

**Rapport annuel d'activité**

**2015**

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

**Année d'exercice  
2014**

## 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. 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 et co-infectés par le VIH, 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 afin d'évaluer leur sensibilité à quantifier les mutants de l'AgHBs et l'évaluation de la nouvelle version de la trousse Monolisa HCV Ag/Ab Ultra (Bio-Rad). La surveillance des donneurs de sang n'a pas fait apparaître de différences notables avec les années précédentes.

Le laboratoire associé du virus de l'hépatite delta vu se consolider la mission d'expertise tant au niveau national qu'international pour la variabilité génétique du virus et dans le diagnostic en biologie moléculaire, à la fois le génotypage des souches et la quantification de la charge virale ARN plasmatique. Un troisième contrôle national de qualité pour le diagnostic HDV en sérologie et en biologie moléculaire a été réalisé à un grand nombre de laboratoires de la France hexagonale. Le premier contrôle international de qualité pour la quantification de la charge virale ARN a été complété et mené à son terme par l'envoi à tous les centres internationaux de tous les continents exceptés l'Amérique du Sud, soit au total 29 laboratoires.

**Rapport annuel d'activité**

**2015**

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

**Année d'exercice**

**2014**

**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, Unité Transversale de Traitement des Infections 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 certains personnels du laboratoire de Virologie d'Avicenne sont désormais rattachés à l'équipe de recherche de l'IMRB U955, en particulier les Docteurs Emmanuel GORDIEN et Ségolène BRICHLER.

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 2014

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

#### Techniques développées ou en développement

Le développement de méthodes diagnostiques alternatives au prélèvement sanguin pour le dépistage et le diagnostic des hépatites virales est en plein essor. C'est le cas des tests immunologiques sur bandelettes permettant la mise en évidence d'antigènes ou d'anticorps (TRODs ou tests rapides d'orientation diagnostique) ou des tests non immunologiques permettant la détection ou la quantification des acides nucléiques. Ces techniques utilisent des matrices biologiques non conventionnelles, telles que le liquide cravicaire 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 veineux ou capillaire et de le conserver sous forme desséchée. De nombreuses analyses peuvent être envisagées à partir de ce support (moléculaires, sérologiques et pharmacologiques). Les techniques de biologie moléculaire pour la détection voire la quantification des génomes viraux (ARN du VHC ou ADN du VHB) à partir de sang total déposé sur buvard ont été développées au cours de l'année 2014. 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 des techniques de biologie moléculaire permettant la détermination du génotype de résistance des patients nouvellement pris en charge pour leur hépatite chronique C dans le cadre de la mise en place de l'observation nationale de la résistance du VHC aux antiviraux directs adossé à la cohorte nationale HEPATHER (ANRS CO22).

### Travaux d'évaluation des techniques (réactifs et trousses)

**Performances des nouveaux tests rapides (TROD) pour la détection des anticorps anti-VHC à partir de sang total.** L'objectif était d'évaluer les performances de TROD disposant d'un marquage CE-IVD pour la détection des anticorps anti-VHC à partir de sang total veineux déposé sur DBS. Un total de 197 individus [55,3 % d'hommes, 52 ans d'âge médian (intervalle : 18-84 ans)] ayant signé un consentement éclairé, séronégatifs (n=68) ou séropositifs [n=129 avec une charge virale moyenne de  $5,80 \pm 0,80$  Log UI/mL et majoritairement infectés par un génotype 1 (57,1%), 4 (20,6%) et 3a (15,1%)] pour le VHC ont été inclus. Chez chacun des individus, 4 TROD [OraQuick® HCV rapid Antibody Test (Orasure), ASSURE® HCV rapid Test, Multisure HCV (MP Diagnostics) et FIRST RESPONSE® HCV Card Test (Premier Medical Ltd)] ont été réalisés à partir du sang total veineux déposé sur papier buvard. Les résultats des tests étaient interprétables dans 100% des cas. La spécificité des tests était de 100%, et ce quel que soit le test considéré. La sensibilité variait de 98,45% à 100% selon le test. Les anticorps anti-VHC n'étaient pas détectés chez 5

individus (respectivement, 2 avec le test ASSURE, 1 avec le test FIRST RESPONSE et 2 avec le test Multisure). La détection des anticorps anti-VHC chez ces individus à l'aide des mêmes TROD à partir de plasma était positive, excepté chez les 2 individus faussement négatifs avec le test Multisure HCV. Ce travail a fait l'objet d'une communication orale aux Journées Francophones de Virologie en avril 2015.

**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 et infectés par un génotype 1 à 6. La spécificité de la trousse HCV Ag Architect était de 100% (IC95% : 97,8%-100%). Les titres de l'AgC n'étaient pas influencés par le génotype du VHC. 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 (*m2000* et Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV v2.0). 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,  $p<0,001$ )

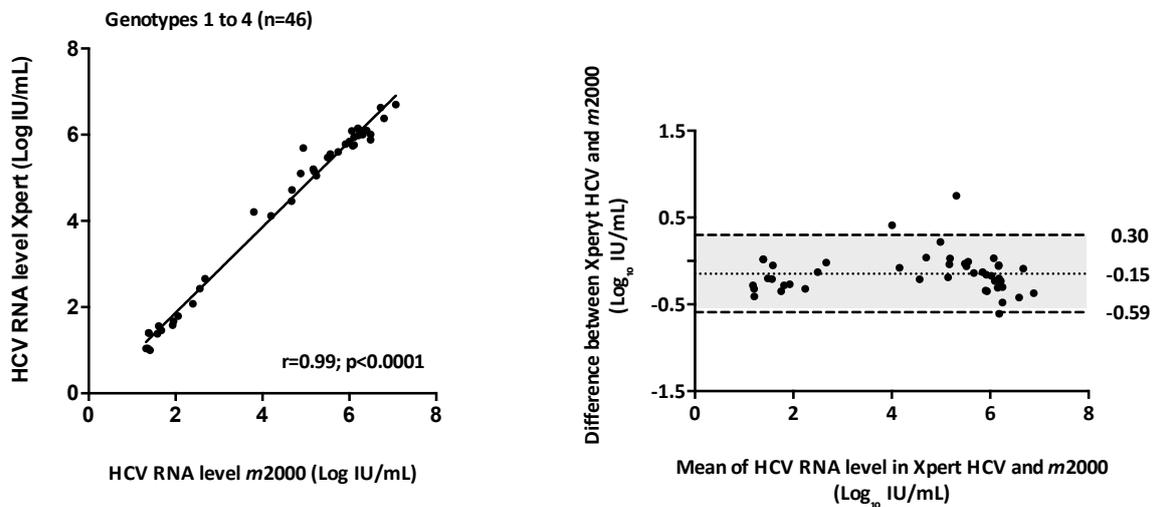
Au total, la trousse HCV Ag Architect était spécifique et le test était facile à réaliser. Cela pourrait représenter un outil pour le dépistage, le diagnostic et le monitoring, en particulier avec le développement des thérapeutiques antivirales sans interféron qui ne nécessite pas une sensibilité analytique élevée (Chevaliez et al., J Clin Virol. 2014;61(1):145-8).

**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 et la détermination du génotype à partir de méthodes standardisées couramment utilisées dans les laboratoires de diagnostic. Des échantillons de sérum et de sang total ont été collectés chez 3 groupes de patients (170 patients séronégatifs pour le VHC, 26 patients avec une infection guérie et 315 patients avec une infection chronique). La détection des anticorps anti-VHC à partir de sang total déposé sur DBS était fiable après redéfinition d'une nouvelle valeur seuil (ratio signal/cutoff). L'ARN du VHC était détecté chez la plupart des patients ayant une répllication virale, mais les valeurs de charges virales étaient significativement plus faibles que celles observées à partir du sérum (en moyenne 1,60 à 1,75 Log UI/mL inférieures), suggérant que seule la présence ou l'absence d'ARN du VHC ou des variations entre 2 valeurs doivent être prises en considération. La détection-quantification de l'antigène de capsid à partir de sang total déposé sur DBS manquait de sensibilité car seuls 64,1% des échantillons étaient positifs. La détermination du génotype était correcte dans la grande majorité des cas.

Au total, cette étude a montré que le sang total recueilli sur buvard peut être utilisée en toute confiance pour le diagnostic et le monitoring de l'infection virale C. Le DBS pourrait avoir une réelle utilité pour améliorer l'accès aux soins de populations éloignées des structures classiques de soins (Article soumis).

**Evaluation des performances de la plate-forme Xpert HCV pour la détection et la quantification de l'ARN du VHC.** Les performances intrinsèques de la plate-forme de PCR en temps réel Xpert HCV (Cepheid) ont été évaluées pour la quantification de l'ARN du VHC dans un contexte de pratique clinique. L'ARN de 126 sérums de patients infectés par les principaux génotypes du VHC (1-5) à été quantifié à l'aide de la plate-forme Xpert HCV et par la plate-forme *m2000* (Abbott Diagnostics). Les valeurs de charge virale obtenues avec la plate-forme Xpert HCV étaient modérément sous-estimés par rapport aux valeurs obtenues avec le *m2000* (moyenne de la différence Xpert moins *m2000* : - 0,15 Log IU/mL) et ce, quels

que soient le génotype et la valeur de la charge virale considérés (**Figure 1**).



**Figure 1 :** Corrélation des valeurs d'ARN du VHC mesurées par la plate-forme de PCR en temps réel Xpert HCV (Cepheid) avec les valeurs mesurées sur les mêmes échantillons avec la technique *m2000* (Abbott) (A). Représentation de Bland-Altman (B). La zone grise correspond à la moyenne  $\pm$  1,96 DS.

### Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Aucune technique n'a été transférée à d'autres laboratoires au cours de l'exercice 2014.

## 2.2. Activité d'expertise de l'année 2014

### Nombre de souches ou prélèvements réceptionnées

Au total, le nombre de prélèvements envoyés au CNR a été de 115. Ces prélèvements provenaient exclusivement de laboratoires hospitaliers français.

### Nombre de souches testées pour leur sensibilité aux antiviraux

Au cours de l'année 2014, 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 (4 demandes au

total). Ces demandes émanaient des hôpitaux de Sens, Saint Lô, Metz et la Réunion.

Au cours de l'année 2014, plusieurs recherches de mutations de résistance aux antiviraux directs (antiprotéases, anti-NS5A et anti-polymérase) utilisés dans le traitement de l'hépatite chronique C ont été réalisées par le CNR (25 demandes au total). En effet, la mise à disposition des nouveaux antiviraux d'abord en ATU avant l'obtention de l'AMM européenne a justifié la mise en place de réunions de concertation pluridisciplinaires (RCP) selon les recommandations du rapport Dhumeaux sur la prise en charge des personnes infectées par les virus d'hépatite B et C. Bien qu'il n'y ait pas à ce jour de recommandation pour la détermination du profil de résistance génotypique, la recherche de substitutions amino acidiques est systématiquement réalisée pour les patients en échec de traitement aux antiviraux directs qui sont candidats à un retraitement du fait de la gravité de leur maladie hépatique, la présence de manifestations extra-hépatiques, etc... Les trois régions (NS3, NS5A et NS5B) sont systématiquement séquencées.

### 3. Activités de surveillance

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

##### **Surveillance de l'hépatite B au sein de l'enquête ANRS-COQUELICOT 2011-2013.**

L'étude Coquelicot était une enquête séro-épidémiologique transversale réalisée dans 5 agglomérations et 2 départements en France. Les données ont été collectées auprès de 1 718 usagers de drogues (UD) recrutés dans 122 structures de prise en charge et de réduction des risques. Les critères d'inclusion dans l'enquête étaient d'avoir injecté ou sniffé au moins une fois dans sa vie et d'être âgé de plus de 18 ans. La population incluse dans l'enquête était à la fois francophone et russophone, en raison de la présence importante d'UD russophones dans les dispositifs de soins et de réduction des risques depuis quelques années. Le prélèvement biologique était un recueil de sang total déposé sur un papier buvard après auto-piqûre au bout du doigt. Un total de 21 hommes était porteur de l'AgHBs, la séroprévalence du VHB était estimée à 1,62%. Les 21 UD infectés par le VHB avaient un âge moyen de 46,8 ans, étaient majoritairement nés dans un pays où la prévalence du VHB est supérieure ou égale à 2% (69,2%). Les UD coinfectés par le VHC ne représentaient que 29,8% des UD séropositifs pour l'AgHBs (versus 45,1% parmi les UD non infectés par le VHB)

et 5,6% étaient également infectés par le VIH (versus 8,6% parmi les UD non infectés par le VHB). Les UD coinfectés étaient plus âgés, étaient originaires de pays de faible endémicité, avaient tous connu une pratique d'injection au cours de leur vie et étaient proportionnellement moins nombreux à déclarer avoir eu des relations sexuelles dans les 12 derniers mois (Article BEH soumis).

**Estimation de l'incidence de l'hépatite C au sein de l'enquête ANRS-COQUELICOT 2011-2013.** L'incidence de l'hépatite C a été estimée à partir des données biologiques en utilisant la formule  $I=(n/N)\times(365/WP)\times 100$ , décrite par Bush et Page Shaffer (N étant le nombre d'UD séronégatif pour le VHC, n étant le nombre d'UD nouvellement infectés, i.e présence d'ARN du VHC en l'absence d'anticorps anti-VHC et WP la fenêtre sérologique). Parmi les 907 patients séronégatifs, 55 patients avaient un ARN du VHC détectable et/ou quantifiable. Quarante-huit patients avaient un ARN quantifiable avec une valeur moyenne de  $2,6\pm 0,9$  Log UI/mL, tandis que 6 patients avaient un ARN détectable non quantifiable. Sept patients étaient coinfectés par le VIH et ont donc été exclus des cas incidents. La confrontation des données biologiques avec les réponses aux questionnaires systématiquement distribués à chaque participant a permis d'exclure 40 patients en l'absence de facteur de risque. L'incidence VHC parmi les UD a été estimée à 49% en Ile de France. Cette valeur était significativement plus élevée chez les UD âgés de moins de 30 ans et les utilisateurs de crack au cours des mois précédents (respectivement, 75% et 62% versus 27%) (Article soumis).

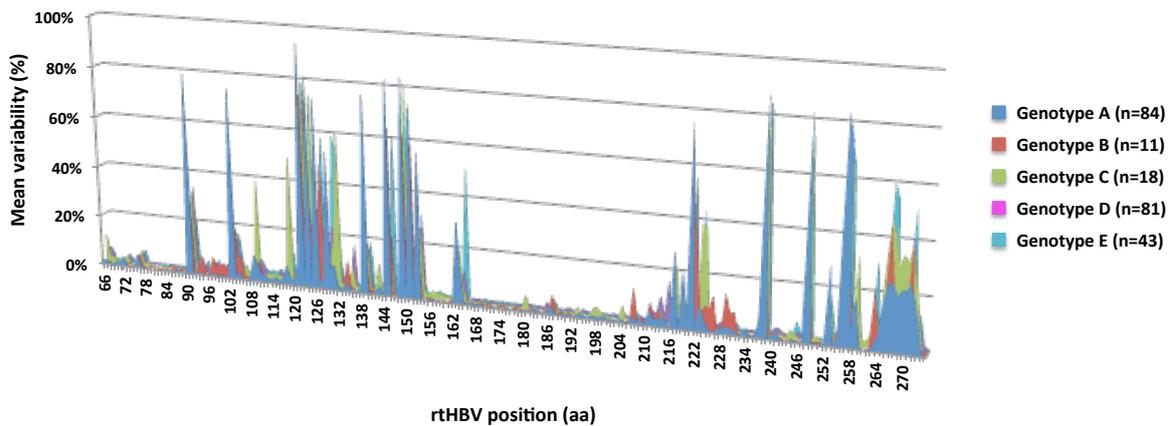
### 3.2. Surveillance de la résistance aux antiviraux

**Prévalence de la résistance primaire aux analogues nucléos(t)idiques.** La prévalence de la résistance primaire a été évaluée chez 238 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  $2 \text{ Log}_{10}$  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 caractéristiques des patients sont présentées dans le **Tableau 1**. Plus de 1 600 000 séquences ont été analysées, soit 55 000 séquences en moyenne par échantillon. L'analyse par UDPS révélait la présence de 3 régions hautement variables ( $\geq 50\%$  de variabilité nucléotidique) ; il s'agissait des régions 121-131, 216-221 et 266-271 (**Figure**

2), et ce quel que soit le génotype viral. Au total, 34 patients (14,3%) étaient infectés par des variants minoritaires résistants aux analogues nucléos(t)idiques (RAV). Les variants résistants étaient généralement présents en faibles quantités (0,3%-34,2%). En effet, 11,8%, 0,4%, 1,2% et 0,8% des patients abritaient des virus résistants présents en quantité respectivement, entre 1% et 5%, entre 5% et 10%, entre 10% et 20%, et supérieure à 20%. Seulement 2 patients avaient en effet des RAV qui représentaient plus de 20% de la population virale.

**Tableau 1** : Caractéristiques des patients

|                                       | N=238     |
|---------------------------------------|-----------|
| <b>Âge, moy±SD (année)</b>            | 45,1±13,7 |
| <b>Sexe masculin, n (%)</b>           | 148 (62%) |
| <b>Pays de naissance</b>              |           |
| France                                | 80 (34%)  |
| Europe                                | 20 (11%)  |
| Afrique du Nord                       | 20 (8%)   |
| Moyen-Orient                          | 16 (7%)   |
| Asie                                  | 27 (11%)  |
| Afrique Sub-saharienne                | 67 (28%)  |
| <b>ALAT (&gt;LSN)</b>                 | 94 (42%)  |
| <b>Cirrhose, n (%)</b>                | 18 (10%)  |
| <b>AgHBe-négatif, n (%)</b>           | 202 (85%) |
| <b>ADN du VHB (Log UI/mL), moy±SD</b> | 4,2±1,7   |
| ADN du VHB ≥2000 UI/mL                | 138 (58%) |
| <b>Génotype VHB, n (%)</b>            |           |
| Génotype A                            | 84 (35%)  |
| Génotype B                            | 11 (4%)   |
| Génotype C                            | 18 (7%)   |
| Génotype D                            | 81 (34%)  |
| Génotype E                            | 43 (18%)  |
| Génotype G                            | 1 (0,4%)  |



**Figure 2 :** Variabilité nucléotidique du domaine de transcriptase inverse de l’ADN polymérase du VHB en fonction des génotypes (A à E). Les différents génotypes du VHC sont représentés par différentes couleurs.

### 3.3. 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, ledipasvir, paritaprevir/r, ombitasvir et dasabuvir). Le nombre de patients inclus à ce jour est des 16 629 (62% VHC, 30% VHB et 8% VHC-VHB). L’efficacité de ces antiviraux directs (DAA), administrés ou non en association à l’interféron alpha, est élevée, avec des taux de guérison, caractérisés par un ARN viral indétectable 12 semaines après l’arrêt du traitement, supérieurs à 80%. La majorité des échecs de traitement sont des rechutes, définies par un ARN viral à nouveau positif après l’arrêt du traitement chez des patients l’ayant négativé sous traitement. Ces rechutes surviennent majoritairement dans les premières semaines suivant l’arrêt du traitement. L’analyse des populations virales des patients en échec de traitement à l’aide de méthodes de séquençage direct (“population sequencing”) ou des méthodes plus sensibles de séquençage de nouvelle génération (UDPS) a montré que la majorité des patients abritait des virus résistants à un ou plusieurs des

antiviraux directs administrés. Le rôle de la résistance dans la non-réponse au traitement est probablement important, mais reste à évaluer. C'est la raison pour laquelle il a été décidé de mettre en place un observatoire national de la résistance qui sera adossé à la cohorte nationale française HEPATHER (ANRS CO 22). Les objectifs principaux de cet observatoire seront de mesurer l'incidence de la résistance du VHC aux antiviraux directs et de caractériser les profils de résistance des patients en échec de traitement inclus dans HEPATHER. Les objectifs secondaires de cet observatoire seront les suivants : (i) Etudier la persistance des variants viraux résistants au cours du temps après l'arrêt du traitement antiviral ; (ii) Caractériser la dynamique des populations virales résistantes aux antiviraux directs ; et (iii) Développer des stratégies antivirales de retraitement des patients en échec de traitement. Tous les patients inclus dans la cohorte nationale HEPATHER et traités par DAA (sofosbuvir, simeprevir, daclatasvir ou tout DAA en développement) et n'ayant pas été guéris (échec de traitement) ou ayant prématurément arrêté le traitement et ce, quelle qu'en soit la raison (observance, effets indésirables, ...) seront inclus dans cet observatoire. Des échantillons biologiques de sang total seront prélevés avant le début du traitement, au moment de l'échec et régulièrement après (semaines 4, 12, 24, 48 et annuellement après l'arrêt du traitement). Cet observatoire permettra d'évaluer l'incidence de la résistance aux nouveaux DAA et d'avoir une cartographie de la résistance dans la "vraie vie" à partir d'une large cohorte de patients atteints d'hépatite chronique C traités par DAA.

## 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-signallement@invs.sante.fr](mailto:noa-signallement@invs.sante.fr).

**Transmission du VHC en hémodialyse.** L'étude génétique et phylogénique menée au niveau de 3 régions du génome viral (portion du gène NS5B, gène codant le glycoprotéine d'enveloppe E1 et région HVR1) chez le patient source et les cas index suspectés (au nombre de 7 mais seuls 3 ont été considérés du fait d'un génotype identique) a montré que les séquences nucléotidiques présentaient des pourcentages d'homologie variables en fonction de la région considérée (**Tableau 2**).

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

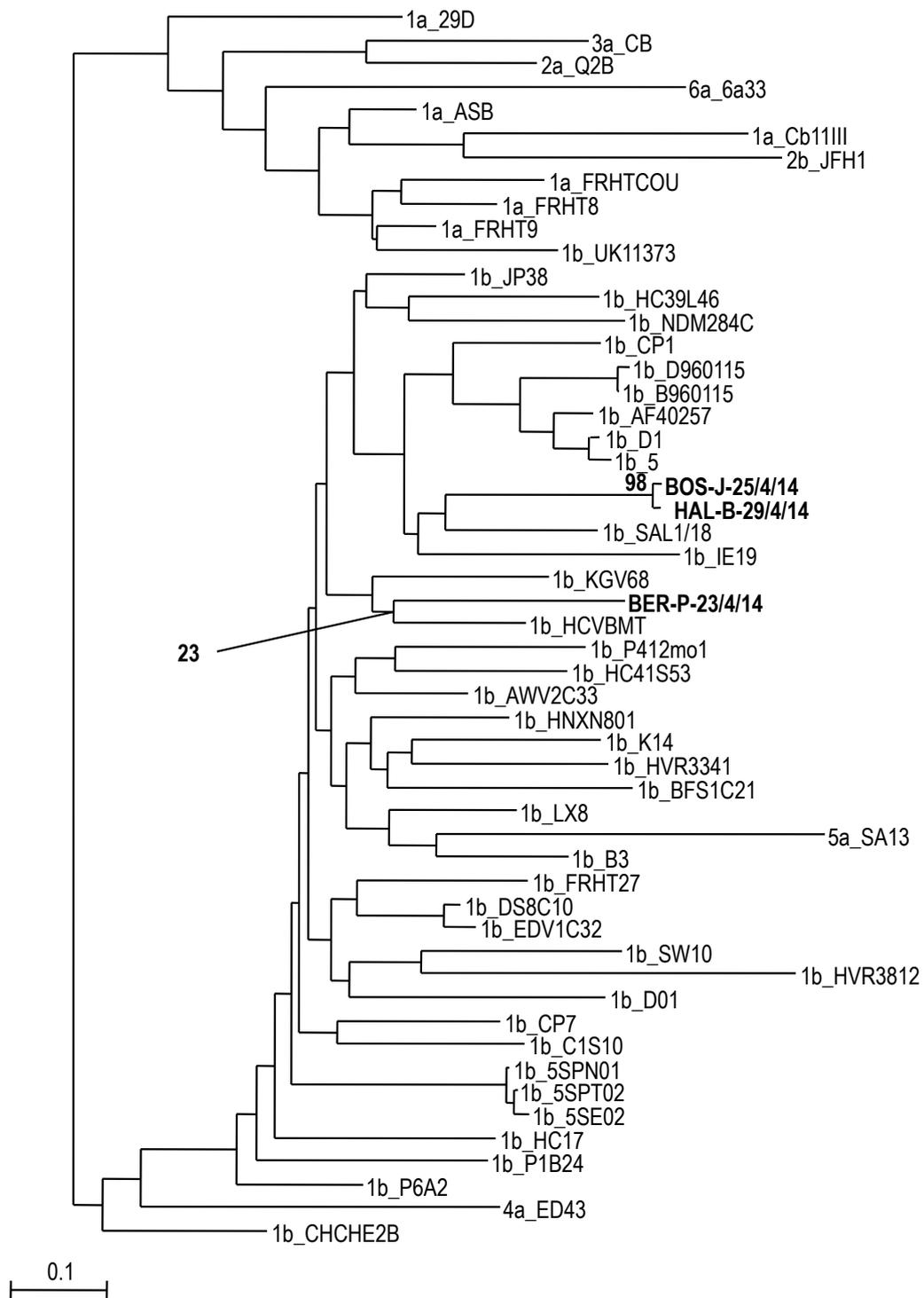
| Patient                   | % d'homologie nucléotidiques |              |
|---------------------------|------------------------------|--------------|
|                           | E1 (551 nt)                  | HVR1 (81 nt) |
| Pt-1 (cas index suspecté) | 100%                         | 100%         |
| Pt-2                      | 99,8%                        | 92,6%-100%*  |
| Pt-3                      | 88,4%                        | 61,7%-64,2%* |

\*Positions dégénérées expliquant l'intervalle d'homologie

En effet, les séquences de la région E1 avaient un fort pourcentage d'homologie (88,4% à 99,8%). Si l'on considère les séquences de la région HVR1, l'homologie nucléotidique était importante entre les patients Pt-1 et Pt-2 (92,6%-100%). L'étude de la région E1, fondée sur l'alignement des séquences obtenues avec 110 séquences nucléotidiques de génotype 1b, disponibles dans les banques, montrait que les souches isolées des patients 1 et 2 étaient phylogéniquement très proches, et plus proches les unes des autres que de chacune des autres séquences prototypes incluses dans l'analyse (valeur

de ré-échantillonnage : 100%). Lorsque l'on étudiait la région HVR1 par comparaison avec 38 séquences nucléotidiques de génotype 1b disponibles dans les banques, les souches des 2 patients (Pt-1 et Pt-2) formaient à nouveau un groupe monophylétique avec des valeurs de ré-échantillonnage élevées au niveau du nœud (98%) (**Figure 3**).

