



HAL
open science

Évaluation des performances du test de quantification de l'ADN du virus de l'hépatite B par GeneXpert Cepheid : application dans la qualification microbiologique des dons d'organes en urgence

Jessica Cros-Labrit

► To cite this version:

Jessica Cros-Labrit. Évaluation des performances du test de quantification de l'ADN du virus de l'hépatite B par GeneXpert Cepheid : application dans la qualification microbiologique des dons d'organes en urgence. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02337418

HAL Id: dumas-02337418

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02337418>

Submitted on 29 Oct 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2019

Thèse n° 77

THESE POUR L'OBTENTION DU
DIPLÔME D'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par CROS-LABRIT Jessica

Née le 9 novembre 1991, à Champigny-sur-Marne

Le 9 septembre 2019

**EVALUATION DES PERFORMANCES DU TEST DE
QUANTIFICATION DE L'ADN DU VIRUS DE L'HEPATITE B PAR
GENEXPERT® CEPHEID : APPLICATION DANS LA
QUALIFICATION MICROBIOLOGIQUE DES DONS D'ORGANES
EN URGENCE**

Sous la direction de : Madame le Docteur Pascale TRIMOULET

Membres du jury :

Mme le Professeur Véronique DUBOIS
M. le Professeur Victor DE LEDINGHEN
Mme le Professeur Marie-Edith LAFON
Mme le Docteur Pascale TRIMOULET

Président
Juge
Juge
Juge

Remerciements

A Madame le Professeur Véronique Dubois, de me faire l'honneur de présider ce jury et d'avoir accepté de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Victor de Lédighen, vous me faites l'honneur d'apporter votre expérience à la critique de ce travail. Croyez-en mes plus sincères remerciements.

A Madame le Professeur Marie-Edith Lafon, vous avez très gentiment accepté de participer à ce jury de thèse. Je vous remercie pour votre bienveillance qui m'accompagne depuis mon semestre passé au laboratoire de Virologie.

A Madame le Docteur Pascale Trimoulet, merci d'avoir accepté de diriger ce travail de thèse. Je tiens à te remercier pour ta patience lors de mes nombreux questionnements, et pour ta bienveillance dans les conseils qui ont encadré ce travail. Cela a été un réel plaisir de travailler avec toi.

Je remercie également vivement Isabelle et Pantxika, pour leurs précieux conseils pendant mon semestre de virologie ainsi que pour l'intérêt qu'elles ont porté à ce travail.

Merci à Laureline, qui a dompté le Cobas et accepté de passer quelques échantillons... et à Marie-Jo, qui a participé aux extractions informatiques à la genèse de ce travail.

A Camille et Charly (les professionnels du nom), mes deux anges gardiens du laboratoire pendant ce travail, sans qui il aurait été beaucoup plus compliqué à réaliser. Tantôt « pipeteurs », messagers ou donneurs de sang (eh oui, c'est moche)... tout cela serait bien différent sans vous.

A Camille (il est là, le vrai paragraphe), tu es apparue dans les premiers jours de mon internat, et depuis tu as été mon guide. Pas d'histoire de gourou là-dedans, mais une magnifique amitié, indéfectible, qui s'est installée comme une évidence. Nos moments passés ensemble, d'abord à Limoges (« là où tout a commencé »), sont teintés d'une poésie que je ne peux transcrire, mais tu vois, hein. Ton « Teddy Bear » a bien grandi, et marche maintenant dans les pas de sa « Mummy Bear ». Je te souhaite le meilleur, pour toujours.

A Audrey, là aussi, l'improbable ville de Limoges a vu notre rencontre. Je pense à toi et je t'estime, un Padawan n'oublie jamais son Maître Jedi.

A Clémentine, à toi j'ai passé le flambeau, d'externe je t'ai vue devenir interne et je suis fière de ton parcours, brillant. Ta maturité m'a souvent fait m'interroger sur ton âge réel (... ?), et tes conseils m'ont toujours été précieux. J'aime nos discussions, et je te remercie pour ta patience et ton écoute. Je suis très heureuse de te compter parmi mes amis les plus chers ; je te souhaite le meilleur, avec ton Lapinou.

A Elvina et Keissy, nous nous sommes rencontrées tard pendant cet internat mais cela n'a pas empêché de lier une belle complicité... que de « Projects » nous avons élaborés ! ;-) Avec la hâte de vous retrouver, au soleil... Vous rayonnez de positif, et je vous souhaite le meilleur, partout où vous serez.

A Cécile, nous avons partagé un semestre ensemble et j'ai pu découvrir ta gentillesse et ta bienveillance. Ton humour aussi, et chaque occasion de se voir reste un plaisir pour moi. Tu mérites le meilleur.

A mes anciens co-internes (y compris ceux qui ne l'ont jamais été...) : Robin, Henri, Marion, Kavish, Thibault, Jérémie, Florian, Marine, Mylène, Marie-Fleur, Sylvain, Laurie, Sarah, Camille M.

A Viviane et Christophe, vous m'avez accueillie dans votre famille avec toute votre bonté, je vous en remercie.

A Maman, je te dédie ce travail ; je ne sais comment te remercier pour ton soutien depuis toujours, c'est grâce à toi si j'ai pu réaliser ce travail, entre autres. Je t'estime pour tout ce que tu as fait, et ce pour quoi tu t'es battue. Tu es une personne magnifique et je suis fière d'être ta fille.

A Pierre, merci pour ton soutien, ta patience. Tu m'as fait grandir. On dit souvent que l'on se fait sa famille, je ne vais pas m'étendre, mais tu as compris. Merci d'être là.

A mon grand frère, Gilles, je te dédie ce travail. Je suis si fière de toi et de tout ce que tu fais. Enfant, je te voyais comme un puits de savoir, et en grandissant ça n'a pas vraiment changé : je sais que tu me battras toujours à QPUC. Merci pour ton soutien et ta présence à mes côtés. Avec Julie, vous m'avez donné la chance d'être quatre fois tatie, et ces petits êtres font tout mon bonheur.

A Charly, j'ai tant de chance d'avoir croisé ton chemin. Je ne sais comment te remercier : ton soutien et ta patience infailibles pour cette thèse bien sûr, et au quotidien. Un Grand a chanté « Le jour où quelqu'un vous aime, il fait très beau, j'peux pas mieux dire, il fait très beau ! ». Avec toi, le soleil brille, je ne dirais pas mieux.

Table des matières

Table des abréviations.....	8
Table des illustrations.....	9
Table des tableaux	11
Introduction.....	12
I. Généralités sur le virus de l'hépatite B	14
i. Taxonomie, structure du virus et de son génome.....	14
ii. Génotypes du VHB et notion de quasi espèces.....	16
iii. Physiopathologie des infections par le VHB	20
i. Cycle viral.....	20
ii. Réponse immune, atteinte hépatique	22
iv. Pouvoir pathogène du VHB	23
v. Epidémiologie	28
vi. Diagnostic biologique d'une infection par le VHB.....	33
vii. Traitement, prévention	36
II. La greffe et le don d'organes.....	42
i. Généralités sur la greffe et le don d'organes, définitions	42
ii. Cadre réglementaire, éthique	46
iii. Les risques liés au don et leur gestion.....	47
iv. Qualification microbiologique des donneurs : contexte actuel	49
v. Perspectives pour les années à venir : le plan 2017-2021	52
III. Méthodes de diagnostic « point-of-care », exemple du système Cepheid.....	53
i. Définitions	53
ii. Organisation d'une unité de laboratoire POC	53
iii. Applications en microbiologie : contexte et besoins	54
iv. La biologie moléculaire en POC.....	55
IV. Objectifs de l'étude	58
Matériels et méthodes.....	59
I. Recueil des données épidémiologiques des bilans de qualification des donneurs d'organes en EME au CHU de Bordeaux depuis 2014	59
II. Evaluation des performances.....	59
i. Matrice sélectionnée.....	59
ii. Sélection des échantillons	60

III. Détermination des charges virales VHB.....	62
i. Le Cobas 6800.....	62
ii. Le système GeneXpert®.....	63
IV. Génotypage : technique de génotypage VHB au CHU de Bordeaux.....	69
V. Analyse des résultats.....	71
Résultats.....	72
I. Etat des lieux : données épidémiologiques des bilans de qualification des donneurs d'organes en EME au CHU de Bordeaux depuis 2014.....	72
II. Evaluation des performances du test GeneXpert® CV VHB.....	77
i. Etude de la linéarité en fonction des génotypes.....	77
ii. Corrélation entre GeneXpert® et Cobas 6800.....	79
iii. Agrément entre GeneXpert® et Cobas 6800.....	79
iv. Concordance entre GeneXpert® et Cobas 6800.....	83
v. Evaluation du système GeneXpert® par l'étude des standards internes.....	83
III. Retour d'expérience au cours de l'étude et depuis la mise en place de la technique GeneXpert® CV VHB au CHU de Bordeaux.....	84
i. Utilisation et problèmes rencontrés pendant l'étude.....	84
ii. Evolution du délai de rendu des résultats de CV VHB des bilans de PMO au CHU de Bordeaux depuis la mise en place du test GeneXpert® CV VHB.....	85
iii. Résultats et dysfonctionnements rencontrés depuis la mise en place du test GeneXpert® CV VHB.....	86
Discussion.....	87
Conclusion.....	94
Annexes.....	96
ANNEXE 1 : Valeurs utilisées pour l'étude de linéarité du test HBV VL GeneXpert (en log ₁₀ UI/mL)..	96
ANNEXE 2 : Rapports détaillés Excel des régressions linéaires effectuées sur les droites de linéarité pour chaque génotype et tests statistiques des pentes.....	97
ANNEXE 3 : Valeurs brutes utilisées pour la corrélation et nature des échantillons utilisés.....	100
ANNEXE 4 : Valeurs et calculs utilisés pour l'étude d'agrément entre GeneXpert et Cobas 6800.....	102
ANNEXE 5 : Valeurs supplémentaires utilisées pour l'étude de concordance.....	104
ANNEXE 6 : Valeurs des RIQ-H et RIQ-B.....	104
Références bibliographiques.....	106

Table des abréviations

ABM : agence de la biomédecine	IFN α : interféron alpha
Ac : anticorps	INR : <i>international normalized ratio</i>
ADN : acide désoxyribonucléique	IST : infection sexuellement transmissible
ADNccc : ADN circulaire covalamment clos	IQS : <i>internal quality standard</i>
ADNdl : ADN double brin linéaire	LAM : lamivudine
ADNrc : ADN relâché circulaire	LAMP : <i>loop-mediated isothermal amplification</i>
ADV : adéfovir dipivoxil	LIH: lipémie, ictère, hémolyse
AES : accident d'exposition au sang	LOD : limite de détection
Ag : antigène	LOQ : limite de quantification
ALAT : alanine amino-transférase	LSP : paramètres spécifiques de lot
ALD : affection de longue durée	LT : lymphocyte T
ANSM : agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé	LTreg : lymphocyte T régulateur
ARN : acide ribonucléique	ME : mort encéphalique
ARNm : ARN messenger	NA : analogue nucléotidique/nucléosidique
ARNpg : ARN pré-génomique	NAAT : <i>nucleic acid amplification test</i>
ARS : agence régionale de santé	OMS : organisation mondiale de la santé
ASAT : aspartate amino-transférase	Pb : paire de bases
AVC : accident vasculaire cérébral	PCC : <i>probe check control</i>
AVE : adéquation du volume de l'échantillon	PCR : <i>polymerase chain reaction</i>
CHC : carcinome hépatocellulaire	pmh : par million d'habitants
CHU : centre hospitalier universitaire	PMO : prélèvement multi-organes
CME : commission médicale d'établissement	POC : <i>point-of-care</i>
CMV : cytomégalovirus	POCT : <i>point-of-care test</i>
Ct : <i>cycle threshold</i> (cycle seuil)	PTBM: plateau technique de biologie moléculaire
CV : charge virale	QCMD: <i>quality control for molecular diagnostics</i>
DGOS : direction générale de l'offre de soins	RIQ : référence interne quantitative
DGV : dépistage du génome viral	RUO: <i>research use only</i>
EASL : <i>european association for the study of the liver</i>	SIL : système informatique du laboratoire
EBV : Epstein-Barr virus	TAF : ténofovir alafénamide
EDTA / EDTA-PPT : éthylènediaminetétraacétique / éthylènediaminetétraacétique- <i>plasma preparation tube</i>	TBV : telbivudine
EDQM: <i>European directorate for the quality of medicines & healthcare</i>	TDF : ténofovir disoproxil fumarate
EEG : électro-encéphalogramme	UDI : usager de drogues injectables
EME : état de mort encéphalique	VHB : virus de l'hépatite B
ETV: entécavir	VHC : virus de l'hépatite C
FDA: <i>food and drug administration</i>	VIH : virus de l'immunodéficience humaine
GHP: groupe hospitalier Pellegrin	
GHT : groupement hospitalier de territoire	
HAS : haute autorité de santé	
HSH: hommes ayant des relations homosexuelles masculines	
HTLV : virus T-lymphotropique humain	
I-CORE® : <i>intelligent cooling/heating optical reaction</i>	

Table des illustrations

Figure 1: Représentation schématique de la structure du virus de l'hépatite B.....	15
Figure 2: Organisation schématique du génome du VHB et représentation des ARN messagers à l'origine des mécanismes de traduction protéique	16
Figure 3: Répartition géographique des génotypes du VHB	18
Figure 4: Cycle viral du VHB.....	21
Figure 5: Evolution de l'infection à VHB en fonction de l'âge à la contamination.....	24
Figure 6: Evolution de l'infection à VHB chez l'adulte	24
Figure 7: Histoire naturelle de l'hépatite B chronique selon la classification EASL 2017	27
Figure 8: Prévalence mondiale de l'AgHBs.....	28
Figure 9: Nombre de tests AgHBs positifs en France, 2016	29
Figure 10: Pourcentage de patients en ALD pour une hépatite B chronique en France, données SNIIRAM SNDS, 2016	29
Figure 11: Répartition des cas d'hépatite B aiguë déclarés entre 2003 et 2015 en France, par sexe et classe d'âge (N = 1575).....	30
Figure 12: Distribution par sexe et classe d'âge des personnes en ALD pour hépatite chronique B au 31 décembre 2015, France.....	30
Figure 13: Profil d'évolution habituelle des marqueurs de l'hépatite B au cours d'une hépatite aiguë B spontanément résolutive	35
Figure 14: Profil d'évolution des marqueurs au cours d'une hépatite B chronique	35
Figure 15: Algorithme de management de l'infection à VHB.....	37
Figure 16: Performance des traitements de l'hépatite B chronique, selon le statut HBe	40
Figure 17: Les besoins et possibilités en greffe d'organes	43
Figure 18: Evolution du prélèvement par type de donneur en France.....	44
Figure 19: Donneurs en état de mort encéphalique prélevés en 2015	45
Figure 20: Evolution de la répartition par âge des donneurs prélevés en EME.....	46
Figure 21: Principe de la PCR en temps réel (exemple de la technologie Taqman).....	56
Figure 22: Schéma du déroulement de l'étude.....	62
Figure 23: Automate GeneXpert® IV	63
Figure 24: Composition d'un module GeneXpert® et vue de l'intérieur d'un module GeneXpert®	64
Figure 25: Schéma d'un module et son I-CORE®	65
Figure 26: Schéma d'une cartouche.....	66
Figure 27: Nombre de bilans de qualification virologique des donneurs pour PMO reçus au Laboratoire de Virologie du CHU de Bordeaux	72
Figure 28: Origine des bilans de qualification virologique des donneurs pour PMO reçus au Laboratoire de Virologie du CHU de Bordeaux	73
Figure 29: Répartition par sexe des bilans de qualification virologique des donneurs pour PMO reçus au Laboratoire de Virologie du CHU de Bordeaux	73
Figure 30: Âge moyen des donneurs pour PMO par année et par sexe, relevé au CHU de Bordeaux .	74
Figure 31: Répartition par classes d'âges du nombre de donneurs enregistrés pour bilans de PMO au CHU de Bordeaux entre 2014 et 2018, en valeur absolue et pourcentage	75
Figure 32: Droites de linéarité obtenues pour chaque génotype du VHB avec la technique GeneXpert® et leurs coefficients de corrélation r	78

Figure 33: Etude de corrélation entre Cobas 6800 et GeneXpert® CV VHB sur 74 échantillons	79
Figure 34: Graphique de Bland-Altman représentant le niveau d'agrément entre Cobas 6800 et GeneXpert® CV VHB sur 74 échantillons.....	80
Figure 35: Graphique de Bland-Altman représentant le niveau d'agrément entre Cobas 6800 et GeneXpert® CV VHB pour les échantillons de génotypes A, B, C ou D	81
Figure 36: Graphique de Bland-Altman représentant le niveau d'agrément entre Cobas 6800 et GeneXpert® CV VHB pour les échantillons de génotypes E, F, G ou H.....	82
Figure 37: Moyennes mensuelles des délais de rendu en heures des CV VHB pour bilans de PMO au CHU de Bordeaux de janvier 2018 à mai 2019.....	85

Table des tableaux

Tableau 1: Résumé des cas d'application des greffes dérogatoires	51
Tableau 2: CV des échantillons primaires de génotype VHB connu utilisés pour l'étude de linéarité	60
Tableau 3: Programme de la PCR nichée pour le génotypage du VHB au CHU de Bordeaux .	70
Tableau 4: Principales mutations de résistance aux antiviraux et leur interprétation.....	70
Tableau 5: Profils sérologiques positifs rencontrés dans les bilans de PMO reçus au CHU de Bordeaux entre 2014 et 2017	76
Tableau 6: Comparaison des résultats obtenus entre Cobas 6800 et GeneXpert® CV VHB....	83
Tableau 7: Données de reproductibilité des standards internes GeneXpert® sur 98 cartouches	84

Introduction

L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) est l'infection virale chronique la plus répandue dans le monde, avec 257 millions de personnes atteintes en 2015 (1). On estime que 30% de la population mondiale a été ou est en contact avec le virus, et ce, malgré l'existence d'un vaccin efficace. L'hépatite chronique B est une pathologie grave, pouvant être mortelle si elle évolue vers la décompensation d'une cirrhose ou la survenue d'un carcinome hépatocellulaire (CHC). Entre 1990 et 2013, la mortalité liée aux infections par le VHB a augmenté de 33% (2) et on estime à 686 000 le nombre de décès dus à leurs complications chaque année (3). C'est pourquoi l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) place la lutte contre les hépatites virales, et notamment l'hépatite B, sur la liste des combats prioritaires à mener pour la santé publique. Parmi ses objectifs, l'accès aux soins est une priorité, mais afin de pouvoir entamer une prise en charge adaptée à chaque cas, il est indispensable de disposer de solutions de dépistage et de diagnostic efficaces, précises et accessibles (4).

Issue des progrès technologiques de ces dernières décennies, la biologie moléculaire a permis de réduire les imprécisions parfois rencontrées avec les techniques de sérologie, en particulier en cas d'infections très récentes ou d'infections à virus mutants (5–7). C'est pourquoi la détection et la quantification du génome du VHB font désormais partie des analyses indispensables au bilan diagnostique et thérapeutique de l'infection à VHB. Cependant, ces techniques sont lourdes à mettre en œuvre et demandent des compétences ainsi qu'une organisation spécifiques au sein d'un laboratoire. Elles restent donc réservées à des centres de pointe, comme les CHU, mais même dans ces structures elles ne sont pas adaptées à une utilisation en urgence car elles nécessitent un personnel qualifié sachant utiliser un matériel spécifique adapté à une utilisation en séries mais pas à la réalisation de tests unitaires.

Or, aujourd'hui, la réglementation française impose la détection de certains génomes viraux en urgence dans des cas très particuliers. C'est le cas des bilans de qualification des donneurs d'organes en état de mort encéphalique, avec la nécessité de détection et de

quantification de l'ARN du virus de l'hépatite C (VHC), de l'ARN du VIH-1 et de l'ADN du VHB en urgence (8). L'ajout de la biologie moléculaire au panel d'analyses effectuées avant le don permet d'avoir une approche plus précise du statut infectieux du donneur et donc du risque associé, afin d'élargir le recrutement de donneurs possibles tout en garantissant la sécurité de la greffe à venir.

Depuis quelques années, les tests de laboratoire dits « point-of-care » sont en pleine expansion, en particulier dans le domaine de la microbiologie. Ces tests ont pour vocation de fournir des résultats rapides, généralement en moins de deux heures, et sont réalisables à proximité directe du patient par du personnel non nécessairement formé aux techniques de laboratoire. Plus récemment, de nouveaux automates ont été développés avec pour objectif de transposer le principe de test point-of-care au domaine de la biologie moléculaire. Ces nouveaux outils permettent un accès facilité à des techniques moléculaires de pointe, autrefois réservées à un personnel qualifié, et sont donc utilisables facilement en situation d'urgence, à toute heure et tous les jours de l'année. Ils se présentent sous la forme de tests unitaires, en cartouches fermées, réduisant ainsi le risque de contaminations quel que soit l'endroit où le test est réalisé. Leur utilisation paraît donc indiquée pour la réalisation des bilans de qualification des donneurs d'organes en état de mort encéphalique, bien qu'elle ne soit pas encore approuvée dans cette indication.

Lors de ce travail, nous avons eu l'opportunité de tester une nouvelle trousse de biologie moléculaire « point-of-care » pour la détection et la quantification du génome du VHB avant sa commercialisation par la société Cepheid®. Nous avons évalué les performances de ce nouveau réactif ainsi que ses modalités d'utilisation afin de démontrer l'utilité de sa mise en place au Laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux dans le cadre du bilan de qualification microbiologique des donneurs d'organes en urgence.

I. Généralités sur le virus de l'hépatite B

i. Taxonomie, structure du virus et de son génome

Taxonomie :

Le virus de l'hépatite B est un virus à ADN exclusivement humain appartenant à la famille des *Hepadnaviridae* et au genre *Orthohepadnavirus*, découvert en 1965 par Samuel Blumberg (9).

Structure du virus :

La particule infectante, appelée « particule de Dane » est de forme sphérique et mesure de 42 à 47 nm de diamètre (10). Elle se compose d'une enveloppe entourant une capsid contenant elle-même une molécule d'ADN, une polymérase virale et différentes protéines virales.

L'enveloppe lipoprotéique porte l'antigène de surface HBs (AgHBs). Elle est issue de la membrane du réticulum endoplasmique et des corps multi-vésiculaires de l'hépatocyte infecté lors du bourgeonnement de la particule virale dans leur lumière. Sa particularité réside dans la proportion importante de protéines d'enveloppe qui la constituent, conférant au VHB une certaine résistance en dehors de l'organisme hôte en dépit de son caractère enveloppé. On peut également trouver dans le sérum des particules d'enveloppe vides produites en excès par rapport aux particules infectieuses, les pseudo-particules virales (11).

La capsid, de symétrie icosaédrique, porte la protéine core ou antigène HBc (AgHBc), non détecté dans le sérum par les techniques de diagnostic biologique. A l'intérieur de cette capsid se trouve le génome viral. Il consiste en une molécule d'ADN partiellement bicaténaire, le brin de polarité négative étant le plus long (environ 3200 bases) (12). Le brin positif chevauche les extrémités du brin négatif, conférant à la molécule d'ADN une conformation pseudo-circulaire dont les extrémités ne sont pas liées de manière covalente, appelé ADN relâché circulaire (ADNrc). Une molécule de polymérase virale est, quant à elle, liée de manière covalente par son extrémité terminale à l'extrémité 5' du brin négatif (13).

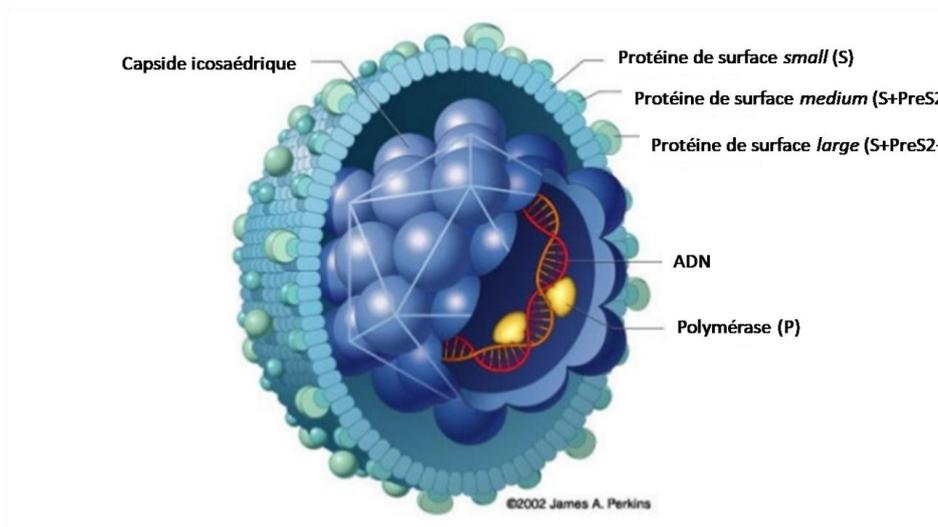


Figure 1: Représentation schématique de la structure du virus de l'hépatite B

Source : James A. Perkins, 2002

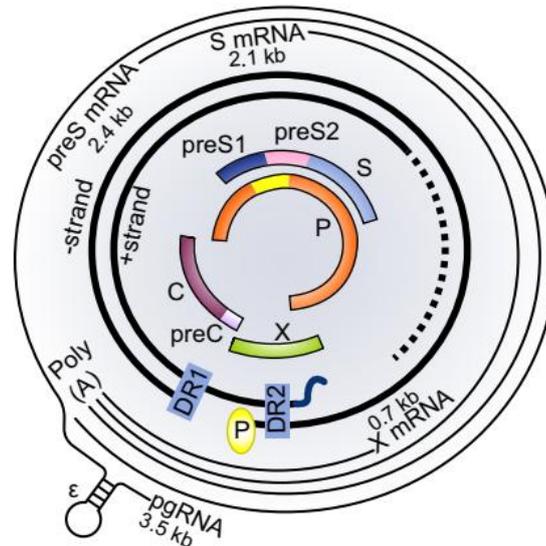
Organisation du génome :

Le génome du VHB se démarque par sa compacité, étant donnée sa petite taille (maximum 3221 pb pour le génotype A), ce qui en fait le plus petit parmi les virus à ADN. Néanmoins, il comprend 4 cadres de lecture, C, P, S, et X, ainsi que de nombreux éléments de régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle. Les 4 cadres de lecture codent pour les protéines suivantes :

- C : code pour la protéine core et l'antigène HBe (AgHBe, domaines core et précore)
- P : pour la polymérase virale
- S : pour les protéines de surface (avec les domaines préS1, préS2 et S)
- X : pour la protéine X

On comprendra facilement que ce génome se doit d'être doté de propriétés particulières afin d'assurer la réplication et les fonctions virales dans un espace restreint. Les cadres de lecture nécessitent d'être chevauchants sur les deux tiers du génome (figure 2) et chaque nucléotide est codant. Les utilisations alternatives des codons d'initiation au niveau des gènes préS1, préS2 et S du gène d'enveloppe génèrent trois types de protéines d'enveloppe : une « grande » ou *large* issue de la traduction de préS1, préS2 et S, une « moyenne » ou *medium*, issue de préS2 et S et une « petite » ou *small* venant de S seul. De la même façon, l'expression des protéines core et précore dépend de l'initiation de la

traduction depuis le codon AUG du core ou du précore, respectivement. Les promoteurs et « *enhancers* » nécessaires à la génération des transcrits viraux recouvrent aussi partiellement les séquences codantes. Avec la protéine HBx, produit du gène X, qui agit comme un faible activateur transcriptionnel (14,15), ils stimulent la production des quatre ARN viraux polyadénylés de 3.5, 2.4, 2.1 et 0.7 kb.



DR1, DR2 : direct repeat sequences (réplication et circularisation du génome)

Figure 2: Organisation schématique du génome du VHB et représentation des ARN messagers à l'origine des mécanismes de traduction protéique

Source : Tong et Reville, 2016

ii. Génotypes du VHB et notion de quasi espèces

Génotypes :

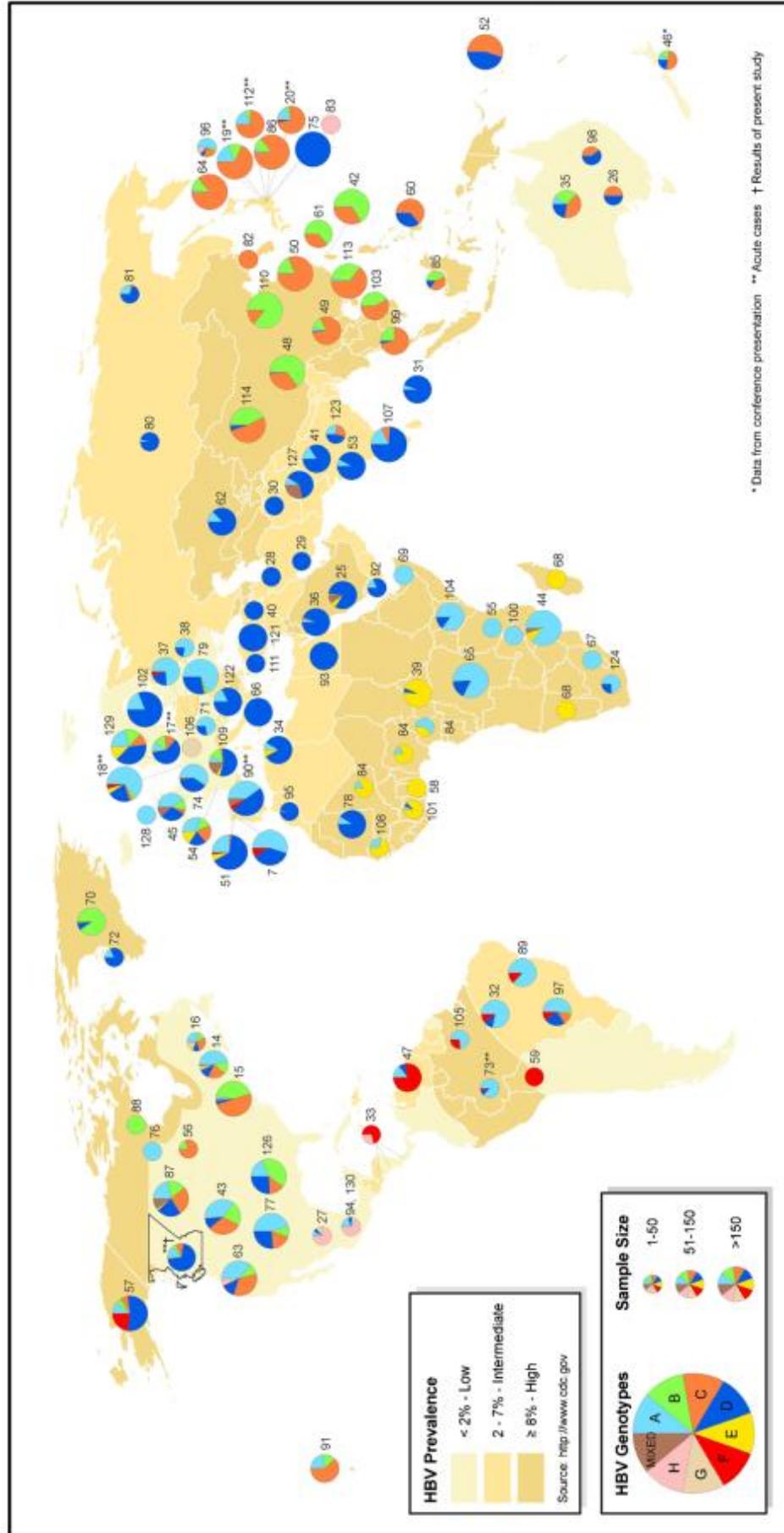
La comparaison des différents génomes connus de VHB permet de définir à ce jour 8 génotypes, nommés de A à H. Leur classement se fait en fonction du pourcentage d'homologie nucléotidique sur l'ensemble du génome : il est admis que les souches de même génotype ont une divergence inférieure à 8%. On décrit également des sous-types regroupant les souches ayant une divergence inférieure à 4% (16,17). La divergence globale entre tous les génotypes est d'environ 12%, les génotypes F et H étant les plus divergents par rapport aux autres. Il semblerait également qu'il existe une plus grande homologie entre ces deux génotypes et d'autres *Hepadnaviridae* de chauve-souris sud-américaines qu'avec

les autres génotypes humains ; ceci suggèrerait une potentielle rupture de barrière d'espèce pour le VHB (18). Les génotypes B et C sont les plus proches l'un de l'autre ; il en est de même pour les génotypes D et E pour lesquels une délétion dans le domaine préS1 les dote des génomes les plus courts.

Les 8 génotypes se distinguent notamment par leur distribution géographique : le génotype D a la prévalence la plus élevée et est présent sur tous les continents mais majoritaire en Inde, au Moyen Orient et en Afrique du Nord. Le génotype A domine en Europe, en Amérique du Nord et est présent partout en Afrique et en Inde. Il existe une plus grande divergence de souches de génotype A en Afrique, suggérant qu'il y est plus anciennement établi qu'en Europe où son émergence date de 500 à 1000 ans. Le génotype G, souvent retrouvé en association avec le génotype A, est présent en Europe et en Amérique du nord. Les génotypes B et C sont majoritaires en Chine, en Asie du sud-est et en Océanie, tandis que le F est retrouvé en Amérique. Le génotype E a la prévalence la plus élevée en Afrique subsaharienne mais il reste minoritaire dans les populations américaines descendant de l'importation d'esclaves africains, principalement infectées par le génotype A : ceci suggère que le génotype E se serait implanté en Afrique il y a moins de 200 ans. Le génotype H se rencontre quant à lui dans une zone géographique très restreinte, à savoir en Amérique centrale et en Amazonie.

Des recombinaisons inter-génotypiques ont été décrites et certains auteurs suggèrent l'existence de deux « nouveaux » génotypes possiblement issus de ces recombinaisons qui sont provisoirement dénommés génotypes I et J (19,20). Ces deux entités ont été décrites en Asie, mais l'affirmation de leur existence est toujours débattue au sein de la communauté scientifique. Le putatif génotype I serait une recombinaison des génotypes A, C et G, isolée au Vietnam et au Laos (21,22). Les quatre souches vietnamiennes isolées variaient seulement de $7 \pm 0.4\%$ par rapport aux sous-génotypes C1 et C5, soit moins que les 8% de différence nécessaires à la définition d'un génotype à part entière. Concernant le génotype J, il a été isolé de patients sur les îles japonaises de Ryukyu. En considérant la séquence entière de son génome, il présente une différence de 9.9 à 16.5% par rapport aux 8 génotypes humains et aux 4 HBV de primates (chimpanzé, gorille, gibbon, et orang-outang) (20). Leur prise en compte dans les classifications du VHB est encore controversée.

