

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER**  
FACULTE DE SANTE  
DEPARTEMENT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2023

THESE 2023 TOU3 2101

# **THESE D'EXERCICE**

**POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

***PHASE D'APPROFONDISSEMENT***

**Interne en BIOLOGIE MEDICALE**

Présentée et soutenue  
publiquement  
par

Pauline SOTTIL

**PERFORMANCE DU KIT ALTOSTAR HEV RNA POUR LA DETECTION ET LA  
QUANTIFICATION DE L'ARN DU VIRUS DE L'HEPATITE E**

26 octobre 2023

Directeur de thèse : Dr Florence ABRAVANEL

## **JURY**

Président : Pr Christophe, PASQUIER  
1er assesseur : Dr Sébastien, LHOMME  
2ème assesseur : Dr Florence, ABRAVANEL

**PERSONNEL ENSEIGNANT**  
**du Département des Sciences Pharmaceutiques**  
**de la Faculté de santé**  
**au 08 mars 2023**

**Professeurs Emérites**

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

**Professeurs des Universités**

**Hospitalo-Universitaires**

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B. (Directrice-adjointe)	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

**Universitaires**

Mme BERNARDES-GENISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COSTE A.	Parasitologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Doyen-directeur)	Physiologie
Mme DERAËVE C.	Chimie Thérapeutique
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
Mme WHITE-KONING M.	Mathématiques

## Maîtres de Conférences des Universités

### Hospitalo-Universitaires

M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
Mme KELLER L.	Biochimie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT A.S.	Biophysique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

### Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C. (*)	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie Analytique
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS C. (*)	Immunologie
Mme ECHINARD-DOUIN V. (*)	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme GADEA A.	Pharmacognosie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C. (*)	Pharmacognosie
M. LE NAOUR A.	Toxicologie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MONFERRAN S	Biochimie
M. PILLOUX L.	Microbiologie
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie

(\*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

## Enseignants non titulaires

### Assistants Hospitalo-Universitaires

M. AL SAATI A	Biochimie
Mme BAKLOUTI S.	Pharmacologie
Mme CLARAZ P.	Pharmacie Clinique
Mme CHAGNEAU C.	Microbiologie
Mme DINTILHAC A.	Droit Pharmaceutique
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie
Mme RIGOLOT L.	Biologie Cellulaire, Immunologie
Mme STRUMIA M.	Pharmacie Clinique

### Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Mme HAMZA Eya	Biochimie
Mme MALLI Sophia	Pharmacie Galénique
M. TABTI Redouane	Chimie Thérapeutique

## Remerciements

Je tiens à remercier Florence, ma directrice de thèse, pour son aide conséquente notamment quand j'étais en stage à Castres, son très bon encadrement, ses remarques toujours pertinentes et sa grande accessibilité. Merci aux membres du jury, Christophe et Sébastien, d'avoir lu ce manuscrit et de m'écouter ce jour.

Je remercie aussi Soheil et Kévin, techniciens de virologie, qui m'ont toujours bien accueillie sur le plateau et qui ont été très pédagogues quant à l'utilisation en routine de l'automate Altostar®, objet d'étude de cette thèse.

Je tiens à remercier mes amis de longue date de Calédonie et répartis à travers la France : Nathalie ma copine de toujours maintenant devenue Mme Seigneur (pardon Madame), Nathalie G ma copine pharmacienne calédonienne qui doit devenir Dr le même jour que moi d'ailleurs, Manon avec qui j'ai grandi « à distance », Lauryne ma copine de danse aux rêves les plus fous (« toi oui »), Simone que j'ai hâte de voir danser le ORI, Iwan, Margaux et Steeve mes amis de NC qu'il me tarde de revoir en espérant qu'ils n'aient pas trop vieillis, Vincent « mon gars sur de Toulouse ».

Je remercie Thomas, ma plus belle rencontre de ces dernières années et mon soutien le plus fidèle (« y'en a pour toi »).

Je tiens à remercier ma famille de France et notamment : Anne, François et Louis, mes oncles et tantes Danielle, Josiane et Noël qui m'ont rendu la vie ici beaucoup plus agréable et qui m'ont toujours fait sentir que j'étais entourée.

Enfin, je remercie mes parents et mon frère Bertrand, qui m'ont toujours beaucoup manquée mais que j'ai réussi à voir de temps en temps malgré les « 22000 » : « oléti bien beaucoup ».

## Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	4
<b>Introduction</b> .....	8
<b>Le virus de l'hépatite E</b> .....	9
1. Historique.....	9
2. Virus.....	10
3. Génome.....	10
4. Taxonomie.....	11
5. Epidémiologie.....	12
A. Dans les pays en développement.....	12
B. Dans les pays développés .....	13
6. Pathogénicité.....	14
A. Cycle de vie du VHE .....	14
B. Pathogénèse du VHE.....	16
C. Rôle du système immunitaire dans la physiopathologie du VHE.....	18
7. Diagnostic .....	19
8. Traitement et suivi .....	22
9. Prévention.....	24
<b>Objectif</b> .....	25
<b>Matériels et méthodes</b> .....	25
1. Echantillons .....	25
2. Kit Altostar® HEV RT-PCR 1.5.....	26
A. Automates.....	26
B. Thermocycleur CFX96TM DW Dx.....	29
C. Délai de rendu des résultats.....	31
3. Comparaison avec le kit RealStar® HEV RT-PCR 2.0 .....	31
A. Automates.....	31
B. Délai de rendu des résultats .....	33
4. Analyses statistiques.....	33
<b>Résultats</b> .....	34
1. Répétabilité .....	34
2. Reproductibilité .....	35
3. Justesse .....	35
4. Exactitude .....	36
5. Incertitude .....	37

6. Spécificité et inclusivité .....	37
7. Etendue de mesure .....	37
A. Limite de détection .....	37
B. Linéarité.....	38
C. Limite de quantification.....	39
8. Contamination .....	39
9. Comparaison de méthodes .....	40
A. Analyse de la concordance des résultats qualitatifs .....	40
B. Analyse de la concordance des résultats quantitatifs .....	40
C. Régression linéaire .....	41
<b>Discussion.....</b>	<b>42</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>45</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> - Génome du VHE. Adapté de Fieulaine et al, 2023. ....	11
<b>Figure 2</b> - Cycle de vie du virus de l'hépatite E. Adapté de Kamar et al, 2017. ....	16
<b>Figure 3</b> - Evolution des marqueurs biologiques de l'hépatite E. ....	20
<b>Figure 4</b> - Algorithme diagnostique du VHE proposé par le CNR. ....	22
<b>Figure 5</b> - AltoStar AM16. ....	26
<b>Figure 6</b> - Processus de purification. ....	28
<b>Figure 7</b> - CFX96TM DW Dx. ....	30
<b>Figure 8</b> - MagNa Pure 96. ....	32
<b>Figure 9</b> - LightCycler 480. ....	32
<b>Figure 10</b> - Linéarité des concentrations. ....	39
<b>Figure 11</b> - Graphe de Bland-Altman. ....	41
<b>Figure 12</b> - Droite de régression linéaire Altostar/Realstar. ....	41

## Introduction

Le virus de l'hépatite E, découvert dans les années 1980 est la première cause actuelle d'hépatite aiguë dans le monde. Elle touche à la fois les pays en voie de développement et les pays plus industrialisés par divers modes de contamination. Elle peut causer des troubles hépatiques sévères, notamment chez les femmes enceintes et les sujets immunodéprimés. Compte tenu de cette potentielle gravité et d'une prévalence relativement élevée, il est nécessaire de savoir la détecter afin de poser un diagnostic et d'établir un suivi adapté si besoin.

Deux approches se complètent quant au diagnostic de l'infection par le VHE : la sérologie et la biologie moléculaire. Nous nous intéresserons plus particulièrement ici à l'approche moléculaire. En effet, L'objectif de cette thèse est d'évaluer le kit AltoStar® HEV RNA implémenté sur l'automate ALTOSTAR® AM16 d'Altona Diagnostics dans la détection et la quantification de l'ARN du virus de l'hépatite E au sein de différentes matrices.

On abordera dans un premier temps une présentation du virus de l'hépatite E ; ses aspects génétiques et physiopathologiques. Puis les performances du test ALTOSTAR, outil de biologie moléculaire, pour la détection et la quantification de l'ARN viral dans le sang et les selles. Enfin, on comparera ce dernier au précédent test utilisé au laboratoire et discuteront du bénéfice de ce nouvel outil dans la détection de nombreux virus.

## Le virus de l'hépatite E

### 1. Historique

L'existence du virus de l'hépatite E (VHE) a été mentionnée pour la première fois en 1978 dans la vallée du Cachemire en Inde à la suite d'une grande épidémie d'hépatites d'origine entériques. Celle-ci aurait été la conséquence de l'ingestion d'une eau contaminée. Ne retrouvant pas de marqueurs sérologiques d'hépatite A ou B, on parle au début du « virus de l'hépatite non A non B » mais accompagné d'une clinique similaire (1). Le docteur M.S. Khuroo, gastroentérologue dans la région au moment de l'épidémie, soulèvera la particulière gravité de cette infection chez la femme enceinte (1).