Au total, les analyses des souches de VHC issues des 7 patients suggéraient très fortement que le cas index (Pt-1) avait été infecté au cours d'une séance d'hémodialyse à partir du sang du patient source (Pt-2).



**Figure 3 :** Phylogénie de la région HVR1 du VHC (81 nucléotides). Analyse réalisée par DNADIST (Phylip 3.65), Kimura 2-parameter, Ts/Tv 2.0. Les chiffres indiqués au niveau des nœuds correspondent aux pourcentages de 1 000 re-échantillonnage.

**Transmission du VHC au cours d'une intervention chirurgicale.** 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 le cas index suspecté a montré que les séquences nucléotidiques présentaient des pourcentages d'homologie nucléotidique de respectivement 97,1% et 87,6% pour les régions E1 et HVR1.

L'étude de la région E1, fondée sur l'alignement des séquences obtenues avec 110 séquences nucléotidiques de génotype 1b, disponibles dans les banques, montrait que les souches isolées des 2 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 : 97%). Lorsque l'on étudiait la région HVR1 par comparaison avec 38 séquences nucléotidiques de génotype 1b disponibles dans les banques, les souches des 2 patients formaient à nouveau un groupe monophylétique avec des valeurs de ré-échantillonnage élevées au niveau du nœud (84%).

Au total, les analyses des souches de VHC issues des 2 patients suggèrent très fortement que le cas index a été infecté à partir du sang du patient source.

## 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 M1 Biologie-Santé dans le cadre de l'UE Interactions des agents microbiens : "Diversité virale", Faculté de Médecine de Créteil, Université Paris Est

Enseignement dans le cadre du Master M1 Biologie-Santé dans le cadre du parcours Microbiologie-Infectiologie : "Aspects moléculaires de l'infection VHC", Faculté de Médecine Paris Descartes, Université Paris 5

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 Sud.

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 dans le cadre du Master M2 Sciences, technologie, santé, mention infectiologie : microbiologie, virologie, immunologie, spécialité virologie moléculaire et médicale : "Virus de l'hépatite C et apparentés : structure et virologie moléculaire", Université Denis Diderot.

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

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

### Formation aux professionnels de santé

1. “Interpreting on-treatment responses: new stopping rules“. Hepatitis C treatment evolution: the impact for physicians; the impact for the patients, Berlin Germany, June 13-14, 2014.
2. “Virologie de l’hépatite C : un métier d’avenir ?“. Hépatites virales/VIH : des antiviraux pour une pathologie virale, Perpignan, 11 février 2014.
3. “Place de la virologie dans les traitements actuels et futurs du VHC“. Journée Janssen en Hépatologie, Paris, 3 juin 2014.
4. “La virologie de l’hépatite C a-t-elle un avenir ?“. Diagnostic & Suivi des Maladies Infectieuses, Innovations et Perspectives, 5 juin 2014.
5. “Dépistage et diagnostic de l’hépatite C : TROD et autotest“. La fin des dogmes dans la prise en charge de l’hépatite C, Paris, 9 juillet 2014.

### Accueil de stagiaire

Léa Ouakin (France)

Monika Chomczyk (Pologne)

Anetta Sulewska (Pologne)

### 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 auprès de la DGS

. Membre du Comité Scientifique du programme de surveillance des hépatites B et C auprès de l’InVS

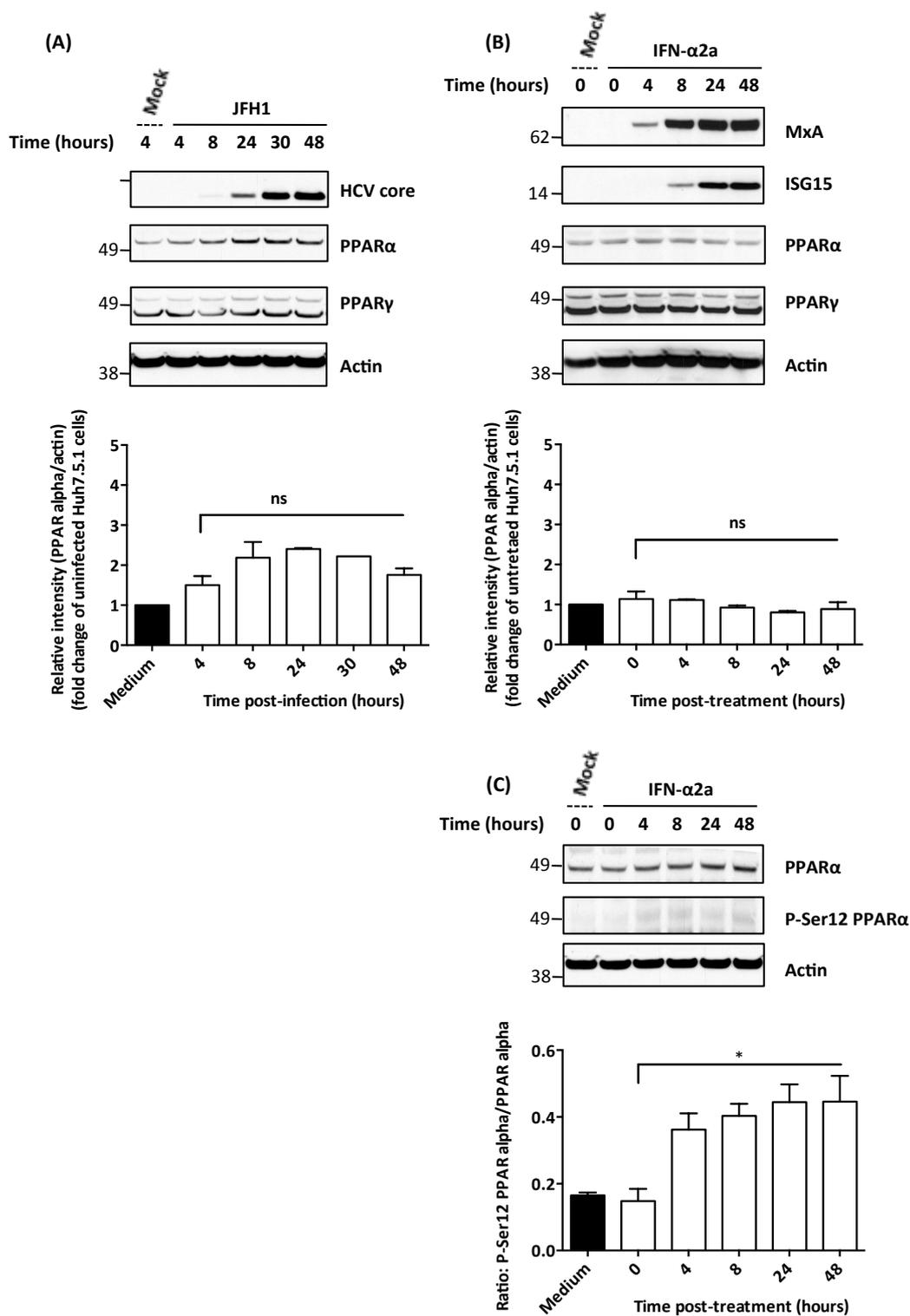
. Membre du groupe de travail sur le parcours de soins du patient infecté par le VHC auprès de l'ARS

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

### 3.1. Activité de recherche

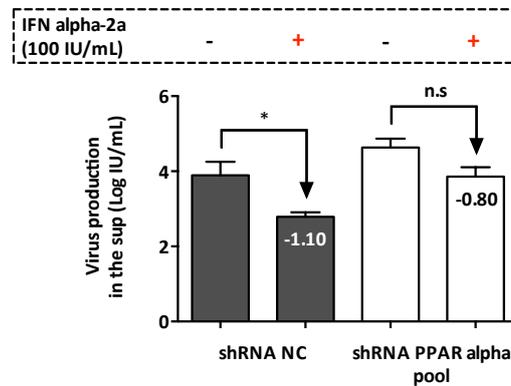
**Etude du rôle des récepteurs nucléaires PPAR alpha dans la réponse antivirale à l'IFN alpha dans le modèle de l'infection par le VHC. Applications potentielles.** L'IFN alpha endogène joue un rôle majeur dans la guérison des cellules infectées par le VHC, qu'elle soit spontanée ou dans le contexte d'une profonde inhibition de la réplication virale par les antiviraux directs (DAA). Les récepteurs nucléaires PPAR (*peroxisome proliferated-activated receptor*) alpha sont majoritairement exprimés dans le foie et constituent des facteurs de transcription de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et dans la régulation de l'immunité. Les ligands synthétiques des PPAR alpha ont une activité antivirale vis-à-vis du VHC *in vitro* et *in vivo*. Le cycle viral du VHC est intimement associé au métabolisme des lipides, en particulier les VLDL. Nos résultats préliminaires ont montré que l'IFN alpha activait les PPAR alpha par phosphorylation (**Figure 4**) et que l'activité antivirale de l'IFN était entre autres dépendante de l'activation des PPAR (**Figure 5**).

Ce travail nous permettra d'identifier des mécanismes possibles par lesquels les récepteurs nucléaires PPAR alpha participent à l'action antivirale de l'IFN alpha endogène au cours de la guérison spontanée ou thérapeutique de l'infection chronique par le VHC. Ces résultats serviront de base pour guider les hypothèses d'un projet complet visant à disséquer les voies d'activation et de répression impliquées dans ces phénomènes, de comprendre les mécanismes moléculaires les sous-tendant et d'identifier des cibles potentielles d'intervention au niveau de ces voies permettant d'accélérer la guérison de cellules infectées de façon chronique. La compréhension de ces mécanismes pourrait avoir de nombreuses applications en thérapeutique antivirale en dehors du modèle de l'hépatite chronique C. Elle s'intègre au travail actuel du laboratoire sur le développement de nouvelles approches antivirales à large spectre.



**Figure 4 :** (A) Expression de la protéine de capsid du VHC et des formes totales de PPAR alpha et gamma, au cours de l'infection de cellules Huh7.5.1 par JFH1 (MOI=1); (B) Expression des protéines MxA et ISG15 et des formes totales de PPAR alpha et gamma sous

traitement par l'IFN alpha (100 UI/mL) ; (C) Expression protéique des formes totale et phosphorylée (Ser12) de PPAR alpha sous traitement par IFN alpha (100 UI/mL) (\* $p < 0,05$ ).



**Figure 5 :** Production virale dans la surnageant de cellules Huh7.5.1 transfectées par un mélange de shRNA PPAR alpha ou par un shRNA témoin (shRNA NC), infectées par JFH1 (MOI=1) et traitées ou non par l'IFN alpha (100 UI/mL), exprimée en TCID50/mL.

#### 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.

### 3.2. Publications et communications

#### Publications internationales

1. Jilg N, Lin W, Hong J, Schaefer EA, Wolski D, Meixong J, Goto K, Brisac C, Chusri P, Fusco DN, Chevaliez S, Luther K, Kumthip K, Urban TJ, Peng LF, Lauer GM, Chung RT. Kinetic differences in the induction of interferon stimulated genes by interferon alpha and *IL28B* are altered by infection with hepatitis C virus. **Hepatology** 2014; 59(4): 1250-61.
2. Rodriguez C, Chevaliez S, Pawlotsky JM. Response to Rodriguez-Frias et al. **Hepatology** 2014; 59(3): 1212-3 (letter to editor).
3. Chevaliez S, Challine D, Naija H, Luu T, Laperche S, Nadala L, Allain JP, Lee HH, Pawlotsky JM. Performances of a new rapid test for the detection of hepatitis B surface antigen in various patient populations. **J Clin Virol** 2014; 59(2): 89-93.

4. 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. **J Clin Virol** 2014, 61(1): 145-148.
5. Cloherty G, Cohen D, Sarrazin C, Wedemeyer H, Chevaliez S, Herman C, Bernstein B, Pawlotsky JM. Hepatitis C Virus RNA Assay Sensitivity Impacts the Management of Patients Treated with Direct-Acting Antivirals. **Antiviral Ther** 2014; in press.
6. Cotte L, Braun J, Lascoux-Combe C, Vincent C, Valantin MA, Sogni P, Lacombe K, Neau D, Aumaitre H, Batisse D, de Truchis P, Gervais A, Michelet C, Morlat P, Vittecoq D, Rosa I, Bertucci I, Chevaliez S, Aboulker JP, Molina JM; the ANRS HC26 study group. Telaprevir for HIV-HCV coinfecting patients failing peginterferon-ribavirin (ANRS HC26 TelapreVH): an open-label, single-arm, phase 2 trial. **Clin Infect Dis** 2014, 59(12):1768-76.
7. Schmidt WN, Nelson DR, Pawlotsky JM, Sherman KE, Thomas DL, Chung RT. Direct-acting antiviral agents and the path to interferon independence. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2014;12(5):728-37.
8. Hayer J, Rodriguez C, Germanidis G, Deléage G, Zoulim F, Pawlotsky JM, Combet C. Ultradeep pyrosequencing and molecular modeling identify key structural features of hepatitis B virus RNase H, a putative target for antiviral intervention. **J Virol** 2014;88(1):574-82.
9. Féray C, Pawlotsky JM, Roque-Afonso AM, Samuel D, Dhumeaux D. Should we screen blood products for hepatitis E virus RNA ? **Lancet** 2014;383(9913):218.
10. Pawlotsky JM. What are the pros and cons of the use of host-targeted agents against hepatitis C? **Antiviral Res** 2014;105:22-5.
11. Pawlotsky JM. New hepatitis C therapies: the toolbox, strategies, and challenges. **Gastroenterology** 2014;146(5):1176-92.
12. Hézode C, Fontaine H, Dorival C, Zoulim F, Larrey D, Canva V, De Ledinghen V, Poinard T, Samuel D, Bourliere M, Alric L, Raabe JJ, Zarski JP, Marcellin P, Riachi G, Bernard PH, Loustaud-Ratti V, Chazouilleres O, Abergel A, Guyader D, Metivier S, Tran A, Di Martino V, Causse X, Dao T, Lucidarme D, Portal I, Cacoub P, Gournay J, Grand-Lemaire V, Hillon P, Attali P, Fontanges T, Rosa I, Petrov-Sanchez V, Barthe Y, Pawlotsky JM, Pol S, Carrat F, Bronowicki JP; CUPIC Study Group. Effectiveness of

- telaprevir or boceprevir in treatment-experienced patients with HCV genotype 1 infection and cirrhosis. **Gastroenterology** 2014;147(1):132-142.
13. Pawlotsky JM. New hepatitis C therapies. **Semin Liver Dis** 2014;34(1):7-8.
  14. Pawlotsky JM. New hepatitis C virus (HCV) drugs and the hope for a cure: concepts in anti-HCV drug development. **Semin Liver Dis** 2014;34(1):22-9.
  15. Meguellati A, Ahmed-Belkacem A, Yi W, Haudecoeur R, Crouillère M, Brillet R, Pawlotsky JM, Boumendjel A, Peuchmaur M. B-ring modified aurones as promising allosteric inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. **Eur J Med Chem** 2014;80:579-92.
  16. Laird ME, Mohsen A, Duffy D, Mamdouh R, LeFouler L, Casrouge A, El-Daly M, Rafik M, Abdel-Hamid M, Soulier A, Pawlotsky JM, Hézode C, Rosa I, Renard P, Mohamed MK, Bonnard P, Izopet J, Mallet V, Pol S, Albert ML, Fontanet A. Apolipoprotein H expression is associated with *IL28B* genotype and viral clearance in hepatitis C virus infection. **J Hepatol** 2014;61(4):770-6.
  17. Ahmed-Belkacem A, Guichou JF, Brillet R, Ahnou N, Hernandez E, Pallier C, Pawlotsky JM. Inhibition of RNA binding to hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase: a new mechanism for antiviral intervention. **Nucleic Acids Res** 2014;42(14):9399-409.
  18. Florimond A, Chouteau P, Bruscella P, Le Seyec J, Mérour E, Ahnou N, Mallat A, Lotersztajn S, Pawlotsky JM. Human hepatic stellate cells are not permissive for hepatitis C virus entry and replication. **Gut** 2014 Jul 25.
  19. Pawlotsky JM. Hepatitis E screening for blood donations: an urgent need? **Lancet** 2014;384(9956):1729-30.
  20. Pawlotsky JM. Viral entry inhibition: too late for hepatitis C, but promising for other viral infections. **Gut** 2015;64(3):362-4.
  21. Ruiz I, Feray C, Pawlotsky JM, Hézode C. Patient with decompensated hepatitis C virus-related cirrhosis delisted for liver transplantation after successful sofosbuvir-based treatment. **Liver Transpl** 2015;21(3):408-9.

### Communications nationales

1. Chevaliez S, Poiteau L, Soulier A, Rosa I, Hézode C, Roudot-Thoraval F, Pawlotsky JM. Dépistage de l'infection virale C à partir de sang total : performances des tests

rapides d'orientation diagnostique. 17<sup>ème</sup> Journées Francophones de Virologie, Paris, 9-10 avril 2015.

### Communications internationales

1. Chevaliez S, Rodriguez C, Poiteau L, Soulier A, Donati F, Darty M, Chevallier P, Leroy V, Brodard V, Brouard C, Larsen C, Semaille C, Roudot-Thoraval F, Pawlotsky JM. Primary resistance to HBV in a large population of treatment-naïve patients. 65<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Boston (USA), November 7-11, 2014 (abstract: Hepatology 2014; 60(1) Suppl: 232A).
2. Chevaliez S, Soulier A, Poiteau L, Pawlotsky JM. Dried blood spot (DBS), a promising tool for large-scale hepatitis C screening, diagnosis and treatment monitoring. 49<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), London (UK), April 9-13, 2014 (abstract: Journal of Hepatology 2014; 60 Suppl 1: S325-326).
3. Brisac C, Salloum S, Chevaliez S, Feeney E, Schaefer E, Zhu C, Hong J, Fusco D, Peng L, Lin W, Chung R. The scaffold protein IQGAP2 is essential for the innate control of HCV infection in hepatoma cells. 21<sup>st</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff, Canada, September 7-11, 2014.
4. Chevaliez S, Soulier A, Poiteau L, Rosa I, Hézode C, Roudot-Thoraval F, Pawlotsky JM. New virological tools for large-scale hepatitis C screening, diagnosis and treatment monitoring. AASLD/EASL Special Conference on Hepatitis C, New York, NY, USA, September 12-13, 2014.

### Conférences nationales sur invitation

1. "Virologie de l'hépatite C : un métier d'avenir ?". Hépatites virales/VIH : des antiviraux pour une pathologie virale (Gilead), Perpignan, 11 février 2014. (SC)
2. "Place de la virologie dans les traitements actuels et futurs du VHC". Journée Janssen en Hépatologie, Paris, 3 juin 2014. (SC)
3. "La virologie de l'hépatite C a-t-elle un avenir ?". Diagnostic & Suivi des Maladies Infectieuses, Innovations et Perspectives (Abbott), 5 juin 2014. (SC)
4. "Dépistage et diagnostic de l'hépatite C : TROD et autotest". La fin des

- dogmes dans la prise en charge de l'hépatite C (MSD), Paris, 9 juillet 2014. (SC)
5. "Alternatives au prélèvement veineux : TDR et DBS". Journée AC11/AC12/AC33 de l'ANRS, Amphithéâtre Adicare, hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, 27-28 janvier 2014. (SC)
  6. "Dépistage VIH/VHC : quel test de dépistage choisir ? TROD versus buvard. 1<sup>ère</sup> Rencontre des unités sanitaires de la région PACA : Amélioration du diagnostic et de la prise en charge du VIH en milieu carcéral, Aix en Provence, 5 juin 2014. (SC)
  7. "Construire un parcours de santé cohérent pour tous les patients et optimiser la prise en charge, à l'aune des avancées thérapeutiques". Journée nationale de lutte contre les hépatites virales (table ronde), Paris, 19 mai 2014. (SC)
  8. "La place des tests rapides dans l'hépatite C". 15<sup>èmes</sup> Journées Nationales d'Infectiologie (JNI), Palais des Congrès, Bordeaux Lac, 11-13 juin 2014. (SC)
  9. "Hépatite virale C : résistances virologiques au traitement". 19<sup>ème</sup> journée annuelle du Groupe Français d'Etudes Moléculaires des Hépatites (GEMHEP), Paris, 9 décembre 2014. (SC)
  10. "Les nouveaux traitements de l'hépatite C". Réunion AC11-AC33 de l'ANRS, Paris, 27-28 janvier 2014. (JMP)
  11. "Guérison du VHB: fantasme ou réalité?". Séminaire de l'IHU Maladies Infectieuses, Marseille, 7 février 2014. (JMP)
  12. "A l'heure des nouvelles cibles thérapeutiques du VHC". Forum Hépatite C Gilead, Marseille, 28-29 mars 2014. (JMP)
  13. "Conclusions". 2<sup>ndes</sup> Rencontres Parlementaires sur l'Hépatite C, Paris, 27 mai 2014.
  14. "Virus de l'hépatite C: virologie, diagnostic, traitement, résistance". Formation des médecins régionaux Abbvie, Rungis, 30 juin 2014. (JMP)
  15. "Traitement de l'hépatite B et de l'hépatite C en 2014". Synergies Résistance, Aix-en-Provence, 9-10 octobre 2014. (JMP)
  16. "Les inhibiteurs de protéase du VHC". Synergies Résistance, Aix-en-Provence, 9-10 octobre 2014. (JMP)
  17. "Eradication VHB-VHC". 15<sup>ème</sup> Congrès de la Société Française de Lutte contre le SIDA, Paris, 23-24 octobre 2014. (JMP)
  18. "Eradication du VHB". Réunion G10, Paris, 4 décembre 2014. (JMP)

19. "Hépatite C: virus, médicaments, cancer". 1<sup>ère</sup> Journée du Collegium Galilée, Paris, 5 décembre 2014. (JMP)
20. "Update sur la résistance du VHC aux antiviraux". Journées de l'AC11/AC33 de l'ANRS, Paris, 21-22 janvier 2014. (JMP)