Figure 3: Répartition géographique des génotypes du VHB
Source : Osiowy et al., 2016 (23)



Quasi-espèces :

Outre ces différents génotypes, le VHB se présente sous forme d'une quasi-espèce virale, c'est-à-dire de sous-populations virales pouvant se répliquer et coexister au sein d'un même hôte, à l'instar d'autres virus ayant une étape de rétro-transcription dans leur cycle comme le VIH ou d'autres rétrovirus. En effet, l'émergence de cette quasi-espèce se fait à la faveur des erreurs de répllication et d'une correction défailante par la polymérase virale (24). Le génome viral présente, en conséquence, de nombreuses mutations pouvant affecter plusieurs cadres ouverts de lecture en raison du chevauchement de certains gènes comme précédemment décrit. En réalité, un patient n'est donc pas infecté par un VHB d'un certain génome, mais par un « pool viral », constitué de plusieurs virus différents par quelques mutations, substitutions ou délétions génomiques, coexistant sous forme d'une quasi-espèce. Chaque « type viral » ainsi formé possède ses propres caractéristiques de *fitness*, de résistance aux antiviraux ou d'échappement au système immunitaire. Il s'établit un équilibre constant entre hôte et réponse immune, complexe et délicat à appréhender du fait de l'existence de cette quasi-espèce (25). La compréhension de la physiopathologie de l'infection à VHB ne peut se faire sans prendre en compte cette notion qui a une influence non négligeable sur les capacités de répllication virale, l'émergence et la sélection des mutants résistants aux antiviraux et donc l'évolution de la maladie. Il est admis que des mutants résistants aux antiviraux émergent de ce pool de quasi-espèce, préexistants à l'introduction de la pression de sélection antivirale. Par ailleurs, l'étude phylogénétique de ces quasi-espèces peut permettre de retracer les voies de transmission du virus, d'identifier des *clusters* au sein de certaines populations, notamment dans le cas des transmissions verticales. Dans certaines études, les populations virales retrouvées chez les enfants et leurs mères ont été comparées afin de déterminer « la filiation virale » entre les quasi-espèces retrouvées chez chacun. Il s'est avéré que le type de virus transmis n'est pas forcément le même, certains virus prédominants chez l'enfant ont été retrouvés minoritaires chez la mère, ou alors n'y sont pas retrouvés mais sont le résultat d'une « filiation » avec une des sous-populations virales de la mère. Cette notion est donc un outil dans l'épidémiologie infectieuse mais aussi humaine (26).

iii. Physiopathologie des infections par le VHB

i. Cycle viral

Le VHB pénètre dans les hépatocytes via son récepteur spécifique, le co-transporteur sodium taurocholate (NTCP Na^+ - *taurocholate cotransporting polypeptide*), exprimé exclusivement à la surface des hépatocytes, puis libère sa capside dans le cytoplasme. Celle-ci migre vers le noyau et y libère le complexe polymérase/ADNrc. La polymérase convertit l'ADNrc en ADNccc pour *covalently closed circular DNA* ou ADN superenroulé, qui constitue la forme intra-hépatocytaire stable du VHB. L'ADNccc sert de modèle pour la transcription des quatre ARN viraux de 3.5 kb, 2.4 kb, 2.1 kb et 0.7 kb, exportés vers le cytoplasme afin d'être traduits en protéines et de participer à la réplication de l'ADN viral (7).

Plusieurs codons d'initiation de la traduction sur un même ARN messager (ARNm) permettent de générer différentes protéines. Les ARNm de 2.4, 2.1 et 0.7 kb permettent de produire les protéines de surface S, M et L et HBx. L'ARN de 3.5 kb peut être à l'origine de la protéine pré-core/core, précurseur de l'antigène HBe (AgHBe), une protéine sécrétée non indispensable à la réplication mais critique pour l'établissement de la chronicité de l'infection. La version courte de l'ARN de 3.5 kb, l'ARN pré-génomique (ARNpg), est à l'origine de la protéine core et de la polymérase virale P.

La polymérase s'associe à l'ARNpg et à core pour former une première capside immature. Au sein de cette capside, la protéine P catalyse la synthèse du brin négatif d'ADN viral par transcription inverse à partir de l'ARNpg. L'infidélité de la transcription inverse cause un taux de mutation élevé, estimé à 10^{-3-6} substitutions par cycle de réplication. Puis l'ARNpg est en partie dégradé, la partie restante servant d'amorce pour la synthèse du brin positif d'ADN. L'élongation du brin positif est partielle et donne un brin d'ADN de taille variable pour des raisons encore mal connues, l'ADNrc. La capside ainsi mature peut être ensuite enveloppée pour donner de nouveaux virions, prêts à être libérés dans le milieu extracellulaire après passage par la membrane cytoplasmique de la cellule hôte ou retourner vers le noyau à l'intérieur duquel l'ADNrc est converti en ADNccc.

Le processus d'amplification en ADNccc permet d'assurer suffisamment de copies d'ADNccc par cellule afin de maintenir la persistance de l'infection. Des molécules d'ADN double brin linéaires (ADNdl) peuvent aussi être générées lors d'une élongation complète exceptionnelle du brin positif d'ADN. L'ADNdl est le modèle de choix pour s'intégrer au chromosome de la cellule hôte. Cette intégration ne joue pas de rôle particulier dans le cycle du VHB mais peut contribuer au développement du CHC selon le site d'intégration (19).

L'AgHBe ainsi que les pseudo-particules virales sont aussi sécrétés dans le milieu extracellulaire. Le nombre de ces particules subvirales, dépourvues de capside, dépasse de près de 1000 fois le nombre de virions et sont détectées en sérologie comme l'AgHBs. C'est cet antigène, autrefois dénommé antigène «Australia», qui a permis d'identifier l'agent causal de l'hépatite B à partir d'échantillons d'aborigènes australiens malades.

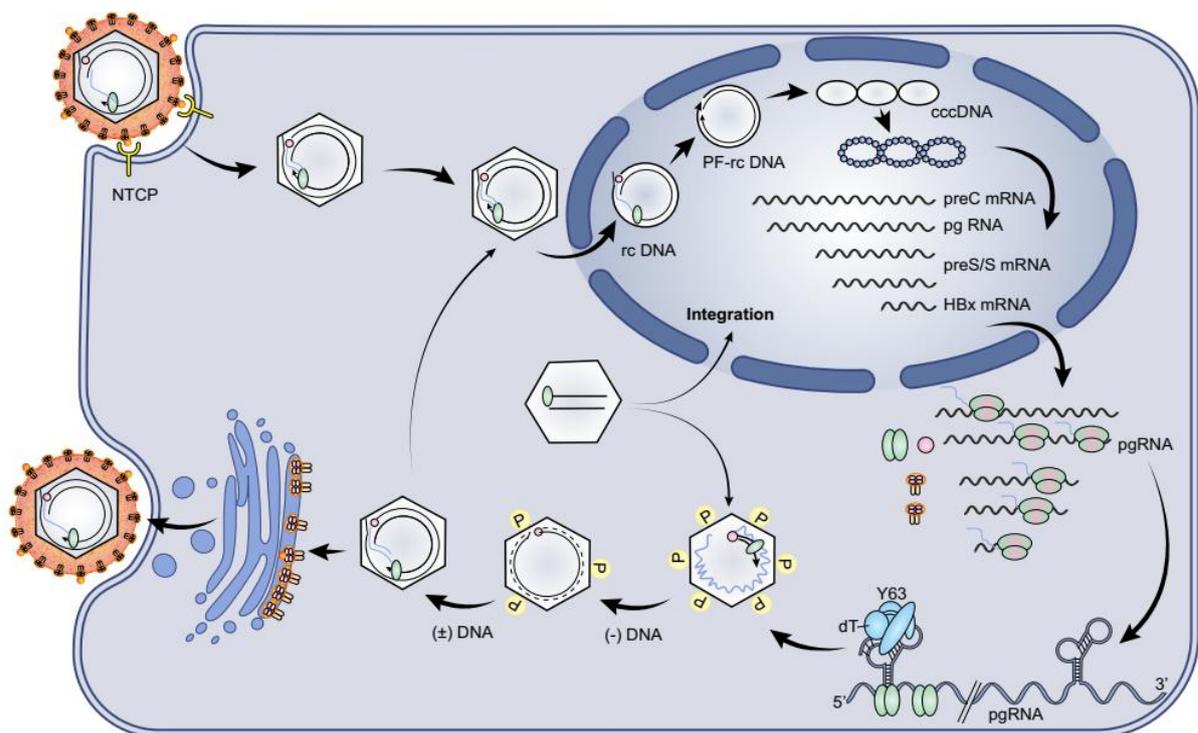


Figure 4: Cycle viral du VHB

Source : Tong et Reville, 2016

ii. Réponse immune, atteinte hépatique

Le VHB n'induit pas d'effet cytopathogène : le contrôle de l'infection et l'atteinte hépatique sont immunomédiés. L'issue de l'infection dépend donc de l'interaction complexe entre le VHB et la réponse immune de l'organisme hôte.

Environ huit semaines après la contamination, on observe une élévation des transaminases, reflétant la destruction des hépatocytes infectés par les cellules de l'immunité adaptative. Il s'agit d'une réponse cellulaire de type TH1, liée principalement à l'activité cytolytique des lymphocytes T (LT) CD8+. Les principaux épitopes reconnus ayant un effet cytolytique sont présents dans les protéines core et HBe. Il semblerait que la réponse contre les hépatocytes exprimant les épitopes spécifiques de HBe contrôle de façon plus efficace la réplication virale (27). Ainsi, cela expliquerait que les mutants n'exprimant pas HBe (mutant préC) soient sélectionnés par une pression de sélection d'origine immunologique, permettant une reprise de la réplication virale.

Puis, 2 à 3 mois après le début de l'infection, apparaît la réponse immunitaire humorale. Parmi les anticorps produits, seuls ceux dirigés contre l'AgHBs, les anticorps anti-HBs (Ac anti-HBs), sont neutralisants. Ils empêchent l'infection des hépatocytes non infectés et permettent le contrôle à long terme de l'infection par le système immunitaire (28).

Les réponses du système immunitaire au VHB peuvent avoir des effets délétères. Une réaction trop importante est supposée être à l'origine des hépatites fulminantes à VHB, ainsi que les exacerbations d'infection chronique avec ascension des transaminases (29). Certaines de ces exacerbations sont accompagnées par des diminutions importantes de la charge virale (CV) et une séroconversion du système HBe, signant une clairance immunitaire efficace des hépatocytes infectés, alors que d'autres ne donnent qu'une réduction transitoire de la CV VHB, preuve d'une réponse immunitaire inefficace. Les augmentations récurrentes des transaminases accroissent le risque de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire. Les lymphocytes T régulateurs (LTreg) jouent un rôle dans le contrôle de l'inflammation, afin qu'elle ne soit pas démesurée. Inversement, une sur-activation des LTreg serait impliquée dans l'absence de contrôle de l'infection par le système immunitaire.

Parallèlement aux signes et symptômes hépatiques, des manifestations extra-hépatiques, à type de glomérulonéphrite et de vascularite, peuvent se développer à la faveur d'un déséquilibre de la réponse immune humorale, générant des complexes immuns circulants.

iv. Pouvoir pathogène du VHB

Comme cela a été dit précédemment, le VHB n'a pas d'effet cytopathogène par lui-même, la maladie qu'il induit est principalement liée à la réponse immunitaire contre les hépatocytes infectés.

La période d'incubation dure en moyenne de 60 à 90 jours (de 24 à 180 jours) (30).

Au niveau clinique, on distingue deux versants de l'infection à VHB : l'infection aiguë et l'infection chronique.

L'infection à VHB aiguë :

L'hépatite B aiguë est le plus souvent asymptomatique, dans plus de 60% des cas, et on notera seulement des perturbations du bilan biologique hépatique ; elle est la plupart du temps spontanément résolutive. Elle peut néanmoins être symptomatique, avec les symptômes classiques des hépatites, à savoir ictère des conjonctives et muqueuses, asthénie, décoloration des selles, pour ce qui concerne la clinique, et cytolysse au niveau biologique. Moins de 1% des hépatites aiguës symptomatiques se présentent sous forme d'hépatite fulminante, très grave, nécessitant une prise en charge rapide car mettant le pronostic vital du patient en jeu (31).

L'infection chronique à VHB :

Une hépatite B chronique est définie par la persistance de l'AgHBs plus de 6 mois après l'infection aiguë. Le risque de passage à la chronicité varie selon l'âge de la vie : il est très élevé voire systématique chez le nouveau-né et le nourrisson (environ 90% des cas), reste important chez l'enfant et l'adolescent (dans 30-50% des cas) et demeure plus rare chez l'adulte, avec un passage à la chronicité estimé à 2-10% environ.

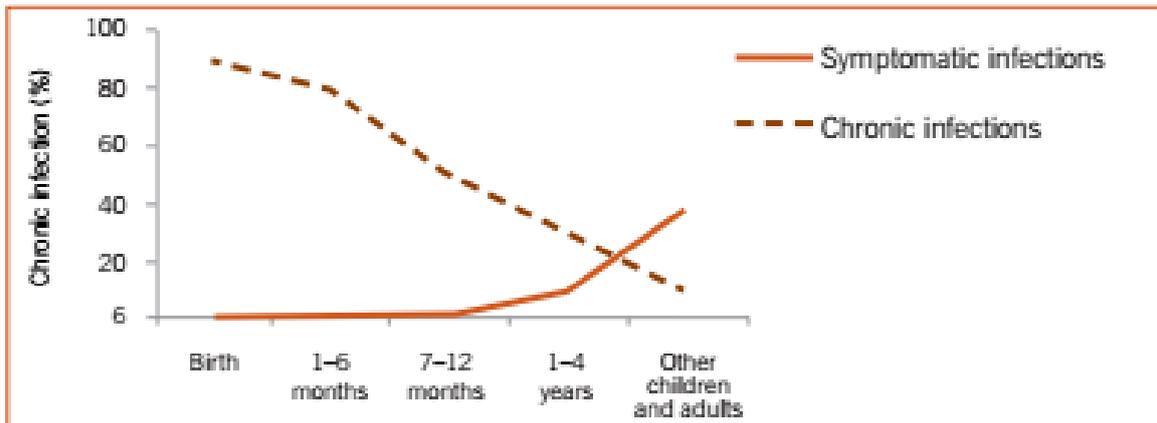


Figure 5: Evolution de l'infection à VHB en fonction de l'âge à la contamination

Source: WHO guidelines on hepatitis B and C testing, 2017

Au cours d'une hépatite B chronique, il existe un équilibre permanent entre la réponse immunitaire et la réplication virale. Ce sont les changements de cet équilibre qui définissent les différentes phases de l'infection chronique. En 2017, l'EASL (*European Association for the Study of the Liver*) a publié de nouvelles recommandations pratiques sur la gestion de l'infection par le VHB et une nouvelle classification des phases de l'infection chronique. L'histoire naturelle de l'infection chronique a été divisée schématiquement en 5 phases en se basant sur la présence de l'AgHBe, les taux d'ADN VHB, de transaminases et la présence éventuelle d'une inflammation hépatique. La nouvelle nomenclature est basée sur la description de deux principaux états lors de la chronicité : l'infection *versus* l'hépatite en tant que telle (3).

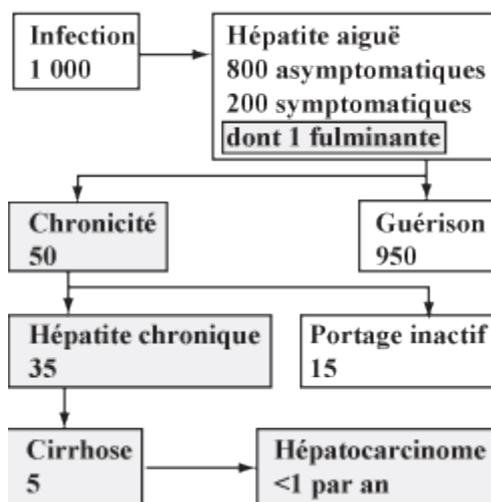


Figure 6: Evolution de l'infection à VHB chez l'adulte
Source : Huraux, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, 2008

✓ Histoire naturelle de l'infection chronique à VHB

Les cinq phases de l'infection chronique à VHB sont les suivantes (2) :

- **Phase 1** : infection VHB chronique à AgHBe positif, anciennement dénommée « phase de tolérance immune ». Elle est caractérisée par la présence de l'AgHBe sérique, de taux élevés d'ADN du VHB et la persistance des transaminases à des taux normaux. Au niveau hépatique, il n'y a pas ou peu d'inflammation ou de fibrose. En revanche, le taux d'intégration de l'ADN viral est élevé pendant cette phase, suggérant que le processus de carcinogénèse hépatique soit déjà en préparation « silencieuse ». Cette séquence est plus fréquente et dure plus longtemps chez les sujets infectés par transmission verticale ; ces patients sont hautement contagieux à cause des taux élevés d'ADN du VHB qu'ils présentent.
- **Phase 2** : hépatite B chronique à AgHBe positif, anciennement « phase de clairance immune ». Elle se définit par la présence sérique de l'AgHBe, des taux élevés d'ADN viral mais, à la différence de la phase précédente, par des taux de transaminases élevés. Dans l'hépatocyte, il existe une inflammation voire une nécro-inflammation modérée à sévère et une accélération du processus de fibrose. Elle peut arriver après plusieurs années de phase 1 et survient plus fréquemment et/ou rapidement chez les sujets infectés pendant l'âge adulte. L'issue de cette phase est variable : la plupart des patients peuvent aboutir à une séroconversion HBe et une négativation des taux d'ADN viral pour entrer dans une phase d'infection chronique AgHBe négative. D'autres peuvent ne pas parvenir à contrôler l'infection à VHB et progresser vers une phase d'hépatite B chronique à AgHBe négatif pour plusieurs années.
- **Phase 3** : infection chronique à AgHBe négatif, anciennement appelée « phase de portage inactif de l'AgHBs ». On y retrouve la présence d'Ac anti-HBe, des taux faibles voire indétectables d'ADN VHB et des taux normaux de transaminases. Dans certains cas, des valeurs de CV plus élevées peuvent être rencontrées, mais ne dépassant pas les 2000 UI/mL, toujours avec des taux d'ALAT normaux et une inflammation hépatique minime. Ces patients ont un faible risque de progression vers la cirrhose ou le carcinome hépatocellulaire s'ils restent dans cette phase. La perte de l'AgHBs ou la

séroconversion HBs peuvent spontanément apparaître dans 1 à 3% des cas. Par ailleurs, ces patients ont des taux d'AgHBs bas (< 1000 UI/mL).

- **Phase 4** : hépatite B chronique à AgHBe négatif. Elle est associée à des taux d'ADN du VHB fluctuants, modérés à élevés (mais souvent plus bas que dans les phases où l'AgHBe est présent), ainsi que des valeurs d'ALAT élevées plus ou moins constamment. L'histologie hépatique montre des tissus nécro-inflammatoires et fibrosés. La plupart de ces patients sont porteurs de virus mutants au niveau des régions précore/core qui entravent ou abolissent l'expression de l'AgHBe. Cette phase est associée à de faibles taux de rémission spontanée.
- **Phase 5** : elle correspond à la négativation de l'AgHBs, associée à la détection d'Ac anti-HBc, avec ou sans la présence d'Ac anti-HBs détectables. Elle est appelée « infection occulte à VHB ». Dans de rares cas cependant, l'absence de l'AgHBs peut être liée à un manque de sensibilité du test utilisé pour sa détection. Dans la plupart des cas, les enzymes hépatiques sont normales et la charge VHB est indétectable. Fréquemment, l'ADNccc peut néanmoins être détecté au niveau hépatique. Une perte de l'AgHBs avant la mise en place d'un processus cirrhotique est associée à un risque faible de décompensation, de cirrhose et de CHC ; en revanche, dans le cas où le processus cirrhotique aurait été enclenché avant la disparition de l'AgHBs, le patient demeure à risque de CHC, et doit pour cette raison être surveillé régulièrement. Une immunosuppression peut mener à une réactivation du VHB chez ces patients.

Il est à noter que les cinq phases de l'infection chronique à VHB ne se déroulent pas nécessairement selon la séquence décrite. De plus, malgré cette nouvelle nomenclature, le classement n'est pas toujours évident, et certains patients demeurent malgré tout dans une « zone grise » à la fin des investigations.

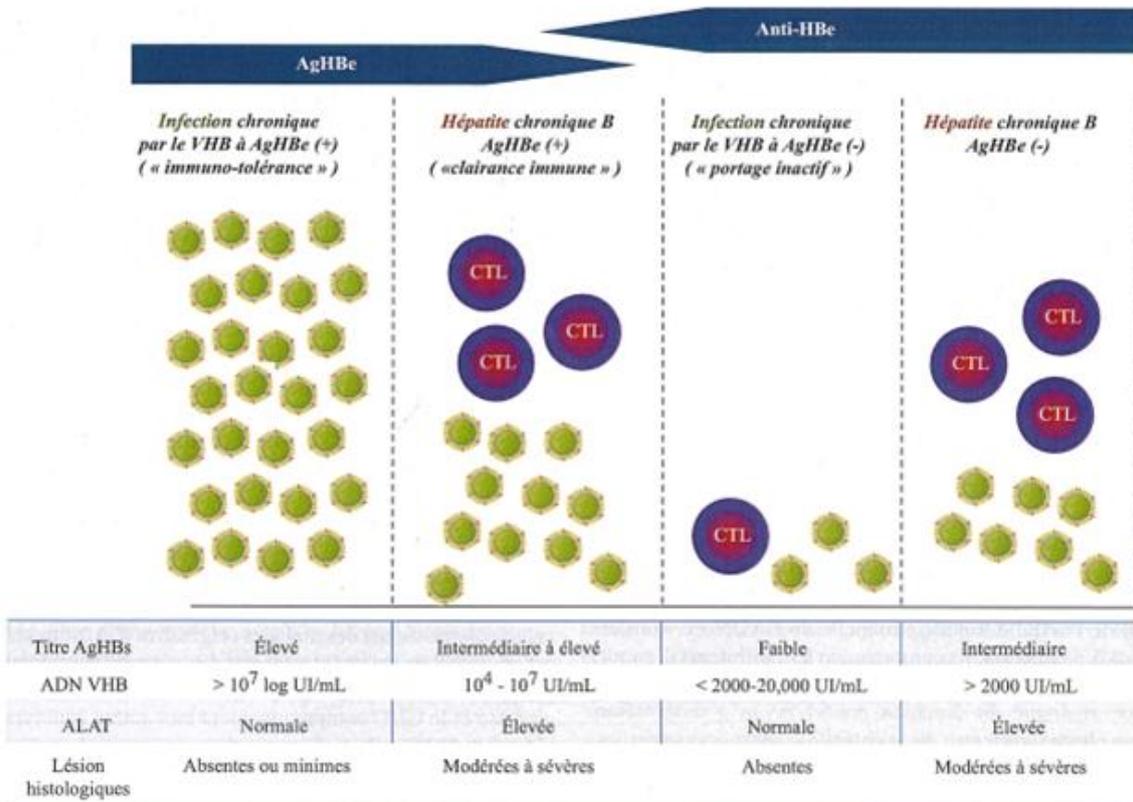


Figure 7: Histoire naturelle de l'hépatite B chronique selon la classification EASL 2017

Source : Fourati et Pawlotsky, *Virologie*, 2019 (32)

✓ Cirrhose et CHC

Chez les patients atteints d'hépatite B chronique, il est primordial d'évaluer et de surveiller le risque d'évolution vers la cirrhose et le CHC. Ce risque est variable et conditionné notamment par la réponse immunitaire de l'hôte. Parmi les patients non traités, l'incidence de la cirrhose à 5 ans est comprise entre 8% et 20%. Parmi les patients atteints de cirrhose, on estime qu'à 5 ans le risque de décompensation hépatique est de 20% et que le risque annuel de survenue d'un CHC varie de 2 à 5%. Parmi les facteurs de risque de CHC, on distingue ceux relatifs à l'hôte, parmi lesquels la cirrhose, l'inflammation hépatique chronique, un âge avancé, le sexe masculin, l'origine africaine, l'abus d'alcool, l'immunodépression, le diabète, le tabagisme actif... et les facteurs dépendants du virus lui-même à savoir des taux élevés d'ADN viral et/ou d'AgHBs (reliés aussi à la réponse immunitaire de l'hôte), un virus de génotype C, des mutations spécifiques (précore/core). Des scores ont été élaborés et sont toujours en développement afin de prédire le risque de CHC chez les patients atteints d'hépatite B chronique.

v. Epidémiologie

Mondiale :

Selon le rapport de l'OMS 2017, environ 2 milliards de personnes ont eu ou ont une infection à VHB et 248 millions sont porteuses chroniques de l'AgHBs, en particulier dans les pays en voie de développement. La séroprévalence de l'AgHBs varie selon la zone géographique : les plus fortes prévalences sont observées en Afrique sub-saharienne, en Asie du Sud-Est, dans certaines îles du Pacifique et dans le bassin amazonien d'Amérique du Sud. Les plus faibles prévalences sont retrouvées en Amérique centrale et du nord et en Europe occidentale (figure 8).

Chaque année, l'OMS estime qu'environ 686 000 personnes meurent des complications d'une infection chronique par le VHB. Parmi ces complications, on compte environ 45% de carcinomes hépatocellulaires et 30% de cirrhoses. Ces proportions sont encore majorées dans les pays en voie de développement.

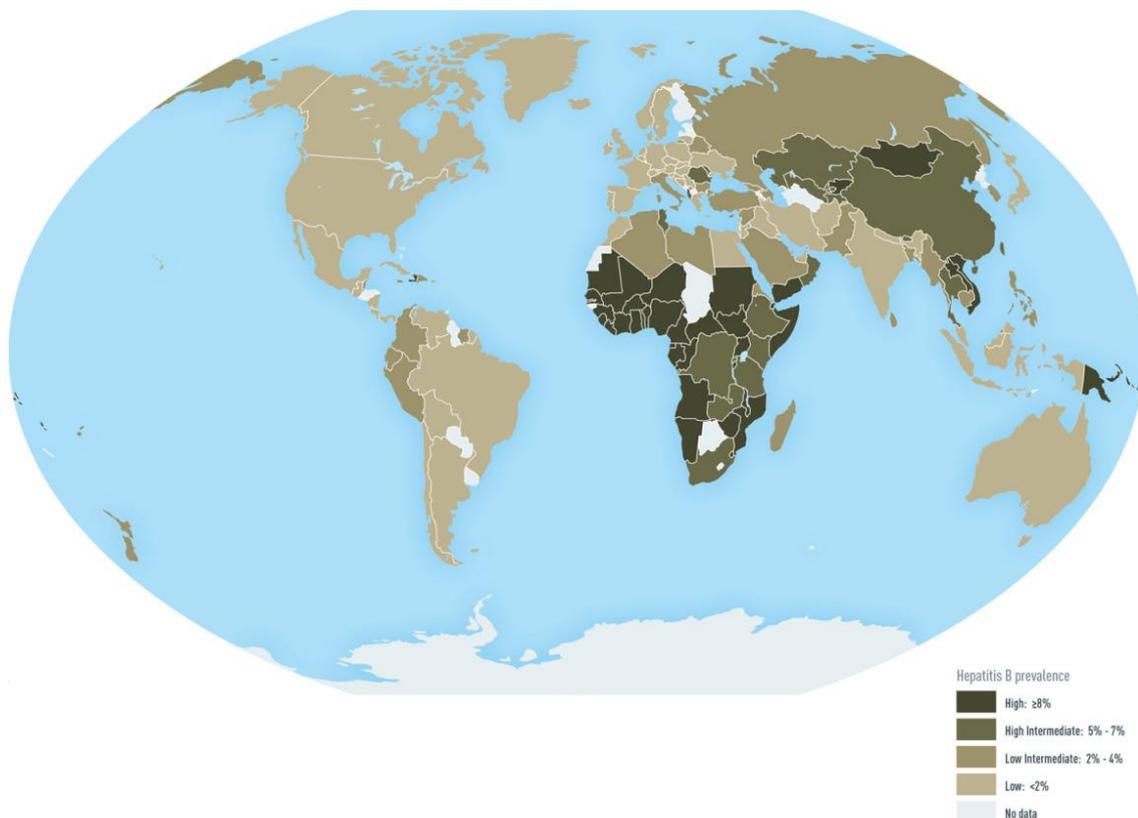


Figure 8: Prévalence mondiale de l'AgHBs

Source : Center for Disease Control, 2015

En France :

Les derniers résultats de l'enquête Labohep nous permettent de disposer des données épidémiologiques nationales françaises pour l'année 2016 (33). Sur 4,3 millions de tests de dépistage réalisés, 33962 se sont avérés positifs, soit une augmentation de 6% par rapport à l'année 2013. Les régions les plus concernées avec plus de 100 tests positifs pour 100 000 habitants sont (par ordre décroissant) Mayotte, la Guyane et l'Île-de-France.

Un peu plus de 27 000 patients sont sous ALD pour une infection chronique à VHB, soit une augmentation de 6% par rapport à 2013.

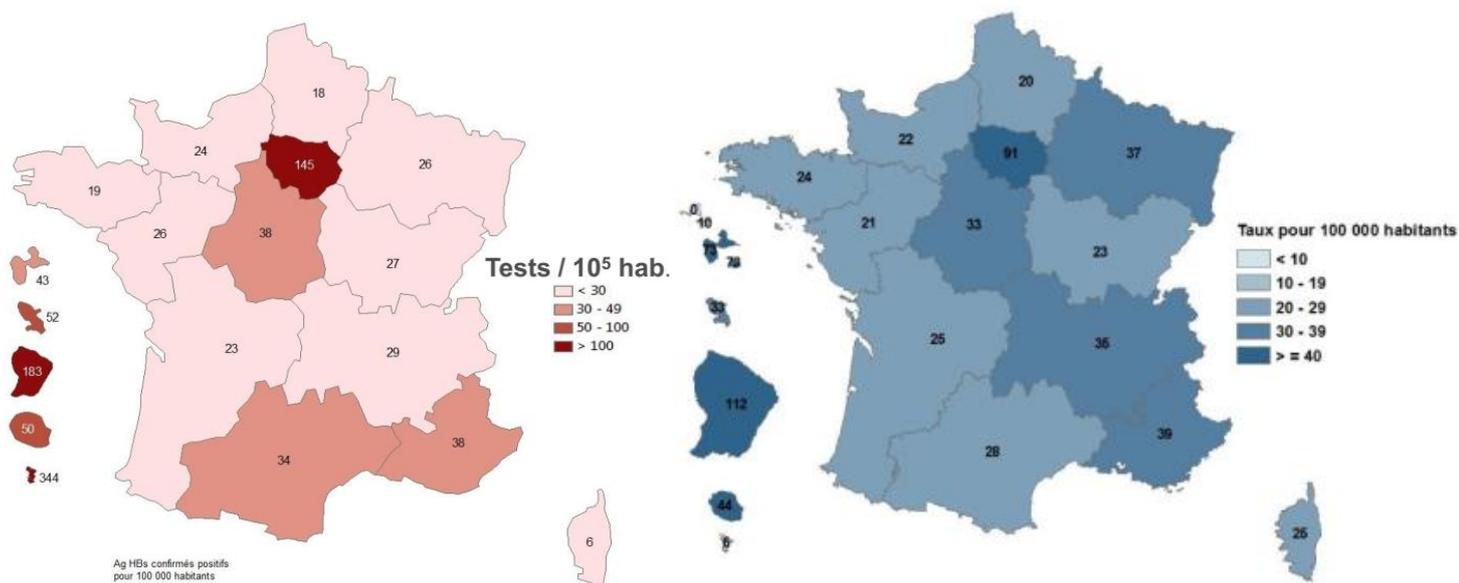


Figure 9: Nombre de tests AgHBs positifs en France, 2016

Figure 10: Pourcentage de patients en ALD pour une hépatite B chronique en France, données SNIIRAM SNDS, 2016

Source : Vaux et al., 2018

En tenant compte des données de la déclaration obligatoire (figure 11), les hépatites B aiguës surviennent en majorité chez les hommes, avec un sex-ratio H/F de 2,6. L'âge médian est de 39 ans, avec une prédominance des classes des 30-39 ans et 40-49 ans.

En 2015, 66% des personnes en ALD pour une hépatite B chronique étaient des hommes. Les classes d'âges les plus représentées étaient les 40-49 ans et les 50-59 ans dans cette population. Les femmes sont généralement plus jeunes, avec une majorité des femmes en ALD situées dans les classes des 30-39 ans et 40-49 ans.

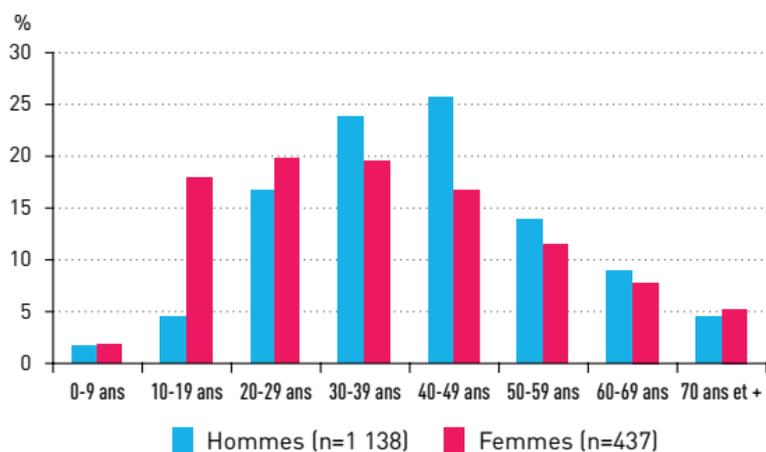
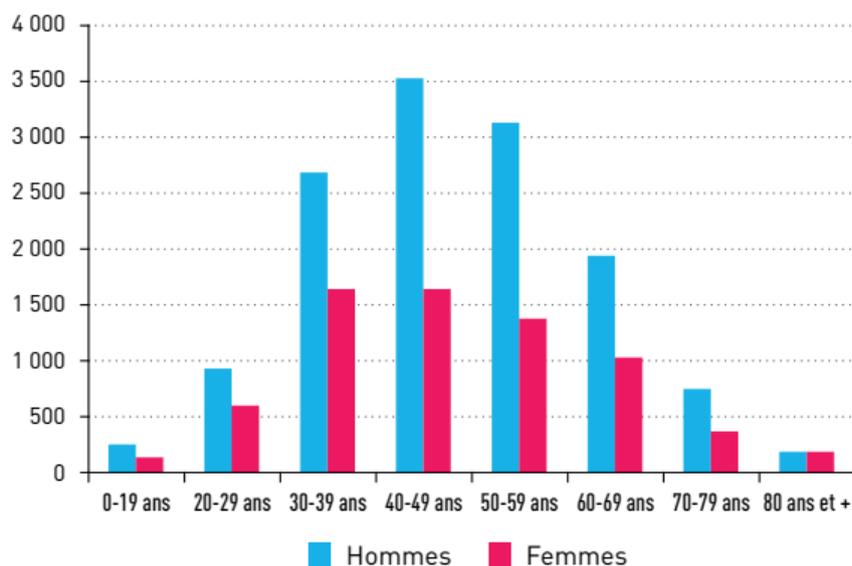


Figure 11: Répartition des cas d'hépatite B aiguë déclarés entre 2003 et 2015 en France, par sexe et classe d'âge (N = 1575)

Source : Santé publique France (SPF), 2017



Sources : Sniiram, régime général et sections locales mutualistes, France entière. Exploitation : Santé publique France.

