

Centre National de Référence des Virus des Hépatites à transmission entérique

<http://www.cnrvha-vhe.org/>

Laboratoire de Virologie
Hôpital Paul Brousse
12 avenue Paul Vaillant-Couturier
94804 Villejuif

Responsable scientifique
Pr Anne Marie Roque-Afonso

Rapport d'activité 2011

SOMMAIRE

1	Introduction.....	3
1.1	Rappel des missions du CNR des virus des hépatites à transmission entérique	3
1.2	Résumé des activités de l'année 2011	4
1.3	Equipe : personnels dévolus dans les activités du CNR	5
1.4	Locaux et équipements	7
2	Activités d'expertise Hépatite A.....	8
2.1	Capacités techniques du CNR pour le VHA	8
2.2	Activités d'expertise VHA de l'année 2011	11
3	Activités de surveillance VHA.....	14
3.1	Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	14
3.2	Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux.....	16
3.3	Contribution aux réseaux de surveillance internationaux.....	18
4	Alerte VHA.....	19
5	Activités d'expertise Hépatite E	20
5.1	Capacités techniques du CNR.....	20
5.2	Activités d'expertise VHE de l'année 2011	23
6	Activités de surveillance VHE	24
6.1	Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	24
6.2	Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux.....	28
7	Alerte VHE	30
8	Activités d'information, de formation et de conseil	30
8.1	Enseignements	30
8.2	Modalités de diffusion des données du CNR	31
8.3	Expertise auprès des autorités de santé	31
9	Travaux de recherche en lien direct avec l'activité du CNR.....	32
10	Liste des publications et communications	33
11	Programme d'activité 2012 et 2013.....	36

1 Introduction

1.1 Rappel des missions du CNR des virus des hépatites à transmission entérique

Le CNR des hépatites A et E (VHA et VHE) a des missions d'expertise microbiologique, de surveillance épidémiologique en lien avec l'INVS et d'alerte.

Dans sa mission d'expertise virologique, le CNR évalue des tests commercialisés et développe des tests sérologiques et moléculaires pour le diagnostic et la confirmation des infections et le typage moléculaire des souches ; Il étudie les souches responsables d'hépatites fulminantes et, pour le VHE, d'hépatites chroniques.

Dans sa mission de surveillance, le CNR contribue à l'investigation d'épidémies par la caractérisation de la souche épidémique et contribue à la recherche de la source, participe aux réseaux de surveillance internationaux. Concernant le VHE, il participe à l'évaluation du risque zoonotique, en liaison avec les agences de santé animale et environnementale.

Dans sa mission d'alerte, le CNR signale à l'INVS les phénomènes inhabituels : cas groupés, modification des formes cliniques, apparition de nouvelles souches.

Depuis 2002 et jusqu'en 2010, le laboratoire de Virologie de l'hôpital Paul Brousse à Villejuif (sous la responsabilité du Pr Elisabeth DUSSAIX) avait en charge le virus de l'hépatite A et celui du Val de Grâce à Paris (sous la responsabilité du Dr Elisabeth NICAND) avait en charge le virus de l'hépatite E. Suite aux restructurations survenues dans les hôpitaux militaires, les deux activités ont été prises en charge à Paul Brousse, le transfert de technologie ayant été initié à partir de 2006. Au départ en retraite du Pr Dussaix en août 2011, la direction du CNR a été reprise par le Pr Roque-Afonso. En Janvier 2012, le CNR des virus des hépatites à transmission entérique a été renouvelé sous la direction du Pr Roque-Afonso, avec comme laboratoire associé pour le VHE celui de l'hôpital Purpan à Toulouse, dirigé par le Pr Izopet.

Pour remplir ses missions, le CNR a mis en place un réseau de laboratoires publics et privés, qui adressent des échantillons pour diagnostic ou expertise.

1.2 Résumé des activités de l'année 2011

1.2.1 Hépatite A

L'année 2011 a été marquée par une baisse des échantillons adressés au CNR au titre de l'observatoire des souches, probablement en lien avec la baisse de l'incidence des déclarations obligatoires (1.6/100 000 en 2011 vs 1.97/100 000 en 2010). En revanche, l'activité d'expertise diagnostique reste importante et représente maintenant 40% de l'activité.

Depuis 2008, les infections sont très majoritairement dues au génotype IA (80%) et plus précisément à deux souches qui se sont implantées sur notre territoire et persistent en sein de réseaux de diffusion, souches dites « autochtones ». L'une de ces deux souches, associée à la précarité, a été responsable en 2011 de plus de 40 % des cas d'hépatite A et de la plupart des cas groupés investigués par le CNR.

1.2.2 Hépatite E

Le nombre d'échantillons adressés au CNR pour diagnostic a très régulièrement augmenté depuis sa création et de +30% par rapport à 2010. L'hépatite E doit maintenant être évoquée en 1^{ère} intention, au même titre que les hépatites A et B, devant toute hépatite aiguë.

En 2011, 266 infections aiguës ont été diagnostiquées ; elles ont été considérées autochtones dans plus de 90% des cas. Une hépatite fulminante a bénéficié d'une transplantation hépatique avec des suites favorables.

Devant une cytolysse, même minime, chez un immunodéprimé l'hypothèse d'une hépatite E chronique est maintenant rapidement évoquée : 29 nouvelles infections chroniques ont été diagnostiquées en 2011, essentiellement chez des transplantés d'organe (transplantation rénale, en particulier).

L'hépatite E doit également être écartée avant de conclure à une cytolysse hépatique d'origine médicamenteuse, plusieurs infections ont été diagnostiquées dans ce contexte.

Le mode de contamination reste hypothétique dans beaucoup de cas. Mais nous avons pu montrer cette année une stricte homologie de séquence entre la souche infectant un patient et celle retrouvée dans un figatellu conservé. Nous avons également démontré une contamination transfusionnelle. Et enfin, nous avons isolé chez un patient une souche proche des souches retrouvées chez les lapins en Chine et aux Etats-Unis: ce réservoir potentiel mérite d'être étudié en France et en Europe.

A ce jour, les infections autochtones sont essentiellement associées à des virus de génotype 3 ; en 2011, nous avons vu l'émergence du génotype 4, représentant 3% des souches isolées.

1.3 Equipe : personnels dévolus dans les activités du CNR

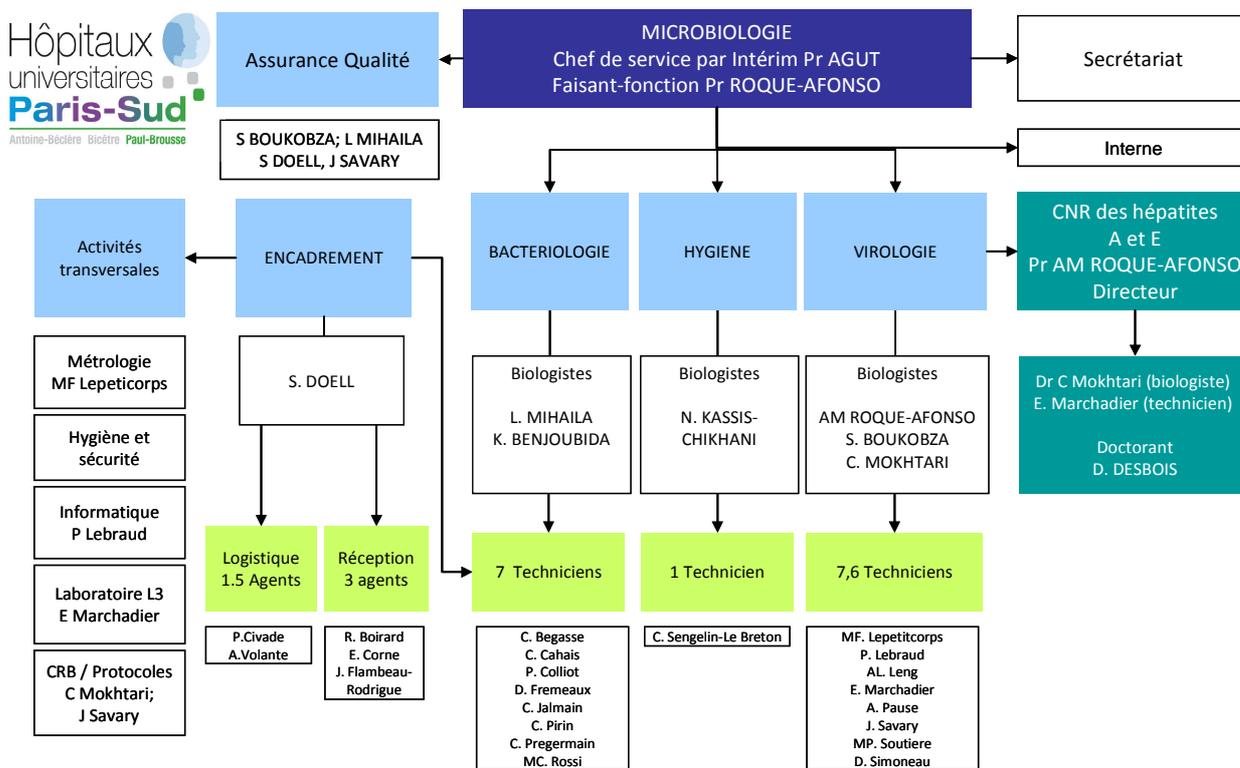
En 2011, les personnels dédiés à ces activités étaient rémunérés par l'assistance publique des hôpitaux de Paris (AP-HP) et par l'université Paris-Sud, pour les personnels hospitalo-universitaires :

- Pr Elisabeth Dussaix PU-PH, (0.1 ETP), chef de service et directeur du CNR jusqu'en août 2011, remplacée par le Pr Anne Marie Roque-Afonso, PU-PH (0,2 ETP), directeur du CNR et faisant fonction de chef de service au laboratoire de virologie de l'hôpital Paul Brousse depuis septembre 2011
- Delphine Desbois, AHU (0,1 ETP), jusqu'en août 2011 ; remplacée par Camélia Mokhtari, Praticien attaché (0.1 ETP), depuis septembre 2011.

Delphine Desbois poursuit sa thèse de 3^{ème} cycle (3^{ème} année), mais n'est plus rémunérée par l'APHP, ni par l'université

- un technicien (1 ETP)
- Françoise Le-Glaunec, remplacée en octobre 2011 par Sabine Doell, cadre de santé (0.1 ETP)

Le CNR est intégré au Laboratoire de microbiologie de Paul Brousse, dont l'organigramme fin 2011 était le suivant :



La démarche qualité du CNR s'inscrit dans celle du service de Microbiologie dans lequel le système qualité mis en place est en adéquation avec les exigences du GBEA, (Arrêté du 26 Novembre 1999 paru au Journal Officiel du 11 Décembre 1999).

Depuis juin 2011, le service de Microbiologie est intégré au pôle hospitalier Biologie-Pathologie-Pharmacie, qui regroupe l'ensemble des laboratoires du groupe hospitalier des hôpitaux universitaires Paris-Sud (HUPS). La démarche d'accréditation selon la norme NF-EN ISO 15189 sera initiée officiellement auprès du COFRAC en octobre 2012.

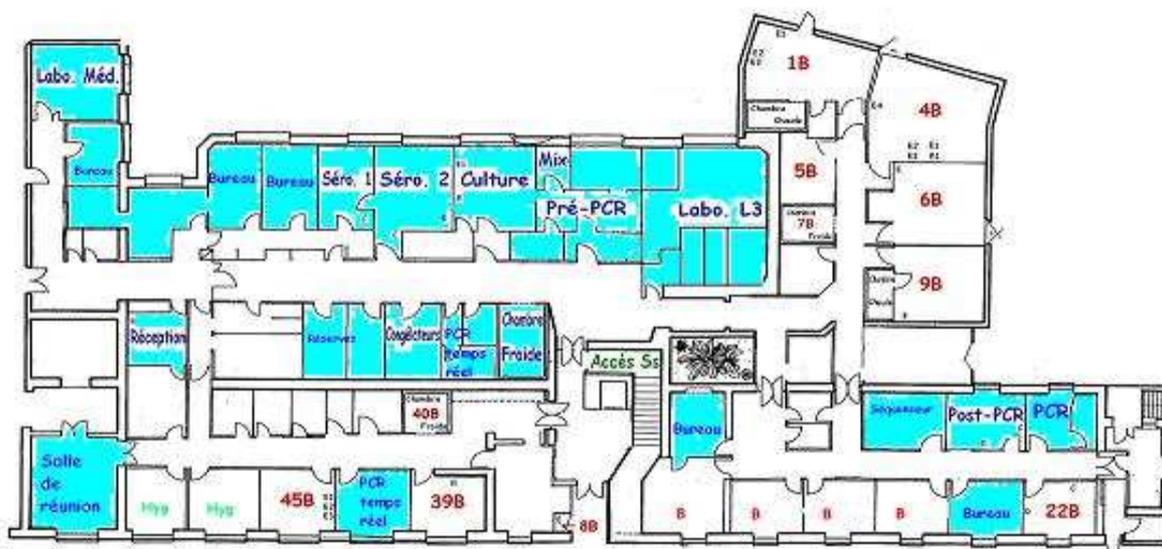
Depuis février 2011, le laboratoire de virologie a mis en place les procédures pour intégrer le Centre de Ressources Biologiques (CRB) Paris-Sud, certifié selon le référentiel AFNOR NF S 96-900. Son intégration sera effective en juin 2012.

