroniques et des Cancers Liés (Directeur : Pr JM Pawlotsky) de l’Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB), Unité INSERM U955 poursuit également une recherche translationnelle dans deux domaines principaux. Le premier est le développement de nouvelles approches thérapeutiques et l’étude des mécanismes moléculaires de la résistance aux antiviraux développés contre le VHC et le VHB. De nouveaux inhibiteurs ont été découverts au laboratoire, en collaboration avec des équipes de chimistes, et sont actuellement en phase de caractérisation pré-clinique, en particulier une toute nouvelle famille d’inhibiteurs des cyclophylines non dérivés de la cyclosporine A, des membres de la famille des aurones, et des Flavonoïdes (ces 2 derniers groupes de molécules agissant comme des inhibiteurs non nucléosidiques de l’ARN polymérase virale). L’étude génétique de la résistance est fondée sur l’utilisation d’approches fondées sur le séquençage de nouvelle génération (NGS) et de logiciels originaux d’analyse des données développés au laboratoire. Les mécanismes moléculaires de la résistance sont étudiés dans différents systèmes expérimentaux enzymatiques acellulaires, ou dans des systèmes cellulaires de

réplication et d'infection par le VHC, grâce à des approches combinant mutagenèse dirigée et utilisation de cassettes comprenant les séquences virales des individus infectés et éventuellement traités. Le deuxième thème de recherche majeur concerne l'étude des mécanismes des lésions hépatiques associées à l'infection par le VHC à l'aide de modèles murins transgéniques et de modèles cellulaires. Les différents aspects étudiés sont la capacité de l'expression des protéines virales de jouer un rôle dans les perturbations métaboliques associées à l'hépatite chronique C (perturbations du métabolisme lipidique, insulino-résistance, diabète de type 2), dans la progression de la fibrose et dans la survenue du CHC. L'hépatocarcinogenèse viro-induite, les mécanismes de la croissance tumorale et le rôle du micro-environnement hépatique, et le développement d'approches préventives du CHC chez les malades cirrhotiques constituent le deuxième axe majeur du laboratoire pour les prochaines années.

6.2. Publications et communications

Publications internationales

1. Rodriguez C, Chevaliez S, Bensadoun P, Pawlotsky JM. Characterization of the dynamics of hepatitis B virus resistance to adefovir by ultra-deep pyrosequencing. *Hepatology* 2013; 58(3): 890-901.
2. Vallet S, Larrat S, Laperche S, Le Guillou-Guillemette H, Legrand-Abravanel F, Bouchardeau F, Pivert A, Henquell C, Mirand A, André-Garnier E, Giordanengo V, Lagathu G, Thibault V, Scholtes C, Schvoerer E, Gaudy-Graffin C, Maylin S, Trimoulet P, Brochot E, Hantz S, Gozlan J, Roque-Afonso AM, Soussan P, Plantier JC, Charpentier C, Chevaliez S, Colson P, Mackiewicz V, Aguilera L, Rosec S, Gouriou SD, Magnat N, Lunel-Fabiani F, Izopet J, Morand P, Payan C, Pawlotsky JM. Multicenter quality control of hepatitis C virus protease inhibitor resistance genotyping. *J Clin Microbiol* 2013; 51(5): 1428-33.
3. Chevaliez S, Hézode C, Bahrami S, Grare M, Pawlotsky JM. Long-term hepatitis B surface antigen (HBsAg) kinetics during nucleoside/nucleotide analogue therapy: finite treatment duration unlikely. *J Hepatol* 2013; 58(4): 676-683.
4. Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Rodriguez C, Soulier A, Poveda JD, Pawlotsky JM. The Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV Test, version 2.0 Real-time PCR Assay Accurately Quantifies Hepatitis C Virus Genotype 4 RNA. *J Clin Microbiol* 2013; 51(4): 1078-82.
5. Chevaliez S. New markers for diagnosis and management of chronic hepatitis C virus infection. *Ann Gastroenterol* 2013, 26(2): 98-99.

6. Chevaliez S. Is HBsAg quantification ready for prime time? *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2013, 37(6): 559-563.
7. Pascarella S, Clément S, Dill T, Conzelmann S, Lagging M, Missale G, Neumann AU, Pawlotsky JM, Zeuzem S, Rubbia-Brandt L, Bochud PY, Negro F. Intrahepatic mRNA levels of SOCS1 and SOCS3 are associated with cirrhosis but do not predict virological response to therapy in chronic hepatitis C. *Liver Int* 2013; 33: 94-103.
8. Söderholm J, Waldenström J, Pilli M, Bochud PY, Negro F, Askarieh G, Pawlotsky JM, Zeuzem S, Ferrari C, Neumann A, Haagmans BL, Missale G, Hellstrand K, Lagging M. Soluble CD26 impacts treatment outcome and associates with the functionality of HCV-specific T-cells in chronic hepatitis C virus genotype 1 infection. *PloS One*; 8: e56991.
9. Pawlotsky JM. Treatment of hepatitis C : how will we use viral kinetics, response-guided therapy ? *Curr Gastroenterol Rep* 2013; 15: 309.
10. Polyak SJ, Ferenci P, Pawlotsky JM. Hepatoprotective and antiviral functions of silymarin components in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2013; 57: 1262-1.
11. Pawlotsky JM. Treatment of chronic hepatitis C: current and future. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013; 369: 321-42.
12. Polyak SJ, Oberlies NH, Pécheur EI, Ferenci P, Pawlotsky JM. Silymarin for hepatitis C virus infection. *Antivir Ther* 2013; 18: 141-147.
13. Maqbool MA, Higgs M, Carmouse S, Pawlotsky JM, Lerat H. Regulation of hepatitis C virus replication by nuclear translocation of nonstructural 5A protein and transcriptional activation of host genes. *J Virol* 2013; 87: 5523-5539.
14. Pawlotsky JM. NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C. *J Hepatol* 2013; 59: 375-382.
15. Sulkowski MS, Bourlière M, Bronowicki JP, Asselah T, Pawlotsky JM, Shafran S, Pol S, Mauss S, Larrey D. Faldaprevir combined with peginterferon alfa-2a and ribavirin in chronic HCV genotype 1 patients with prior nonresponse: SILEN-C2 trial. *Hepatology* 2013; 57: 2155-2163.
16. Haudecoeur R, Peuchmaur M, Ahmed-Belkacem A, Pawlotsky JM, Boumendjel A. Structure-activity relationships in the development of allosteric hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase inhibitors: 10 years of research. *Med Res Rev* 2013; 33: 934-984.
17. Pawlotsky JM. Hepatitis C virus: standard-of-care treatment. *Adv Pharmacol* 2013; 67: 169-215.
18. Hézode C, Fontaine H, Dorival C, Larrey D, Zoulim F, Canva V, de Lédighen V, Poynard T, Samuel D, Bourlière M, Zarski JP, Raabe JJ, Alric L, Marcellin P, Riachi G, Bernard PH, Loustaud-Ratti V, Métivier S, Tran A, Serfaty L, Abergel A, Causse X, Di Martino V, Guyader D, Lucidarme D, Grando-Lemaire V, Hillon P, Féray C, Dao T, Cacoub P, Rosa I, Attali P, Petrov-Sanchez V, Barthe Y, Pawlotsky JM, Pol S, Carrat F, Bronowicki JP. Triple therapy in treatment-experienced patients with HCV-cirrhosis in

a multicentre cohort of the French early access programme (ANRS CO20-CUPIC)-nct01514890. *J Hepatol* 2013; 59: 434-441.

19. Higgs MR, Lerat H, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus-induced activation of beta-catenin promotes c-myc expression and a cascade of pro-carcinogenetic events. *Oncogene* 2013; 32: 4683-4693.
20. Chevaliez S, Soulier A, Poiteau L, Bouvier-Alias M, Pawlotsky JM. Clinical utility of hepatitis C virus core antigen quantification in patients with chronic hepatitis C. *article soumis*.

Communications nationales

1. Chevaliez S, Poiteau L, Rosa I, Soulier A, Roudot-Thoraval F, Hézode C, Pawlotsky JM. Dépistage de l'infection virale C à partir de sang capillaire ou de liquide craviculaire : performances des TRODs. 72^{ème} journées de l'Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF), Lille, 2-5 octobre 2013.
2. Chevaliez S, Poiteau L, Rosa I, Soulier A, Roudot-Thoraval F, Hézode C, Pawlotsky JM. Dépistage de l'infection virale C à partir de sang capillaire ou de liquide craviculaire : performances des TRODs. 18^{ème} journées annuelle du groupe Français d'Etudes Moléculaires des Hépatites (GEMHEP), Paris, 21 novembre 2013.

Communications internationales

1. Chevaliez S, Bensadoun P, Belle A, Pawlotsky JM. Ribavirin is a TLR7 agonist and its antiviral effect on HCV is at least partly related to the induction of IRF7 expression. 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Amsterdam, The Netherlands, April 24-28, 2013 (abstract: *Journal of Hepatology* 2013; 58 Suppl.1: S465).
2. Gatselis NK, Soulier A, Chevaliez S, Katel P, Muir AJ, Pawlotsky JM. Utility of serum samples for *IL28B* genotyping: a valuable source of genomic DNA. 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Amsterdam (The Netherlands), April 24-28, 2013 (abstract: *Journal of Hepatology* 2013; 58 Suppl.1: S187).
3. Rodriguez C, Chevaliez S, Darthuy F, Pawlotsky JM. Sequence analysis of the PreC/C region by ultra-deep pyrosequencing as a predictor of adefovir treatment outcome in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Amsterdam (The Netherlands), April 24-28, 2013 (abstract: *Journal of Hepatology* 2013; 58 Suppl.1: S314).
4. Chevaliez S, Poiteau L, Rosa I, Soulier A, Roudot-Thoraval F, Hézode C, Pawlotsky JM. Clinical performance of rapid diagnostic tests for broad-scale HCV screening. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD),

Washington DC (USA), November 1-5, 2013 (abstract: Hepatology 2013; 58(4) Suppl: 905A).

5. Chevaliez S, Soulier A, Poiteau L, Pawlotsky JM. Clinical utility of HCV core antigen quantification in patients with chronic hepatitis C. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Washington DC (USA), November 1-5, 2013 (abstract: Hepatology 2013; 58(4) Suppl: 913A).
6. Chevaliez S, Bensadoun P, Belle A, Pawlotsky JM. Ribavirin is a TLR7 agonist and its antiviral effect on HCV is at least partly related to the induction of IRF7 expression. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Washington DC (USA), November 1-5, 2013 (Abstract: Hepatology 2013; 58(4) Suppl: 1174A).

Conférences nationales sur invitation

Conférences internationales sur invitation

1. "How important is the selection of the RNA assay in the treatment of hepatitis C? 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Amsterdam, The Netherlands, 24-28 April 2013.
2. "Mechanisms of HCV resistance to DAA". The third Romanian-French Hepatology meeting. Bucharest, Romania, 9-11 October 2013 (Abstract: Romanian Journal of Hepatology 2013, 9(1): 40).
3. "HCV treatment: why to wait". 11th European Meeting on HIV and Hepatitis-Treatment Strategies and Antiviral Drug Resistance, Rome (Italy), 20-22 mars 2013.
4. "Optimal virological monitoring of HCV therapy". 11th European Meeting on HIV and Hepatitis-Treatment Strategies and Antiviral Drug Resistance, Rome (Italy), 20-22 mars 2013.
5. "Conduite à tenir devant un antigène HBs positif ou un ELISA VHC positif et actualités thérapeutiques". Congrès Maghrébin de Transfusion Sanguine, Marrakeck (Morocco), 28-30 mars 2013.
6. "Treatment of chronic hepatitis B: EASL clinical practice guidelines and beyond". 3rd Liver Disease Update Conference, Koweit City (Koweit), 5-6 avril 2013.
7. "Adverse events and their management in patients receiving triple therapy for hepatitis C". 3rd Liver Disease Update Conference, Koweit City (Koweit), 5-6 avril 2013.
8. "Future directions in HCV treatment". 3rd Liver Disease Update Conference, Koweit City (Koweit), 5-6 avril 2013.

9. "Future DAAs and their potential use in the setting of liver transplantation". 1st International Workshop on the Optimal Use of DAA's in Liver Transplanted Patients, Amsterdam (The Netherlands), 23 avril 2013.
10. "Advances in DAA-based thérapies :from triple therapy to interféron-free regimens". The International Liver Congress 2013. 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Amsterdam (The Netherlands), 24-28 avril 2013.
11. "Hepatitis C treatment pipeline: today and tomorrow". Abbott Symposium. The International Liver Congress 2013. 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Amsterdam (The Netherlands), 24-28 avril 2013.
12. "Alisporivir attributes in genotype 2/3 interferon-free regimens". Novartis Symposium. The International Liver Congress 2013. 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Amsterdam (The Netherlands), 24-28 avril 2013.
13. "Looking for the best all-oral combination: facing the issues". The International Liver Congress 2013. 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Amsterdam (The Netherlands), 24-28 avril 2013.
14. "Interventional studies". Hepatology Live, Athens (Greece), 17-19 mai 2013.
15. "Viral load monitoring in hepatitis C". Hepatology Live, Athens (Greece), 17-19 mai 2013.
16. "Natural course of HCV infection and impact of antiviral therapy". 2013 Virology Meeting, Lisbon (Portugal), 24-25 mai 2013.
17. "Virological tools and monitoring in the DAA era". White Nights of Hepatology, Saint-Petersburg (Russia), 6-7 juin 2013.
18. "Clinical implications of HCV resistance in DAA regimens". White Nights of Hepatology, Saint-Petersburg (Russia), 6-7 juin 2013.
19. "Management of HCV treatment failure". The 25th Sigrid Juselius International Symposium: Diagnosis and Therapy of Severe Liver Diseases, Helsinki (Finland), 9-12 juin 2013.
20. "Hepatitis C treatment update". 3rd Swedish-Danish Hepatitis Meeting, Malmö (Sweden), 29 août 2013.
21. "DAA therapy and the interferon-free era". 3rd Int. Symposium on Hepatitis Care for Substance Users (INHSU), Munich, 5-6 septembre 2013.
22. "HCV DAAs : classification and mechanisms of action". 10th International Meeting on Therapy in Liver Diseases, Barcelona (Spain), 17-20 septembre 2013.
23. "Looking for the best all-oral combination : facing the issues". Abbvie training, Barcelona (Spain), 19 septembre 2013.
24. "How are we going to treat HCV patients in 2015 ?" 1st London Liver Group Meeting, London (UK), 8 octobre 2013.
25. "The optimal interferon-free regimen". Jenny Heathcote Farewell Symposium, Toronto (Canada), 30 octobre 2013.

26. "Do we have enough drugs of hepatitis C yet ?" Early Morning Workshop, Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), 2-5 novembre 2013.
27. "Current treatment of chronic hepatitis C" ? 40th Chilean Congress of Gastroenterology, Pucon (Chile), 27-29 novembre 2013.
28. "Future treatments of hepatitis C". 40th Chilean Congress of Gastroenterology, Pucon (Chile), 27-29 novembre 2013.
29. "Current treatment of chronic hepatitis B". 40th Chilean Congress of Gastroenterology, Pucon (Chile), 27-29 novembre 2013.
30. "HBV, HCV and hepatocellular carcinoma". 40th Chilean Congress of Gastroenterology, Pucon (Chile), 27-29 novembre 2013

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

Sans objet

8. Programme d'activité 2014-2016

Les priorités des prochaines années seront :

1. La poursuite et le développement des alternatives au prélèvement veineux pour le diagnostic et le suivi des infections par les virus d'hépatites B et C (TROD, DBS)
2. La mise en place de l'observatoire national de la résistance aux traitements antiviraux (cohorte NEWAVE)
3. La poursuite de la mise en place de la plate-forme de séquençage de nouvelle génération (NGS) et l'application de ces méthodes à l'ensemble des études du CNR
4. La création d'un site web du CNR

Rapport annuel d'activité

2014

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

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

**Année d'exercice
2013**

1. Missions et Organisation du CNR

Missions

Voir annexe 1

Changements dans les effectifs des personnels

L'unité d'expertise en virologie de l'Institut National de la Transfusion Sanguine (INTS) comprend 15 personnes :

- 8 techniciens de laboratoires,
- 1 aide-laboratoire
- 3 ingénieurs
- 1 secrétaire,
- 1 adjoint au chef d'unité
- 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 :

- 5 techniciens,
- 1 ingénieur,
- 0,1 secrétariat,
- 0,5 responsable.

Le laboratoire

Trois secteurs d'activités peuvent être individualisés :

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

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

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

La démarche qualité

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

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

Cette année, nous avons participé à une étude pilote organisée par le QCMD pour l'étude moléculaire de la résistance du VHB vis-à-vis des molécules couramment utilisées dans la prise en charge thérapeutique de l'infection chronique.

2. Activités d'expertise

Activités d'expertise de l'année 2013

Expertise dans le domaine de la sécurité transfusionnelle

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

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

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

Expertise dans le domaine des outils de diagnostic

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

Evaluation comparative des trousse de quantification de l'AgHBs

La quantification de l'Ag HBs (qHBs) est aujourd'hui un marqueur important dans la prise en charge thérapeutique des patients chroniquement infectés par le VHB et divers dispositifs sont désormais disponibles. L'objectif de cette étude multicentrique (Biomnis, Ivry (Thoai Duong Ly), INTS, Paris (Syria Laperche, Annabelle Servant-Delmas), CH Paul Brousse, Villejuif (Anne-Marie Roque), CH Pitié-Salpêtrière, Paris (Vincent Thibault)) était de comparer la sensibilité de toutes les trousse de qHBs disponibles sur le marché au moment de l'étude à l'aide d'échantillons parfaitement caractérisés en termes de génotype (gt) et de séquence du déterminant "a". Méthodes Trois réactifs commerciaux (HBsAg Architect Abbott, HBsAg Quant Liaison XL Dia Sorin, HBsAg II Quant Elecsys Roche) dont le seuil de quantification indiqué était de 0,03 UI/ml pour DiaSorin et 0,05 pour Abbott et Roche, ont été évalués en parallèle en se conformant aux instructions des industriels, sur 5 panels : le standard OMS (03/262) (gt A, subtype adw2), le panel de génotypes (A à G) du PEI (n=15), un panel d'échantillons d'individus chroniquement infectés présentant des mutations de l'enveloppe virale distribués dans les 5 génotypes principaux (A-E) (n=75), un panel de 160 échantillons

AgHBs positif de génotype connu et sans mutation du gène S identifiée (24 gt A, 10 gt B, 55 gt C, 43 gt D, 15 gt E, 8 gt F, 5 gt H), enfin une collection de 16 protéines recombinantes. Afin de s'affranchir d'un biais, les valeurs obtenues par une technique pour chaque échantillon ont été comparées à la moyenne obtenue par les 3 techniques. La sensibilité analytique évaluée sur le standard OMS était de 0,026, 0,059 et 0,039 UI/ml pour Abbott, DiaSorin et Roche, respectivement. Par rapport aux valeurs attendues sur ce standard dans la zone de quantification annoncée les valeurs obtenues étaient en moyenne 29% plus élevées, 17% plus faibles et 4% plus élevées pour Abbott, DiaSorin et Roche, respectivement. Les valeurs obtenues sur les différents échantillons du panel PEI révèlent une influence du génotype sur les dosages Abbott et DiaSorin alors que les valeurs Roche ne sont pas impactées. Sur les échantillons sans substitution du déterminant "a", les 3 techniques sont bien corrélées entre elles (r^2 allant de 0,8957 à 0,9013) mais des biais de -14, 4 et 10% ont été observés pour DiaSorin, Roche et Abbott, respectivement. L'analyse centrée sur chaque génotype montre que les échantillons de génotype C sont sous-évalués d'environ 19% par Abbott alors que DiaSorin tend à les sur-quantifier de 19%. Des différences notables ont également été observées sur les génotypes plus rares F (n=8) et H (n=5). L'impact des substitutions du déterminant "a" sur la qAgHBs était particulièrement marqué pour Roche qui a montré une sous-quantification globale de ces échantillons ($p=0.0004$) avec 9 des 10 valeurs les plus aberrantes dues à des variants dont la majorité portant la substitution G145R. Pour DiaSorin et Abbott, 8/10 et 4/10 respectivement étaient également des variants sans qu'une substitution spécifique soit identifiée.

Malgré quelques divergences qui, toutefois, n'ont pas nécessairement de conséquences cliniques, il existe une bonne corrélation entre les trousse de quantification de l'AgHBs disponibles à ce jour. L'impact sur les dosages, des génotypes (notamment les génotypes C, F et H) et des substitutions du déterminant "a" émergeant naturellement au cours de l'infection, impose cependant une certaine vigilance. En cas de doute, le recours à des trousse de différents fournisseurs doit être recommandé (manuscrit en préparation).

Participation à l'établissement du premier standard international pour les marqueurs HBe du VHB

Le Paul-Ehrlich Institut (PEI) a organisé une étude collaborative afin de calibrer les

premiers standards internationaux des marqueurs AgHBe et anti-HBe. Le laboratoire a testé 7 échantillons pour chaque marqueur à l'aide des trousseaux ETI EBK PLUS et ETI AB-EBK-PLUS (DiaSorin). La synthèse des différents laboratoires participants a fait l'objet de deux rapports au cours de l'année 2013 (Report of the WHO collaborative study to establish the First International Standard for detection of antibodies to hepatitis B virus e antigen, Olivia Knauer et al., 2013 ; Report of the WHO collaborative study to establish the First International Standard for Hepatitis B e Antigen (HBeAg), human serum, Annette Reissinger et al, 2013).

Participation à l'établissement du premier standard international pour l'antigène de capside VHC

Le PEI a organisé une étude collaborative afin de calibrer le premier standard international du marqueur antigène VHC. Le laboratoire a testé 5 échantillons à l'aide des trousseaux Monolisa HCV Ag-Ab ULTRA V1 et V2 (Bio-Rad) et Murex HCV Ag/Ab Combination (DiaSorin). La synthèse des résultats des différents laboratoires participant est en cours de rédaction par le PEI.

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'écartier les candidats au don susceptibles de compromettre la sécurité transfusionnelle en renforçant l'efficacité de l'entretien précédant le don, et pour d'autre part déterminer les risques correspondant aux nouvelles infections.

Parallèlement à cette veille épidémiologique descriptive, est menée une surveillance virologique plus spécifique. Elle a pour objectif de mieux caractériser le profil biologique des donneurs confirmés positifs pour les virus VHB et VHC et d'assurer une veille de la diversité virale des souches circulant dans la population des donneurs de sang. Cette surveillance est réalisée en prospectif depuis 2000 à partir d'un échantillon de chaque don confirmé positif.