Figure 12: Distribution par sexe et classe d'âge des personnes en ALD pour hépatite chronique B au 31 décembre 2015, France

Source : Sniiram et SPF, 2017

Parmi les populations à risque, la prévalence de l'AgHBs a été étudiée chez les femmes enceintes : parmi les 0,8% de femmes porteuses de l'AgHBs, 13% étaient également séropositives pour le VIH et un peu plus de 5% étaient nées dans un pays de forte endémicité. Au sein de la population homosexuelle masculine (HSH), la prévalence de l'AgHBs est de 0,6% (1,5% pour les personnes séropositives pour le VIH), 63% déclarent être vaccinés contre l'hépatite B (65% parmi les personnes VIH+), contre 47% dans la population générale des adultes vivant en France métropolitaine.

Modes de transmission :

En règle générale, la contagiosité est maximale entre 1 et 3 mois après le contagement et persiste tant que l'ADN du VHB est détectable dans le sang.

Par ailleurs, le VHB peut survivre en dehors du corps humain pendant minimum 7 jours, sur une surface inerte à température ambiante ; cela lui confère une capacité de transmission facilitée par comparaison avec d'autres virus comme le VIH. On le trouve dans les différents fluides corporels tels que le sang, mais aussi le sperme, les sécrétions menstruelles ou vaginales, la salive. Ainsi on distingue trois principaux modes de transmission du VHB (1) :

- La transmission sexuelle qui est le mode de transmission le plus prévalent dans les zones de faible endémicité, comme la France. Elle peut avoir lieu lors de rapports non protégés entre une personne infectée et une personne non vaccinée, par passage du virus au travers des muqueuses lésées ou non. Le virus peut être alors véhiculé par la salive, les écoulements menstruels et les sécrétions vaginales et séminales. En France, une exposition sexuelle est rapportée dans 56% des cas, avec le plus souvent des relations non protégées avec des partenaires multiples ou des relations HSH (34).

- La transmission sanguine, par « piqûre » : suite à un AES, le taux de transmission varie de 6 à 30% en fonction de la CV. Il est environ dix fois plus faible après exposition sur muqueuse ou sur peau lésée, que par voie transcutanée. De façon anecdotique, de rares cas de transmission du VHB par morsure ont été documentés. Outre les AES, la transmission sanguine peut se faire par partage de matériel d'injection chez les usagers de drogues intraveineuses (UDI), ou par transfusion, ce qui est devenu exceptionnel en France, avec un risque résiduel estimé à 1/1350000 dons de 2008 à 2010.

- La transmission verticale, mère-enfant : c'est le mode de transmission le plus fréquent dans les pays de forte endémicité. Elle peut survenir lors de l'accouchement et varie de 25 à 90% en fonction du niveau de réplication virale chez la mère. Le taux de transmission est fortement diminué en cas de sérovaccination à la naissance et quasi nul si la mère est traitée efficacement pendant le dernier trimestre de la grossesse.

Une transmission horizontale peut également être rencontrée dans le cas des transmissions intrafamiliales. Elle est souvent rencontrée chez les jeunes enfants en zone d'endémie, participant à la prévalence élevée d'hépatite B chronicisées dans les premières années de vie. Le virus peut se transmettre au contact de la peau lésée ou des muqueuses avec d'autres fluides corporels tels que les larmes, la salive, le sang. La transmission *via* le partage d'objets intimes tels que brosse à dents, linge de toilette, rasoir est aussi possible. Bien que souvent rencontré chez le jeune enfant en zone d'endémie, ce type de transmission est possible à tout âge (35).

Facteurs de risque :

Du fait de sa capacité à se transmettre par voie sexuelle, l'infection à VHB partage les mêmes facteurs de risque de contamination que les autres infections sexuellement transmissibles (IST), avec notamment la multiplicité des partenaires sexuels, les pratiques homo/bisexuelles ou l'infection par d'autres IST, en particulier par le VIH ou le VHC. Parmi les autres facteurs de risque relatifs aux transmissions sanguine et verticale, on peut lister :

- L'usage de drogues injectables ou intra-nasales,
- L'incarcération,
- Les tatouages avec effraction cutanée, les piercings,
- Etre originaire d'une zone d'endémie haute ou moyenne,
- Le portage du VHB dans l'entourage.

Les transfusions répétées ou l'administration de médicaments dérivés du sang sont devenus des facteurs de risques beaucoup plus anecdotiques à l'heure actuelle, grâce aux méthodes de décontamination et au dépistage génomique viral des produits sanguins à usage thérapeutique.

vi. Diagnostic biologique d'une infection par le VHB

Dépistage :

Le dépistage est obligatoire pour les donneurs de sang, d'organes, de tissus ou de cellules et les femmes enceintes.

Il est recommandé pour les populations à risque tels que :

- Les sujets contacts d'un malade atteint d'hépatite B
- Devant une augmentation non expliquée des transaminases
- Les sujets ayant les facteurs de risque évoqués précédemment.

Chez ces personnes, le dépistage de l'infection se fait par la combinaison de méthodes diagnostiques directes et indirectes, via les marqueurs sérologiques. Ils comprennent la détection d'antigènes spécifiques du VHB ainsi que d'anticorps produits par l'hôte (3).

Marqueurs sérologiques :

Les marqueurs utilisés à ce jour dans le dépistage et le suivi d'une infection à VHB sont:

- L'AgHBs : c'est le marqueur phare de tout dépistage d'infection à VHB. La fenêtre sérologique, temps défini entre le contagement et la détection de l'AgHBs est estimée à 38 jours en moyenne. Sa présence signe une infection en cours, elle devient chronique si l'AgHBs persiste au-delà de 6 mois. La nomenclature prévoit une cotation à part entière dans le cadre du suivi de la grossesse, dans les autres indications, la recherche de l'AgHBs doit désormais être prescrite en association avec d'autres marqueurs sérologiques, même dans le cadre du dépistage simple.
- Les Ac anti-HBs : seuls anticorps neutralisants, leur présence équivaut à une protection vis-à-vis du virus soit par la vaccination s'ils sont seuls, soit suite à une guérison lorsqu'ils sont associés aux Ac anti-HBc. Ils apparaissent en 3 à 6 mois lors d'une hépatite B aiguë résolutive.
- Les Ac anti-HBc (totaux) : indiquent un contact, ancien ou présent avec le VHB. Ils apparaissent environ 3 mois après le début de l'infection et persistent toute la vie chez l'immunocompétent.

Les trois marqueurs précédemment cités sont prescrits de façon groupée, afin de déterminer le statut sérologique d'un sujet vis-à-vis du VHB (but diagnostique) (36). En cas de résultat positif pour l'AgHBs, d'autres marqueurs sont utilisés et guident la conduite à tenir :

- Les IgM anti-HBc : leur présence signe un contact récent avec le VHB, mais ils peuvent rester détectables jusqu'à 6 mois. Leur ré-ascension peut être observée durant les phases de « réactivation » de l'infection chronique à VHB.
- L'AgHBe : indique une réplication active du virus, sauf en cas de mutant AgHBe négatif (précore/core)
- Les Ac anti-HBe : indiquent en général l'absence de réplication, mais sont aussi présents chez les mutants AgHBe négatifs avec réplication active du virus (37).

Les autres marqueurs :

Enfin, outre la détection des antigènes viraux, le diagnostic direct de l'infection repose aussi sur la détection et la quantification de l'ADN du VHB. C'est un marqueur évident de réplication, corrélé à la progression de la maladie et utile lors du bilan pré-thérapeutique et de la surveillance du traitement (38). En association à la détection de l'AgHBe et des Ac anti-HBe, l'ADN VHB est utilisé dans un but pronostique dans le suivi d'une hépatite chronique B. Il est indispensable lors d'une suspicion d'hépatite occulte devant une cytolysse inexplicée, par exemple chez un patient infecté par un virus muté sur l'AgHBs. De plus, selon la sensibilité de la méthode utilisée, l'ADN viral peut être détecté légèrement plus précocement que l'AgHBs et permet donc de réduire la fenêtre sérologique (39).

D'autres paramètres biologiques, non virologiques, sont également utilisés dans le diagnostic et le suivi de l'infection tels que les taux des transaminases, ainsi que différents scores de fibrose hépatique établis au moyen de combinaisons de paramètres biochimiques sériques (Fibrotest®, Actitest®).

Des outils non invasifs ont aussi été validés dans l'évaluation de l'atteinte hépatique au cours de l'infection à VHB chronique, tels que l'élastographie impulsionnelle (FibroScan®) (40). Cette technique permet de détecter la fibrose hépatique par estimation de l'élasticité du foie en mesurant la vitesse de propagation d'une onde de choc au travers du parenchyme hépatique (41). Elle est indiquée notamment dans l'exclusion de la fibrose et de la cirrhose

sévères chez les patients « porteurs inactifs », en remplacement de la biopsie hépatique (42).

Ces marqueurs sont utiles au dépistage, au diagnostic mais aussi au suivi et guident la prise en charge thérapeutique d'une hépatite B chronique.

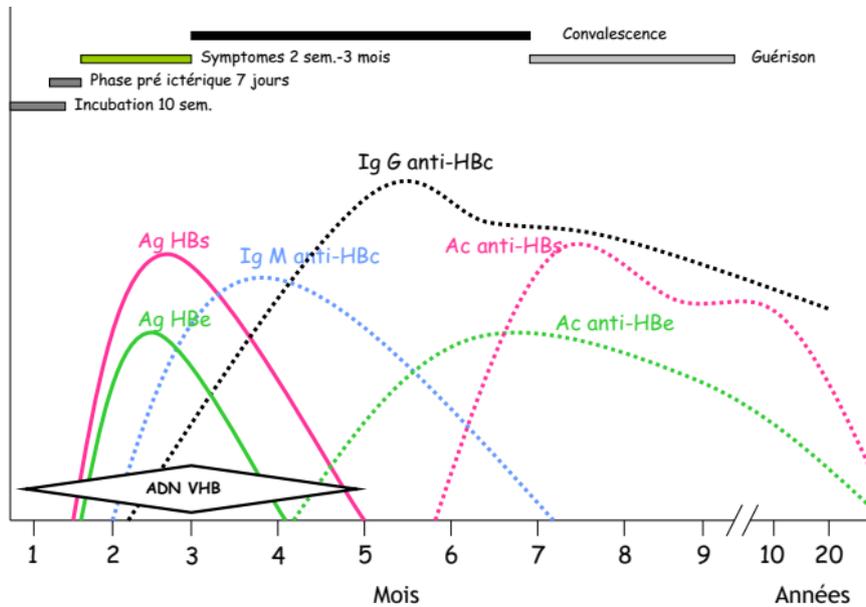


Figure 13: Profil d'évolution habituelle des marqueurs de l'hépatite B au cours d'une hépatite aiguë B spontanément résolutive

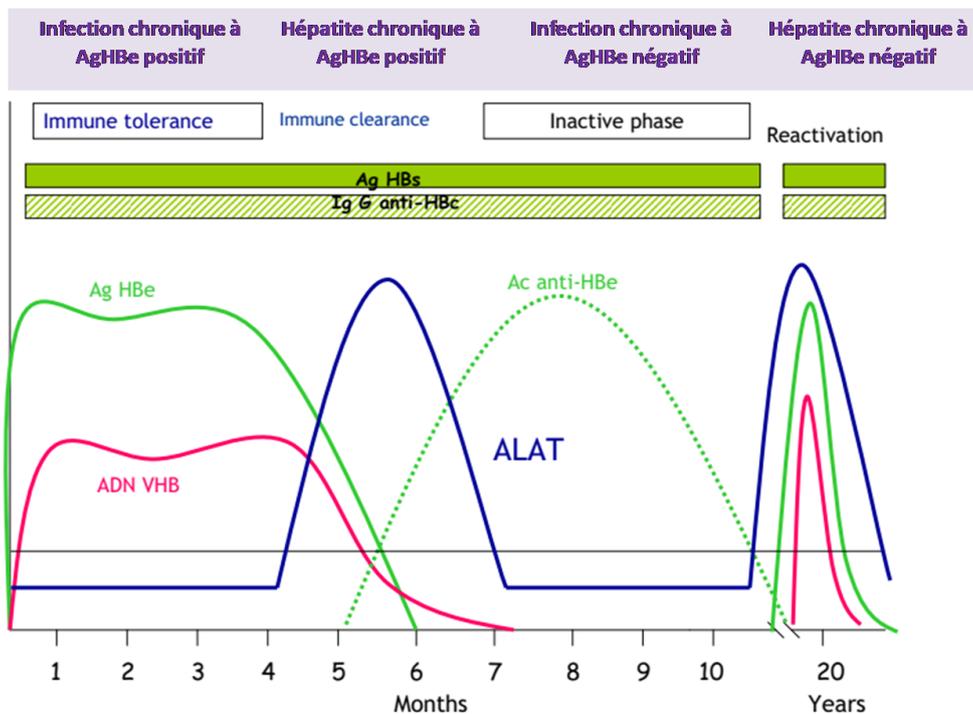


Figure 14: Profil d'évolution des marqueurs au cours d'une hépatite B chronique

(43)

vii. Traitement, prévention

Traitement :

✓ Hépatites aiguës

Les hépatites aiguës sont dans la majorité des cas spontanément résolutive et ne nécessitent qu'un traitement symptomatique. Néanmoins, on peut parfois avoir recours à un traitement spécifique dans des situations clinico-biologiques sévères telles que des anomalies de l'hémostase, définies classiquement par un INR > 1.5, la persistance de symptômes notamment l'ictère pendant plus de 4 semaines ou des signes de défaillance hépatique. Les objectifs d'un tel traitement sont de prévenir le risque de défaillance hépatique aiguë, de diminuer le risque de passage à la chronicité ainsi que de réduire la durée des symptômes associés. Le ténofovir ou l'entécavir sont habituellement utilisés, mais en cas de prise en charge trop tardive avec une atteinte hépatique avancée, la transplantation peut parfois être le seul traitement disponible.

✓ Hépatites chroniques

La mise en place d'un traitement antiviral spécifique concerne surtout les hépatites chroniques B, selon certaines indications. L'EASL a fixé dans son rapport de 2017 les indications à un traitement antiviral de l'hépatite B en se basant sur la combinaison de trois critères : la CV VHB, les taux d'ALAT sériques et la sévérité de l'atteinte hépatique (2). Les indications sont les suivantes :

- Tous les patients atteints d'hépatite B chronique (AgHBe positif ou négatif), caractérisée par une CV VHB supérieure à 2000 UI/mL, des ALAT supérieures à la normale, et/ou des signes de fibrose ou de lésions nécrotico-inflammatoires hépatiques
- Les patients atteints de cirrhose, compensée ou non
- Les patients présentant une CV VHB supérieure à 20 000 UI/mL et des ALAT supérieures à 2 fois la normale, quel que soit le degré de fibrose
- Les patients âgés de plus de 30 ans, présentant une infection chronique AgHBe positive (ALAT normales et ADN VHB élevé), quelle que soit la gravité des lésions hépatiques

- Les patients avec une infection chronique AgHBe positive ou négative, ayant des antécédents familiaux de CHC ou de cirrhose et des manifestations extra-hépatiques

La marche à suivre générale concernant la décision de traiter ou non est résumée dans la figure 15. En résumé, les hépatites B chroniques sont traitées selon les conditions présentées précédemment, alors que les infections chroniques à VHB ne le sont qu'en cas de risque accru d'évolution vers la cirrhose ou le CHC, en tenant compte de l'âge et des antécédents familiaux notamment.

Pour les patients ne répondant pas à une de ces indications, un suivi est nécessaire afin de réévaluer régulièrement la nécessité éventuelle d'une mise sous traitement.

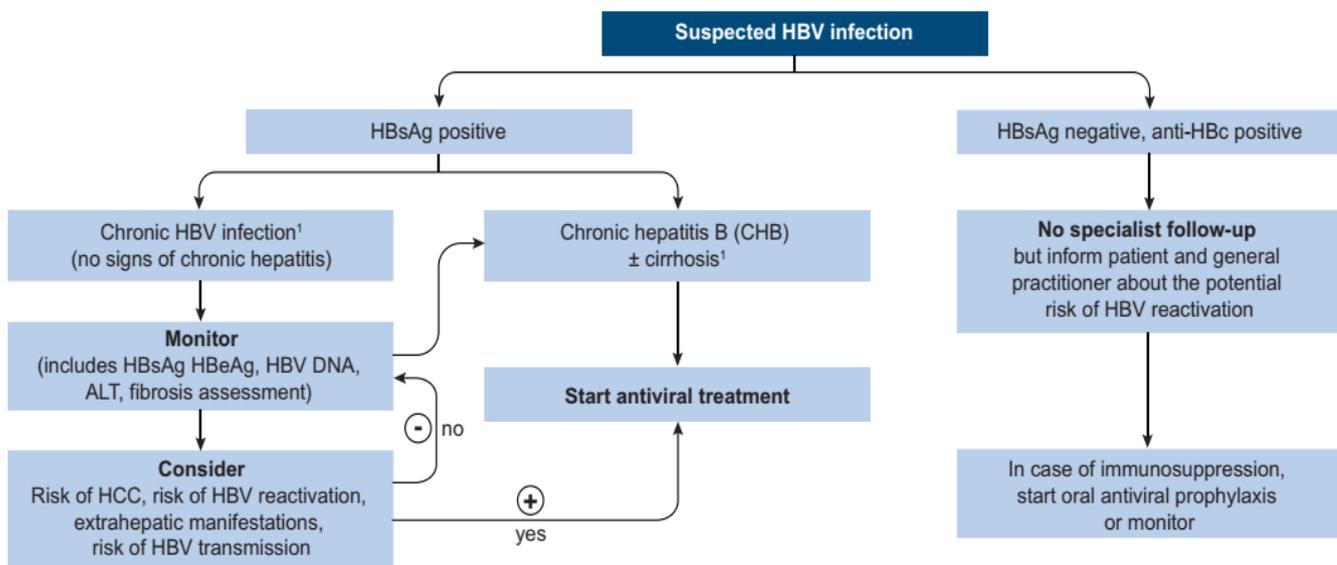


Figure 15: Algorithme de management de l'infection à VHB

Source : EASL, 2017

Les recommandations de l'EASL mettent en évidence les 4 grands objectifs d'une thérapeutique antivirale :

- L'induction d'une négativation à long terme de l'ADN VHB
- La perte de l'AgHBe, avec ou sans séroconversion anti-HBe, car elle représente souvent un certain degré de contrôle de l'infection par le système immunitaire
- Une réponse biochimique, à savoir la normalisation des ALAT

- La perte de l'AgHBs, avec ou sans séroconversion anti-HBs, considérée comme un des buts principaux, indiquant une suppression de la réplication virale et de la synthèse protéique en profondeur.

Actuellement, il existe deux principales options thérapeutiques pour les patients atteints d'hépatite B chronique : un traitement par analogue nucléotidique/nucléosidique (NA), ou par IFN α , en l'occurrence sous sa forme pégylée (PegIFN α). Les NAs approuvés en Europe dans cette indication sont : la lamivudine (LAM), l'adefovir dipivoxil (ADV), l'entécavir (ETV), la telbivudine (TBV) et le ténofovir (sous sa forme disoproxil fumarate TDF ou alafénamide TAF). La LAM, l'ADV et la TBV sont classés parmi les antiviraux ayant une faible barrière génétique aux résistances virales, donc à fort risque de mutations, tandis que l'ETV, le TDF et le TAF sont à faible risque de mutations, donc à barrière génétique haute. En France, seuls l'entécavir et le ténofovir (sous forme disoproxil fumarate, et plus récemment alafénamide) sont utilisés. Le TAF a été développé pour réduire le risque de toxicité rénale et osseuse observée avec le TDF. Il a été approuvé dans cette indication par la commission de la transparence de la Haute Autorité de Santé (HAS) en avril 2018 (44) et est pour le moment utilisé comme anti-VHB chez les patients traités par TAF pour une infection à VIH.

Le traitement de première intention pour un patient naïf atteint d'hépatite B chronique consiste en l'administration par voie orale d'un NA à barrière génétique haute, soit l'ETV soit le ténofovir, en monothérapie. Les autres NAs ne sont pas recommandés dans le traitement de l'hépatite B chronique. Lors du choix de l'utilisation d'un NA, la stratégie consiste à freiner l'atteinte hépatique et la progression de la maladie en inhibant la réplication virale. Ces traitements se prennent facilement par voie orale, sont bien tolérés et représentent souvent la seule option thérapeutique pour certains patients présentant déjà des complications hépatiques, ainsi que pour les patients immunodéprimés, en prévention d'une réactivation du VHB. Globalement, la perte de l'AgHBe est peu fréquente la première année et peut augmenter au cours du temps : un maximum de 21% de patients étudiés atteints d'hépatite B chronique ont eu une séroconversion HBe après 6 mois de traitement par TDF ou ETV. La diminution des taux d'AgHBs est aussi limitée, la perte de l'AgHBs a pu être observée dans seulement 3% des cas au bout de 6 mois sous TDF, pour les hépatites B chroniques à AgHBe positif, selon le rapport de l'EASL 2017. Les analogues ayant une barrière génétique de résistance élevée ont l'avantage d'induire une efficacité antivirale à long terme, se

traduisant par l'obtention d'une CV indétectable chez la grande majorité des patients observants : en moyenne, 70% des patients étudiés présentent des CV VHB inférieures à 60 UI/mL ainsi qu'une normalisation des ALAT à 6 mois de traitement (2) (figure 16). Pour les patients présentant une hépatite chronique AgHBe négative, la diminution de l'ADN VHB à 6 mois de traitement est plus importante, avec environ 90% des patients ayant un ADN VHB inférieur à 60 UI/mL. Cependant la perte de l'AgHBs n'a été observée pour aucun de ces patients (2). La durée du traitement est donc le plus souvent indéfinie, ce qui est possible grâce à leur très bonne tolérance. Selon l'EASL, le traitement par NA peut être arrêté chez les rares patients ayant perdu l'AgHBs. Un arrêt serait aussi envisageable pour les patients ayant une hépatite chronique AgHBe positive, ayant eu une séroconversion HBe, une charge ADN VHB indétectable et au moins 12 mois de traitement.

Le traitement par PegIFN α a pour but d'induire un contrôle de l'infection à long terme en agissant sur le versant immunologique, avec une durée de traitement définie de 48 semaines. Cependant, contrairement à ce qui a été décrit pour les NAs, son utilisation est plus délicate, sous forme d'injections sous-cutanées, et s'accompagne d'effets indésirables fréquents, de nombreuses contre-indications, ainsi que d'une efficacité très variable selon les patients. Ses indications sont aujourd'hui limitées à certains patients ayant une cirrhose compensée sans hypertension portale, et ceux ayant une hépatite chronique qualifiée de « modérée » (2). On observe une disparition de l'AgHBs dans 3 à 7% des cas, cependant les résultats concernant la réduction de la CV VHB ainsi que la normalisation des ALAT sont plus médiocres que ceux des NA : environ 15 à 20% des patients obtiennent un taux d'ADN VHB inférieur à 60 UI/mL à 48 semaines de traitement (2), et en moyenne 50% des patients parviennent à une normalisation des ALAT (figure 16).

Du point de vue physiopathologique, on pourrait supposer qu'une association de ces deux stratégies ait un meilleur bénéfice que les deux approches prises séparément mais, malheureusement, les preuves de cette hypothétique supériorité manquent toujours (2) : une association de ces deux traitements n'est donc pas recommandée.

Figure 16: Performance des traitements de l'hépatite B chronique, selon le statut HBe Source : EASL, 2017 (2)

Table 3. Results of main studies for the treatment of HBeAg-positive chronic hepatitis B at 6 months following 48 or 52 weeks of pegylated interferon alfa (PegIFN α) and at 48 or 52 weeks of nucleos(t)ide analogue therapy.

	PegIFN		Nucleoside analogues				Nucleotide analogues		
	PegIFN α 2a	PegIFN α 2b	LAM	TBV	ETV	ADV	TDF	TAF	
Dose*	180 μ g	100 μ g	100 mg	600 mg	0.5 mg	10 mg	245 mg	25 mg	
Anti-HBe-seroconversion	32%	29%	16–18%	22%	21%	12–18%	21%	10%	
HBV DNA <60–80 IU/ml	14%	7%	36–44%	60%	67%	13–21%	76%	64%	
ALT normalisation [#]	41%	32%	41–72%	77%	68%	48–54%	68%	72%	
HBsAg loss	3%	7%	0–1%	0.5%	2%	0%	3%	1%	

References: see EASL CPG 2012¹ for all drugs except for TAF.⁷⁶

PegIFN α , pegylated interferon alfa; ETV, entecavir; TDF, tenofovir disoproxil fumarate; TAF, tenofovir alafenamide; LAM, lamivudine; TBV, telbivudine; ADV, adefovir; ALT, alanine aminotransferase.

* PegIFN α were given as percutaneous injections once weekly and nucleos(t)ide analogues as oral tablets once daily.

[#] The definition of ALT normalisation varied among different trials (i.e., decrease of ALT to \leq 1.25-times the upper limit of normal (xULN) in the ETV or \leq 1.3 x ULN in the TBV trial). The lower quantification limit of HBV DNA assays was different across studies: <29 IU/ml for TAF studies.

Table 4. Results of main studies for the treatment of HBeAg-negative chronic hepatitis B at 6 months following 48 weeks of pegylated interferon alfa (PegIFN α) and at 48 or 52 weeks of nucleos(t)ide analogue therapy.

	PegIFN		Nucleoside analogues				Nucleotide analogues		
	PegIFN α 2a	PegIFN α 2b	LAM	TBV	ETV	ADV	TDF	TAF	
Dose*	180 μ g	100 μ g	100 mg	600 mg	0.5 mg	10 mg	245 mg	25 mg	
HBV DNA <60–80 IU/ml	19%	7%	72–73%	88%	90%	51–63%	93%	94%	
ALT normalisation [#]	59%	4%	71–79%	74%	78%	72–77%	76%	83%	
HBsAg loss	4%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	

References: EASL CPG 2012¹ for all drugs except for TAF.⁷⁴

PegIFN α , pegylated interferon alfa; ETV, entecavir; TDF, tenofovir disoproxil fumarate; TAF, tenofovir alafenamide; LAM, lamivudine; TBV, telbivudine; ADV, adefovir; ALT, alanine aminotransferase.

* PegIFN α was given as percutaneous injections once weekly and nucleos(t)ide analogues as oral tablets once daily.

[#] The definition of ALT normalisation varied among different trials (i.e., decrease of ALT to \leq 1.25-times the upper limit of normal [ULN] in the ETV or \leq 1.3-times the ULN in the TBV trial). The lower quantification limit of HBV DNA assays was different across studies: for TAF studies it was <29 IU/ml.

Prévention :

Plusieurs vaccins sont disponibles sous forme monovalents, bivalents ou hexavalents, alors combinés à d'autres vaccins. Tous les vaccins prévenant l'hépatite B sont des vaccins inactivés : ils contiennent de l'AgHBs recombinant et sont administrés en injection intramusculaire. Depuis le 1^{er} janvier 2018, la vaccination contre l'hépatite B est obligatoire chez tous les nourrissons nés à compter de cette date, dès l'âge de 2 mois. Elle est aussi recommandée en rattrapage, chez tous les enfants ou adolescents jusqu'à l'âge de 15 ans révolus, non antérieurement vaccinés. Chez les nourrissons, le schéma vaccinal se compose de trois doses, administrées à l'âge de 2 mois, 4 mois et 11 mois ; pour les adultes, adolescents et enfants, il consiste en trois doses administrées en respectant un intervalle d'au moins un mois entre les deux premières doses et d'au moins six mois entre la deuxième et la dernière dose (45). On considère qu'un patient est immunisé, bon répondeur à la vaccination, si le taux d'Ac anti-HBs induit est supérieur à 10 UI/mL, ce qui concerne 95% des patients. Les anticorps anti-HBs sont des anticorps neutralisants protecteurs mais leur titre peut diminuer au cours du temps, voire devenir indétectable à distance de la vaccination. Cela ne signifie pas une absence de protection, qui persiste via l'immunité cellulaire mémoire chez l'immunocompétent. Chez 50% des patients non-répondeurs, un taux supérieur à 10 UI/mL peut être atteint après administration de trois doses supplémentaires au maximum. En cas de non réponse, un rappel supplémentaire n'est pas indiqué. Les facteurs de moindre réponse à la vaccination sont l'âge (après 40 ans), le surpoids, certaines co-morbidités (diabète, cirrhose), certains profils HLA (HLA DRB1 et DQR1).

Enfin, l'immunothérapie par injection d'immunoglobulines anti-HBs peut être indiquée chez les patients exposés et non immunisés, en particulier le nouveau-né d'une mère porteuse de l'AgHBs.

II. La greffe et le don d'organes

i. Généralités sur la greffe et le don d'organes, définitions

Dans de nombreux cas de défaillance terminale d'un organe vital, la greffe reste le traitement de dernier recours mais néanmoins irremplaçable. Pour un patient en insuffisance rénale chronique terminale, elle constitue le traitement de suppléance ayant le meilleur profil coût/efficace, et procure la meilleure qualité de vie possible au patient (46). Les tissus greffés sont prélevés la plupart du temps sur donneurs décédés ou recueillis sur donneur vivant pour des organes comme le rein ou un lobe de foie.

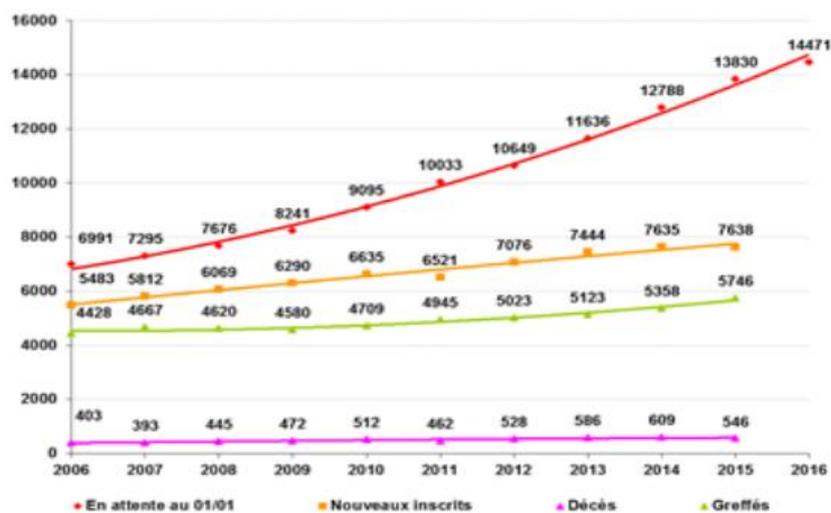
L'état de mort encéphalique:

Sur donneur décédé, le patient est le plus souvent en état de mort encéphalique (EME). Cet état correspond à la destruction totale et irréversible des fonctions cérébrales (cerveau, cervelet, tronc cérébral) chez un sujet à cœur battant, c'est la conséquence d'un arrêt complet de la circulation cérébrale. En situation de mort encéphalique (ME), les organes restent donc fonctionnels à condition que la réanimation soit adaptée. En l'absence de ces facteurs confondants (hypothermie, imprégnation médicamenteuse ou toxique), le diagnostic de ME repose sur 3 critères cliniques : un coma non réactif (Glasgow 3), associé à l'abolition des réflexes du tronc cérébral et de la ventilation spontanée vérifiée par une épreuve d'hypercapnie. Dans l'optique du don, la réglementation impose que le diagnostic de ME soit confirmé soit par deux EEG nuls et non réactifs pendant 30 minutes effectués à 4 heures d'intervalle, soit par une angiographie objectivant l'arrêt de perfusion cérébrale (47).

Les catégories de donneurs décédés :

Il existe à ce jour trois types de donneurs décédés susceptibles d'entrer dans une procédure de prélèvement multi-organes (PMO) : les donneurs en EME, ceux décédés après arrêt circulatoire suite à un arrêt cardiaque inopiné (catégorie I et II de Maastricht) et les donneurs décédés après arrêt circulatoire suite à une limitation ou un arrêt des thérapeutiques (catégorie III de Maastricht) (48). L'EME étant un événement rare représentant moins de 1% des décès à l'hôpital et compte tenu du contexte permanent de pénurie d'organes à greffer, la législation a permis d'élargir le panel de donneurs potentiels

aux donneurs à cœur arrêté. Après avoir été abandonné dans les années 1980, ce programme de prélèvement a repris depuis fin 2006 pour les donneurs décédés après arrêt cardiaque inopiné grâce au décret du 2 août 2005, encadré par des procédures très strictes. L'extension du programme aux donneurs décédés en arrêt circulatoire suite à une limitation des thérapeutiques (Maastricht III) a été autorisée en France depuis septembre 2014, ce qui a été rendu possible notamment par la loi du 22 avril 2005, dite loi Leonetti, permettant que les actes de soins soient suspendus ou non entrepris afin d'empêcher toute « obstination déraisonnable ». La gestion médicale est différente dans les trois cas, notamment concernant les conditions de conservation des organes pour le maintien de leur oxygénation. Malgré tout, les donneurs en EME restent largement majoritaires parmi les donneurs d'organes décédés avec, pour l'année 2016, un recensement de 3676 donneurs (1770 prélevés), contre 111 donneurs décédés après arrêt circulatoire suite à un arrêt cardiaque inopiné (42 prélevés) et 88 donneurs recensés après arrêt circulatoire suite à une limitation ou un arrêt des thérapeutiques (62 éligibles) (48). Au total, 22627 malades étaient en attente d'un organe en 2016.



Ces chiffres représentent les inscriptions en greffe d'organe. Un même patient peut être inscrit plusieurs fois pour le même organe dans l'année ou pour plusieurs organes différents.