Le service participe aux contrôles de qualité organisés régulièrement par l'AFSSAPS, l'ANRS et le GEMHEP (Groupe d'Etude Moléculaire des Hépatites). En 2011, le CNR a participé à un contrôle de qualité sur le VHE sous l'égide du Paul Ehrlich Institut. L'ensemble des appareils thermiques (étuves, congélateurs, frigidaires) est relié à un système d'alarme centralisé avec report à la loge de l'hôpital pour la nuit, les week-ends et les jours fériés. Une technicienne formée en métrologie a en charge la surveillance de toutes les alarmes du service et le contrôle des pipettes.

L'ensemble des modes opératoires et des procédures utilisés par le CNR répond aux mêmes exigences de qualité, ainsi que la gestion des réactifs, la gestion documentaire et le matériel.

1.4 Locaux et équipements

Le Service de Microbiologie de l'hôpital Paul Brousse occupe une surface d'environ 1200m² et comporte actuellement trois unités fonctionnelles : Bactériologie, Hygiène et Virologie. L'unité de Virologie comporte actuellement 3 pièces dédiées à la sérologie, un laboratoire de culture cellulaire, 7 pièces dédiées à la biologie moléculaire (pièces de pré et post PCR, amplification, séquençage, clonage) et un laboratoire de haute sécurité type L3 équipé d'une ultracentrifugeuse. Le service possède deux chambres froides, une laverie et de nombreuses réserves. Au sous-sol du service, une salle climatisée accueille de nombreux congélateurs.



Service de Microbiologie de l'hôpital Paul Brousse ; en bleu = virologie, en rouge = bactériologie, en vert = hygiène

Les principaux équipements du laboratoire sont les suivants :

- 1 automate de Sérologie : ETiMax (DiaSorin)
- Automates d'extraction des acides nucléiques : Ampliprep (Roche Diagnostics), M2000sp (Abbott diagnostics)
- 5 Automates de PCR en temps réel : 3 automates « fermés », Cobas Taqman (Roche Diagnostics) et M2000rt, (Abbott diagnostics), et 2 automates « ouverts », Light Cycler I (Roche Diagnostics) et ABI 7500 (Applied Biosystems).
- 8 thermocyclers (Applied Biosystems)
- Accès mutualisé à un séquenceur 16 capillaires ABI 3130 (Applied Biosystems)
- 2 ultra-centrifugeuses
- 7 Postes de Sécurité Microbiologique
- 1 microscope à fluorescence
- de nombreux congélateurs à -80°C et -20°C reliés comme les réfrigérateurs et les étuves à un système de surveillance centralisé au niveau du PC sécurité de l'hôpital.

2 Activités d'expertise Hépatite A

2.1 Capacités techniques du CNR pour le VHA

2.1.1 Liste des techniques de référence pour le VHA

Tests Sérologiques

- Test ELISA de détection et quantification des anticorps totaux (ETI-AB-HAVK PLUS, Diasorin) et de détection des anticorps IgM (ETI-HA-IgMK PLUS, DiaSorin et Vidas HAV IgM, BioMérieux)
- Test ELISA permettant l'étude de l'avidité des IgG (Desbois, J Clin Microbiol 2004).

Ces différents tests sont réalisés sur des échantillons de sérum, de plasma ou de salive.

Détection et quantification du génome viral

- RT-PCR de la **région 5' non codante**. Sa sensibilité déterminée à partir du standard international du NIBSC (working reagent) est de 200 copies/ml.
- RT-PCR de la **région VP1-2A** (500 nucléotides) permettant le génotypage des souches (sensibilité de 10 copies/ml).
- RT-PCR de la totalité de la région **VP1**, développée initialement dans le cadre du réseau européen Event pour une comparaison des différents isolats européens.
- RT-PCR en **temps réel ciblant la région 5'NC** et utilisant la trousse SuperScript™ III platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen). Des dilutions de la souche HM175-18f, adaptée à la culture, sont utilisées comme gamme externe de quantification. Cette gamme est étalonnée grâce au standard NIBSC titré à 2000 copies/ml. Le seuil de sensibilité de cette technique est de 125 copies /ml.

Génotypage des souches

Il est réalisé en 1^{ère} intention par séquençage de la région VP1/2A ou de la région N-terminale de VP1 par une analyse phylogénétique incluant des souches annotées prélevées dans GenBank ou issues de la collection du CNR.

Techniques de culture cellulaire

Nous disposons des lignées fibroblastiques FRh-K4 et hépatocytaires Huh7 et de la souche HM175-18f de génotype IB, produisant un effet cytopathogène et permettant d'obtenir en 10 jours des surnageants titrant 10⁶ pfu/ml sur lignée FRh-K4.

Nous avons cultivé avec succès sur ces systèmes des souches cliniques de génotype IIA, IIIA et IA. Les titres obtenus et les quantités de surnageants disponibles sont suffisants pour envisager de les utiliser pour des contrôles de qualité.

Recueil des échantillons sériques sur papier buvard.

Cette technique permet l'envoi à moindre coût des échantillons sériques au CNR pour analyse sérologique ou moléculaire sans faire appel à des transporteurs (Desbois, J Clin Microbiol 2009).

Techniques développées en 2011

- Séquençage du génome complet sur le principe de la marche en avant

Cette technique nous a permis d'étudier l'évolution d'une souche de génotype IIA en culture cellulaire, montrant une grande stabilité de la souche sur 4 mois de culture (travail du doctorant, D Desbois).

- Analyse de l'évolution de la quasiespèce VHA en culture cellulaire par clonage et séquençage des variants

Complémentaire du séquençage du génome complet, cette technique a permis d'évaluer le taux d'erreur de l'ARN polymérase virale, similaire à celui d'autres virus à ARN ; toutefois aucune évolution de la séquence majoritaire n'était notée. Des contraintes fortes de structure s'appliquent sur le VHA en aval de la réplication, expliquant la grande stabilité génétique des souches issues d'une zone géographique donnée et suggérant que la recombinaison pourrait être un autre moyen de diversification virale (Travail du M2, M William)

2.1.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

- Base de données sur le logiciel Bionumerics : séquences génotypées et annotées sur l'origine géographique et certains facteurs de risque (gens du voyage, homosexuels masculins, ...)

2.1.3 Collections

Description

- Collection clinique de plus de 600 sérums ou selles contenant de l'ARN VHA dont la souche a été typée (IA, IB, IIA et IIIA).
- Souche de référence HM175-18f, aliquotée à 10^6 pfu/ml.
- Surnageants de cultures de souches cliniques.

Conditions de stockage

Les échantillons sont conservés à -80°C dans des congélateurs reliés à un système de surveillance centralisé des températures. L'emplacement des échantillons est géré par le système informatique du laboratoire.

Une convention de stockage devra être signée entre l'INVS et le CRB Paris-Sud. Le Laboratoire de Virologie de Paul Brousse héberge en effet un CRB « liquides » associé au CRB Paris-Sud, initialement centré sur les tissus et cellules.

Conditions de mise à disposition

La mise à disposition des sérums se fait sur présentation d'un projet de recherche en collaboration avec le CNR, selon les règles du CRB.

2.1.4 Liste des techniques recommandées par le CNR

Listes existantes

Le diagnostic de l'infection aiguë repose sur la détection des IgM VHA par des techniques marquées CE. La valeur prédictive positive de ce marqueur est faible en l'absence de cytolysse et en dehors d'un contexte aigu. Il est alors recommandé de confirmer/infirmier cette infection par une recherche de l'ARN viral et la mesure de l'avidité des IgG VHA.

Devant une symptomatologie aiguë, une forte probabilité d'infection VHA et la négativité des IgM, ce test doit être répété 24 ou 48 h plus tard.

Le diagnostic d'une infection ancienne ou d'une réponse vaccinale repose sur la détection des anticorps totaux ou IgG anti-VHA par des techniques marquées CE. Ces techniques doivent préciser leur seuil de positivité. On estime qu'un titre d'anticorps > 20mUI/ml est protecteur.

Pour contribuer à l'observatoire des souches, les laboratoires sont invités à adresser au CNR les sérums présentant des IgM VHA positives.

Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses

- Evaluation des trousses de RT-PCR temps réel hepatitisA@ceeramTools™.health V2 et RealStar® HAV RT-PCR Kit 1.0.

La sensibilité clinique a été évaluée par la quantification de 38 échantillons (28 de génotype IA, 2 de génotype IB, 3 de génotype IIA et 5 de génotype IIIA) détectable par RT-PCR conventionnelle (sensibilité 10 copies/ml)

La technique Altona a détecté 100% des échantillons, la technique Ceeram 36/38 (95%) et la technique CNR 37/38 (92%).

L'étude de sensibilité doit se poursuivre par l'étude de dilutions de surnageants de culture de la souche HM175-18f et de souches cliniques.

2.2 Activités d'expertise VHA de l'année 2011

2.2.1 Prélèvements réceptionnés, provenance

L'activité VHA du CNR a régulièrement augmenté depuis sa création en 2002. La mise en place de la déclaration obligatoire en 2006 a conduit les laboratoires qu'ils soient privés ou publics, sollicités par les CIRE ou les ARS, à nous adresser des échantillons de sérums dans le cadre de l'investigation des cas groupés. Cette démarche a contribué à faire connaître le CNR et à renforcer le réseau des biologistes qui n'hésitent plus à faire appel au CNR pour résoudre leurs problèmes diagnostiques et à alimenter l'observatoire.

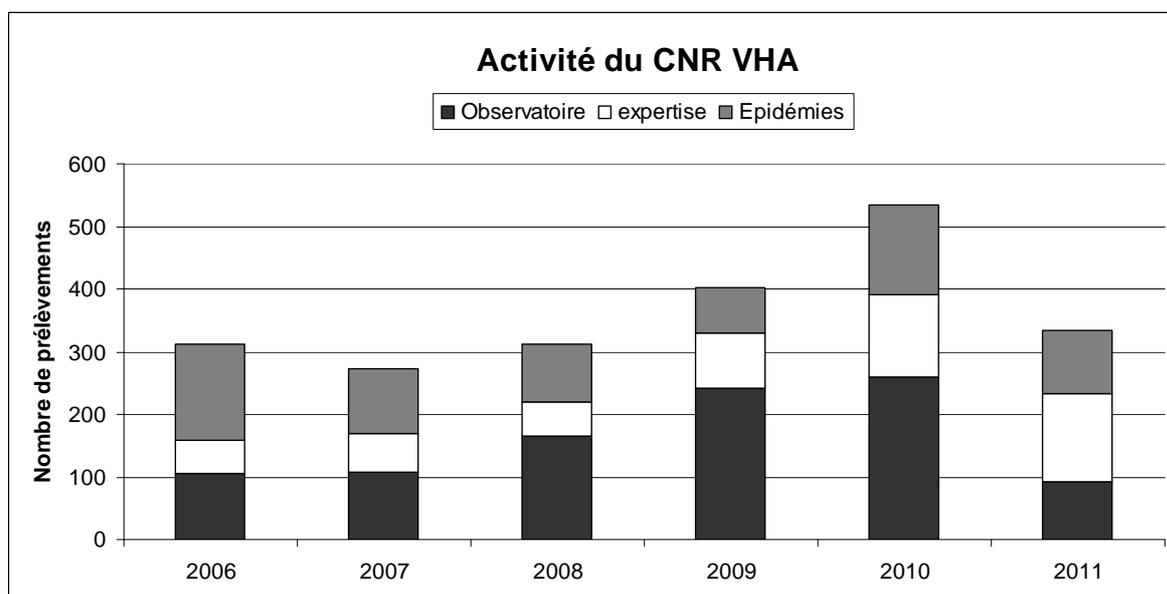
En 2011, 334 échantillons ont été reçus

- 93 (28%) au titre de l'observatoire des souches
- 100 (30%) dans le cadre d'investigations de cas groupés.
- 141 (42%) pour expertise diagnostique dont 59 (17%) pour diagnostic moléculaire chez des sujets immunodéprimés en l'absence de positivité des IgM et 82 (25%) pour résolution de problèmes diagnostiques (positivité des IgM avec faible probabilité épidémiologique d'hépatite A).