L'acheminement d'un échantillonnage de tout don trouvé positif pour un des marqueurs de l'infection par les virus VHB ou VHC depuis l'EFS vers notre laboratoire, est régi par l'arrêté du 6 février 2009 précisant les conditions de transmission de poches et d'échantillons de plasma issus de donneurs de sang prélevés par l'Etablissement français du sang au laboratoire de virologie transfusionnelle de l'Institut national de transfusion sanguine associé des centres nationaux de référence des virus des hépatites B, C et delta et du VIH, paru au journal officiel le 19 février 2009.

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

3.1. Méthode

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

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

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

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

La surveillance virologique du VHB comprend :

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

2) La recherche de la **virémie** (débutée en 1998) par une méthode d'amplification par PCR d'un fragment de génome de la capsid virale (nucléotides 1955-2401), mise au point au laboratoire et dont la sensibilité analytique sur un échantillon de référence internationale (WHO) avait été estimée entre 85 et 172 UI/ml (500 et 1000 copies/ml). A partir de 2005, cette méthode a été remplacée par une PCR amplifiant une partie du gène S correspondant à la boucle antigénique de l'Ag HBs (nucléotides 256-723) et dont la sensibilité analytique a été évaluée à 30 UI/ml (175 copies /ml ; référence internationale WHO). La détermination de la charge virale est réalisée depuis 2005 avec le réactif Cobas Taq Man, RocheDiagnostics (Limite de Quantification : 6 UI/ml).

3) La détermination du **profil sérologique HBe** par les techniques ETI EBK PLUS et ETI AB-EBK-PLUS (DiaSorin)

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

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

6) L'analyse moléculaire par **phylogénie** des souches virales est venue compléter le sérotypage pour les souches particulières dès 2002. Elle concerne toutes les souches disponibles en quantité suffisante et dont la virémie est détectable sur tous les dons Ag HBs et/ou ADN positifs depuis 2005. Cette analyse comprend la détermination du génotypage et

la mise en évidence de mutations dans l'enveloppe virale à l'aide d'une PCR maison couvrant la région hydrophile majeure de la protéine d'enveloppe « S » (région amplifiée : nucléotides 99 à 568) suivie d'une étape de séquençage direct (Servant-Delmas A et al. Transfusion, 2010). En 2012, le laboratoire a développé une PCR spécifique d'une région chevauchante codant la polymérase du virus (cible des molécules antivirales) et la boucle antigénique de l'Ag HBs. Cet outil va permettre de génotyper les souches VHB et d'étudier la présence de mutations de résistance au traitement et celles décrites comme affectant l'antigénicité de l'Ag HBs chez les donneurs de sang.

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

La surveillance virologique du VHC comprend :

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

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

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

3.2. Résultats

Les données qui sont présentées concernent les résultats exhaustifs obtenus depuis le début de la mise en place de la surveillance virologique jusqu'à la fin de l'année 2011. L'année 2012 n'a pas été prise en compte car l'ensemble des données n'était pas disponible au moment de la rédaction de ce rapport.

Seuls les éléments les plus significatifs sont présentés.

3.2.1. Le VHB

Epidémiologie descriptive de l'infection par le VHB

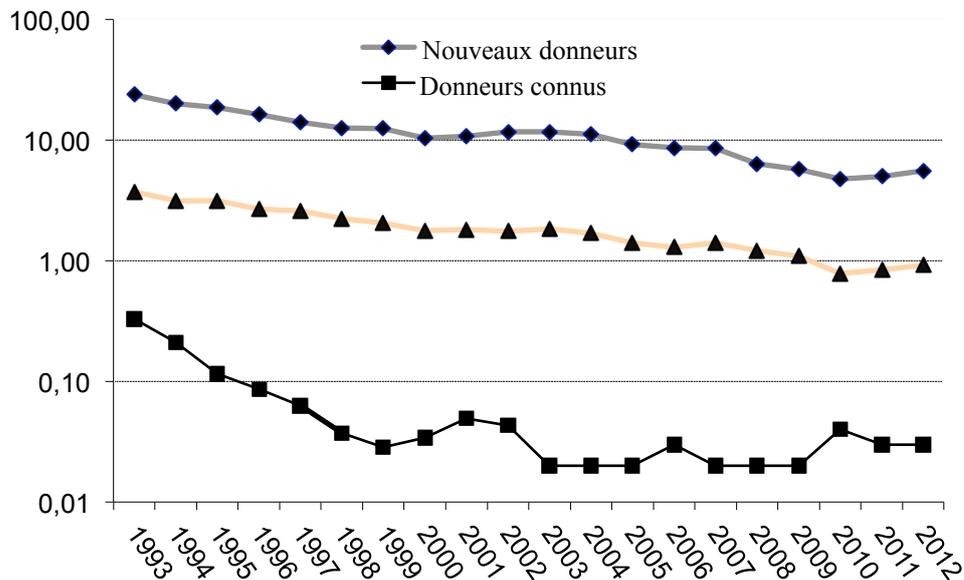
Le tableau 1 et la figure 1 donnent la comparaison et l'évolution des taux de positivité des dons VHB positifs observés entre 1993 et 2012 pour les dons issus de nouveaux donneurs et des donneurs connus.

Tableau 1 : Taux des dons VHB positifs observés dans les dons de sang de 1993 à 2012.

Année	Nouveaux donneurs		Donneurs connus		Ensemble	
	nombre de dons positifs	Taux Pour 10000 dons	nombre de dons positifs	Taux Pour 10000 dons	nombre de dons positifs	Taux p. 10000 dons
1993	1168	23.8	96	0.33	1264	3.72
1994	935	20.1	56	0.21	991	3.17
1995	885	18.6	28	0.12	913	3.14
1996	717	16.2	20	0.09	737	2.67
1997	682	14.1	14	0.06	696	2.58
1998	569	12.6	8	0.04	577	2.23
1999	511	12.5	6	0.03	517	2.06
2000	431	10.3	7	0.03	438	1.77
2001	434	10.8	10	0.05	444	1.83
2002	424	11.7	9	0.04	433	1.76
2003	447	11.7	4	0.02	451	1,83
2004	420	11.1	4	0.02	424	1,70
2005	346	9.25	5	0.02	351	1.40
2006	327	8.61	6	0.03	333	1.29
2007	376	8.57	5	0.02	381	1.40
2008	339	6.39	5	0.02	344	1.22
2009	322	5.75	5	0.02	327	1.09
2010	224 (6)*	4.77	10 (1)*	0.04	234	0.78
2011	257 (7)*	5.00	7 (3)*	0.03	264	0.84
2012	272 (10)*	5.56	8 (5)*	0.03	280	0.92

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

Figure 1: Evolution des taux (pour 10.000 dons) de dons de sang VHB positifs de 1993 à 2012 (échelle logarithmique).

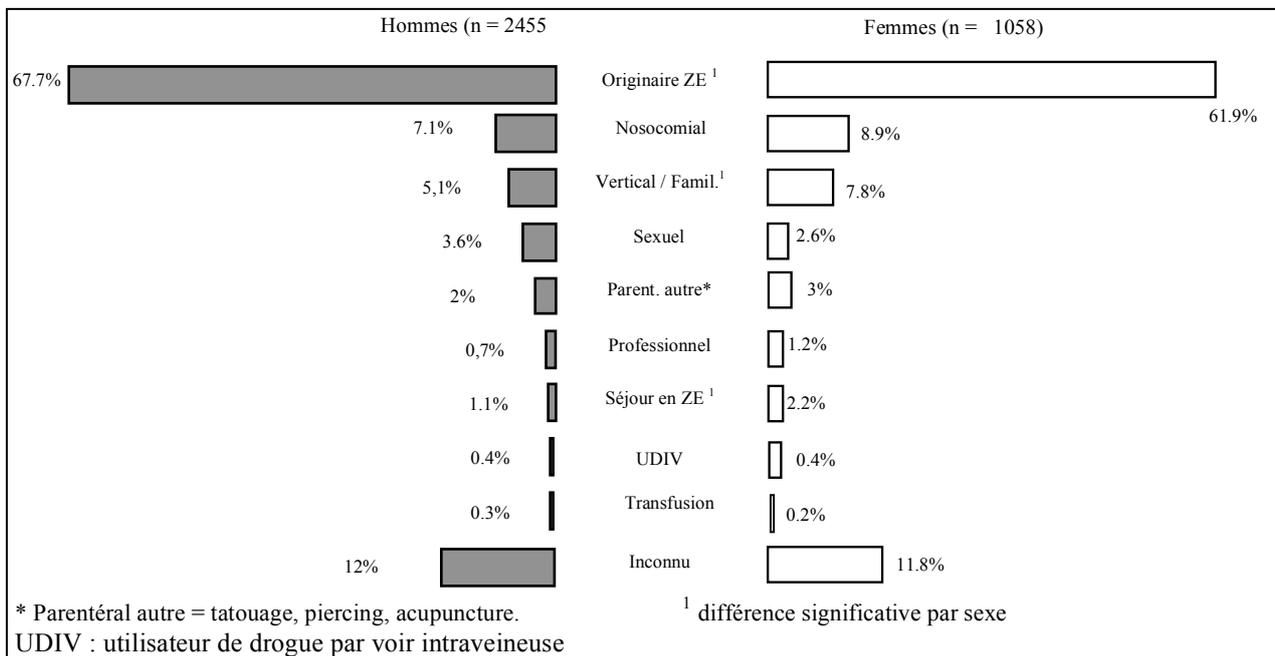


Comme le montre la figure 2, qui fait état des facteurs de risque (hiérarchisés en fonction de leur probabilité de survenue) recherchés chez 3513 (68.3%) des 5147 nouveaux donateurs positifs pour l'Ag HBs, prélevés en France métropolitaine entre 1998 et 2012, et qui ont pu être interrogés, le facteur de risque principal est l'origine géographique, suivi du risque nosocomial.

En revanche, chez les donateurs connus de la période 1998-2012 (nombre total : 99) pour lesquels un facteur de risque a pu être identifié (55 sur les 79 interrogés), le risque sexuel se retrouve au premier plan (22.8%).

Il convient de souligner, que chez 11.9% des nouveaux donateurs et dans 30.4% des cas chez les donateurs connus, interrogés sur leur facteur de risque, celui-ci n'a pas été identifié.

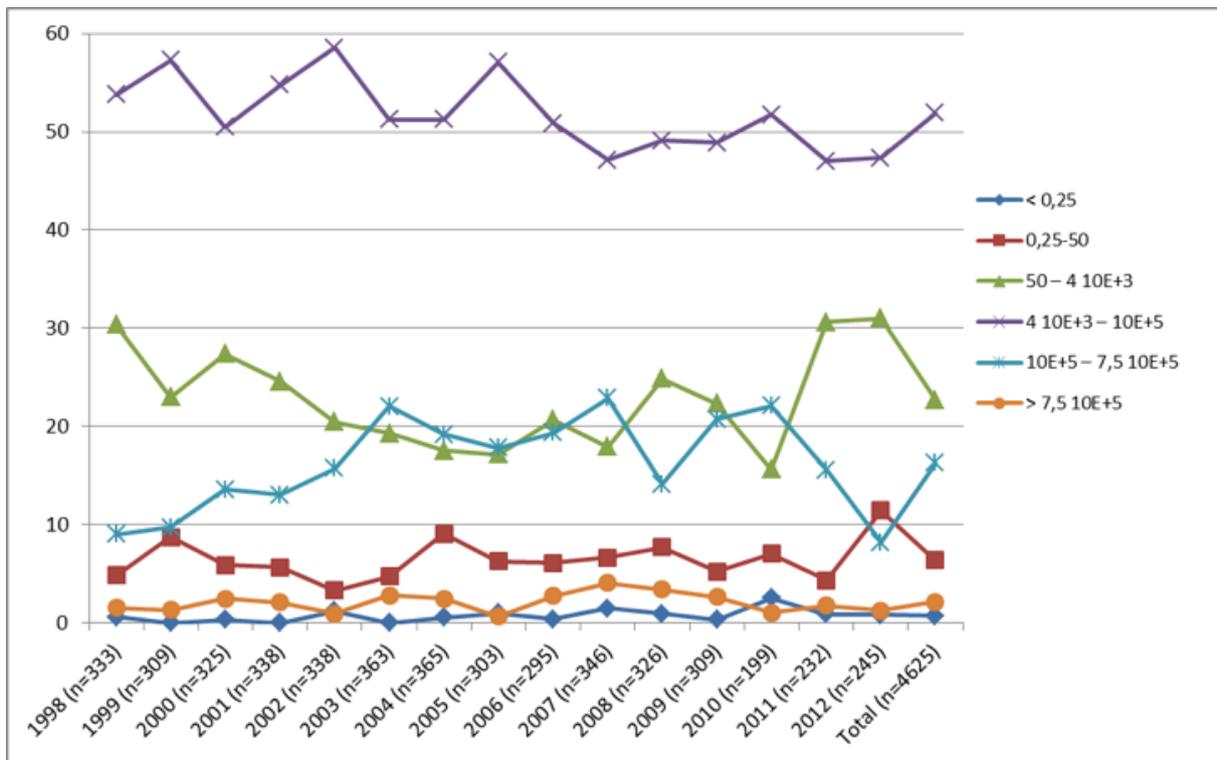
Figure 2 : Facteurs de risque des nouveaux donneurs VHB positifs en France métropolitaine entre 1998 et 2012 (n= 3513).



Surveillance virologique de l'infection par le VHB

La figure 3 fait état de l'évolution des **titres de l'Ag HBs** dans les dons positifs pour ce marqueur entre 1998 et 2012. Ces résultats montrent que plus de 99% des dons analysés avaient un taux d'Ag HBs supérieur à 0.25 ng/ml, taux environ 20 fois supérieur aux capacités de détection des tests de dépistage de l'Ag HBs utilisés à ce jour. Les taux observés sont stables dans le temps. La corrélation entre concentration de l'Ag HBs et la charge virale en fonction des génotypes est en cours.

Figure 3 : Evolution des titres de l'Ag HBs (ng/ml) chez les donneurs de sang entre 1998 et 2012.



La répartition des **marqueurs HBe** sur les 4643 dons pour lesquels l'information est disponible : soit 80% des 5798 dons VHB positifs dans la période 1998-2012 est fourni dans le tableau 2.

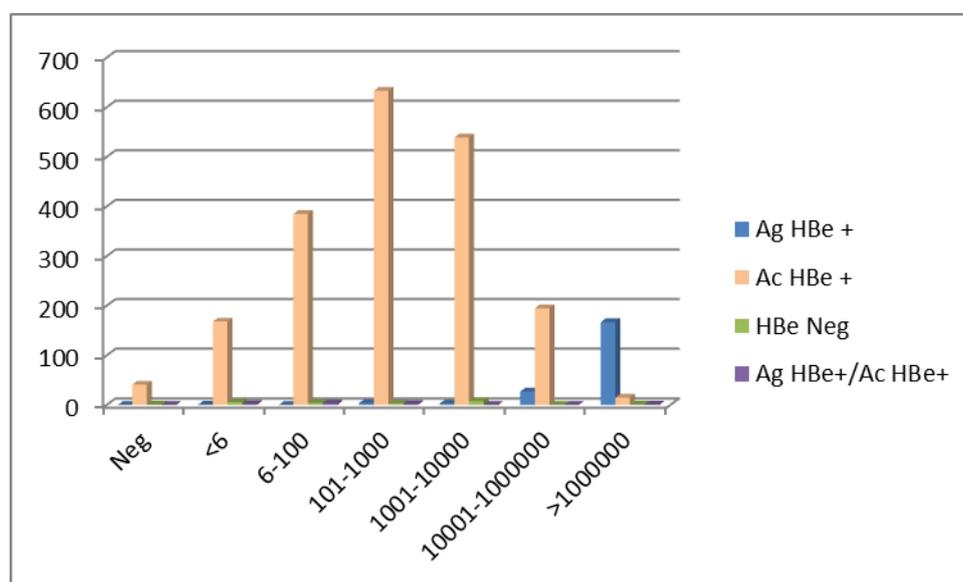
Tableau 2 : Répartition des marqueurs HBe chez les donneurs VHB positifs entre 1998 et 2012

	AchHBe pos / AgHBe neg		AgHBe pos / AchHBe neg		AgHBe pos / AchHBe pos		HBe neg		Total testé N
	N	%	N	%	N	%	N	%	
1998	291	86.9	39	11.6	2	0.6	3	0.9	335
1999	260	85.5	40	13.2	0	0.0	4	1.3	304
2000	269	85.7	40	12.7	1	0.3	4	1.3	314
2001	286	86.7	36	10.9	2	0.6	6	1.8	330
2002	302	89.6	34	10.1	0	0.0	1	0.3	337
2003	325	89.0	37	10.1	1	0.3	2	0.5	365
2004	321	87.9	39	10.7	1	0.3	4	1.1	365

2005	278	91.1	24	7.9	1	0.3	2	0.7	305
2006	266	89.6	29	9.8	0	0.0	2	0.7	297
2007	298	85.6	45	12.9	1	0.3	4	1.1	348
2008	291	89,0	30	9,2	1	0.3	5	1.5	327
2009	282	91.3	25	8.1	0	0	2	0.6	309
2010	181	87.4	19	9.2	0	0	7	3.4	207
2011	226	92.2	13	5.3	0	0	6	2.5	245
2012	226	88.6	23	9.0	0	0	6	2.4	255
Total	4102	88.3	473	10.2	10	0.2	58	1.3	4643

Il apparaît que 88.3% (4102/4643) des dons VHB positifs sont **Ac HBe** positifs, cette proportion étant stable dans le temps. Par ailleurs, comme le montre la figure 4, les dons Ag HBe positifs présentent des charges virales plus élevées.

Figure 4 : Relation entre la charge virale (UI/ml) et le statut HBe sur 2209 dons VHB positifs collectés entre 2005 et 2012 (202 AgHBe pos, 1976 Ac HBe pos, 23 HBe neg, 8 Ag et AcHBe positifs).



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

Le tableau 3 en fournit les résultats et montre une faible fréquence (3.1% au total) des anti-HBs chez les donneurs AgHBs positifs sans liaison évidente avec l'existence de mutations du gène S. La moyenne du taux d'anti-HBs est de 69 mUI/ml avec une médiane de 21 mUI/ml. Par ailleurs, 15 (1.1%) dons présentaient des Ac anti-HBs sans Ag associé dont le détail n'est pas montré ici.

La fréquence des mutants de l'AgHBs n'est pas significative pour les dons Ag/Ac HBs positifs (12.2% ; 5/41) que les dons Ac anti-HBs négatifs (4.6% ; 57/1251). Ces cinq souches sont porteuses de 2 mutations pour 2 souches et d'au moins 3 mutations pour 3 souches. La notion de vaccination n'est pas renseignée à l'exception d'un donneur pour lequel l'absence de vaccination a été exclue. Par ailleurs, aucune différence significative n'est observée concernant l'origine géographique des donneurs, le facteur de risque ou le sexe ratio. En revanche, les donneurs Ag/Ac HBs positifs sont plus âgés (51.2% ont plus de 40 ans) que les donneurs Ac négatifs (66.3% ont moins de 40 ans ; $p = 0.020$). De plus, on note une charge virale plus élevée dans le groupe des Ac anti-HBs négatifs avec 42.6% des dons avec une charge virale supérieure à 1000UI/mL ; alors que cela représente seulement 26.8% des dons Ag/AcHBs+ ($p=0.044$). Enfin, le titre en AgHBs est plus faible pour les dons Ag/Ac positifs que les dons Ac négatifs ; 56.1% des dons Ag/Ac+ présentent un titre inférieur à 4000 ng/ml alors que ceci concerne seulement 32.7% des dons anti-HBs négatifs ($p=0.002$). Toutefois, ces résultats seront à consolider au cours des années à venir.

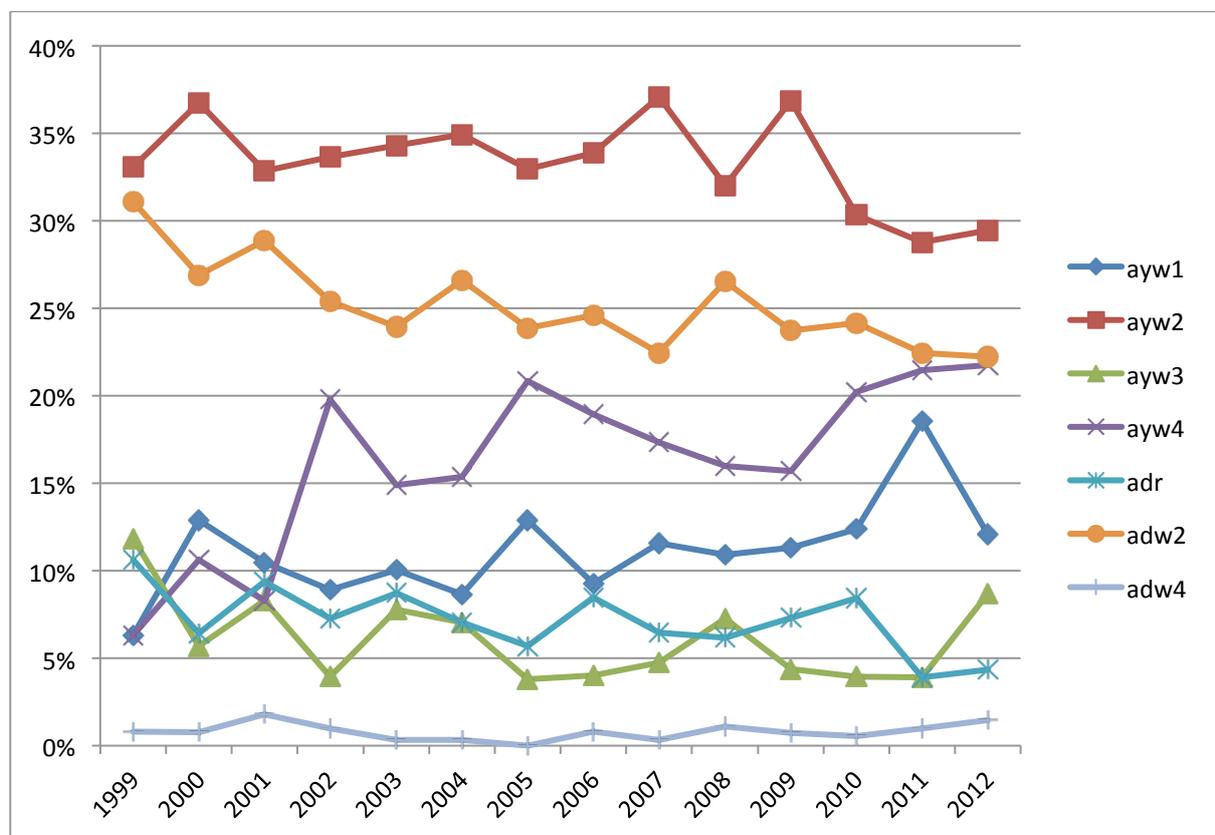
Tableau 3 : Fréquence des anti-HBs chez les donneurs AgHBs positifs de 2008 à 2011 en fonction du génotype.