Figure 17: Les besoins et possibilités en greffe d'organes

Source : Plan 2017-2021 pour la greffe d'organes et de tissus, Ministère chargé de la santé

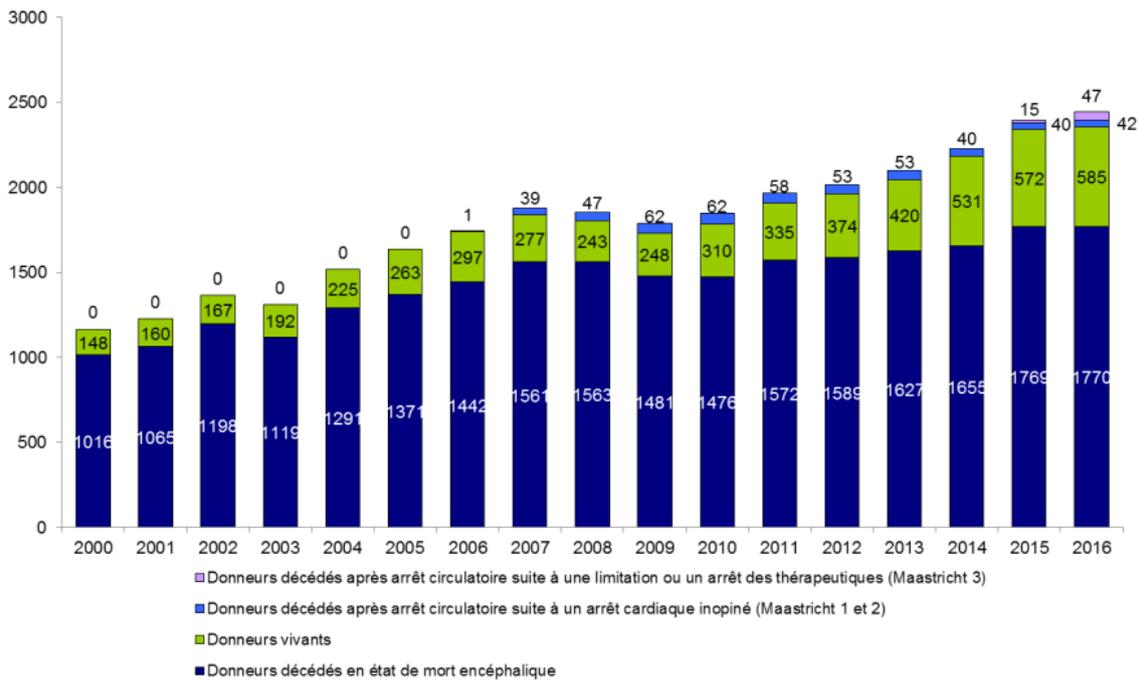


Figure 18: Evolution du prélèvement par type de donneur en France

Source : Agence de la biomédecine

Quelques chiffres

En 2016, le taux global de prélèvement au niveau national est de 27,8 donneurs par million d’habitants (pmh); le taux de recensement, calculé à partir du nombre de sujets en EME déclarés à l’Agence de biomédecine (ABM), était de 55 donneurs pmh en 2016, malgré un taux d’opposition à 34%. Le taux d’opposition est calculé en comptabilisant l’ensemble des donneurs pour lesquels toute opposition est enregistrée (entourage, défunt, y compris contre-indications médicales) par rapport au nombre total de donneurs recensés. Il stagne à environ 33% depuis 10 ans et est très variable selon les régions et les années. A l’inverse, le taux d’opposition parmi les donneurs prélevables exclut les causes médicales des refus de don. Ce taux est bien supérieur au taux brut, et se situe à 41,2% en France en 2016, s’échelonnant de 29,7% (en Franche-Comté) à 68,8% (Guadeloupe).

En France, 189 sites ont une activité de prélèvement d’organes sur donneur en EME, couvrant la quasi-totalité du territoire français. Pour l’inter-région Sud-Ouest, 62,3 donneurs pmh ont été recensés en 2016 avec 30,7 donneurs prélevés pmh ; on note également un taux global d’opposition à 35%. L’inter-région Sud-Ouest regroupe les activités des CHU de Bordeaux (Pellegrin et Haut-Lévêque), de Toulouse et de Limoges, ainsi que des CH d’Agen,

Albi, Auch, Bayonne, Brive, Cahors, Dax, Foix, Libourne, Mont-de-Marsan, Montauban, Pau, Périgueux, Rodez et Tarbes. Le groupe hospitalier Pellegrin (GHP) comptabilise l'activité de prélèvement la plus importante avec 55 donneurs prélevés pour l'année 2016 sur un total de 221 donneurs prélevés sur l'inter-région. Sur le plan national, le GHP arrive en 2^{ème} place après l'hôpital Edouard Herriot de Lyon. En Aquitaine, de 2011 à 2016, le taux de prélèvement a progressé de 26,7 à 37,9 sujets prélevés en EME pmh, soit une des évolutions les plus importantes sur l'ensemble des régions (48).

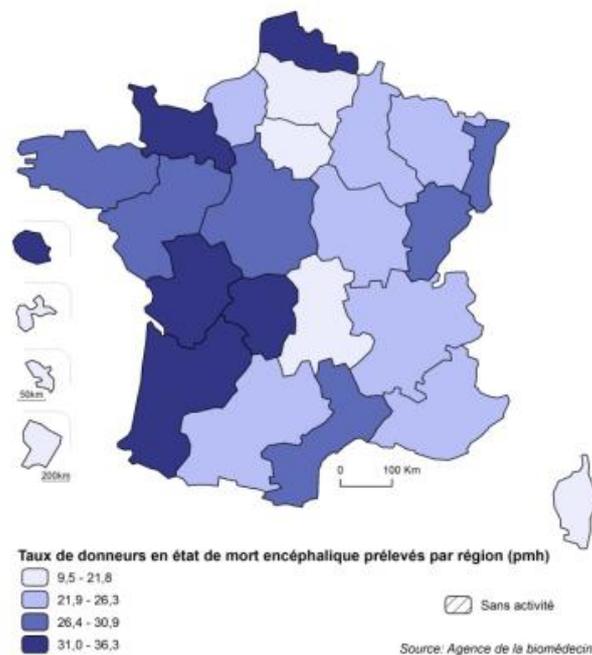


Figure 19: Donneurs en état de mort encéphalique prélevés en 2015

Source : Plan 2017-2021 pour la greffe d'organes et de tissus, Ministère chargé de la santé

L'analyse des causes de décès de ces patients montre une inversion entre les deux causes principales depuis le début des années 2000 : la part liée aux accidents de la route a largement diminué (20,9% en 2016), laissant les causes vasculaires, essentiellement les AVC, en première place (58%). Logiquement, l'âge moyen des donneurs prélevés a augmenté, ainsi, le nombre de donneurs prélevés âgés de plus de 65 ans a été multiplié par un facteur 10 entre 2000 et 2015 et la tranche d'âge des 18-49 ans qui représentait 66% des donneurs en 1998 n'est plus que de 30% en 2016.

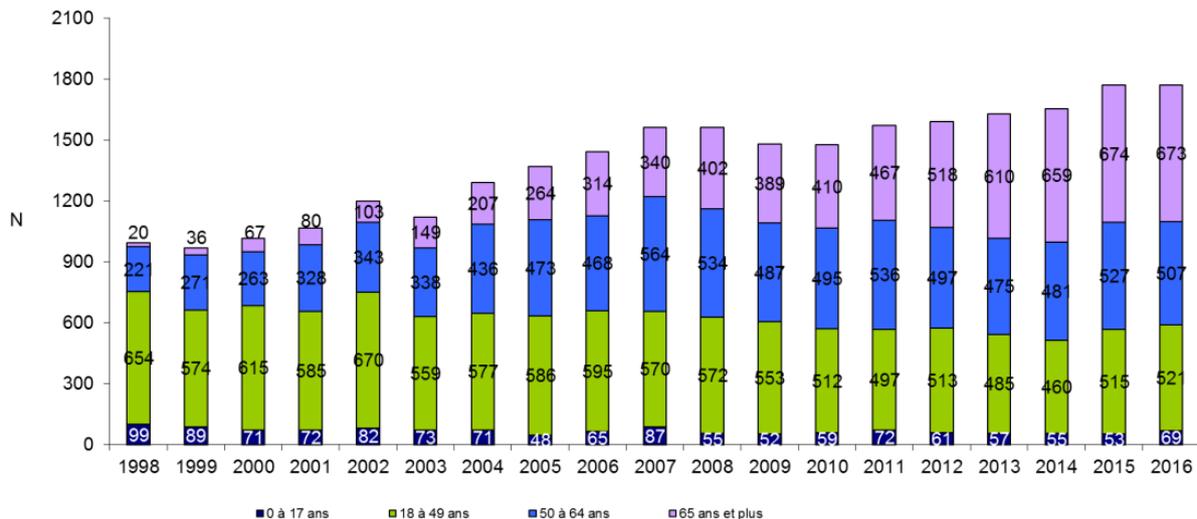


Figure 20: Evolution de la répartition par âge des donneurs prélevés en EME
Source : Agence de la biomédecine

ii. Cadre réglementaire, éthique

L'ensemble de l'activité de prélèvement et de greffe repose sur les principes éthiques de gratuité, d'anonymat, de consentement, de sécurité sanitaire et d'équité, tous inscrits dans la loi de bioéthique et la convention d'Oviedo sur les droits humains et la biomédecine qui fut ratifiée en 2011 par la France (49).

Le principe de gratuité découle du principe de non patrimonialité du corps humain, impliquant que toute commercialisation du corps est interdite et donc, toute rémunération du donneur également.

L'anonymat suppose que le nom du donneur ne peut être communiqué au receveur, et vice versa. La famille du donneur peut cependant être informée des organes et tissus prélevés ainsi que du résultat des greffes.

En France, le don d'organe de personnes décédées est régi par le principe de consentement présumé, il n'existe donc pas de registre du « oui » : selon la loi nous sommes tous présumés donateurs, sauf en cas d'expression d'un refus de la part du défunt, via l'inscription sur le registre national des refus, un écrit, ou le témoignage des proches. C'est sur la loi Caillavet de 1976, stipulant que « *Des prélèvements peuvent être effectués à des fins thérapeutiques ou scientifiques sur le cadavre d'une personne n'ayant pas fait connaître de son vivant son*

refus d'un tel prélèvement », que repose ce principe. Il n'a ensuite été que réaffirmé par les lois de bioéthique de 1994, 2004 et 2011, remplaçant la recherche du consentement par celle de l'opposition, puis renforcé par la loi de 2016 de modernisation du système de santé.

La loi de bioéthique de 2004 a enfin permis de consacrer les principes de sécurité sanitaire, incluant une sélection clinique et biologique des donneurs, ainsi que le principe d'équité concernant les règles de répartition et d'attribution des greffons.

Ces activités sont également encadrées par les directives européennes qui fixent des normes de qualité et de sécurité, transposées à la législation française. Ainsi, au sein du conseil de l'Europe, *l'European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare* (EDQM) élabore régulièrement un guide pour la qualité et la sécurité des organes pour transplantation, la 7^{ème} et dernière édition datant de l'année 2018.

En France, le ministère chargé de la santé élabore les textes normatifs du secteur encadrant les activités du prélèvement et de la greffe. A ce titre, il définit les conditions médico-techniques dans lesquelles doivent être réalisées les activités de prélèvement, de greffe, de préparation, de transformation et de conservation des greffons. Il définit également les règles de sécurité sanitaire relatives à la sélection clinique et biologique des donneurs et assure une veille éthique sur toutes les activités de prélèvement et de greffe (50). Enfin le ministère chargé de la santé travaille en lien avec l'ABM pour définir les actions à mettre en œuvre afin de favoriser le développement des activités de ce secteur.

iii. Les risques liés au don et leur gestion

On distingue trois grandes catégories de risques pouvant impacter l'issue de la greffe :

- Le risque de transmission de pathologies du donneur vers le receveur, qu'elles soient de nature infectieuse ou maligne ;
- Les risques liés aux caractéristiques du donneur ou de l'organe lui-même pouvant augmenter la possibilité d'échec à terme, liés à la qualité intrinsèque du greffon ;
- Les risques liés aux caractéristiques du receveur, à la procédure de greffe (impliquant la conservation de l'organe, le temps d'ischémie...), avec le risque de rejet à contrebalancer avec la potentielle (ré)-émergence de pathologies virales ou malignes latentes préexistantes chez le receveur.

Dans notre travail, nous sommes plus particulièrement intéressés par le risque infectieux, et plus précisément viral. La particularité du don d'organes sur donneur décédé est qu'il ne se programme pas et se fait dans l'urgence, pour un receveur dont le pronostic vital est souvent en jeu. D'autre part, la greffe de l'organe prélevé ne peut pas attendre, afin de conserver une qualité optimale des tissus et de leurs fonctions. C'est pourquoi la coordination hospitalière d'un établissement dans lequel décède un patient doit rapidement être en mesure de vérifier s'il remplit les critères de « donneur potentiel » afin d'organiser les prélèvements à venir. L'évaluation des risques infectieux fait partie de ses missions, en lien avec l'équipe soignante du malade, les laboratoires, l'ensemble de ce personnel devant être opérationnel 24h/24, tous les jours. La sélection clinique d'une part, et la qualification biologique d'autre part, sont les deux moyens d'appréhender ce risque avec une nécessité de rapidité de rendu des résultats de quelques heures (51).

La sélection clinique :

Cette étape essentielle est guidée par une fiche de sélection clinique établie sous l'égide de l'ABM, pour les donneurs vivants et décédés. Elle est régulièrement mise à jour. La sélection repose entre autres sur l'examen des antécédents médicaux, la recherche de pathologies qui pourraient contre-indiquer le don au niveau infectieux, les facteurs de risque d'IST, liés à l'UDI, les traitements en cours, les vaccinations récentes... Concernant les donneurs décédés, la coordination hospitalière doit préciser également les causes et circonstances du décès, car les décès de cause inconnue contre-indiquent le prélèvement.

La sélection biologique :

Comme pour la sélection clinique, la qualification biologique du donneur décédé n'a rien de comparable avec celle du donneur vivant. On dispose d'un temps très réduit entre la constatation du décès, le prélèvement de sang (ou d'autres liquides biologiques) et la production de résultats validés biologiquement. De plus, la qualité du prélèvement n'est pas souvent optimale dans le cas de patients décédés, il peut être dilué par des polytransfusions ou de mauvaise qualité (sérum ou plasma fortement hémolysés voire laqués) s'il a été recueilli dans un délai plus ou moins long après arrêt circulatoire (52,53).

La qualification biologique du donneur est définie et encadrée par des textes de lois opposables aux biologistes responsables de la réalisation de l'analyse depuis la phase pré-analytique jusqu'au rendu des résultats. Parallèlement, le stockage d'un échantillon sous forme d'une sérothèque est obligatoire car il pourra permettre la réalisation d'analyses complémentaires au cas où une infection se déclarerait chez le receveur après la greffe.

iv. Qualification microbiologique des donneurs : contexte actuel

En 2011, 3 déclarations d'incidents ont été réalisées auprès de la cellule biovigilance de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) concernant la qualification sérologique du donneur : il s'agissait d'un dépistage du génome viral (DGV) VHB positif, dont le résultat a été rendu en post-greffe chez un donneur multi-organes à profil sérologique « naïf » vis-à-vis du VHB, un DGV VHB positif chez un patient ayant un profil d'infection ancienne guérie et un retard dans la réalisation d'une sérologie syphilis (54). En 2015, ce sont deux DGV VHB positifs chez le donneur, découverts en post-greffe, qui ont été rapportés à l'ANSM, dont un concernant une greffe de foie (55).

La découverte de ces DGV VHB positifs, n'ayant pas pu être rendus dans des délais compatibles avec la greffe, soulève le problème de la réalisation en urgence des PCR virales.

En pratique, le bilan infectieux obligatoire minimal à réaliser avant la greffe est le suivant : les sérologies VIH-1,2 combo, VHB (AgHBs, Ac anti-HBs, Ac anti-HBc), VHC, HTLV, CMV, et EBV en urgence. Les sérologies toxoplasmose et syphilis peuvent être réalisées dans les heures ouvrables suivant le prélèvement. De plus, les arrêtés du 23 décembre 2010 et du 22 juin 2011 précisent que le DGV pour le VIH, le VHB et le VHC doit être réalisé le plus précocement possible avant la greffe ; le rendu du DGV aux seules heures ouvrées des laboratoires n'est que le reflet d'un fonctionnement dérogatoire, faute de mise en œuvre technique possible en urgence (56). Si le DGV VIH n'est pas disponible avant la greffe, la recherche de l'antigène p24 doit être réalisée afin de réduire la fenêtre sérologique. L'introduction des tests moléculaires permet de réduire la période silencieuse à 6 jours pour l'infection à VIH, 5 jours pour le VHC et une vingtaine de jours pour le VHB, permettant notamment de dépister les hépatites occultes à AgHBs négatif (49).

Ce processus nécessite une organisation pointue basée sur une maîtrise de tous les maillons de la chaîne, des techniciens aux biologistes, en nombre suffisant et formés à la réalisation et à la validation technique et biologique de ces marqueurs en 3 à 4 heures, à toute heure et chaque jour de l'année. Sur la région Nouvelle-Aquitaine, les CHU de Bordeaux, Limoges et Poitiers sont les seuls établissements à être équipés d'un dispositif permettant la réalisation des sérologies obligatoires jour et nuit, 7 jours sur 7 (46).

Concernant les équipements nécessaires, à la lecture des différentes fiches techniques consignées par l'ABM, nous nous rendons compte que seuls très peu de réactifs ont l'agrément pour la réalisation de tests de dépistages viraux sur échantillons prélevés post-mortem, notamment à cœur arrêté. Pour la plupart d'entre eux, les conditions pré-analytiques nécessaires ne sont même pas précisées dans le cadre des échantillons prélevés après arrêt circulatoire ou bien ce cas de figure est exclu de leur utilisation. Ceci est particulièrement vrai pour les automates et réactifs destinés au DGV : dans le « point sur la maîtrise de la phase pré-analytique des échantillons destinés à la qualification microbiologique des donneurs d'organes, de tissus ou de cellules » de 2017, l'ABM et l'ANSM référencent les différentes trousse disponibles et leurs indications. Pour la quantification de l'ARN du VIH-1 par exemple, il apparaît que sur 13 kits étudiés, seuls 2 d'entre eux (Procleix Ultrio® et Procleix UltrioElite® de Gen-Probe) sont indiqués comme étant capables de détecter le génome viral dans les échantillons provenant de donneurs humains, y compris les donneurs cadavériques (53). Dans le cas des autres kits, il est le plus souvent mentionné dans leur notice qu'ils ne sont pas conçus comme test de dépistage pour les donneurs de sang, plasma ou tissus : c'est notamment le cas pour le réactif du HIV-1 Cobas 6800 (Roche), utilisé jusqu'en 2018 par le CHU de Bordeaux pour la qualification microbiologique des donneurs. Pour le cas du DGV VHB, on retrouve le même constat, avec, dans la plupart des cas, une absence d'évaluation de l'utilisation de la trousse en tant que test de dépistage de l'ADN VHB dans le sang ou les produits sanguins. Ce constat souligne le fossé existant entre les pratiques répondant à une nécessité sanitaire et le retard de mise à jour des autorisations « officielles » d'utilisation. C'est d'ailleurs un des points abordés dans le « Plan 2017-2021 pour la greffe d'organes et de tissus » qui expose l'objectif d' « assurer l'utilisation de nouveaux automates actuellement en cours de déploiement ».

Cas des greffes dérogoaires :

La réalisation du DGV en urgence est désormais une exigence, inscrite dans la loi française depuis 2011, mais dont la mise en pratique est toujours sujette à difficultés pour les centres responsables. En octobre 2016, le directeur du prélèvement et de la greffe de l'ABM a adressé un courrier aux responsables des laboratoires en charge de ces bilans pré-greffes leur rappelant que le DGV devait être réalisé en urgence, tout comme le dépistage sérologique, dès lors que la technologie le permettait. En effet, outre la détection d'infections occultes notamment pour le VHB, le DGV permet également d'augmenter le nombre de greffes dérogoaires réalisées en élargissant leurs indications en fonction des receveurs concernés.

Par greffe dérogoaire, on définit toute greffe réalisée à partir de donneurs ayant été en contact avec le VHB ou le VHC à des receveurs de rein, de foie, de cœur et de poumon informés de la nature de ces greffons (57). Cette procédure est autorisée en France par le décret du 23 décembre 2010, modifié par l'arrêté du 23 décembre 2015 permettant d'élargir les possibilités d'attribution de ces greffons en cas de DGV VHC négatif. Dans ce cadre, l'obtention du DGV avant la greffe est précieuse, afin d'orienter correctement les greffons, et d'utiliser ceux qui auraient été auparavant évincés du processus de greffe. En 2016, 172 organes porteurs des marqueurs du VHB ont été greffés pour 73 donneurs, soit environ 4% des donneurs en EME prélevés cette année-là. Ces greffes ont bénéficié à 170 receveurs. Les possibilités de greffe en fonction du statut sérologique du donneur et des résultats du DGV pour le VHB et VHC sont résumées dans le tableau suivant.

Marqueurs VHB	Profil sérologique	Greffes et conditions		DGV-VHB pré-greffe du donneur
	AgHBs-/anti-HBs+/anti-HBc +	Tout organe (sauf foie): greffe en routine encadrée		Négatif
		Foie : greffe dérogoaire		Négatif
AgHBs- /anti-HBs- / anti-HBc+	Tout organe : greffe dérogoaire		Négatif	
Sérologie VHC positive	Résultat DGV VHC pré-greffe du donneur		Conditions de greffes	Receveur
	Négatif		Dérogoaire	Anti-VHC positif
	Positif (ou non disponible)		Dérogoaire	DGV VHC positif

Tableau 1: Résumé des cas d'application des greffes dérogoaires
Source : Agence de la biomédecine, 2017

v. Perspectives pour les années à venir : le plan 2017-2021

Le plan 2017-2021 est le troisième plan pour la greffe mis en place en France. Il s'inscrit dans un besoin toujours croissant d'organes à greffer, avec une augmentation de près de 40% du nombre de patients en attente de greffe entre 2012 et 2016.

Au niveau global, l'objectif pour l'année 2021 est de réaliser 7800 greffes d'organes, soit 115 greffes pmh, dont 6800 à partir de donneurs décédés et 4950 greffes rénales dont 1000 à partir de donneurs vivants (58).

Une des grandes orientations de ce plan vise à augmenter le prélèvement et la greffe d'organes à partir de donneurs décédés. Pour cela, il mentionne explicitement la volonté de développer le prélèvement sur donneurs décédés porteurs de marqueurs viraux : la première solution avancée est d'assurer un DGV en urgence. En effet, par ce document, le ministère chargé de la santé insiste sur le fait qu'une soixantaine de donneurs recensés ne peuvent finalement pas être prélevés chaque année, à cause de marqueurs viraux avérés ou suspectés. La difficulté d'obtention des DGV en pré-greffe entraîne le refus de donneurs potentiels dont le caractère virémique n'a pu être démontré ou infirmé à temps. L'objectif est donc d'obtenir des DGV dans les délais compatibles avec la greffe, en complément des examens actuels, conformément au cadre réglementaire en vigueur depuis 2011.

Pour cela, le ministère encourage l'initiation d'une réflexion avec un groupe de travail associant l'ABM, la DGOS, les ARS, les directeurs généraux de CHU et les présidents de CME afin d'évaluer la possibilité de mise en place de plateformes régionales ou interrégionales s'inscrivant dans les GHT. D'autre part, cette réflexion doit mener à la possibilité d'utilisation de nouveaux automates permettant le rendu de DGV en urgence.

III. Méthodes de diagnostic « point-of-care », exemple du système Cepheid

i. Définitions

De nombreuses définitions des point-of-care tests (POCTs) ont été proposées dans la littérature (59). Par exemple, la *Food and Drug Administration* (FDA) propose une liste des caractéristiques que devrait regrouper un « test simple » (60) :

- Un instrument totalement automatisé, ou un test unitaire
- Nécessitant des échantillons directement utilisables (écouvillons, urine, sang capillaire...)
- Nécessitant une manipulation basique de l'échantillon et des réactifs
- Ne nécessitant pas d'intervention de l'opérateur pendant l'étape d'analyse
- Ne nécessitant pas de formation technique ou spécialisée
- Ne nécessitant pas d'opération de calibration, de calcul par l'opérateur en vue de la récupération du résultat, ni de maintenance électronique ou mécanique
- Possédant des performances comparables à celles d'une méthode de référence, démontrées par plusieurs études scientifiques
- Contenant une instruction brève et compréhensible par l'opérateur

Pour résumer, un test à vocation point-of-care (POC) regroupe trois caractéristiques : il ne nécessite pas d'infrastructure de laboratoire spécialisée ou un personnel dédié, il est conçu pour être facile d'utilisation et d'interprétation et est le plus souvent capable de rendre un diagnostic rapide, dans un délai de l'ordre de l'heure.

ii. Organisation d'une unité de laboratoire POC

Equipement et personnel :

Par définition, un laboratoire POC nécessite une logistique simple. Il peut être destiné à être mis en place à proximité d'un service de soins d'urgences, dans un dispensaire ou dans d'autres lieux non destinés à la réalisation d'analyses médicales comme des navires militaires. Selon Drancourt et al., ce type de laboratoire peut être installé dans une pièce climatisée de 5 à 10 m², équipée d'un système de surveillance et de régulation de la température ambiante et d'une source d'électricité. Il doit disposer d'au moins une enceinte

à température ambiante et d'une enceinte réfrigérée à +4°C pour le stockage des réactifs (59). Concernant les stations de travail, les techniques POC nécessitent souvent des automates compacts, voire aucun automate pour les techniques à lecture manuelle. Un ordinateur reste indispensable pour le rendu des résultats et la communication avec le laboratoire central dont dépend la gestion de l'unité POC.

Un laboratoire POC est destiné à être utilisé par un personnel formé et régulièrement évalué dans un objectif de maintien des compétences. Néanmoins, les techniques mises en œuvre sont simples et ne nécessitent qu'une formation rapide même pour des utilisateurs qui ne sont pas familiarisés avec les techniques de laboratoire.

L'objectif de ces techniques est de permettre leur utilisation en *random access*, c'est-à-dire avec la possibilité d'y accéder à tout moment, 24h/24 et 7j/7. Les automates dédiés au POC ne doivent donc pas être dépendants de contraintes de maintenances régulières dans leur fonctionnement. Ils doivent permettre un *workflow* le plus simple possible, avec peu d'étapes entre la phase pré-analytique et le rendu du résultat.

Contrôles de qualité :

Ces tests ont pour vocation d'apporter des réponses rapides guidant la prise de décision médicale. Malgré leur facilité d'utilisation, le contrôle reste nécessaire (61), car ils sont le plus souvent employés par des opérateurs non qualifiés et donc moins sensibles à une défaillance éventuelle de l'automate ou du kit.

Ainsi, Fournier et al. recommandent l'utilisation de contrôles de qualité interne et externe des POCTs, ainsi que la mise en place d'un système de management de la qualité, afin de garantir la sécurité et la fiabilité de l'ensemble du processus.

iii. Applications en microbiologie : contexte et besoins

Dans le domaine de la microbiologie, ces tests sont basés principalement sur des techniques immunochromatographiques ou de PCR en temps réel (61). L'un des premiers POCTs à apparaître permettait la détection du Streptocoque A par écouvillonnage pharyngé grâce à une technique immunochromatographique. La vocation de ce test était d'être disponible immédiatement, au lit du malade ou au cabinet médical, afin de guider la prescription éventuelle d'antibiotique.

Outre l'optimisation du délai de réponse, les POCTs ont pour but d'être utilisables dans des situations que l'on jugerait traditionnellement inadaptées à la réalisation d'analyses médicales de précision. Ces tests sont aujourd'hui utilisés dans des conditions d'organisation précaires, par exemple sur des bateaux ou dans des camps militaires. Dans les pays à faibles ressources, des POCTs de biologie moléculaire sont utilisés pour le diagnostic de la tuberculose, en remplacement de la microscopie pour les patients infectés par le VIH (60), devant les faibles performances des techniques conventionnelles.

Dans ces mêmes régions du globe, la nécessité de suivi des patients infectés par le VIH par des méthodes simples a guidé le développement de POCTs permettant la quantification de la CV du VIH, en dehors d'un laboratoire « classique » de biologie moléculaire.

Ces quelques exemples ne se veulent pas exhaustifs, mais décrivent la nécessité d'adaptation de techniques de laboratoire sensibles et spécifiques, telles que celles de biologie moléculaire, à des diagnostics en point-of-care.

iv. La biologie moléculaire en POC

Principe :

Les tests d'amplification d'acides nucléiques, souvent retrouvés sous l'appellation *Nucleic acid amplification tests* (NAATs), ont pour but de détecter une ou plusieurs séquences d'ADN ou d'ARN spécifiques d'un pathogène donné. Ces techniques ont révolutionné le diagnostic des pathologies infectieuses (59). Il existe à ce jour deux types de techniques disponibles pour les POCTs : les techniques basées sur la PCR et celles basées sur l'amplification isotherme d'acides nucléiques.

La technique de PCR inclut habituellement 30 à 40 cycles de chauffage à des températures différentes, permettant séquentiellement la dissociation des brins d'acides nucléiques, l'hybridation des amorces aux séquences cibles et l'élongation des brins d'ADN obtenus. Une technique de PCR en temps réel est habituellement utilisée en POC. Des sondes fluorescentes spécifiques sont utilisées, permettant d'augmenter la sensibilité et la spécificité de la réaction et une quantification des produits de la réaction en temps réel. Les résultats reportent le nombre de cycles (Ct ou *cycle threshold*) requis pour détecter un signal

positif. Plus le Ct est faible, plus la quantité de produit à amplifier était importante au départ, et donc plus le résultat final est quantitativement grand.

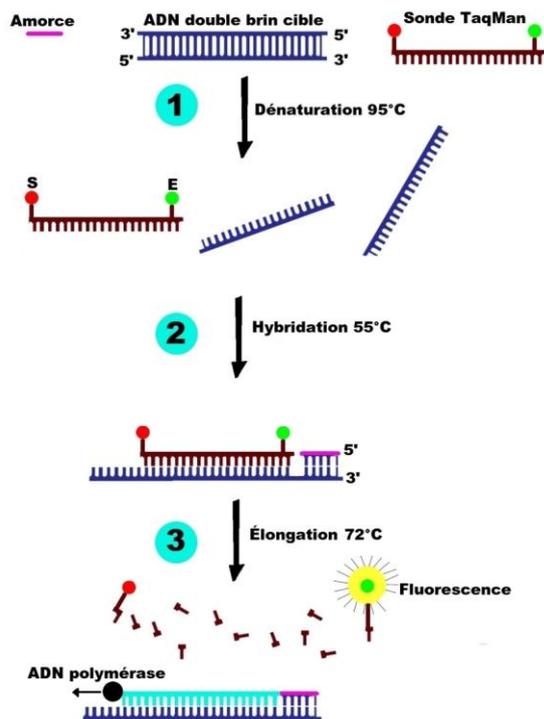


Figure 21: Principe de la PCR en temps réel (exemple de la technologie Taqman)

E : émetteur (ou *reporter*) ;

S : supprimeur (ou *quencher*)

La seconde technique d'amplification d'acides nucléiques applicable en point-of-care est la LAMP pour *Loop-mediated isothermal amplification*. Cette alternative à la PCR classique utilise aussi une ADN polymérase mais à une température constante allant de 60 à 65°C. La détection d'une amplification se fait par l'intermédiaire de la détection du pyrophosphate de magnésium en tant que co-produit (62). La LAMP permet donc de se passer d'un thermocycleur, rendant la technique moins coûteuse au départ et moins consommatrice d'énergie, et donc peut être plus facilement utilisable dans les pays en voie de développement (63). Elle est par ailleurs utilisée pour le diagnostic du paludisme en zone d'endémie (64).

Exemple du système GeneXpert® (Cepheid) :

Le système GeneXpert® est un automate de biologie moléculaire utilisable en POC. Il combine les fonctions d'un extracteur de matériel génétique et d'un thermocycleur en un seul instrument (59).

Historiquement, le GeneXpert® a été utilisé pour la première fois dans le diagnostic de la tuberculose. Ses caractéristiques en font un instrument robuste, assez aisément transportable et facile d'utilisation (65), y compris par du personnel non qualifié (66).

Ce système utilise des cartouches unitaires, spécifiques à chaque type d'analyse. Les étapes d'extraction, d'amplification et de détection sont intégrées dans une même cassette. L'amplification génique est réalisée par une réaction de PCR en temps réel, pouvant être précédée d'une étape de rétro-transcription lorsque la cible est un ARN. Une fois l'échantillon inséré dans une cassette (ou cartouche), l'utilisateur la place dans un module de l'automate. Ces modules sont indépendants les uns des autres, offrant la possibilité de tester plusieurs échantillons en même temps, sur plusieurs analyses différentes, sans que leur lancement ait lieu simultanément (67).

L'utilisation de cartouches unitaires fermées permet de s'affranchir des problèmes de contamination, primordiaux en biologie moléculaire. L'ensemble des opérations ayant lieu au sein de la cartouche de test, il n'est pas nécessaire d'avoir plusieurs pièces dédiées aux étapes « pré-PCR » ou « post-PCR ». Ceci permet un gain d'espace en plus d'une simplification des procédures d'utilisation.

D'autre part, la durée de réalisation des tests proposés par Cepheid ne dépasse généralement pas 2 heures, pré-traitement compris. Ceci, combiné à sa capacité d'utilisation dans des conditions précaires, le rend potentiellement intéressant pour une utilisation en situation d'urgence.

Plus récemment, un nouveau test POC GeneXpert® a été développé permettant la quantification de l'ARN du VHC à partir de sang total capillaire, prélevé au bout du doigt. Ce test appelé « HCV Viral Load Finger-Stick » permet d'obtenir un résultat en heure, sans besoin de pré-traitement de l'échantillon. Il est indiqué pour une utilisation en dehors d'un laboratoire et permet d'atteindre des populations de patients souvent touchées par le VHC mais demeurant difficiles d'accès, tels que les toxicomanes UDI (68). Ce nouveau test POC trouve sa place dans le dépistage de l'infection à VHC dans ces groupes de populations, et participe à l'objectif d'éradication du VHC dans le monde.

IV. Objectifs de l'étude

Après avoir dressé un état des lieux des bilans de qualification virologique des donneurs d'organes réalisés au CHU de Bordeaux, notre travail avait pour objectif d'étudier les performances analytiques de la trousse de quantification de l'ADN du VHB par la technique GeneXpert®, avant sa commercialisation. Pour cela, nous avons réalisé une étude de linéarité en fonction des 8 géotypes du VHB, puis comparé les performances de ce test avec la technique de référence utilisée au CHU de Bordeaux via une étude de corrélation, d'agrément et de concordance en incluant des profils viraux particuliers.

Cette étude des performances a été réalisée dans la perspective de la mise en place de ce test dans les bilans de qualification microbiologique des dons d'organes en urgence, le but étant d'avoir accès à une technique de biologie moléculaire rapide à réaliser, sur le même plateau technique que celui où sont réalisées les sérologies urgentes. L'objectif final était de déterminer si ce test était indiqué pour une utilisation dans cette indication, tant du point de vue des performances analytiques que de ses modalités d'utilisation, ainsi que d'analyser l'impact de sa mise en place sur le rendu de résultats.