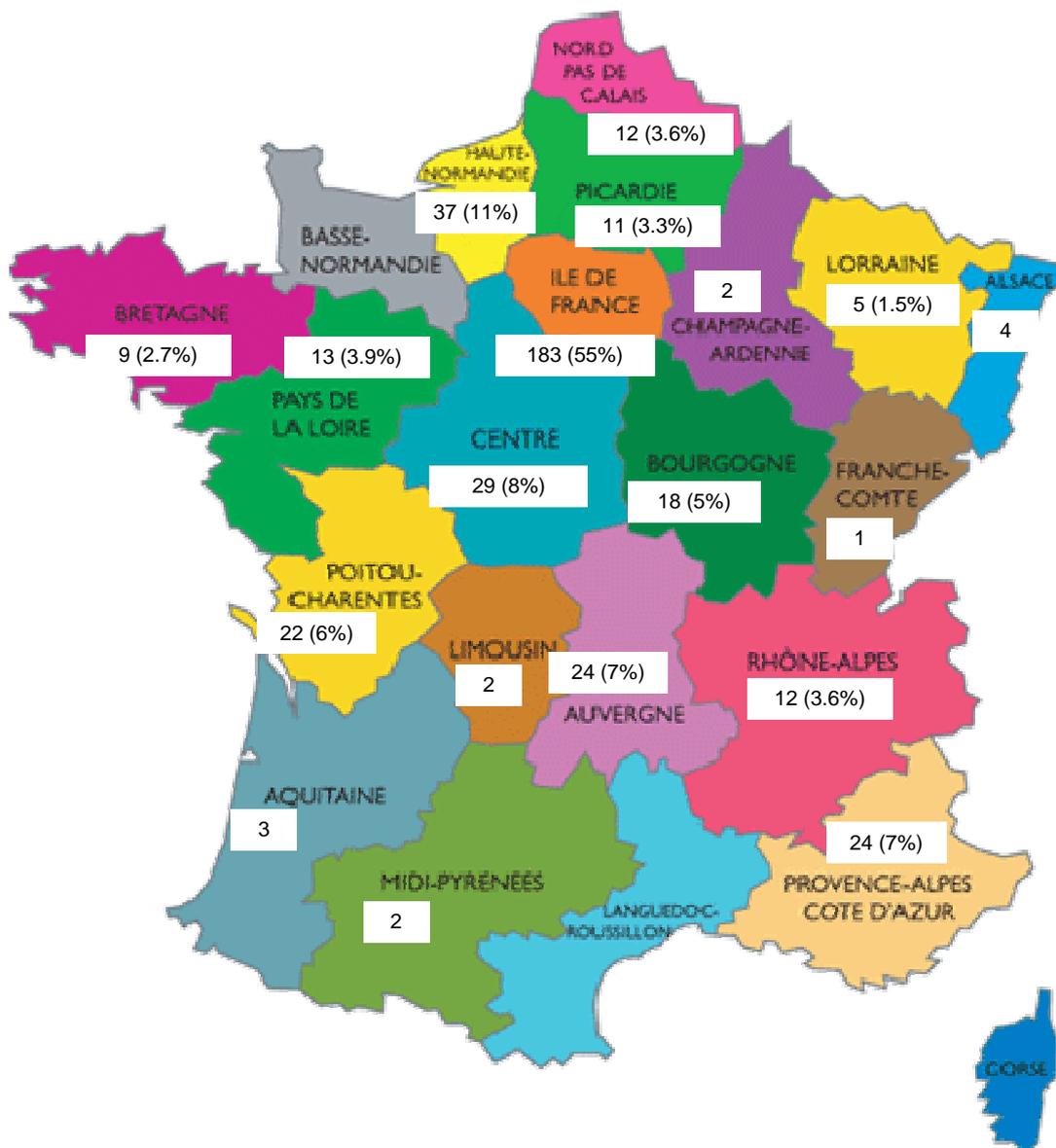
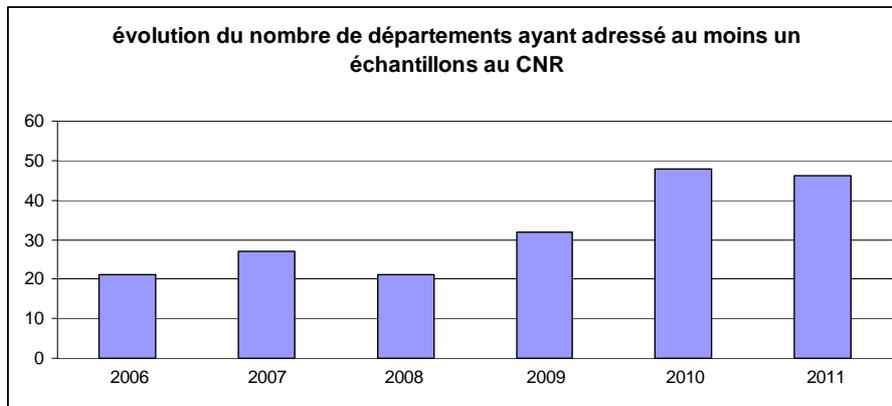
Le type d'échantillon reçu est très majoritairement du sérum (95.5%) puis des selles ; 63% des échantillons ont été prélevés chez des sujets de sexe masculin.

La nouveauté 2011 est cette demande de recherche d'ARN viral chez l'immunodéprimé, pour éliminer formellement une hépatite A. Cette demande est survenue suite à la publication d'un cas d'hépatite fulminante chez une patiente recevant du rituximab (anticorps monoclonal anti-CD20) qui a eu un retard à la production d'IgM (Chakvetadze et al., Ann Intern Med, 2011)

On peut également noter la baisse du nombre de souches adressées dans le cadre de l'observatoire, qui reflète la baisse du nombre de déclarations obligatoires en 2011 (incidence des cas déclarés 1.6/100 000 en 2011 vs 1.97/100 000 en 2010).



Entre 2006 et 2010, les laboratoires d'Ile de France ont contribué pour plus d'un tiers (37%) à l'envoi d'échantillons au titre d'expertise et d'observatoire. Cette proportion est passée à 55% en 2011. Toutefois malgré la baisse du nombre d'échantillons adressés, le nombre de départements faisant appel au CNR (46 en 2011) n'a que peu diminué.



Nombre et % d'échantillons adressés par les différentes régions en 2011

2.2.2 Analyses réalisées

La recherche du génome VHA a été réalisée sur l'ensemble des 334 échantillons réceptionnés.

L'ARN viral était détectable dans 178 échantillons (53.3%).

- L'ensemble des échantillons présentant un ARN viral détectable a été séquencé pour génotypage
 - o génotype IA : 140 souches (79%) ; génotype IB : 32 souches (18%) ; génotype IIIA : 5 souches (3%)
- L'avidité des IgG VHA a été réalisée sur 41 de ces échantillons présentant un ARN détectable
 - o Des avidités entre 10 et 66% ont été retrouvées (moyenne et médiane 42%), correspondant à des infections récentes.

L'ARN viral était indétectable dans 156 échantillons

- Dans l'ensemble des 59 échantillons adressés pour diagnostic moléculaire chez des immunodéprimés : dans ce contexte, aucun autre examen n'a été réalisé
- Dans 79/82 échantillons adressés pour expertise diagnostique. Ils présentaient, dans le laboratoire d'origine, des IgM VHA positives ou douteuses. Dans ce contexte, la positivité des IgM VHA a été contrôlée par la technique Vidas-Biomérieux disponible au laboratoire et l'avidité des IgG VHA a été mesurée.

Les IgM VHA ont été contrôlées négatives dans 26/79 (33%) échantillons.

- o Dans 2 cas, les IgG VHA étaient également négatives, sur des échantillons douteux en IgM par la technique Architect Abbott chez des patients à transaminases normales : faux positifs
- o Dans 3 cas, l'avidité des IgG VHA a été retrouvée à 33, 43 et 52% (compatibles avec des infections récentes) chez 3 patients ayant été vaccinés un mois auparavant et qui présentaient des IgM VHA positives ou douteuses en technique Architect Abbott : IgM d'origine vaccinale possible
- o Dans les 21 autres cas, l'avidité des IgG VHA se situait entre 63 et 100%, indiquant une infection ancienne : IgM d'activation polyclonale possible

Les transaminases étaient disponibles pour 17 de ces 26 échantillons et étaient normales dans seulement 4 cas (23%).

Les IgM VHA ont été contrôlées positives dans 51 échantillons sériques (64.5%)

Elles n'ont pu être vérifiées sur 2 échantillons de selles.

Dans les 51 sérums, l'avidité des IgG se situait entre 67 et 100% (moyenne 90%, médiane 92%), indiquant une infection ancienne : positivité des IgM liée à une activation polyclonale du système immunitaire.

Les transaminases étaient disponibles pour 44 échantillons et normales dans 18 cas (41%).

L'âge moyen des sujets avec un ARN indétectable était 57+/-17 ans vs 24+/-17 pour les sujets avec ARN détectable ($p < 0.0001$).

La détection d'IgM par les laboratoires d'origine en l'absence d'ARN viral détectable peut correspondre à des faux positifs, à la détection d'IgM vaccinales ou à la détection d'IgM d'activation polyclonale. Ces résultats confirment que **la positivité des IgM VHA, même associée à une cytololyse hépatique, n'indique pas forcément une infection en cours par le VHA.**

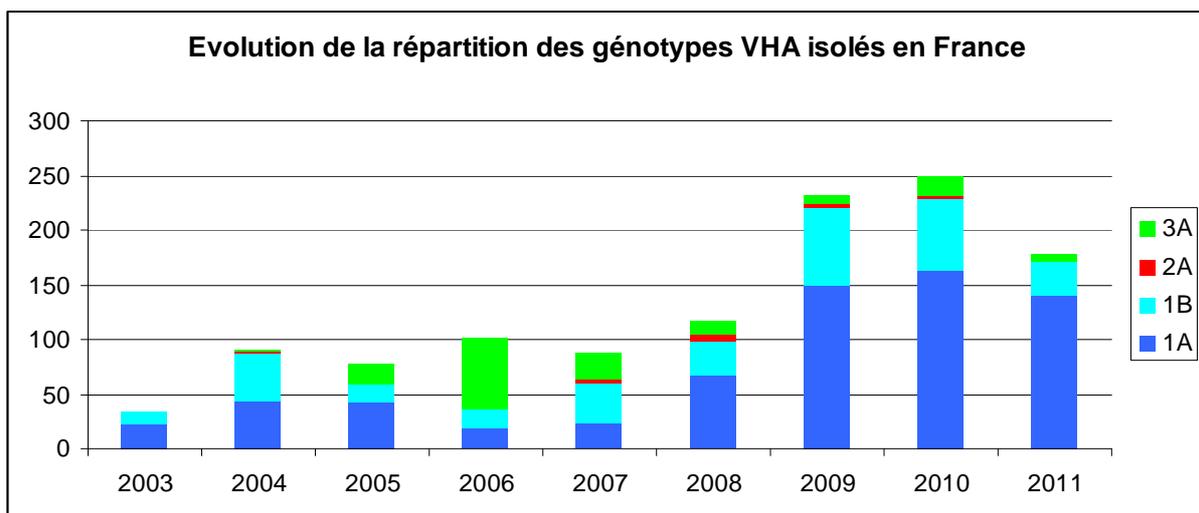
3 Activités de surveillance VHA

3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.1.1 Définition de l'échantillon de souches isolées

Comme chaque année, la prédominance masculine est importante parmi les échantillons présentant un ARN viral détectable (64%).

Depuis 2008 le génotype IA est à nouveau majoritaire en France et est retrouvé dans près de 80% des cas en 2011.