Ac HBs	2008	2009	2010	2011	2012	Total
N testés	313	301	204	238	251	1307
N Ac HBs Pos	8 (2.6%)	5 (1.7%)	7(3.4%)	7 (2.9%)	14 (5.6%)	41 (3.1%)
Taux (mUI/mL)	10-145	12 - 46	10 – >100	12 - 25	12-1490	10 – 1490
Ac HBe	7	5	6	6	12	36
gt A	1double pop	2	1	1	3	8
gt B	0	0	1	2	0	3
gt C	1	0	1	0	1	3
gt D	3	1	3	3	6	16
gt E	1	1	0	1	2	5
gt F	1	0	0	0	1	2
ND	1	1	1	0	1	4
Mutations HBs	1	1	2	1	0	5

Sur les 5189 donneurs trouvés Ag HBs positifs entre 1999 et 2012, 4306 (82.5 %) ont bénéficié d'un **sous-typage de l'Ag HBs** et 85.1 % d'entre eux (n = 3664) ont pu être entièrement typés. Les 14.9 % n'ayant pas pu être entièrement sous typés correspondaient dans la majorité des cas à des échantillons présentant des titres d'Ag HBs inférieurs au seuil de détection de la technique de sérotypage. La figure 5 montre l'évolution de la répartition des différents sous-types de l'Ag HBs de 1999 à 2012. Sur l'ensemble de la période 1999-2012, le sous-type *ayw2* (correspondant au génotype D, fortement prévalent dans le bassin-méditerranéen) était le plus fréquent (33.6 %), suivi du sous-type *adw2* (génotype A ou B, majoritaire en Europe occidentale) (25.3 %). Les sous-types *ayw1* (génotype A (Afrique) ou B (Asie)), *ayw4* (génotype E originaire d'Afrique sub-saharienne) et *adr* (génotype C, asiatique) étaient en proportions respectives de 10.9%, 16 % et 7.3%. Toutefois, on note jusqu'en 2005

(figure 5) une diminution significative ($p=0.004$) des souches adw2 et ayw3 ($p=0.001$) et une augmentation des ayw4 ($p<10^{-4}$), en probable liaison avec une augmentation des donneurs originaires d'Afrique. Depuis 2005 une relative stabilisation des proportions est observée avec toutefois des fluctuations avec notamment une baisse des ayw2 au profit des ayw4 et des ayw1 qui méritent d'être confirmées dans les années à venir.

Figure 5 : Evolution de la part relative (en %) des sous-types de l'Ag HBs chez les donneurs de sang entre 1999 et 2012 (incluant les Antilles depuis 2006 et La Réunion depuis 2008).



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 (53.7%), le sous-type ayw2 avec le bassin Méditerranéen (48.6%), les sous-types ayw3 et adw2 avec l'Europe (65.3% et 61.7%, respectivement), le sous-type ayw4 avec l'Afrique sub-saharienne (79.7%) et le sous-type adr avec l'Asie (60.6%).

Tableau 4 : Proportion (%) des différentes origines géographiques des donneurs VHB positifs en fonction du sous-type 1999-2012

Origine géographique	ayw1		ayw2		ayw3		ayw4		adr		adw2		adw4		Total sous typés	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Europe ¹	53	14,4	371	35,2	124	65,3	88	16,1	63	26,7	511	61,7	14	56,0	1224	37,7
Bassin Méditerranéen	16	4,4	512	48,6	22	11,6	7	1,3	1	0,4	56	6,8	0	0	614	18,9
Afrique Sub Saharienne	197	53,7	87	8,3	13	6,8	435	79,7	2	0,8	74	8,9	0	0	808	24,9
Asie	77	21,0	15	1,4	3	1,6	1	0,2	143	60,6	62	7,5	0	0	301	9,3
Autre	24	6,5	69	6,5	28	14,7	15	2,7	27	11,4	125	15,1	11	44,0	299	9,2
Sous total	367	100	1054	100	190	100	546	100	236	100	828	100	25	100	3246	100
Ethnie inconnue	34 (8.5 %)		177 (14.4 %)		35 (15.6%)		40 (6.8 %)		30 (11.3 %)		99 (10.7 %)		3 (10.7 %)		418 (11.4%)	
Total	401(10.9%)		1231(33.6 %)		225 (6.1%)		586 (16.0 %)		266 (7.3%)		927 (25.3%)		28 (0.8%)		3664 (100%)	

¹ Bassin Méditerranéen exclu

L'analyse moléculaire a été réalisée sur 2252 dons Ag HBs positifs et/ou ADN positifs collectés entre 2005 et 2012. Parmi ces 2252 dons, 225 (10%) n'étaient pas génotypables en raison d'une charge virale trop faible ou de chromatogrammes de séquençage ne permettant pas de conclure de façon formelle sur la séquence obtenue (doubles populations par exemple). La répartition des génotypes est donnée dans la figure 6. Comme présenté dans la figure 7, la proportion des génotypes est stable entre 2005 et 2009. En 2010 et 2011, on note une inflexion du génotype D au profit des génotypes A et E. Cette tendance (non statistiquement significative) devra être confirmée dans les années à venir. Néanmoins ces observations sont concordantes avec l'évolution des sérotypes.

On note une prévalence globale plus élevée de génotype D (41.9%), suivie des génotypes A (27.7%) et E (17.6%) puis des génotypes B (6.1%), C (5.9%) et F (0.7%).

Cette répartition est en accord avec l'origine géographique des donneurs (A : Europe et Afrique, B et C: Asie, , D : bassin méditerranéen et Europe, E : Afrique). Le sexe ratio n'est pas différent en fonction des génotypes à l'exception d'une proportion plus importante d'homme pour le génotype D que le génotype C avec un sexe ratio respectivement 2.71 et 1.61 ($p=0.010$). Parmi les hommes, l'âge moyen est plus élevé chez les sujets infectés par le génotype D (35.6 ans) et les plus jeunes ont été observés dans le génotype E (27.7 ans, $p<10^{-4}$). Les femmes infectées par le génotype A sont plus âgées que celles infectées par le génotype E (35.6 contre 24.3 ans, respectivement, $p<10^{-4}$).

Figure 6: Répartition des génotypes du VHB chez 2027 donneurs de sang infectés par le VHB entre 2005 et 2012.

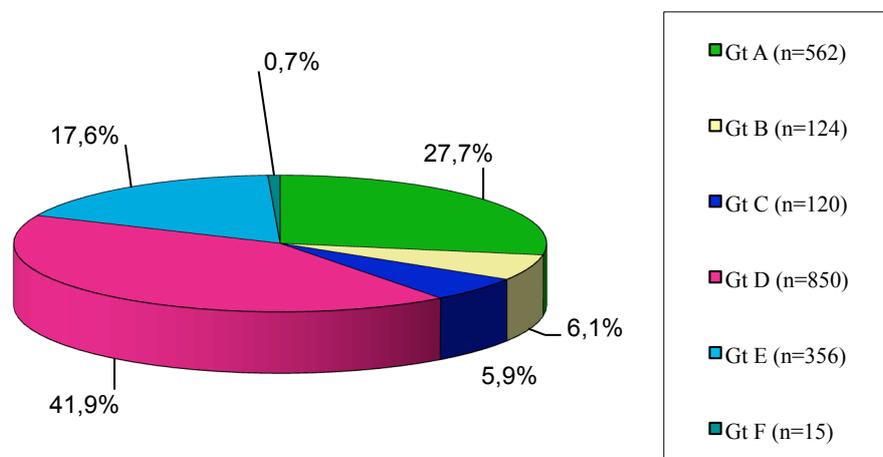
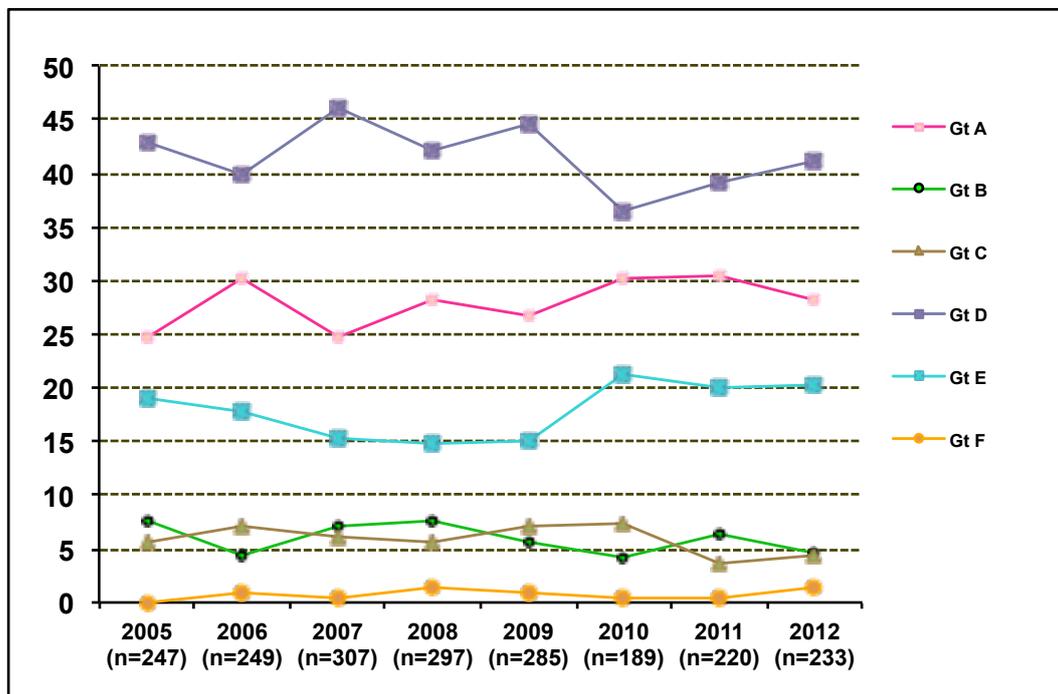


Figure 7 : Evolution des proportions (%) des différents génotypes du VHB chez les donneurs de sang infectés par le VHB entre 2005 et 2012.



Le tableau 5 compare la répartition des génotypes entre les donneurs VHB positifs ayant fait un don aux Antilles entre 2005 et 2012 et ceux ayant donné en Métropole entre 2005 et 2012 et à la Réunion entre 2008 et 2012. Soixante-neuf (80.2%) des 86 dons prélevés aux Antilles dans la période d'étude ont été analysés. Bien que les effectifs soient trop faibles pour en tirer un enseignement, l'on note des différences significatives : le génotype A étant majoritaire aux Antilles avec 75.3% des souches dont, par ailleurs, 53.9% (n= 28) sont A1, décrites comme étant originaires d'Afrique et 7.7% (n=4) sont A2, d'origine européenne

Tableau 5 : Comparaison de la répartition des génotypes du VHB entre les souches provenant des donneurs de sang prélevés aux Antilles (2005-2012) et sur le reste du territoire (Métropole 2005-2012 et Ile de la Réunion 2008-2012).

génotype	Antilles		Métropole + Réunion		p
	N	%	N	%	
A dont	52	75.4 %	510	26 %	<10 ⁻⁴
A1	28 (53.9%)*		68 (13.3%)**		
A2	4 (7.7%)		145 (28.4%)		
A autres	20 (38.5%)		297 (58.3%)		
B	1	1.4%	123	6.3%	na
C	0	0%	120	6.1 %	na
D	13	18.8%	837	42.8%	0.047
E	3	4.4%	353	18%	na
F	0	0%	15	0.8%	na
TOTAL	69		1958		

* dont 22/22 testés (100%) sont adw2

** dont 51/68 (75%) sont adw2

na : non applicable, NS : non significatif

La corrélation entre sérotype et génotype figure dans le tableau 6. Sur les 2304 échantillons étudiés (5 non testés ni en génotypage ni en sérotypage), 1945 (84.4%) ont été sérotypés et 2027 (88%) génotypés. Parmi ces 2299 échantillons, 1770 (77%) ont été caractérisés par les 2 méthodes (encadré dans le tableau 7), 97 (4.2%) n'ont pu être caractérisés par aucune des méthodes, 257 (11.2%) uniquement par séquençage et 175 (7.6%) uniquement par sérotypage. Parmi les 1770 échantillons caractérisés par les 2 méthodes, 28 (1.6%) étaient discordants selon la classification admise liées à des mutations modifiant le sérotype.

Tableau 6 : Répartition des génotypes du VHB et relation avec le sérotype chez 2027 donneurs de sang entre 2005 et 2012.

Sous- types Génotypes	ayw1	ayw2	ayw3	ayw4	adw2	adw4	adr	Total ss typés	Non typables	Non testés	TOTAL	
A	151 (70.2%)	<u>2 (0.3 %)</u>			367 (89.3 %)			520	28 ¹	14	562	27.7%
B	59 (27.5%)				43 (10.5 %)			102	20	2	124	6.1%
C		<u>1 (0.2%)</u>					110 (100%)	111	5	4	120	5.9%
D	<u>5 (2.3%)</u>	589 (98%)	85 (98.8%)	<u>8 (2.4 %)</u>				688	142	20	850	41.9%
E		<u>9 (1.5 %)</u>	<u>1 (1.2%)</u>	325 (97.6%)	<u>1 (0.2%)</u>			336	10	10	356	17.6%
F						13 (100%)		13	2	0	15	0.8%
<i>Total génotypés</i>	215	601	86	333	411	13	111	1770	207	50	2027	100%
Non génotypables	19	36	10	28	45	1	10	149	51	25	225	
Non testés	3	6	3	4	7	0	3	26	21	5	52	
TOTAL	237	643	99	365	463	14	124	1945	279	80	2304	

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

¹ incluant 2 ADN positifs/Ag HBs négatifs

Par ailleurs, des mutations du gène S codant l'Ag HBs décrites comme pouvant affecter le diagnostic ou échappant à la vaccination, ou aux immunoglobulines et hors polymorphisme naturel ont été retrouvées pour 105 échantillons (5.2%) (tableau 7). Quarante-trois souches présentaient une mutation unique dans la région analysée, et 22 des mutations multiples (2 : n=15, 3 : n=3 ; >3 n=4). La mutation majoritairement identifiée (21%) portait sur le résidu 133 (22 cas dont 7 en association avec au moins une autre mutation), puis sur les résidus 130 (16 cas), 134 et 129 (15 cas pour chacun). Le génotype B présente la plus forte proportion de souches mutées (12.1%).

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

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

Sur un total de 248 souches génotypées, 5 (2%) présentaient une mutation de résistance ; pour trois il s'agissait de la mutation rtA194T ou rtA194S associées à une résistance au Ténofovir et pour les deux autres, la mutation retrouvée était rtI233V associée à une résistance à l'Adéfovir. Il est difficile de mettre en évidence des caractéristiques particulières chez ces donneurs de sang compte-tenu du faible effectif. Cette surveillance se poursuivra donc dans les années à venir.

Tableau 7 : Inventaire des mutations du gène S du VHB retrouvées par analyse moléculaire de 2027 donneurs de sang virémiques entre 2005 et 2012.

Génotype	A	B	C	D	E	F	TOTAL
Mutations							
T116N	2						2
P120S				3	1		4
P120T	2	1		1	1		5
I/T126A		4					4
I/T126N			2	1			3
Q129H		2		3	1		6
Q129R				1			1
G130R		1		3			4
G130N	3				1		4
T131I		1		3			4
M133I				4			4
M133T	7			1	1		9
M133L		1			1		2
F134L	2				1		3
Y134N				4			4
C137Y			1				1
T/S143M	2	1		2			5
S143L				3	1		4
D144E		1		1	1		3
G145R	1				2		3
G145A			1		2		3
T116N-D144G				1			1
T118R-Q129P				1			1
P120S-F134I		1					1
Q129H-D144A	1						1
Q129R-G130N	2						2
Q129R-G145A					1		1
G130N-M133I				1			1
G130R-S132Y				1			1
G130R-Y134N				1			1
M133T-T116N		1					1
M133L-F134L	1						1
M133T-F134L	2		1				3
T131N-M133I-Y134H				1			1
T116N-S117K-T125M	1						1
Q129L-G130R-M133T				1			1
multiples	1			3			4

mutations > 3							
codon stop w163	1						1
codon stop w172				1			1
insertion 116T	2	1					3
Total	30	15	5	40	16	0	105
	28.6%	14.3%	4.8%	38.1%	14.3%		
% /génotype	5.3%	12.1%	4.2%	4.7%	4.2%	0%	5.2%

La figure 8 et le tableau 8 font état de la relation entre charge virale et génotype sur 2170 souches. Ces résultats montrent que les charges virales plus élevées sont observées pour les génotypes B et C avec une différence statistiquement significative ($p < 10^{-3}$).

Figure 8 : Proportions (%) des charges virales (log UI/ml) en fonction du génotype du VHB chez 2170 donneurs de sang en 2005 et 2012. (ND : génotype non déterminé).

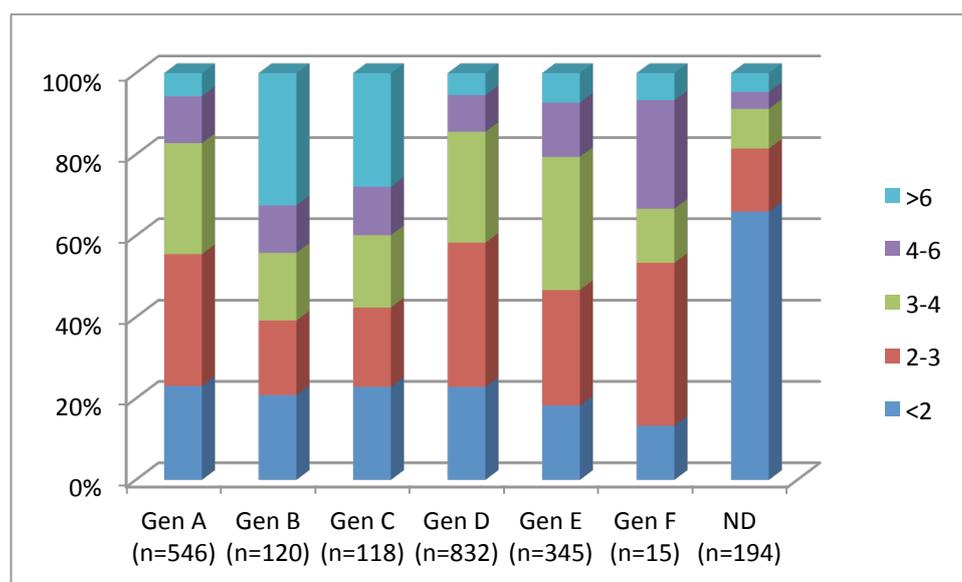


Tableau 8 : Pourcentage de donneurs de sang dans les différentes tranches de charges virales en fonction des génotypes 2005-2012.

CV log UI/ml	Gen A (n=481)	Gen B (n=110)	Gen C (n=108)	Gen D (n=737)	Gen E (n=299)	Gen F (n=12)	ND (n=181)	Total (N=1928)
<2	23.1	20.8	22.9	22.8	18.3	13.3	66.0	25.8
2-3	32.4	18.3	19.5	35.5	28.4	40.0	15.5	30.0

3-4	27.3	16.7	17.8	27.3	32.8	13.3	9.8	25.4
4-6	11.5	11.7	11.9	9.0	13.3	26.7	4.1	10.3
>6 *	5.7	32.5	28.0	5.4	7.3	6.7	4.6	8.4
moy	3.02	4.40*	4.12*	2.97	3.32	3.48	1.84	3.08
Ecart Type	1.58	2.63	2.47	1.55	1.64	1.77	1.66	1.80

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

Le statut vis à vis **des anticorps anti-Delta** des donneurs VHB positifs est consigné dans le tableau 9. Parmi ces donneurs, 2% présentent une co-infection par le virus Delta entre 1997 et 2012. Après une période de stabilité autour de 1.1% pendant 10 ans, la prévalence a augmenté à partir de 2006 pour atteindre 6.5% en 2010. On note un retour autour de 1.2 et 2% en 2011 et 2012. En ne prenant en compte que les positifs francs, le taux de prévalence des anticorps Delta s'élève à 1.33%.

En collaboration avec le laboratoire associé au CNR pour l'étude du virus Delta, nous menons une étude visant à établir les fréquences des sujets virémiques pour le virus Delta parmi les donneurs présentant des anticorps. La quantification de la virémie, réalisée sur 62 échantillons a identifié 14 souches (22.6%) avec une charge virale détectable (10^2 - 10^8 copies/ml). Douze souches étaient de génotype 1, une de génotype 7 et une de génotype 8 (2012 étant en cours d'investigation). Trois souches VHD-1 étaient isolées chez des donneurs européens, 2 VHD-1 chez des donneurs originaires du Bassin Méditerranéen et les 7 autres chez des donneurs originaires d'Afrique Sub-Saharienne. La charge virale VHB des 14 donneurs ARN-VHD positifs était plus basse (médiane à 14 UI/ml) que celle des dons ARN-VHD négatifs (médiane à 874 UI/ml). Aucune différence dans la répartition des génotypes du VHB n'était observée entre les donneurs mono et co-infectés.

La surveillance prospective des donneurs VHB positifs a permis d'identifier une augmentation de la prévalence en lien possible avec l'origine géographique des donneurs. Le faible taux de donneurs ARN Delta positifs (22.6%) comparé à celui observé dans le cadre d'un recrutement hospitalier peut en partie s'expliquer par le portage asymptomatique du virus chez les donneurs. Toutefois, les faibles effectifs nécessitent une poursuite de la

surveillance. L'ensemble des données relatives à la coinfection VHB-Delta chez les donneurs de sang a fait l'objet d'une publication cette année (*AServant-Delmas, et al. Increasing prevalence of HDV/HBV infection over 15 years in France. 2013, Journal of Clinical Virology*).