Matériels et méthodes

I. Recueil des données épidémiologiques des bilans de qualification des donneurs d'organes en EME au CHU de Bordeaux depuis 2014

Nous avons établi un état des lieux des prélèvements reçus au Laboratoire de Virologie entre 2014 et 2017 dans le cadre de PMO. Pour cela, nous avons effectué une extraction des analyses urgentes enregistrées pour PMO sur le système informatique du laboratoire (SIL) Synergy, pour la période allant du 1^{er} janvier 2014 au 31 décembre 2017. Nous avons inclus dans notre requête les résultats des analyses suivantes : sérologie HTLV, sérologie VIH, CV VIH, sérologie VHC, CV VHC, sérologie VHB (AgHBs, Ac anti-HBs, Ac anti-HBc) et CV VHB. Cette recherche nous a permis d'obtenir la liste des bilans reçus dans ce cadre avec les dates de naissance des patients concernés, leur sexe et le service demandeur ou le centre hospitalier de provenance du bilan.

Nous avons également collecté les dossiers enregistrés avec une CV VHB urgente dans le cadre de PMO pour la période allant du 1^{er} janvier 2018 au mois de février 2019 sur le logiciel Synergy, puis sur le logiciel Glims à partir de février 2019 (bascule de la technique sur Cepheid et sur le nouveau SIL) jusqu'au mois de mai 2019. A partir de ces dossiers, nous avons collecté les dates et heures d'enregistrement des prélèvements (assimilées aux dates et heures de réception au laboratoire), ainsi que les dates et heures de validation technique de la CV VHB, que nous avons assimilées au moment où le résultat est disponible pour le service demandeur (celui-ci étant faxé par le biologiste responsable ou l'interne de garde avant validation biologique sur le SIL).

II. Evaluation des performances

i. Matrice sélectionnée

Le fabricant de la trousse testée dans ce travail préconise l'utilisation de plasma obtenu à partir de sang total prélevé sur tube EDTA, EDTA-PPT ou sérum. Nous avons décidé de réaliser nos tests sur plasmas en se conformant au manuel de prélèvement du Laboratoire

de Virologie du CHU de Bordeaux : les échantillons sont obtenus à partir de tubes EDTA acheminés à +4°C dans un délai de 24 heures, puis centrifugés à 3500 rpm pendant 10 minutes, ou utilisés sous forme de plasma déjà aliquoté et acheminé à -20°C pour les prélèvements extérieurs au CHU.

ii. Sélection des échantillons

Pour notre étude, nous disposons de 100 tests HBV-VL RUO (*Research Use Only*). Nous avons sélectionné des échantillons de plasmas congelés de patients infectés par le VHB conservés dans la plasmathèque hospitalière du CHU de Bordeaux. Les données clinico-biologiques ont été recueillies à partir des logiciels Synergy et DxCare.

Linéarité :

Les plasmas de 7 patients infectés par un VHB de génotype A à G et de CV VHB connue, ont été utilisés. Pour le génotype H, nous avons eu recours à un contrôle externe de qualité de type QCMD, conservé congelé au Laboratoire de Virologie, dont nous avons préalablement déterminé la CV par la technique Cobas 6800 (technique de référence pour la totalité de notre étude). Chaque échantillon appartenant à l'un des différents génotypes a été dilué selon une gamme de concentration allant de 3 à 6 log₁₀ UI/mL. Dans le cas du génotype H, nous avons pu réaliser une gamme de 1,5 à 3,5 log₁₀ UI/mL, l'échantillon pur utilisé ayant une CV VHB quantifiée à 3,6 log₁₀ UI/mL. Les CV VHB des échantillons primaires utilisés pour les dilutions sont reportées dans le tableau 2.

Génotype	A	B	C	D	E	F	G	H
CV VHB (log ₁₀ UI/mL) de l'échantillon primaire	8,76	6,97	8,51	7,07	6,23	5,81	7,22	3,61

Tableau 2: CV des échantillons primaires de génotype VHB connu utilisés pour l'étude de linéarité

Les dilutions ont été réalisées à l'aide de plasma VHB négatif, provenant de sujets volontaires sains (ADN VHB plasmatique indétectable par la technique Cobas 6800 et

sérologie VHB correspondant à un profil vaccinal (Ac anti-HBs positifs isolés) ou absence d'immunité et d'infection (marqueurs sérologiques VHB totalement négatifs).

Pour les génotypes A et C, des séries de dilutions au 1/10 ont été réalisées : la première dilution de chacun de ces deux génotypes n'a pas été utilisée pour l'étude car les valeurs de CV théoriquement obtenues étaient supérieures à la limite de la gamme que nous avons fixée. Pour les génotypes B, D et G, 4 dilutions au 1/10 réalisées directement à partir des échantillons de départ ont été utilisées. L'échantillon de génotype E était disponible en faible quantité : nous avons réalisé au préalable une dilution au 1/2 pour obtenir un plasma ayant une CV théorique à $5,93 \log_{10}$ UI/mL à partir duquel nous avons réalisé 3 dilutions au 1/10 en cascade. Concernant le génotype F, l'échantillon pur a été utilisé directement puis 3 dilutions supplémentaires au 1/10 ont été réalisées. Enfin, l'échantillon de génotype H issu des EEQ ayant un volume faible ainsi qu'une CV VHB basse, nous avons réalisé la gamme de dilution suivante : 1/5, 1/10 puis 1/100 à partir de l'échantillon initial. Les valeurs précises des dilutions attendues pour chaque génotype sont reportées dans l'annexe 1.

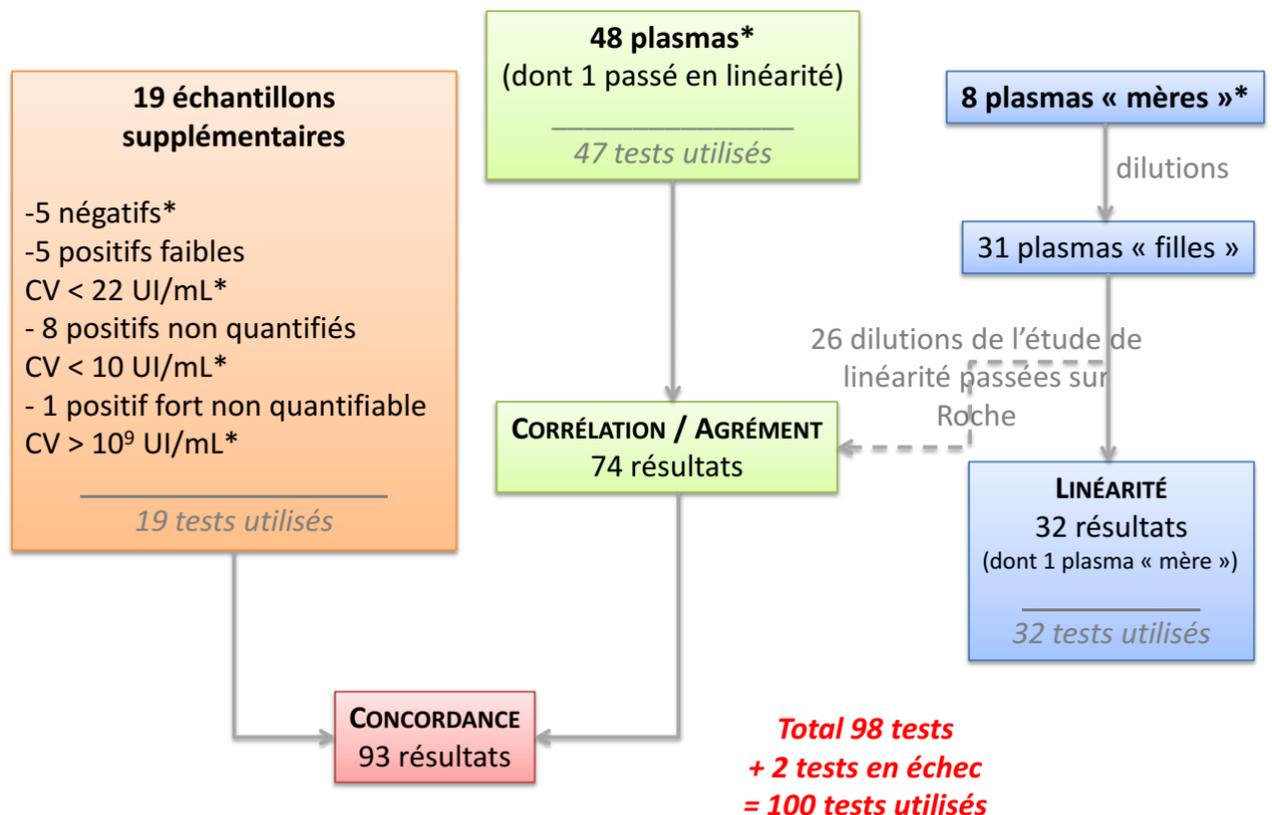
Etude de corrélation et d'agrément :

Au total, 74 plasmas couvrant la gamme analytique du test de 1 à $9 \log_{10}$ UI/mL ont été utilisés pour l'étude de corrélation : 48 plasmas issus de la plasmathèque hospitalière et 26 dilutions de plasmas précédemment utilisées pour l'étude de linéarité (figure 22). Parmi ces 74 échantillons, les profils clinico-biologiques particuliers suivants étaient représentés: 4 échantillons contenant des virus mutés sur l'AgHBs, 32 échantillons contenant des virus présentant des mutations de résistance aux antiviraux et 13 plasmas issus de patients co-infectés par le VIH et/ou le VHC.

Etude de concordance :

Au total, 93 plasmas ont été utilisés pour l'analyse de concordance : les 74 plasmas utilisés pour l'étude de corrélation/agrément et 19 échantillons supplémentaires choisis en fonction de leur CV déterminée par la technique Cobas 6800 : 5 plasmas indétectables, 8

plasmas < 10 UI/mL, 5 plasmas positifs faibles (quantifiés entre 13 et 22 UI/mL) et 1 plasma > 10⁹ UI/mL.



* Connu en Roche Cobas 6800

Figure 22: Schéma du déroulement de l'étude

III. Détermination des charges virales VHB

i. Le Cobas 6800

Les plasmas issus de la plasmathèque hospitalière ont été préalablement testés sur Cobas 6800, considéré comme la technique de référence. Il s'agit de la technique utilisée en routine pour la quantification de l'ADN VHB au laboratoire de Virologie du CHU de Bordeaux. Cette technique nous a également permis d'attester l'absence de détection de l'ARN du VIH-1, du VHC et de l'ADN du VHB de nos plasmas diluants, de quantifier les QCMD utilisés pour

l'étude du VHB de génotype H et de tester les plasmas dilués utilisés dans l'étude de linéarité, afin d'étayer l'étude de corrélation.

ii. Le système GeneXpert®

Aucun des 100 tests GeneXpert® HBV-VL RUO dont nous disposons n'a été utilisé afin de rendre un résultat à un médecin prescripteur ou un patient. Ces tests ont été utilisés conformément aux recommandations du fournisseur, après stockage à +4°C.

Présentation de l'automate :

Le GeneXpert® est un automate de biologie moléculaire « tout-en-un », intégrant les étapes de purification d'échantillon, d'amplification des acides nucléiques et de détection des séquences cibles selon un protocole de PCR en temps réel. Le système se compose d'un automate connecté à un ordinateur portable dédié et du logiciel « GeneXpert » permettant le lancement des tests, la visualisation et la sauvegarde des résultats.



Figure 23: Automate GeneXpert® IV

L'automate peut comporter plusieurs modules (selon les modèles) destinés à recevoir les cartouches à l'intérieur desquelles ont lieu les réactions de biologie moléculaire proprement dites. Chaque module est indépendant et traite un échantillon à la fois, mais permet de gérer l'intégralité de l'analyse.

✓ **Le module :**

Un module est composé de tous les éléments nécessaires au fonctionnement d'une cartouche de test. Ceci comprend donc la nécessité de réhydrater les billes réactionnelles (cf. infra), le transfert de liquides dans les chambres de la cartouche, la réalisation de la réaction de PCR et la détection du signal au cours de celle-ci. De manière plus détaillée, la composition simplifiée d'un module de l'automate est la suivante :

- le moteur de valve : fait pivoter le corps de la valve de la cartouche afin d'atteindre les différentes chambres de la cartouche,
- le moteur du piston de la seringue ; permet de distribuer les liquides dans les différentes chambres de la cartouche,
- un émetteur d'ultrasons afin de lyser l'échantillon
- le module I-CORE® (*Intelligent Cooling/Heating Optical Reaction Module*) : c'est le « cœur » de l'appareil, dans lequel s'effectuent l'amplification et la détection au cours de la réaction de PCR.

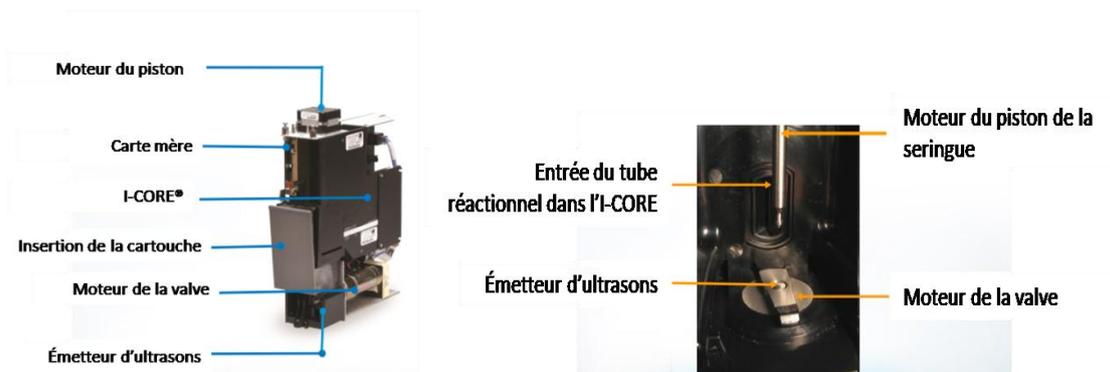


Figure 24: Composition d'un module GeneXpert® et vue de l'intérieur d'un module GeneXpert®

Adapté d'après Cepheid

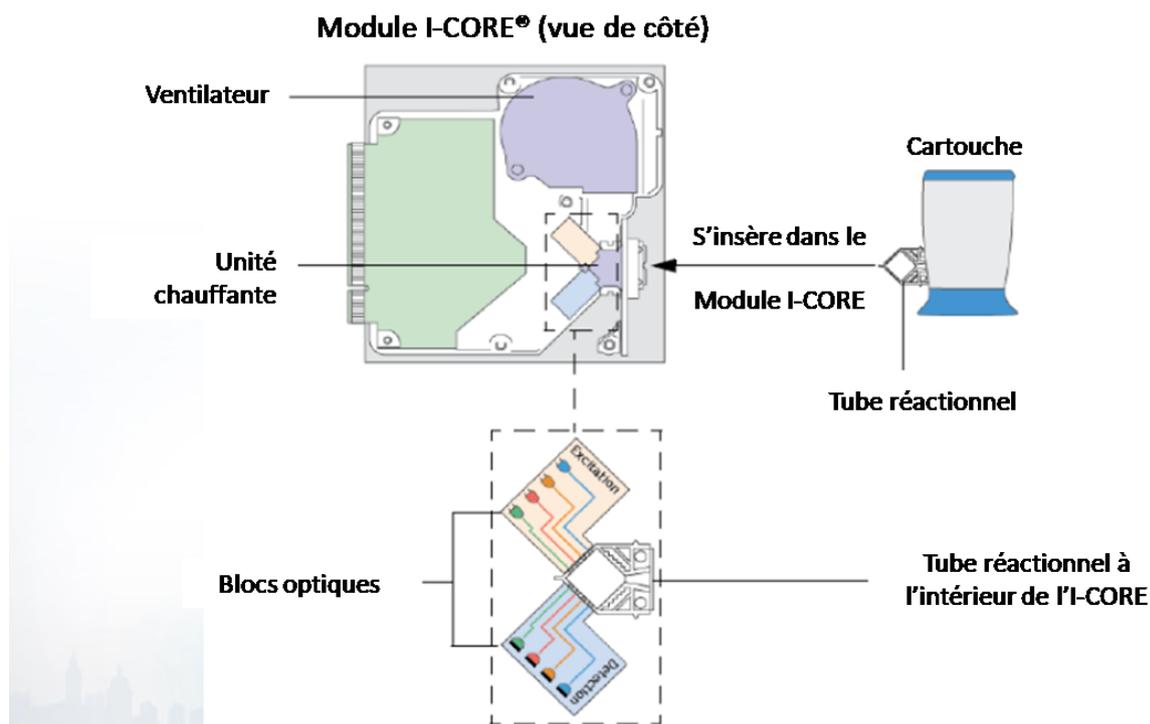


Figure 25: Schéma d'un module et son I-CORE®

Adapté d'après Cepheid

✓ **La cartouche réactionnelle :**

La réalisation d'un test nécessite l'utilisation d'une cartouche à usage unique GeneXpert® HBV-VL. Chaque cartouche GeneXpert® est un dispositif de test clos : la réaction de PCR en temps réel a lieu à l'intérieur de la cartouche, chacune contenant l'ensemble des réactifs nécessaires à l'extraction, la purification, l'amplification et la détection du signal de PCR. La technologie Cepheid est basée sur le fait que tous ces réactifs sont présents sous forme de billes lyophilisées dans la cartouche, permettant ainsi une conservation à long terme de réactifs réputés « fragiles » comme des enzymes d'amplification. Ces réactifs sont ensuite réhydratés au sein de la cartouche pendant la réalisation du test.

Chaque cartouche réactionnelle contient :

- 3 billes de réactifs lyophilisées (de compositions différentes)
- 1,7 mL de réactif de lyse au guanidinium thiocyanate
- 0,5 mL de réactif de rinçage
- 1,5 mL de réactif d'éluion

- 1,5 mL de réactif de liaison
- 0,48 mL de réactif à la protéinase K

Des contrôles internes permettent au système de détecter des modes d'échec spécifiques au sein de chaque dispositif de test :

- Un contrôle de vérification de la sonde (PCC pour « Probe Check Control »)
- Des références internes quantitatives (RIQ) : un contrôle bas « IQS-L » et un contrôle haut « IQS-H »
- Contrôle d'adéquation du volume de l'échantillon (AVE)
- Paramètres spécifiques au lot (LSP)

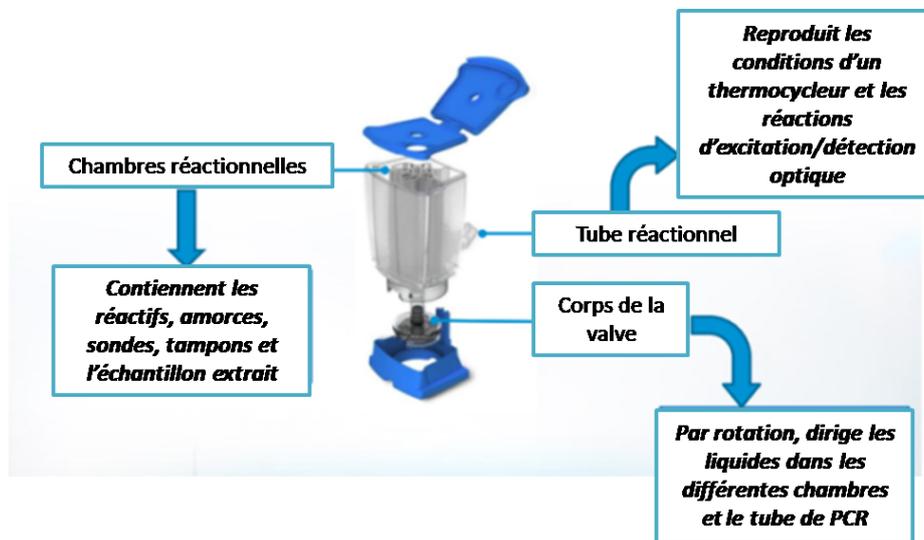


Figure 26: Schéma d'une cartouche

Adapté d'après Cepheid

Protocole de réalisation d'un test :

Après avoir suivi les indications données par le logiciel de l'automate pour programmer un test, le protocole de réalisation d'un test HBV-VL sur le GeneXpert® est le suivant :

- Ouvrir la cartouche en soulevant délicatement le couvercle
- Pipeter entre 600 et 750 µL de plasma à l'aide d'une pipette automatique de précision ou 1 mL à l'aide de la pipette fournie dans le kit

- Rejeter le plasma dans la cartouche par l'orifice situé au coin inférieur droit, en veillant à ne pas créer de bulle
- Refermer la cartouche par simple pression sur le couvercle
- Insérer la cartouche dans un des modules de l'automate, le test démarre une fois le module refermé.

Dans un protocole de biologie moléculaire classique, un fonctionnement rigoureux avec une circulation des personnes, du matériel, et des échantillons allant de pièces « pré-PCR » aux pièces « post-PCR » est indispensable, afin d'éviter notamment d'éventuelles contaminations. Ici, *a contrario*, aucun équipement spécialisé ou aménagement du laboratoire n'est nécessaire à la réalisation de l'analyse. De la réception de l'échantillon jusqu'au rendu de résultat, toutes les étapes ont lieu dans la même pièce. Nous avons travaillé sur l'automate GeneXpert® IV, doté de 4 modules, installé dans la pièce de réception des échantillons du PTBM (Plateau Technique de Biologie Moléculaire, Tripode, Hôpital Pellegrin).

Validation d'un résultat de CV VHB sur le GeneXpert®:

Grâce aux systèmes de contrôles internes précédemment cités, lorsqu'un résultat de CV est rendu par le GeneXpert®, cela signifie que le test a satisfait à chacun des points de contrôle programmés par l'automate. Ils permettent de vérifier la fiabilité du système analytique, tant sur le plan mécanique, qu'au niveau de la réaction de PCR elle-même.

✓ Le contrôle de sonde (Probe Check Control (PCC))

Avant le début de la réaction de PCR, le système mesure le signal de fluorescence des sondes afin de surveiller les différents processus indispensables à l'analyse :

- La réhydratation des réactifs
- Le remplissage des tubes réactionnels
- L'intégrité de la sonde de PCR
- La stabilité des fluorochromes

Le contrôle de vérification de la sonde permet de détecter de potentiels évènements bloquant la réaction de PCR, à savoir :

- L'absence du réactif spécifique de la cible ou des billes de réactif enzymatique qui contiennent amorces, sondes et matrices de contrôle interne
- La reconstitution incomplète des réactifs
- Un remplissage incomplet des tubes réactionnels
- La dégradation éventuelle des sondes

Les mesures sont comparées aux valeurs par défaut établies par le fabricant. Dans le cas où les valeurs mesurées satisfont aux critères d'acceptation attribués, le PCC est réussi. A l'inverse, si la vérification de la sonde échoue, l'analyse ne peut démarrer, elle est interrompue par le système expert qui rendra un résultat de test « ERROR » (ERREUR).

✓ **Les références internes quantitatives (RIQ ou IQS *Internal Quantitative Standards*)**

Elles consistent en du matériel génétique contenu sous forme d'une bille lyophilisée soumis à l'intégralité du processus GeneXpert®. Ces séquences sont incluses dans deux plasmides linéarisés et sont distinctes de l'analyte afin d'éviter toute concurrence. Les RIQ sont calibrées par rapport aux étalons OMS lors de la production des réactifs.

Ces références revêtent un rôle double : elles sont utiles à la détection d'éventuels inhibiteurs de PCR ainsi qu'à la quantification de la concentration en ADN du VHB dans l'échantillon en jouant le rôle d'étalon interne par l'intermédiaire d'un calcul utilisant les paramètres spécifiques au lot.

Tout comme pour le PCC, les références internes RIQ-H (IQS-H pour haut ou *high*) et RIQ-B (IQS-L pour bas ou *low*) réussissent si elles répondent aux critères d'acceptation établis par Cepheid. En cas d'échec, le test prend fin, et le système rend un résultat « INVALID » (NON VALIDE), indiquant que les Ct du RIQ-B ou du RIQ-H ne sont pas dans la plage acceptable.

✓ **Le contrôle d'adéquation du volume de l'échantillon ou contrôle d'AVE**

Il permet de vérifier que le volume d'échantillon est suffisant pour réaliser correctement l'analyse, selon les spécifications fixées par le fournisseur.

En cas d'échec, à savoir volume d'échantillon insuffisant ou échantillon absent, l'analyse ne peut aboutir et s'interrompt, avec un test « ERROR » (2096 si absence d'échantillon ou 2097 si le volume est insuffisant).

✓ **Paramètres spécifiques du lot (LSP)**

Les LSP (ou *Lot Specification Parameters*) correspondent aux données propres à chaque lot de réactif qui sont importées dans le logiciel GeneXpert® à chaque fois qu'une cartouche est scannée. Ces données permettent notamment de préciser les valeurs limites attendues de Ct minimum et maximum pour les RIQ-H et RIQ-B. Les LSP servent donc à garantir la fiabilité de la quantification génomique du VHB.

IV. Génotypage : technique de génotypage VHB au CHU de Bordeaux

Le génotypage peut être réalisé si la CV de l'échantillon à étudier est suffisante, c'est-à-dire au moins égale à 500 UI/mL. L'ADN du VHB est extrait à partir de 200 µL de plasma sur l'automate Magna Compact® Roche. Le génotypage repose sur la comparaison d'une région du gène de la polymérase du VHB de l'échantillon à tester avec une banque de données après séquençage de celui-ci. Pour cela, deux réactions de PCR sont réalisées selon la méthode de PCR « nichée » ou *nested PCR*. La première réaction de PCR, d'une durée de 2h10, utilise les amorces CHBV-3 (5'-CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC-3') et HBVSeq 17 Rev (5'-CGTCCCGCG(AC)AGGATCCAGTT-3'). La deuxième PCR, dont la séquence cible est nichée à l'intérieur du produit de la première PCR, dure 2h15 et utilise les amorces VT301 (5'-CYTGGCGWAAATTCGAGTCCC-3') et VT1022 (5'-GCAAANCCCAAAGACCACAAT-3'). Ces deux réactions de PCR se déroulent selon le programme présenté dans le tableau 3. On obtient alors un fragment d'ADN de 721 pb codant une partie (nt 1214-1934, sous-domaines A-E) du gène de la polymérase du VHB. Puis, le séquençage par la technique de Sanger est réalisé selon le programme défini par le laboratoire, d'une durée de 2h10. Les séquences

sont ensuite analysées à l'aide du logiciel SeqScape v2.7, et comparées à des séquences de référence de génotype connu : cela nous permet d'obtenir le génotype VHB de la souche étudiée et de rechercher la présence éventuelle de mutations de résistance aux antiviraux situées sur le gène porteur de l'activité reverse transcriptase de la polymérase du VHB.

1 ^{ère} PCR « HBV-1 »		Etape	Température	Durée
		Début de la dénaturation	94°C	12 minutes
30 cycles	Dénaturation	94°C	45 secondes	
	Hybridation	63°C	45 secondes	
	Polymérisation	72°C	45 secondes	
	Fin de l'élongation	72°C	7 minutes	
	Terminaison	8°C	5 minutes	
		Ambiante	A l'infini	
2 ^{ème} PCR « HBV-2 »		Début de la dénaturation	94°C	12 minutes
	30 cycles	Dénaturation	94°C	45 secondes
		Hybridation	56°C	45 secondes
		Polymérisation	72°C	45 secondes
		Fin de l'élongation	72°C	7 minutes
		Terminaison	8°C	5 minutes
			Ambiante	A l'infini

Tableau 3: Programme de la PCR nichée pour le génotypage du VHB au CHU de Bordeaux

Variant VHB	Degré de sensibilité				
	Lamivudine	Telbivudine	Entecavir	Adefovir	Tenofovir
Type sauvage	S	S	S	S	S
M204V*	R	S	I	S	S
M204I	R	R	I	S	S
L180M+M204V	R	R	I	S	S
A181T/V	R	R	S	R	I
N236T	S	S	S	R	I
A181T/V+N236T	R	R	S	R	I/R
L180M+M204V/I±I169T±V173L±M250V	R	R	R	S	S
L180M+M204V/I±T184G ±S202I/G	R	R	R	S	S

R: résistant S: sensible I: intermédiaire

*la mutation M204V isolée n'est pas souvent détectée en diagnostic, son profil de résistance croisée a surtout été décrit *in vitro*.

Tableau 4: Principales mutations de résistance aux antiviraux et leur interprétation

V. Analyse des résultats

Les calculs et graphiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Excel.

Résultats

I. Etat des lieux : données épidémiologiques des bilans de qualification des donneurs d'organes en EME au CHU de Bordeaux depuis 2014

Sur ces cinq dernières années, le laboratoire de Virologie du CHU de Bordeaux a reçu en moyenne 167 bilans de qualification des donneurs d'organes par an. Depuis 3 ans, on constate une légère diminution du nombre de bilans (figure 27).

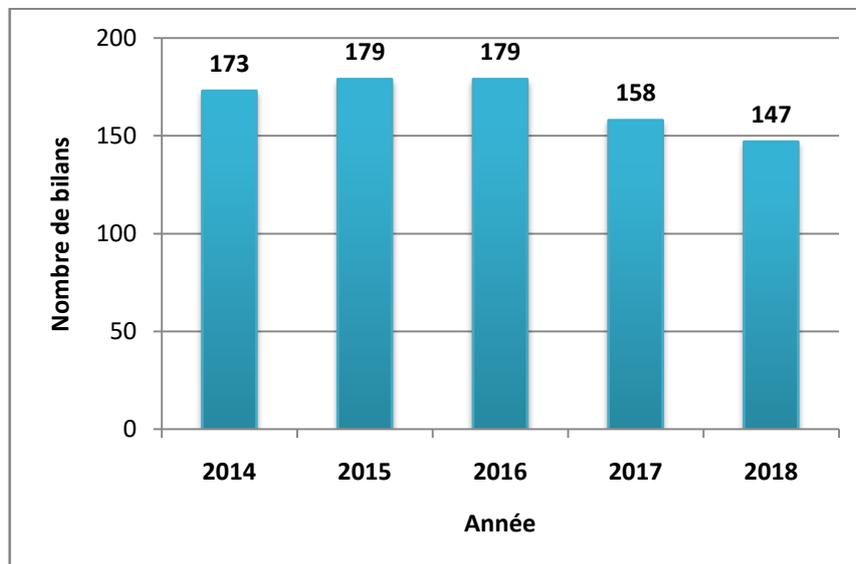


Figure 27: Nombre de bilans de qualification virologique des donneurs pour PMO reçus au Laboratoire de Virologie du CHU de Bordeaux

L'origine de ces bilans se partage à part quasi-égales entre le CHU de Bordeaux et les CH périphériques. Parmi ces derniers, les CH de Périgueux et de Bayonne fournissent le plus grand nombre de bilans avec près de 10% des bilans enregistrés au laboratoire de Virologie du CHU de Bordeaux (figure 28).

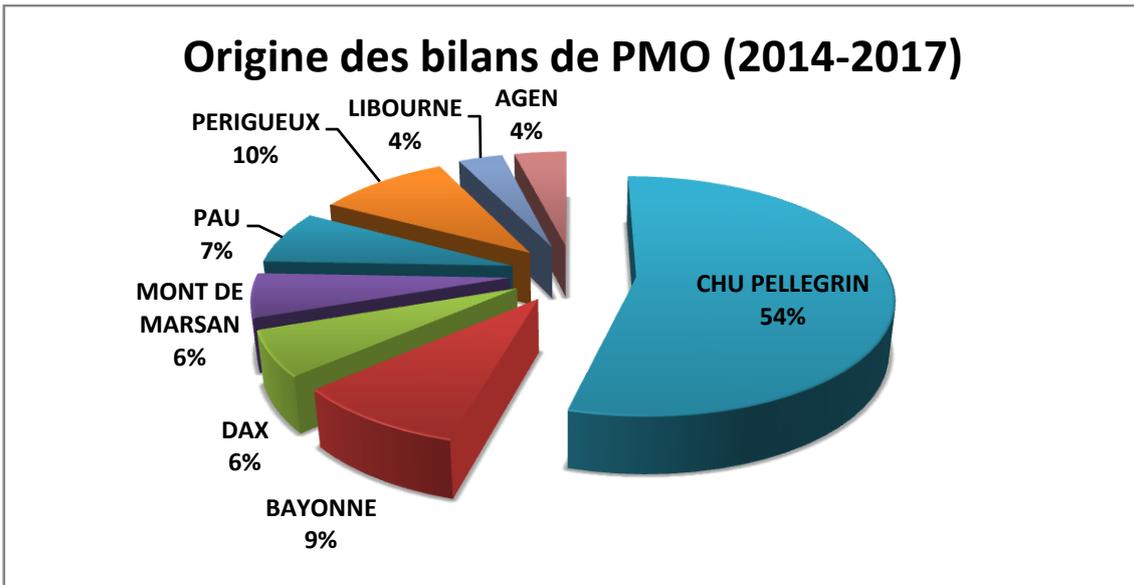


Figure 28: Origine des bilans de qualification virologique des donneurs pour PMO reçus au Laboratoire de Virologie du CHU de Bordeaux

La répartition par sexe est équilibrée, avec un sex-ratio calculé à 1,08 pour les bilans entre 2014 et 2018, malgré une discrète prédominance masculine observée pour les années 2015 à 2017 (figure 29).

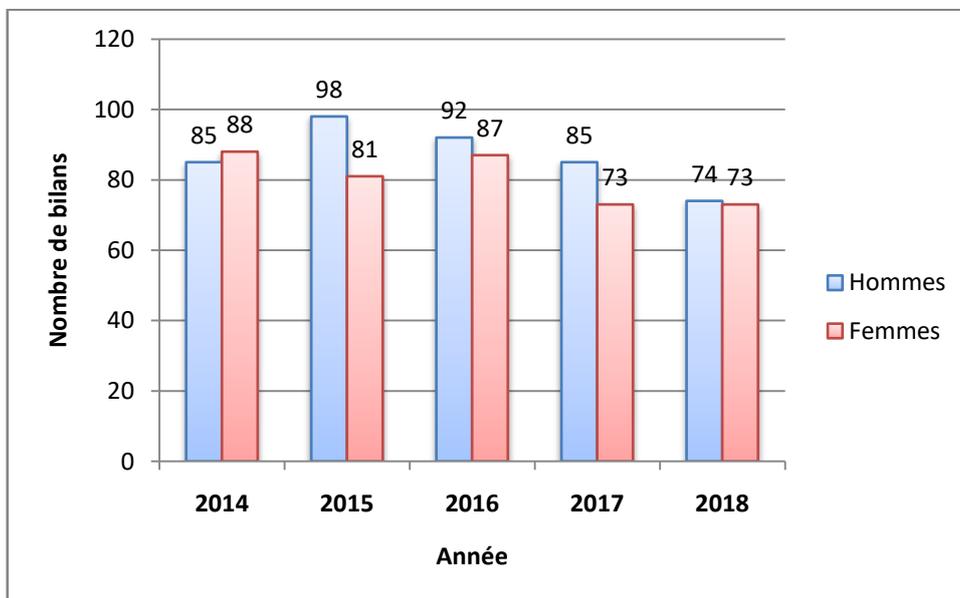


Figure 29: Répartition par sexe des bilans de qualification virologique des donneurs pour PMO reçus au Laboratoire de Virologie du CHU de Bordeaux

La moyenne d'âge des donneurs pour l'année 2018 est de 62 ans et on constate une légère augmentation de l'âge moyen au fil des années, avec une progression de 2 ans depuis l'année 2014. Ce constat est retrouvé lorsqu'on observe les moyennes d'âges par sexe, avec une progression de 3 ans pour les femmes et 2 ans pour les hommes depuis l'année 2014. On observe aussi que les femmes sont légèrement plus âgées que les hommes au moment du don, quelle que soit l'année étudiée (figure 30).