Parmi les patients infectés par le sous-type IA, une minorité a été contaminée lors d'un voyage en zone d'endémie et 65% ont été infectés en métropole par l'une des deux souches devenues endémiques en France:

- La souche FR2008-HA33-15 (GenBank GQ506662), identifiée en 2008 dans la communauté homosexuelle masculine, a diffusé dans la population générale. Elle a représenté 13% des cas infectés par un sous-type IA en 2011. Il s'agit essentiellement d'hommes (83%), d'âge moyen 33+/-10 ans. Sa prévalence est en baisse.
- La souche FR2009-HA44-2 (GenBank GQ506663), déjà présente en 2008 sur le territoire, a été responsable de cas groupés dans la communauté des gens du voyage depuis 2009, mais a également diffusé dans la population générale. Elle a représenté 52% des souches de sous-type IA et 41% de l'ensemble des souches en 2011. La prédominance masculine est moins marquée (60%). Elle est isolée chez des enfants ou de jeunes adultes d'âge moyen 18+/-17 ans.

Le sous-type IB est retrouvé dans 18% des cas. Là encore, la notion de voyage en zone d'endémie n'est rapportée que dans 43% des cas (Afrique, Europe de l'Est). La souche importée de Turquie et responsable de cas groupés associés à la consommation de tomates séchées en 2009-2010, n'a pas été retrouvée en 2011.

Le génotype IIIA n'est retrouvé que dans 3% des cas et est associé dans 80% des cas à un voyage en zone d'endémie (Inde, Comores)

Aucune souche de génotype IIA n'a été isolée en 2011.

3.1.2 Réseau de partenaires

INVS

Il existe des contacts permanents entre l'InVS (Dr COUTURIER) et le CNR. L'InVS signale systématiquement au CNR VHA tous les cas groupés d'hépatite A et met en contact les laboratoires de ville ou de CHU/CHR concernés avec le CNR. Un retour d'information (nombre de prélèvements reçus, résultats) est effectué systématiquement à l'InVS.

ANSES

Le CNR VHA collabore avec Sylvie Pérelle (ANSES, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Maisons-Alfort) pour tout ce qui touche le VHA dans les produits alimentaires. Des échanges de souches et de techniques ont eu lieu à plusieurs reprises. Un projet commun de sous-typage des souches environnementales par RT-PCR en temps réel est en cours, ainsi qu'un projet visant à analyser les déterminants de fixation des virus des hépatites aux cellules polarisées entériques.

IFREMER

Des collaborations étroites existent également avec Soizick Le Guyader avec laquelle nous échangeons régulièrement nos informations concernant d'éventuelles contaminations de parcs à huîtres ou autres coquillages et nos procédures techniques.

Réseau de biologistes

La déclaration obligatoire des cas d'hépatite A amène les laboratoires qu'ils soient privés ou publics, sollicités l'ARS, à adresser des échantillons de sérums au CNR dans le cadre de l'investigation des cas groupés. Cette démarche contribue à faire connaître le CNR et à renforcer le réseau des biologistes qui n'hésitent plus à faire appel au CNR pour résoudre leurs problèmes diagnostiques et à alimenter l'observatoire.

3.2 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

En 2011, 100 échantillons nous ont été adressés pour l'investigation de 7 épisodes de cas groupés survenus fin 2010 et en 2011. Dans la plupart de ces cas groupés, la souche autochtone GQ506663 diffusant dans la communauté des gens du voyage était retrouvée. Aucune épidémie d'origine alimentaire suspectée n'a été signalée en 2011. Un résumé de l'analyse de quelques épisodes est présenté ci-dessous.

Cas groupés en Bretagne (2010)

Au cours de l'année 2010, et début 2011 le CNR VHA a reçu des sérums de patients présentant des IgM VHA positives dans les départements des Côtes d'Armor, du Morbihan, d'Ille et Vilaine et du Finistère. Le CNR a réalisé l'épidémiologie moléculaire des souches virales. 39 sérums avec des dates de prélèvement allant du 3/12/2009 au 03/01/2011 ont été inclus dans l'analyse.

Des virus de génotype IA étaient retrouvés chez 32/39 sérums analysés, avec deux souches différentes. Une première souche infectait 7 patients de Brest et 1 de St Brieuc, dont l'appartenance à la communauté homosexuelle masculine était précisée. Cette souche est différente de la souche GQ506662, identifiée jusque-là dans cette communauté. Chez les 24 autres patients, la souche autochtone GQ506663 (gens du voyage) est identifiée, aussi bien chez des enfants que chez des jeunes adultes, dans les quatre départements.

Chez 7/39 patients, l'analyse phylogénétique a retrouvé des souches importées : Une souche de génotype IIA chez un patient de retour du Burkina Faso, une souche de génotype IIIA, chez un patient de retour du Népal, des souches de génotype IB chez 5 patients.

En 2010, les hépatites A diagnostiquées en Bretagne et analysées au CNR étaient majoritairement dues à la souche autochtone de génotype IA GQ506663. Cette situation Bretonne était différente de la France dans son ensemble où cette souche représente seulement 25% des souches analysées par le CNR en 2010. Par ailleurs, une nouvelle souche de génotype IA pourrait avoir émergé dans la communauté homosexuelle masculine.

Cas groupés en Basse Normandie (Rouen)

Deux épisodes de cas groupés sont survenus en 2011, l'un en février/mars, l'autre en septembre/octobre. Le CNR a inclus pour l'analyse 9 échantillons du 1^{er} cas groupé, 9 échantillons du 2^{ème} cas groupé et 4 cas «sporadiques» issus de la même région, identifiés en 2011. L'ARN viral était détectable dans 21/22 échantillons.

L'analyse phylogénétique a identifié la souche autochtone de génotype IA GQ506663 (gens du voyage) lors du 1^{er} épisode et également chez 6/9 cas du 2^{ème} épisode. Le facteur de risque « gens du voyage » a été signalé au CNR dans 5 des 9 cas du 2^{ème} épisode. Lors du 2nd épisode 2 patients sont infectés par des souches de génotype IA distinctes de la souche autochtone et probablement importées. Parmi les 4 cas sporadiques, aucun n'est porteur de la souche autochtone, 3 sont infectés par des souches de génotype IB et 2 rapportent des voyages hors métropole.

Les cas groupés de Rouen étaient majoritairement liés à l'infection par la souche autochtone diffusant en France dans la communauté des gens du voyage, mais des souches importées ont également été mises en évidence, suggérant des réseaux de diffusion différents.

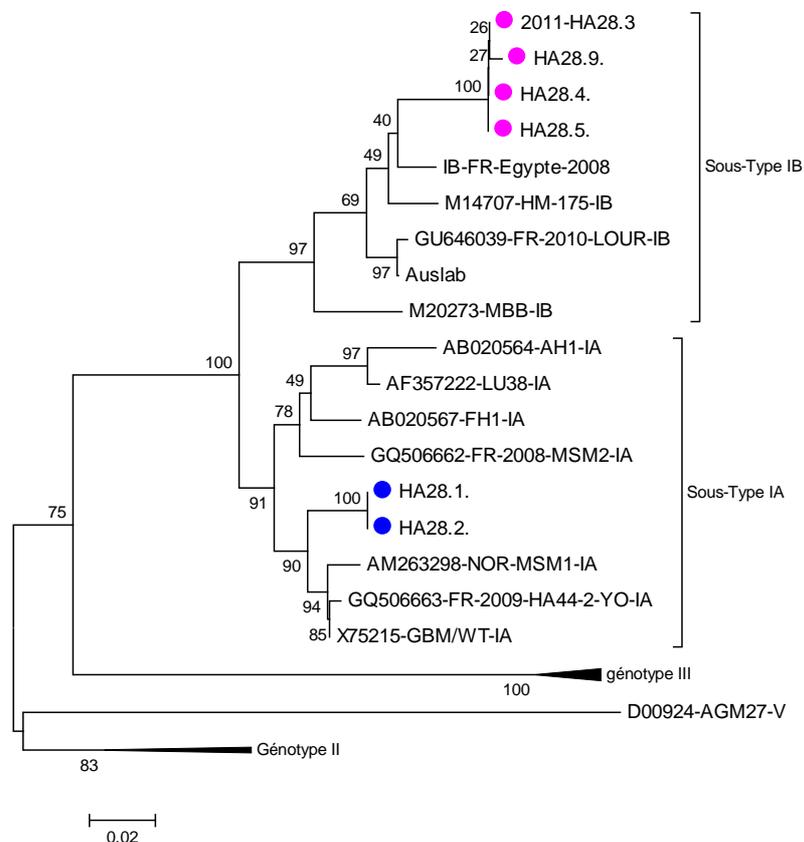
Cas groupés à Beauvais

Autour d'une suspicion de cas groupés associés à une crèche, le CNR a reçu du centre hospitalier de Beauvais, 10 sérums prélevés entre le 14 avril et le 7 juin 2011 présentant des IgM VHA positives. Les transaminases étaient élevées chez 8 des 10 patients, deux patients revenaient d'Algérie.

L'ARN viral était indétectable chez 2 patients âgés (90 et 97 ans). Chez eux une avidité des IgG VHA >70% suggérait une infection ancienne. L'ARN viral était également indétectable chez deux patients de 2 et 33 ans ayant une avidité des IgG VHA entre 50 et 70%. Cette avidité suggère une infection VHA récente mais datant de plus d'un mois, ce qui est compatible avec le taux normal ou faiblement augmenté des transaminases.

L'ARN viral était détectable chez 6 des 10 patients. Une première souche de sous-type IA était identifiée chez 2 patients de 19 et 22 au retour d'Algérie (en bleu) ; Deux autres souches, de sous-type IB, ont été identifiées chez 4 autres patients âgés de 28 à 36 ans en lien avec la crèche de l'hôpital (en rose).

La diversité des souches identifiées indique des sources de contamination différentes.



Analyse phylogénétique des cas groupés de Beauvais

Cas groupés, Puy de Dôme

Suite à des cas groupés d'hépatite A survenus à l'automne 2011 dans le Puy de Dôme, le CNR VHA a reçu 14 sérums pour réaliser l'épidémiologie moléculaire des souches virales, chez 13 enfants âgés de 5 à 13 ans et un adulte de 23 ans.

Les 14 patients étaient infectés par des souches de génotype IA. Trois souches distinctes ont été identifiées. La souche autochtone de génotype IA GQ506663 (gens du voyage) était identifiée dans 10/14 cas. Un patient était infecté par une souche génétiquement très proche de la souche « GDV ». Trois enfants étaient porteurs d'une souche importée d'Afrique du Nord.

Cas groupés, Région Centre

A la demande de l'ARS Centre, le CNR a réalisé l'épidémiologie moléculaire de souches virales possiblement responsables de cas groupés dans plusieurs villes de la région.

Nous avons inclus dans l'analyse l'ensemble des souches provenant de cette région et reçues en 2011 : 32 échantillons prélevés entre août et novembre, concernant 26 enfants âgés de 3 à 17 ans et 6 adultes âgés de 26 à 62 ans. Neuf échantillons provenaient de Tours, 5 de Chartres, 3 de Romorantin, 6 de Chateauroux, 1 de Bourges et 1 de Vierzon, 6 de Bléré et 3 d'Orléans. Seul 2 sujets rapportaient un voyage hors métropole.

L'ARN viral était détectable dans 29/32 échantillons. Un cas négatif présentait une avidité des IgG VHA à 22% suggérant une infection récente, les deux autres cas correspondaient à des infections anciennes.

La souche autochtone de génotype IA GQ506663 (gens du voyage) était identifiée chez 24/29 des sujets analysés. Le facteur de risque « gens du voyage » n'a été signalé au CNR que dans un cas. Cette souche était le plus souvent isolée chez des enfants, mais aussi chez 4 adultes. Chez 2 autres sujets, les souches identifiées ne différaient pas significativement de la souche GQ506663 (1/420 nucléotides analysés ; 0.2%). Chez 3 sujets rapportant un voyage hors métropole les souches identifiées correspondaient à celles isolées habituellement dans ces régions, respectivement IA en Bulgarie, IB au Liban et IIIA en Inde.

Les cas d'hépatite A aigüe diagnostiqués en région Centre entre août et Novembre 2011, en l'absence de notion de voyage, sont associés à la souche autochtone de génotype IA GQ506663 diffusant en France dans la communauté des gens du voyage. Cette souche a représenté 25% des souches isolées par le CNR en 2010 et plus de 40% en 2011.