### Conférences internationales sur invitation

1. "Interpreting on-treatment responses: New stopping rules". Hepatitis C treatment evolution: The impact for physicians; the impact for the patients, Berlin, Germany, June 13-14, 2014. (SC)
2. "Hepatitis C infection: New methods of diagnosis". HCV 2020, An expert Forum for Global HCV Specialists, University of Oxford, Oxford, UK, October 1-2, 2014. (SC)
3. "Treatment of hepatitis C in 2014 and beyond". Viral Hepatitis Symposium, Lausanne (Suisse), 16 janvier 2014. (JMP)
4. "Interferon-free hepatitis C regimens". 6th Challenges in Virology, Saanen (Suisse), 17-18 janvier 2014. (JMP)
5. "Exploration of antiviral therapy". Central European Alliance to Fight Hepatitis C Inaugural Workshop, Vienna (Austria), 24-25 janvier 2014. (JMP)
6. "HCV from the virological perspective: turning from bench to bedside". 9<sup>th</sup> Hepatology Perspectives, Berlin (Germany), 1-2 février 2014. (JMP)
7. "HCV molecular targets". 39<sup>th</sup> Annual Congress of the Spanish Association for the Study of the Liver (AEEL), Madrid (Spain), 18-20 février 2014. (JMP)
8. "Molecular basis of new HCV therapies and future clinical developments". 47<sup>th</sup> Annual Meeting of the Italian Association for the Study of the Liver (AISF), Rome (Italy), 20-21 février 2014. (JMP)
9. "Interferon alfa-free treatment of HCV". Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI) 2014, Boston (USA), 2 and 6 mars 2014. (JMP)
10. "New therapeutic strategies for hepatitis C". 23<sup>rd</sup> International Meeting on News and Perspectives in Hepatology, Padova (Italy), 14 mars 2014. (JMP)
11. "New HCV therapies: unsolved issues". The International Liver Congress 2014, Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL),

- London (UK), 9-13 avril 2014. (JMP)
12. "Achieving the highest probability of HCV cure". The International Liver Congress 2014, Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), London (UK), 9-13 avril 2014. (JMP)
  13. "Will viral resistance be of importance?". Post-Graduate Course, The International Liver Congress 2014, Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), London (UK), 9-13 avril 2014. (JMP)
  14. "A critical evaluation of HCV treatment targets for patients of all genotypes". BMS Symposium, The International Liver Congress 2014, Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), London (UK), 9-13 avril 2014. (JMP)
  15. "EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2014". The International Liver Congress 2014, Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), London (UK), 9-13 avril 2014. (JMP)
  16. "Update on HCV drug development". ANRS Basic Research Seminar, Montpellier (France), 27-28 avril 2014. (JMP)
  17. "Do clinicians need resistance testing in the DAA era?". C-HEP, Controversies in Viral Hepatitis, Berlin (Germany), 1-3 mai 2014. (JMP)
  18. "Screening and diagnosis of hepatitis virus infections". The 8<sup>th</sup> International Workshop on HIV Treatment, Pathogenesis and Prevention Research in Resource-poor Settings (INTEREST), Lusaka (Zambia), 5-9 mai 2014. (JMP)
  19. "Treatment of HCV infection: past, present and future". The 8th International Workshop on HIV Treatment, Pathogenesis and Prevention Research in Resource-poor Settings (INTEREST), Lusaka (Zambia), 5-9 mai 2014. (JMP)
  20. "Treatment of hepatitis B and hepatitis C". IPFA/PEI 21st International Workshop on Surveillance and Screening of Blood Borne Pathogens, Rome (Italy), 21-22 mai 2014. (JMP)
  21. "Targets for direct acting antiviral agents in hepatitis C". 12<sup>th</sup> International Symposium on Viral Hepatitis, Sitges (Spain), 30-31 mai 2014. (JMP)
  22. "Importance of resistance to interferon-free regimens: potential problems for retreatment after failure to initial DAA combinations". International Workshop on Antiviral Drug Resistance, Berlin (Germany), 3-7 juin 2014. (JMP)

23. "Clinical updates and new virological tools for management of hepatitis B and C". 5<sup>th</sup> Nordic Conference of HIV and Hepatitis Drug Resistance and Treatment Strategies, Uppsala (Sweden), 12 juin 2014. (JMP)
24. "Overview of current HCV therapeutic landscapes ". EMERALD Programme Leadership Meeting, Fracfort (Germany), 18 juillet 2014. (JMP)
25. "HCV Guidelines Workshop". Gilead Speaker's Bureau Training Meeting, Bratislava (Slovakia), 4-5 septembre 2014. (JMP)
26. "HCV drug discovery and new combination therapies". 21<sup>st</sup> International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, Banff (Canada), 7-11 septembre 2014. (JMP)
27. "Viral resistance: perspectives for clinicians". AASLD/EASL Special Conference on Hepatitis C, New York (USA), 12-13 septembre 2014. (JMP)
28. "Transforming the HCV treatment landscape". Middle East HCV Expert Forum, Dubai (UAE), 27 septembre 2014. (JMP)
29. "New medicines". HCV2020, Oxford (UK), 1-2 octobre 2014. (JMP)
30. "Hepatitis C treatment: from benchside to bedside". 7<sup>th</sup> Aula Abierta en Hepatologia, Santander (Spain), 3-4 octobre 2014. (JMP)
31. "Update on HCV therapies". 9th Congress of the Panarab Association of Gastroenterologia, Tunis (Tunisia), 9 octobre 2014. (JMP)
32. "New interferon-free treatments in HCV". Finnish Hepatitis C Symposium, Helsinki (Finland), 15 octobre 2014. (JMP)
33. "HCV resistance and treatment failures". Bristol-Myers Squibb R&D Team Symposium/BMS TV webcast, Princeton (USA), 5 novembre 2014. (JMP)
34. "New Hepatitis C DAAs". Israeli AASLD Satellite Symposium, Boston (USA), 9 novembre 2014. (JMP)
35. "The European Perspective: Advances in chronic hepatitis C management and treatment". Viraled Internet Symposium, Boston (USA), 11 novembre 2014. (JMP)
36. "Fighting the global HCV epidemic: the promise and the challenges". 8<sup>th</sup> Netherlands Conference on HIV Pathogenesis, Epidemiology, Prevention and Treatment (NCHIV), Amsterdam (The Netherlands), 18 novembre 2014. (JMP)
37. "HCV: how to best tackle this smart player?". Hepatitis C Educational Event under the auspices of the Hellenic Association for the Study of the Liver, Athens (Greece),

22 novembre 2014. (JMP)

38. "Update on new HCV therapies". 4<sup>th</sup> Danish-Swedish Joint Hepatitis Meeting, Copenhagen (Denmark), 25 novembre 2014. (JMP)
39. "Treatment of HCV in monoinfected patients". Five Nations Conference on HIV and Hepatitis, London (UK), 8-9 décembre 2014. (JMP)
40. "The story of EASL". EASL Young Investigator Workshop, Champéry (Switzerland), 11-13 décembre 2014. (JMP)

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

Sans objet

## **8. Programme d'activité 2015-2016**

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
3. La participation aux enquêtes épidémiologiques de l'InVS (PREVAGAY 2<sup>ème</sup> édition, épidémiologie des hépatites B, C et delta à partir de la cohorte Constances)
4. 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
5. La création d'un site web du CNR

**Rapport annuel d'activité**

**2015**

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

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

**Année d'exercice  
2014**

## 1. Missions et Organisation du CNR

Voir annexe 1

## 2. Activités d'expertise

### Activités d'expertise de l'année 2014

#### *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.

#### *Expertise dans le domaine des outils de diagnostic*

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).

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**

L'objectif de cette étude multicentrique (Biomnis, Ivry, INTS, Paris, CH Paul Brousse, Villejuif, CH Pitié-Salpêtrière, Paris) était de comparer la sensibilité de toutes les trousse de quantification de l'AgHBs (qAgHBs) 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".

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 respectivement de 0,026, 0,059 et 0,039 UI/mL pour Abbott, DiaSorin et Roche. 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 (manuscrit en préparation).

### **Evaluation de la trousse Monolisa HCV Ag/Ab Ultra version 2, Bio-Rad**

Le test de dépistage combiné de l'Ag de capside et des anticorps VHC Monolisa HCV Ag/Ab Ultra commercialisé par la société Bio-Rad est remplacé par une version 2. Les objectifs de notre étude a été 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 ont été testés. Une gamme d'Ag VHC titrée a permis 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 a aussi été évalué grâce aux dons de sang VHC positifs caractérisés au laboratoire tout génotype confondu. Les principaux résultats montrent que le test Monolisa HCV ULTRA Ab/Ag version 2 semble plus sensible que la version 1 concernant la détection de l'Ag VHC dans la fenêtre sérologique.

#### *Résultats obtenus sur les 75 échantillons collectés avant séroconversion*

|                    | <b>Total<br/>ARN positifs</b> | <b>Monolisa Ag-Ab<br/>V1</b> | <b>Murex</b>         | <b>Monolisa Ag-Ab<br/>V2</b> |
|--------------------|-------------------------------|------------------------------|----------------------|------------------------------|
| Donneurs de sang   | 18                            | 6/18                         | 9/18                 | 6/18                         |
| Séroconversions :  |                               |                              |                      |                              |
| Panels commerciaux | 25                            | 10/22                        | 12/22                | 13/25                        |
| Hémodialysés       | 32                            | 3/32                         | 13/32                | 4/32                         |
| <b>TOTAL</b>       | <b>75</b>                     | <b>19/72 (26,4%)</b>         | <b>34/72 (47,2%)</b> | <b>23/75 (30,7%)</b>         |

Un gain dans la détection de la phase précoce de l'infection par le VHC est observé avec la version 2 en comparaison de la version 1 puisque 30,7% des échantillons en fenêtre

sérologique sont positifs contre 26,4%. Néanmoins, Murex présente une meilleure sensibilité avec 47,2% d'échantillons détectés. Cette nouvelle version est aussi ici la technique la plus sensible comparée aux deux autres trousse combinées testées, concernant la détection des Ac anti-VHC.

*Résultats obtenus sur les 88 échantillons collectés après séroconversion*

|                    | <b>Total<br/>Ac positifs</b> | <b>Monolisa Ag-Ab<br/>V1</b> | <b>Murex</b>         | <b>Monolisa Ag-Ab<br/>V2</b> |
|--------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------|------------------------------|
| Séroconversions :  |                              |                              |                      |                              |
| Panels commerciaux | 36                           | 27/29                        | 19/29                | 36/36                        |
| Hémodialysés       | 52                           | 51/52                        | 51/52                | 52/52                        |
| <b>TOTAL</b>       | <b>88</b>                    | <b>78/81 (96,3%)</b>         | <b>70/81 (86,4%)</b> | <b>88/88 (100%)</b>          |

### 3. Activités de surveillance des donneurs de sang

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

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

#### 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'AgHBs, 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'AgHBs 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 AgHBs est stable, voire à la baisse.

**La surveillance virologique du VHB** comprend :

1) La détermination du **titre de l'AgHBs** 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'AgHBs (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 TaqMan, Roche Diagnostics (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'AgHBs** 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'AgHBs.

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<sup>er</sup> janvier 2000 et le 30 juin 2001, veille de la mise en place systématique du DGV du VHC. Cette recherche a été réalisée sur tous les dons anti-VHC confirmés positifs reçus au laboratoire et prélevés sur cette période de 18 mois, par le réactif AMPLICOR VHC 2.0 (Roche), dont le seuil de sensibilité annoncé était de 50 UI/mL. 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 (VERSANT HCV GENOTYPING ASSAY LiPA 2.0, Siemens) et par séquençage d'un fragment d'environ 300 paires de bases de la région NS5b 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 2013. L'année 2014 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 donne la comparaison et l'évolution des taux de positivité des dons VHB positifs observés entre 1993 et 2013 pour les dons issus de nouveaux donneurs et des donneurs connus.

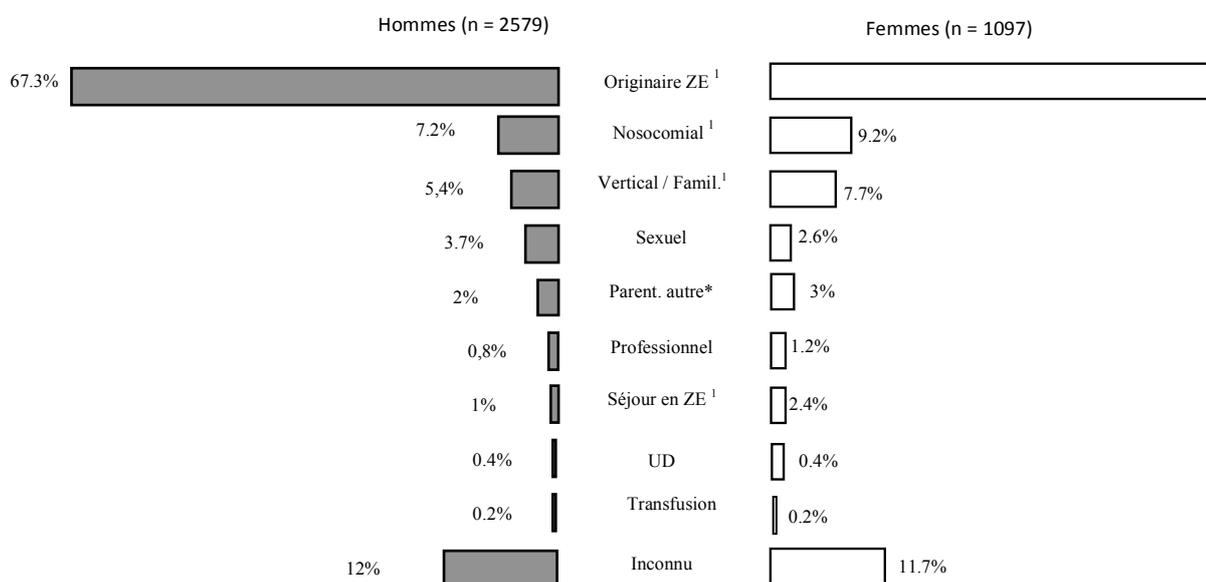
**Tableau 1** : Taux des dons VHB positifs observés dans les dons de sang de 1993 à 2013.

| 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               |
| 2013  | 220 (4)*                | 4,89                 | 3                       | 0,01                 | 223                     | 0,81               |

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

Comme le montre la figure 1, qui fait état des facteurs de risque (hiérarchisés en fonction de leur probabilité de survenue) recherchés chez 3676 (69,5%) des 5288 nouveaux donneurs positifs pour l'AgHBs, prélevés en France métropolitaine entre 1998 et 2013, et qui ont pu être interrogés, le facteur de risque principal est l'origine géographique, suivi du risque nosocomial. En revanche, chez les donneurs connus de la période 1998-2013 (nombre total : 102) pour lesquels un facteur de risque a pu être identifié (57 sur les 81 interrogés), le risque sexuel se retrouve au premier plan (22,2%). Il convient de souligner, que chez 11,9% des nouveaux donneurs et dans 29,6% des cas chez les donneurs connus, interrogés sur leur facteur de risque, celui-ci n'a pas été identifié.

**Figure 1** : Facteurs de risque des nouveaux donneurs VHB positifs en France métropolitaine en fonction du sexe entre 1998 et 2013 (n = 3676).



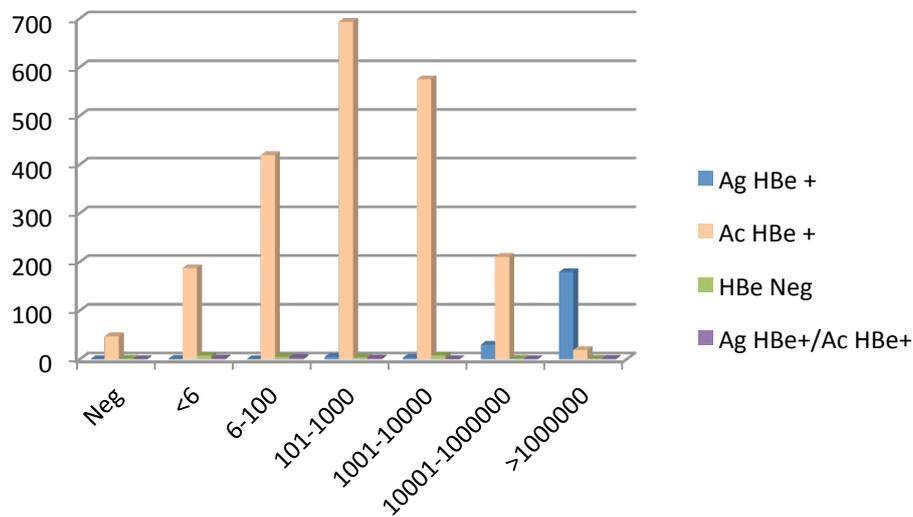
\* Parentéral autre = tatouage, piercing, acupuncture.  
 ZE : Zone d'endémie, UD : utilisateur de drogue

<sup>1</sup> différence significative par sexe

### Surveillance virologique de l'infection VHB

Le suivi de l'évolution des **titres de l'AgHBs** dans les dons positifs entre 1998 et 2013, montre que plus de 99% des dons analysés avaient un taux d'AgHBs supérieur à 0,25 ng/mL, taux environ 20 fois supérieur aux capacités de détection des tests de dépistage de l'AgHBs utilisés à ce jour. Les taux observés sont stables dans le temps. La répartition des **marqueurs HBe** sur les 4842 dons pour lesquels l'information est disponible, soit 80% des 6021 dons VHB positifs dans la période 1998-2013, fait apparaître que 88,4% (4280/4842) des dons VHB positifs sont **Ac HBe positifs AgHBe négatifs**, cette proportion étant stable dans le temps. Par ailleurs, comme le montre la figure 2, les dons AgHBe positifs présentent des charges virales plus élevées.

**Figure 2** : Relation entre la charge virale (UI/mL) et le statut HBe sur 2404 dons VHB positifs collectés entre 2005 et 2013 (218 AgHBe pos, 2150 Ac HBe pos, 28 HBe neg, 8 Ag et Ac HBe 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. Le tableau 2 en fournit les résultats et montre une faible fréquence (3% 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 64 mUI/mL avec une médiane de 19 mUI/mL. Par ailleurs, 16 (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 (11,1% ; 5/45) par rapport aux dons Ac anti-HBs négatifs (5,1% ; 71/1405). 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 (51,1% ont plus de 40 ans) que les donneurs Ac négatifs (66,0% ont moins de 40 ans ;  $p = 0,017$ ). De plus, on note une charge virale plus élevée dans le groupe des Ac anti-HBs négatifs avec 40,3% des dons avec une charge virale supérieure à

1000 mUI/mL ; alors que cela représente seulement 24,4% des dons Ag/AcHBs+ ( $p=0,032$ ). Enfin, le titre en AgHBs est plus faible pour les dons Ag/Ac positifs que les dons Ac négatifs ; 60% des dons Ag/Ac+ présentent un titre inférieur à 4000 ng/ml alors que ceci concerne seulement 33,3% des dons anti-HBs négatifs ( $p=0,0002$ ).

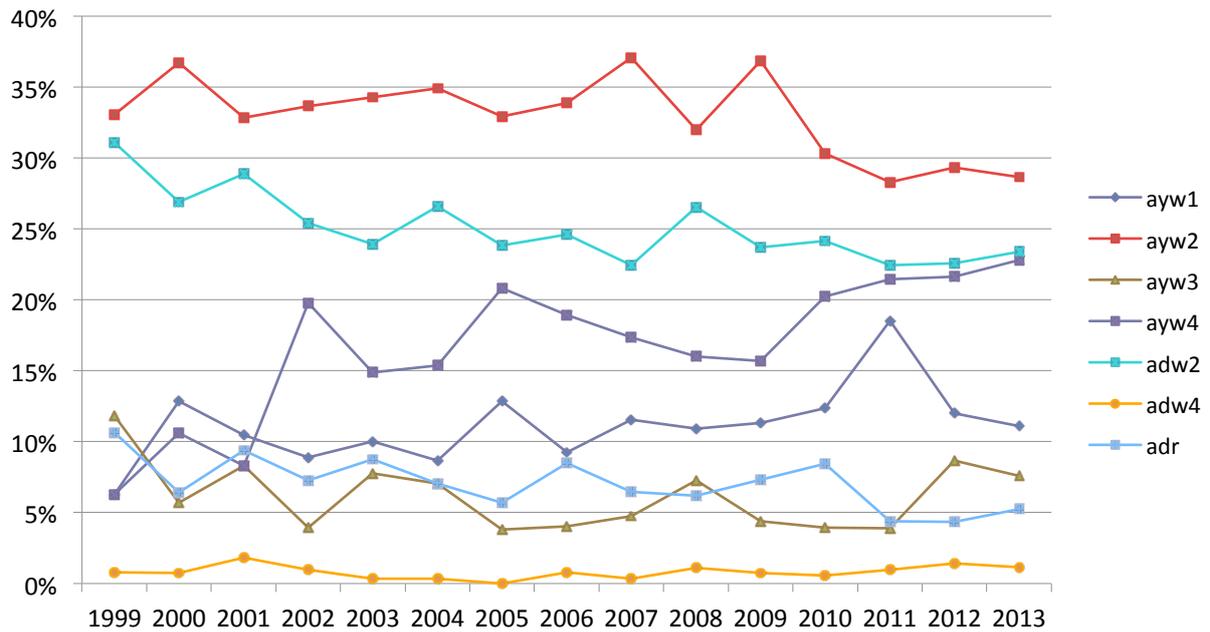
**Tableau 2 :** Fréquence des anti-HBs chez les donneurs AgHBs positifs de 2008 à 2013 en fonction du génotype

| Ac HBs          | 2008     | 2009     | 2010     | 2011     | 2012      | 2013   | Total     |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|-----------|--------|-----------|
| N testés        | 313      | 301      | 204      | 238      | 251       | 196    | 1503      |
| N Ag/Ac HBs Pos | 8 (2,6%) | 5 (1,7%) | 7 (3,4%) | 7 (2,9%) | 14 (5,6%) | 4 (2%) | 45 (3%)   |
| Taux (mUI/mL)   | 10-145   | 17-46    | 10- >100 | 17 - 25  | 12-1490   | 11-15  | 10 - 1490 |
| Ac Hbe          | 7        | 5        | 6        | 6        | 12        | 4      | 40        |
| gt A            | 1        | 2        | 1        | 1        | 3         | 0      | 8         |
| gt B            | 0        | 0        | 1        | 2        | 0         | 0      | 3         |
| gt C            | 1        | 0        | 1        | 0        | 1         | 0      | 3         |
| gt D            | 3        | 1        | 3        | 3        | 6         | 2      | 18        |
| gt E            | 1        | 1        | 0        | 1        | 2         | 1      | 6         |
| gt F            | 1        | 0        | 0        | 0        | 1         | 0      | 2         |
| ND              | 1        | 1        | 1        | 0        | 1         | 1      | 5         |
| Mutations HBs   | 1        | 1        | 2        | 1        | 0         | 0      | 5         |

Sur les 5408 donneurs trouvés AgHBs positifs entre 1999 et 2013, 4476 (82,8%) ont bénéficié d'un **sous-typage de l'AgHBs** et 85,7% d'entre eux ( $n=3836$ ) ont pu être entièrement typés. Les 14,3% n'ayant pas pu être entièrement sous typés correspondaient dans la majorité des cas à des échantillons présentant des titres d'AgHBs inférieurs au seuil de détection de la technique de sérotypage.

La figure 3 montre l'évolution de la répartition des différents sous-types de l'AgHBs de 1999 à 2013.

**Figure 3 :** Evolution de la part relative (en %) des sous-types de l'AgHBs chez les donneurs de sang entre 1999 et 2013 (incluant les Antilles depuis 2006 et La Réunion depuis 2008).



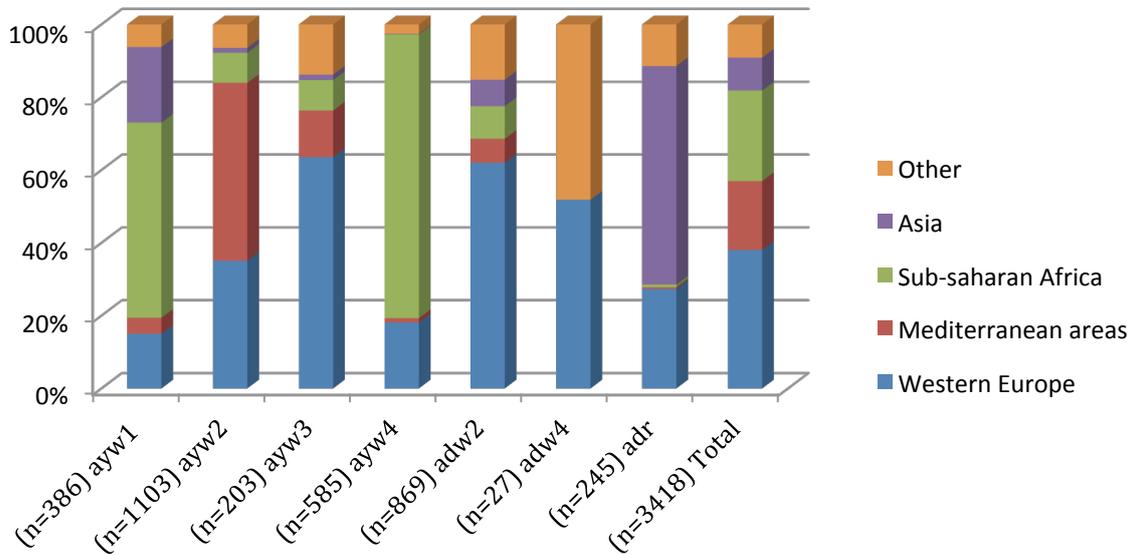
Sur l'ensemble de la période 1999-2013, le sous-type *ayw2* (correspondant au génotype D, fortement prévalent dans le bassin-méditerranéen) était le plus fréquent (33,4 %), suivi du sous-type *adw2* (génotype A ou B, majoritaire en Europe occidentale) (25,2 %). Les sous-types *ayw1* (génotype A (Afrique) ou B (Asie)), *ayw4* (génotype E originaire d'Afrique sub-saharienne) et *adr* (génotype C, asiatique) étaient en proportions respectives de 10,9%, 16,3% et 7,2%. Toutefois, on note jusqu'en 2005 (figure 3) 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* qui méritent d'être confirmées dans les années à venir.