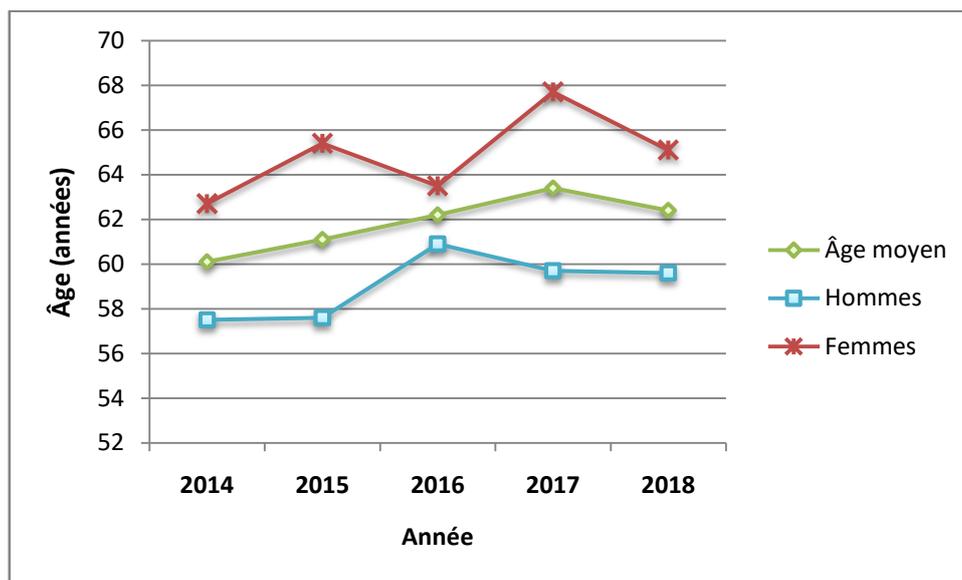


Figure 30: Âge moyen des donneurs pour PMO par année et par sexe, relevé au CHU de Bordeaux

L'étude de la répartition du nombre de donneurs par catégorie d'âge depuis 2014 va dans le sens des observations nationales. La classe des 18-49 ans est devenue minoritaire par rapport aux classes plus âgées et on constate que la classe des 65 ans et plus occupe davantage de place d'année en année, représentant à ce jour plus de la moitié des donneurs enregistrés.

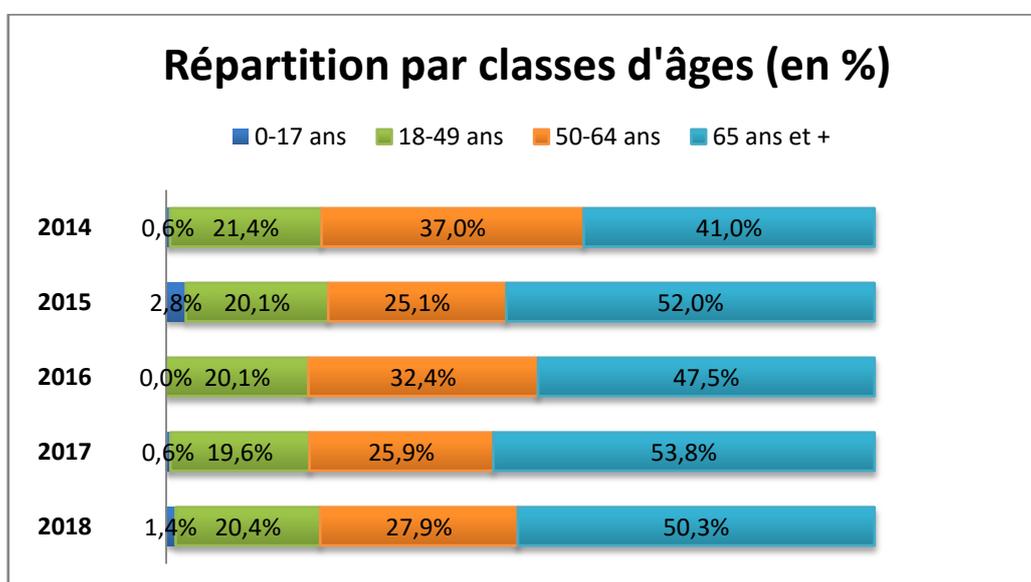
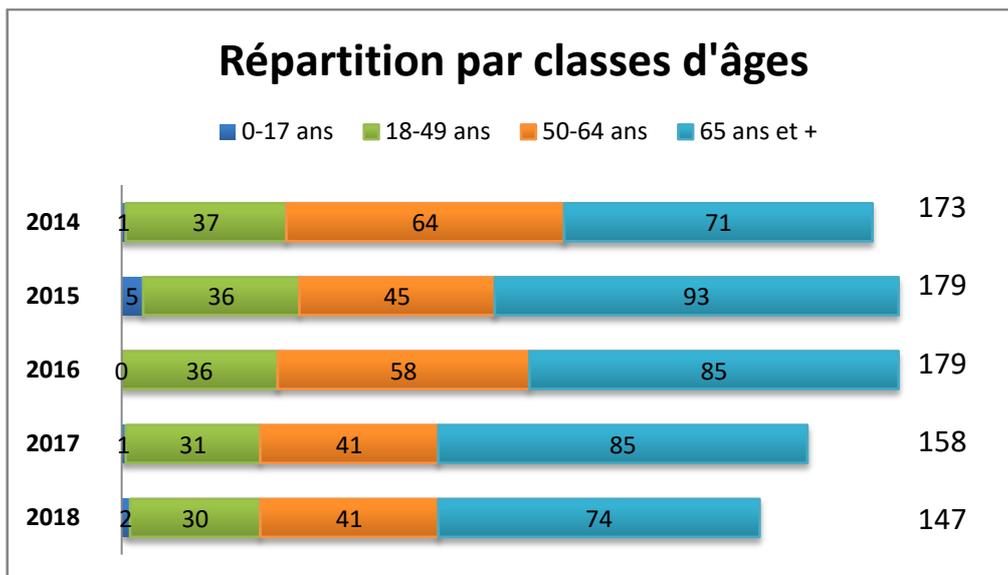


Figure 31: Répartition par classes d'âges du nombre de donneurs enregistrés pour bilans de PMO au CHU de Bordeaux entre 2014 et 2018, en valeur absolue et pourcentage

Nous avons recueilli le nombre de marqueurs viraux positifs pour les infections à HTLV, VIH, VHC ou VHB parmi les bilans de PMO reçus entre 2014 et 2017. Aucun marqueur d'infection à HTLV ni à VIH n'a été retrouvé. Parmi les 10 sérologies hépatite C positives, 2 ARN VHC ont été détectés. Le 3^{ème} ARN VHC positif était détecté mais non quantifié (< 12 UI/mL), sur un bilan de 2014 présentant par ailleurs une sérologie VHC négative. Pour ce bilan, un contrôle de la CV VHC réalisé sur sérum n'avait pas détecté d'ARN du VHC ; il avait été alors conclu à un très probable faux positif de la première recherche. Un total de 23 bilans présentait des

Ac anti-HBc positifs. L'AgHBs a été détecté dans 2 cas, associé à une CV VHB positive. Six bilans associaient des AgHBs et Ac anti-HBs négatifs, ainsi qu'une CV VHB négative (rendue à posteriori, sauf pour 1 bilan qui a été annulé) ; ces profils réuniraient les conditions de prélèvement en vue d'une greffe dérogatoire (cf tableau 1). Les 15 autres bilans AgHBs négatifs montraient des Ac anti-HBc associés aux Ac anti-HBs et une CV VHB indétectable, pouvant correspondre à un profil d'hépatite B « guérie ».

Marqueur	Résultats positifs entre 2014-2017	
Sérologie HTLV	0	
Sérologie VIH	0	
ARN VIH	0	
Sérologie VHC	10	
ARN VHC	3	
Ac anti-HBc	23	1 AgHBs + / Ac anti-HBs - / Ac anti-HBc + / ADN VHB +
		1 AgHBs + / Ac anti-HBs + / Ac anti-HBc + / ADN VHB +
		6 AgHBs - / Ac anti-HBs - / Ac anti-HBc+ / ADN VHB – (sauf 1 non réalisé)
		15 AgHBs - / Ac anti-HBs + / Ac anti-HBc+ / ADN VHB – (sauf 1 non réalisé)

Tableau 5: Profils sérologiques positifs rencontrés dans les bilans de PMO reçus au CHU de Bordeaux entre 2014 et 2017

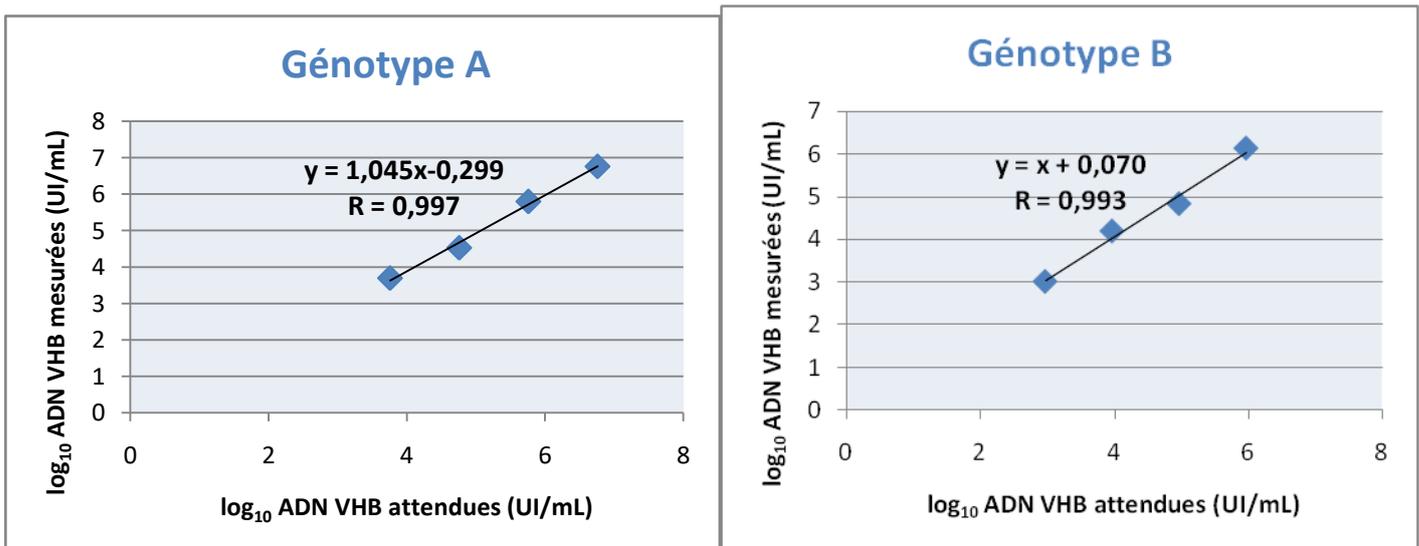
II. Evaluation des performances du test GeneXpert® CV VHB

i. Etude de la linéarité en fonction des génotypes

L'étude de linéarité de la quantification de l'ADN VHB en fonction des génotypes a été réalisée à partir de différentes dilutions de plasmas infectés par les 8 génotypes du VHB.

Pour chaque génotype, les 4 valeurs de CV VHB observées ont été comparées aux valeurs de CV théoriques attendues. Dans tous les cas, nous avons obtenu une réponse linéaire du test GeneXpert® sur les gammes de concentrations étudiées : de 3 à 6 \log_{10} pour les génotypes A à G et de 1,5 à 3,5 \log_{10} pour le génotype H. Une étroite corrélation a été constatée entre les valeurs observées et les valeurs attendues ($r = 0.992$ à 0.999).

Les pentes des 8 droites de corrélation sont comprises entre 0.959 et 1.045 : les tests de Student effectués sur chaque valeur de pente et d'ordonnée à l'origine ne montrent pas de différence significative avec la valeur 1 et 0, respectivement (cf. annexe 2).



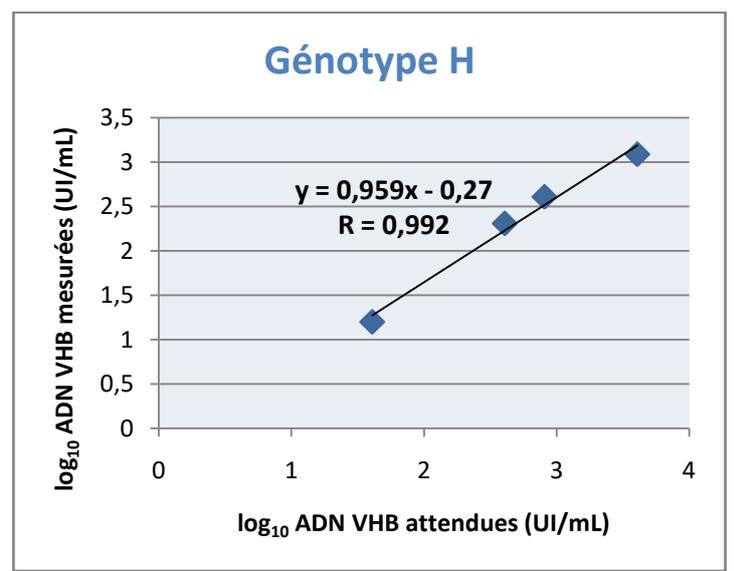
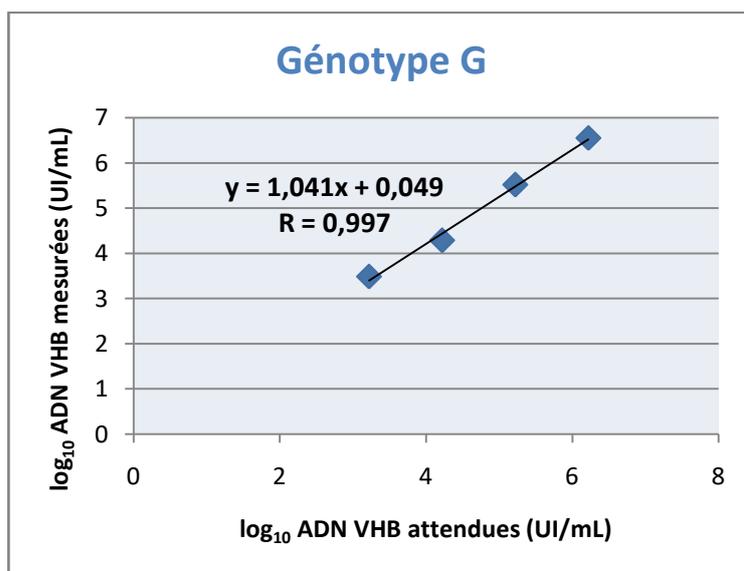
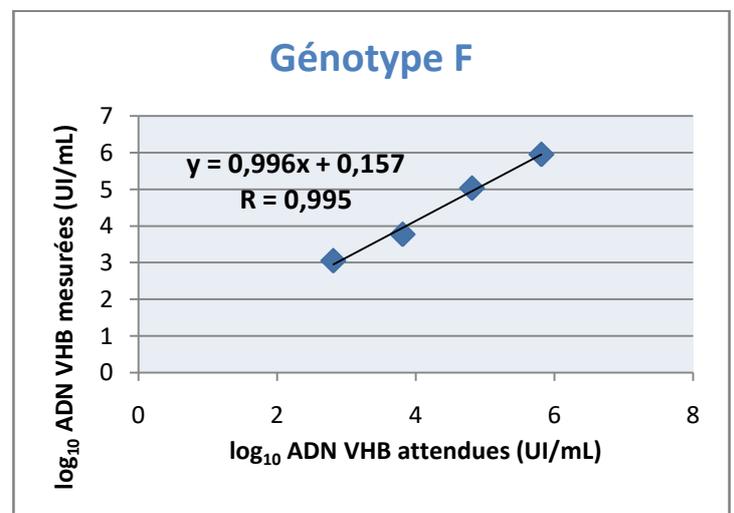
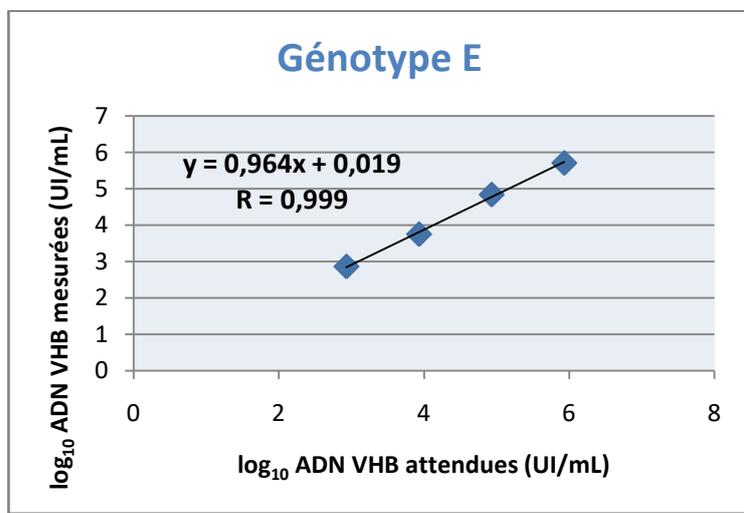
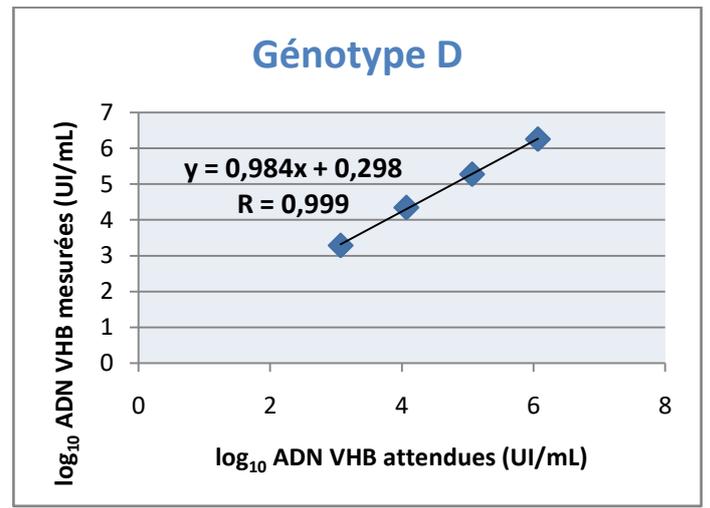
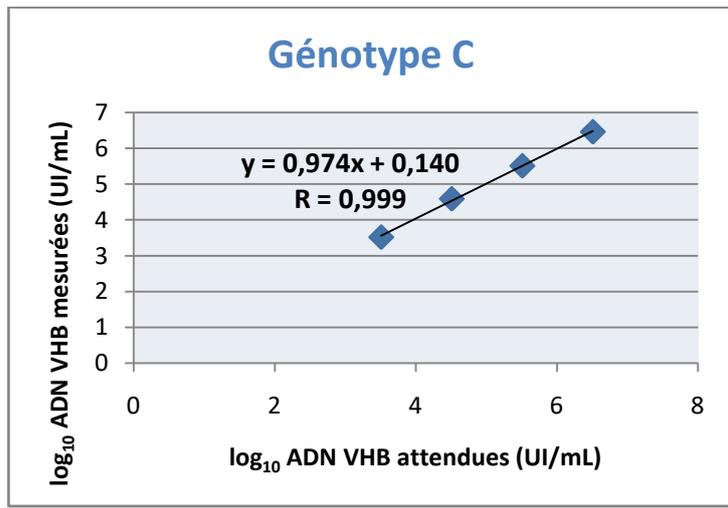


Figure 32: Droites de linéarité obtenues pour chaque génotype du VHB avec la technique GeneXpert® et leurs coefficients de corrélation r

ii. Corrélation entre GeneXpert® et Cobas 6800

Pour étudier la relation entre le Cobas 6800 et le GeneXpert®, les résultats de CV VHB de 74 échantillons compris entre 1.46 et 9 log₁₀UI/ml ont été comparés. Les 2 techniques étaient significativement corrélées sur toute la gamme de concentrations étudiée ($r = 0.993$), en particulier dans le cas des échantillons présentant un VHB muté sur l'AgHBs, ayant des mutations de résistance aux antiviraux ainsi que pour les plasmas de patients co-infectés par le VIH et/ou le VHC.

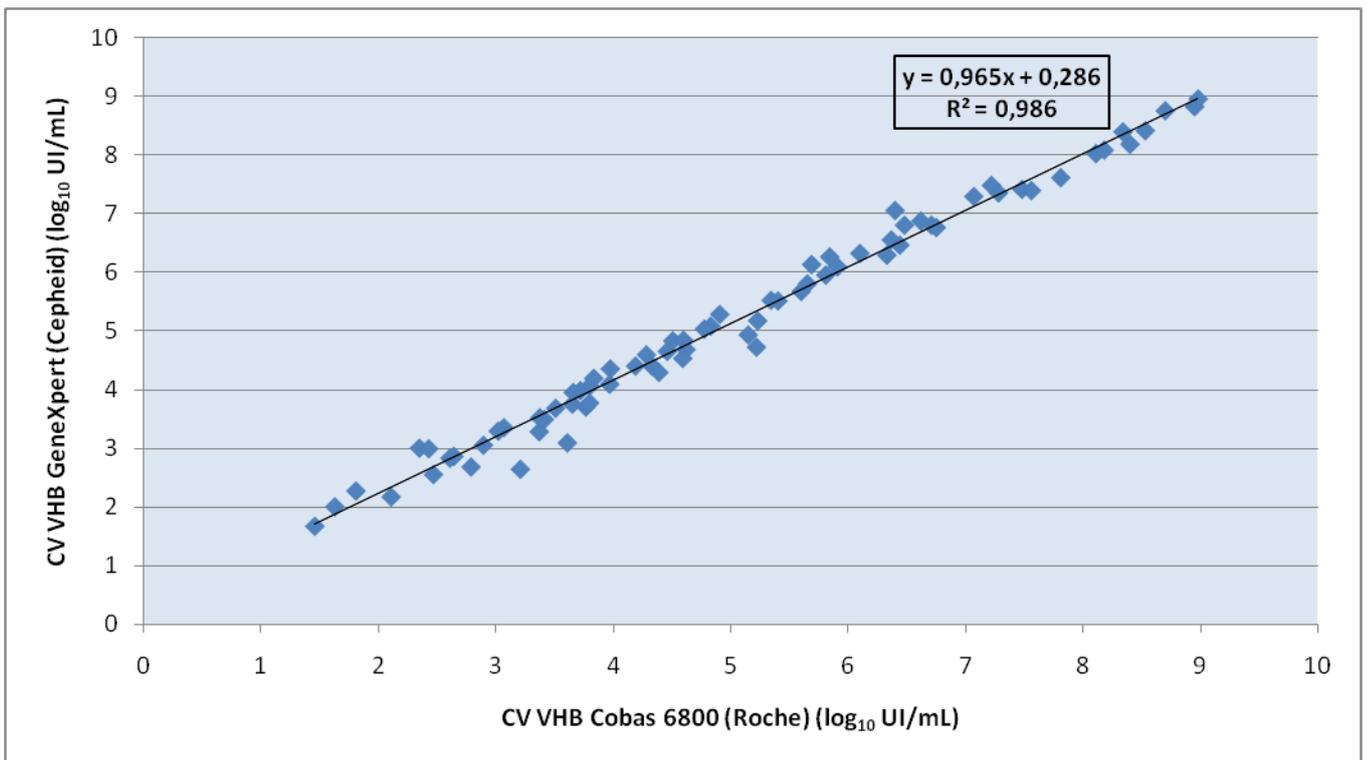


Figure 33: Etude de corrélation entre Cobas 6800 et GeneXpert® CV VHB sur 74 échantillons

iii. Agrément entre GeneXpert® et Cobas 6800

Pour déterminer le degré d'agrément entre les deux tests, un graphique de Bland-Altman (figure 34) a été construit, dans lequel nous avons comparé les valeurs obtenues pour les 74 échantillons par les deux techniques.

Les différences entre les CV mesurées [CV GeneXpert] - [CV Cobas 6800] y sont reportées en fonction des moyennes des deux mesures. En moyenne, les valeurs produites par GeneXpert® étaient plus élevées de 0.12 log₁₀ UI/mL par rapport à celles du Cobas 6800. Les limites basses et hautes d'agrément correspondant à ± 1.96 écart-type étaient à -0.34 et 0.57 log₁₀ UI/mL. Trois échantillons ont montré une différence en valeur absolue plus importante que la limite inférieure d'agrément : il s'agissait d'un échantillon de génotype A d'un patient co-infecté par le VIH, d'un patient ayant un VHB de génotype E, également infecté par le VIH et dont le VHB présentait 2 mutations de résistance aux antiviraux (T184L/M204I) et de l'échantillon de génotype H issu du programme d'EEQ. Deux échantillons avaient une différence plus grande que la limite à +1.96 SD : il s'agissait de plasmas non génotypés.

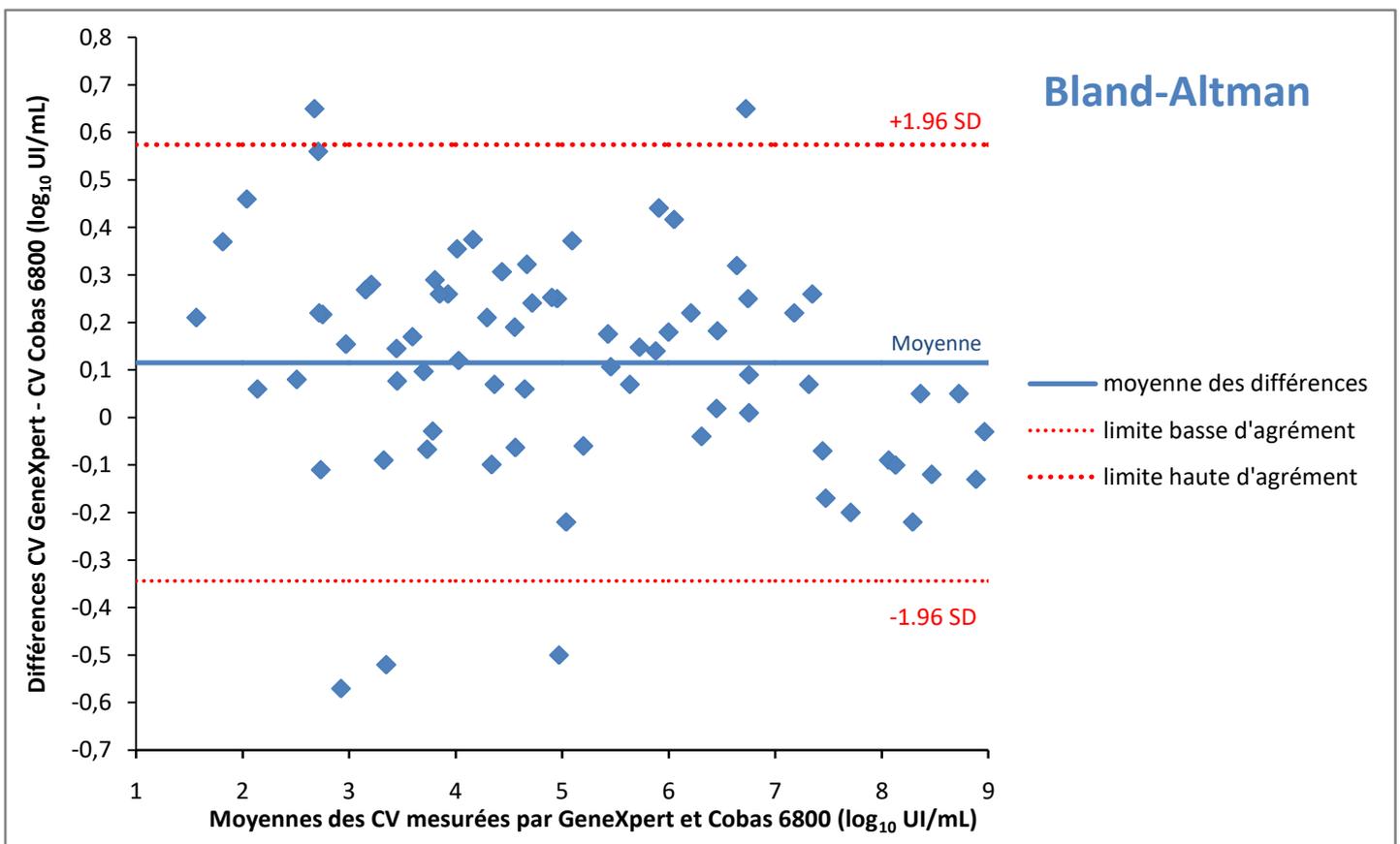


Figure 34: Graphique de Bland-Altman représentant le niveau d'agrément entre Cobas 6800 et GeneXpert® CV VHB sur 74 échantillons

On constate que la surestimation des résultats par GeneXpert® est plus fréquente pour les échantillons de génotype B, D, F et G (figures 35 et 36), pour lesquels les différences moyennes entre les mesures de ces échantillons par les 2 techniques étaient supérieures à la moyenne globale des différences (0.37, 0.23, 0.23 et 0.15 log₁₀ UI/mL respectivement). Les 3 échantillons de génotype B ont tous donné des résultats supérieurs sur GeneXpert® d'au moins 0,3 log₁₀ UI/mL par rapport au Cobas 6800. Parmi les 14 échantillons de génotype D, 11 (79%) ont montré une différence entre les deux mesures supérieure à la moyenne des différences observée. Six échantillons de génotype F sur les 7 étudiés (86%) présentaient une différence supérieure à la moyenne de 0,12 log₁₀ UI/mL. Pour le génotype G, cette surestimation par GeneXpert® est un peu moins marquée avec une moyenne des différences à 0,15 log₁₀ UI/mL et 5 points sur 8 (63%) supérieurs à la moyenne des différences globale. L'étude des échantillons de génotype A, C et E n'a pas permis de mettre en évidence une sur- ou sous-estimation par une des deux techniques (différences moyennes de -0.12, 0.04 et 0.05 log₁₀ UI/ml, respectivement).

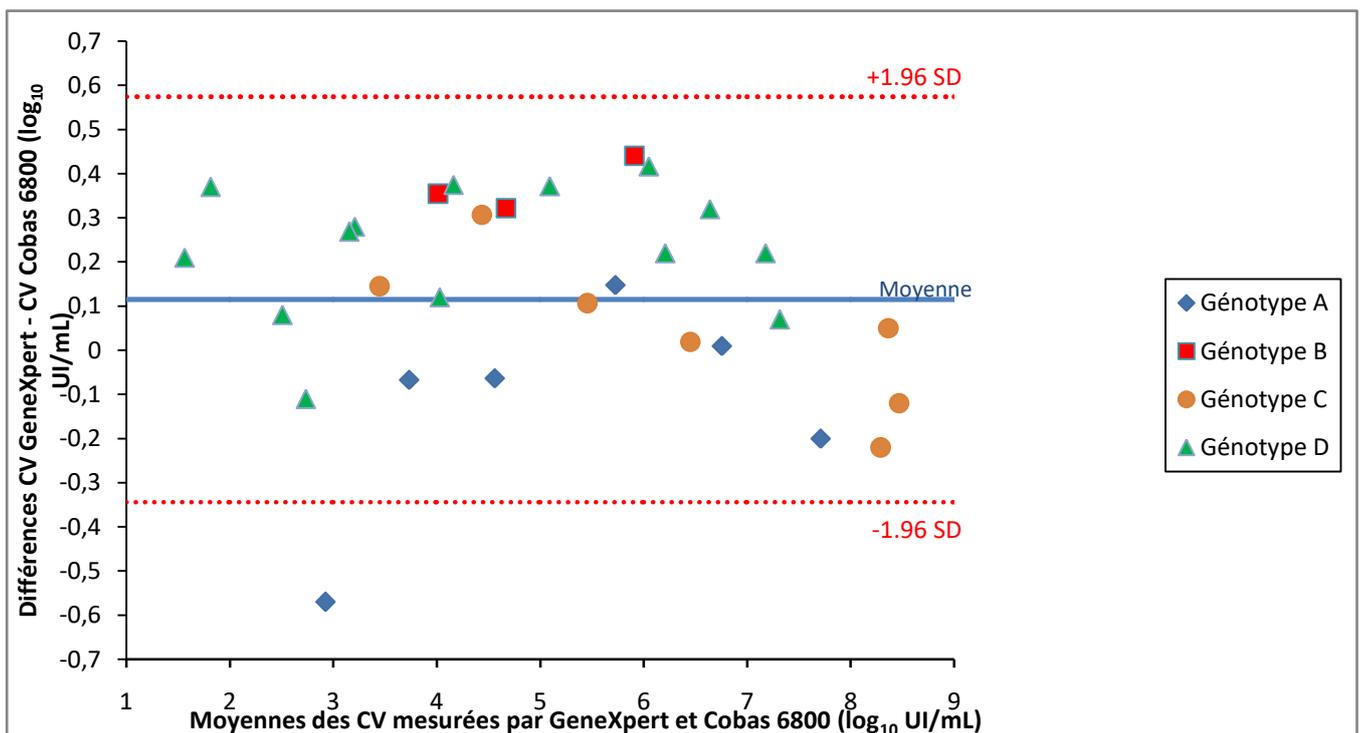


Figure 35: Graphique de Bland-Altman représentant le niveau d'accord entre Cobas 6800 et GeneXpert® CV VHB pour les échantillons de génotypes A, B, C ou D

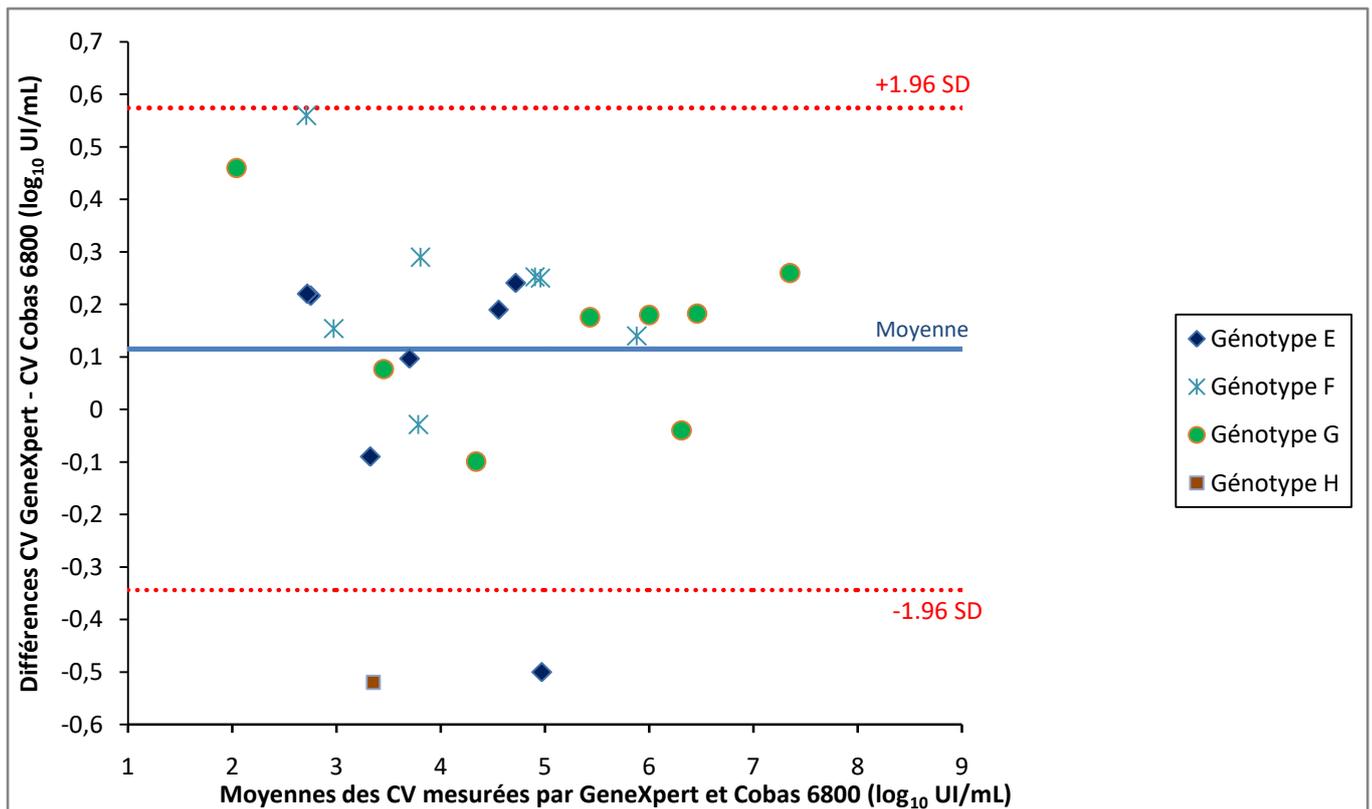


Figure 36: Graphique de Bland-Altman représentant le niveau d'agrément entre Cobas 6800 et GeneXpert® CV VHB pour les échantillons de génotypes E, F, G ou H

De même que pour la corrélation, l'étude d'agrément a utilisé des échantillons comprenant des VHB mutés sur l'AgHBs ou présentant des mutations de résistance aux antiviraux anti-VHB, ainsi que des plasmas de patients co-infectés par le VIH et/ou le VHC. Les 4 échantillons comportant une mutation sur l'AgHBs étaient de génotype D ; les différences observées entre les techniques suivent le constat fait précédemment pour ce génotype. Les échantillons co-infectés par le VIH \pm VHC étaient de génotypes E, F et G principalement et nous n'avons pas constaté d'autre tendance pour ces échantillons que celle décrite pour ces 3 génotypes. Le même constat a été fait pour les VHB présentant des mutations de résistance aux antiviraux qui se répartissaient entre les génotypes D, F et G.

iv. Concordance entre GeneXpert® et Cobas 6800

Au total, 93 échantillons ont servi à l'analyse comparative.