3.3 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux

Sous l'égide de Marion Koopmans du RIVM (National Institute for Public Health and the Environment) aux Pays Bas, va se mettre en place un projet de séquençage des génomes complets des souches responsables de cas groupés transnationaux associés à la consommation de tomates séchées en 2009-2010.

4 Alerte VHA

Tout phénomène anormal (souche inhabituelle, mode de transmission inhabituel, ...) est signalé par téléphone ou par mail au correspondant INVS, Elisabeth Couturier.

Les correspondant européens (ex réseau EVENT) sont sollicités par mail, en cas de découverte d'une souche inhabituelle, pour comparaison avec les souches présentes dans leurs bases de données respectives. Inversement, nos correspondants peuvent nous solliciter de la même manière. Ainsi, de nouveaux cas associés à la consommation de tomates séchées importées ont été signalés aux Pays Bas en 2011. Cela n'a pas été le cas en France.

Concernant le VHA, aucune alerte n'a été lancée en 2011 par le CNR.

5 Activités d'expertise Hépatite E

5.1 Capacités techniques du CNR

5.1.1 Liste des techniques de référence pour le VHE

Tests Sérologiques

- Tests ELISA de détection des anticorps anti-HEV classe IgG et IgM (Adaltis/Diapro).
- Test ELISA permettant l'étude de l'avidité des IgG VHE (par adaptation de la technique IgG Adaltis).
- Test immunochromatographique permettant la recherche rapide des IgM (MP bioMedicals)

Détection et quantification du génome viral

- RT-PCR nichée ciblant l'ORF2 (Cooper J Virol Methods 2005), sensibilité estimée à 3.7 log UI/ml avec le 1^{er} standard international VHE.
- RT-PCR temps-réel qualitative ciblant l'ORF2/3, sensibilité estimée à 2.7 logUI/ml. La quantification peut être réalisée avec une gamme externe de dilutions du standard international

Génotypage des souches

Il est réalisé en routine après séquençage direct du produit de PCR nichée ciblant l'ORF2, suivit d'une analyse phylogénétique.

Techniques développées en 2011

- Pour confirmer ou infirmer des homologies entre souches, des fragments de l'ORF1 sont amplifiés : ARNpolymérase et région Nterminale. Ces autres régions ont permis de confirmer la stricte homologie entre souches lors de contaminations alimentaires ou transfusionnelles
- Séquençage du génome complet sur le principe de la marche en avant : caractérisation complète des souches
- Détection du brin négatif, intermédiaire de réplication du VHE

5.1.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

Base de données de séquences génotypées. Cette base sera installée sur le logiciel Bionumerics avec des annotations sur l'origine géographique supposée et le contexte clinique (infection aiguë ou chronique, infection fulminante, signes neurologiques associés). Cette base sera transmise au laboratoire du Pr Izopet qui reprend l'expertise VHE.

5.1.3 Collection de souches

Description

- Collection clinique de 400 sérums ou selles contenant de l'ARN VHE dont la souche a été génotypée.

Conditions de stockage

Les échantillons sont conservés à -80°C dans des congélateurs reliés à un système de surveillance centralisé des températures. L'emplacement des échantillons est géré par le système informatique du laboratoire.

Une convention de stockage devra être signée entre l'INVS et le CRB Paris-Sud. Le Laboratoire de Virologie de Paul Brousse héberge en effet un CRB « liquides » associé au CRB Paris-Sud, initialement centré sur les tissus et cellules.

Conditions de mise à disposition

La mise à disposition des sérums se fait sur présentation d'un projet de recherche en collaboration avec le CNR, selon les règles du CRB.

5.1.4 Liste des techniques recommandées par le CNR

Listes existantes

La détection d'IgM anti-VHE permet le diagnostic de l'infection aiguë chez l'immunocompétent et chez la plupart des immunodéprimés (cf infra). Des techniques marquées CE sont disponibles et fiables, y compris le diagnostic rapide sur bandelette par immunochromatographie.

Le diagnostic de l'infection chronique repose sur la détectabilité de l'ARN viral. Des techniques marquées CE sont disponibles. Leur évaluation est en cours.

Evaluations techniques

Les performances de 5 techniques de détection de l'ARN du virus de l'hépatite E (VHE) par RT-PCR temps réel ont été comparées : trois ciblant l'ORF2 et deux, dont une commerciale, ciblant l'ORF2/3.

Des dilutions successives de 2 candidats standards fournis par le Paul-Ehrlich-Institut (génotype 3a et 3b) titrant 250000 UI/ml ont été testées en quadruplicate.

Détection des dilutions de souches de référence 3a et 3b

	ORF2								ORF2/3			
	RT-PCR		C		D		E		A		B	
	3a	3b	3a	3b	3a	3b	3a	3b	3a	3b	3a	3b
undiluted	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
1/10	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	1/4	1/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
1/100	0/4	2/4	3/4	4/4	0/4	0/4	0/4	3/4	4/4	2/4	4/4	4/4
1/1000	0/4	0/4	0/4	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4	1/4
1/10000	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

La PCR nichée détectait de manière constante les dilutions 1/10 (25000 UI/ml).

Parmi les techniques ciblant l'ORF2, les résultats de détection étaient dépendants du sous-type. La technique C présentait de très bons résultats, particulièrement pour le sous-type 3b (250 UI/ml). Les techniques ciblant l'ORF2/3 avaient des résultats similaires pour 3a et 3b avec la détection quasi-constante de la dilution 1/100.

La sensibilité clinique a été évaluée sur 47 sérums présentant un ARN viral détectable par RT-PCR nichée, dont 45 de génotype 3. Les bons résultats de la technique C ne sont pas confirmés. Seules les techniques ciblant l'ORF2/3 ont détecté tous les échantillons. Le % de détection des techniques ciblant l'ORF2 variait de 83 à 96%.

La technique commerciale distribuée par CeeramTools et ciblant l'ORF2/3 inclut un contrôle interne d'amplification et semble adaptée à la détection en routine de l'ARN VHE des souches de génotype 3 couramment isolées en France.

5.2 Activités d'expertise VHE de l'année 2011

5.2.1 Prélèvements réceptionnés, provenance

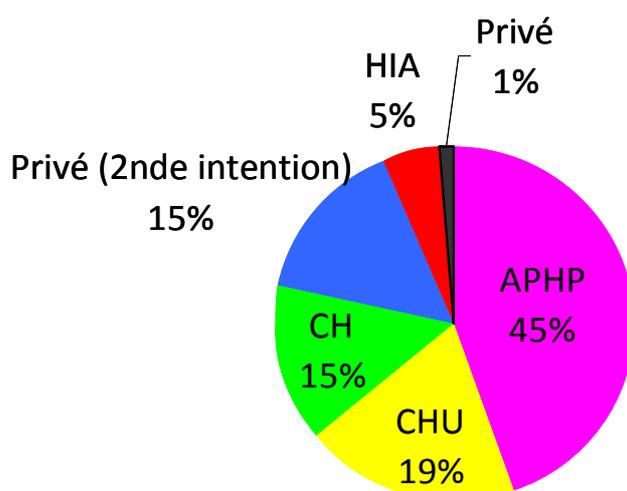
Les prélèvements sont adressés au CNR principalement dans le cadre de la démarche diagnostique initiale. Pour les laboratoires assurant le diagnostic sérologique, les échantillons ont été transmis en seconde intention pour étude des marqueurs moléculaires et génotypiques, au titre de l'observatoire des souches. Parmi nos correspondants, outre le laboratoire Cerba qui pratiquait déjà le diagnostic sérologiques, plusieurs CHU ont mis en place la sérologie VHE en 2011.

En 2011, 4422 échantillons correspondant à 3429 patients nous ont été adressés (soit une augmentation de plus de 30% du nombre de patients ayant bénéficié du diagnostic par rapport à 2010). Ces échantillons provenaient de 81 laboratoires différents.

Année	2010	2011
Nombre de patients	2549	3429
Sex ratio H/F	1,4	1,25
Âge moyen (extrêmes)	50 (1-94 ans)	48 (0-97 ans)
Âge (médiane)	59,5 ans	48 ans
Nombre total d'échantillons	3310	4422
Nombre de sérum	2922	4036
Nombre de selles	383	373
Autres types échantillons	5	12

Caractéristiques démographiques et épidémiologiques de la population étudiée en 2010 et 2011 par le CNR

Comme les années précédentes, les échantillons adressés en 2011 au CNR étaient très majoritairement des établissements publics, avec l'APHP comme 1^{er} prescripteur.



Origine des échantillons transmis au CNR suivant le type de structure de santé

Origine géographique des échantillons adressés au CNR

Cet indicateur a été déterminé pour les établissements publics, non militaires, ayant adressé plus de 10 prélèvements en 2011. Ils représentaient 79% des échantillons adressés au CNR.

Comme les années précédentes, l'Île de France est le plus grand prescripteur avec 65% des prescriptions, suivie de la région PACA, 13%, avec toutefois une augmentation significative de la proportion d'échantillons provenant d'Île de France (43% en 2010). Suivent, par ordre de fréquence, les régions Poitou-Charente à 6%, Aquitaine à 4%, Basse Normandie à 3%, Alsace, Centre et Languedoc-Roussillon à 2% puis Bourgogne, Haute Normandie et Pays de Loire à 1%.

5.2.2 Analyses réalisées

Au total 2557 sérologies IgM+IgG et 3014 détections d'ARN viral ont été effectuées en 2011. Les analyses réalisées en 1^{ère} intention étaient celles prescrites.

Devant la positivité de l'un des marqueurs, le CNR complétait la demande par l'autre marqueur si celui-ci n'était pas prescrit d'emblée.

Tous les échantillons ayant un ARN viral détectable pour la 1^{ère} fois au laboratoire ont été amplifiés dans la région de géotypage et séquencés : L'ARN VHE était détectable dans 450 échantillons, correspondant à 280 patients dont 260 ont pu être géotypés.

6 Activités de surveillance VHE

6.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

6.1.1 Définition de l'échantillon de souches isolées

Sur 260 patients présentant un ARN viral détectable, comme les années précédentes, le géotype 3f était majoritaire, représentant 68% des souches typées, suivi du géotype 3c (21%) et 3e (5%). Ces % sont comparables à ceux retrouvés en 2010 pour les cas autochtones, comme montré dans le tableau ci-dessous.

Répartition des géotypes identifiés au CNR

Géotype	1	4	3a	3c	3e	3f	3 non typable
Séquences 2011 N=260	2%	3%	0%	21%	5%	68%	1%
Séquences autochtones 2010 N=206			4%	14%	5%	75%	

On peut remarquer toutefois une augmentation de la proportion des souches de géotype 3c, ainsi que l'émergence du géotype 4. Le premier cas d'infection par un géotype 4 autochtone a d'ailleurs été décrit cette année (Tessé, J Clin Virol 2012).

6.1.2 Caractéristiques de l'infection

Au total 307 infections ont été diagnostiquées au CNR en 2011 selon les critères suivants :

- un ARN détectable quelle que soit la sérologie
- la présence d'IgM associées à des IgG de faible avidité, dans un contexte d'hépatite aigue
- des IgM fortement positives isolément dans un contexte d'hépatite aigue

Dans 266 cas, ces infections ont été considérées comme des hépatites aiguës, dans 41 cas il s'agissait d'infections chroniques (13,5%).

La question de l'existence d'un contexte d'immunosuppression été posée dans 287 cas et retrouvée dans 73 cas (25%) : 40/41 des infections chroniques (97%) et 33/246 infections aiguës (13%).

Infections diagnostiquées par la détection d'ARN VHE

Une infection VHE virémique a été détectée chez 280 patients. 20 patients présentaient un ARN détectable par RT-PCR temps réel, avec une charge virale faible ne permettant pas le génotypage. Les résultats sérologiques étaient disponibles pour 264 patients.

Profils sérologiques des infections virémiques

	IgM+ et IgG+	IgM+	IgG+	négative
total	186 (71%)	67 (25%)	3 (1%)	8 (3%)
% d'immunosuppression (quand notion disponible)	36/164 (22%)	26/65 (40%)	3/3	7/8
% d'infection chronique	22/186 (12%)	15/67 (22%)	2/3	5/8

Le profil le plus fréquent était la détection simultanée d'IgM et d'IgG. Dans ce profil sont identifiées aussi bien des infections aiguës que chroniques (qui représentent 13.5% de l'ensemble des infections et 12% des infections avec ce profil).