**Tableau 3** : Proportion (%) des différentes origines géographiques des donneurs VHB positifs en fonction du sous-type 1999-2013

| Origine géographique   | ayw1       |              | ayw2        |              | ayw3       |             | ayw4       |              | adr        |             | adw2       |              | adw4      |             | Total       |       |
|------------------------|------------|--------------|-------------|--------------|------------|-------------|------------|--------------|------------|-------------|------------|--------------|-----------|-------------|-------------|-------|
|                        | N          | %            | N           | %            | N          | %           | N          | %            | N          | %           | N          | %            | N         | %           | N           | %     |
| Europe <sup>1</sup>    | 58         | 15,0%        | 387         | 35,1%        | 129        | 63,5%       | 106        | 18,1%        | 67         | 27,3%       | 539        | 62,0%        | 14        | 51,9%       | 1300        | 38,0% |
| Bassin Méditerranéen   | 17         | 4,4%         | 539         | 48,9%        | 26         | 12,8%       | 7          | 1,2%         | 1          | 0,4%        | 57         | 6,6%         | 0         | 0,0%        | 647         | 18,9% |
| Afrique Sub Saharienne | 207        | 53,6%        | 91          | 8,3%         | 17         | 8,4%        | 456        | 77,9%        | 2          | 0,8%        | 78         | 9,0%         | 0         | 0,0%        | 851         | 24,9% |
| Asie                   | 80         | 20,7%        | 15          | 1,4%         | 3          | 1,5%        | 1          | 0,2%         | 147        | 60,0%       | 63         | 7,2%         | 0         | 0,0%        | 309         | 9,0%  |
| Autre                  | 24         | 6,2%         | 71          | 6,4%         | 28         | 13,8%       | 15         | 2,6%         | 28         | 11,4%       | 132        | 15,2%        | 13        | 48,1%       | 311         | 9,1%  |
| <b>Sous total</b>      | <b>386</b> |              | <b>1103</b> |              | <b>203</b> |             | <b>585</b> |              | <b>245</b> |             | <b>869</b> |              | <b>27</b> |             | <b>3418</b> |       |
| Ethnie inconnue        | 34         | 8,1%         | 177         | 13,8%        | 35         | 14,7%       | 40         | 6,4%         | 30         | 10,9%       | 99         | 10,2%        | 3         | 10,0%       | 418         | 10,9% |
| <b>Total</b>           | <b>420</b> | <b>10,9%</b> | <b>1280</b> | <b>33,4%</b> | <b>238</b> | <b>6,2%</b> | <b>625</b> | <b>16,3%</b> | <b>275</b> | <b>7,2%</b> | <b>968</b> | <b>25,2%</b> | <b>30</b> | <b>0,8%</b> | <b>3836</b> |       |

<sup>1</sup> Bassin Méditerranéen exclu

**Figure 4 :** Proportion (%) des différentes origines géographiques des 3418 donneurs VHB positifs en fonction du sous-type pour la période 1999-2013

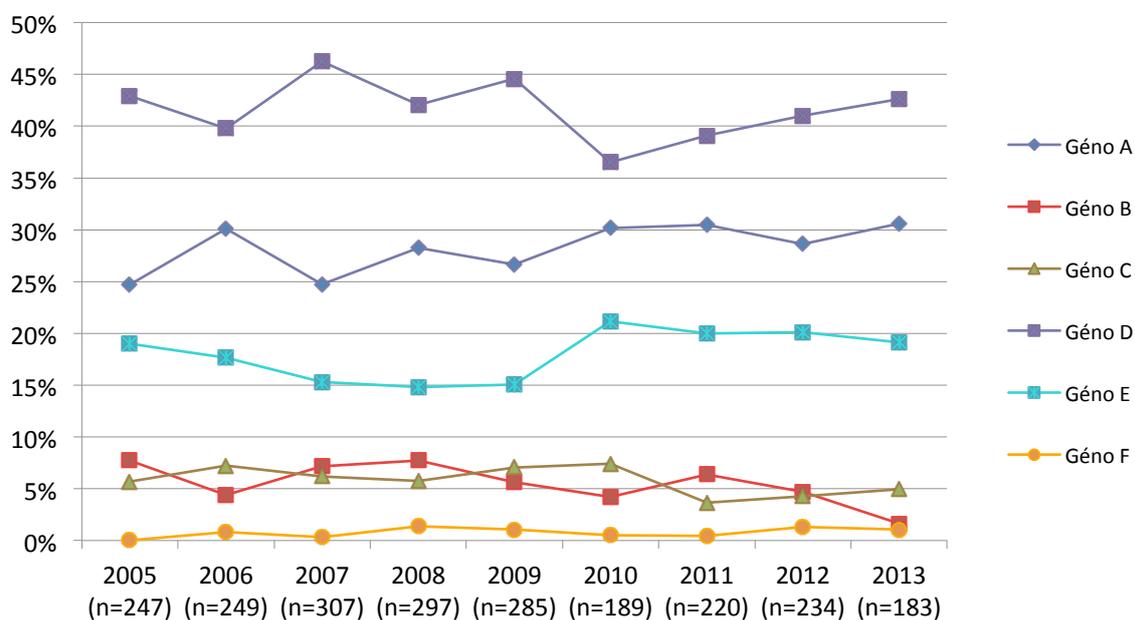


Le tableau 3 et la figure 4 montrent la répartition des origines géographiques des donneurs AgHBs positifs en fonction du sous-type et confirme la relation entre le sous-type ayw1 et l’Afrique Sub-Saharienne (53,6%), le sous-type ayw2 avec le bassin Méditerranéen (48,9%), les sous-types ayw3 et adw2 avec l’Europe (63,5% et 62%, respectivement), le sous-type ayw4 avec l’Afrique sub-saharienne (77,9%) et le sous-type adr avec l’Asie (60%).

**L’analyse moléculaire** a été réalisée sur 2448 dons AgHBs positifs et/ou ADN positifs collectés entre 2005 et 2013. Parmi ces 2448 dons, 237 (9,7%) 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). Comme présenté dans la figure 5, 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 (42%), suivie des génotypes A (28%) et E (17,7%) puis des génotypes B (5,7%), C (5,8%) et F (0,8%). 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 2,76 et 1,69 ( $p=0,012$ ). Parmi les hommes, l'âge moyen est plus élevé chez les sujets infectés par le génotype D (35,7 ans) et les plus jeunes ont été observés dans le génotype E (27,8 ans,  $p<10^{-4}$ ). Les femmes infectées par le génotype A sont plus âgées que celles infectées par le génotype E (35,5 contre 24,3 ans, respectivement,  $p<10^{-4}$ ).

**Figure 5 :** Evolution des proportions (%) des différents génotypes du VHB chez les donneurs de sang infectés par le VHB entre 2005 et 2013.



Le tableau 4 compare la répartition des génotypes entre les donneurs VHB positifs ayant fait un don aux Antilles entre 2005 et 2013 et ceux ayant donné en Métropole entre 2005 et 2013 et à la Réunion entre 2008 et 2013. Soixante-seize (81,7%) des 93 dons reçus et prélevés aux Antilles dans la période d'étude ont été génotypés. 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 76,3% des souches dont, par ailleurs, 55,2% ( $n=32$ ) sont A1, décrites comme étant originaires d'Afrique et 10,3% ( $n=6$ ) sont A2, d'origine européenne.

**Tableau 4** : Comparaison de la répartition des génotypes du VHB entre les souches provenant des donneurs de sang prélevés aux Antilles (2005-2013) et sur le reste du territoire (Métropole 2005-2013 et Ile de la Réunion 2008-2013)

| Génotypes    | Antilles  |             | Métropole+ Réunion |             | p                          |
|--------------|-----------|-------------|--------------------|-------------|----------------------------|
|              | N         | %           | N                  | %           |                            |
| <b>A</b>     | <b>58</b> | <b>76,3</b> | <b>561</b>         | <b>26,3</b> | <b>&lt;10<sup>-4</sup></b> |
| A1           | 32*       | 55,2        | 83**               | 14,8        |                            |
| A2           | 6         | 10,3        | 161                | 28,7        |                            |
| A autre      | 20        | 34,5        | 317                | 56,5        |                            |
| <b>B</b>     | <b>1</b>  | <b>1,3</b>  | <b>126</b>         | <b>5,9</b>  | <b>NA</b>                  |
| <b>C</b>     | <b>0</b>  |             | <b>129</b>         | <b>6,0</b>  | <b>NA</b>                  |
| <b>D</b>     | <b>14</b> | <b>18,4</b> | <b>914</b>         | <b>42,8</b> | <b>0,109</b>               |
| <b>E</b>     | <b>3</b>  | <b>3,9</b>  | <b>388</b>         | <b>18,2</b> | <b>NA</b>                  |
| <b>F</b>     | <b>0</b>  |             | <b>17</b>          | <b>0,8</b>  | <b>NA</b>                  |
| <b>Total</b> | <b>76</b> |             | <b>2135</b>        |             |                            |

\* dont 26/27 testés (96%) sont adw2

\*\* dont 61/83 (73%) sont adw2

NA : non applicable

La corrélation entre sérotype et génotype dans le tableau 5. Sur les 2504 échantillons étudiés (5 non testés ni en génotypage ni en sérotypage), 2117 (84,5%) ont été sérotypés et 2211 (88,3%) génotypés. Parmi ces 2499 échantillons, 1934 (77,4%) ont été caractérisés par les 2 méthodes (encadré dans le tableau 5), 105 (4,2%) n'ont pu être caractérisés par aucune des méthodes, 277 (11,1%) uniquement par séquençage et 183 (7,3%) uniquement par sérotypage. Parmi les 1934 échantillons caractérisés par les 2 méthodes, 30 (1,6%) étaient discordants en lien avec la présence de mutations sur l'AgHBs.

**Tableau 5 : Répartition des génotypes du VHB et relation avec le sérotype chez 2211 donneurs de sang entre 2005 et 2013**

|                        | Sous-types ayw1      | ayw2                    | ayw3                 | ayw4                    | adw2                   | adw4      | adr                    | Total ss typés | Non typables | Non testés | TOTAL     |
|------------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|------------------------|-----------|------------------------|----------------|--------------|------------|-----------|
| <b>Génotypes</b>       |                      |                         |                      |                         |                        |           |                        |                |              |            |           |
| A                      | 164 (70.4%)          | <b><u>2 (0,3 %)</u></b> |                      |                         | 407 (90,2 %)           |           |                        | 573            | 32           | 14         | 619 28%   |
| B                      | 62 (26.6%)           |                         |                      |                         | 43 (9,5 %)             |           |                        | 105            | 20           | 2          | 127 5,7%  |
| C                      |                      | <b><u>1 (0,2%)</u></b>  |                      |                         |                        |           | 118 (99,2%)            | 119            | 5            | 5          | 129 5,8%  |
| D                      | <b><u>7 (3%)</u></b> | 637 (98,2%)             | 98 (99%)             | <b><u>8 (2,2 %)</u></b> |                        |           | <b><u>1 (0,8%)</u></b> | 751            | 154          | 23         | 928 42%   |
| E                      |                      | <b><u>9 (1,4 %)</u></b> | <b><u>1 (1%)</u></b> | 360 (97,8%)             | <b><u>1 (0,2%)</u></b> |           |                        | 371            | 10           | 10         | 391 17,7% |
| F                      |                      |                         |                      |                         |                        | 15 (100%) |                        | 15             | 2            | 0          | 17 0,8%   |
| <i>Total génotypés</i> | 233                  | 649                     | 99                   | 368                     | 451                    | 15        | 119                    | 1934           | 223          | 54         | 2211 100% |
| Non génotypables       | 20                   | 37                      | 10                   | 31                      | 46                     | 1         | 11                     | 156            | 55           | 26         | 237       |
| Non testés             | 3                    | 6                       | 3                    | 5                       | 7                      | 0         | 3                      | 27             | 24           | 5          | 56        |
| <b>TOTAL</b>           | 256                  | 692                     | 112                  | 404                     | 504                    | 16        | 133                    | 2117           | 302          | 85         | 2504      |

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

Par ailleurs, des mutations du gène S codant l'AgHBs décrites comme pouvant affecter le diagnostic ou échappant à la vaccination, ou aux immunoglobulines et hors polymorphisme naturel ont été retrouvées pour 122 échantillons (5,5%) (tableau 6). Quarante-vingt-dix-huit souches présentaient une mutation unique dans la région analysée, et 24 des mutations multiples (2 : n=15, 3 : n=4 ; >3 n=5). La mutation majoritairement identifiée (24,6%) portait sur le résidu 133 (30 cas dont 10 en association avec au moins une autre mutation), puis sur les résidus 130 (18 cas), 134 et 129 (16 et 15 respectivement). Le génotype B présente la plus forte proportion de souches mutées (11,8%). Il convient de noter que les variants retrouvés ici ont été détectés par les trousseuses utilisées dans le dépistage de l'AgHBs 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'AgHBs, la présence de mutations de résistance aux traitements antiviraux est maintenant caractérisée dans cette population asymptomatique et naïve de tout traitement. Sur un total de 417 souches génotypées, 11 (2,6%) présentaient une mutation de résistance ; les deux mutations les plus représentées portaient sur la mutation rtI233V associée à une résistance à l'adéfovir (3 cas de mutations unique et 1 cas de mutations multiples) et la mutation rtA194TS associée à une résistance au ténofovir. Les autres mutations sont détaillées dans le tableau 7. 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 6 :** Inventaire des mutations de l'AgHBs du VHB retrouvées par analyse moléculaire de 2211 dons de sang virémiques entre 2005 et 2013

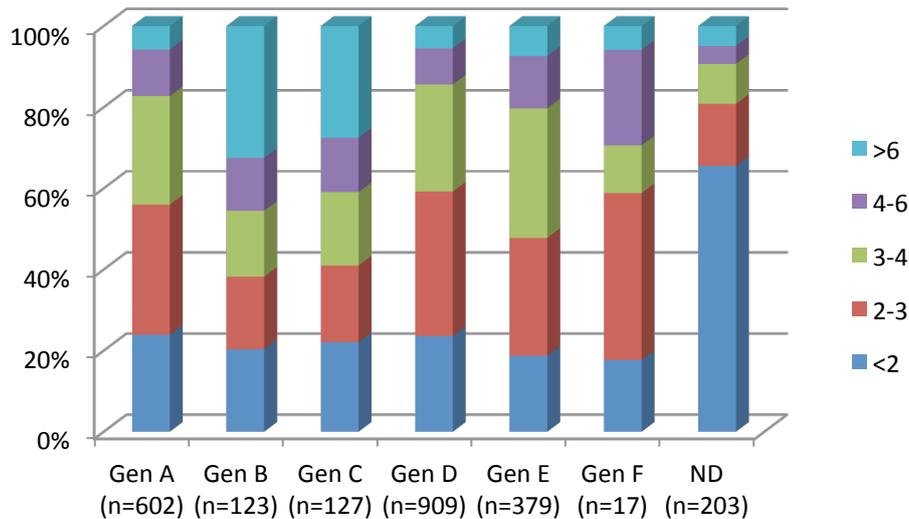
| Génotypes                         | A            | B            | C           | D            | E            | F           | TOTAL       |
|-----------------------------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| <b>Mutations</b>                  |              |              |             |              |              |             |             |
| T116N                             | 2            |              |             |              | 1            |             | 3           |
| T118R                             |              |              |             | 1            |              |             | 1           |
| P120S                             |              |              |             | 3            | 1            |             | 4           |
| P120T                             | 2            | 1            |             | 1            | 1            |             | 5           |
| T123N                             |              |              |             | 1            |              |             | 1           |
| C124R                             |              |              | 1           |              |              |             | 1           |
| T126A                             |              | 4            |             |              |              |             | 4           |
| I/T126N                           |              |              | 2           | 1            |              |             | 3           |
| Q129H                             |              | 2            |             | 3            | 1            |             | 6           |
| Q129R                             |              |              |             | 1            |              |             | 1           |
| G130R                             |              | 1            |             | 4            |              |             | 5           |
| G130N                             | 4            |              |             |              | 1            |             | 5           |
| T131I                             |              | 1            |             | 3            |              |             | 4           |
| M133I                             | 1            |              |             | 5            |              |             | 6           |
| M133T                             | 8            |              |             | 2            | 1            |             | 11          |
| M133L                             |              | 1            |             | 1            | 1            |             | 3           |
| F134L                             | 2            |              |             |              | 1            |             | 3           |
| Y134N                             |              |              |             | 4            |              |             | 4           |
| C137Y                             |              |              | 1           |              |              |             | 1           |
| T/S143M                           | 2            | 1            |             | 2            |              |             | 5           |
| S143L                             |              |              |             | 5            | 1            |             | 6           |
| D144E                             |              | 1            |             | 1            | 2            |             | 4           |
| G145R                             | 1            |              |             |              | 2            |             | 3           |
| G145A                             |              |              | 1           |              | 2            |             | 3           |
| T116N M133T                       |              | 1            |             |              |              |             | 1           |
| 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           |
| M133L F134L                       | 1            |              |             |              |              |             | 1           |
| M133T-F134L                       | 2            |              | 1           |              |              |             | 3           |
| <b>Multiples mutations &gt;=3</b> |              |              |             |              |              |             |             |
|                                   | 2            |              |             | 7            |              |             | 9           |
| codon stop w163                   | 1            |              |             |              |              |             | 1           |
| codon stop w172                   |              |              |             |              | 1            |             | 1           |
| insertion 114TT                   | 1            |              |             |              |              |             | 1           |
| insertion 116T                    | 2            | 1            |             |              |              |             | 3           |
| <b>Total</b>                      | <b>34</b>    | <b>15</b>    | <b>6</b>    | <b>50</b>    | <b>17</b>    | <b>0</b>    | <b>122</b>  |
|                                   | <b>27,9%</b> | <b>12,3%</b> | <b>4,9%</b> | <b>41,0%</b> | <b>13,9%</b> |             |             |
| <b>Total génotypés</b>            | <b>619</b>   | <b>127</b>   | <b>129</b>  | <b>928</b>   | <b>391</b>   | <b>17</b>   | <b>2211</b> |
|                                   | <b>5,5%</b>  | <b>11,8%</b> | <b>4,7%</b> | <b>5,4%</b>  | <b>4,3%</b>  | <b>0,0%</b> | <b>5,5%</b> |

**Tableau 7 :** Inventaire des mutations de la polymérase virale sur le domaine reverse transcriptase (RT) du VHB associées à une résistance au traitement antiviral, retrouvées par analyse moléculaire des 417 dons de sang virémiques pour les années de collectes 2012 et 2013

| Génotypes            |                                       | A           | B          | C          | D           | E          | F         | TOTAL       |
|----------------------|---------------------------------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|-----------|-------------|
| Mutations "RT"       | Impact drogue                         |             |            |            |             |            |           |             |
| L80V                 | Lamivudine<br>Telbivudine             |             |            |            | 1           |            |           | 1           |
| I169T                | Entecavir                             |             |            |            | 1           |            |           | 1           |
| A194T                | Tenofovir                             |             |            |            | 2           |            |           | 2           |
| A194S                | Tenofovir                             |             |            |            | 1           |            |           | 1           |
| A181T                | Lamivudine<br>Telbivudine             |             |            |            |             | 1          |           | 1           |
| T184S                | Entecavir                             | 1           |            |            |             |            |           | 1           |
| I233V                | Adefovir                              | 1           |            |            | 2           |            |           | 3           |
| L80V, I233V          | Lamivudine<br>Telbivudine<br>Adefovir |             |            |            | 1           |            |           | 1           |
| Total avec mutations |                                       | 2<br>18,2%  | 0<br>0,0%  | 0<br>0,0%  | 8<br>72,7%  | 1<br>9,1%  | 0         | 11          |
| Total génotypés      |                                       | 123<br>1,6% | 14<br>0,0% | 19<br>0,0% | 174<br>4,6% | 82<br>1,2% | 5<br>0,0% | 417<br>2,6% |

La figure 6 fait état de la relation entre charges virales et génotypes sur 2360 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 6 :** Proportions (%) des charges virales (Log UI/mL) en fonction du génotype du VHB chez 2360 donneurs de sang en 2005 et 2013. (ND : génotype non déterminé)



Le statut vis à vis **des anticorps anti-Delta** des donneurs VHB positifs est consigné dans le tableau 8. Parmi ces donneurs, 2,1% présentent une coinfection par le virus Delta entre 1997 et 2013. 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 1,28 et 2,4% en 2011 et 2012 avec une nouvelle remontée à 3,61% en 2013 à confirmer. En ne prenant en compte que les positifs francs, le taux de prévalence des anticorps delta s'élève à 1,38%.

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 72 échantillons a identifié 18 souches (25%) avec une charge virale détectable ( $10^2$ - $10^8$  copies/mL). Seize souches étaient de génotype 1, une de génotype 7 et une de génotype 8. Cinq souches VHD-1 étaient isolées chez des donneurs européens, 2 VHD-1 chez des donneurs originaires du Bassin Méditerranéen et les 8 autres chez des donneurs originaires d'Afrique Sub-Saharienne et 1 originaire des DOM. La charge virale VHB des 18 donneurs ARN-VHD positifs était plus basse (médiane à 24 UI/mL) que celle des dons ARN-VHD négatifs (médiane à 1157 UI/mL). La surveillance prospective des donneurs VHB positifs a permis d'identifier une augmentation de la prévalence en lien possible avec l'origine géographique des donneurs. Le faible taux de donneurs ARN Delta positifs (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 en 2014 (*Servant-Delmas et al. Increasing prevalence of HDV/HBV infection over 15 years in France. 2014, Journal of Clinical Virology*).

**Tableau 8 : Prévalence des anticorps anti-Delta chez les donneurs de sang VHB positifs de 1997 à 2013**

|                                            | 1997  | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005  | 2006 | 2007  | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012  | 2013  | Total |
|--------------------------------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|-------|------|------|------|------|-------|-------|-------|
| n testés                                   | 253   | 325  | 278  | 303  | 325  | 330  | 360  | 360  | 297   | 283  | 331   | 314  | 299  | 200  | 234  | 250   | 194   | 4936  |
| Positifs faibles                           | 0     | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 3    | 1     | 8    | 1     | 2    | 5    | 8    | 2    | 2     | 2     | 35    |
| Positifs francs                            | 3     | 3    | 4    | 1    | 4    | 4    | 4    | 2    | 3     | 4    | 8     | 10   | 3    | 5    | 1    | 4     | 5     | 68    |
| %                                          | 1,19  | 0,92 | 1,44 | 0,33 | 1,23 | 1,21 | 1,39 | 1,39 | 1,35  | 4,24 | 2,72  | 3,82 | 2,68 | 6,50 | 1,28 | 2,40  | 3,61  | 2,09  |
| PCR Pos/nb testés<br>parmi les pos faibles | 0/0   | 0/0  | 0/0  | 0/0  | 0/0  | 0/0  | 0/0  | 0/3  | 0/0   | 0/6  | 0/1   | 0/0  | 0/2  | 0/6  | 0/1  | 0/0   | 0/1   | 0/20  |
| PCR Pos/nb testés<br>parmi les pos francs  | 2/2   | 0/0  | 0/0  | 0/0  | 0/3  | 1/3  | 1/3  | 1/2  | 2/2   | 1/4  | 3/7   | 1/9  | 1/3  | 0/4  | 1/1  | 2/4   | 2/5   | 18/52 |
| Génotype                                   | 2xGt1 |      |      |      |      | Gt7  | Gt1  | Gt1  | 2xGt1 | Gt1  | 3xGt1 | Gt1  | Gt1  |      | Gt8  | 2xGt1 | 2xGt1 |       |

### 3.2.2. Le VHC

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

Le tableau 9 donne la comparaison des taux de positivité pour le VHC observés entre 1993 et 2013 pour les dons issus de nouveaux donneurs et des donneurs connus.