		Cobas 6800			Total
		Négatif	<10 UI/mL	>10 UI/mL	
GeneXpert®	Négatif	5	3	0	8
	<10 UI/mL	0	3	0	3
	>10 UI/mL	0	2	80	82
	Total	5	8	80	93

Tableau 6: Comparaison des résultats obtenus entre Cobas 6800 et GeneXpert® CV VHB (en rouge : résultats discordants)

Avec la technique de référence Cobas 6800, 5 plasmas (5.4%) avaient une CV indétectable et 88 plasmas (94.6%) étaient détectables en ADN VHB (CV quantifiable pour 80 échantillons (86%) et inférieure à la limite de quantification (LOQ) (<10 UI/ml) pour les 8 autres (8.6%)).

En comparant ces résultats à ceux obtenus avec GeneXpert®, une concordance globale est observée pour 88 échantillons (94.6%), dont 80 quantifiables en ADN VHB, 3 inférieurs à la LOQ et 5 négatifs avec les deux techniques (tableau 6).

Les 5 résultats discordants figuraient parmi les échantillons positifs inférieurs à la LOQ en Cobas 6800: 3 d'entre eux sont apparus négatifs avec la technique GeneXpert® et les 2 autres ont été quantifiés par GeneXpert®, avec des valeurs très proches de la LOQ (10 UI/ml et 11 UI/mL).

v. Evaluation du système GeneXpert® par l'étude des standards internes

Nous avons extrait les résultats obtenus pour les RIQ hautes et basses contenues dans chaque cartouche GeneXpert® utilisée au cours de notre étude afin d'en estimer la fidélité intermédiaire.

Les valeurs des RIQ sont exprimées en nombre de Ct. Les données obtenues sur les 98 cartouches utilisées sont résumées dans le tableau 7.

	Moyenne	Ecart-type	Coefficient de variation
RIQ-B	30.86	0.24	0.77%
RIQ-H	19.84	0.30	1.50%

Tableau 7: Données de reproductibilité des standards internes GeneXpert® sur 98 cartouches

Les faibles coefficients de variation observés nous permettent de conclure à une très bonne précision du système analytique étudié.

III. Retour d'expérience au cours de l'étude et depuis la mise en place de la technique GeneXpert® CV VHB au CHU de Bordeaux

i. Utilisation et problèmes rencontrés pendant l'étude

L'évaluation en conditions réelles de cette trousse nous a permis de déterminer que la durée moyenne d'un test est de 57 min, de son lancement à bord de l'automate jusqu'au rendu du résultat.

Sur les 100 cartouches dont nous disposions, nous avons eu 3 résultats de tests en « ERREUR » :

- Une « erreur d'analyse post-expérience » code 5007 : due à un échec du contrôle de la sonde RIQ-H ; la fluorescence mesurée pour cette sonde a été jugée trop basse par l'appareil.
- Une erreur « opération arrêtée » code 2005 : due à un défaut de détection du mécanisme de transmission de la seringue.

- Une erreur « opération arrêtée » code 2037 : due à un échec du test d'intégrité de la cartouche, pouvant indiquer une fuite ou un compartiment défectueux de la cartouche, ou une erreur sur le module.

Le test ayant donné l'erreur 2037 a été répété avec la même cartouche, car à ce stade d'arrêt du test, l'échantillon n'a pas encore été aspiré dans la chambre échantillon. Lors de ce second essai, le test a correctement fonctionné et a rendu un résultat valide selon tous les critères énoncés précédemment et cohérent avec celui attendu.

Nous avons donc eu au total 2% de résultats en erreur sur l'ensemble des tests effectués.

ii. **Evolution du délai de rendu des résultats de CV VHB des bilans de PMO au CHU de Bordeaux depuis la mise en place du test GeneXpert® CV VHB**

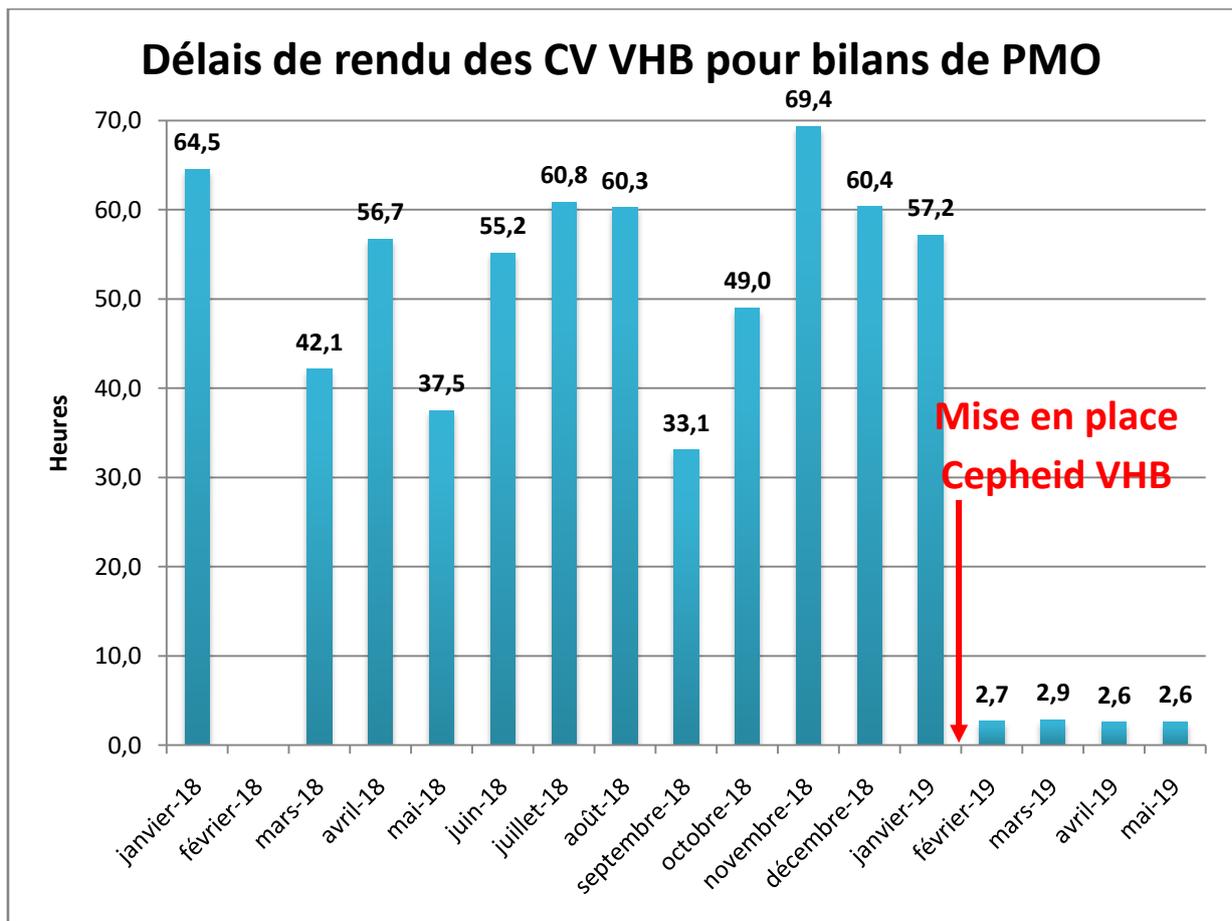


Figure 37: Moyennes mensuelles des délais de rendu en heures des CV VHB pour bilans de PMO au CHU de Bordeaux de janvier 2018 à mai 2019

La trousse GeneXpert® CV VHB a été mise en place le 6 février 2019, sur le plateau technique d'urgence du GHP, à proximité directe des automates réalisant les sérologies virales des bilans de PMO en urgence, permettant de regrouper toutes les analyses réalisées pour ces bilans sur un même plateau technique.

Les délais présentés sur la figure 37 ont été calculés en prenant en compte la différence entre la date et l'heure de réception du prélèvement et la date et l'heure de validation technique de la CV VHB. L'étude des délais de rendu des CV VHB révèle qu'avant la mise en place du GeneXpert® CV VHB, les CV VHB étaient rendues en moyenne en 55,1 heures, soit un peu plus de 2 jours, sur la période étudiée (janvier 2018 à janvier 2019). Le délai minimum observé était de 3,5 heures, correspondant à un bilan reçu le matin du jour de passage des CV VHB en série. Le maximum constaté a été de 196 heures soit un peu plus de 8 jours. Après mise en place du GeneXpert® CV VHB, le délai moyen de rendu est passé à 2,69 heures, soit 2 heures et 41 minutes, avec un minimum constaté de 1,43 heures et un maximum de 5,53 heures.

iii. Résultats et dysfonctionnements rencontrés depuis la mise en place du test GeneXpert® CV VHB

Depuis la mise en place du test GeneXpert® CV VHB pour les bilans de PMO et d'hépatite fulminante au CHU de Bordeaux en février 2019, aucun ADN VHB n'a été détecté positif.

D'autre part, sur 116 tests CV VHB GeneXpert® effectués entre le 6/02/19 et le 30/06/19, deux analyses n'ont pas pu aller à leur terme dans le cadre de bilans d'hépatites fulminantes. Il s'agissait de deux tests en « ERREUR » 2096, signifiant une absence de détection de l'échantillon par l'appareil, correspondant donc à un oubli d'origine humaine. Chacun des 2 tests a été correctement relancé à partir des mêmes échantillons, et a pu fournir des résultats valides.

Discussion

Depuis la demande de l'ABM et des pouvoirs publics de fournir les résultats des PCR virales des bilans de PMO dans les meilleurs délais (8,56,69), les laboratoires de Virologie agréés ont dû trouver des solutions permettant de produire un résultat en urgence, tout en conservant la qualité de l'analyse rendue.

Représentant le 2^{ème} CHU de France pour ce qui est du nombre de prélèvements réalisés sur donneurs en EME, le GH Pellegrin est particulièrement concerné (48). L'état des lieux des bilans de qualification des donneurs reçus depuis 2014 a montré qu'en moyenne, le Laboratoire de Virologie réalise 167 bilans de PMO par an, bien que ces deux dernières années, leur nombre ait légèrement diminué (147 bilans en 2018 contre 179 en 2016). L'âge moyen relevé au moment du don suit la tendance nationale, avec un vieillissement notable de la population des donneurs sur ces dernières années. La tranche d'âge des 65 ans et plus représente aujourd'hui la majorité des donneurs recensés (53,8% en 2017 et 50,3% en 2018 contre 41% en 2014), à la fois dans notre étude, et sur le plan national (46). Ceci est en lien avec les causes de décès des donneurs : la part des accidents de la route a diminué, contrairement aux causes vasculaires, touchant habituellement des sujets plus âgés.

Le laboratoire du CHU de Bordeaux reçoit de nombreux bilans de PMO provenant des CH périphériques des départements alentours. Un délai pouvant aller jusqu'à 2 à 3 heures s'est parfois écoulé entre le moment du prélèvement et la réception des échantillons de sang au laboratoire. Ce délai est à prendre en compte dans le processus global des prélèvements d'organes comme une contrainte supplémentaire, d'autant que 46% des bilans de PMO reçus au laboratoire de virologie entre 2014 et 2017 étaient concernés. L'utilisation de techniques délivrant des résultats en moins de 2 heures est devenue indispensable, tant pour répondre à une exigence légale que par souci d'harmonisation des délais de rendu des résultats.

En France, en 2016, 17 donneurs en EME présentant des Ac anti-HBc positifs isolément ont eu un prélèvement d'organes et ont permis la greffe de 31 reins et 10 foies. Pour les donneurs ayant un statut AgHBs négatif, Ac anti-HBc positif et Ac anti-HBs positif, l'ABM a

recensé 54 donneurs ayant permis de greffer 86 reins, 7 poumons, 28 foies, 7 cœurs et la réalisation d'une greffe cœur-poumons (48). Toujours en 2016, sur les 214 organes greffés à partir de donneurs en EME ayant des marqueurs sérologiques positifs (syphilis, VHB, VHC), 172 (80%) comptaient au moins un marqueur positif pour le VHB (48). Depuis l'évolution de la législation, la part des greffes dérogatoires est donc devenue une activité non négligeable, en particulier concernant le VHB.

Au niveau du CHU de Bordeaux, 2 bilans de PMO ont montré des sérologies VHC et CV VHC positives entre 2014 et 2017. Parmi les 8 autres bilans présentant des Ac anti-VHC, 5 ARN VHC ont été rendus négatifs *a posteriori* (les CV VHC des autres bilans avaient été annulées, comme probablement la décision de prélever suite à la découverte des Ac anti-VHC positifs). La connaissance de la CV VHC avant la greffe aurait donc potentiellement permis de réaliser 10 prélèvements en protocole de greffe dérogatoire (8 pour des receveurs séropositifs pour le VHC et 2 pour des receveurs ayant un ARN VHC détectable). Pour le VHB, les 19 bilans présentant des Ac anti-HBc positifs avec AgHBs et CV VHB négatives auraient pu faire l'objet d'un protocole dérogatoire. En sachant que le nombre moyen d'organes prélevés par donneur est de 3 (48), cela signifie que près de 90 organes auraient pu être prélevés et greffés en protocole dérogatoire au CHU de Bordeaux, sur ces 3 années, si le statut génomique du VHB et du VHC avait été connu en pré-greffe.

Sur le plan des performances du test GeneXpert® CV VHB, nous avons montré que la quantification restait linéaire quel que soit le génotype du VHB. Néanmoins, nous restons réservés pour le génotype H, car nous n'avons pu établir qu'une gamme de concentrations limitée, allant de 1,5 à 3,5 \log_{10} UI/mL, étant donné la rareté des échantillons de ce type. Nous n'avons eu aucun patient infecté par ce type de VHB dans notre recrutement. La répartition de ce génotype reste très confidentielle, n'ayant été détecté qu'en Amérique centrale et en Amazonie (23) et la probabilité que nous soyons confrontés à un virus de génotype H est faible. Cependant, il serait intéressant de réaliser une étude de linéarité de plus grande ampleur sur le génotype H, afin de confirmer nos observations.

La comparaison de méthodes entre GeneXpert® et Cobas 6800 nous a permis de noter quelques différences, grâce à l'étude d'agrément, malgré une forte corrélation entre les

deux techniques. Bien que le « biais » moyen soit faible ($0,12 \log_{10}$ UI/mL dans le sens d'une surestimation par GeneXpert®), des différences plus importantes ont été observées à l'échelle d'un échantillon : la surestimation et la sous-estimation maximale par le GeneXpert® étaient respectivement de $0,65$ et de $-0,57 \log_{10}$ UI/mL. Or, le seuil de définition des réponses virologiques sous traitement pour une hépatite B chronique est fixé à $1 \log_{10}$ UI/mL. Sous NA, une absence de réponse primaire correspond à une diminution de l'ADN VHB inférieure à $1 \log_{10}$ UI/mL à l'issue de 3 mois de traitement, tandis qu'une réponse virologique partielle se définit par une diminution de la CV VHB de plus d' $1 \log_{10}$ UI/mL après au moins 12 mois de traitement. Enfin, un échappement virologique se définit par une augmentation confirmée de la CV VHB de plus d' $1 \log_{10}$ UI/mL par rapport au nadir de la CV VHB pendant le traitement (2). Les différences observées dans notre étude restant proches du seuil décisionnel clinique de $1 \log_{10}$ UI/mL, il ne serait pas possible de suivre un même patient par les deux techniques. En effet, le risque de conclure à tort à une ré-ascension significative de la CV VHB (en cas de surestimation) ou à l'inverse à une bonne réponse au traitement (lors d'une sous-estimation) apparaît trop important. Ceci nous a donc révélé que, malgré la coexistence des deux automates dans le laboratoire de Virologie, il paraît délicat d'utiliser l'un en back-up de l'autre pour le suivi des patients infectés par le VHB.

Parmi les 5 points situés au-delà des limites d'agrément, 2 points concernaient des plasmas de patients co-infectés par le VIH, dont un présentant un VHB ayant 2 mutations de résistance aux antiviraux (T184L / M204I). Nous disposions de 5 autres échantillons ayant ces 2 mutations de résistance, associées à une infection à VIH : la comparaison de leurs résultats obtenus avec le GeneXpert® et le Cobas 6800 a montré des écarts allant de $-0,09$ à $0,24 \log_{10}$ UI/mL. De plus, les échantillons comportant d'autres mutations de résistance (cf. annexes 3 et 4) n'ont pas donné lieu à des écarts différents de ceux observés avec les échantillons contenant des virus non mutés ; la présence de mutations de résistances du VHB, parmi celles étudiées, ne semble donc pas influencer sur la différence de résultats observés entre GeneXpert® et Cobas 6800. Le seul facteur ayant potentiellement pu influencer sur ces résultats est le génotype du VHB, comme cela a été présenté précédemment.

En ce qui concerne la co-infection avec le VIH et/ou le VHC, nous n'avons pas observé de différence significative entre les deux techniques parmi les patients co-infectés à

VIH/VHB±VHC. Les différences de résultats entre GeneXpert® et Cobas 6800 s'échelonnaient de -0.57 à 0.56 log₁₀ UI/mL, avec une différence moyenne de 0.11 log₁₀ UI/mL.

Au niveau de la concordance globale des résultats entre GeneXpert® et Cobas 6800, les valeurs des 5 échantillons discordants se situaient dans la limite de quantification (LOQ) des deux techniques. Les deux CV VHB détectées mais non quantifiées par Cobas 6800 ont donné des résultats très proches sur GeneXpert® (10 et 11 UI/mL) ; ces discordances n'engendreraient pas de différence de prise en charge dans le cadre des PMO car l'ADN du VHB est détecté dans les deux cas. De plus, selon leurs fiches techniques respectives, les limites de détection (LOD) des deux techniques sont de 6.6 et 4 UI/mL pour Cobas 6800 et GeneXpert® respectivement, et leur LOQ est fixée à 10 UI/mL (70,71). Ceci vient bien confirmer que les LOD et LOQ annoncées par les deux fournisseurs sont très proches. En revanche, le cas des 3 CV rendues négatives par GeneXpert® mais détectées < 10 UI/mL par le Cobas 6800 pourrait avoir des conséquences cliniques. Le risque serait d'entamer un protocole de greffe dérogatoire, avec une CV VHB positive faible, non détectée chez le donneur. Des greffes d'organes provenant de donneurs ayant un profil de « portage aigu ou chronique » (AgHBs positif ou virémie à VHB) existent de façon marginale, seulement en cas d'urgence vitale et en l'absence d'alternative thérapeutique pour le receveur, mais n'entrent pas dans le cadre des greffes dérogatoires (72). Dans ce cas, l'instauration d'un traitement préventif associant vaccination, sérothérapie et NA chez le receveur est systématique (73). Le NA le plus étudié dans cette indication a été la LAM, mais l'ETV et le TDF sont maintenant utilisés. Dans le cas des greffes dérogatoires, le risque de développer une hépatite B *de novo* à partir d'un greffon Ac anti-HBc positif est maximal pour une transplantation hépatique (74) et est plus faible en cas de transplantation rénale ou cardiaque. Plusieurs études suggèrent qu'il est préférable d'orienter l'attribution des greffons anti-HBc positifs vers des receveurs AgHBs positif ou immunisés par un titre d'Ac anti-HBs > 100 UI/L (75). Chez les receveurs de foie, il est recommandé d'instaurer un traitement préventif par antiviral sur un temps indéterminé, en fonction du statut sérologique du receveur (73). Ces receveurs seraient donc supposément couverts, même en cas de greffe avec un ADN VHB positif non signalé. D'autres équipes recommandent d'étendre le traitement par NA à tout receveur d'organe provenant d'un donneur ayant des Ac anti-HBc positifs isolés, mais cette pratique ne semble pas faire consensus (76)(69). Le risque résiduel correspondrait donc aux receveurs d'autres

organes que le foie, ayant des Ac anti-HBs, pour lesquels la prévention par NA n'est pas recommandée systématiquement. Cependant, les receveurs d'organes greffés par protocole dérogatoire font l'objet de suivis thérapeutiques, sérologiques et virologiques réguliers (minimum tous les 3 mois), permettant d'objectiver assez rapidement une éventuelle contamination par le VHB (72).

La comparaison de méthodes présente néanmoins certaines limites. Ainsi nous pouvons nuancer nos conclusions sur deux points : premièrement, nous avons travaillé à partir d'échantillons ayant subi plusieurs cycles de congélation-décongélation à -80°C et -20°C . Pour l'étude de comparaison, tous les échantillons ont été congelés au moins une fois puis décongelés avant leur passage sur chaque automate. Plusieurs études réalisées sur l'influence des cycles de congélation-décongélation sur la quantification de la CV VHB donnent des résultats parfois contradictoires. Certains auteurs ont ainsi noté que la congélation-décongélation des échantillons étudiée à -20°C et -70°C induisait une diminution significative de la CV VHB (77), alors que d'autres ont constaté une augmentation minime de la CV VHB (78). Dans tous les cas, la conservation à -20°C voire -80°C semble avoir une influence, même faible, sur la quantification de l'ADN VHB. Les variations minimales de CV VHB constatées pourraient donc en partie être dues aux conditions pré-analytiques et il serait intéressant de pouvoir comparer les deux méthodes à partir d'échantillons frais, ou ayant subi peu de cycles de congélation-décongélation.

Deuxièmement, le manque de puissance de l'étude est une limite aux tendances constatées pour chaque génotype dans l'étude d'agrément : l'effectif maximum relevé par génotype dans l'étude de comparaison est de 14 échantillons pour le génotype D, et là encore, une étude de plus grande ampleur serait intéressante afin de pouvoir conforter nos résultats.

Au cours de ce travail, nous avons observé un test en erreur « 5007 », dû à un échec du contrôle RIQ-H, signifié par une fluorescence mesurée par l'appareil plus basse que la limite requise. Cette erreur s'est produite avec un échantillon de CV VHB très élevée ($8,9 \log_{10}$ UI/mL par Cobas 6800), qui aurait pu avoir un effet inhibiteur sur la détection de la sonde de standard interne. Cependant, 3 autres échantillons ayant une CV VHB $> 8,5 \log_{10}$ UI/mL, et un échantillon $> 9 \log_{10}$ UI/mL avec le Cobas 6800 ont été correctement traités par le

GeneXpert®. Cette erreur semble donc être de nature aléatoire et ne pas être liée à la forte quantité d'ADN VHB présente dans le prélèvement.

Au final, à l'issue de ces comparaisons, le GeneXpert® n'apparaît pas moins performant que la technique Cobas 6800, ce qui a justifié sa mise en place pour les bilans de PMO et d'hépatite fulminante à partir de février 2019 au CHU de Bordeaux.

L'étude des délais de rendu des CV VHB pour bilans de PMO nous a permis de constater un écart de plus d'une heure entre le temps de réalisation du test (57 min) et le délai moyen de rendu du résultat (2 heures 41 min). Ceci peut être expliqué par le fait que nous avons utilisé l'heure de validation technique du résultat sur le SIL pour recueillir nos données. L'appareil n'étant pas connecté directement au SIL, le technicien en charge de l'analyse rentre le résultat lui-même dans le logiciel, généralement lorsque les résultats des 3 PCR VIH-1, VHC et VHB sont connus, sachant que la PCR VIH-1 dure 1h45. La priorité étant de transmettre les résultats à la coordination hospitalière concernée via un rapport faxé, le report informatique des résultats peut parfois être différé. Nos résultats concernant les délais de rendu sont donc probablement surestimés, ceci ayant néanmoins un impact limité sur la compréhension de l'étude.

Les deux tests en échec recensés depuis l'utilisation de la trousse GeneXpert® CV VHB concernaient deux bilans d'hépatites fulminantes pour lesquels une erreur humaine sur le volume de l'échantillon était en cause. Il n'y a pas eu d'autre analyse en « ERREUR » ou « NON VALIDE » dans cette indication. En revanche, du 6/02/19 au 30/06/19, 4 bilans d'hépatites fulminantes n'ont pas pu être analysés sur GeneXpert® pour les CV VIH-1 et VHC. Dans tous les cas, les tests ont avorté en raison d'un résultat « NON VALIDE », dû à un échec du contrôle RIQ-B et/ou RIQ-H. Le fait que les 2 tests VIH-1 et VHC soient en erreur pour le même échantillon oriente vers une anomalie liée à l'échantillon lui-même. En effet, il s'agit souvent d'échantillons ictériques, voire plus ou moins hémolysés. Parmi les 4 échantillons étudiés, 2 étaient hémolysés et un légèrement ictérique. Les indices de lipémie, d'ictère et d'hémolyse LIH du dernier bilan sont manquants. D'après les fiches techniques fournies par Cepheid, les limites au-delà desquelles une interférence de l'hémolyse ou de la bilirubine peut être constatée sont identiques pour les 3 tests CV VHC, VIH-1 et VHB (500 mg/dL pour

l'hémoglobine et 20 mg/dL pour la bilirubine) (70,79,80). Cependant, d'après notre expérience, il semble y avoir des répercussions différentes de ces paramètres sur chacun des tests, seuls les tests CV VIH-1 et VHC ayant été impactés. Ceci constitue une limite importante de l'utilisation des tests GeneXpert® CV VIH-1 et VHC dans les bilans d'hépatite fulminante où ils ont été mis en échec dans 4 bilans sur 27 (soit 15%).

Conclusion

La réalisation en urgence des PCR virales pour les bilans de PMO est devenue une exigence retranscrite dans un cadre législatif, mais également une condition indispensable à l'élargissement de l'offre de soins en termes de dons et greffes d'organes. Dans un contexte de pénurie de greffons toujours en expansion, le CHU de Bordeaux se place parmi les centres réalisant le plus d'actes de prélèvements chaque année au niveau national, accueillant les bilans de qualification microbiologique des CH périphériques alentours. Il était donc devenu nécessaire de trouver des solutions adaptées et sécurisées à la problématique des analyses de biologie moléculaire en urgence.

Après la mise en place des PCR unitaires VIH-1 et VHC sur le plateau d'urgence du GHP, nous avons eu l'opportunité d'évaluer, avant sa commercialisation, les performances d'un nouveau test de quantification de la CV VHB, dans le but de compléter le panel de PCR virales réalisées en urgence dans le cadre des bilans de PMO. Notre travail a permis de montrer l'existence d'une réponse linéaire du test GeneXpert® sur les gammes de concentrations étudiées pour chacun des 8 géotypes du VHB, ainsi qu'une excellente fidélité via l'analyse des RIQ-H et RIQ-B. L'étude comparative réalisée avec le Cobas 6800 a révélé que les deux automates étaient positivement corrélés, mais aussi que les différences de résultats constatées ne permettraient pas leur utilisation en back-up l'un par rapport à l'autre pour le suivi d'un patient infecté par le VHB.

Le test CV VHB GeneXpert® a montré des performances compatibles avec son utilisation dans le cadre des bilans de PMO, rendant possible la réalisation en urgence des CV VHB. L'utilisation de ce test devrait permettre d'envisager davantage de greffes en protocole dérogatoire. Une enquête en lien avec les coordinations hospitalières pourrait permettre d'objectiver l'évolution du nombre de greffes dérogatoires réalisées depuis l'installation de la trousse GeneXpert® au laboratoire.

Enfin, des études supplémentaires pourraient être réalisées, dans le but de tester la reproductibilité de la trousse sur des CV VHB proches de la LOQ et de la LOD, comparativement à celle du Cobas 6800. Il serait également intéressant de surveiller

l'influence de la nature de l'échantillon en termes d'hémolyse et d'ictère sur la bonne exécution du test.

En conclusion, l'utilisation de la trousse CV VHB GeneXpert® au CHU de Bordeaux a permis de simplifier la réalisation des analyses de biologie moléculaire des bilans de PMO en regroupant physiquement tous les automates et tous les échantillons dédiés à la réalisation d'un bilan complet sur un même plateau technique, tout en conservant une sensibilité analytique comparable à la méthode conventionnelle. L'objectif initial d'apporter des réponses rapides à des problématiques urgentes étant désormais rempli, il reste néanmoins indispensable de poursuivre l'étude prospective des performances du test, notamment en ce qui concerne les bilans d'hépatite fulminante.

Annexes

ANNEXE 1 : Valeurs utilisées pour l'étude de linéarité du test HBV VL GeneXpert (en log₁₀ UI/mL) :

	Nom	Attendu	Mesuré
Génotype A	Mère = 8,76		
	L1 6LOG	6,76	6,76
	L1 5LOG	5,76	5,8
	L1 4LOG	4,76	4,53
	L1 3LOG	3,76	3,7
Génotype B	Mère = 6,97		
	L2 5LOG	5,97	6,13
	L2 4LOG	4,97	4,83
	L2 3LOG	3,97	4,19
	L2 2LOG	2,97	3,01
Génotype C	Mère = 8,51		
	L3 6LOG	6,51	6,46
	L3 5LOG	5,51	5,51
	L3 4LOG	4,51	4,59
	L3 3LOG	3,51	3,52
Génotype D	Mère = 7,07		
	L4 6LOG	6,07	6,26
	L4 5LOG	5,07	5,28
	L4 4LOG	4,07	4,35
	L4 3LOG	3,07	3,29
Génotype E	Mère = 6,23		
	L5 6LOG	5,93	5,71
	L5 5LOG	4,93	4,84
	L5 4LOG	3,93	3,75
	L5 3LOG	2,93	2,86
Génotype F	Mère = 5,81		
	L6 6LOG	5,81	5,95
	L6 5LOG	4,81	5,03
	L6 4LOG	3,81	3,77
	L6 3LOG	2,81	3,05
Génotype G	Mère = 7,22		
	L7 6LOG	6,22	6,55
	L7 5LOG	5,22	5,52
	L7 4LOG	4,22	4,29
	L7 3LOG	3,22	3,49
Génotype H	Mère = 3,61		
	L8	3,61	3,09
	L8 /5	2,91	2,61
	L8/10	2,61	2,31
	L8/100	1,61	1,2

Remarque : les premières dilutions ne sont pas forcément les dilutions au 1/10^{ème} de la solution mère (problème de faible volume de certains échantillons primaires).

Les dilutions suivantes sont les dilutions en cascade au 1/10^{ème} de la première (sauf pour le génotype H, cf. tableau).

ANNEXE 2 : Rapports détaillés Excel des régressions linéaires effectuées sur les droites de linéarité pour chaque génotype et tests statistiques des pentes :

$$t_{\text{calculé}} = \frac{a-1}{s_a}$$

Pour tous les tests on considère : avec s_a l'écart-type de a

$t_{\text{théorique}}$ est déterminé selon la table de Student pour un risque de 5% et (n-1)ddl (où n est le nombre d'observations, ici 4). Si $t_{\text{calculé}} < t_{\text{théorique}}$, H_0 est acceptée.