L'avidité des IgG VHE a été réalisée dans 137 présentant un index IgG >3

- Avidité <50% dans 102 cas (74%) : infections récentes
- Avidité >70% dans 29 cas (21%).

En l'absence de virémie, une avidité >70% évoque une infection ancienne. Mais en cas de virémie détectable, une avidité >70% peut évoquer une infection chronique, ce qui était le cas chez seulement 9 patients.

Chez les autres 20 patients, aucun argument pour une infection chronique n'était présent (symptomatologie aigue chez des sujets immunocompétents). Ce résultat pourrait donc suggérer une réinfection, qui serait observée dans environ 15% des infections analysables

Les patients présentant une infection chronique ou une immunodépression étaient surreprésentés dans les autres profils sérologiques (IgM ou IgG isolés). Il faut noter que le seul sujet immunocompétent présentant une infection séronégative était un donneur de sang totalement asymptomatique, probablement prélevé en phase d'incubation et qui a présenté une séroconversion IgG 6 mois plus tard.

Caractéristiques des infections aiguës

- Marqueurs diagnostiques

Sur 266 infections aiguës, 239 infections étaient virémiques et 27 ont été diagnostiquées sur des marqueurs sérologiques, en l'absence de détection d'ARN viral. Parmi ces infections non virémiques, 25 présentaient des IgM positives associées à des IgG de faible avidité et 2 présentaient des IgM isolées. Ce nombre n'inclut pas les infections diagnostiquées uniquement sur des critères sérologiques par nos partenaires. Ces laboratoires adressent leurs sérums au titre de l'observatoire des souches : seul l'ARN viral est recherché au CNR pour génotypage. Le nombre de ces infections est donc sous-estimé.

- Contexte épidémiologique

Parmi les 266 infections aiguës, 73 sont survenues chez des femmes et 193 (72.5%) chez des hommes. L'âge moyen était de 55+/-14 ans.

13% sont survenues dans un contexte d'immunodépression : maladies inflammatoires ou auto-immunes traitées (36%), de cancers (30%), de greffes (21%) ou infection VIH (12%).

La notion de voyage hors France métropolitaine a été relevée dans 17 cas dont 7 en zone d'endémie (Asie, Afrique).

Le recueil des facteurs de risques alimentaires n'a pas été exhaustif. L'item charcuterie a été cité dans 22 cas dont 12 citant les figatelli. Dans un cas le patient avait conservé l'aliment : la souche du patient et celle retrouvée dans l'aliment par N Pavio de l'ANSES étaient strictement homologues dans 2 régions séquencées (génotype 3f).

- Génotypes isolés

221 souches ont pu être séquencées. Le génotype 3 est largement majoritaire, essentiellement représenté par les sous-types 3f (69%), 3c (21%) et 3e (3%). Trois souches n'ont pu être typées avec précision, elles semblent proches du 3c.

Contrairement au génotype 1 qui n'a été isolé que chez des patients au retour de zone d'endémie (2% des souches), le génotype 4 a été retrouvé chez un patient revenant de Chine et chez 8 patients n'ayant pas quitté le territoire (4% des souches) (cf. infra).

- Particularités cliniques

Une hépatite fulminante autochtone (génotype 3f) a été diagnostiquée chez un patient ayant une hépatopathie sous-jacente, qui a été transplanté.

Trois patients immunocompétents ont présenté des signes neurologiques. La recherche de l'ARN viral dans le LCR, disponible dans un cas, était négative

Caractéristiques des infections chroniques

Parmi les 41 infections chroniques, 12 étaient connues avant 2011 et 29 nouvelles infections chroniques ont été diagnostiquées. Les hommes sont surreprésentés : 78%.

La notion d'immunodépression est quasi constante : 40/41 cas, essentiellement chez des transplantés d'organe (87%).

Un traitement par ribavirine a été instauré en 2011 chez 10/41 patients.

Le génotype viral était disponible dans 39 cas : 3f (56%) ; 3c (25%), 3e (13%). Un patient était infecté par une souche de sous-type 3a et un patient était infecté par une souche très particulière, proche des souches décrites chez les lapins (cf. infra).

6.1.3 Réseau de partenaires

INVS

Il existe des contacts permanents entre l'InVS (Dr COUTURIER) et le CNR.

ANSES Laboratoire de Sécurité des Aliments, Maisons-Alfort

Le CNR collabore avec Sylvie Pérelle (ANSES). Des échanges de souches et de techniques ont eu lieu à plusieurs reprises. Un projet visant à analyser les déterminants de fixation des virus des hépatites A et E aux cellules polarisées entériques est en cours.

UMR Virologie, Equipe Virus entériques et Barrière d'Espèces, ANSES Maisons-Alfort

Le CNR collabore avec Nicole Pavio pour tout ce qui concerne le VHE dans les aliments d'origine porcine et la comparaison des souches isolées chez les patients et dans le réservoir animal.

Réseau de biologistes

Laboratoires de biologie publics et privés qui adressent les échantillons biologiques au CNR, et qui pratiquent le diagnostic sérologique et moléculaire de l'infection par le VHE.

Laboratoire de virologie du CHU Purpan à Toulouse (Pr Izopet)

Ce laboratoire a été associé au CNR des virus des hépatites entéro-transmissibles pour le mandat 2012-2016.

Un projet commun a été financé par l'ANRS : Rôle de la surinfection par un virus hépatotrope dans la décompensation de la cirrhose virale C chez le patient co-infecté par le VIH.

6.2 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

Suspicion de cas groupés à Narbonne

Le 3 mai 2011, l'ARS Languedoc-Roussillon recevait le signalement par un gastro-entérologue de l'hôpital de Narbonne de deux cas d'hépatite E aiguë parmi des membres du personnel travaillant dans le même bloc opératoire de cet hôpital. Dans un des cas, il s'agissait d'une forme compliquée nécessitant une hospitalisation. L'existence de plusieurs repas pris en commun sur le lieu de travail comme facteur d'exposition entre les deux premiers cas suggérait l'hypothèse d'une toxi-infection alimentaire collective parmi les personnels du bloc opératoire.

Le CNR a recherché les marqueurs d'infection VHE chez 59 sujets travaillant au CH de Narbonne : 2 sujets symptomatiques prélevés le 28 et 29 avril 2011 ; 57 sujets asymptomatiques prélevés entre le 9 et le 18/5/11.

Des marqueurs VHE ont été retrouvés chez 17/59 patients (28.8%) dont 15.3% compatibles avec une infection ancienne (IgM-/IgG+) et 13.6% compatibles avec une infection récente. Parmi les sujets ayant une sérologie compatible avec une infection récente, seuls les 2 sujets symptomatiques étaient virémiques. Deux souches différentes ont été retrouvées, l'une de génotype 3F, l'autre de génotype 3C, n'excluant pas une source commune, en raison du mode de fabrication de certaines charcuteries.

Première description d'une infection humaine liée à souche de VHE proche des souches isolées chez les lapins

Un patient de 47 ans transplanté hépatique en 2002 a été infecté par le VHE en mars 2011 et a développé une infection chronique. Le séquençage de la souche dans l'ORF2 a montré une forte homologie avec les souches isolées de lapins d'élevage en Chine.

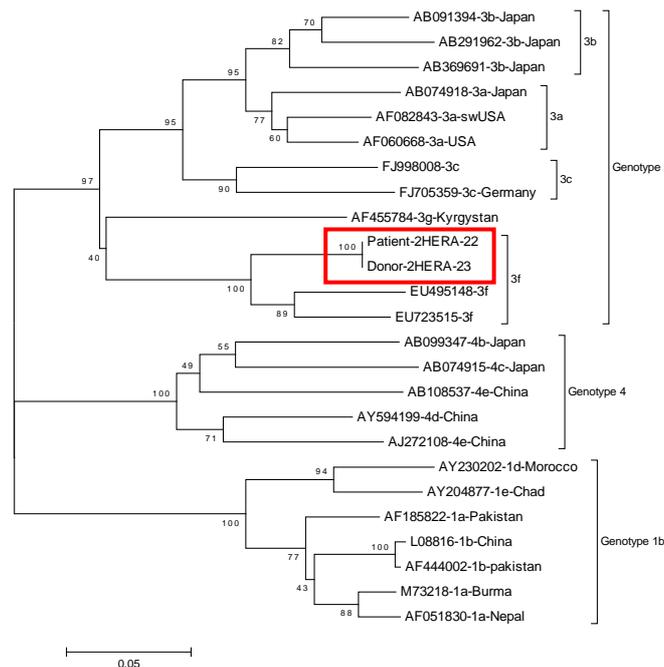
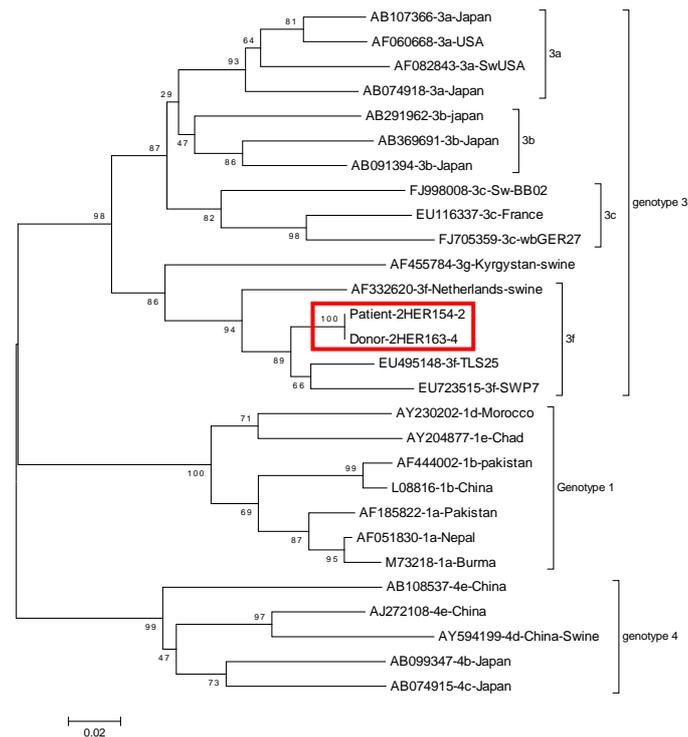
Le patient travaille comme cuisinier dans un restaurant, est en contact avec des animaux morts (dont des lapins) et se blesse de temps en temps, suggérant des pistes sur le mode de contamination (coupure avec des ustensiles souillés). Il n'y a pas de données sur la prévalence du VHE chez le lapin en France. Toutefois, il faut signaler que la Chine est le 1^{er} fournisseur de la France en lapins frais et surgelés destinés à la restauration. L'infection du patient par cette souche atypique a certainement été favorisée par son immunosuppression.

Hépatite E transfusionnelle

Un patient de 81 ans présentant une cardiopathie ischémique chronique, une thrombopénie et une anémie auto-immunes, a été hospitalisé dans un contexte d'aggravation de sa maladie hématologique en Juin 2011 avec instauration d'un traitement par corticoïdes puis par ciclosporine. En juillet, une cytolyse aiguë est apparue (ALAT 192 UI/L) associée à un ictère. Une étiologie médicamenteuse puis auto-immune ont été évoquées avant le diagnostic d'une hépatite E fin septembre 2011.

L'analyse de deux sérums antérieurs a révélé une sérologie négative et un ARN VHE indétectable le 3 mai 2011 et une sérologie positive (IgM et IgG) avec une virémie détectable le 30 juin. Une contamination alimentaire a été exclue par l'interrogatoire : en particulier, le

patient ne mangeait pas de porc pour des raisons religieuses. Hospitalisé à de nombreuses reprises depuis janvier, le patient avait reçu 9 transfusions de concentrés plaquettaires et 4 transfusions de culots globulaires. L'hypothèse d'une contamination transfusionnelle a été explorée à partir des sérothèques des 28 donneurs des produits transfusés entre avril et juin : L'un des échantillons provenant d'un donneur régulier, présentait une charge virale VHE estimée à 17 000 UI/ml (4,2 log UI/ml) et une séquence de génotype 3f ayant une homologie de 100% avec la souche infectant le patient, dans 2 régions génomiques (ORF2 et ORF1).