**Tableau 9** : Taux des dons de sang VHC positifs de 1993 à 2013.

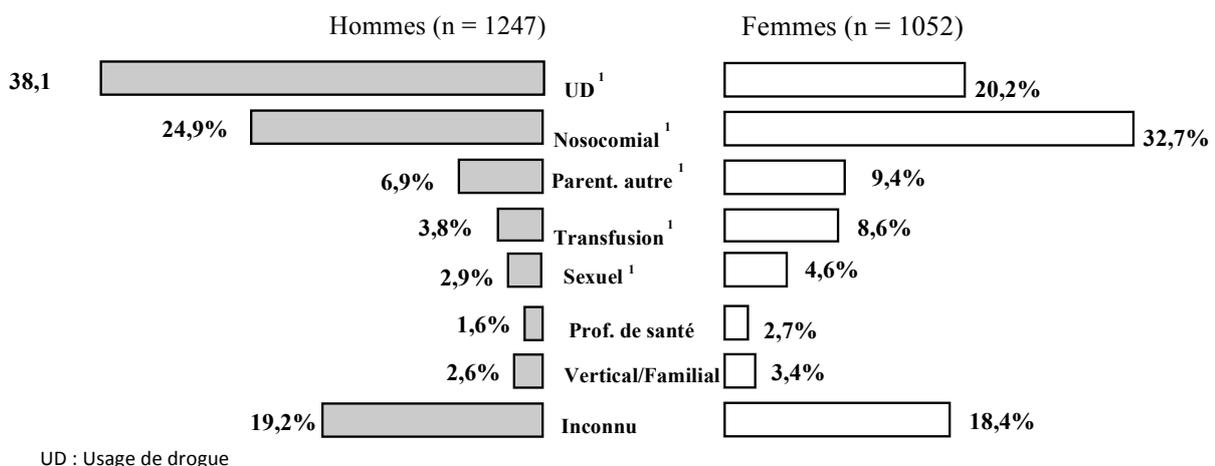
| Année | Nouveaux donneurs       |                       | Donneurs connus         |                       | Ensemble                |                       |
|-------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|
|       | nombre de dons positifs | Taux Pour 10 000 dons | nombre de dons positifs | Taux Pour 10 000 dons | nombre de dons positifs | Taux Pour 10 000 dons |
| 1993  | 1605                    | 32,7                  | 902                     | 3,1                   | 2507                    | 7,4                   |
| 1994  | 1281                    | 28,2                  | 266                     | 1,03                  | 1547                    | 5,08                  |
| 1995  | 1106                    | 23,3                  | 178                     | 0,73                  | 1284                    | 4,42                  |
| 1996  | 914                     | 20,7                  | 118                     | 0,51                  | 1032                    | 3,74                  |
| 1997  | 720                     | 14,9                  | 71                      | 0,32                  | 791                     | 2,93                  |
| 1998  | 601                     | 13,4                  | 51                      | 0,24                  | 652                     | 2,52                  |
| 1999  | 428                     | 10,5                  | 36                      | 0,17                  | 464                     | 1,84                  |
| 2000  | 337                     | 8,1                   | 39                      | 0,19                  | 376                     | 1,52                  |
| 2001  | 322                     | 8,0                   | 43 <sup>(2)</sup>       | 0,21                  | 365                     | 1,51                  |
| 2002  | 262                     | 7,2                   | 27 <sup>(2)</sup>       | 0,13                  | 289                     | 1,17                  |
| 2003  | 290 <sup>(1)</sup>      | 7,60                  | 16                      | 0,08                  | 306                     | 1,24                  |
| 2004  | 227                     | 6,02                  | 28 <sup>(2)</sup>       | 0,13                  | 255                     | 1,02                  |
| 2005  | 210                     | 5,61                  | 14 <sup>(2)</sup>       | 0,07                  | 224                     | 0,89                  |
| 2006  | 188 <sup>(2)</sup>      | 4,95                  | 17                      | 0,08                  | 205                     | 0,80                  |
| 2007  | 178 <sup>(2)</sup>      | 4,06                  | 14 <sup>(1)</sup>       | 0,06                  | 192                     | 0,71                  |
| 2008  | 182                     | 3,43                  | 19 <sup>(1)</sup>       | 0,08                  | 201                     | 0,71                  |
| 2009  | 181                     | 3,23                  | 13                      | 0,05                  | 194                     | 0,65                  |
| 2010  | 103                     | 2,19                  | 15 <sup>(2)</sup>       | 0,06                  | 118                     | 0,39                  |
| 2011  | 124                     | 2,41                  | 16                      | 0,06                  | 140                     | 0,44                  |
| 2012  | 129                     | 2,64                  | 11                      | 0,04                  | 140                     | 0,46                  |
| 2013  | 109                     | 2,42                  | 8                       | 0,03                  | 117                     | 0,42                  |

<sup>(1)</sup> dont 2 Ac nég DGV pos <sup>(2)</sup> dont 1 Ac nég DGV pos

Une baisse régulière des taux est observée liée, d'une part à une sélection progressive de la population des donneurs connus, et d'autre part à une meilleure maîtrise des facteurs de risque qui a permis d'éliminer des candidats au don potentiellement à risque lors de l'entretien précédent le don. 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 59,4% (2299) des 3871 nouveaux donneurs VHC positifs entre 1998 et 2013 (figure 7), montrent que près de 18,9% n'ont aucun facteur de risque identifié, et que la toxicomanie (38,1% chez les hommes et 20,2% chez les femmes) et les expositions nosocomiales (24,9% chez les hommes et 32,7% chez les femmes) restent au premier plan des modes de contaminations potentiels retrouvés chez ces sujets. Chez les 252 donneurs connus (116 hommes et 136 femmes) ayant présenté une séroconversion documentée et interrogés sur leur facteur de risque (soit 69% des 365 de cette catégorie entre 1998 et 2013), la toxicomanie par voie IV représente le facteur de risque le plus fréquemment identifié chez les hommes (32,8%) alors que pour les femmes il s'agit d'un risque nosocomial (25,7%) 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% (résultats non montrés).

**Figure 7 :** Facteurs de risque des nouveaux donneurs VHC+ interrogés sur FdR 1998-2013 (n = 2299).

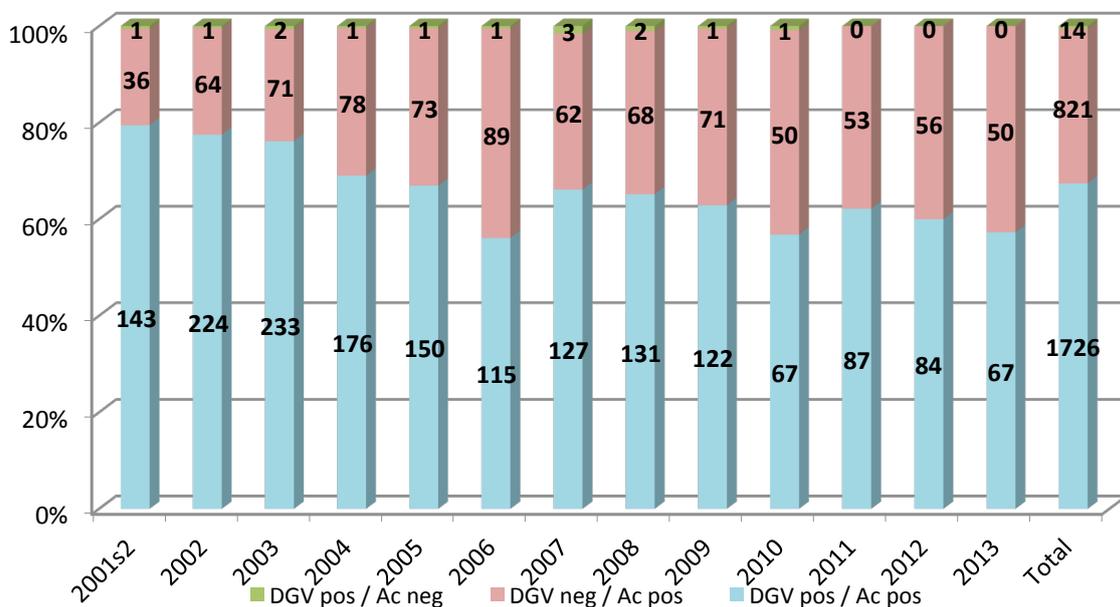
<sup>1</sup>Différence significative par sexe



## Surveillance virologique de l'infection par le VHC

Sur la période 2000-2013, le laboratoire a reçu 2535 échantillons de donneurs VHC positifs, ce qui représente 81,2% des 3122 donneurs trouvés VHC positifs sur cette période de 14 ans. Les résultats concernant la recherche de l'ARN du VHC fournis pour l'année 2000 et le 1<sup>er</sup> trimestre 2001 sont issus des analyses pratiquées dans notre laboratoire, sur 64% (358/561) des donneurs trouvés VHC positifs sur cette période de 18 mois et ceux fournis à partir du second semestre 2001 sont ceux du DGV et sont donc exhaustifs. La proportion de dons VHC positifs virémiques est en moyenne de 69,7 % avec toutefois une tendance à la baisse de cette catégorie (figure 8) 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.

**Figure 8 :** Répartition des donneurs infectés par le VHC entre 2001 (semestre 2 : début du DGV) et 2013 en fonction de la virémie (n=2561).



La répartition des charges virales déterminées sur 653 donneurs prélevés entre 2007 et 2013. 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 10, 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 moy entre ces génotypes) 2) les CVs les moins élevées observées pour les génotypes 3 et 4 (aucune différences entre ces 2 génotypes).

**Tableau 10** : Répartition des charges virales VHC en fonction des génotypes (2007-2013)

| CV<br>log UI/ml       | Gen1a<br>(n=204) | Gen1b<br>(n=173) | Gen2<br>(n=75) | Gen3<br>(n=138) | Gen4<br>(n=48) | Gen5<br>(n=9) | NG<br>(n=6) | TOTAL<br>(N=653) |
|-----------------------|------------------|------------------|----------------|-----------------|----------------|---------------|-------------|------------------|
| <1.39                 | 0%               | 0%               | 0%             | 0%              | 2,1%           | 0%            | 16,7%       | 0,3%             |
| 1.39-3                | 0,5%             | 1,2%             | 1,3%           | 1,4%            | 0%             | 11,1%         | 0%          | 1,1%             |
| 3-4                   | 2,5%             | 2,9%             | 5,3%           | 7,2%            | 14,6%          | 0%            | 0%          | 4,7%             |
| 4-5                   | 12,7%            | 11,6%            | 10,7%          | 23,2%           | 22,9%          | 0%            | 16,7%       | 15,0%            |
| 5-6                   | 34,8%            | 39,3%            | 25,3%          | 41,3%           | 43,8%          | 22,2%         | 16,7%       | 36,6%            |
| 6-7                   | 40,7%            | 41,6%            | 46,7%          | 25,4%           | 16,7%          | 55,6%         | 50,0%       | 36,9%            |
| >7                    | 8,8%             | 3,5%             | 10,7%          | 1,4%            | 0%             | 11,1%         | 0%          | 5,4%             |
| <b>Moy. Log</b>       | <b>5,88</b>      | <b>5,82</b>      | <b>5,91</b>    | <b>5,37</b>     | <b>5,15</b>    | <b>5,93</b>   | <b>3,88</b> | <b>5,64</b>      |
| Ecart-type<br>des log | 0,85             | 0,84             | 1,08           | 0,96            | 1,11           | 1,33          | 2,1         | 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

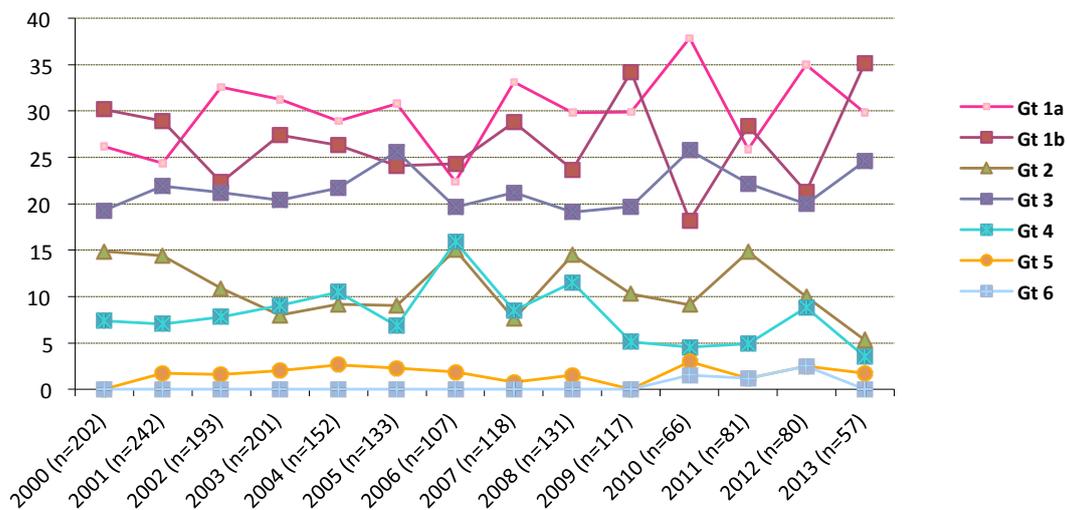
Sur les 2034 donneurs trouvés ARN VHC positifs entre 2000 et 2013, 92,8 % (n=1888) ont bénéficié d'une détermination du génotype. La figure 9 montre l'évolution des génotypes dans le temps.

### Variabilité du VHC

Sur la période 2000-2013, le génotype le plus fréquent parmi les souches génotypées

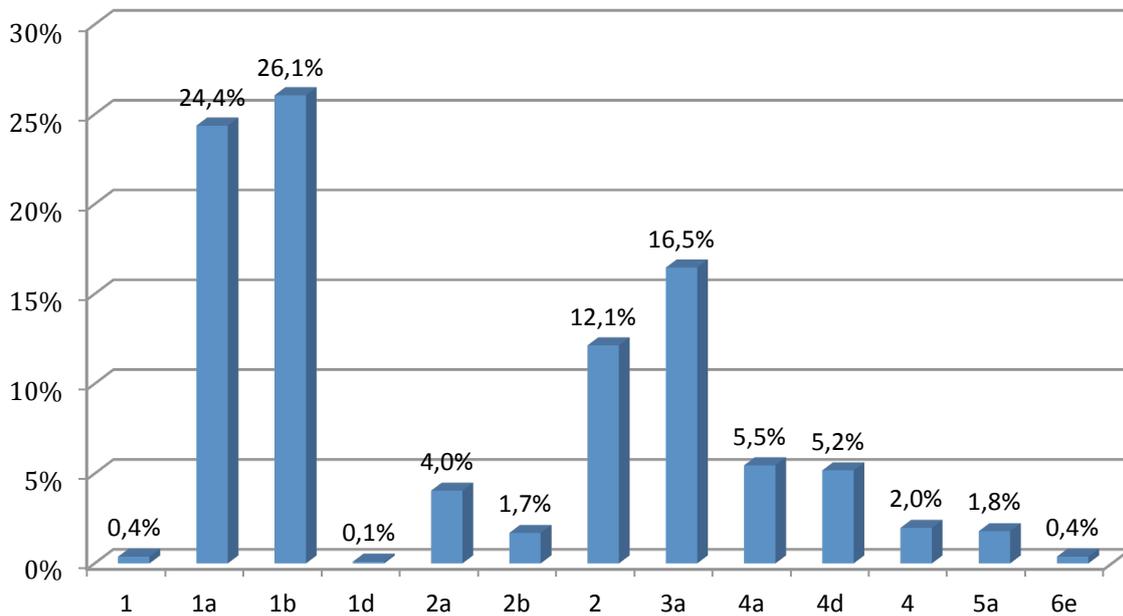
est le génotype 1 (57,3 % se répartissant pour environ moitié 1a, et moitié 1b), suivi par le génotype 3 (21,2 %), le génotype 2 (11,6 %) et le génotype 4 (8,2 %). Cette répartition est relativement stable au cours des 5 premières années d'étude (pas de différence significative). Toutefois, en 2006 une augmentation des génotypes 4, avec une baisse des génotypes 1 ont été observées, tendances non confirmées en 2007-2009.

**Figure 9** : Evolution des proportions relatives (en %) des génotypes du VHC chez les donneurs de sang virémiques pour la période 2000-2013.



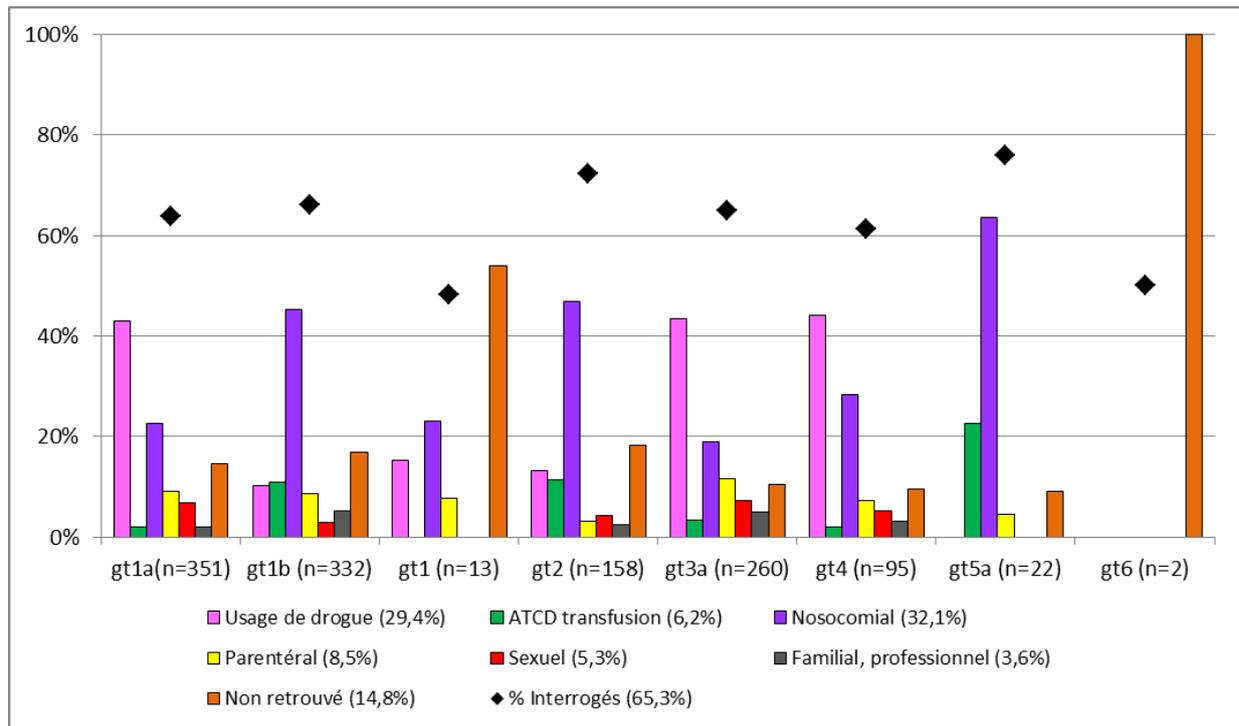
L'analyse moléculaire par séquençage de 1063 souches (541 génotypes 1, 190 génotypes 2, 175 génotypes 3, 134 génotypes 4, 19 génotypes 5, 4 génotype 6) collectées durant cette même période rend compte d'une grande variabilité des sous-types, comme le montre la figure 10. Parmi les 541 donneurs infectés par le génotype 1, 51,2% sont de sous-type 1b et 47,9% de sous-type 1a. L'analyse des 190 souches de génotype 2 montre une très grande variabilité de ce génotype avec toutefois une majorité des souches appartenant au sous-type 2a avec 22,6%. Les génotypes 3 et 5 sont très homogènes : 100% des souches sont de sous-type 3a et 5a respectivement. Enfin, le génotype 4 est aussi très variable en dehors des sous-types 4a et 4d, qui représentent respectivement 43,3% et 41% des souches de ce génotype.

**Figure 10** : Répartition des génotypes et des sous-types du VHC sur 1063 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 drogues, antécédents de transfusion avant 1991, exposition nosocomiale, expositions parentérales autres (tatouage, piercing, acupuncture), sexuel, autre (familial, professionnel). Cette analyse montre que génotypes et facteurs de risques sont significativement liés ( $p < 10^{-4}$ ). Chez les donneurs ayant un génotype 1a, 3a ou 4, une proportion plus élevée (43%, 43,5% et 44,2% respectivement) ont été contaminés par toxicomanie comparativement aux autres génotypes. Chez les donneurs avec un génotype 1b ou 2, une proportion plus élevée (45,2 % et 46,8 % respectivement) ont été contaminés par voie nosocomiale, comparativement aux autres génotypes (figure 11).

**Figure 11** : Répartition des facteurs de risque du VHC (hiérarchisés) chez les donneurs de sang en fonction du génotype sur la période 2000-2013.



### Sérotypage VHC

Parmi les 349 donneurs non virémiques que comptaient les années 2008 à 2013 (68, 71, 50, 54, 56 et 50 respectivement), 200 (57,3%) ont été analysés pour la détermination du sérotype VHC. Les 149 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 200 échantillons, 108 (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 11.

**Tableau 11** : Comparaison des proportions de sérotypes VHC et des génotypes VHC sur la période 2008-2013

| Type | Sérotype (n=108) |       | Génotype (n=540) |       | p      |
|------|------------------|-------|------------------|-------|--------|
|      | N                | %     | N                | %     |        |
| 1    | 79               | 73,15 | 311              | 57,59 | 0,0026 |
| 2    | 5                | 4,63  | 66               | 12,22 | 0,0211 |
| 3    | 18               | 16,67 | 113              | 20,93 | NS     |
| 4    | 4                | 3,70  | 38               | 7,04  | NA     |
| 5    | 0                | 0     | 8                | 1,48  | NA     |
| 6    | 0                | 0     | 4                | 0,74  | NA     |
| 1+4  | 1                | 0,93  |                  |       | NA     |
| 3+4  | 1                | 0,93  |                  |       | 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, inversement la proportion de type 2 est moins importante chez 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. Seuls 81 de ces 108 donneurs ont été interrogés sur leur facteur de risque : aucun facteur de risque n'a été retrouvé pour 18 (22,2%) d'entre eux. Des 63 autres : 22 avaient des antécédents de toxicomanie, 4 avaient été transfusés, 24 déclaraient une contamination nosocomiale possible, 4 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 (VIH, VHC, VHB) avec la même technologie (Ultrio Procleix, Novartis Chiron). Depuis la mise en place du **DGV du VHC** le 1<sup>er</sup> juillet 2001 et jusqu'au 31 décembre 2013 34,2 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 12); 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 13 premières années de pratique du DGV, soit 0,35 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  $4,7 \times 10^7$  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 12** : Caractéristiques des donneurs dépistés ARN positifs anticorps négatifs entre le 1<sup>er</sup> juillet 2001 et le 31 décembre 2013

| 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 <sup>7</sup> | 0,93                         | M/62     | DC    | 141                                          | endoscopie                              |            |
| 2   | 2002  | FS     | 3a        | 1,2x10 <sup>5</sup> | 0,10                         | M/35     | DC    | 1515                                         | ?                                       | ALT +      |
| 3   | 2003  | ?      | Non testé |                     | Non testé                    | M/22     | ND    | Na                                           | ?                                       |            |
| 4   | 2003  | IS     | 4a        | > 5x10 <sup>5</sup> | 2,58                         | M/47     | ND    | Na                                           | ?                                       |            |
| 5   | 2004  | FS     | 1b        | 1,8x10 <sup>7</sup> | 0,50                         | F/58     | DC    | 91                                           | AES                                     |            |
| 6   | 2005  | FS     | 1a        | 2,2x10 <sup>3</sup> | 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 <sup>5</sup> | 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 <sup>7</sup> | 2,4                          | M/47     | DC    | 120                                          | Non investigué                          |            |
| 11  | 2008  | ?      | 1a        | 1,9x10 <sup>7</sup> | 1,77                         | M/64     | DC    | 77                                           | Nosocomial/sexuel ?                     |            |
| 12  | 2008  | FS     | 1a        | 8x10 <sup>3</sup>   | 0,5                          | F/37     | DC    | 217                                          | partenaire VHC et toxicomane            |            |
| 13  | 2009  | FS     | 3a        | 2 x10 <sup>4</sup>  | 0,41                         | M/23     | DC    | 1003                                         | ?                                       |            |
| 14  | 2010  | ?      | 1a        | 18x10 <sup>6</sup>  | 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 10,7 millions de dons en ayant bénéficié jusqu'au 31 décembre 2013, 38 dons ont été retrouvés AgHBs négatif et DGV positif. 29 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 0,84 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 13).