Tableau 9 : Prévalence des anticorps anti-Delta chez les donneurs de sang VHB positifs de 1997 à 2012

	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	Total
n testés	253	325	278	303	325	330	360	360	297	283	331	314	299	200	234	249	4741
Positifs faibles	0	0	0	0	0	0	1	3	1	8	1	2	5	8	2	1	32
Positifs francs	3	3	4	1	4	4	4	2	3	4	8	10	3	5	1	4	63
%	1.18	0.92	1.44	0.33	1.23	1.21	1.39	1.11	1.35	4.24	2.72	3.82	2.67	6.5	1.28	2.00	2.00
PCR Pos/nb testés parmi les pos faibles	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/3	0/0	0/6	0/1	0/0	0/2	0/6	0/1	NT	0/19
Génotype																	
PCR Pos/nb testés parmi les pos francs	2/2	0/0	0/0	0/0	0/3	1/3	1/3	1/2	2/2	1/4	3/7	1/9	1/3	0/4	1/1	NT	14/43
Génotype	2xGt1					Gt7	Gt1	Gt1	2xGt1	Gt1	3xGt1	Gt1	Gt1		Gt8		

3.2.2. Le VHC

Epidémiologie descriptive de l'infection par le VHC

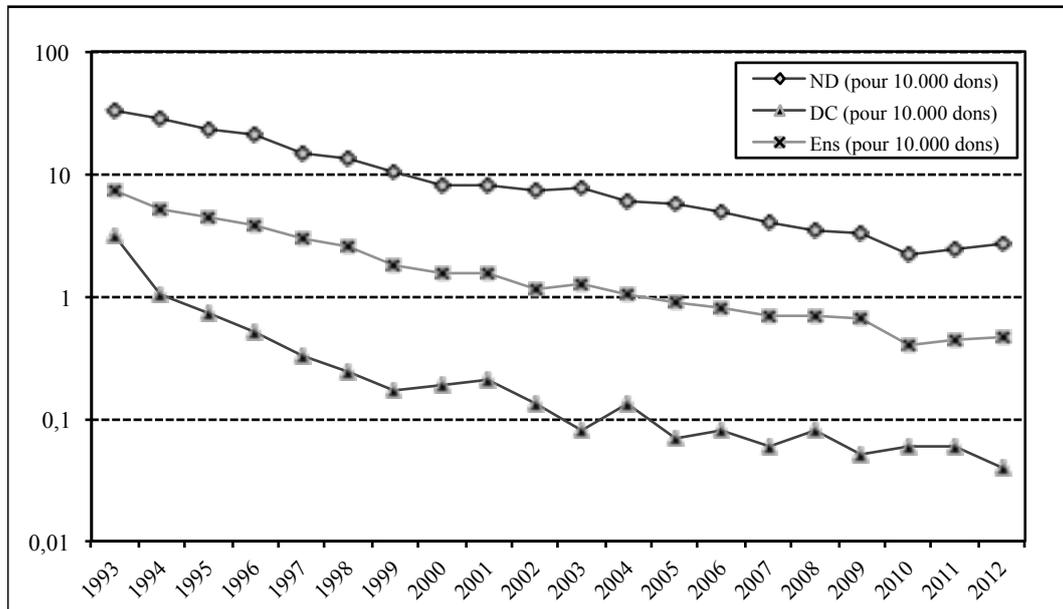
Le tableau 10 et la figure 9 donnent la comparaison des taux de positivité pour le VHC observés entre 1993 et 2012 pour les dons issus de nouveaux donneurs et des donneurs connus.

Tableau 10 : Taux des dons de sang VHC positifs de 1993 à 2012.

Année	Nouveaux donneurs		Donneurs connus		Ensemble	
	nombre de dons positifs	Taux Pour 10 000 dons	nombre de dons positifs	Taux Pour 10 000 dons	nombre de dons positifs	Taux Pour 10 000 dons
1993	1605	32.7	902	3.1	2507	7.4
1994	1281	28.2	266	1.03	1547	5.08
1995	1106	23.3	178	0.73	1284	4.42
1996	914	20.7	118	0.51	1032	3.74
1997	720	14.9	71	0.32	791	2.93
1998	601	13.4	51	0.24	652	2.52
1999	428	10.5	36	0.17	464	1.84
2000	337	8.1	39	0.19	376	1.52
2001	322	8.0	43 ⁽²⁾	0.21	365	1.51
2002	262	7.2	27 ⁽²⁾	0.13	289	1.17
2003	290 ⁽¹⁾	7.60	16	0.08	306	1.24
2004	227	6.02	28 ⁽²⁾	0.13	255	1.02
2005	210	5.61	14 ⁽²⁾	0.07	224	0.89
2006	188 ⁽²⁾	4.95	17	0.08	205	0.80
2007	178 ⁽²⁾	4.06	14 ⁽¹⁾	0.06	192	0.71
2008	182	3.43	19 ⁽¹⁾	0.08	201	0.71
2009	181	3.23	13	0.05	194	0.65
2010	103	2.19	15 ⁽²⁾	0.06	118	0.39
2011	124	2.41	16	0.06	140	0.44
2012	129	2.64	11	0.04	140	0.46

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

Figure 9 : Evolution des taux (pour 10.000 dons) de dons de sang VHC positifs de 1993 à 2012. (ND : nouveaux donneurs, DC : donneurs connus, ens : ensemble) (échelle logarithmique).



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

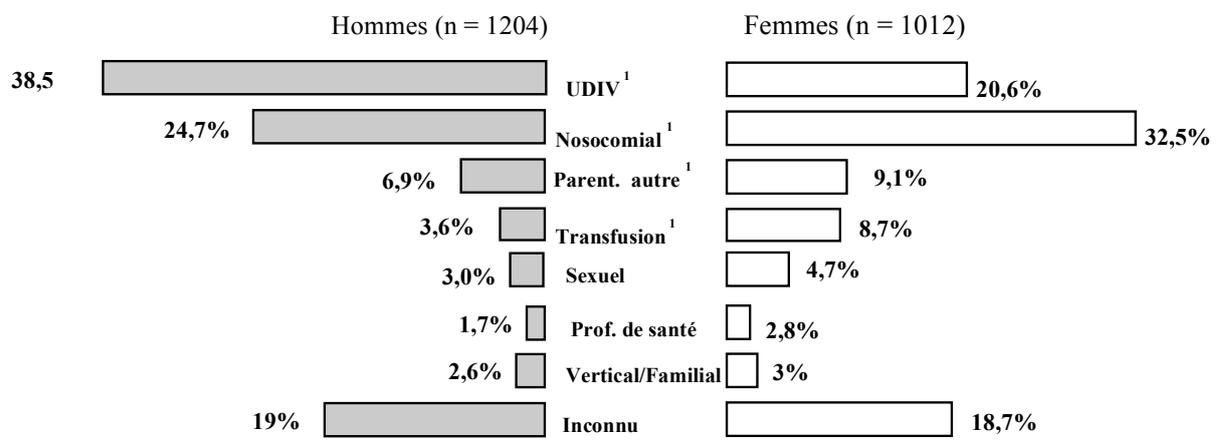
Les facteurs de risque renseignés pour 58.9% (2216) des 3762 nouveaux donneurs VHC positifs entre 1998 et 2012 (figure 10), montrent que près de 18.9% n'ont aucun facteur de risque identifié, et que la toxicomanie (38.5% chez les hommes et 20.6 % chez les femmes) et les expositions nosocomiales (24.7% chez les hommes et 32.5% chez les femmes) restent au premier plan des modes de contaminations potentiels retrouvés chez ces sujets.

Chez les 246 donneurs connus (115 hommes et 131 femmes) ayant présenté une séroconversion documentée et interrogés sur leur facteur de risque (soit 68.7% des 358 de cette catégorie entre 1998 et 2012), la toxicomanie par voie IV représente le facteur de risque le plus fréquemment identifié chez les hommes (33%) alors que pour les femmes il

s'agit d'un risque nosocomial (25.2%) suivi d'un partenaire connu pour être VHC positif (22.1%). La part des donneurs connus sans facteur de risque identifié s'élève à 21.1% (résultats non montrés).

Figure 10 : Facteurs de risque des nouveaux donneurs VHC+ interrogés sur FdR 1998-2012 (n = 2216).

¹Différence significative par sexe



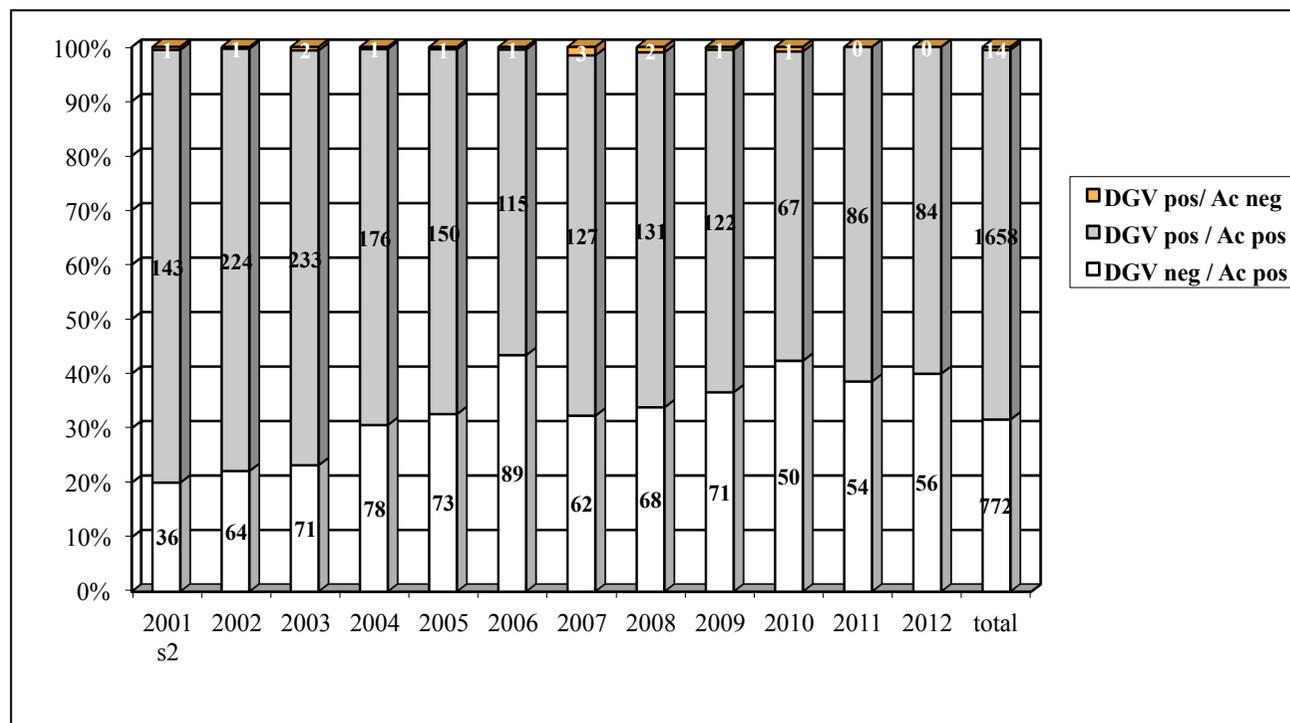
Surveillance virologique de l'infection par le VHC

Sur la période 2000-2012, le laboratoire a reçu 2417 échantillons de donneurs VHC positifs, ce qui représente 80.4% des 3005 donneurs trouvés VHC positifs sur cette période de 13 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 11, la proportion de dons VHC positifs virémiques est en moyenne de 70.2 % avec toutefois une tendance à la baisse de cette catégorie (figure 11) particulièrement marquée en 2006 et 2010. Aucune différence dans les caractéristiques démographiques et épidémiologiques entre le groupe des donneurs virémiques et celui des non virémiques n'a pu être mise en évidence pour expliquer ce phénomène.

Tableau 11 : Répartition des donneurs infectés par le VHC entre 2000 et 2012 en fonction de la virémie.

	2000		2001 (S1)		2001 (S2)		2002		2003		2004		2005		2006		2007		2008		2009		2010		2011		2012		total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Ac +/ARN+	205	81,0	89	84,8	143	79,4	224	77,5	233	76,1	176	69,0	150	67,0	115	56,1	127	66,1	131	65,2	122	62,9	67	56,8	86	61,4	84	60,0	1952	69,7
Ac+ /ARN -	48	19,0	16	15,2	36	20,0	64	22,1	71	23,2	78	30,6	73	32,6	89	43,4	62	32,3	68	33,8	71	36,6	50	42,4	54	38,6	56	40,0	836	29,8
Ac -/ARN +	0	0,0	0	0,0	1	0,6	1	0,3	2	0,7	1	0,4	1	0,4	1	0,5	3	1,6	2	1,0	1	0,5	1	0,8	0	0,0	0	0,0	14	0,5
TOTAL	253		105		180		289		306		255		224		205		192		201		194		118		140		140		2802	

Figure 11 : Répartition des donneurs infectés par le VHC entre 2001 (semestre 2 : début du DGV) et 2012 en fonction de la virémie (n=2444).



La figure 12 fournit la répartition des charges virales déterminées sur 596 donneurs prélevés entre 2007 et 2012. Cinq donneurs avaient des CV inférieures au seuil de quantification de la trousse (< 25 UI/ml), néanmoins dépistées par le DGV pratiqué en pool : 1 donneur était en phase de préséroconversion (Ac VHC négatifs), les 4 autres étaient porteurs chroniques (Ac VHC positifs) dont 3 avec une CV faible et 1 porteur d'un génotype 4f, sous-quantifié par le Cobas Taq Man (140 UI/ml avec la technique d'Abbott). Dans le tableau 12 figure la répartition des CV en fonction des génotypes ainsi que les CV moyennes. Il existe une différence significative entre celles-ci ($p < 10^{-4}$) avec 2 groupes : 1) les CVs les plus élevées concernent les génotypes 1 (1a et 1b) et 2 (absence de différences entre les CVs moyennes entre ces génotypes) 2) les CVs les moins élevées observées pour les génotypes 3 et 4 (aucune différence entre ces 2 génotypes).

Figure 12 : Répartition des charges virales (en log d'UI/ml) du VHC chez 596 donneurs de sang virémiques prélevés entre 2007 et 2012.

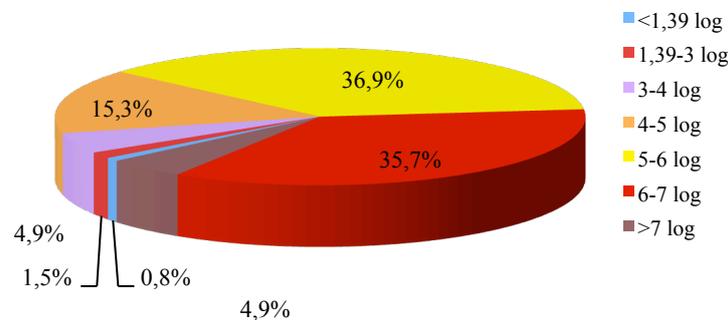


Tableau 12 : Répartition des charges virales VHC en fonction des génotypes (2007-2012).

CV	Gen1a	Gen1b	Gen2	Gen3	Gen4	Gen5	NG	TOTAL (N=588)
log UI/ml	(n=186)	(n=154)	(n=66)	(n=124)	(n=45)	(n=8)	(n=5)	
<1.39	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	2.2%	0.0%	80.0%	0.9%
1.39-3	0.5%	1.3%	1.5%	1.6%	0.0%	12.5%	20.0%	1.4%
3-4	2.2%	3.2%	6.1%	8.1%	13.3%	0.0%	0.0%	4.9%
4-5	12.4%	12.3%	10.6%	25.0%	22.2%	0.0%	0.0%	15.3%
5-6	37.1%	37.0%	27.3%	41.9%	44.4%	25.0%	0.0%	37.1%
6-7	39.8%	42.2%	45.5%	21.8%	17.8%	62.5%	0.0%	35.5%
>7	8.1%	3.9%	9.1%	1.6%	0.0%	0.0%	0.0%	4.9%
Moy	5.87	5.81	5.84	5.28	5.16	5.79	1.63	5.64
Ecart Type	0.84	0.87	1.09	0.95	1.10	1.35	0.54	1.03

NG : non génotypables

Sont exclus de ce tableau :

- 2 échantillons de 2010 de génotypes 1d (CV : 6.90 log UI/ml) et 6 (CV : 5.68 log UI/ml) respectivement
- 2 échantillons de 2011 de génotypes 1L (CV : 4.69 log UI/ml) et 6 (CV : 6.24 log UI/ml) respectivement
- 4 échantillons de 2012 de génotypes 1 (CV : 2.24 log UI/ml), 1g (CV : 6.03 log UI/ml) et 6 (CV : 5.70 log UI/ml et CV : 6.19 log UI/ml) respectivement

Sur les 1966 donneurs trouvés ARN VHC positifs entre 2000 et 2012, 92.8 % (n = 1825) ont bénéficié d'une détermination du génotype. La figure 13 montre la répartition des génotypes sur l'ensemble de la période, et la figure 14 l'évolution des génotypes dans le temps.

Variabilité du VHC

Sur la période 2000-2012, le génotype le plus fréquent est le génotype 1 (57.3 %), suivi par le génotype 3 (21.2 %), le génotype 2 (11.6 %) et le génotype 4 (8.3 %). Cette répartition est relativement stable au cours des 5 premières années d'étude (pas de différence significative). Toutefois, en 2006 une augmentation des génotypes 4, avec une baisse des génotypes 1 ont été observées, tendances non confirmées en 2007-2009. Le

génotype 1 semble amorcer une remontée en 2009 alors que l'inverse se produit pour le génotype 4.

Figure 13 : Répartition des génotypes du VHC chez 1825 donneurs de sang virémiques pour la période 2000-2012.

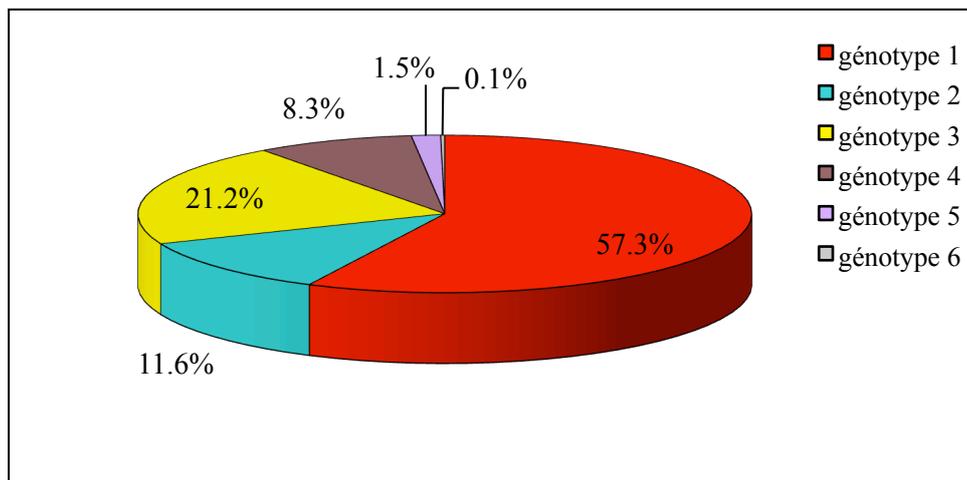
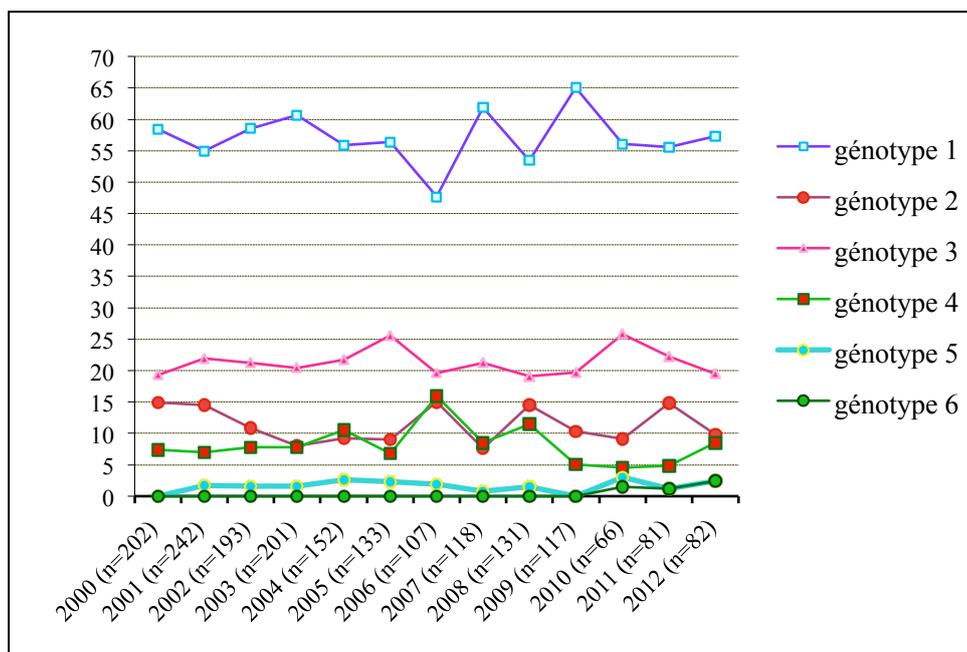
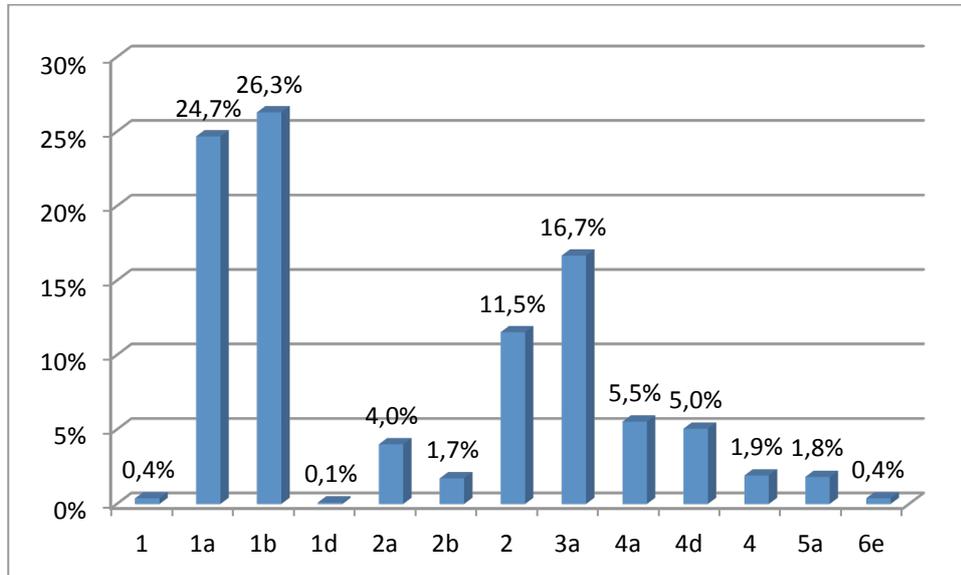


Figure 14 : Evolution des proportions relatives (en %) des génotypes du VHC chez les donneurs de sang virémiques pour la période 2000-2012.