Analyse phylogénétique des régions ORF2 (315 nucléotides, en haut) et ORF1 (323 nucléotides, en bas)

Emergence du génotype 4 en France

Jusqu'à récemment les infections autochtones rapportées en Europe étaient associées à des souches VHE de génotype 3. En 2008, une infection autochtone de génotype 4 a été publiée chez un patient allemand et récemment des souches de génotype 4 ont été détectées dans des élevages porcins en Belgique et le 1^{er} cas autochtone français a été décrit.

Parmi les 260 infections virémiques, 9 infections aiguës associées à un génotype 4 ont été détectées en 2011 (3.4%). Un seul sujet rapportait un voyage en Chine.

7 Alerte VHE

Tout phénomène anormal (souche inhabituelle, mode de transmission inhabituel, ...) est signalé par téléphone ou par mail au correspondant INVS, Elisabeth Couturier. Les phénomènes « anormaux » décrits au chapitre précédent ont été signalés à l'INVS.

8 Activités d'information, de formation et de conseil

8.1 Enseignements

8.1.1 Formation initiale et continue

En tant qu'hospitalo-universitaires, les membres du CNR participent à différents enseignements concernant le VHA et le VHE dispensés aux étudiants en Médecine (DCEM1, DCEM2) et en DES de biologie, ou scientifiques (Master 2).

Nous intervenons auprès des professionnels lors de séminaires et de conférences invitées

8.1.2 Accueil de stagiaires

Le service de microbiologie accueille 2 internes par an. Dans le cadre de l'agrément niveau 2 pour la virologie l'interne est amené à contribuer au CNR

Le service est terrain de stage en M2. Il a accueilli

- en 2010-2011, M William, Virologie, Paris VII : variabilité en culture de souches d'hépatite A de génotype IIA.
- En 2011-2012, D Delaune, Agents infectieux : interactions hôte/environnement, UVSQ : séquençage complet et infectiosité chez l'animal d'une souche VHE d'origine cuniculicole suspectée

Le service accueille des doctorants : Actuellement le Dr Delphine Desbois est en 3^{ème} année de thèse sur le VHA génotype IIA (Paris XI)

8.2 Modalités de diffusion des données du CNR

Les résultats des analyses pratiquées au CNR sont adressés au laboratoire demandeur par courrier. Les diagnostics positifs d'hépatite E sont également transmis par téléphone au médecin prescripteur.

Le rapport d'épidémiologie moléculaire est adressé au médecin des ARS en cas d'épidémie.

Un site web (<http://www.cnrvha-vhe.org/>) en cours de mise à jour présente les données récentes, les rapports d'activité ainsi que les coordonnées du CNR (téléphone, fax et mail) et les modalités d'envoi des prélèvements.

8.3 Expertise auprès des autorités de santé

- Participation à la rédaction de la note de la DGS parue en 2011 sur la Prévention de l'hépatite E chez les personnes susceptibles de développer une forme grave.
- Validation du contrôle national de qualité AFSSAPS 2012 pour la sérologie Hépatite A
- Expert auprès de l'AFSSAPS et de l'EMEA dans le groupe SIDA et hépatites virales

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

Caractérisation des souches VHA de sous-type IIA

Nous avons montré l'origine géographique restreinte des souches de sous-type IIA (Desbois J Clin Microbiol 2010). Nous avons également montré que les souches cliniques de différents génotypes avaient des efficacités traductionnelles faibles (Mackiewicz, J Virol 2010). Dans cette dernière étude, l'unique souche de génotype IIA présentait une efficacité traductionnelle paradoxale, plus élevée en lignée cellulaire fibroblastique qu'hépatocytaire. Nous avons cloné les IRES de plusieurs souches de génotype IIA, l'étude de leur efficacité traductionnelle est en cours. Cette étude pourra contribuer à la compréhension de la faible diffusion de ce sous-type. (thèse de D Desbois)

Variabilité du génotype IIA du VHA en culture et calcul du taux d'erreur de son ARN polymérase

L'analyse génétique d'une souche cultivée sur lignée FRhK-4 pendant 120 jours a montré la stabilité de la séquence consensus des régions 5' non codante, VP1/2A et 2C. L'analyse par clonage et séquençage a mis en évidence une quasiespèce avec des taux d'erreur variant de $2.12 \cdot 10^{-4}$ substitutions/nt dans la région 5'NC à $2.07 \cdot 10^{-3}$ subst/nt dans la région VP1/2A. (M2 de M William)

Emergence du VHE de génotype 4 en France

L'analyse phylogénétique des régions ORF1 et ORF2 des souches isolées en 2011 a montré un regroupement des souches autochtones indépendant des souches importées ou isolées en Chine et au Japon. L'analyse de l'ORF1 a montré que les cas autochtones formaient un regroupement unique et spécifique, proche des souches isolées chez les porcs belges.

Nous allons poursuivre le recueil des données cliniques et épidémiologiques et, en collaboration avec l'INVS, rechercher des facteurs qui les distingueraient des souches autochtones de génotype 3 identifiées lors de la surveillance renforcée de l'hépatite E en 2010.

Première description d'une infection humaine liée à souche de VHE cuniculicole

Un patient de 47 ans transplanté hépatique en 2002 a été infecté par le VHE en mars 2011 et a développé une infection chronique. Le séquençage de la souche dans l'ORF2 a montré une forte homologie avec les souches isolées de lapins d'élevage en Chine.

Le séquençage complet du génome a montré une homologie moyenne de 81% avec les souches de lapins chinoises et de 77% avec des souches de génotype 3.

En collaboration avec l'ANSES, cette souche sera inoculée à des lapins et à des porcs pour étayer son origine cuniculicole. (M2 de D Delaune)

10 Liste des publications et communications

Articles Originaux Francophones

1. D Desbois, L. Grangeot-Keros, B. Roquebert, AM Roque-Afonso, V. Mackiewicz, JD Poveda, E. Dussaix. Usefulness of specific IgG avidity for diagnosis of hepatitis A infection. **Gastroenterol Clin Biol**, 2005 ; 29 :573-76.
2. P Santa-Olalla, AM Roque-Afonso, E Couturier, B Cottrelle, C Drougard, C Lecadet-Morin, P Lebraud, J Beytout, D Lévy-Bruhl, E Dussaix, E Delarocque-Astagneau. Utilisation de tests salivaires dans l'investigation d'une épidémie d'hépatite A, Auvergne, décembre 2004. **BEH** n° 2-3/2006; 13-15.
3. E Couturier, MJ Letort, AM Roque, E Dussaix, E Delarocque-Astagneau. Hépatite aigue A an France en 2006 : première année de surveillance par la déclaration obligatoire. **BEH** n°29-30/2007 : 253-256.
4. C Chakvetadze, F Bani-Sadr, L Slama, G Pialoux, AM Roque-Afonso, E Dussaix. Sustained alanine aminotransferase increase during hepatitis A due to concomitant lymphogranuloma venereum infection in an HIV-1 positive patient. **Gastroenterol Clin Biol** 2008 ; 32 :657-59.
5. A Berlioz-Arthaud, S. Barny, J.F. Yvon, AM Roque-Afonso, E. Dussaix Surveillance biologique de l'hépatite A en Nouvelle-Calédonie : de l'endémie à l'épidémie (1986-2007). **Bull Soc Path Ex** 2008 ; 101 : 336-342.
6. D Desbois, E Couturier, V Mackiewicz, A Graube, MJ Letort, E Dussaix, AM Roque-Afonso. Genetic diversity of a rare hepatitis A virus genotype. **Path Biol** 2011;59(1):57-65
7. E Couturier, L Grout, AM Roque-Afonso, C Gallot, J Pouey, MJ Letort, P Soler, P Carrillo-Santistevé, B Aldabe, P Capdepon, S Saint-Martin, P Ben Hamida, H Laverdet, H De Valk, V Vaillant. Épidémie d'hépatite A liée à la consommation de tomates semi-séchées, France, 2009-2010. **BEH** n° 13-14/2011; 165-168.

Articles Originaux Anglophones

- 1- G Rezende, AM Roque-Afonso, D Samuel, M Gigou, E Nicand, V Ferré, E Dussaix, H Bismuth, C Féray. Viral and clinical factors associated with the fulminant course of hepatitis A infection. **Hepatology** 2003; 38: 613-8.
- 2- V Mackiewicz, E Dussaix, MF Le Petitcorps, AM Roque-Afonso. Detection of Hepatitis A Virus RNA in Saliva. **J Clin Microbiol** 2004; 42: 4329–31.
- 3- AM Roque-Afonso, L Grangeot-Keros, B Roquebert, D Desbois, JD Poveda, V Mackiewicz, E Dussaix. Diagnostic relevance of IgG avidity for Hepatitis A Virus. **J Clin Microbiol** 2004; 42: 5121-4.
- 4- V Mackiewicz, AM Roque-Afonso, E Marchadier, E Nicand, L Fki-Berrajah , E Dussaix. Rapid Investigation of Hepatitis A Virus Outbreak by Single Strand Conformation Polymorphism Analysis. **J Med Virol**; 2005; 76:271-278.
- 5- AM Roque-Afonso, V Mackiewicz, E Dussaix. Detection of Immunoglobulin M Antibody to Hepatitis A Virus in Patients without Acute Hepatitis A: The Usefulness of Specific Immunoglobulin G Avidity. **Clin Infect Dis**. 2006; 42:887-8.
- 6- Schwarz NG, Revillion M, Roque-Afonso AM, Dussaix E, Giraud M, Liberpre C, Couturier E, Delarocque-Astagneau. A food borne outbreak of hepatitis A virus (HAV) in a secondary school in Upper Normandy/France in November 2006. **Euro Surveill** 2008; 13. pii: 18885.
- 7- Couturier E, Roque-Afonso AM, Letort MJ, Dussaix E, Vaillant V, de Valk H. Cluster of cases of hepatitis A with a travel history to Egypt, September-November 2008, France. **Euro Surveill**. 2009 Jan 22 ;14(3). pii : 19094
- 8- Guillois-Bécel Y, Couturier E, Le Saux JC, Roque-Afonso AM, Le Guyader FS, Le Goas A, Pernès J, Le Behec S, Briand A, Robert C, Dussaix E, Pommepuy M, Vaillant V. An oyster-associated hepatitis A outbreak in France in 2007. **Euro Surveill**. 2009;14(10):pii=19144.

- 9- D Desbois, AM Roque-Afonso, P Lebraud, E Dussaix. Use of dried serum spots for serological and molecular diagnosis of hepatitis A virus. **J Clin Microbiol** 2009; 47: 1536- 42.
- 10- B Syhavong, B Rasachack, L Smythe, KSA Myint, JM Rolain, AM Roque-Afonso, K Jenjaroen, V Soukhaserm, S Phongmany, R Phetsouvanh, S Soukhaserm, T Thammavong, M Mayxay, SD Blacksell, E Barnes, P Parola, D Raoult, E Dussaix, I Humphreys, Paul Klenerman, NJ White, PN Newton. The infective causes of hepatitis and jaundice amongst hospitalised patients in Vientiane, Laos. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 2010
- 11- D Desbois, E Couturier, V Mackiewicz, A Graube, MJ Letort, E Dussaix, AM Roque-Afonso. Epidemiology and genetic characterisation of Hepatitis A virus genotype IIA. **J Clin Microbiol.** 2010; 48: 3306-15.
- 12- V Mackiewicz, A Cammas, D Desbois, E Marchadier, S Pierredon, F Beaulieux, E Dussaix, S Vagner, AM Roque-Afonso. Nucleotide variability and translation efficiency of the 5'untranslated region of hepatitis A virus: an update from clinical isolates associated with mild and severe hepatitis. **J Virol**, 2010; 84: 10139-147.
- 13- Guet L, Desbois D, Roque-Afonso AM, Germain JM, Merle V. Investigation of a severe nosocomial outbreak of hepatitis A among healthcare workers and adult patients. **J Hosp Infect**, 2011
- 14- C Gallot, L Grout, AM Roque-Afonso, E Couturier, P Carrillo-Santistevé, J Pouey, MJ Letort, S Hoppe, P Capdepon, S Saint-Martin, H De Valk, V Vaillant. Hepatitis A Associated with Semidried Tomatoes, France, 2010. **Emerging Infectious Diseases**, 2011; 17: 566-67.
- 15- Kamar N, Garrouste C, Haagsma EB, Garrigue V, Pischke S, Chauvet C, Dumortier J, Cannesson A, Cassuto-Viguier E, Thervet E, Conti F, Lebray P, Dalton HR, Santella R, Kanaan N, Essig M, Mousson C, Radenne S, Roque-Afonso AM, Izopet J, Rostaing L. Factors Associated with Chronic Hepatitis in Patients with Hepatitis E Virus Infection Who Have Received Solid Organ Transplants. **Gastroenterology** 2011;

Articles de revue francophones

1. E Dussaix et AM Roque Afonso. Le virus de l'Hépatite A. **mt pédiatrie** ; déc 1998 ;vol 1 hors série :4-9.
2. V Mackiewicz, AM Roque-Afonso, E Dussaix. Hépatite A : de l'évidence au piège diagnostique. **RFL** 2006 ; 382 : 51-56.
3. AM Roque-Afonso, V Mackiewicz, E Dussaix. Le virus de l'hépatite A : Actualités. **IBS**. 2006 ; 21 :202-209.
5. E Dussaix, V Mackiewicz, AM Roque Afonso. Epidémiologie de l'hépatite A : qu'en est-il en 2007 ? **Virologie** 2007 ; 11 :361-9.