**Tableau 13 : Bilan du DGV VHB de 2005 au 31 décembre 2013**

|                      | DOM<br>(2005-2013) | CTSA<br>(2006-2013) | FM<br>(2010 partiel-2013) | Total                     |
|----------------------|--------------------|---------------------|---------------------------|---------------------------|
| Dons testés          | 365 319            | 164 991             | 10 186 279 <sup>1</sup>   | 10 716 589 <sup>1</sup>   |
| DGV pos<br>AgHBs pos | 215                | 62                  | 726                       | 1003 (90,9%)              |
| DGV pos<br>AgHBs neg | 4                  | 1                   | 33                        | <sup>2</sup><br>38 (3,5%) |
| DGV neg<br>AgHBs pos | 15                 | 0                   | 47                        | 62 (5,6%)                 |
| Total VHB Pos        | 234                | 63                  | 806                       | 1103                      |

<sup>1</sup> estimation

<sup>2</sup> Dont 29 OBI (anti-HBc pos) 9 FS (anti-HBc neg)

Le risque résiduel sur la période 2011-2013 est de 1/20 000 000 dons (IC95% : 0 - 1/1 700 000) pour le VHC et 1/4 000 000 dons (IC95% : 0-1/1 100 000) pour le VHB.

#### 4. Activités de recherche 2013

##### **Corrélation de la mutation précore 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, 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 précore (PC). La charge virale VHB et la quantification de l'AgHBs étaient obtenues à l'aide de trousses 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 AgHBe 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.

*Pivert, A. et al . Correlation of the G1896A precore mutation and HBsAg quantification among infected hepatitis B virus French blood donors, Journal of Medical Virology, 87: 529-535 PLoS One 2013;8(9):e75267.*

### **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 le 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  $3 \times 10^6$  UI/mL avec la trousse Abbott puisque la quantification en ddPCR obtenue était de  $2,5 \times 10^5$  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.

*L. Boizeau et al., Could droplet digital PCR be used instead of real-time PCR for quantitative detection of Hepatitis B virus genome in plasma? 2014 Journal of Clinical Microbiology, 52: 3407-3408.*

### **Impact de la diversité virale sur la détermination de la charge virale VHB**

La surveillance moléculaire des souches VHB isolées chez les donneurs de sang dans la période 2005-2013 montre que parmi les 2360 dons pour lesquels la virémie était quantifiée, 199 (8,4%) avaient une charge virale < 6 UI/mL. Malgré cette charge virale faible, le génotype était déterminé pour 54% de ces dons (108/199) (limite de détection de l'ordre de 30 UI/mL). Afin de documenter la réalité de telles quantifications, nous avons mené une étude sur 71 échantillons tout génotype confondu, tout titre AgHBs. La détermination de la charge virale initialement renseignée par la Trousse Roche (région cible précore/core), a été comparée à celle obtenue avec la trousse Abbott HBV Real time (région cible ; preS). Les résultats de quantification sont concordants pour 90% (64/71) des échantillons. Pour les 7 dons discordants de génotype A, la technique Roche fournissait une CV <6 UI/mL et la technique Abbott de 72 à 5906 UI/mL. Afin d'expliquer ces différences, nous avons débuté l'étude des séquences de la région précore/Core (cible d'amplification de la trousse Roche) à l'aide d'une PCR maison pour ces 7 échantillons et étendu notre étude à 36 dons de CV Roche <20 UI/mL avec un titre AgHBs fort (> 40000 ng/mL), tout génotype confondu. Parmi les 26 échantillons pour lesquels une séquence précore/core était obtenue, 6 montrent une quantification de la charge virale faible quelle que soit la technique utilisée (Roche ou Abbott), 6 ont une discordance entre les 2 trousse et 14 sont en cours de quantification avec la trousse Abbott. Nous observons un polymorphisme génétique particulier pour toutes les souches de génotype A qui présentent un défaut de quantification avec la trousse Roche. Ces résultats encore préliminaires méritent d'être confortés avec l'inclusion d'autres échantillons.

### **Evaluation de la fréquence des mutations de résistance aux anti-protéases chez les donneurs de sang**

Un nouvel outil moléculaire spécifique de la région NS3 du VHC a été mis en place en 2013 au laboratoire 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 l'année de collecte 2012 a été réalisée courant 2014. 83 dons VHC positifs étaient inclus dans l'étude avec une virémie médiane de  $10^6$  UI/mL. Les souches étaient génotypées à l'aide de la trousse VERSANT HCV GENOTYPING ASSAY LiPA 2.0 (Siemens) et reprises si nécessaire avec une PCR spécifique de la région NS5b suivie d'une analyse de séquences. Parmi les 70 échantillons génotypés avec la PCR pangénotypique, 36 étaient de gt 1 (52%), 8 de gt2 (11%), 16 de gt 3 (23%), 7 de gt4 (10%), 1 de gt 5 (1%) et 2 de gt6 (3%) avec une concordance de 100% avec la technique de génotypage précédemment utilisée. Parmi les 36 souches de gt1, 4 (11%) présentaient une mutation de résistance aux anti-protéases (cf tableau ci-dessous).

| N° épidémiologie | Génotype NS3 | Mutations résistances             |
|------------------|--------------|-----------------------------------|
| C3854            | 1 a          | Q80K (Siméprévir)                 |
| C3860            | 1 g          | T54S (Bocéprévir)                 |
| C3918            | 1 a          | V36M<br>(Bocéprévir / Téléprévir) |
| C3974            | 1 a          | T54S (Bocéprévir)                 |

Concernant les 34 génotypes non-1, en raison de l'absence de données clairement établies sur les phénotypes de résistance, l'étude du polymorphisme génétique est en cours. L'ensemble de ces résultats fera l'objet d'une publication.

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

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 réplication 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 dans des éléments régulateurs du génome viral pouvant altérer la réplication du VHB. En particulier, l'analyse de souches virales associées à une réactivation de l'infection B occulte a permis d'identifier une mutation ponctuelle qui inactivait un site 5' d'épissage (nucléotide 458) dans l'ARNm viral

pre-S2/S et qui altéraient la production d'AgHBs via un mécanisme post-transcriptionnel restant à caractériser. Dans ce but, l'étude des relations fonctionnelles entre épissage de l'ARNm S et expression de la protéine S et l'impact négatif potentiel de mutations spécifiques chez des donneurs de sang porteurs d'OBI a été entreprise.

Des souches VHB de génotypes A-E infectant des donneurs porteurs d'infection B occulte et chronique (AgHB+) ont été collectées à travers le monde et les séquences correspondantes de l'ARNm pre-S2/S incluant les sites d'épissage ont été analysées. L'influence de mutations sur la structure secondaire de l'ARN au niveau des sites d'épissage a été évaluée à l'aide du programme MFOLD. L'effet de mutations sélectionnées sur l'épissage et la production d'AgHBs a été évalué *in vitro* en clonant et en transfectant dans des cellules de lignée hépatocytaire Huh7 (1) des fragments subgénomiques codant l'ARN S de souches VHB occultes avec ou sans l'élément régulateur post-transcriptionnel (PRE) distant, (2) le génome entier VHB répliatif muté, et (3) des génomes viraux extraits de biopsies de foies. La production d'ARNm et d'AgHBs a été quantifiée dans les cellules et les surnageants de culture. Les résultats ont été 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 ont été 'réparées' par mutagenèse dirigée des résidus nucléotidiques étudiés, et les mutations occultes correspondantes ont été 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.

Les résultats obtenus ont confirmé l'épissage alternatif de l'ARNm pre-S2/S *in vitro* indépendamment du génotype VHB et du promoteur autologue ou hétérologue contrôlant la transcription du gène S. Cet épissage alternatif a été également détecté dans le contexte naturel d'un génome complet se répliquant et *in vivo* dans des biopsies de foie de sujets infectés présentant un profil AgHBs+ ou OBI. Le site 5' donneur d'épissage (nt458) était parfaitement conservé parmi les souches VHB mais de nouveaux sites 3' accepteur d'épissage ont été identifiés *in vitro* et confirmés *in vivo* dans le voisinage du PRE. Indépendamment du génotype viral, des substitutions de nucléotides autour du site 5' d'épissage ont été plus fréquemment observées dans les séquences OBI comparées aux contrôles non-OBI. En théorie, ces substitutions pouvaient altérer une structure secondaire

putative en boucle dans la majorité des séquences OBI. Bien qu'une production d'AgHBs détectable ait été observée *in vitro* dans des cultures transfectées avec des séquences OBI, elle était significativement plus faible comparée à celle obtenue avec des séquences issues de souches AgHBs+. La présence d'un site 5' muté empêchait l'épissage de l'ARN et s'accompagnait d'une réduction significative de la production d'AgHBs. De façon similaire, une double mutation nt453/nt463 présente chez deux souches OBI indépendantes interférait avec l'épissage et la production d'AgHBs. Cependant, le blocage par mutagenèse dirigée des sites 3' d'épissage abolissait l'épissage de l'ARNm pre-S2/S mais n'avait aucun effet sur la production d'AgHBs. Les mutations autour du site 5' affectaient également l'expression de la protéine moyenne et à un moindre niveau de la longue protéine de surface du VHB. Aucun effet n'a été observé sur la production de l'AgHBc et de l'AgHBe codés par l'ARN pré-génomique.

Ces résultats suggèrent que la séquence et le contexte autour du site 5' d'épissage du gène S est important pour une expression optimale de l'ARNm pre-S2/S mais que l'épissage lui-même n'est pas essentiel à la production de l'AgHBs. Cette région du gène S apparaît contenir un nouvel élément génétique de contrôle de l'expression du gène S indépendant du PRE et régulant *in cis* une étape du traitement post-transcriptionnel de l'ARNm fonctionnel. Des résultats préliminaires suggèrent une implication dans le transport nucléocytoplasmique des ARNs viraux. Cette piste sera explorée par des expériences de transcription *in vitro* et en parallèle de détection des ARNms viraux dans les cellules transfectées par des techniques sensibles d'hybridation *in situ* à l'aide de sondes fluorescentes.

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

### Enseignement universitaire

- Diplôme Universitaire de Transfusion Sanguine, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6
- Diplôme Universitaire de Transfusion Sanguine, Université Paris Est Créteil, Paris 12
- Capacité en Transfusion Sanguine, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6
- DESC d'Hémobiologie, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6
- Diplôme Universitaire de Médecine Transfusionnelle, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6

- Master 2, Virologie, module virologie moléculaire et médicale, Paris 7

### Enseignement non universitaire

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

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

- Rétro-information à InVS
- Participation au numéro thématique *Don de sang : surveillance du risque infectieux et sécurité transfusionnelle* BEH 23 octobre 2012 / n° 39-40

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

## 6. Liste des publications et communications relatives aux activités du CNR 2014

### Publications

Bloch EM, Shah A, Kaidarova Z, **Laperche S**, Lefrere JJ, van Hasselt J, Zacharias P, Murphy EL; Anglophone Africa Transfusion Research Group. A pilot external quality assurance study of transfusion screening for HIV, HCV and HBsAg in 12 African countries. *Vox Sang* 2014;107:333-42.

**Boizeau L, Laperche S**, Désiré N, **Jourdain C**, Thibault V, **Servant-Delmas A**. Could droplet digital PCR be used instead of real-time PCR for quantitative detection of the hepatitis B virus genome in plasma? *J Clin Microbiol*. 2014;52:3497-8.

Pivert A, **Servant-Delmas A**, Lunel-Fabiani F, Le Guillou-Guillemette H, **Laperche S**, Ducancelle A. Correlation between the promoter basal core and precore mutations and HBsAg quantification in French blood donors infected with hepatitis B virus. *J Med Virol* 2015;87:529-35.

Brichler S, Le Gal F, Neri-Pinto F, Mansour W, Roulot D, **Laperche S**, Gordien E. Serological and molecular diagnosis of hepatitis delta virus infection: results of a French national quality control study. J Clin Microbiol 2014;52:1694-7.

Tagny CT, Mbanya 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 Methods 2014;199:119-23

**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

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.

### **Communications orales**

V. Thibault, **A. Servant-Delmas**, L. Thoai Duong, AM. Roque-Afonso, **S. Laperche**. Impact des génotypes du virus de l'hépatite B et des variants du déterminant "a" sur la quantification de l'AgHBs 2014. XVI<sup>e</sup> Journées Francophones de Virologie, Paris, France.

### **Invitations**

**A. Servant-Delmas**. Monolisa HCV Ag-Ab ULTRA Version 2, Bio-Rad. 2014. Bio-Rad Day, Singapour

## **7. Programme d'activité 2014-2015**

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

- 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 2014 et particulièrement la recherche de **mutations de résistance**

aux thérapeutiques dans la population des donneurs de sang

- 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 génotypage 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) Etude de la diversité génétique du VHB

### **- Polymorphisme de la région Précore/Core du VHB**

Nos premiers résultats montrent un polymorphisme génétique particulier de la région Précore/Core pour toutes les souches de génotype A qui présentent un défaut de quantification avec la trousse Roche. Nous poursuivons notre étude avec l'inclusion de dons toutes charges virales confondues avec le système Roche et étudions le polymorphisme génétique des souches de génotype A par rapport aux autres génotypes sur cette région. L'ensemble des échantillons sera aussi quantifié à l'aide de la technique Abbott.

### **- 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 réalisons 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. Des résultats très préliminaires montrent que la technologie nanopore doit encore évoluer afin de limiter les erreurs générées lors du séquençage. En 2015, nous poursuivrons nos essais vis-à-vis des souches de génomes complets VHB.

**- Caractérisation moléculaire et fonctionnelle des souches du virus de l'hépatite B infectant des sujets présentant un haut niveau d'AgHBs sans virémie détectable : implications sécuritaires et cliniques**

Les mécanismes moléculaires associés à une réplication virale persistante à faible niveau indépendamment de la production d'AgHBs et le risque infectieux lié à ce profil biologique particulier restent mal connus. Cet écart inhabituellement élevé entre les niveaux d'ADN viral et d'AgHBs suggère la présence de mutations dans le génome viral pouvant affecter soit la détection moléculaire de variants viraux soit la réplication du génome viral et/ou la maturation et la production de particules virales infectieuses. Afin de tester cette hypothèse, des échantillons de plasma de donneurs de sang (population d'étude témoin naïve de tout traitement) dépistés AgHBs positif et ADN VHB non-réactif/faiblement réactif non-répétable seront collectés dans une étude collaborative regroupant six laboratoires en Europe, Afrique du Sud et Malaisie, permettant ainsi l'étude simultanée de plusieurs génotypes du VHB. La présence de génomes VHB circulants sera confirmée en associant des méthodes de concentration des particules virales, d'amplification génique et de séquençage du génome viral entier ou à défaut de certaines régions critiques. Les séquences virales obtenues seront comparés aux séquences de souches virales contrôles de même génotypes afin d'identifier d'éventuelles mutations dans les protéines virales et/ou les éléments régulateurs pouvant affecter la réplication du VHB. Les propriétés répliquatives de ces virus seront évaluées *in vitro* comme modèle expérimental préliminaire pouvant se substituer à des tests d'infectiosité directe. Les données recueillies permettront d'évaluer indirectement

le potentiel infectieux des plasmas dépistés AgHBs positif/ADN négatif et seront utilisées dans le débat sur l'impact potentiel de la suppression du dépistage de l'AgHBs sur la sécurité transfusionnelle. Ce projet de recherche a fait l'objet d'une demande de financement auprès de l'ANRS dans le cadre du 2<sup>e</sup> appel d'offres 2015.

#### 4) Veille technologique

##### **Evaluation de la sensibilité clinique vis-à-vis des mutants de l'AgHBs des tests rapides d'orientation diagnostique AgHBs**

Le but du travail sera d'évaluer le test rapide d'orientation diagnostique (TROD) VIKIA HBsAg - BioMérieux comparativement à deux réactifs du même type :

- DRW-HBsAg v2 assay (Diagnostics for the Real World<sup>TM</sup>, Ltd, USA)
- Alere Determine<sup>TM</sup> HBsAg (Alere)

La sensibilité analytique des trousse sera déterminée à l'aide du standard de référence international WHO calibré en UI/ml. La sensibilité clinique sera évaluée vis-à-vis d'échantillons natifs et recombinants de souches de géotypes VHB différents avec des mutations sur l'AgHBs décrites comme pouvant altérer son antigénicité. Un panel de 55 souches de tout géotype avec une ou plusieurs mutations sur l'AgHBs ainsi qu'un panel de 6 souches présentant des mutations sur la séquence de la polymérase associées à une résistance au traitement antiviral, avec un impact sur la séquence de l'AgHBs seront inclus dans cette évaluation. Un panel de 7 échantillons composés de protéines HBs recombinantes mutées, calibrées à environ 25 UI/ml sera inclus dans l'étude sous réserve d'une limite de détection des trousse compatible avec les concentrations des échantillons et les volumes disponibles au laboratoire.

#### 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**

**2015**

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

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

**Année d'exercice**

**2014**

## 1 Missions et organisation du CNR

La description détaillée est présentée en annexe.

Le changement par rapport à l'année précédente, est la fonctionnalité complète d'un laboratoire de niveau L3 au sein du laboratoire. De plus sur le plan des équipements, il y a eu l'acquisition effective de l'automate de nouvelle génération de séquençage le Myseq500 Illumina au sein de plate forme de biologie moléculaire mutualisée 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, l'introduction du contrôle interne de notre technique de référence dans la pratique nous a permis de détecter la présence d'inhibiteurs dans moins de 2% des échantillons testés. Les échantillons à tester et le contrôle interne sont désormais mis sur une même plaque réduisant le temps technicien et les aléas techniques. De même l'étalon international OMS est incorporé dans toutes nos techniques, nous permettant de rendre les résultats en copies et en UI/mL. Cette pratique sera généralisée en 2015.

En revanche, *les mises au point techniques* pour tenter de réaliser la phase de transcription inverse et la PCR quantitative en une seule étape ont été suspendues du fait des collaborations établies avec une société privée.

#### - 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 du 3<sup>ème</sup> contrôle national en 2014, auxquels tous les laboratoires français de l'Hexagone ont participé (voir rapport en annexe) et de la 2<sup>ème</sup> phase du 1<sup>er</sup> contrôle international de qualité 2013 (auxquels ont participé 29 laboratoires dont 6 français) pour le diagnostic de l'infection Delta.

Cette 2<sup>ème</sup> phase du 1<sup>er</sup> contrôle international de qualité a consisté en l'envoi

à tous les centres internationaux de tous les continents exceptés l'Amérique du Sud, d'un panel constitué de 2 dilutions en 1/10<sup>ème</sup> et au 1/100<sup>ème</sup> du standard international OMS HDV, chacune en *triplicata*, avec deux témoins négatifs. Ainsi l'ensemble des résultats ont pu être convertis de copies/ml en unités internationales (UI) par ml et ceci a permis de réaliser analyses comparatives exhaustives de quasiment toutes les techniques commerciales et « maison » développées dans le monde (voir paragraphe 2.2 ci-dessous).

#### **- Techniques transférées vers d'autres laboratoires**

Le CNR-D a permis l'implantation de sa technique à Nantes 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. Ce laboratoire a aussi participé au contrôle international de qualité.

De même après l'achat du contrat de licence par les laboratoires CERBA, les évolutions techniques et technologiques liées à notre test de quantification CNR-D, sont systématiquement répercutées chez eux, ainsi que le stipule ce contrat.

D'autre part dans les 2 cas, les échanges scientifiques et techniques sont continus et toutes les souches positives sont envoyées au CNR-D avec les renseignements épidémiologiques afférant dans le cas de notre veille prospective des souches HDV circulant en France.

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

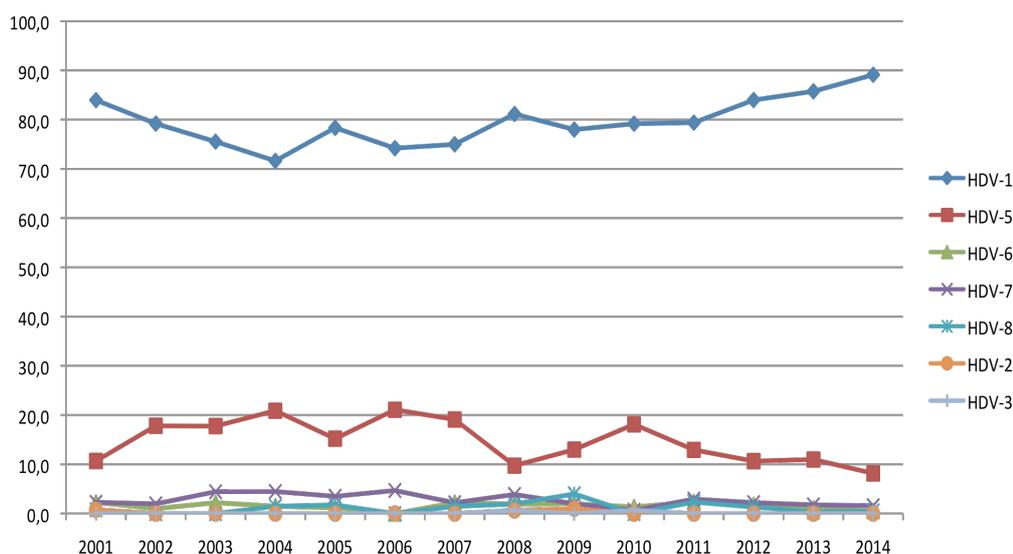
**L'activité diagnostique HDV du CNR-D** au cours de l'année 2014 a été marquée par une stabilisation du nombre de demandes de dépistage sérologique : recherches d'Anticorps (Ac) Totaux (1006 examens) et des Anticorps anti-Delta IgM (90). La recherche des IgM Delta chez les patients a diminué régulièrement depuis 2007. Son intérêt semble à la fois méconnu et discuté. Les IgM, contrairement aux autres infections en microbiologie, persistent au cours de l'infection chronique Delta. Cependant ils peuvent manquer chez des patients africains ainsi que nous l'avons montré dans une étude récente réalisée en Mauritanie (Mansour et coll., 2014). Cependant, la recommandation du CNR-D est de considérer ces IgM quand ils ont été retrouvés chez des patients et que leur présence au cours de l'infection chronique doit indiquer la poursuite des traitements même en cas de charge

virale ARN négative.

Enfin, la reprise des examens de charge virale ARN Delta par des laboratoires ayant développé la technique, s'est traduite par une diminution des demandes au CNR-D de 16% par rapport à l'an 2013, avec un total de 2039 examens réalisés. Toutefois des demandes venant directement de pays européens et africains commencent à être comptabilisée (une dizaine au dernier trimestre 2014).

**Le typage prospectif des nouvelles souches delta** circulant en France. En 2014, 184 nouvelles souches HDV ont été génotypées au laboratoire. Les génotypes retrouvés étaient : 164 HDV-1, 15 HDV-5, 1 HDV-6, 3 HDV-7 et 1 HDV-8 (voir figure et tableau ci dessous). A celles –ci il convient de rajouter aussi le typage de 111 souches venant directement de l'étranger de pays de forte endémie HDV (Afrique Subsaharienne, Europe de l'Est) via le laboratoire CERBA. Il s'agissait principalement des pays suivants : Cameroun, Cote d'Ivoire, Mauritanie, République Centrale Africaine, Sénégal, Tchad et Roumanie. 71 souches HDV-1, 6 souches HDV-5, 4 souches HDV-6, 4 souches HDV-7 et 26 souches sont en cours de caractérisation.