L'analyse moléculaire par séquençage de 1050 souches (540 génotypes 1, 181 génotypes 2, 175 génotypes 3, 131 génotypes 4, 19 génotypes 5, 4 génotype 6) collectées durant cette même période rend compte d'une grande variabilité des sous-types, comme le montre la figure 15. Parmi les 540 donneurs infectés par le génotype 1, 51.1% sont de sous-type 1b et 48% de sous-type 1a. L'analyse des 181 souches de génotype 2 montre une très grande variabilité de ce génotype avec toutefois une majorité des souches appartenant au sous-type 2a avec 23.2%. Les génotypes 3 et 5 sont très homogènes : 100% des souches sont de sous-type 3a et 5a respectivement. Enfin, le génotype 4 est aussi très variable en dehors des sous-types 4a et 4d, qui représentent respectivement 44.3% et 40.4% des souches de ce génotype.

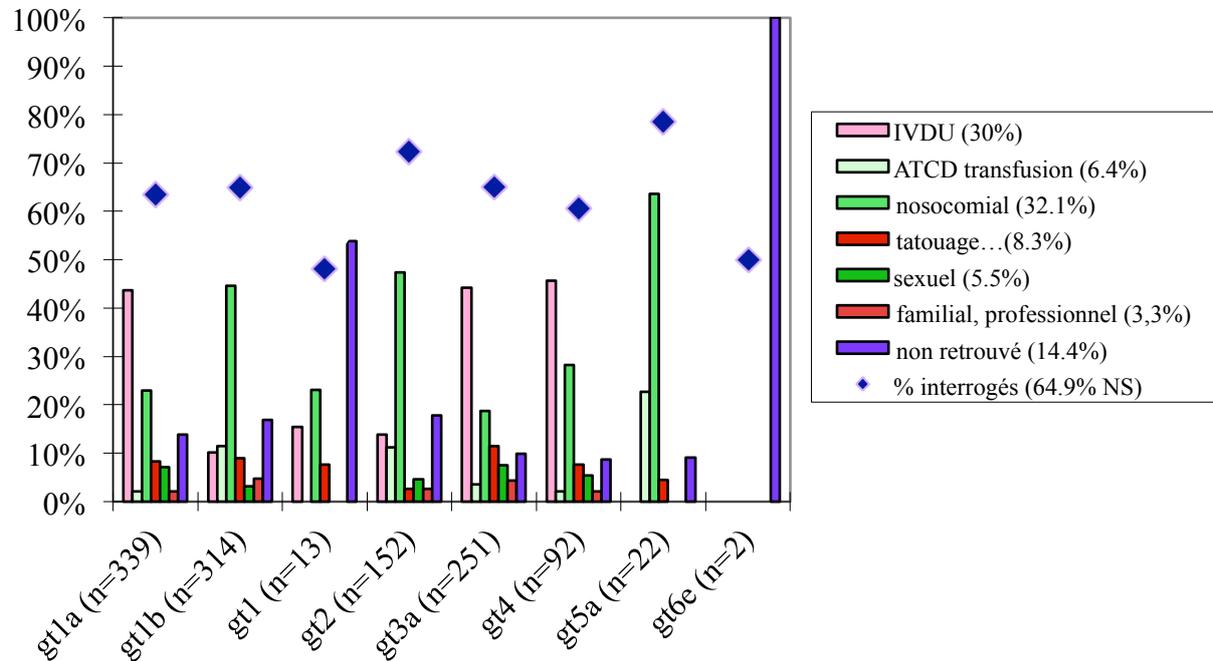
Figure 15 : Répartition des génotypes et des sous-types du VHC sur 1050 souches étudiées par séquençage moléculaire.



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

Cette analyse montre que génotypes et facteurs de risques sont significativement liés ($p < 10^{-4}$). Chez les donneurs ayant un génotype 1a, 3a ou 4, une proportion plus élevée (43.7 %, 44.2% et 45.7% respectivement) ont été contaminés par toxicomanie intraveineuse comparativement aux autres génotypes. Chez les donneurs avec un génotype 1b ou 2, une proportion plus élevée (44.6 % et 47.4 % respectivement) ont été contaminés par voie nosocomiale, comparativement aux autres génotypes (figure 16).

Figure 16 : Répartition des facteurs de risque du VHC (hiérarchisés) chez les donneurs de sang en fonction du génotype sur la période 2000-2012.



Sérotypage VHC

Parmi les 299 donneurs non virémiques que comptaient les années 2008 à 2012 (68, 71, 50, 54 et 56 respectivement), 176 (58.9%) ont été analysés pour la détermination du sérotype VHC. Les 123 échantillons restants n'ont pas été étudiés, soit parce qu'ils n'avaient pas été reçus (1/3), soit parce qu'ils ne présentaient pas d'anti-NS4, anticorps sur lesquels est basé le sérotypage (2/3). Sur ces 176 échantillons, 95 (54%) ont été sérotypés avec succès. La répartition des sérotypes et sa comparaison avec la répartition des génotypes sur la même période sont fournies dans le tableau 13.

Tableau 13 : Comparaison des proportions de sérotypes VHC et des génotypes VHC sur la période 2008-2012.

Type	Sérotipe (n=95)		Génotype (n=477)		P
	N	%	N	%	
1	68	71.6	275	57.6	0.027
2	5	5.3	57	12	na
3	17	17.9	99	20.8	NS
4	3	3.2	35	7.3	na
5	0	0	7	1.5	na
6	0	0	4	0.8	na
1+4	1	1	0	0	na
3+4	1	1	0	0	na

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

Seuls 73 de ces 95 donneurs ont été interrogés sur leur facteur de risque : aucun facteur de risque n'a été retrouvé pour 16 (21.9%) d'entre eux. Des 57 autres : 20 avaient des antécédents de toxicomanie IV, 3 avaient été transfusés, 22 déclaraient une contamination nosocomiale possible, 3 parentérales, 6 avaient possiblement été exposés sexuellement et 3 présentaient un autre mode de contamination possible (vertical, familial, professionnel...).

3.2.3. Bilan du DGV et risque résiduel

Le dépistage génomique viral est pratiqué à ce jour à l'aide d'un test triplex (HIV, HCV, HBV) avec la même technologie (Ultrio Procleix, Novartis Chiron).

Depuis la mise en place du **DGV du VHC** le 1^{er} juillet 2001 et jusqu'au 31 décembre 2012 31 millions de dons ont bénéficié de cette mesure. Au terme de cette période, 14 dons provenant de donneurs sans anticorps spécifiques ont été identifiés (voir les caractéristiques dans le tableau 14); parmi ceux-ci 1 avait un taux élevé de transaminases et 1 présentait des anti-HBc. Ces 2 dons auraient été écartés : le bilan net du DGV se porte donc à 12 dons pour les 12 premières années de pratique du DGV, soit 0.38 par million de dons. Aucun cas n'a été observé depuis 2010. Huit étaient des hommes (moyenne d'âge 40 ans) et 6 des femmes (moyennes d'âge 43.8 ans). Dix étaient des donneurs connus avec un délai moyen entre le don négatif et le don index de 379 jours (77-1515). Huit donneurs étaient en phase aigüe de l'infection objectivée par une séroconversion ultérieure, un donneur était un porteur chronique sans anticorps et 5 n'ont pas été investigués. Les charges virales s'étendaient entre moins de 25 et 4.7×10^7 UI/ml. A noter que 5 des 12 dons testés à l'aide d'un test Ag/Ac ont été trouvés positifs, montrant le bénéfice que pourrait présenter l'utilisation d'un tel test en lieu et place du DGV dans certains pays à ressources limitées ne pouvant introduire la recherche de l'ARN pour garantir un certain niveau de sécurité transfusionnelle.

Tableau 14 : Caractéristiques des donneurs dépistés ARN positifs anticorps négatifs entre le 1^{er} juillet 2001 et le 31 décembre 2012.

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

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

Na : non applicable

Le DGV VHB est pratiqué en unitaire dans les DOM depuis janvier 2005 et au CTSA depuis 2006 et a été étendu à la métropole en 2010 avec une introduction progressive entre mai et octobre. Sur les 7.9 millions de dons en ayant bénéficié jusqu'au 31 décembre 2012, 34 dons ont été retrouvés Ag HBs négatif et DGV positif. 25 avaient des anti-HBc et correspondaient probablement à une infection dite « occulte » et 9 étaient en fenêtre sérologique comme en a attesté le suivi sérologique pour 7 cas, 1 pas d'évolution des marqueurs sérologiques en 15 jours et 1 absence de suivi. Le bilan net est donc de 1.13 par million de dons testés. Il convient d'être prudent sur ce taux car le nombre de dons testés est encore trop faible pour conclure (tableau 15).

Tableau 15 : Bilan du DGV VHB de 2005 au 31 décembre 2012.

	DOM (2005-2012)	CTSA (2006-2012)	FM (2010 partiel-2012)	Total
Dons testés	316365	147278	7474811 ¹	7938454 ¹
DGV pos AgHBs pos	204	57	537	798 (91.8%)
DGV pos AgHBs neg	4	1	29	34 ² (3.2%)
DGV neg AgHBs pos	15	0	33	48 (5%)
Total HBV Pos	209	58	599	880

¹ estimation

² Dont 25 OBI (anti-HBc pos) 9 FS (anti-HBc neg)

Le risque résiduel sur la période 2010-2012 est de 1/10 000 000 dons (IC 95% : 0 - 1/1 400 000) pour le VHC et 1/2 500 000 dons (IC 95% : 0-1/775 000) pour le VHB.

4. Activités de recherche 2013

Epidémiologie 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 et a été publiée en 2013.

Thibault V, Laperche S, Thiers V, Sayon S, Letort MJ, Delarocque-Astagneau E, Antona D, Molecular Epidemiology and Clinical Characteristics of Hepatitis B Identified through the French Mandatory Notification System. PLoS One. 2013;8(9):e75267.

Corrélation de la mutation précocore G1896A et de la quantification d'AgHBs chez les donneurs de sang VHB positifs. En collaboration avec l'équipe de virologie du CHU d'Angers (Alexandra Ducancelle et Françoise Lunel-Fabiani), 200 nouveaux donneurs de sang AgHBs positifs dans la période 2006-2007, étaient inclus dans l'étude. Le séquençage direct du gène Précore/Core était réalisé afin de détecter les mutations A1762T/G1764A dans la région du promoteur (BCP) et la mutation G1896A dans la région précocore (PC). La charge virale VHB et la quantification de l'AgHBs étaient obtenues à l'aide de trousse commerciales.

La prévalence des populations virales mutées dans les régions BCP et PC était de 37% et 59.4% respectivement ($p < 0.05$). La proportion de mutations PC augmentait chez les sujets AgHBs négatifs. La charge virale et le titre d'AgHBs chez les donneurs de sang infectés par une souche mutée en PC étaient plus faibles que chez les sujets infectés par une souche sauvage. En conclusion, la prévalence de la mutation G1896A chez les donneurs de sang asymptomatiques est élevée, et associée à un titre AgHBs et ADN viral faibles. De plus larges études sont nécessaires afin de confirmer la signification clinique de cette mutation et en particulier l'impact de l'expression du Core sur l'évolution vers la fibrose hépatique.

Correlation of the G1896A precore mutation and HBsAg quantification among infected hepatitis B virus French blood donors. A. Pivert, A. Servant-Delmas, F. Lunel-Fabiani, H. Le Guillou-Guillemette, S. Laperche, A. Ducancelle, manuscrit soumis.

Evaluation du QX100 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad). Le système QX100 Droplet Digital PCR system (ddPCR) est une technologie d'amplification de troisième génération permettant une quantification absolue de molécules d'ADN cibles contenues dans l'échantillon sans recours à un standard de quantification. Le mélange réactionnel est immobilisé en gouttelettes calibrées dans lesquelles la réaction d'amplification a lieu, la détection se faisant en point final grâce à la présence d'une sonde couplée à une chimie de type TaqMan. En collaboration avec Vincent Thibault (laboratoire de Virologie, CH Pitié-Salpêtrière), cette technologie a été mise à profit afin d'étudier des échantillons de donneurs de sang dont la charge virale était en dessous de 15 UI/ml avec la trousse Cobas TaqMan (Roche Diagnostics) et qui ont été génotypés à l'aide des outils moléculaires développés au laboratoire dont la sensibilité analytique est estimée entre 30 et 60 UI/ml.

La quantification de l'ADN viral était obtenue avec une autre trousse commerciale ; Abbott HBV RealTime assay (Abbott Molecular), une PCR maison en temps réel développée par l'équipe de la Pitié (Désiré et al, 2011) et la ddPCR à partir d'une même préparation d'acides nucléiques extraits (Abbott). Parmi les 29 échantillons testés, 93,1% (27/29), 72,4% (21/29) et 48,3% (14/29) étaient détectés par Abbott, la PCR maison et la ddPCR respectivement. Même si les effectifs sont faibles, les moyennes de quantification obtenues sur les échantillons positifs étaient de 21,1 UI/ml en Abbott, 30,5 UI/ml avec la PCR maison et 9,7 UI/ml avec la ddPCR. Le défaut de quantification observé avec la ddPCR était confirmé avec l'étude d'un échantillon titré à $3 \cdot 10^6$ UI/ml avec la trousse Abbott puisque la quantification en ddPCR obtenue était de $2,5 \cdot 10^5$ UI/ml. Dans cette étude très préliminaire, nous avons observé une perte de sensibilité de la ddPCR pour la quantification de l'ADN du VHB comparé aux données obtenus avec des PCR quantitatives en temps réel (commerciale ou maison). Néanmoins, le nombre d'échantillons testé est faible et la mise au point des conditions de ddPCR est nécessaire afin d'optimiser cet outil (*manuscrit en préparation*).

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
- DES de Biologie, Ile de France

Enseignement 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

Accueil de Stagiaires

Nous avons accueilli un étudiant en master 1 de l'université St Quentin en Yvelines-Versailles (Paris 11). Il a participé à la mise en place la PCR de la région NS3 du VHC chez les donneurs de sang

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

- Rétro-information à InVS

Comité de pilotage « Epidémiologie des donneurs de sang InVS

6. Liste des publications et communications relatives aux activités du CNR 2013

Publications

Servant-Delmas A, Chuteau C, Lefort C, Piquet Y, Chevaleyre S, Betbeze V, Delhoume M, Hantz S, Alain S, Laperche S. Two cases of transfusion-transmitted hepatitis B virus (HBV) infection in a low-endemic country before implementation of HBV nucleic acid testing. *Transfusion*. **2013**;53:291-6

Villet S, Larrat S, Laperche S, Le Guillou-Guillemette H, Legrand-Abravanel F, Bouchardeau F, Pivert A, Henquell C, Mirand A, André-Garnier E, Giordanengo V, Lagathu G, Thibault V, Scholtes C, Schvoerer E, Gaudy-Graffin C, Maylin S, Trimoulet P, Brochot E, Hantz S, Gozlan J, Roque-Afonso AM, Soussan P, Plantier JC, Charpentier C, Chevaliez S, Colson P, Mackiewicz V, Aguilera L, Rosec S, Gouriou S, Magnat N, Lunel-Fabiani F, Izopet J, Morand P, Payan C, Pawlotsky JM. Multicenter quality control of hepatitis C virus protease inhibitor resistance genotyping. *J Clin Microbiol*. **2013**;51: 1428-33.

Laperche S on behalf of the Francophone African Group for Research in Blood Transfusion Multinational assessment of blood-borne virus testing and transfusion safety on the African continent. *Transfusion* 2013; 53: 816-26.

Thibault V, Laperche S, Thiers V, Sayon S, Letort MJ, Delarocque-Astagneau E, Antona D, Molecular Epidemiology and Clinical Characteristics of Hepatitis B Identified through the French Mandatory Notification System. *PLoS One*. 2013;8(9):e75267.

Tagny CT, Murphy EL, Lefrère JJ and the Francophone Africa Blood Transfusion Research Network. The Francophone Africa Blood Transfusion Research Network: a five-year report (2007-2012). *Transfus Med*. 2013 ;23:442-4.

Chevaliez S, Challine D, Naija H, Luu TC, Laperche S, Nadala L, Allain JP, Lee HH, Pawlotsky JM. Performance of a new rapid test for the detection of hepatitis B surface antigen in various patient populations. *J Clin Virol*. 2014;59:89-93.

Servant-Delmas A, Le Gal F, Gallian P, Gordien E, Laperche S. Increasing prevalence of HDV/HBV infection over 15 years in France. *J Clin Virol*. 2014; 59:126-8

Tayou Tagny C, Mbanaya D, Murphy EL, Lefrère JJ, Laperche S. Screening for hepatitis C virus infection in a high prevalence country by an Antigen/Antibody combination assay versus a rapid test. *J Virol Meth* **2014**, 199:119-23

Brichler S, Le Gal F, Neri-Pinto F, Mansour W, Roulot D, Laperche S, Gordien E. Serological and Molecular Diagnosis of Hepatitis Delta Infection: Results of a French National Quality Control. *J Clin Microbiol*. **2014** sous presse

Communications orales.

A. Servant-Delmas, F. Le Gal, P. Gallian, E. Gordien, S. Laperche. Caractéristiques des co-infections VHB-VHD chez les donneurs de sang en France : étude sur 15 ans (1997 – 2011). **2013**. XXV^e congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, Paris, France

Communications affichées

A. Servant-Delmas, F. Le Gal, P. Gallian, S. Laperche, E. Gordien. Characteristics of HBV-HDV co-infection among blood donors in France: 15-year study (1997 - 2011) **2013**. HBV international meeting, Shanghai, Chine.

Thibault V, Laperche S, Thevenin M, Masson J, Akhavan S. Performance of Qiagen HCV real time assay to monitor Hepatitis C virus viral load^{5th} **2013**. European congress of Virology, Lyon, France

7. Programme d'activité 2014-2015

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

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

ces infections et de les comparer aux infections chroniques qu'elles soient « classiques » ou « occultes ».

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

- L'étude de la **diversité génétique du VHB** chez les donneurs de sang étendue à la région polymérase du génome viral depuis l'année 2012 de collectes de dons se poursuivra sur la collecte de l'année 2013 et particulièrement la recherche de **mutations de résistance** aux thérapeutiques dans la population des donneurs de sang

- Un nouvel outil moléculaire spécifique de la région NS3 du VHC a été mis en place en 2013 afin de disposer d'une technique capable d'amplifier les 6 génotypes viraux en une seule réaction (Besse B et al. J Virol Methods, 2012). La mise en évidence des souches **VHC porteuses de mutations de résistance aux anti-protéases**, fait l'objet d'un nouvel axe de surveillance dans cette population. L'analyse des dons de sang de 2012 et 2013 sera réalisée courant 2014.

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

2) Le virus Delta

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

3) Etudes de la diversité génétique du VHB

- **Exploration de la diversité génétique du VHB par séquençage haut débit**

L'analyse moléculaire des souches VHB isolées chez les donneurs de sang nous conduit à caractériser en plus du génotype, la présence de variants de l'enveloppe virale ainsi que de mutations décrites dans les résistances aux molécules utilisées dans le traitement de l'hépatite B chronique. Nous disposons donc aujourd'hui d'une collection

importante d'échantillons bien caractérisés pour le VHB.

Afin d'évaluer la place des nouvelles techniques de séquençage haut débit et particulièrement les technologies de troisième génération, nous participerons à un programme d'essais d'un nouveau système de séquençage miniaturisé utilisant la technique nanopore (Oxford nanopore technologies, UK). Ainsi, nous souhaitons comparer les techniques moléculaires classiques (Amplification par PCR-clonage-séquençage par méthode Sanger) à ce type de technologie tout à fait novateur puisque (i) le format d'analyse est une clé USB qui en théorie ne nécessite pas d'amplification préalable de la région d'intérêt contenue dans l'échantillon biologique et (ii) la longueur des séquences analysées serait de l'ordre de 10 à 100 kilobases permettant donc le séquençage d'un génome complet du VHB en une réaction.

Nous pourrions ainsi évaluer la place de ces technologies dans une activité de veille virologique telle que nous la faisons aujourd'hui chez les donneurs de sang avec des outils moléculaires plus conventionnels vis-à-vis du VHB et l'étendre au VHC ou au VIH.

- **Infections B occultes chez les donneurs de sang**

L'étude des mécanismes moléculaires des infections B occultes (OBI) sera initiée par Daniel Candotti, chercheur dans le domaine et qui a récemment rejoint le laboratoire. L'OBI se caractérise par la présence d'ADN viral en très faible quantité dans le sang ou le foie d'individus infectés asymptomatiques en absence d'AgHBs circulant détectable. Les mécanismes moléculaires associés à cette répllication virale réduite mais persistante restent mal connus. L'analyse génétique et fonctionnelle préliminaire de variants VHB associés à l'infection occulte a montré l'existence de mutations qui étaient localisés dans l'ARNm viral pre-S2/S au voisinage d'un site 5' d'épissage et qui altéreraient l'épissage alternatif de cet ARNm et la production d'AgHBs. Ces résultats suggèrent l'existence d'un nouvel élément génétique de contrôle de l'expression du gène S en régulant en cis une étape du traitement post-transcriptionnel de l'ARNm (transport nucléo-cytoplasmique, localisation cellulaire, traduction ou stabilité de l'ARNm). Le traitement post-transcriptionnel de l'ARNm pre-S2/S pourrait impliquer des interactions ARNm-protéine entre ce nouvel élément régulateur et des facteurs cellulaires restant à identifier.

Cette hypothèse sera testée *in vitro* en clonant et en transfectant des fragments subgénomiques codant l'ARN S de souches VHB occultes dans des lignées hépatocytaires. La

production d'ARNm et d'AgHBs sera quantifiée dans les cellules et le surnageant de culture. Les modifications post-transcriptionnelles de l'ARNm S seront étudiées en relation avec la production d'AgHBs et les résultats comparés avec ceux obtenus avec des souches virales contrôles non-OBI de même génotypes. Les souches variantes occultes présentant une réduction significative de leurs capacités de production d'AgHBs seront 'réparées' par mutagenèse dirigée des résidus nucléotidiques étudiés, et les mutations occultes correspondantes seront introduites dans les génomes des souches contrôles afin d'associer définitivement ces mutations spécifiques de l'infection B occulte à un défaut de production de l'AgHBs.