Génotype A

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Statistiques de la régression</i>		
Coefficient de détermination multiple	0,99705071	
Coefficient de détermination R ²	0,99411012	
Coefficient de détermination R ²	0,99116519	
Erreur-type	0,12718097	
Observations	4	
<i>Coefficients Erreur-type</i>		
Constante = b	-0,2992	0,30585689
Variable X 1 = a	1,045	0,05687706

Test de Student

	$H_0 : a = 1$	$b = 0$
valeur	1,045	-0,2992
écart-type	0,05687706	0,30585689
t calculé	0,79118013	0,97823528
t théorique	3,1824463	4,30265273
	conforme	conforme

Droite de régression linéaire : $y = 1,045x - 0,299$

Génotype B

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Statistiques de la régression</i>		
Coefficient de détermination multiple	0,99252466	
Coefficient de détermination R ²	0,98510521	
Coefficient de détermination R ²	0,97765781	
Erreur-type	0,19442222	
Observations	4	
<i>Coefficients Erreur-type</i>		
Constante	0,07	0,40063151
Variable X 1	1	0,08694826

	$H_0 : a = 1$	$b = 0$
valeur	1	0,07
écart-type	0,08694826	0,40063151
t calculé	0	0,17472415
t théorique	3,1824463	4,30265273
	conforme	conforme

Droite de régression linéaire : $y = x + 0,070$

Génotype C

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Statistiques de la régression</i>	
Coefficient de détermination multiple	0,99945021
Coefficient de détermination R ²	0,99890073
Coefficient de détermination R ²	0,99835109

Erreur-type	0,05108815	
Observations	4	
	<i>Coefficients</i>	<i>Erreur-type</i>
Constante	0,14026	0,11728065
Variable X 1	0,974	0,02284731

	H0 : a = 1	b = 0
valeur	0,974	0,14026
écart-type	0,02284732	0,11728066
t calculé	1,13798908	1,19593465
t théorique	3,1824463	4,30265273
	conforme	conforme

Droite de régression linéaire : $y = 0,974x + 0,140$

Génotype D

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Statistiques de la régression</i>		
Coefficient de détermination multiple	0,99966761	
Coefficient de détermination R^2	0,99933533	
Coefficient de détermination R^2	0,99900299	
Erreur-type	0,04012481	
Observations	4	
	<i>Coefficients</i>	<i>Erreur-type</i>
Constante	0,29812	0,08442415
Variable X 1	0,984	0,01794436

	H0 : a = 1	b = 0
valeur	0,984	0,29812
écart-type	0,01794436	0,08442415
t calculé	0,89164514	3,5312169
t théorique	3,1824463	4,30265273
	conforme	conforme

Droite de régression linéaire : $y = 0,984x + 0,298$

Génotype E

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Statistiques de la régression</i>		
Coefficient de détermination multiple	0,99904151	
Coefficient de détermination R^2	0,99808395	
Coefficient de détermination R^2	0,99712592	
Erreur-type	0,06678323	
Observations	4	
	<i>Coefficients</i>	<i>Erreur-type</i>
Constante	0,01948	0,13645663
Variable X 1	0,964	0,02986637

	H0 : a = 1	b = 0
valeur	0,964	0,01948
écart-type	0,02986637	0,13645663
t calculé	1,20536915	0,14275598
t théorique	3,1824463	4,30265273
	conforme	conforme

Droite de régression linéaire : $y = 0,964x + 0,019$

Génotype F

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Statistiques de la régression</i>		
Coefficient de détermination multiple	0,99512468	
Coefficient de détermination R ²	0,99027312	
Coefficient de détermination R ²	0,98540968	
Erreur-type	0,1560769	
Observations	4	
<i>Coefficients Erreur-type</i>		
Constante	0,15724	0,31079376
Variable X 1	0,996	0,06979971

	H0 : a = 1	b = 0
valeur	0,996	0,15724
écart-type	0,06979971	0,31079376
t calculé	0,05730683	0,50593037
t théorique	3,1824463	4,30265273
	conforme	conforme

Droite de régression linéaire : $y = 0,996x + 0,157$

Génotype G

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Statistiques de la régression</i>		
Coefficient de détermination multiple	0,99696226	
Coefficient de détermination R ²	0,99393375	
Coefficient de détermination R ²	0,99090063	
Erreur-type	0,12858849	
Observations	4	
<i>Coefficients Erreur-type</i>		
Constante	0,04898	0,2789416
Variable X 1	1,041	0,05750652

	H0 : a = 1	b = 0
valeur	1,041	0,04898
écart-type	0,05750652	0,2789416
t calculé	0,71296262	0,17559231
t théorique	3,1824463	4,30265273
	conforme	conforme

Droite de régression linéaire : $y = 1,041x + 0,049$

Génotype H

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Statistiques de la régression</i>		
Coefficient de détermination multiple	0,99226134	
Coefficient de détermination R ²	0,98458258	
Coefficient de détermination R ²	0,97687387	
Erreur-type	0,12198330	
Observations	4	
<i>Coefficients Erreur-type</i>		
Constante	-0,2717883	0,2358076
Variable X 1	0,9587663	0,0848355

	H0 : a = 1	b = 0
valeur	0,95876663	-0,27178839
écart-type	0,0848355	0,23580761
t calculé	0,48603912	1,15258535
t théorique	3,1824463	4,30265273
	conforme	conforme

Droite de régression linéaire : $y = 0,959x - 0,27$

ANNEXE 3 : Valeurs brutes utilisées pour la corrélation et nature des échantillons utilisés :

CODE	Génotype	Mutations/co-infections	CV VHB ROCHE log ₁₀ (UI/mL)	CV VHB CEPHEID log ₁₀ (UI/mL)
C1	D	Mutant AgS	1,46	1,67
C2	D	L180M/M204V/S202G	1,63	2,0
C3	G	N236T + VIH + VHC	1,81	2,27
C4	inconnu		2,11	2,17
C5	inconnu		2,35	3,0
C6	F	+ VIH	2,43	2,99
C7	D	Mutant AgS	2,47	2,55
C8	E	+VIH / T184L/M204I	2,61	2,83
C9	D	aucune	2,79	2,68
C10	D	L180M/M204V/S202G	3,07	3,35
C11	A	+ VIH	3,21	2,64
C12	E	+VIH / T184L/M204I	3,37	3,28
C13	inconnu		3,51	3,68
C14	F	+ VIH	3,66	3,95
C15	inconnu		3,8	4,06
C16	D	L180M/M204V/S202G	3,97	4,09
C17	inconnu		4,19	4,4
C18	inconnu		4,33	4,4
C19	E	+VIH / T184L/M204I	4,46	4,65
C20	inconnu		4,62	4,68
C21	F	+ VIH	4,83	5,08
C22	inconnu		5,15	4,93
C23	E	+VIH / T184L/M204I	5,22	4,72
C24	inconnu		5,23	5,17
C25	inconnu		5,6	5,67
C26	F	+ VIH	5,81	5,95
C27	G	N236T + VIH + VHC	5,91	6,09
C28	D		6,1	6,32
C29	inconnu		6,4	7,05
C30	G	N236T + VIH + VHC	6,33	6,29
C31	D	Mutant AgS	6,48	6,8
C32	inconnu		6,62	6,87
C33	inconnu		6,71	6,8
C34	D	L180M/M204V/S202G	7,07	7,29
C35	G	N236T + VIH + VHC	7,22	7,48
C36	D	Mutant AgS	7,28	7,35
C37	inconnu		7,48	7,41
C38	Inconnu		7,56	7,39
C39	A	inconnu	7,81	7,61
C40	Inconnu		8,11	8,02
C41	C	inconnu	8,34	8,39

C42	C	Inconnu	8,4	8,18
C43	C	inconnu	8,53	8,41
C44	inconnu		8,7	8,75
C46	inconnu		8,95	8,82
C47	inconnu		8,98	8,95
C48	Inconnu		8,18	8,08
C49	Inconnu		3,72	3,98
L1 6LOG	A	Aucune	6,75	6,76
L1 5LOG	A	Aucune	5,65	5,8
L1 4LOG	A	Aucune	4,59	4,53
L1 3LOG	A	Aucune	3,77	3,7
L2 5LOG	B	Aucune	5,69	6,13
L2 4LOG	B	Aucune	4,51	4,83
L2 3LOG	B	Aucune	3,84	4,19
L3 6LOG	C	Inconnu	6,44	6,46
L3 5LOG	C	Inconnu	5,40	5,51
L3 4LOG	C	Inconnu	4,28	4,59
L3 3LOG	C	Inconnu	3,37	3,52
L4 6LOG	D	L180M/M204V/S202G	5,84	6,26
L4 5LOG	D	L180M/M204V/S202G	4,91	5,28
L4 4LOG	D	L180M/M204V/S202G	3,98	4,35
L4 3LOG	D	L180M/M204V/S202G	3,02	3,29
L5 5LOG	E	+VIH / T184L/M204I	4,60	4,84
L5 4LOG	E	+VIH / T184L/M204I	3,65	3,75
L5 3LOG	E	+ VIH / T184L/M204I	2,64	2,86
L6 5LOG	F	+ VIH	4,78	5,03
L6 4LOG	F	+ VIH	3,80	3,77
L6 3LOG	F	+ VIH	2,90	3,05
L7 6LOG	G	N236T + VIH + VHC	6,37	6,55
L7 5LOG	G	N236T + VIH + VHC	5,34	5,52
L7 4LOG	G	N236T + VIH + VHC	4,39	4,29
L7 3LOG	G	N236T + VIH + VHC	3,41	3,49
L8	H	Aucune	3,61	3,09

ANNEXE 4 : Valeurs et calculs utilisés pour l'étude d'agrément entre GeneXpert et Cobas 6800 :

CODE	CV VHB ROCHE log ₁₀ (UI/mL)	CV VHB CEPHEID log ₁₀ (UI/mL)	Moyenne des résultats	Différences calculées
C1	1,46	1,67	1,565	0,21
C2	1,63	2	1,815	0,37
C3	1,81	2,27	2,04	0,46
C4	2,11	2,17	2,14	0,06
C5	2,35	3	2,675	0,65
C6	2,43	2,99	2,71	0,56
C7	2,47	2,55	2,51	0,08
C8	2,61	2,83	2,72	0,22
C9	2,79	2,68	2,735	-0,11
C10	3,07	3,35	3,21	0,28
C11	3,21	2,64	2,925	-0,57
C12	3,37	3,28	3,325	-0,09
C13	3,51	3,68	3,595	0,17
C14	3,66	3,95	3,805	0,29
C15	3,8	4,06	3,93	0,26
C16	3,97	4,09	4,03	0,12
C17	4,19	4,4	4,295	0,21
C18	4,33	4,4	4,365	0,07
C19	4,46	4,65	4,555	0,19
C20	4,62	4,68	4,65	0,06
C21	4,83	5,08	4,955	0,25
C22	5,15	4,93	5,04	-0,22
C23	5,22	4,72	4,97	-0,5
C24	5,23	5,17	5,2	-0,06
C25	5,6	5,67	5,635	0,07
C26	5,81	5,95	5,88	0,14
C27	5,91	6,09	6	0,18
C28	6,1	6,32	6,21	0,22
C29	6,4	7,05	6,725	0,65
C30	6,33	6,29	6,31	-0,04
C31	6,48	6,8	6,64	0,32
C32	6,62	6,87	6,745	0,25
C33	6,71	6,8	6,755	0,09
C34	7,07	7,29	7,18	0,22
C35	7,22	7,48	7,35	0,26
C36	7,28	7,35	7,315	0,07
C37	7,48	7,41	7,445	-0,07
C38	7,56	7,39	7,475	-0,17
C39	7,81	7,61	7,71	-0,2
C40	8,11	8,02	8,065	-0,09
C41	8,34	8,39	8,365	0,05

C42	8,4	8,18	8,29	-0,22
C43	8,53	8,41	8,47	-0,12
C44	8,7	8,75	8,725	0,05
C46	8,95	8,82	8,885	-0,13
C47	8,98	8,95	8,965	-0,03
C48	8,18	8,08	8,13	-0,1
C49	3,72	3,98	3,85	0,26
L1 6LOG	6,75	6,76	6,755	0,01
L1 5LOG	5,65	5,8	5,726	0,15
L1 4LOG	4,59	4,53	4,562	-0,06
L1 3LOG	3,77	3,7	3,734	-0,07
L2 5LOG	5,69	6,13	5,910	0,44
L2 4LOG	4,51	4,83	4,669	0,32
L2 3LOG	3,84	4,19	4,013	0,35
L3 6LOG	6,44	6,46	6,450	0,02
L3 5LOG	5,40	5,51	5,457	0,11
L3 4LOG	4,28	4,59	4,437	0,31
L3 3LOG	3,37	3,52	3,447	0,15
L4 6LOG	5,84	6,26	6,052	0,42
L4 5LOG	4,91	5,28	5,094	0,37
L4 4LOG	3,98	4,35	4,163	0,37
L4 3LOG	3,02	3,29	3,156	0,27
L5 5LOG	4,60	4,84	4,719	0,24
L5 4LOG	3,65	3,75	3,702	0,10
L5 3LOG	2,64	2,86	2,752	0,22
L6 5LOG	4,78	5,03	4,904	0,25
L6 4LOG	3,80	3,77	3,784	-0,03
L6 3LOG	2,90	3,05	2,973	0,15
L7 6LOG	6,37	6,55	6,459	0,18
L7 5LOG	5,34	5,52	5,432	0,18
L7 4LOG	4,39	4,29	4,340	-0,10
L7 3LOG	3,41	3,49	3,452	0,08
L8	3,61	3,09	3,350	-0,52

Moyenne des différences = $d = 0,115175392$

Ecart-type des différences = $s_d = 0,234219524$

Pour $\alpha = 0,05$

Limite inférieure d'agrément = $d - 1,96 s_d = -0,34388644$

Limite supérieure d'agrément = $d + 1,96 s_d = 0,574237223$

ANNEXE 5 : Valeurs supplémentaires utilisées pour l'étude de concordance :

CODE	CV VHB ROCHE UI/mL	CV VHB CEPHEID UI/mL
D1	< 10	Non détecté
D2	< 10	Non détecté
D3	< 10	<10
D4	< 10	11
D5	< 10	<10
D6	< 10	<10
D7	< 10	Non détecté
D8	< 10	10
D9	15	16

CODE	CV VHB ROCHE UI/mL	CV VHB CEPHEID UI/mL
D10	17	23
D11	13	86
D12	22	17
D13	20	16
N1	Non détecté	Non détecté
N2	Non détecté	Non détecté
N3	Non détecté	Non détecté
N4	Non détecté	Non détecté
N5	Non détecté	Non détecté

ANNEXE 6 : Valeurs des RIQ-H et RIQ-B :

RIQ-H	RIQ-B
19,7	30,9
20	30,6
20	30,8
20,1	30,7
19,8	30,8
19,7	30,7
19,8	30,6
19,7	30,9
19,7	30,6
19,6	30,7
20	30,8
20,5	31,1
19,7	30,9
19,8	30,4
19,4	31,1
19,6	30,6
19,5	30,5
20,2	31
19,9	31
19,8	30,7
19,5	30,7

RIQ-H	RIQ-B
20	30,9
19,7	30,8
19,6	30,9
19,6	31,5
20	30,7
20,1	30,9
20,5	31,3
20	30,7
19,8	30,9
20,1	30,7
20,1	30,8
19,4	30,9
19,8	30,7
20,1	30,5
19,3	30,8
20,2	30,9
19,7	30,7
19,8	31,1
19,5	30,7
19,8	30,6
19,6	31,1

RIQ-H	RIQ-B
19,7	30,7
19,8	30,6
19,6	30,7
19,6	30,9
20	31
19,9	30,9
20	30,9
20,1	30,6
19,9	30,9
20,1	31
20,4	31,2
19,8	30,9
19,8	30,5
19,6	31,2
19,8	30,5
19,7	30,9
20,2	31,3
20,2	31,1
20,2	30,9
19,8	30,8
19,4	30,9

RIQ-H	RIQ-B
19,7	30,7
19,7	30,7
20,1	30,5
20,1	31,4
20,1	30,8
19,7	30,8
19,4	30,8
19,9	30,8
19,7	31
20,5	31,2
19,4	31,2

RIQ-H	RIQ-B
19,5	31,1
19,9	31,1
19,8	31,1
19,9	30,7
20,3	30,8
20,1	31
20,1	30,9
19,8	30,8
19,9	30,7
19,8	30,8
19,5	30,7

RIQ-H	RIQ-B
19,9	30,7
20,1	30,8
19,3	30,5
19,8	31,2
19,5	30,8
19,2	31,1
19,6	30,8
20,8	31,6
19,2	31,6
19,9	30,8
19,7	31

Moyenne RIQ-H = 19,8354167

Moyenne RIQ-B = 30,865625

Ecart-type RIQ-H = 0,2973494

Ecart-type RIQ-B = 0,23966122

CV RIQ-H = 1,49908321

CV RIQ-B = 0,77646644

Références bibliographiques

1. Organisation Mondiale de la Santé. Principaux repères sur l'hépatite B. 2018.
2. European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* mars 2017;(vol. 67):370-98.
3. World Health Organization, Global Hepatitis Programme. WHO guidelines on hepatitis B and C testing. [Internet]. 2017 [cité 28 sept 2018]. Disponible sur: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254621/1/9789241549981-eng.pdf>
4. Organisation mondiale de la santé. Rapport mondial sur l'hépatite, 2017 [Internet]. 2017 [cité 22 avr 2019]. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255833/WHO-HIV-2017.06-fre.pdf;jsessionid=FAF2243D7A519737BB4F730A0EB45FAA?sequence=1>
5. Carman WF, Korula J, Wallace L, MacPhee R, Mimms L, Decker R. Fulminant reactivation of hepatitis B due to envelope protein mutant that escaped detection by monoclonal HBsAg ELISA. *The Lancet.* juin 1995;345(8962):1406-7.
6. Qin Y, Liao P. Hepatitis B virus vaccine breakthrough infection: surveillance of S gene mutants of HBV. *Acta Virol.* 2018;62(02):115-21.
7. Zuckerman AJ. Effect of hepatitis B virus mutants on efficacy of vaccination. *The Lancet.* avr 2000;355(9213):1382-4.
8. Ministère du travail, de l'emploi et de la santé. Arrêté du 23 décembre 2010 pris en application des articles R. 1211-14, R. 1211-15, R. 1211-16, R. 1211-21 et R. 1211-22 du code de la santé publique. déc 23, 2010.
9. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A New Antigen in Leukemia Sera. *JAMA.* 13 juill 1984;252(2):252-7.
10. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. VIRUS-LIKE PARTICLES IN SERUM OF PATIENTS WITH AUSTRALIA-ANTIGEN-ASSOCIATED HEPATITIS. *The Lancet.* 4 avr 1970;295(7649):695-8.
11. Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature.* oct 1985;317(6037):489-95.
12. Summers J, O'Connell A, Millman I. Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* nov 1975;72(11):4597-601.
13. Molnar-Kimber KL, Summers J, Taylor JM. Protein Covalently Bound to Minus-Strand DNA Intermediates of Duck Hepatitis B Virus. *J VIROL.* 1983;45:8.
14. Tong S, Revill P. Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. *J Hepatol.* avr 2016;64(1):S4-16.
15. Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology.* mai 2015;479-480:672-86.
16. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol.* 14 mai 2014;20(18):5427-34.

17. Kramvis A, Arakawa K, Yu MC, Nogueira R, Stram DO, Kew MC. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol.* janv 2008;80(1):27-46.
18. Drexler JF, Geipel A, König A, Corman VM, van Riel D, Leijten LM, et al. Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 oct 2013;110(40):16151-6.
19. Yu H, Yuan Q, Ge S-X, Wang H-Y, Zhang Y-L, Chen Q-R, et al. Molecular and Phylogenetic Analyses Suggest an Additional Hepatitis B Virus Genotype "I". *PLoS ONE* [Internet]. 19 févr 2010 [cité 26 déc 2018];5(2). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2824819/>
20. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, et al. A Genetic Variant of Hepatitis B Virus Divergent from Known Human and Ape Genotypes Isolated from a Japanese Patient and Provisionally Assigned to New Genotype J. *J Virol.* 15 oct 2009;83(20):10538-47.
21. Huy TTT, Ngoc TT, Abe K. New Complex Recombinant Genotype of Hepatitis B Virus Identified in Vietnam. *J Virol.* 1 juin 2008;82(11):5657-63.
22. Olinger CM, Jutavijittum P, Hübschen JM, Yousukh A, Samounry B, Thammavong T, et al. Possible New Hepatitis B Virus Genotype, Southeast Asia. *Emerg Infect Dis.* nov 2008;14(11):1777-80.
23. Osiowy C, Coffin C, Andonov A. Review of Laboratory Tests used in Monitoring Hepatitis B Response to Pegylated Interferon and Nucleos(t)ide Analog Therapy. *Curr Treat Options Infect Dis.* 2 juill 2016;8.
24. Halfon P, Pol S, Bourlière M, Cacoub P. Les génotypes du virus de l'hépatite B. 2019;8.
25. Cao L, Wu C, Shi H, Gong Z, Zhang E, Wang H, et al. Coexistence of Hepatitis B Virus Quasispecies Enhances Viral Replication and the Ability To Induce Host Antibody and Cellular Immune Responses. *J Virol.* août 2014;88(15):8656-66.
26. Jun Cheng et al. Quasispecies of Hepatitis B Virus. *Infect Int.* 2012;1(4):177-82.
27. Desmond CP, Bartholomeusz A, Gaudieri S, Revill PA, Lewin SR. A systematic review of T-cell epitopes in hepatitis B virus: identification, genotypic variation and relevance to antiviral therapeutics. *Antivir Ther.* 2008;13(2):161-75.
28. Huang C-F, Lin S-S, Ho Y-C, Chen F-L, Yang C-C. The immune response induced by hepatitis B virus principal antigens. *Cell Mol Immunol.* avr 2006;3(2):97-106.
29. Trépo C, Chan HLY, Lok A. Hepatitis B virus infection. *The Lancet.* déc 2014;384(9959):2053-63.
30. INRS. Fiche Hépatite B. 2016.
31. Pilly E, Épaulard O, Le Berre R, Tattevin P, Collège des universitaires de maladies infectieuses et tropicales (France). *ECN.Pilly: maladies infectieuses et tropicales : préparation ECN, tous les items d'infectiologie.* 2017.
32. Fourati S, Pawlotsky J-M. Progrès récents dans la compréhension et le diagnostic de l'infection chronique par le virus de l'hépatite B. *Virologie.* 1 janv 2019;23(1):23-34.
33. Vaux S, Laporal S, Pioche C, Brouard C, Lot F. HÉPATITES B ET C DERNIÈRES DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES. Journée nationale de lutte contre les hépatites B et C; 2018 mai 15; Ministère des solidarités et de la santé, Paris.

34. Santé Publique France. Surveillance des hépatites B et C. In 2017. p. 28.
35. Goh KT, Ding JL, Monteiro EH, Oon CJ. Hepatitis B infection in households of acute cases. *J Epidemiol Community Health*. juin 1985;39(2):123-8.
36. LAFARGE Jean-Charles. Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic et à la prise en charge des hépatites B, C et D. Haute Autorité de Santé; 2017.
37. Bourlière M. Le portage inactif du VHB = infection chronique VHB Ag HBe négatif. :8.
38. Ratziu V, Sayegh-Tainturier M-H, Nourani M, Poynard T. Mutants pré-C du VHB. /data/revues/03998320/00260005/509/ [Internet]. 29 févr 2008 [cité 23 sept 2018]; Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/en/article/99138>
39. Höner zu Siederdisen C, Maasoumy B, Cornberg M. What is new on HBsAg and other diagnostic markers in HBV infection? *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. juin 2017;31(3):281-9.
40. Marcellin P, Ziol M, Bedossa P, Douvin C, Poupon R, Lédighen VD, et al. Non-invasive assessment of liver fibrosis by stiffness measurement in patients with chronic hepatitis B. *Liver Int*. 2009;29(2):242-7.
41. Castera L. Le FibroScan : un nouvel outil pour l'évaluation non invasive de la fibrose au cours des maladies chroniques du foie. *Hépatogastro Oncol Dig*. 1 mars 2007;14(2):90-8.
42. European Association for the Study of the Liver. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J Hepatol*. juill 2015;63(1):237-64.
43. Trimoulet P. Diagnostic des Hépatites virales B et C.
44. HAS. Avis de la commission de la transparence VEMLIDY [Internet]. 2018 [cité 6 mai 2019]. Disponible sur: https://webzine.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-16449_VEMLIDY_PIC_INS_Avis_post_aud_CT16449.pdf
45. Ministère des solidarités et de la santé. Calendrier vaccinal 2018. 2018.
46. Ministère chargé de la santé. Plan 2017-2021 pour la greffe d'organes et de tissus [Internet]. ministère chargé de la santé; 2017 [cité 22 sept 2018]. Disponible sur: https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/plan_2017-2021_pour_la_greffe_d_organes_et_de_tissus.pdf
47. Boulard G, Guiot P, Pottecher T, Tenaillon A. Prise en charge des sujets en état de mort encéphalique dans l'optique d'un prélèvement d'organes. *Ann Fr Anesth Réanimation*. juill 2005;24(7):836-43.
48. Agence de la biomédecine. Le prélèvement d'organes en vue de greffe [Internet]. agence-biomedecine.fr. 2016 [cité 22 sept 2018]. Disponible sur: <https://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2016/donnees/organes/01-prelevement/pdf/prelevement.pdf>
49. Council of Europe, conventions, recommendations,, resolutions and reports. Safety, quality and ethical matters related to the use of organs, tissues and cells of human origin. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM); 2017 p. 301. Report No.: 3rd.
50. Ministère des Solidarités et de la Santé. Greffes et don d'organes [Internet]. Ministère des Solidarités et de la Santé. 2019 [cité 9 avr 2019]. Disponible sur: <https://solidarites-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/autres-produits-de-sante/article/greffes-et-don-d-organes>

51. Peigue-Lafeuille H. Dons d'organes et risques infectieux en 2009 : des risques maîtrisés aux événements inattendus. 2009;13(1):13.
52. European Committee, (Partial Agreement), on Organ Transplantation, (CD-P-TO). Guide to the quality and safety of organs for transplantation, 7th edition. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM); 2018 p. 507. Report No.: 7th.
53. ANSM, Agence de la Biomédecine. Le point sur la maîtrise de la phase pré-analytique des échantillons destinés à la qualification microbiologique des donneurs d'organes, de tissus ou de cellules v1.0 [Internet]. ansm, ABM; 2017 [cité 22 sept 2018]. Disponible sur: https://www.agence-biomedecine.fr/IMG/pdf/maitrise_de_la_phase_preatalytiquevf_12janv18-min.compressed.pdf
54. Creusvaux DH, Rigault G. Rapport annuel de synthèse de biovigilance Agence de la Biomédecine 201. 2011;32.
55. Samuel SL, Galdbart DJ-O, Roche M. Rapport annuel de synthèse de biovigilance (vigilance des organes) 2015. 2015 p. 26.
56. Pr Olivier Bastien. Lettre du directeur du prélèvement et de la greffe aux responsables des laboratoires. 2016.
57. Ministère des affaires sociales et de la santé. Journal Officiel : Arrêté [...] relatif aux conditions d'utilisation d'organes ou de cellules provenant de donneurs porteurs de marqueurs du virus de l'hépatite B. juill 16, 2013.
58. Clause-Verdreau A-C. Fiche Repère n°2. Le don d'organes et de tissus. 2018.
59. Drancourt M, Michel-Lepage A, Boyer S, Raoult D. The Point-of-Care Laboratory in Clinical Microbiology. Clin Microbiol Rev. juill 2016;29(3):429-47.
60. Yager P, Domingo GJ, Gerdes J. Point-of-Care Diagnostics for Global Health. Annu Rev Biomed Eng. août 2008;10(1):107-44.
61. Fournier P-E, Drancourt M, Colson P, Rolain J-M, Scola BL, Raoult D. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. Nat Rev Microbiol. août 2013;11(8):574-85.
62. Nixon GJ, Svenstrup HF, Donald CE, Carder C, Stephenson JM, Morris-Jones S, et al. A novel approach for evaluating the performance of real time quantitative loop-mediated isothermal amplification-based methods. Biomol Detect Quantif. déc 2014;2:4-10.
63. Francois P, Tangomo M, Hibbs J, Bonetti E-J, Boehme CC, Notomi T, et al. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. FEMS Immunol Med Microbiol. juin 2011;62(1):41-8.
64. Sattabongkot J, Tsuboi T, Han E-T, Bantuchai S, Buates S. Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Diagnosis of Malaria Infections in an Area of Endemicity in Thailand. J Clin Microbiol. 1 mai 2014;52(5):1471-7.
65. Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, Michael JS, Gotuzzo E, Tahirli R, et al. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study. The Lancet. avr 2011;377(9776):1495-505.

66. Causer LM, Guy RJ, Tabrizi SN, Whiley DM, Speers DJ, Ward J, et al. Molecular test for chlamydia and gonorrhoea used at point of care in remote primary healthcare settings: a diagnostic test evaluation. *Sex Transm Infect.* août 2018;94(5):340-5.
67. Nicol M, Whitelaw A, Stevens W. Using Xpert MTB/RIF. *Curr Respir Med Rev.* 1 sept 2013;9(3):187-92.
68. Lamoury FMJ, Bajis S, Hajarizadeh B, Marshall AD, Martinello M, Ivanova E, et al. Evaluation of the Xpert HCV Viral Load Finger-Stick Point-of-Care Assay. *J Infect Dis.* 25 mai 2018;217(12):1889-96.
69. Arrêté du 19 septembre 2011 pris en application des articles R. 1211-14 et R. 1211-21 relatif aux conditions d'utilisation d'organes, de tissus ou de cellules provenant de donneurs porteurs de marqueurs du virus de l'hépatite B.
70. Cepheid. Fiche technique Xpert HBV Viral Load FRENCH Package Insert 301-5878F, révision A. 2018.
71. Roche. cobas® HBV Test [Internet]. [cité 21 juill 2019]. Disponible sur: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/cobas-hbv-test.html#productSpecs>
72. Arrêté du 23 décembre 2010 relatif aux protocoles prévus à l'article R. 1211-21 du code de la santé publique pour la mise en œuvre de la dérogation permettant l'utilisation d'organes ou de cellules de donneurs porteurs de marqueurs du virus de l'hépatite B et du virus de l'hépatite C.
73. Huprikar S, Danziger-Isakov L, Ahn J, Naugler S, Blumberg E, Avery RK, et al. Solid Organ Transplantation From Hepatitis B Virus–Positive Donors: Consensus Guidelines for Recipient Management. *Am J Transplant.* 2015;15(5):1162-72.
74. Calmus Y. Utilisation des greffons AchBc+ en transplantation d'organe solide – Use of hepatitis B core antibody-positive liver allografts in solid organ transplantation. 2008;4.
75. Coilly A. Indications pour hépatopathies virales B et C.
76. Kaminski H. Infections transmises par le greffon et/ou le liquide de conservation. :41.
77. Baleriola C, Johal H, Jacka B, Chaverot S, Bowden S, Lacey S, et al. Stability of Hepatitis C Virus, HIV, and Hepatitis B Virus Nucleic Acids in Plasma Samples after Long-Term Storage at –20oC and –70oC. *J Clin Microbiol.* 1 sept 2011;49(9):3163-7.
78. Krajden M, Minor JM, Rifkin O, Comanor L. Effect of multiple freeze-thaw cycles on hepatitis B virus DNA and hepatitis C virus RNA quantification as measured with branched-DNA technology. *J Clin Microbiol.* juin 1999;37(6):1683-6.
79. Cepheid. Xpert HCV VL Assay 301-5034F, Rev. B. 2015.
80. Cepheid. Xpert HIV-1 VL Assay. 2015.

Serment de Galien

Je jure, en présence des maîtres de la faculté et de mes condisciples :

-d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

-d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

-de ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

ABSTRACT

Performance evaluation of the GeneXpert® Cepheid hepatitis B virus viral load assay: application in assessment of organ donors eligibility in emergency situations

According to the World Health Organization, 30% of the world's population has been infected with hepatitis B virus (HBV), responsible for nearly 700,000 deaths a year. Eligibility criteria for organ donation require HBV testing, like HIV and HCV, which represent an average of 160 screenings per year in Bordeaux Hospital. Accredited laboratories have to provide the results of viral genome screenings, as quickly as possible before transplantation. Recently, new "point-of-care" molecular tests based on single-use cartridges have been developed, allowing rapid viral load (VL) quantification. The aim of our study was to assess the performance of a new point-of-care molecular test for HBV DNA quantification, GeneXpert® Cepheid. The linearity of this quantitative assay was confirmed using serial dilutions of different HBV genotypes samples ($r = 0.951$ to 1.035). The Xpert HBV results were positively correlated with the reference method Roche HBV Cobas 6800 ($r=0.993$) for viral loads ranging from 1.46 to 9 log₁₀IU/mL. Among the 93 tested samples, 88 samples (94.6%) showed good agreements between the 2 methods. Three HBV VLs estimated < 10 IU/mL by Cobas 6800 Roche were not detected by HBV Xpert. In conclusion, this test provides HBV viral load results in less than one hour, demonstrates excellent performances and is easy to use, even by unqualified operators, making it suitable for emergency situations. Since its implementation in Bordeaux Hospital, the time to provide HBV VL results for assessment of donor eligibility has been reduced by 20 fold (2.69 hours on average versus 55 hours previously).

KEYWORDS : hepatitis B virus; molecular diagnostics; method comparison; organ donation; point-of-care

RESUME

Evaluation des performances du test de quantification de l'ADN du virus de l'hépatite B par GeneXpert® Cepheid : application dans la qualification microbiologique des dons d'organes en urgence

L'Organisation Mondiale de la Santé estime que 30% de la population mondiale a été en contact avec le virus de l'hépatite B (VHB), responsable de près de 700000 décès chaque année. Le dépistage du VHB en urgence fait partie du bilan obligatoire de qualification virologique des donneurs d'organes, de même que les dépistages du VIH et du VHC, cette activité représentant en moyenne 160 bilans/an au CHU de Bordeaux. Les instances officielles demandent aux laboratoires de virologie agréés de fournir les résultats des dépistages des génomes viraux dans des délais compatibles avec la greffe. Récemment, des trousse de biologie moléculaire « point-of-care » ont été développées permettant la réalisation des charges virales VIH, VHC et VHB sous forme de tests unitaires. Ce travail avait pour objectif d'évaluer une nouvelle trousse de quantification de l'ADN VHB sur l'automate de biologie moléculaire GeneXpert® (Cepheid). Une étude de linéarité a permis de montrer que, quel que soit le génotype (A-H) du VHB, la quantification de l'ADN VHB restait linéaire (r 0.951 à 1.035). L'étude de corrélation avec la technique de référence utilisée au CHU de Bordeaux (Cobas 6800 Roche), a montré d'excellents résultats avec un r = 0.993 pour la gamme de concentrations étudiée (1,46 à 9 \log_{10} UI/mL). Concernant l'étude d'agrément, sur les 93 échantillons testés, 94.6% étaient concordants. Trois plasmas de CV VHB <10 UI/mL sur Cobas ont été retrouvés négatifs en Cepheid. Au total, cette technique permettant le rendu des CV VHB en moins d'une heure, présentait d'excellentes performances, était facile d'utilisation et réalisable en urgence. Sa mise en place au CHU de Bordeaux a permis de réduire le délai de rendu des CV VHB à 2,69 heures *versus* 55 heures avec le Cobas 6800 Roche pour les bilans de qualification virologique des donneurs d'organes.

MOTS-CLES : virus de l'hépatite B ; diagnostic moléculaire ; comparaison de méthodes ; dons d'organes ; point-of-care

TITRE ET RESUME EN ANGLAIS : voir au recto de la dernière page de la thèse

DISCIPLINE: Biologie Médicale

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Laboratoire de Virologie, CHU de Bordeaux
Groupe Hospitalier Pellegrin– PTBM – PABIM
Place Amélie Raba Léon – 33076 Bordeaux