## Proportion des différents génotypes HDV circulant en France (en %)



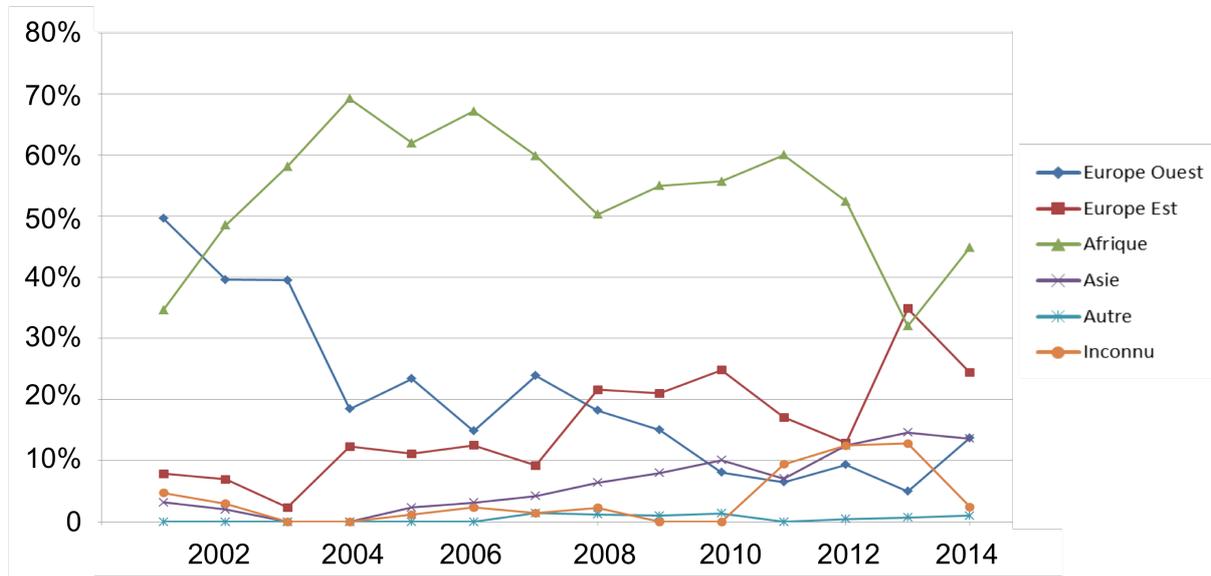
| HDV-génotype | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | *2014 |
|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| HDV-1        | 110  | 80   | 34   | 48   | 134  | 95   | 102  | 125  | 78   | 118  | 135  | 189  | 241  | 164   |
| HDV-5        | 14   | 18   | 8    | 14   | 26   | 27   | 26   | 15   | 13   | 27   | 22   | 24   | 31   | 15    |
| HDV-6        | 3    | 1    | 1    | 1    | 2    | 0    | 3    | 3    | 2    | 2    | 4    | 4    | 3    | 1     |
| HDV-7        | 3    | 2    | 2    | 3    | 6    | 6    | 3    | 6    | 2    | 1    | 5    | 5    | 5    | 3     |
| HDV-8        | 1    | 0    | 0    | 1    | 3    | 0    | 2    | 3    | 4    | 0    | 4    | 3    | 1    | 1     |
| HDV-2        | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     |
| HDV-3        | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0     |
| Total        | 131  | 101  | 45   | 67   | 171  | 128  | 136  | 154  | 100  | 149  | 170  | 225  | 281  | 184   |

\* Pour l'année 2014, 19 souches sont encore en cours de génotypage.

Une mission d'expertise a été confiée au CNR Delta par le comité international de taxinomie (ICTV) : ***l'élaboration d'une proposition d'une classification internationale des différents génotypes viraux Delta***, sur la base de notre collection de plus de 2000 séquences virales. Le génotypage de 2051 souches de notre souchothèque a été réalisé grâce au séquençage d'une région du génome Delta (dite « RO ») développée au laboratoire (Ivaniushina et coll., 2001). Parmi celles-ci, et dans chacun des génotypes, 119 séquences complètes ont été caractérisées grâce au séquençage de 3 régions chevauchantes et reconstitution de la séquence complète. Des études phylogénétiques extensives ont été réalisées avec les 113 séquences complètes disponibles de la littérature, soit au total 229 séquences. La proposition d'une nomenclature internationale est en cours d'élaboration au sein du CNR avec l'aide du Professeur Paul Dény.

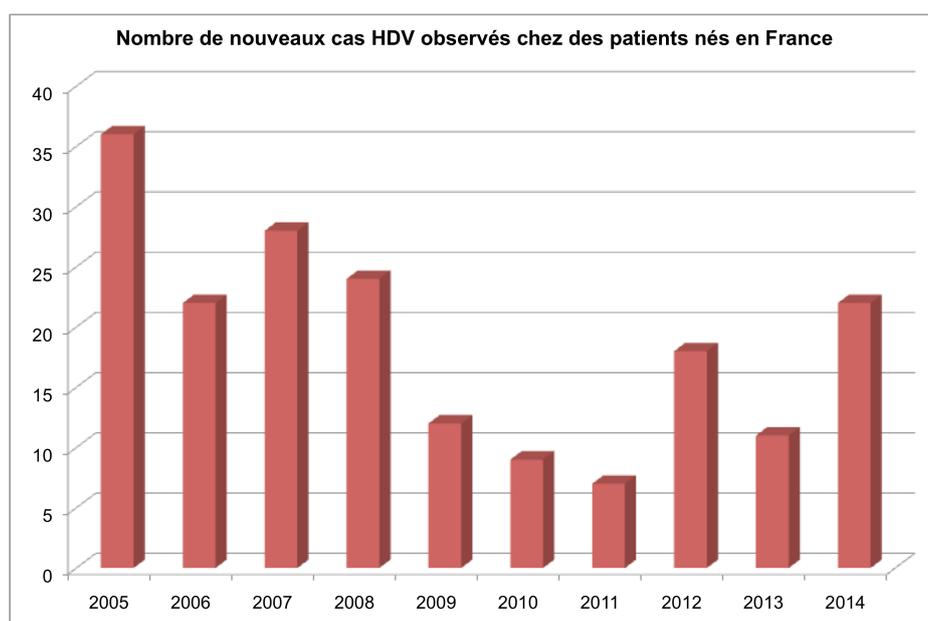
***L'origine géographique des patients.*** Les 184 patients vivent en France, mais originaires des pays suivants : Afrique (52,6%), Asie (7,6%), Europe de l'Est (26,8%), Europe de

l'Ouest (10,26%), (voire figure et tableaux ci-dessous). Les patients asiatiques sont originaires essentiellement de la Mongolie et de la Géorgie.



### Proportion des différents génotypes HDV circulant en France (en %)

La proportion de patients originaires d'Europe de l'Ouest voit cependant une augmentation au dessus de la barre des 10%. Cette donnée est confirmée quand on considère les patients nés en France (voir tableau ci-dessous) où on voit un doublement du nombre de cas HDV positifs par rapport à l'année précédente.



Origine des nouveaux patients infectés par HDV et caractérisés en France au sein du CNR Delta en 2014 (n = 302) ; (\*) correspond aux souches caractérisées chez des patients suivis dans leur pays d'origine.

|                                |                                             |
|--------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>Europe de l'Ouest = 31</b>  | <i>Italie = 1</i>                           |
| <i>France = 21</i>             | <i>Portugal = 4</i>                         |
| <i>Espagne = 1</i>             | <i>Grèce = 3 (2*)</i>                       |
| <i>Luxembourg = 1 (1*)</i>     |                                             |
|                                |                                             |
| <b>Europe de l'Est = 81</b>    | <i>Roumanie = 52 (31*)</i>                  |
| <i>Ukraine = 2</i>             | <i>Russie = 3</i>                           |
| <i>Moldavie = 2</i>            | <i>Géorgie = 7</i>                          |
| <i>Serbie = 1</i>              | <i>Biélorussie = 1</i>                      |
| <i>Bulgarie = 13</i>           |                                             |
|                                |                                             |
| <b>Afrique = 159</b>           | <i>Mali = 8</i>                             |
| <i>Algérie = 1</i>             | <i>Gabon = 3</i>                            |
| <i>Benin = 3</i>               | <i>Mauritanie = 27 (21*)</i>                |
| <i>Guinée Bissau = 4</i>       | <i>République de Centrafrique = 15 (1*)</i> |
| <i>Cameroun = 62 (41*)</i>     | <i>Sénégal = 6 (1*)</i>                     |
| <i>Congo B. = 3</i>            | <i>Tchad = 7 (5*)</i>                       |
| <i>Cote d'Ivoire = 15 (3*)</i> | <i>Tunisie = 1</i>                          |
| <i>Egypte = 7 (3*)</i>         | <i>Libéria = 1</i>                          |
| <i>Maroc = 1</i>               | <i>Niger = 1</i>                            |
| <i>Sierra Leone = 1</i>        | <i>Togo = 1</i>                             |
|                                |                                             |
| <b>Asie = 23</b>               | <i>Mongolie = 17</i>                        |
| <i>Chine = 6</i>               |                                             |
|                                |                                             |
| <b>Moyen Orient = 4</b>        | <i>Daghestan = 1</i>                        |
| <i>Afghanistan = 1</i>         | <i>Iran = 1</i>                             |
| <i>Oman = 1</i>                |                                             |
|                                |                                             |
| <b>DROM = 4</b>                | <i>Antilles = 1</i>                         |
| <i>Guyane = 1</i>              | <i>Réunion = 2</i>                          |
|                                |                                             |

A noter que 3 échantillons en provenance des DROM, où la prévalence de l'infection Delta est supposée faible à nulle, ont été obtenus via des laboratoires privés. Cependant peu d'informations et d'études sont disponibles concernant l'infection Delta dans ces DROM.

- **Les analyses comparatives exhaustives de quasiment toutes les techniques commerciales et « maison » développées dans le monde** ont pu être effectuées grâce au premier contrôle de qualité international (CIQ) organisé par la CNR-D pour la quantification de la charge virale plasmatique chez les patients infectés. Ce CIQ a vu la participation de 29 laboratoires (voir

tableau ci-dessous) de par le monde dont 6 laboratoires français dont 4 d'entre eux qui ont développé la technique CNR-D.

### Liste des laboratoires ayant participé au 1<sup>er</sup> contrôle international de qualité.

| 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, Paris                                                       | France         |
| Pr. Sophie Alain                                      | Service de bactériologie virologie hygiène, Limoges                                                                 | France         |
| Dr Emmanuel Gordien                                   | CNR associé Delta                                                                                                   | France         |
| Pr Marianne Coste-Burel                               | Laboratoire de virologie CHU de Nantes                                                                              | 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                       | Department of Gastroenterology, Hepatology and Endocrinology Hannover Medical School;                               | Germany        |
| Dr Bernhard Miller                                    | MVZ Labor Prof. Seelig GbR Brauer                                                                                   | Germany        |
| Dr Michael Chudy                                      | Moleculare Virologie / Molecular Virology / Paul-Ehrlich-Institut                                                   | Germany        |
| Dr Stephan Urban                                      | University Hospital Heidelberg, Molecular Biology                                                                   | 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                                    | Department 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                                                                                               | Luxemburg      |
| 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 Liang Kung-Hao                                     | Liver Research Center - Chang Gung Memorial Hospital, Taiwan                                                        | Taiwan         |
| 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/ Dr M. Kodani                  | Associate Service Fellow Division of Viral Hepatitis Assay Development and Reference Laboratory                     | USA            |

Ainsi tous les kits commerciaux sauf deux et toutes les techniques « maison » publiées sauf deux ont pu être comparées (voir tableaux ci dessous). Le CNR-D a sélectionné un panel de 18 échantillons positifs de tous les génotypes (exceptés les génotypes 3 et 4) dont la séquence complète a été déterminée. Ceux-ci ont été codés et quantifiés 3 fois au laboratoire par trois techniciens différents. Deux contrôles négatifs ont complété ce panel. La moyenne des trois valeurs obtenues plus ou moins l'écart type, a constitué la valeur cible attendue pour chaque échantillon. Un panel de 8 échantillons supplémentaires constitué de 2 contrôles négatifs et de deux dilutions en *triplicata* du standard OMS international a été envoyé au différents participants et a permis de normaliser l'ensemble des résultats en UI/ml. Tous ces échantillons codés ont été distribués à tous les participants.

## Les techniques « maison » analysées

Yamashiro T, et al.; 2004. Quantitation of the level of hepatitis delta virus RNA in serum, by real-time polymerase chain reaction--and its possible correlation with the clinical stage of liver disease. J Infect Dis. Apr 1;189(7):1151-7.

Le Gal F, et al.; 2005. Quantification of hepatitis delta virus RNA by a consensus real-time PCR indicates different patterns of virological response to interferon therapy in chronically infected patients. J Clin Mic. May 43(5):2363-9

Hofmann, J., K. et al., 2010. Quantitative detection and typing of hepatitis D virus in human serum by real time polymerase chain reaction and melting curve analysis. Diagn Microbiol Infect Dis 67:172-9

Mederacke, I., et al.; 2010. Establishment of a novel quantitative hepatitis D virus (HDV) RNA assay using the Cobas TaqMan platform to study HDV RNA kinetics. J Clin Microbiol 48:2022-9.

Ferns, R. B., E. et al.; 2011. Quantitation of hepatitis delta virus using a single-step internally controlled real-time RT-qPCR and a full-length genomic RNA calibration standard. J Virol Methods 179:189-94.

Scholtes, C., et al., 2012. Standardized one-step real-time reverse transcription-PCR assay for universal detection and quantification of hepatitis delta virus from clinical samples in the presence of a heterologous internal-control RNA. J Clin Microbiol 50:2126-8.

Shang, D., et al., 2012. Development and validation of an efficient in-house real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for the quantitative detection of serum hepatitis delta virus RNA in a diverse South London population. J Virol Methods 184:55-62.

Kodani, M., A. et al., 2013. One-step real-time PCR assay for detection and quantitation of hepatitis D virus RNA. J Virol Methods 193:531-5.

Katsoulidou, A., et al., 2013. Development and assessment of a novel real-time PCR assay for quantitation of hepatitis D virus RNA to study viral kinetics in chronic hepatitis D. J Viral Hepat 20:256-62.

Botelho-Souza LF, et al., 2014. Development of a reverse transcription quantitative real-time PCR-based system for rapid detection and quantitation of hepatitis delta virus in the western Amazon region of Brazil. J Virol Methods. 2014 Mar;197:19-24.

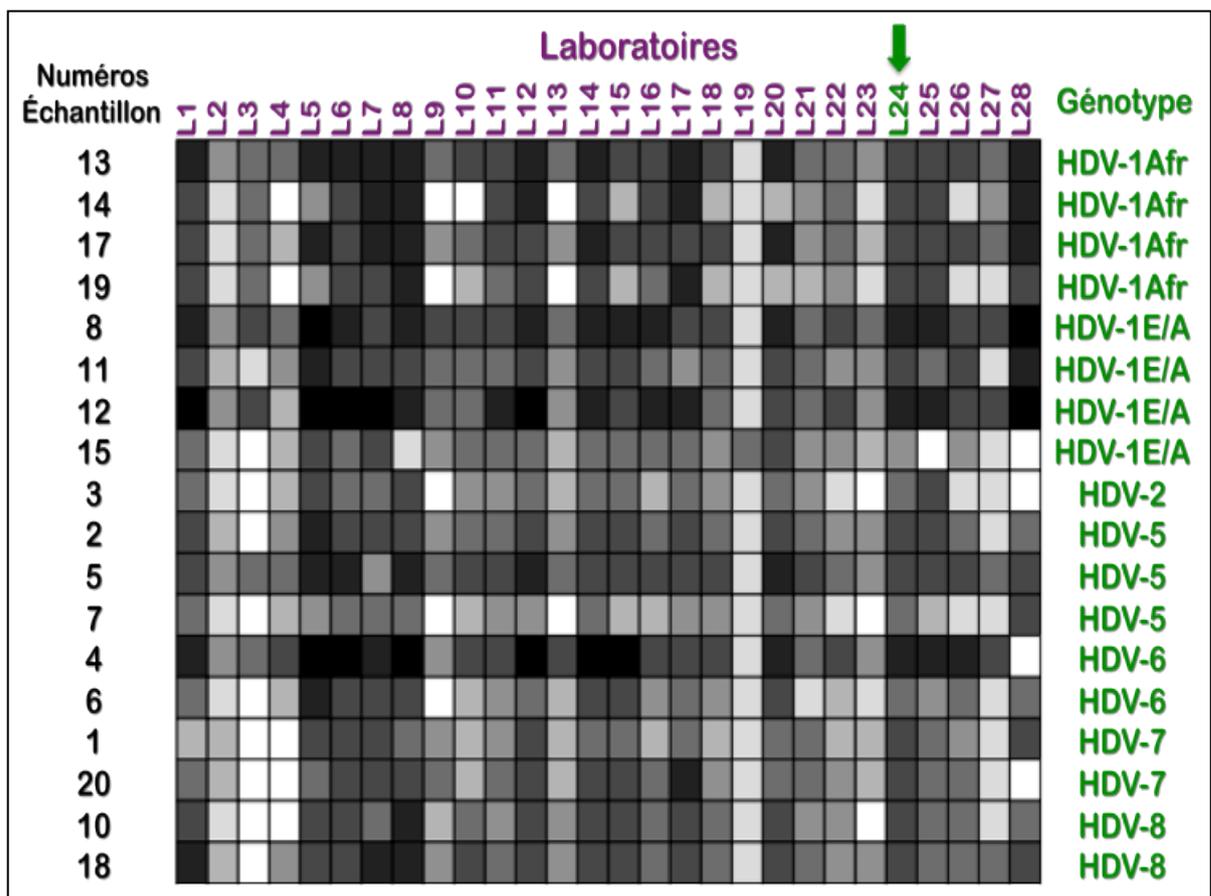
Karayataly E. et al., 2014. A one step real time PCR method for the quantification of hepatitis delta virus RNA using an external armored RNA standard and intrinsic internal control. J. Clin. Virol.. 2014 May; 60 (1): 11-15.

## Les techniques commerciales analysées

- Roche® Lightmix HDV kit (Allemagne)
- AJ-Roboscreen® (Allemagne)
- DiaPro® HV-RNA Quantification kit (Italie)
- Lipsgene® HDV Kit (Allemagne)
- Liferiver™ HDV-Real Time RT-PCR Kit (Chine)
- Amplisens® HDV-Monitor-FRT PCR Kit (Slovaquie)
- Fast Track Diagnostics™ (Luxembourg)
- Primer Design® (Royaume Uni)
- SacaXe® (Italie)
- Ecoli® (Russie)
- Bosphore HDV Quantification-Detection Kit v1 (Turquie)

Le message général est que la plupart des techniques « maison » ou commerciales

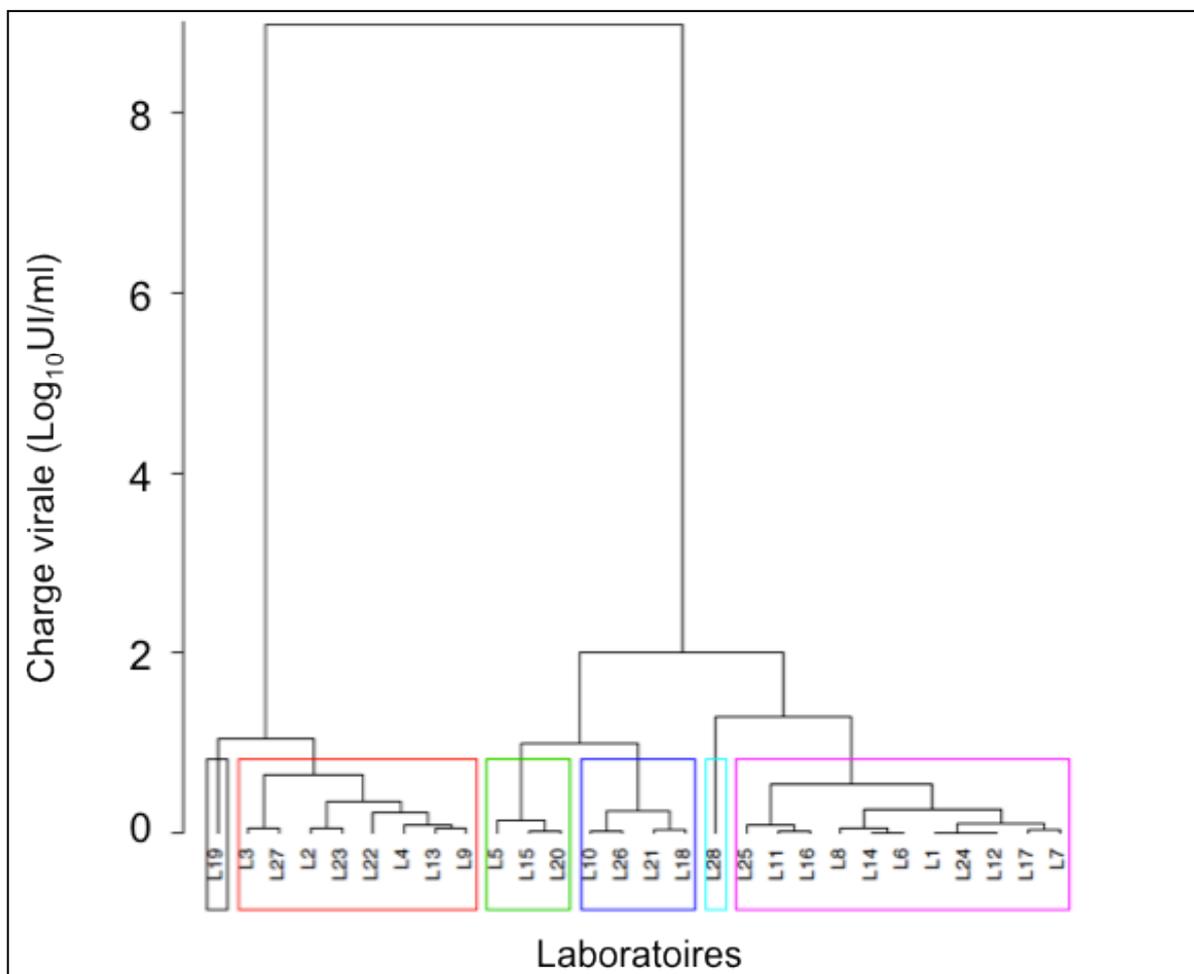
disponibles sous-estiment de façon importante ou sont incapables de quantifier la charge virale dans de nombreux échantillons cliniques. Il s'agit notamment des nombreuses souches de génotypes Africains (HDV-1-Africain et HDV-5, -6, -7 et -8). Ainsi les 18 échantillons positifs d'une valeur de charge virale comprise entre 3,5 et 7,5  $\log_{10}$ UI/ml sont quantifiés de façon très hétérogène selon les différentes techniques ainsi que le montre la figure ci-dessous où l'intensité des valeurs de charge virale relative est représentée selon une échelle de gris. Les cases blanches correspondent à des échantillons positifs, retrouvés négatifs par certains laboratoires, quels que soient les génotypes (en vert) des souches testées. Il convient de noter que deux laboratoires ont obtenu des valeurs positives avec les témoins négatifs (données non montrées).



Résultats globaux des valeurs de charge virale représentées selon une échelle de gris.

Ainsi, plusieurs groupes de laboratoires ont pu être déterminés (voir figure ci-dessous) en fonction de leur capacité de quantification des différents échantillons. Le groupe de droite sur la figure (cadre rose) correspond aux laboratoires ayant obtenu des valeurs cibles concordantes avec celles attendues pour la majorité des échantillons. Le

laboratoire CNR-D est le laboratoire numéro 24.



**Classification hiérarchique des différents laboratoires.**

Ainsi, les résultats de cette étude confirment l'absolue nécessité de la mise au point d'un kit commercial consensus. Ces résultats seront présentés en communication orale au congrès européen d'étude foie (EASL) du 22 au 26 avril 2015 à Vienne en Autriche (voir résumé en annexe).

D'autre part, un travail de comparaison des performances d'un kit commercial (Lipsgene® HDV kit de la société Lipsdiag GmbH) a été réalisé par le CNR-D. La société ayant pris en compte les résultats du contrôle international de qualité, a modifié différents paramètres son kit. Ces travaux ont fait l'objet d'une présentation à congrès (34<sup>ème</sup> réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse Novembre 2014). Les résultats sont que ce kit version améliorée est capable de quantifier l'ensemble des génotypes ; avec une

bonne sensibilité ; cependant une sous quantification peut être observée pour certains génotypes africains notamment. Une collaboration est établie pour l'évaluation plus avant de ce kit de quantification de la charge virale ARN plasmatique.

### 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. Cependant l'augmentation observée de la prévalence de l'infection Delta chez les patients nés en France sera analysée et surveillée en 2015.

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

Le laboratoire de sécurité L3 est complètement opérationnel au sein du laboratoire de bactériologie virologie hygiène. La réflexion a été engagée pour l'élargissement du champ de compétences du CNR-D dans le domaine de la culture des virus B et Delta, pour l'étude de la sensibilité des souches cliniques à l'IFN- $\alpha$ , seul traitement actuellement disponible, mais aux différents antiviraux en phase 2, tels les inhibiteurs d'entrée et de la prénylation. Le laboratoire bénéficie d'une expérience accrue en matière de modèle cellulaire et de plusieurs collaborations dans ce domaine et pourra prendre avantage de la découverte du récepteur d'entrée des virus B et Delta (le polypeptide co-transporteur des acides taurocholiques, NTCP) et donc de modèle d'infection très efficace.