Article de Revue Anglophone

1. AM Roque-Afonso, D Desbois, E Dussaix. Hepatitis A virus: serology and molecular diagnostics. **Future Virology** 2010; 5: 233-42.

Communications orales nationales

- 1- V Mackiewicz, E Dussaix, MF Le Petitcorps, AM Roque-Afonso. Détection du virus de l'hépatite A dans la salive. **RICAI**, Paris 2003
- 2- V Mackiewicz, AM Roque-Afonso, P Lebraud, B Cotterel, P Santa-Ollala, E Delarocque-Astagneau, E Dussaix. Première épidémie d'hépatite A de génotype III en France. **RICAI**, Paris 2005.
- 3- L Guet, AM Roque-Afonso, V Merle, M Dubuisson, D Thillard, JM Germain, A Carbonne. Cas groupés d'hépatite A nosocomiale. **RICAI**, Paris 2008.
- 4- E Couturier, AM Roque-Afonso, MJ Letort, E dussaix, V Vaillant. Adoption internationale et hépatite A aigue, France 2008. **Journées Nationales d'Infectiologie**, Marseille 2009.

Communications orales internationales

- 1- P Santa-Ollala, AM Roque-Afonso, B Cottrelle, V Mackiewicz, E Couturier, J Beytout, E Dussaix, E Delarocque-Astagneau. Sequential saliva testing used in the investigation of hepatitis A outbreak. Auvergne (France), December 2004. **International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Diseases (ISVHLD)**, Paris, 2006.
- 2- Gallot C, Grout L, Roque-Afonso AM, Couturier E, Carrillo P, Pouey J, Agbessi A, Letort MJ, Hoppe S, Capdepon P, Saint-Martin S, Guillo-Bellanger ML, Lardon Z, De Valk H, Vaillant V. Hepatitis A outbreak

associated with semi-dried tomatoes, France, 2010. **International Conference on Emerging Infectious Diseases (ICEID)**, Atlanta, Georgia, USA, July 11 - 14, 2010.

- 3- Kamar N, Garrouste C, Haagsma EB, Garrigue V, Pischke S, Chauvet C, Dumortier J, Cannesson A, Cassuto-Viguer E, Thervet E, Conti F, Lebray P, Dalton HR, Santella R, Kanaan N, Essig M, Mousson C, Radenne S, Roque-Afonso AM, Izopet J, Rostaing L. Factors Associated with Chronic Hepatitis in Patients with Hepatitis E Virus Infection Who Have Received Solid Organ Transplants. **EASL** 2011.

Communications affichées nationales

1. AM Roque Afonso, G Rezende, M Gigou, P Rodriguez-Mathieu, D Samuel, C Féray, E Dussaix. Acute Hepatitis A : Heterogeneity of clinical presentation, Viral load and Genotypes. **RICAI**, Paris 2001.
2. V Mackiewicz, AM Roque, E Marchadier, F Beaulieux, E Dussaix. Confirmation of rare genotype II Hepatitis A Virus circulation in France. **RICAI**, Paris, 2004
3. B Roquebert, AM Roque-Afonso, D Desbois, V Mackiewicz, E Dussaix. Mise au point d'un test de mesure de l'avidité des IgG anti-hépatite A. **JFV**, Paris, 2004,
4. B Roquebert, AM Roque-Afonso, D Desbois, V Mackiewicz, E Dussaix. Intérêt d'un test de mesure de l'avidité des IgG anti-hépatite A. **JFPD**, Paris, 2004,
5. P Santa-Olalla, AM Roque-Afonso, B Cottrelle, C Drougard, E Couturier, C Lecadet-Morin, J Beytout, E Dussaix, D Levy-Bruhl, E Delarocque-Astagneau. Utilisation des tests salivaires pour l'investigation d'une épidémie d'hépatite A, Auvergne, décembre 2004. **Journées de Veille Sanitaire**, Paris 2005
6. V Mackiewicz, AM Roque-Afonso, P. Lebraud, B Cottrelle P Santa-Olalla, E. Delarocque-Astagneau, E Dussaix. Première épidémie d'hépatite A de génotype III en France. **RICAI**, Paris, 2005.
7. V Mackiewicz, AM Roque-Afonso B Cottrelle, P Lebraud, P Santa-Olalla, C Henquell, E Delarocque-Astagneau, E Dussaix. Épidémie, persistance et dissémination d'une souche de virus de l'hépatite A de génotype III en France. **JFV** ; Paris 2006.
8. E Couturier, MJ Letort, AM Roque, E Dussaix, E Delarocque-Astagneau. Hépatite aiguë A face à la déclaration obligatoire. Premier bilan d'un an de notification. **Journées Nationales d'Infectiologie (JNI)** Dijon, 2007
9. Y.Guillois-Bécel, A.Briand, E.Couturier, JC. Le Saux, A.M.Roque Afonso, S. Le Guyader, E.Dussaix, S.Le Behec. Investigation d'une épidémie d'hépatite A. Côtes d'Armor 2007. **Journées de Veille Sanitaire**. Paris 2008.
10. D Desbois, AM Roque-Afonso, P Lebraud, E Dussaix. Utilisation du papier buvard pour le diagnostic sérologique et moléculaire du virus de l'hépatite A. **RICAI**, Paris 2008.
11. Beytout J, Roque-Afonso AM, Couturier E, Cottrelle B, Laurichesse H, Henquell C, Dussaix E. La « success story » d'une souche malgache du virus de l'hépatite A implantée en Auvergne qui a conquis la France. **JNI** Lyon 2009.
12. L. Guet, D. Desbois, C. Cyvoct, M. Dubuisson, D. Thillard, E. Dussaix, AM Roque-Afonso. Cas groupés d'hépatite A d'origine nosocomiale. **JNI** Lyon 2009.
13. E. Couturier, AM. Roque-Afonso, MJ. Letort, E. Dussaix, V. Vaillant. Adoption internationale et hépatite aiguë A, France, 2008. **JNI** Lyon 2009.
14. D Desbois, E Couturier, A Graube, E Dussaix, AM Roque-Afonso. Diversité génétique d'un génotype rare du virus de l'hépatite A. **RICAI**, Paris 2009.
15. V Mackiewicz, A Cammas, E Dussaix, E Marchadier, F Beaulieux, D Samuel, S Vagner, AM Roque-Afonso. Variabilité génétique et activité traductionnelle de la région 5'non-codante du virus de l'hépatite A: Etude de souches cliniques responsables d'hépatites bénignes ou sévères. **JFHOD**, Paris 2010.
16. D Desbois, E Couturier, A Graube, MJ Letort, E Dussaix, AM Roque-Afonso. Diversité génétique d'un génotype rare du virus de l'hépatite A. **JFV**, Paris 2010.
17. D Desbois, E Couturier, A Graube, MJ Letort, E Dussaix, AM Roque-Afonso. Diversité génétique d'un génotype rare du virus de l'hépatite A. **AFEF**, Marseille 2010.
18. Lagathu G, Bardou-Jacquet E, Beusnel C, Veyer D, Roque-Afonso AM, Colimon R. Cas d'hépatites E aiguës diagnostiquées par le laboratoire de virologie au CHU de Rennes entre 2010 et 2011. **JFV** Paris 2012.
19. Mokhtari C, Marchadier E, Tessé S, Savary J, Dussaix E, Roque-Afonso AM. Evaluation de différentes techniques de détection de l'ARN du virus de l'hépatite E par RT-PCR temps-réel. **JFV** Paris 2012.
20. Haim-Boukobza S, Férey MP, Véillard AL, Péllissier E, Pelletier G, Teillet L, Roque-Afonso AM. Transmission transfusionnelle du virus de l'hépatite E. **JFV** Paris 2012.

Communications affichées internationales

1. V Mackiewicz, AM Roque-Afonso, B Cotterel, P Lebraud, P Santa-Ollala, E Delarocque-Astagneau, E Dussaix. Introduction and persistence of Type III hepatitis A strain in France. **EASL**, Vienna, 2006.
2. AM Roque-Afonso, D Desbois, E Dussaix. Prospective assessment of anti-HAV IgG avidity. **Global Hepatitis A Meeting**, Miami, 2007
3. AM Roque-Afonso, A Graube, D Simoneau, E Dussaix. Quantification of Hepatitis A virus RNA by commercial real-time assays. **Global Hepatitis A Meeting**, Miami, 2007.
4. E. Dussaix, AM. Roque-Afonso, C. Chezzi, MC. Archangeletti, F. Ferraglia, D. Leloucy, N. Lambert, C. Masson, N. Sassine. New enzyme immunoassay for the detection of total antibodies against hepatitis A virus. **Global Hepatitis A Meeting**, Miami, 2007.
5. E. Dussaix, AM. Roque-Afonso, C. Chezzi, MC. Archangeletti, F. Ferraglia, D. Leloucy, N. Lambert, C. Masson, N. Sassine. New enzyme immunoassay for the detection of IgM antibodies against hepatitis A virus. **Global Hepatitis A Meeting**, Miami, 2007.
6. Y.Guillois-Bécel, A.Briand, E.Couturier, JC. Le Saux, A.M.Roque Afonso, S. Le Guyader, E.Dussaix, S.Le Behec, A. Le Goas, J.Pernes, M.Pommepuy, V.Vaillant. An Oyster-Associated Hepatitis A outbreak in France in 2007. **International Conference on Molluscan Shellfish Safety**, Nantes, 2009.
7. J Beytout, AM Roque-Afonso, E Couturier, H Laurichesse, O Lesens, E Dussaix, C Henquell. An Hepatitis A Imported Strain Which Spread All Over France. **48th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America (IDSA)**. Vancouver, British Columbia, Canada, 2010.

Séminaires et conférences invités

1. 2005 Nouveaux outils de diagnostic et de suivi épidémiologique de l'hépatite A. Colloque franco-tunisien sur les virus à transmission entérique. Monastir, Tunisie
2. 2008 Vaccination contre l'hépatite A. Semaine de la vaccination, Hôpital Paul Brousse, Villejuif
3. 2010, Janvier. Hépatite A : l'expérience du CNR. Hépatologie. Hôpital Cochin, Paris
4. 2011, Mars. La vaccination anti VHA. Formation Travel Santé à destination des médecins du travail
5. 2011, juin. Hépatite A, un problème réglé ? Hépatologie, Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil
6. 2011, juin. Hépatite A et E : nouveaux aspects épidémiologiques et thérapeutiques. Journées du Centre Hépatobiliaire, Paris.
7. 2011, octobre. Actualités hépatite A et E. Journée du réseau hépatites virales, Caen.
8. 2012, janvier. Actualités diagnostiques de l'hépatite A&E, Biologiste TV

11 Programme d'activité 2012 et 2013

Hépatite A

- Bilan de la déclaration obligatoire à 5 ans
 - o Evolution de l'épidémiologie moléculaire
 - o Collaboration avec l'INVS
- Caractérisation des hépatites A biphasiques
 - o le plus souvent l'ARN viral est indétectable à la 2^{nde} phase : recherche de marqueurs d'autoimmunité
 - o collaboration avec les immunologistes de St Antoine (Paris)
 - o recherche des polymorphismes du récepteur du VHA
- Caractérisation du virus recombinants obtenus par co-culture de sous-types différents

Hépatite E

- Epidémiologie moléculaire
 - o Caractérisation de la diversité génétique des souches circulant en France par l'analyse de plusieurs régions génomiques
 - o Collaboration avec le laboratoire de virologie de Toulouse, laboratoire associé au CNR pour le VHE