Une meilleure connaissance des différents niveaux de régulation de l'expression des gènes viraux durant la réplication du VHB peut permettre de définir de nouvelles cibles thérapeutiques. La caractérisation de ce nouveau type de variants S du VHB apparaît importante pour le suivi clinique des individus infectés.

Ce projet de recherche pour lequel le CNR sera associé, a fait l'objet d'une demande de financement auprès de l'ANRS dans le cadre du 2^e appel d'offres 2014.

4) Veille technologique

Evaluation de la trousse Monolisa HCV Ag/Ab Ultra version 2

Le test de dépistage combiné de l'Ag de capsid et des anticorps VHC Monolisa HCV Ag/Ab Ultra commercialisé par la société Bio-Rad sera remplacé prochainement par une version 2. Les objectifs de notre étude sera d'établir une comparaison de performances en terme de sensibilité pour la détection de l'Ag et des Ac anti-VHC des trousse disponibles sur le marché : la version actuelle de la trousse Bio-Rad, la version 2 et la trousse Murex Ag/Ab HCV combination (Abbott). Des dons DGV positifs et anticorps négatifs ainsi que des panels de séroconversions informatifs seront testés. Une gamme d'Ag VHC titrée permettra de comparer les limites de détections des trois réactifs vis-à-vis de ce marqueur. L'impact de la diversité génétique du VHC sur les tests sera aussi évalué grâce aux dons de sang VHC positifs caractérisés au laboratoire tout génotype confondu.

5) Incidence de l'infection par le VHC

Deux méthodes permettent aujourd'hui d'évaluer **l'incidence de l'infection par le VHC dans** la population des donneurs de sang :

1- soit à partir des séroconversions observées sur des périodes consécutives de 3 ans

2- soit à partir des cas exclusivement virémiques

Le taux d'incidence ainsi calculé est très faible. De manière à disposer de données d'incidence du VHC, nous avons établi une collaboration avec le CHU de Tours et l'InVS, dont l'objectif est, sur la base d'une nouvelle approche basée sur un test d'avidité (Gaudy-Graffin C, et al. *J Clin Microbiol.* **2010**;48:3281-3287) d'identifier les infections de moins et de plus de 6 mois. La limite de cette méthode tient à son absence de fiabilité chez les sujets non-virémiques. Aussi, une modélisation basée sur l'estimation du pourcentage de sujets infectés depuis moins de 6 mois et non virémiques réalisée à partir de données de la littérature, pourra permettre d'ajuster le taux obtenu en prenant en compte ce groupe de sujets qui représente environ 40% des donneurs de sang VHC positifs. De ce fait cette étude nous permettra de mieux apprécier l'évolution du taux d'incidence dans le temps, chose qu'il était difficile d'appréhender jusqu'alors en raison du faible nombre de donneurs entrant dans les 2 catégories ci-dessus citées. De plus, même si la population des donneurs de sang n'est pas superposable à la population générale, parce qu'elle présente l'avantage d'être relativement homogène et suivie exhaustivement dans le temps, les données qui seront issues de son étude fourniront de précieuses informations sur l'infection à VHC en France. Plus d'un millier de dons de sang collectés depuis 2000 ont été soumis au test. L'analyse des résultats est en cours.

Rapport annuel d'activité

2014

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

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

**Année d'exercice
2013**

1 Missions et organisation du CNR

La description détaillée est présentée en annexe.

Les changements par rapport au rapport de l'année précédente, est la relocalisation de l'unité de virologie / CNR-D dans de nouveaux locaux rénovés, avec établissement d'une plate forme de biologie moléculaire commune avec les autres laboratoires du Pôle de biologie.

2 Activités d'expertise

2.1 Évolutions des techniques au cours de l'année N

- Techniques développées ou en développement : au cours de l'année N, nous avons validé dans la pratique l'introduction du contrôle interne de notre technique de référence qui n'en avait pas jusqu'alors. Il s'agit d'une avancée majeure. Cet ajout nous oblige cependant à utiliser deux plaques d'échantillons : l'une pour les échantillons à tester, l'autre pour le contrôle interne. Aussi nous tentons de réaliser les deux manipulations dans une seule plaque en réduisant le nombre d'échantillons contrôle sans diminuer en pertinence de qualité. Ceci nécessite que l'automate puisse en un seul temps, lire les signaux des échantillons cliniques et du contrôle interne et assurer l'interprétation et la validation des résultats. Nous essayons pour cela d'adapter notre technique sur un des automates de routine du service. Les discussions entreprises notamment avec la Société Abbott en ses sens ont débouché sur un accord de leur part. Les mises au point techniques sont en cours. Il s'agit là aussi d'un élément clé pour l'automatisation de différentes étapes, qui permettront de faciliter la qualité, le confort d'utilisation pour nos techniciens et l'accréditation de notre test. D'autre part, de nombreux efforts sont faits pour tenter de réaliser la phase de transcription inverse et la PCR quantitative en une seule étape.

Cela nécessitera de nombreuses mises au point (en cours), qui nous obligeront (1) à définir de nouvelles amorces très conservées (étape réalisée) ; (2) garder la même qualité et quantité d'ADN complémentaire (ADNc) obtenu compte tenu des nombreuses structures

secondo-tertiaires de l'ARN (études en cours) car nous devons utiliser des amorces spécifiques et non plus des amorces aléatoires ; (3) modifier toutes les conditions techniques (une fois l'étape 2 franchie). Chacune de ces étapes devra être validée dans le processus de l'accréditation des techniques.

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

Les travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse ont été réalisés par l'organisation par le CNR-D de contrôles nationaux (auxquels tous les laboratoires français ont participé) et internationaux de qualité (auxquels 25 laboratoires dont 4 français) dans le diagnostic de l'infection Delta en 2009, 2012 et 2013. De plus un travail de comparaisons des performances de kits commerciaux a été réalisé par le CNR-D. Tous ces travaux ont fait l'objet de publications scientifiques et/ou de présentations à congrès internationaux (*Clinical Gastroenterology and Hepatology* Volume 11, Issue 6 , Pages 734-740, June 2013 et dans *Journal of Clinical Microbiology*, 2014 Feb 12. [Epub ahead of print]) ; Congrès EASL Avril 2014).

Le message général est que la plupart des techniques « maison » ou commerciales disponibles sous-estiment de façon importante ou sont incapables de quantifier la charge virale dans de nombreux échantillons cliniques. IL s'agit notamment des nombreuses souches de génotypes Africains (HDV-1-Africain et HDV-5, -6, -7 et -8).

- Techniques transférées vers d'autres laboratoires :

Le CNR-D a permis l'implantation de sa technique à Limoges par un partenariat étroit. Une équipe du CNR-D est allée sur place pour assurer en même temps une formation scientifique des techniciens et biologistes, de même que la réalisation d'une manipulation sur place avec assistance technique.

De même après l'achat du contrat de licence, les laboratoires CERBA ont été accompagné dans la mise en point en routine de la technique dans leurs laboratoires.

D'autres part dans les 2 cas, les échanges scientifiques et techniques sont permanents et toutes les souches positives sont envoyées au CNR-D avec les renseignements épidémiologiques afférents.

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

- L'activité diagnostique HDV au cours de l'année 2013 a été marquée par une stabilisation du nombre de demandes de dépistage sérologique : recherches d'Anticorps (Ac) Totaux (1069 examens) et des Anticorps anti-Delta IgM (120). Cependant, avec 2436 demandes de quantification de la charge virale HDV plasmatique, nous enregistrons une augmentation de plus de 20% par rapport à l'an 2012.

- Au total, 281 nouveaux patients infectés par l'HDV, ont été quantifiés au laboratoire et les souches génotypées. Parmi ceux-ci, 94 venaient directement de l'étranger et principalement de Roumanie (68) ou d'Afrique (24) via les laboratoires privés CERBA ou Biomnis. Les 187 autres patients vivent en France, mais leur origine géographique se répartit ainsi pour l'année 2013 : Afrique (31%), Asie (25,7%), Europe de l'Est (18,4%), Europe de l'Ouest (8,6%), voire figure 1). Cependant, pour plus de 16% des patients la donnée de l'origine géographique n'a pu être obtenue. Il convient de noter une forte proportion de patients asiatiques, originaires essentiellement de la Mongolie (15) et de la Géorgie (16), mais aussi 6 de Chine dont 1 de Taiwan. La proportion de patients originaires d'Europe de l'Ouest demeure en dessous des 10%.

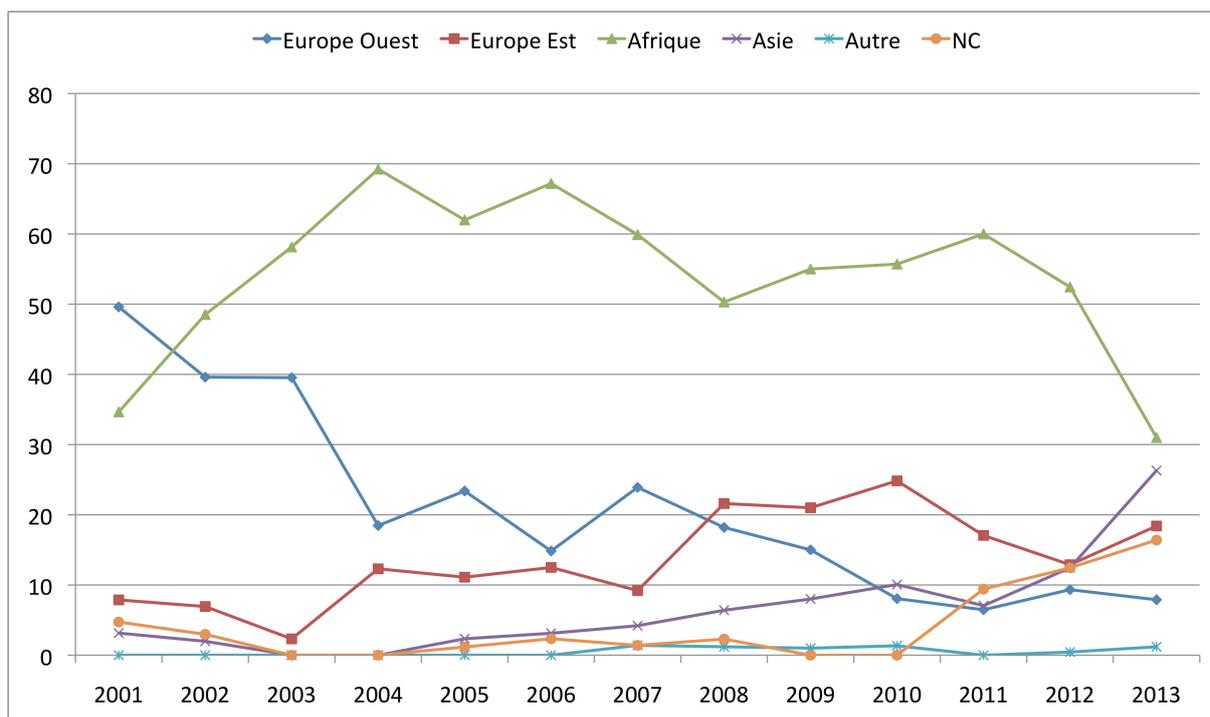


Figure 1 : Origine géographique des patients HDV positifs vivant en France (en %)

- A propos des génotypes des souches isolées, les résultats sont les suivants : les génotypes strictement « africains » : HDV-5 (n=31), HDV-6 (n=3), HDV-7 (n=5) et HDV-8 (n=1) représentent 14% des souches circulant en France. Si on y rajoute les HDV-1Afr (n=55), ce taux passe à 66,4% (Figure 2). Cette donnée est importante eut égard aux performances médiocres des tests de quantification de la charge virale pour les échantillons de génotypes africains, y compris le génotype 1, à la fois par les tests commerciaux et pour les techniques « maison », obtenues lors des études spécifiques et lors contrôles nationaux de qualité que nous avons réalisés (voir les publications produite par le CNR associé dans les revues *Clinical Gastroenterology and Hepatology* Volume 11, Issue 6 , Pages 734-740, June 2013 et dans *Journal of Clinical Microbiology*, 2014 Feb 12. [Epub ahead of print]).

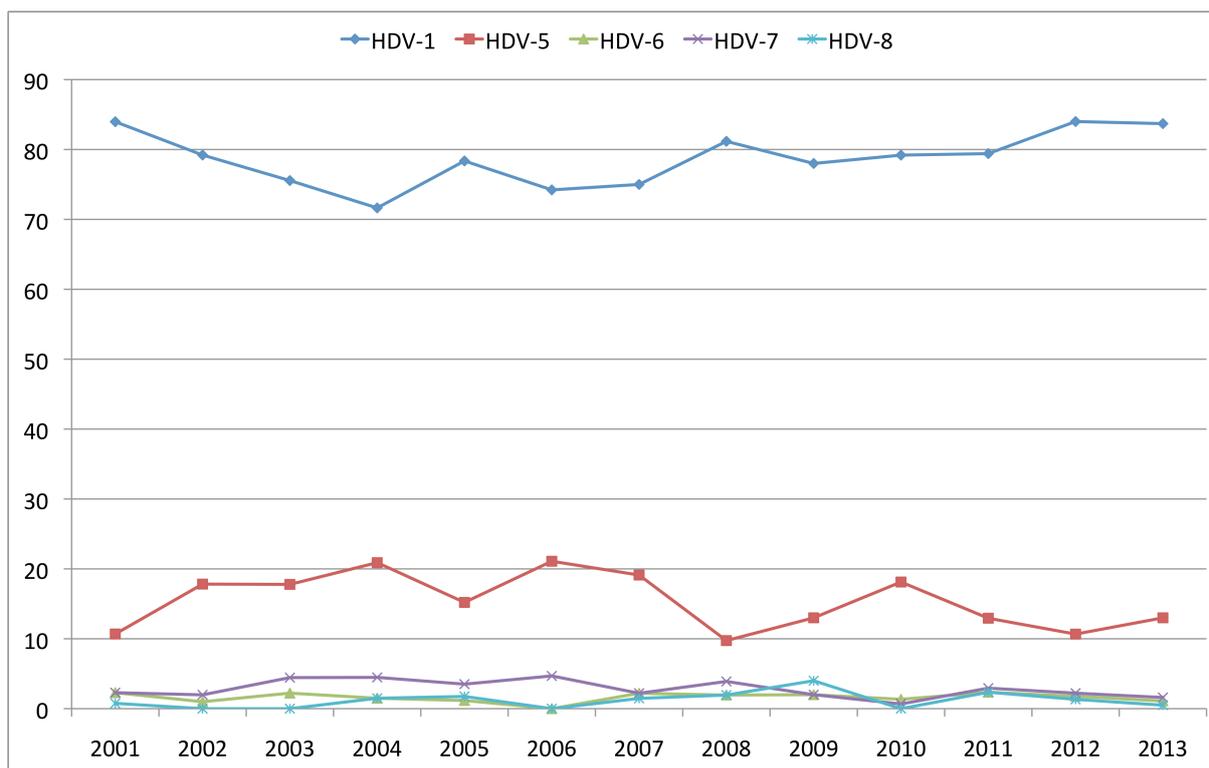


Figure 2 : Proportion des différents genotypes HDV circulant en France (en %)

- Le CNR-D a organisé courant 2013 le premier contrôle international de qualité pour la quantification de la charge virale ARN de l'HDV (1st HDV-IQC), avec le soutien financier de l'ANRS. 25 laboratoires de par le monde ont participé à cette étude utilisant des kits commerciaux (3 nouveaux kits ont été proposés) et surtout des techniques « maison ». Les premiers résultats ont été fournis aux différents participants (voir rapport en annexe). Ils révèlent comme pour le contrôle national français de qualité, des résultats médiocres pour les virus de type africain (voir rapport en annexe). Ces résultats ont été présentés en communication affichée au congrès de l'association européenne pour l'étude du foie (EASL) en Avril 2014, ainsi qu'une communication orale au sein de la réunion du réseau Delta international (Hepatitis Delta International Network, HDIN), en marge du congrès EASL 2014. Le CNR associé Delta anime le groupe de travail international sur la sujet.

- Le CNR-D participé à l'évaluation d'un étalon HDV international OMS. Il s'agit d'une étape décisive dans l'harmonisation des techniques de quantification. Le deuxième volet du contrôle international de qualité pour lequel un nouveau financement a été demandé, sera d'adresser aux laboratoires participant au 1st HDV-IQC, des dilutions de ce standard pour la

conversion de l'ensemble des résultats de copies/ml en IU/ml et achever l'étude complète et exhaustives de comparaison des techniques utilisées (commerciales et « maison »).

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

- Enfin, le CNR-D développe plusieurs collaborations internationales effectives en vue de caractériser la diversité génétique du HDV et de son virus auxiliaire HBV dans diverses régions du Monde. La mise en évidence du nouveau sous-génotype HBV/D8 hautement prévalent au Niger (Abdou M. et al., *J. Gen. Virol.*, 2010) a été aussi retrouvée en Mauritanie. Plus de 27 souches HBV/D8 mauritaniennes sont en cours de caractérisation complète. Cette nouvelle souche HBV est capable de s'associer à des souches HDV de génotypes -1 et -5. De même un nouveau sous génotype A putatif mauritanien est en cours de caractérisation complète. Plusieurs travaux et publications sont en cours. Ces collaborations s'intensifient en particulier avec plusieurs équipes clinico-biologiques d'Afrique du Nord ou d'Afrique Subsaharienne. Plusieurs travaux et publications sont en cours (voir ci-dessous).

- Une étude du diagnostic de l'HDV en sérologie et en biologie moléculaire sur papier buvard a été réalisée. Ces travaux ont été présentés en congrès national et international. (Voir résumé en annexe). Une étude dans la « vraie vie » est en cours d'organisation en collaboration avec des laboratoires privés d'Afrique Subsaharienne, gros pourvoyeurs en France de patients infectés par l'HBV et l'HDV. Le diagnostic de l'infection HDV sera réalisé en parallèle sur des échantillons sanguins et sur des gouttes de sang séché sur papier buvard à la fois en sérologie et en biologie moléculaire.

- La démarche qualité du CNR a été entreprise sous la responsabilité du Dr Mansour, qui effectue cette année (2013-2014) le Diplôme Universitaire « Assurance qualité en Biologie

Médicale » de l'Université Paris 5. Nous avons profité du déménagement achevé dernier trimestre 2013, de l'unité de virologie au troisième étage du bâtiment Lavoisier, dans des locaux rénovés à neuf, et selon les normes classiques de laboratoires. Nous avons aussi profité de la mise en œuvre de l'activité d'accréditation générale engagée au sein du Pôle Biologie - Produits de santé dont nous faisons partie, selon la norme ISO 15189. Deux axes ont été engagés : (1) la mise au norme de la souchothèque CNR Associé Delta grâce à l'acquisition effectuée d'un nouveau congélateur -80°C de grande capacité et (2) l'accréditation de la technique de quantification Delta du CNR Delta. Le plan détaillé et élaboré de cette action sera écrit fin premier trimestre 2014.

3 Activités de surveillance

3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

Voir ci-dessus : toutes les souches HDV positives sont collectées, caractérisées et conservées au sein de la collection CNR-D.

Concernant les patients, on retrouve en majorité des patients de sexe masculin (62,3%). L'âge médian est de 39 ans pour les hommes versus 38,5 ans pour les femmes. L'origine géographique des patients infectés indique l'importance des isolats d'origine africaine subsaharienne

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

La construction du laboratoire de sécurité L3 au sein du laboratoire de bactériologie virologie hygiène dont la livraison est prévu dans le dernier trimestre 2014, devrait permettre d'envisager l'élargissement du champ de compétences du CNR-D dans le domaine de l'étude de la sensibilité des souches cliniques à l'IFN- α , seul traitement actuellement disponible, et aux différents antiviraux à venir.

3.3 Participation aux réseaux de surveillance

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

Il s'agit pour l'instant de la communication régulière des rapports annuels d'activité depuis 2003 ainsi que des rapports d'études ponctuelles réalisées par le CNR-D (rapports techniques et analytiques des contrôles nationaux (2009, 2012) et internationaux (2013) de qualité réalisés.

Origine des patients dépistés en France en 2013	
Europe Ouest = 14	<i>Italie = 1</i>
<i>France = 8</i>	<i>Portugal =1</i>
<i>Belgique=1</i>	<i>Grèce=1</i>
<i>Suisse = 2</i>	
Europe Est = 99	<i>Roumanie = 87*</i>
<i>Bulgarie = 3</i>	<i>Russie = 5</i>
<i>Moldavie = 2</i>	<i>Tchéchénie=1</i>
<i>Albanie=1</i>	
Afrique = 90	<i>Mali = 7</i>
<i>Burkina Fasso = 1</i>	<i>Mauritanie = 4 **</i>
<i>Algérie = 1</i>	<i>Maroc = 1</i>
<i>Bénin=1</i>	<i>Comores=1</i>
<i>Cameroun = 30</i>	<i>République de Centrafrique = 5</i>
<i>Cote d'Ivoire = 13</i>	<i>République Démocratique du Congo = 1</i>
<i>Egypte = 1</i>	<i>Sénégal = 9</i>
<i>Gabon = 2</i>	<i>Sierra Leone = 3</i>
<i>Ghana=1</i>	<i>Tchad = 2</i>
<i>Guinée =4</i>	<i>Tunisie = 2</i>
<i>Madagascar=1</i>	
Asie = 38	
<i>Géorgie = 16</i>	<i>Bali = 1</i>
<i>Chine = 6</i>	<i>Mongolie = 15</i>
Moyen-Orient = 2	<i>Turquie = 2</i>
Autre = 2	<i>Martinique = 1</i>
	<i>Cayenne=1</i>
Inconnu = 21	
En attente = 15	
* Échantillons en provenance de Roumanie	
** Échantillons en provenance de Mauritanie	

- 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...)

La constitution d'un groupe de travail international sur la quantification de l'ARN du viral Delta et la mise au de kits fiables, est la conclusion logique des contacts établis (voir tableau ci-dessous) au cours de l'organisation du premier contrôle international de qualité par le CNR-D. Le rapport remis à chaque participant (voir annexe) avec les perspectives qui y sont consignées, servira de base à cette nécessaire collaboration.