#### 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, 2014) et internationaux (2013, 2014) de qualité réalisés.

- **Contribution aux réseaux de surveillance internationaux**, en particulier européens : le

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

### **3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance**

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 le 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 majeurs de surveillance.

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

### ***- 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 services en Province (Orléans, Limoges, Rennes, Nantes, Strasbourg) 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 2014. De plus le CNR-D a été invité et a participé dans différents Pays, Algérie, Bénin a des formations post universitaires (2014).

***- Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR : Rétro-information aux partenaires***

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, la bonne réalisation des techniques de routine destinées au diagnostic et de suivi de l'infection par HDV est partie intégrante du processus d'accréditation (validation de méthodes). 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, Rennes) dans les sessions scientifiques organisées par des laboratoires pharmaceutiques ;

Cours dans le cadre de la formation continue, de laboratoires privés (Biomnis ;) )

Expertise et conseils auprès de laboratoires privés (Gilead, Bristol Myers Squibb ; Qiagen) ;

Cours à l'Institut Pasteur de Paris (Virologie systématique)

***- 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.

**- 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 a reçu gratuitement de l'OMS plusieurs échantillons de ce standard, afin d'organiser la deuxième phase du 1<sup>st</sup> HDV-IQC.

Le Comité international de taxinomie des virus a saisi le CNR-D mi-2014 pour la proposition d'une nomenclature des génotypes HDV

Le CNR-D est un partenaire du réseau international pour l'hépatite Delta qui est invité et participe aux deux réunions biennuelles du réseau en marge des congrès européen et américain d'étude des maladies du foie.

## **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.**

**- Activités de recherche en cours 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 exploitée. L'étudiante est en cours de rédaction de sa thèse et de deux articles en anglais, dont le premier doit être soumis courant 2015 au *Journal of Clinical Virology*.

Le CNR-D a participé à un colloque et à des enseignements post-universitaires (F. Le Gal, S. Bricler et E. Gordien) en Tunisie.

#### **- Mauritanie :**

Le CNR-D, le laboratoire de virologie d'Angers (Pr Françoise 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. Un étudiant est encadré au sein du laboratoire pour mener à bien ce projet. Une approche à l'aide de la technologie NGS est en cours de discussion, notamment suite à l'outil logiciel développé au sein du CNR principal sur la recombinaison par le Dr Rodriguez Christophe.

De même, un nouveau génotype HBV/A, provisoirement appelé HBV/Am (m pour Mauritanie) a été aussi individualisé. Une dizaine de souches HBV/Am est disponible. Toutes ces souches sont en cours de caractérisation par séquençage nucléotidique complet du génome.

**- 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* » soumise à *Journal of Clinical Virology* a été acceptée (J Clin Virol 2014 Oct;61(2):279-81.)

- **Projet Deltavir** : La souchothèque du LA-CNR (plasma/sérum, ARN, ADNc) est constituée d'échantillons collectés depuis 2001 de tous les nouveaux patients ayant une charge virale VHD positive. Notre base de données contient essentiellement des données épidémiologiques et virologiques : origine géographique, genre, âge des patients, ainsi que le génotype de toutes les souches. Nous avons décidé, avec l'aide du Pr. Dominique Roulot, hépatologue (unité d'hépatologie de l'hôpital Avicenne), de valoriser cette base de données par une analyse rétrospective des dossiers cliniques des patients infectés par l'HDV suivis en France. L'objectif principal est l'analyse de l'épidémiologie, de l'histoire naturelle, de l'évolution de la maladie, et la détermination des facteurs prédictifs de réponse au traitement. Les objectifs secondaires sont les corrélations virologiques VHB/VHD, et les corrélations clinico-virologiques. Un questionnaire spécifique standardisé a été établi, permettant le recueil des données épidémiologiques, cliniques, virologiques au moment du diagnostic de l'infection VHB/VHD, l'évolution clinique, et la réponse aux éventuels traitements antiviraux entrepris. A partir des biothèques conservées localement ou par le CNR-D, des analyses complémentaires ont été réalisées : génotypage HBV (en cas de charge virale VHB positive), quantification de l'AgHBs au moment du diagnostic. Ce projet a été financé par l'ANRS au titre de l'année 2013.

Au total 1112 patients ont été inclus. Les analyses statistiques ont été réalisées par le Dr Roudot-Thoraval (Département de Santé Publique, CHU Mondor, Créteil). Les premiers résultats concernant cette étude vont être présentés dans deux communications cette année au congrès européen EASL (Vienne, avril 2015) (voir résumés des communications en annexe).

Sur le plan épidémiologique, les caractéristiques déjà décrites par le CNR-D sont retrouvées : 69% des patients sont des hommes, avec un âge moyen à la prise en charge de 37 ans. La grande majorité (86%) est née hors de France, principalement en Afrique subsaharienne (53%) ou en Europe du Sud et de l'Est (19%). 19 % d'entre eux sont co-infectés avec le VIH, et 24% avec le VHC ; 16% ont été toxicomanes par voie veineuse. 46% déclarent une consommation excessive d'alcool, et plus d'un tiers (37%) sont en surpoids. La charge virale VHD médiane est de 165 000 copies/ml ; le génotype HDV-1 est majoritaire (76%), puis on trouve l'HDV-5 (18%), HDV-7 (3%), HDV-6 (2%) et VHD-8 (2%).

Sur le plan clinique, 28% des patients avaient une cirrhose au moment de la prise en charge, 15% avaient présenté un ou plusieurs épisodes de décompensation hépatique, et 2.7% étaient au stade de CHC. Les patients ont été suivis pendant une médiane de 4.4 ans. La moitié a été traitée, mais près de 70% avaient toujours un ARN du VHD positif en fin de suivi. Vingt % ont développé une cirrhose, 10% une décompensation hépatique, et 6.5% un CHC. Une transplantation hépatique a été réalisée pour 14% des malades ; 5% sont décédés. Globalement, pour ces patients VHD, le risque à 10 ans de cirrhose est de 40%, celui de décompensation hépatique est de 31% et celui de CHC est de 15%. Des facteurs associés, en analyse multivariée, à une évolution défavorable ont été identifiés : âge, surpoids, ARN VHD positif en fin de suivi, élévation des transaminases et des  $\gamma$ -GT, diminution des plaquettes et du TP. L'origine des patients pourrait aussi avoir une influence.

La co-infection par le VHD en France, est donc actuellement surtout retrouvée dans la population migrante et est associée à une maladie hépatique sévère, avec des risques de complications très élevés. Un manuscrit est en préparation pour rendre compte de ces premiers résultats. Plusieurs études secondaires pourront être conduites à partir de toutes ces données recueillies.

**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. 2051 séquences partielles (région R0) et 119 séquences complètes sont disponibles et des études phylogénétiques extensives sont en cours. Une proposition de classification du genre Deltavirus en génotypes et sous génotypes sera proposée. De même les implications fondamentales d'une telle variabilité génétique sur la biologie du virus seront abordées. Un manuscrit est en

préparation.

## 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.
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.
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.
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.
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.

Les conférences sur invitations :

**Emmanuel GORDIEN** : Octobre 2014 : “The Delta Network and the quest for a standardized HDV-RT-PCR” ; 3<sup>rd</sup> European Workshop ; Berlin.

Juin 2015 : “Towards standardization of HDV assays. 15<sup>th</sup> International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease

**Ségolène BRICHLER** : Décembre 2014 : “Actualités sur l’hépatite Delta : Monitoring virologique et traitement” : Groupe d’Etudes Moléculaires des Hépatites virales (GEMHEP)

## **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 2015 et 2016***

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

**1. La mise au point d'un kit commercial de quantification de la charge virale plasmatique *Delta*** marqué CE-IVD, capable de quantifier tous les géotypes (2015 - 2016), dans le cadre d'un projet ANRS avec l'AC12 (Pays à ressources limitées). Les discussions ont commencé avec la société Omunis de Montpellier.

La méthode : étudier la faisabilité de l'étude à partir de cohortes de patients existantes HIV bien caractérisées où l'évaluation de la triple infection HIV/HBV/HDV serait réalisée. Ensuite le kit de quantification élaboré parallèlement serait évalué en même temps que le kit CNR-D dans la vraie vie. Un traitement interféron pégylé pourrait être prescrit aux patients. Un projet ANRS de l'AC12 serait déposé en septembre 2015. Les résultats obtenus permettraient alors de déposer l'année suivante un projet « du Sud » de plus grande envergure.

### **2. L'étude de la prévalence de l'infection *Delta* dans plusieurs Pays à ressources limitées.**

Un projet ANRS avec le CNR principal a été déposé en mars 2015 au Sénégal pour l'étude de l'infection HBV et HDV. En plus de l'étude épidémiologique chez des militaires, la caractérisation moléculaire des souches B et Delta la quantification de l'ADN HBV et l'ARN delta seront réalisés. Des demandes ont été formulées par le Burkina Faso, la Côte d'Ivoire, notamment.

### **3. La mise au point d'une technique de quantification des ARN « édités » et « non édités » du virus de l'hépatite Delta (HDV). (2015 – 2016)**

Au cours de l'infection HDV, un ARN messager (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 permettant de quantifier la proportion d'ARN « édités » ou « non édités » dans les échantillons cliniques et étudier l'éventuel intérêt pronostic de cet outil. Les expériences initiales réalisées 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, ne se sont pas avérées concluantes. Elles seront reprises à l'aide du nouvel automate NGS disponible au laboratoire le MySeq® d'Illumina.

Méthode : ce sujet sera le projet dans le cadre d'un stage 2 pour l'année 2015 - 2016. La grande expertise existante au sein du CNR principal sera mise à profit.

**4. Recherche fondamentale (2016 - 2017) :** 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, doit permettre le développement d'une réflexion scientifique sur 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

et aussi au sein du pôle de biologie d'Avicenne. Le développement d'une base de données des séquences HDV permettrait une analyse plus fine des séquences ARN essentielles dans la biologie du virus, notamment le site d'Editing, substrat de l'enzyme humaine ADAR-1 (adénosine dé-aminase associée aux ARN). En effet, l'Editing de l'ARN antigénomique Delta est indispensable pour la synthèse de la grande protéine delta, essentielle pour la morphogenèse et la sécrétion des virions delta.

## Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

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

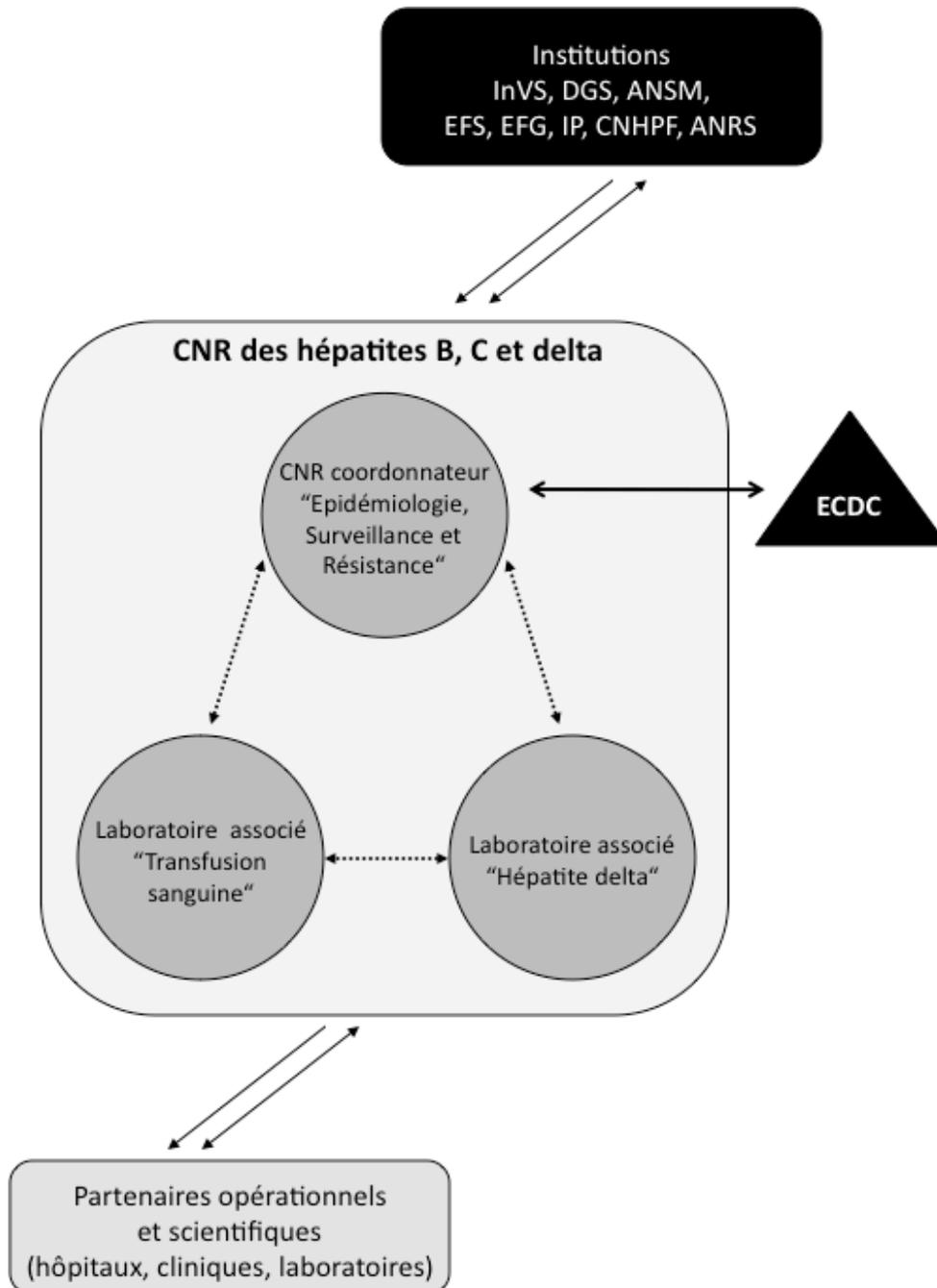
Le CNR des hépatites virales B, C et delta est constitué d'un CNR coordonnateur et de deux laboratoires associés. Son Directeur (responsable scientifique) est le Professeur Jean-Michel PAWLITSKY. Il est assisté du Docteur Stéphane CHEVALIEZ, Directeur Adjoint.

Le CNR coordonnateur est le Laboratoire de Virologie du Département de Virologie, Bactériologie-Hygiène, Mycologie-Parasitologie, Unité Transversale du Traitement des Infections du Groupe Hospitalier Henri Mondor (Chef de Département : Professeur Jean-Michel PAWLITSKY), 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 PAWLITSKY), 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 PAWLITSKY 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) (F DONATI)
- . 1,0 Technicien de laboratoire (APHP) (L POITEAU)
- . 0,10 Cadre de Santé Médico-Technique (F CLERC)

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

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

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

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

Le personnel suivant est affecté au fonctionnement des laboratoires associés :

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

L'unité d'expertise en virologie de l'Institut National de la Transfusion Sanguine (INTS) comprend 13 personnes (Figure 3) :

- . 5 techniciens de laboratoires,
- . 1 aide-laboratoire
- . 1 cadre technique
- . 1 assistant ingénieur
- . 3 chargés de recherche
- . 1 chef de département 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 :

- . 4,9 techniciens,
- . 0,6 chargé de recherche,
- . 0,1 secrétariat
- . 0,5 responsable.

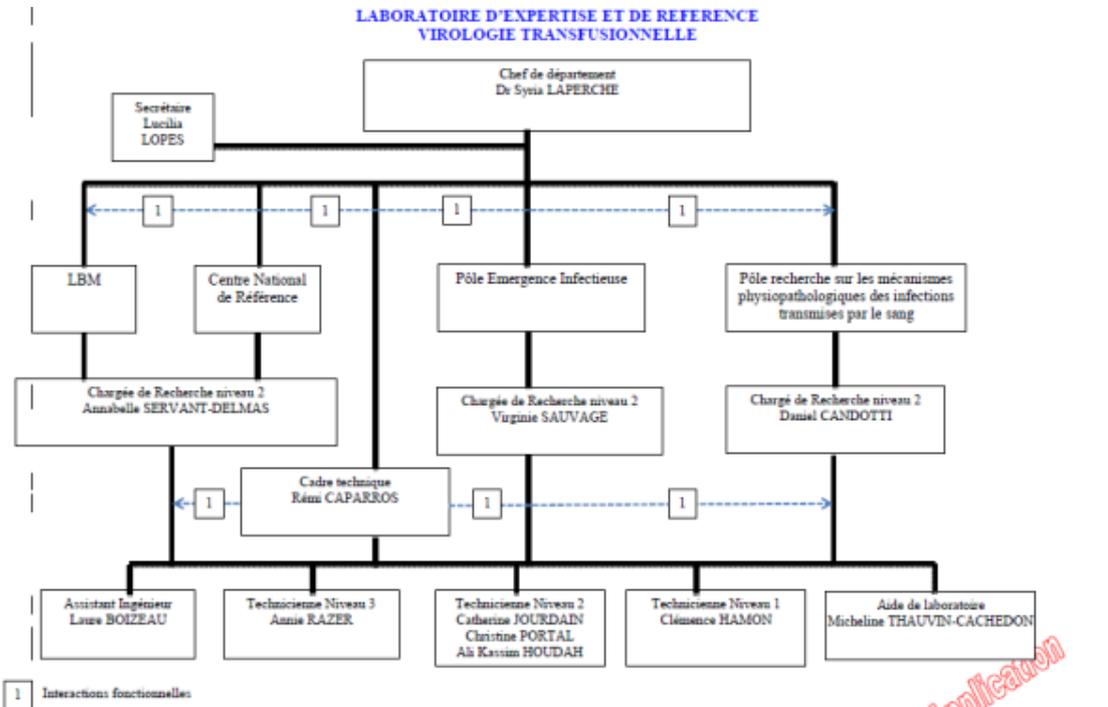


Figure 2 : Organigramme du laboratoire de virologie transfusionnelle

### **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

### **1.3 Locaux et équipements**

#### **CNR coordonnateur**

En ce qui concerne le CNR coordonnateur : Le laboratoire hospitalo-universitaire de Virologie occupe 430 m<sup>2</sup> de laboratoire, 105 m<sup>2</sup> de bureau, 175 m<sup>2</sup> de surface d'accueil, laverie et réserves, bibliothèque (certains locaux sont communs avec le laboratoire de Bactériologie-Hygiène et la plate-forme de séquençage de nouvelle génération) ; 30 m<sup>2</sup> 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<sub>SP</sub>* (Abbott),
- . 2 extracteurs QIASymphony SP/AS (Qiagen),
- . 1 thermocycleur pour PCR "en temps réel" COBAS Taqman 96 (Roche),
- . 1 thermocycleur pour PCR en temps réel *m2000<sub>RT</sub>* (Abbott),
- . 2 thermocycleurs pour PCR en temps réel StepOnePlus (Applied Biosystems),
- . 1 thermocycleur pour PCR en temps réel ABI7300 (Applied Biosystems),
- . 2 Rotor-Gene Q (Qiagen)
- . 1 thermocycleur à gradient (Life Technologies),
- . 1 thermocycleur ABI GENEAMP 9700 (Applied Biosystems),
- . 1 thermocycleur ABI GENEAMP 2700 (Applied Biosystems),
- . 2 thermocycleurs ABI GENEAMP 9600 (Applied Biosystems),
- . 1 thermocycleur UNO II (Biometra).

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

- . 1 automate d'analyse des hybridations inverses AUTOBLOT 3000 (Siemens),
- . 1 Auto-LiPA 48 (Innogenetics)
- . 3 séquenceurs automatiques capillaires ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems), disponibles sur la plate-forme du Centre de Recherche.

#### **- Matériel destiné à la constitution et la conservation des thèques**

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

### **- Equipements pour la plateforme de NGS**

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

En ce qui concerne les laboratoires associés :

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

Quatre 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

4. Une plate-forme de séquençage haut débit (Ion PGM et Ion Proton, Life technologies) coordonnée par Virginie Sauvage

#### **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<sup>ème</sup> étage au sein du service de Bactériologie, Virologie, Hygiène de l'Hôpital Avicenne. Les surfaces de l'ensemble du laboratoire de Virologie sont de 120 m<sup>2</sup> répartis à raison de 60 m<sup>2</sup> propres à

l'unité et 60 m<sup>2</sup> communs de la plate forme de biologie moléculaire du Pôle de Biologie. Décembre 2014 a vu l'ouverture du laboratoire de type L3

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

- . PSM, Etuves à CO<sub>2</sub>, 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 L3
- . Automate de pyroséquençage (Pyromark Qiagen)
- . Séquenceur NGS MySeq Illumina
- . Equipements communs de la plate forme de biologie moléculaire du Pôle Biologie – Produits de Santé Avicenne – Jean Verdier.

#### **1.4 Démarches qualité mise en œuvre au sein du CNR**

Un effort important a été et sera consacré à l'accréditation du laboratoire (obligatoire en 2020). Le processus avait été d'ores-et-déjà engagé dans ce sens pour le CNR coordonnateur avec la visite du COFRAC le 17-18 février 2014 pour l'accréditation des paramètres suivants : anticorps anti-VIH, AgHBs, anticorps anti-VHC et anticorps anti-HTLV. La prochaine visite du COFRAC aura lieu le 19-21 mai 2015 avec l'accréditation des paramètres suivants : sérologies du VHA (IgM anti-VHA, anti-VHA totaux), CMV (IgM et IgG anti-CMV) et EBV (IgG anti-VCA et IgG anti-EBNA).

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<sup>er</sup> 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.

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

1- Contrôle national de la qualité (ANSM)

Le laboratoire de virologie participe au programme national d'évaluation externe de la qualité.

Contrôle National de Qualité de Sérologie Virale une fois par an.

2- Contrôle inter-laboratoire (CTCB)

Le programme porte sur la sérologie VHB et VHC. L'inscription est annuelle pour 3 réalisations des analyses réparties sur l'année.

3- Contrôle inter-laboratoire (QCMD)

Le programme concerne la détermination de la charge virale de l'ARN-VHC et de l'ADN-VHB (La fréquence est de 2 fois par an).

Cette année, nous avons participé à une étude pilote organisée par le QCMD pour l'étude moléculaire de la résistance du VHC vis-à-vis des anti-protéases ainsi que celui dédié à la résistance du VHB.

En ce qui concerne le laboratoire d'Avicenne (CNR delta), Le laboratoire associé au CNR des hépatites B, C et Delta 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 2000 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 BAAZIA, titulaire du diplôme universitaire de qualité de l'université Paris Descartes, est responsable de l'accréditation de l'unité de virologie. Le plan comprend é volets : (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, de la demande forte des laboratoires ; (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<sup>®</sup> (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<sup>®</sup> (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 répllication virale d'un échantillon retrouvé « positif non quantifiable » par notre technique quantitative. Cette technique est une RT-PCR qui consiste à amplifier une région du génome viral (appelée R0) recouvrant la

fin du gène codant la grande protéine jusqu'à la séquence du ribozyme antigénomique (Radjef et al., 2004). Cet examen est inscrit à la nomenclature à la cotation B180 (n°4118). 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). Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles Les génotypes HDV mis en évidence reflètent une répartition géographique très caractéristique. Les génotypes 5, 6, 7 et 8 sont strictement limités à l'Afrique ou aux Pays de migrations africaines. Les génotypes 2 et 4 sont restreints à l'Asie de l'Est et du Sud. Le génotype 4 serait plus spécifique au Japon et en particulier aux îles Miyako. Le génotype 1 est ubiquitaire et est retrouvé partout dans le monde. On distingue cependant des isolats de génotype 1 africain d'une part et des isolats 1 européens et asiatiques. Nous proposons bientôt une classification en subgénotypes à l'instar du virus HBV auxiliaire (E. Gordien, EASL, 2010, conférence monothématique sur l'HDV).

## 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 2000 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 2015.

Pour le CNR en transfusion sanguine, nous disposons pour le VHB d'un panel de référence incluant les 10 principaux sous-types de l'AgHBs 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'AgHBs 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 géotypage, 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). Cependant, s'ils ont été retrouvés positifs, ils doivent être considérés

dans le suivi des patients. Notamment leur persistance, même si l'ARN viral plasmatique est détectable, doit faire continuer le traitement des patients par IFN- $\alpha$ .

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.