CONTACTS	INSTITUTION / ADDRESSES	PAYS
Dr Jackson Kathy	Head Research and Molecular Development	Australia
Dr Elizaveta Padalko	Clinical Biology, Virology ; University H Policlinic 8,	Belgium
Dr Henrik B. Krarup	Section of Molecular Diagnostics Department of Clinical Biochemistry Aalborg University Hospital	Denmark
Dr Maria Buti Ferret/ Dr M. Homs / F. Rodriguez-Frias	Hospital Universitario Valle Hberon Barcelona	España
Dr Vincent Thibaut	Laboratoire de virologie, hôpital La Pitié Salpêtrière	France
Pr Patrice Hervé / Dr Scholtès Caroline	Laboratoire de virologie Centre de biologie Nord, CHU Lyon Sud	France
Dr Jean Dominique Poveda	Laboratoire CERBA	France
Pr Wedemeyer / Dr Birgit Bremer	Dept. of Gastroenterology, Hepatology and Endocrinology Hannover Medical School;	Germany
Dr Bernhard Miller	MVZ Labor Prof. Seelig GbR Brauer	Germany
Dr Michael Chudy	Molekulare Virologie / Molecular Virology / Paul-Ehrlich-Institut	Germany
Dr Thomas Khöler	LIPSDIAG GmbH, Leipzig	Germany
Dr Nikolaos Gatselis	Department of Medicine and Research Laboratory of Internal Medicine Medical School, University of Thessaly, Larissa	Greece
Dr Ada Katsoulidou	Dpt of Hygiene and Epidemiology Athens University Medical School	Greece
Dr Antonella Olivero	Laboratorio di Fisiopatologia Epatica e Digestiva;	Italy
Dr Teresa Pollicino	Laboratorio di Biologia Molecolare	Italy
Dr Garbuglia Anna Rosa	Laboratory of Virology. INMI L Spallanzani	Italy
Dr Bill Carman	Fast Track Diagnostic	Luxembourg
Dr Haye El Bouh	Laboratoire Biomédical-24	Mauritania
Dr Chulanov Vladimir	Central Research Institute of Epidemiology	Russia
Dr Rory N Gunson	West of Scotland Specialist Virology Centre	Scotland
Dr Sahli Roland	Institut de Microbiologie, CHUV Bugnon	Switzerland
Dr A. Mithat Bozdayi	Department of Gastroenterology Hepatology Institute School of Medicine, Ankara University	Turkey
Dr Jeremy Garson/ Dr RB Ferns	Clinical Microbiology and Virology UCLH NHS Foundation Trust	United Kingdom
Dr Tonya Mixson-Hayden, PhD / Dr M. Kodani	Associate Service Fellow Division of Viral Hepatitis Assay Development and Reference Laboratory	USA

3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Elles sont celles des contrôles nationaux et internationaux de qualité qui ont été initiés et qui seront perpétués. Chaque année le CNR-D fournira à tous les laboratoires français un contrôle de qualité externe pour la diagnostic en sérologie et en biologie moléculaire.

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

4 Alerte

A ce jour pas d'alerte notifiée.

La surveillance de toutes les nouvelles souches circulantes, l'évaluation systématique de tous les kits commerciaux, la publication et la diffusion des informations obtenues, sont des éléments majeure de surveillance.

5 Activités d'information, de formation et de conseil

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

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

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

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

Plusieurs service en Province (Orléans, Limoges, Rennes, Nantes) ont eu ou sollicité le CNR-D pour l'organisation de staffs dans leurs hôpitaux. De même les biologistes du CNR-D sont régulièrement directement par téléphone ou par courriel pour l'aide au diagnostic.

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

Au niveau international, le CNR-D a une tradition d'accueil de médecins, chercheurs ou étudiants étrangers. Des étudiants tunisiens, centrafricains, ont été accueillis en 2013. De plus le CNR-D a été invité et a participé dans différents Pays, Algérie, Tunisie, Bénin a des formations post universitaires.

- Lister les guides élaborés (contenu, modes de diffusion) : SO

- Décrire les modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR :

(i) Rétro-information aux partenaires

(ii) Diffusion aux professionnels : conférences, site internet (adresse du site, date de création, rythme des actualisations, date du dernier rapport d'activité mis en ligne).

Les productions du CNR sont essentiellement les différents mémoires de M2 ou de thèses de sciences réalisés. Ils servent de support scientifique et technique en interne au laboratoire dans la mise en place des études et protocoles techniques. Ils sont l'objet de publications scientifiques et de communications nationales et internationales.

De plus, toujours en interne au laboratoire, le Guide de Bonne Exécution des Analyses (GBEA) sert à la bonne réalisation des techniques de routine destinées au diagnostic et de suivi de l'infection par HDV. 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.

Par ailleurs, de par nos activités universitaires et de recherche, plusieurs communications sont aussi réalisées ;

- Des cours magistraux, à la faculté de médecine de Paris 13, de Paris 7 et à la faculté de médecine Antilles Guyane ;
- Staffs et conférences sur invitation, et dans les services cliniques de l'APHP et en Province (Limoges, Nantes, Lille, Orléans) dans les sessions scientifiques organisées par des laboratoires pharmaceutiques ;
- Cours dans le cadre de la formation continue, Bioforma et laboratoires privés (Biomnis Vitry et Lyon) ;
- Cours à l'Institut Pasteur de Paris (Virologie systématique)

- Décrire les activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou e-mails, volume d'activités...) :

Le CNR-D ne possède pas de moyens de secrétariat propre, et s'appuie sur les moyens existants et limités du laboratoire (1 seule secrétaire pour les unités de bactériologie - hygiène, de virologie et de parasitologie. Les appels sont dirigés vers le responsable du CNR-D.

- Lister les 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...) :

Courant 2013, le CNR-D a été sollicité et a participé au développement d'un étalon standard HDV OMS. Celui-ci est désormais disponible depuis octobre 2013. Le CNR-D doit recevoir gratuitement de l'OMS plusieurs échantillons de ce standard, afin d'en préparer des dilutions et d'envoyer des aliquotes diluées et codées à tous les laboratoires qui ont participé au 1st HDV-IQC. Les résultats de cette deuxième partie de l'étude permettront la comparaison objective des différentes techniques sur la base des résultats obtenus.

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

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

Le CNR-D a développé de nombreuses collaborations avec des équipes françaises et internationales et en particulier avec l'Afrique sur la thématique générale : « Epidémiologie moléculaire des infections B et Delta » dans le Pays où la région considérée.

Plusieurs projets sont en cours :

- Tunisie :

- Le CNR-D assure le co-encadrement avec le Pr. TRIKI Henda de l'Institut Pasteur de Tunis d'une étudiante en thèse d'université, Lamia YACOUBI. La thématique d'étude est : « Epidémiologie moléculaire des infections B et Delta chez des patients tunisiens infectés de façon chronique à partir de patients de cohortes tunisiennes » a effectué 3 stages dans le laboratoire, afin de caractériser les souches B et Delta.
- A ce jour la totalité des échantillons caractérisée est en cours d'exploitation. L'étudiante est en cours de rédaction de sa thèse et d'un article en anglais.
- Le CNR-D a participé à un colloque et à des enseignements post-universitaires (F. Le Gal, S. Bichler et E. Gordien) en Tunisie.

- Mauritanie :

Le CNR-D, le laboratoire de virologie d'Angers (Pr. Lunel-Fabiani) ont réalisé une étude importante sur l'épidémiologie moléculaire B et Delta en Mauritanie. Ces travaux ont été l'objet de la thèse d'université du Dr Wael Mansour, actuellement membre de l'équipe CNR-D. Trois (3) publications ont été réalisées (voir ci-dessous). Ces travaux ont montré la prévalence très élevée de l'HBV (8 à 20%) et de l'HDV (33% chez patients HBV positifs). Des travaux complémentaires sont en cours, afin de caractériser au plan moléculaire des souches du virus auxiliaire HBV retrouvées chez ces patients Delta positifs et qui seraient de génotypes nouveaux. Il s'agit d'échantillons appartenant au génotype HBV/D8, caractérisé par notre équipe chez des patients du Niger voisin, et qui est très prévalent en Mauritanie. Elles sont caractérisées par une recombinaison génétique entre des souches HBV/D et HBV/E dans une région très précise du génome impliquée dans l'intégration du génome HBV dans le génome cellulaire. Une trentaine de souches HBV/D8 est disponible au laboratoire. De même, un nouveau génotype HBV/A, provisoirement appelé HBV/Am (m pour Mauritanie) a été aussi individualisé. Une dizaine de souche HBV/Am est disponible. Toutes ces souches sont en cours de caractérisation par séquençage nucléotidique complet du génome. Ces résultats devraient nous permettre de caractériser plus précisément cette zone de recombinaison génétique et ses éventuelles conséquences fonctionnelles, mais aussi de préciser la position taxinomique de ces HBV/D8 et nous permettre de mieux comprendre les relations HDV avec ces souches HBV différentes.

- HDV, sperme et liquide folliculaire et conséquences pour les unités d'assistance médicale à la procréation. Si l'HBV, l'HCV et l'HIV sont systématiquement pris en compte pour les couples pris en charge dans le cadre des service d'assistance médicale à la procréation, il n'en jamais été le cas pour l'HDV. Le CNR a été sollicité pour la recherche de marqueurs HDV dans le sperme et le liquide folliculaire de patients infectés.

Ces travaux ont été présentés lors de congrès internationaux sous forme de communication affichée (voir résumé en annexe). Une publication, intitulée : « *Markers of HDV infection can be detected in follicular fluid and Semen* » vient d'être soumise à *Journal of Clinical Virology*.

- Projet Deltavir : La collection CNR-D de plus de 1600 échantillons correspondant à 1600 patients est en cours de valorisation sur le plan clinique. Dans le courant de l'année 2013, les dossiers cliniques de 1104 patients ont pu être étudiés et l'ensemble des données

épidémiologiques, cliniques, biologiques et histologiques ont été recueillies au moment du diagnostic et au cours du suivi des patients. Il s'agit d'une étude nationale rétrospective multicentrique. Ce projet financé à hauteur de 128 000 € par l'ANRS est arrivé à échéance. Les analyses univariées et multivariées sont en cours d'analyses statistiques exhaustives. De nombreux projets ancillaires pourront aussi être conduits.

- Variabilité génétique de l'HDV : Une étude exhaustive de la variabilité génétique de l'HDV est en cours sur la base des échantillons de la collection CNR-D. 1600 séquences partielles (région R0) et 150 séquences complètes sont disponibles et des études phylogénétiques extensives sont en cours. Une proposition de classification du genre Deltavirus en géotypes et sous géotypes sera proposée. De même les implications fondamentales d'une telle variabilité génétique sur la biologie du virus pourront être abordées.

6.2 Les publications et communications réalisées ou prévues en lien avec les activités du CNR en 2013

Les publications internationales :

- 1: Brichler S, Le Gal F, Neri-Pinto F, Mansour W, Roulot D, Laperche S, Gordien E. Serological and Molecular Diagnosis of Hepatitis Delta Infection: Results of a French National Quality Control. J Clin Microbiol. 2014 Feb 12. [Epub ahead ofprint] PubMed PMID: 24523467.
- 2: Servant-Delmas A, Le Gal F, Gallian P, Gordien E, Laperche S. Increasing prevalence of HDV/HBV infection over 15 years in France. J Clin Virol. 2014 Feb;59(2):126-8. doi: 10.1016/j.jcv.2013.11.016. Epub 2013 Dec 7. PubMed PMID: 24365475.
- 3: Boyd A, Miaillhes P, Brichler S, Scholtès C, Maylin S, Delaugerre C, Chevallier-Queyron P, Gordien E, Girard PM, Lacombe K. Effect of tenofovir with and without interferon on hepatitis D virus replication in HIV-hepatitis B virus-hepatitis D virus-infected patients. AIDS Res Hum Retroviruses. 2013 Dec;29(12):1535-40. doi: 10.1089/AID.2013.0008. Epub 2013 Sep 24. PubMed PMID: 23972039; PubMed Central PMCID: PMC3848444.
- 4: Lunel-Fabiani F, Mansour W, Amar AO, Aye M, Le Gal F, Malick FZ, Baïdy L, Brichler S, Veillon P, Ducancelle A, Gordien E, Rosenheim M. Impact of hepatitis B and delta virus co-infection on liver disease in Mauritania: a cross sectional study. J Infect. 2013 Nov;67(5):448-57. doi: 10.1016/j.jinf.2013.06.008. Epub 2013 Jun 22. PubMed PMID: 23796871.

5: Brichler S, Le Gal F, Butt A, Chevret S, Gordien E. Commercial real-time reverse transcriptase PCR assays can underestimate or fail to quantify hepatitis delta virus viremia. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013 Jun;11(6):734-40. doi: 10.1016/j.cgh.2013.01.025. Epub 2013 Feb 1. PubMed PMID: 23376798.

Les communications nationales :

- Gordien E., Brichler S., Abdou Chekaraou M., Mansour W., Radjef N., Ivaniushina V., Tamby M., Anaïs P., Rico-Garcia M., Oymak S., Gourari S., Gault E., Dény P. et Le Gal F. L'analyse phylogénétique de 1036 séquences du virus de l'hépatite delta indique que le genre Deltavirus est composé de 8 génotypes et de plusieurs sous-génotypes. *72èmes journées scientifiques de l'Association Française d'étude du foie (AFEF), Lille, France, 2-5 octobre 2013*

- Brichler S., Le Gal F., Neri-Pinto F., Mansour W., Gordien E. Contrôle National de Qualité 2012 pour la quantification de l'ARN du virus de l'hépatite Delta : un besoin urgent de standardisation ! *72èmes journées scientifiques de l'Association Française d'étude du foie (AFEF), Lille, France, 2-5 octobre 2013*

Les communications internationales :

- Gordien E., Brichler S., Mansour W., Deny P., Le Gal F. Phylogenetic analyses of 1036 HDV strain sequences: Hepatitis Delta Virus genus is composed of 8 genotypes and several subgenotypes. *APASL liver week 2013, Singapour, 6-10 juin 2013*

- Brichler S., Le Gal F., Neri-Pinto F., Mansour W., Gordien E. Urgent need for a standardized RNA quantification method for Hepatitis delta virus: Results from a French National Quality Control . *APASL liver week 2013, Singapour, 6-10 juin 2013*

- Mansour W., Lemoine M., Cohen-Scali S., Neri-Pinto F., LLabador de Royer M.A., Le Gal F., Brichler S., Patrat C., Gordien E. Detection of Hepatitis Delta Virus Markers in Semen and Follicular Fluid of Infected Patients. *International Meeting: The Molecular Biology of Hepatitis B viruses, Shanghai, China, 20-23 octobre 2013*

- Brichler S., Le Gal F., Mansour W., Chevret S., Roulot D., Gordien E. Epidemiological and virological features of Hepatitis Delta virus infection in a French cohort of 1122 patients.

International Meeting: The Molecular Biology of Hepatitis B viruses, Shanghai, China, 20-23 octobre 2013

- Brichler S., Le Gal F., Neri-Pinto F., Anouhal E., Mansour W., Chevret S., Gordien E. Urgent need for a standardized RNA quantification method for Hepatitis Delta virus: preliminary results of the first international quality control. *International Meeting: The Molecular Biology of Hepatitis B viruses, Shanghai, China, 20-23 octobre 2013*

- Frederic LE GAL, Segolene BRICHLER, Fernando NERI PINTO, Elhame ANOUHAL, Wael MANSOUR, Sylvie CHEVRET, Emmanuel GORDIEN most available assays underestimate or fail to quantify HDV viral load in samples from infected patients: results of the 1st international quality control

International Meeting: EASL, London 2014

Les conférences sur invitations :

- 12 décembre 2013 : Séminaire organisé par le laboratoire BMS

« Actualités sur l'hépatite Delta : Monitoring virologique et traitement » : Ségolène BRICHLER

- Le 10 octobre 2013 : UNIVERSITE ABDERAHMANE MIRA BEJAIA ; Faculté de médecine/Centre hospitalier universitaire de Bejaia - Service des maladies infectieuses

« L'hépatite virale D : actualités » : Emmanuel GORDIEN

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

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

8 Programme d'activité pour les années suivantes

Perspectives et grandes lignes du programme d'activité de l'année N + 1 et N +2

Plusieurs axes de travail de recherche fondamentale ou appliquée sont envisagés ou d'ores et déjà engagés.

1. Tout d'abord, la mise au point d'une technique de quantification des ARN « édités » et « non édités » du virus de l'hépatite Delta (HDV). (N+1)

Au cours de l'infection HDV, un ARN messenger (ARNm) codant la petite protéine Delta est produit à partir de l'unique phase de lecture ouverte (ORF) situé sur l'ARN antigénomique ou antigénome (intermédiaire de réplication). Cet antigénome va subir au cours du cycle viral un mécanisme d'*editing* (en position 1012 sur l'antigénome) qui va modifier le codon stop UAG de l'ARNm en codon Tryptophane UGG aboutissant à une ORF plus longue codant alors pour la grande protéine Delta, plus longue de 19 acides aminés que la petite protéine. P24 active la réplication du génome viral alors que p27 inhibe cette réplication et favorise l'assemblage des virions fils. Nous, et d'autres auteurs, avons montré que p27 était impliqué dans la pathogenèse HDV et notamment par l'activation du stress oxydant par la voie NADPH oxydase et par la transactivation de facteurs de transcription tels STAT-3 et NF-κB.

Au cours de notre expérience de génotypage systématique de toutes les nouvelles souches virales répliquant par séquençage nucléotidique de la région R0 contenant ce site d'*editing*, nous avons constaté sur les électrophorégrammes une hétérogénéité des pics à cette position nucléotidique.

L'objectif du projet est de mettre au point une méthode de quantification par pyroséquençage une courte séquence nucléotidique incluant ce site d'*editing*, à l'aide de l'automate PyroMark® de la société Qiagen disponible au sein du pôle biologie – produits de santé de l'hôpital Avicenne. Nous pourrions ainsi quantifier la proportion d'ARN « édités » ou « non édités » dans les échantillons cliniques et étudier l'éventuel intérêt pronostic de cet outils.

Méthode : Une stagiaire a été recrutée et participera à toutes les étapes de la mise au point, de la réalisation et de la validation de la nouvelle technologie sur des échantillons cliniques.

2. L'amélioration de notre technique consensus de quantification de la charge virale sera

poursuivie et ce dans 2 directions :

- l'automatisation des différentes étapes de notre technique sur les automates de la chaîne Abbott disponibles au laboratoire, notamment l'étape de transcription inverse avec lecture et interprétation des signaux des échantillons cliniques et du contrôle interne
- Mais aussi la tentative de réalisation de RT-PCR en un seul tube.

3. La mise au point d'un kit commercial marqué CE-IVD, capable de quantifier tous les génotypes (N+2). Les discussions se poursuivent avec la société Fast Track Diagnostic basée au Luxembourg. L'APHP (office du transfert de technologies et de partenariats industriels, OTT&PI) est sur le point de définir cadre juridique et organisationnel de la collaboration, puis avec le CNR-D, le cadre scientifique sera défini.

4. Recherche fondamentale (N+2) : L'appartenance du responsable du CNR-D et d'un de ses adjoints à l'unité INSERM U955 dirigée par le Pr. Pawlotsky, directeur du CNR des hépatites virales B, C et Delta, a permis l'amorce d'une réflexion scientifique dans deux directions :

- Quel peut être l'apport des nouvelles techniques de séquençage à haut débit pour la connaissance de l'HDV ? Les outils et l'expertise sont disponibles sur la plate forme de l'hôpital Henri Mondor.
- Pathogénèse spécifique HDV. Plusieurs travaux antérieurs *in vitro*, sous la direction du responsable du CNR-D ont été initiés et publiés, démontrant l'implication potentielle de la grande protéine dans la pathogénèse HDV. Sur la base de ces données et de résultats obtenus non publiés, l'expertise acquise pour l'HCV dans ce domaine au sein de l'unité INSERM 955, autorise la réflexion et l'élaboration (en cours) des projets dans ce domaine.

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Rappel des missions et objectifs majeurs di CNR et des laboratoires associés

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

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

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

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

La coopération se poursuit également avec l'ensemble des partenaires institutionnels et privés impliqués dans la surveillance ou associés à des événements épidémiologiques liés à l'activité du CNR des Hépatites Virales B, C et delta (hôpitaux, cliniques, laboratoires d'analyse, laboratoires de recherche, etc).

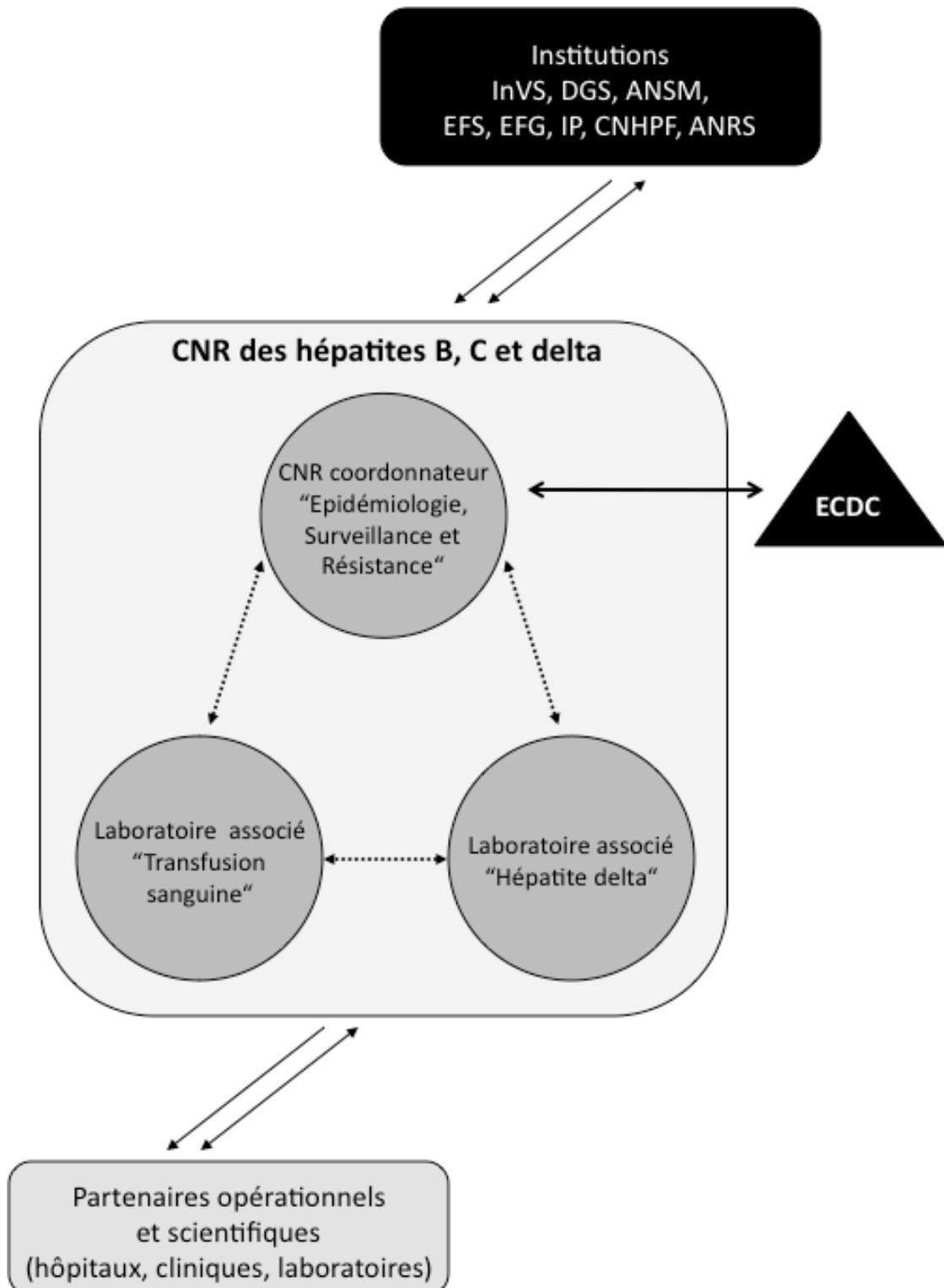


Figure 1 : Structure du CNR des hépatites B, C et delta

ORGANISATION du CNR ET REPARTITION DES ACTIVITES ENTRE LES LABORATOIRES

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

Expertise microbiologique

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

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

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

L'étude de la résistance du VHC et du VHB aux antiviraux, coordonnée par le CNR au plan national, se fait en étroite collaboration avec l'ANRS au sein de l'AC33, présidée par le Professeur Jean-Michel PAWLOTSKY, consacrée spécifiquement à ce sujet. Les objectifs de cette AC sont la mise en place d'un réseau de collaboration des virologues médicaux dédié au développement de techniques d'étude de la résistance et à la surveillance de celle-ci sur le plan national. Celle-ci s'exerce en particulier à travers la mise en place de cohortes et d'un observatoire national de la résistance auquel les trois laboratoires du CNR sont associés.

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

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

Contribution a la surveillance épidémiologique

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

Les trois laboratoires du CNR participent aux études épidémiologiques pour lesquelles ils sont sollicités, tandis que le laboratoire de l'INTS collabore spécifiquement avec

l'EFS et l'AFSSAPS pour la surveillance des infections par le VHB et le VHC dans la population des donneurs de sang en réalisant, en particulier, l'analyse de la diversité des souches circulant en France. Le laboratoire de l'INTS a la capacité de détecter et d'identifier de nouveaux virus pouvant être responsables d'hépatites transmissibles par le sang.

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

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

Contribution a l'alerte

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

Recherche

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

1.2 Moyens humains

Le personnel suivant est affecté au fonctionnement du CNR coordonnateur (Figure 2) :

- . 0,15 Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (Pr JM PAWLITSKY)
- . 0,60 Maître de Conférence des Universités - Praticien Hospitalier (Dr S CHEVALIEZ)
- . 0,35 Praticien Hospitalier (Dr M BOUVIER-ALIAS)
- . 0,25 Praticien Attaché
- . 1,0 Ingénieur d'Etudes (APHP) (A SOULIER)
- . 1,0 Ingénieur d'Etudes (financement InVS) (E ERNANDEZ)
- . 1,0 Technicien de laboratoire (financement InVS) (L POITEAU)
- . 0,10 Cadre de Santé Médico-Technique (F CLERC)

Le personnel suivant est affecté au fonctionnement des laboratoires associés :

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

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

comprend 15 personnes :

- . 8 techniciens de laboratoires,
- . 1 aide-laboratoire
- . 3 ingénieurs
- . 1 secrétaire
- . 1 adjoint au chef d'unité
- . 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 :

- . 5 techniciens,
- . 1 ingénieur,
- . 0,1 secrétariat
- . 0,5 responsable.

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

. 0,10 MCU-PH, APHP, université Paris 13 ; Emmanuel Gordien responsable de l'unité de virologie

. 0,10: Ingénieur Chimie – Biochimie, référent risques chimiques, APHP, Pôle de Biologie – Produits de Santé, Frédéric Le Gal (PhD).

. 0,10 Assistante spécialiste, APHP, Ségolène Brichler (PharmD, PhD)

. 0,60 Praticien Attaché APHP, Wael Mansour (MD, PhD)

. 1,0 Technicien de laboratoire APHP Fernando Neri-Pinto

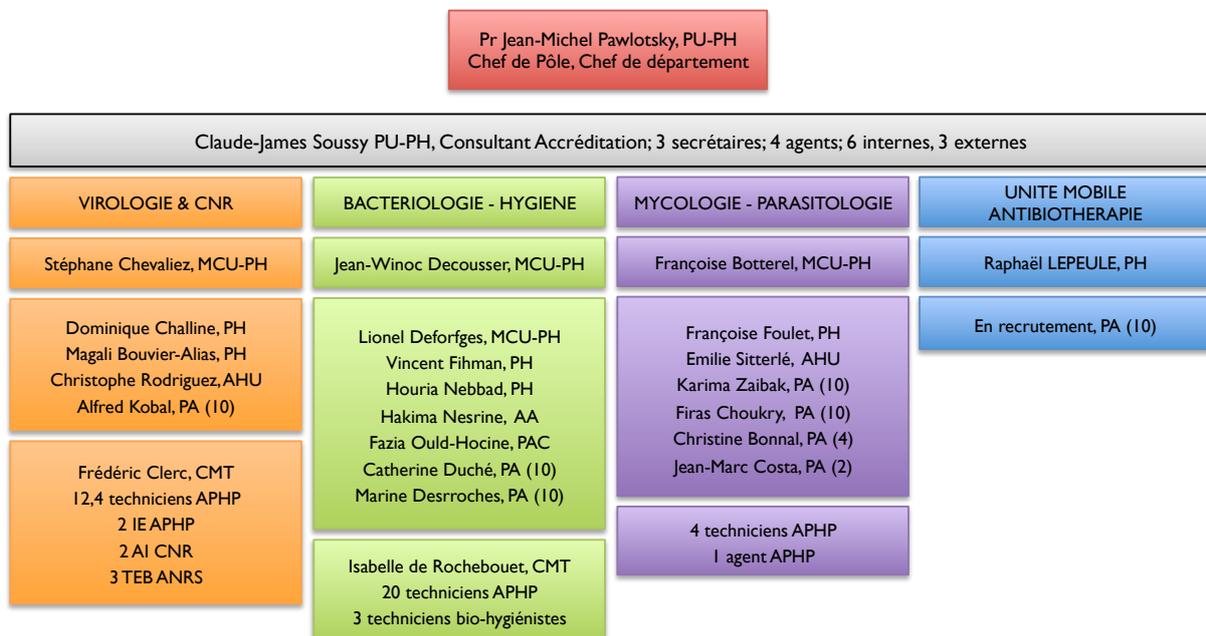


Figure 2 : Organigramme du Département de Virologie, Bactériologie – Hygiène, Mycologie – Parasitologie de l'hôpital Henri Mondor.

1.3 Locaux et équipements

CNR coordonnateur

En ce qui concerne le CNR coordonnateur : Le laboratoire hospitalo-universitaire de Virologie occupe 430 m² de laboratoire, 105 m² de bureau, 175 m² de surface d'accueil, laverie et réserves, bibliothèque (certains locaux sont communs avec le laboratoire de Bactériologie-Hygiène et la plate-forme de séquençage de nouvelle génération) ; 30 m² sont réservés à la garde de nuit. Le laboratoire fonctionne 24 heures sur 24 et 7 jours sur 7. Une

réorganisation physique du laboratoire est prévue dans le cadre du schéma directeur des laboratoires du Pôle de Biologie, dont la date dépendra des financements accordés. Elle vise en particulier à créer, à côté de la plate-forme automatisée de sérologies déjà fonctionnelle, une plate-forme intégrée de biologie moléculaire en maladies infectieuses qui permettra de rationaliser et d'automatiser au maximum les activités actuellement réalisées au sein du laboratoire. Les activités du CNR bénéficieront grandement de cette restructuration. Par ailleurs, une nouvelle plateforme de séquençage de nouvelle génération à haut débit (*next-generation sequencing*, NGS) est en cours d'installation. Cette plateforme est localisée dans des locaux dédiés, en cours de rénovation, contigus au Département de Virologie, Bactériologie-Hygiène, Mycologie-Parasitologie, sous la responsabilité du Pôle de Biologie (Chef de Pôle : Professeur Jean-Michel PAWLOTSKY) et de l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB). Elle comprend de très nombreux appareils détaillés ci-après.

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

- Automates de sérologies virales

- . 3 VIDAS (BioMérieux),
- . 1 ACCESS II (Beckman),
- . 1 LIAISON XL (DIASORIN),
- . 1 VITROS 3600 (Ortho),
- . 1 ARCHITECT (Abbott),

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

- . 1 extracteur automatique d'acides nucléiques COBAS AmpliPrep (Roche)
- . 1 extracteur automatique d'acides nucléiques *m2000_{SP}* (Abbott),
- . 2 extracteurs QIASymphony SP/AS (Qiagen),
- . 1 pipeteur-distributeur Cobas p630 (Roche),
- . 1 automate pour "ADN branchés" Siemens 340 (Siemens),
- . 1 thermocycleur pour PCR "en temps réel" COBAS Taqman 96 (Roche),
- . 1 thermocycleur pour PCR en temps réel *m2000_{RT}* (Abbott),
- . 2 thermocycleurs pour PCR en temps réel StepOnePlus (Applied Biosystems),
- . 1 thermocycleur pour PCR en temps réel LighCycler 1.0 (Roche),
- . 1 thermocycleur pour PCR en temps réel ABI7300 (Applied Biosystems),
- . 1 Rotor-Gene Q (Qiagen)

- . 1 thermocycleur à gradient (Life Technologies),
- . 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),
- . 1 Auto-LiPA 48 (Innogenetics)
- . 2 séquenceurs automatiques LONGREAD TOWER (Siemens),
- . 3 séquenceurs automatiques capillaires ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems), disponibles sur la plate-forme du Centre de Recherche.

- Matériel destiné à la constitution et la conservation des thèques

- . Hottes à flux laminaires,
- . Congélateurs -80°C,
- . Chambres froides et congélateurs -20°C,
- . Cuves d'azote liquide.

- Equipements prévus pour la plateforme de NGS

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

En ce qui concerne les laboratoires associés :

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

Trois secteurs d'activités peuvent être individualisés :

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

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

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

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

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

Le CNR delta ne possède pas à proprement parler de surfaces dévolues spécifiquement à l'activité CNR. Il est localisé dans le bâtiment Lavoisier au 3^{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 120 m² répartis à raison de 60 m² propres à l'unité et 60 m² communs de la plate forme de biologie moléculaire du Pôle de Biologie. La construction d'un laboratoire de type L3 est en cours au sein du laboratoire. Celui-ci devrait être opérationnel courant dernier trimestre 2014.

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

- . PSM, Etuves à CO₂, chaîne du froid : chambre froide à +4°C, congélateurs, -20°C, -40°C, -70°C
- . Laveurs ELISA
- . Automates de sérologies virales acquis en 2010 : Etimax (Diasorin) et Architect (Abbott)
- . Extracteurs automatiques d'acides nucléiques Abbott et Roche
- . Thermocycleurs PCR sprint et ABI 9700, ABI 7000 et ABI 7500 fast (PCR temps réel)
- . Séquenceur ABI3100 (4 capillaires)
- . Séquenceur ABI 3500 (8 capillaires en cours d'acquisition)
- . Lecteur de micro-array MWG
- . Laboratoire L2
- . Automate de pyroséquençage (Pyromark Qiagen)
- . Equipements communs de la plate forme de biologie moléculaire du Pôle Biologie – Produits de Santé Avicenne – Jean Verdier.

1.4 Démarches qualité mise en œuvre au sein du CNR

Un effort important a été et sera consacré à l'accréditation du laboratoire (obligatoire en 2020). Le processus est d'ores-et-déjà engagé dans ce sens pour le CNR coordonnateur avec la visite récente du COFRAC (17-18 février 2014) pour l'accréditation des paramètres suivants : anticorps anti-VIH, AgHBs, anticorps anti-VHC et anticorps anti-HTLV. Le calendrier prévoit un dépôt de dossier fin 2014 pour l'accréditation de l'ARN du VHC, l'ADN du CMV et de l'EBV, ainsi qu'une extension de paramètres sérologiques (anticorps anti-HBs, anti-HBc, anti-VHA, anti-CMV et anti-EBV).

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

En ce qui concerne le laboratoire d'Avicenne (CNR delta), celui-ci a poursuivi la mise à jour du guide de bonne exécution des analyses (GBEA) au fur et à mesure de l'évolution des techniques depuis 2002. Ainsi les échantillons (sérothèques, « cDNA thèques », « tissus thèques »), les techniques sérologiques et moléculaires mises en place au sein du laboratoire et du CNR-D, sont référencées dans le GBEA du laboratoire de Bactériologie, Virologie – Hygiène de l'Hôpital Avicenne. Cette démarche systématique a permis à ce jour la collection de plus de 1600 souches HDV. La mise au point d'un contrôle interne dans notre technique de quantification de référence est acquise. Le processus d'accréditation de l'hôpital Avicenne et du laboratoire de Bactériologie, Virologie – Hygiène selon la norme ISO 15189 est en cours dans l'objectif de la prochaine accréditation V2016. De nombreuses procédures et dispositions organisationnelles ont été mises en place dont notamment la nomination de plusieurs référents accréditation au sein du laboratoire. Aussi afin d'avancer dans ce cadre pour notre technique de référence, après l'extraction automatisée des acides nucléiques sur l'automate M2000sp de la société Abbott, nous sommes en passe d'adapter notre étape de RT-PCR sur leur automate M2000RT (Abbott). Le processus est cours avec l'aide des ingénieurs de la société Abbott. Ainsi les différentes étapes de la technique pourront être plus facilement standardisées à l'instar des normes des tests commerciaux. Enfin, le Dr Mansour, qui suit actuellement le diplôme universitaire de qualité de l'université

Paris Descartes, est responsable de l'élaboration d'un plan spécifique de l'accréditation du laboratoire associé, en liaison avec le Dr Baazia, responsable de l'accréditation de l'unité de virologie. Ce plan comprendra notamment d'une part, (1) la mise à disposition chaque année à tous les laboratoires un contrôle de qualité externe du fait de la diversité de notre collection biologique, et suite à l'expérience et l'expertise acquises dans l'organisation des contrôles nationaux et internationaux de qualité ; et d'autre part (2) la mise aux normes de notre laboratoire pour son accréditation en tant que centre accréditeur.

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

CNR coordonnateur.

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

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

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

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

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

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

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

. Techniques de biologie moléculaire pour la détection des mutations de résistance du VHB associées à la chimiothérapie antivirale, fondées sur le séquençage direct du domaine transcriptase inverse de l'ADN polymérase ; l'hybridation inverse (Ino-LiPA HBV DR v3) ; la caractérisation de la dynamique des populations virales sous traitement par l'étude des quasi-espèces de la transcriptase inverse du VHB par des techniques de clonage-séquençage ; et les techniques de détection des mutations de résistance et de caractérisation de leurs dynamiques par pyroséquençage à haut débit suivi de l'analyse des données par notre package de logiciels "maison" PyroPack[®] (UDPS).

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

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

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

CNR en transfusion sanguine.

- méthodes immunoenzymatiques : automates dédiés, incubateurs, laveurs de microplaques, spectrophotomètres,

analyse moléculaire : plateau d'analyse moléculaire des acides nucléiques comprenant des thermocycleurs, une plateforme de séquençage, des automates de PCR en temps réel (Cobas Taq Man), plateau de clonage

CNR delta.

Dans le cadre du CNR Delta, le laboratoire possède les techniques sérologiques de recherche des anticorps anti-delta totaux, (ETI-AB-DELTAK-2 Sorin Biomedica) ainsi que des anticorps anti-delta IgM (ETI-DELTA-IGMK-2 Sorin Biomedica). La recherche de l'antigène delta (Sorin Biomedica) n'est utilisée qu'à visée de recherche. De nouveaux tests sérologiques (société InGen) sont maintenant disponibles sur le marché : EIAgen ANTI-HDV IgM KIT (Anti Hep Delta IgM) ; EIAgen ANTI-HDV KIT (Anti Hep Delta totaux); EIAgen HDV Ag KIT (Ag Hépatite Delta). Ces tests ont été évalués sur différents les panels d'échantillons constitués. Les principaux résultats viennent d'être publiés (Brichler et al., *J. Clin. Microbiol.*, 2014).

En ce qui concerne les techniques de biologie moléculaire, La technique de RT-PCR quantitative plasmatique pour le virus HDV mise en place au laboratoire en 2004, est utilisée en routine depuis 2005 (Le Gal F. et al *Journal of Clinical Microbiology* 2005). Tous les génotypes sont également quantifiables par cette technique, à l'exception du génotype 3 « Sud Américain » pour lequel une paire d'amorces spécifiques a été définie. Cet examen est inscrit à la nomenclature à la cotation B220 (n°4119). Une étape cruciale a été franchie pour cette technique : la mise au point d'un contrôle interne, par l'utilisation de l'ARN du bactériophage MS2. La mise au point d'une RT-PCR multiplex sera l'étape ultime (fin premier semestre 2014). La détection qualitative de l'ARN HDV est effectuée si le résultat de PCR quantitative est négatif pour les échantillons de patients ayant eu au préalable une détection d'ARN delta positive, ou pour confirmer la réplication virale d'un échantillon retrouvé « positif non quantifiable » par notre technique quantitative. Cette technique est une RT-PCR qui consiste à amplifier une région du génome viral (appelée R0) recouvrant la fin du gène codant la grande protéine jusqu'à la séquence du ribozyme antigénomique (Radjef et al., 2004). Cet examen est inscrit à la nomenclature à la cotation B180 (n°4118). La caractérisation du génotype des souches HDV est effectuée sur toute nouvelle souche positive, par l'amplification de la région R0 du génome viral suivie du séquençage et de l'analyse phylogénétique (par Distance et Neighbor-Joining) (Radjef et al *Journal of Virology*

2004). La séquence ainsi obtenue (environ 320 paires de bases) est alignée avec des séquences de référence des différents types (clades 1 à 8) caractérisées préalablement au laboratoire ou issues de la littérature. De nombreuses autres régions du génome viral peuvent également être caractérisées sur le même modèle par l'utilisation de plusieurs autres couples d'amorces. La séquence complète du génome est obtenue par séquençage de plusieurs régions chevauchantes (appelées R1, R2 et R3, avec des variantes selon certaines souches) et reconstitution de la séquence complète (Le Gal et al *Emerging Infectious Diseases* 2006). Cette identification génotypique entre dans le cadre du suivi épidémiologique des souches circulantes réalisé par le CNR mais n'intervient pas encore dans le schéma de diagnostic clinique du patient. Le CNR-D dispose d'une base de données exhaustive de plus de 1600 séquences 'R0' HDV de tous les génotypes (1 à 8).

2.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

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

Pour le VHC : Anti-VHC et ARN du VHC

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

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

Description : nombre de souches, caractérisation

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

Pour le CNR delta, la souchothèque compte plus de 1600 souches. Celles-ci sont enregistrées dans un tableau informatique, rangées et conservées dans un congélateur à -80°C uniquement réservée à cet effet. La déclaration de la collection est la future étape qui sera réalisée fin premier semestre 2014.

Pour le CNR en transfusion sanguine, nous disposons pour le VHB d'un panel de référence incluant les 10 principaux sous-types de l'Ag HBs est entretenu. Chacun des échantillons de ce panel a été séquencé pour toute ou partie du génome. D'autre part, 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. Nous disposons également d'un panel de 17 échantillons de protéines HBs recombinantes calibrées à environ 50 ng/ml produites *in vitro* en cellules HuH7. Ce panel est composé de 9 échantillons de génotypes A à F et 8 échantillons porteurs d'une ou plusieurs mutations situées sur la boucle antigénique de l'Ag HBs et connues pour être à l'origine de faux négatifs lors du dépistage de ce marqueur. Pour le VHC, nous disposons de divers panels d'échantillons plasmatiques. Ceux-ci comprennent principalement :

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

Conditions de stockage

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

Conditions de mise à disposition des collections

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

disponibles pour la communauté scientifique. La signature d'un "material transfert agreement" (MTA) précisant les conditions exclusive d'utilisation des souches fournies, est signé entre les deux parties.

2.4 Liste des techniques

L'algorithme diagnostique préconisé par le CNR delta est le suivant :

Tout patient infecté par l'HBV doit systématiquement être dépisté pour l'HDV. La recherche des anticorps totaux par technique commerciale ELISA doit être utilisée en première intention. Les contrôles de qualité effectués ont montré une bonne sensibilité et spécificité des tests commerciaux les plus couramment utilisés (Brichler et al., 2014). En cas résultat négatif (hormis chez les patient immunodéprimés majeurs) le patient est considéré comme négatif.

En cas de résultat anticorps totaux anti HDV positifs, la recherche des anticorps IgM anti HDV peut être effectuée, mais n'est pas forcément informative. D'une part, ces anticorps peuvent manquer, notamment chez les patients africains (Lunel Fabiani, F., Mansour W. et al., 2013), d'autre part, les tests disponibles peuvent manquer de sensibilité (Brichler et al., 2014).

La recherche de l'ARN Delta est le seul examen permettant d'affirmer la réplication virale. La quantification par RT_PCR en temps réel est l'examen idéal. Cependant la plupart des techniques « maison » ou commerciale donnent des résultats médiocres. Ainsi, les services doivent adresser leurs échantillons à des centres de référence.

La recherche de l'ARN par RT-PCR qualitative, utilisant la RT-PCR R0 développée par le CNR Delta est possible. Il s'agit d'une technique très sensible (entre 60 et <100 copies/ml ou 60 et 100 UI/ml, après utilisation du nouvel étalon OMS HDV), mais qui donne un résultat positif ou négatif, et donc ne permet pas la quantification et donc le suivi de l'efficacité du traitement institué. Enfin, la RT-PCR qualitative pourrait être utilisée chez un patient immunodéprimé en cas de doute diagnostique si la RT-PCR quantitative n'est pas disponible.

Le génotypage n'a pas montré pour l'instant d'intérêt en pratique clinique et doit être réservé à la recherche clinique et fondamentale. Dans ce cas le génotypage par analyse phylogénique de la région R0 est suffisant.