Ce n'est qu'en 1983, lors d'une nouvelle épidémie dans un camp militaire basé en Afghanistan, que le Dr russe M.S Balayan va isoler le VHE. En effet, en ingérant un culot de selles de patients contaminés, il mettra en évidence les particules virales de ce dernier isolé dans ses propres selles par microscopie électronique (2). Cette découverte souligne dans le même temps la notion de transmission « fécale-orale » de ce virus.

C'est seulement en 1990 que le génome viral a pu être partiellement cloné et séquencé à partir de la bile de macaques infectés expérimentalement et que l'agent des hépatites non-A non-B à transmission entérique a été nommé Virus de l'hépatite E (3).

Pendant de nombreuses années, le virus de l'hépatite E était considéré comme un virus de transmission féco-orale limité aux pays en développement où les infrastructures de traitement des eaux usées étaient insuffisantes. Les cas retrouvés dans les pays industrialisés correspondaient à des cas d'importation.

Ce n'est qu'en 1997 que va être soulevée la notion de cas « autochtone » aux Etats-Unis par Meng *et al.* En effet il a été démontré qu'une souche isolée de porc était génétiquement identique à celle retrouvée chez des patients n'ayant pas séjourné dans des pays endémiques (pays en développement). Ceci souligne alors la transmission zoonotique possible du virus.

Le virus de l'hépatite E a été considéré au début comme agent responsable d'hépatite aiguë uniquement. Une étude menée par Kamar *et al.* chez 14 receveurs d'organes atteints d'une infection aiguë par le virus de l'hépatite E a montré que l'hépatite aiguë pouvait évoluer vers la chronicité chez les patients immunodéprimés. Celle-ci se définissant par un sérum positif pour l'ARN du VHE pendant plus de 3 mois après le diagnostic (4).

## 2. Virus

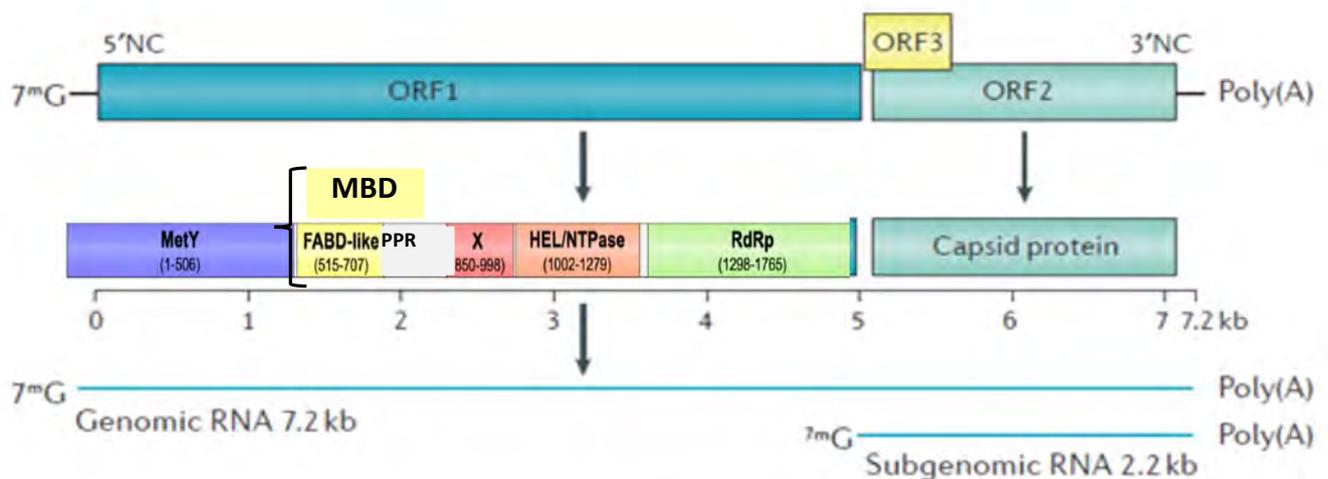
Le virus de l'hépatite E est un petit virus non enveloppé (diamètre 27-34 nm) avec une capsidie icosaédrique et un génome à ARN simple brin (5).

Les virions se présentent sous deux formes : une forme nue et une forme « quasi-enveloppée » associée à une membrane, circulant dans le sang des sujets infectés. Les virions associés à une quasi-enveloppe sont moins sensibles à l'action des anticorps (Ac) neutralisants favorisant ainsi leur dissémination dans l'organisme. Une fois excrété via la bile dans le tractus digestif, cette enveloppe va être détruite par les sels biliaires et les protéases digestives. C'est ainsi que le virus maintenant nu va être éliminé dans les selles et dans l'environnement (6). Il est à l'origine de la transmission fécale-orale entre les hôtes.

Une étude menée par Xin Yin *et al.* a permis de montrer que les deux formes du virus utilisaient deux mécanismes d'entrée distincts : les formes quasi-enveloppées nécessitent un trafic endosomique dépendant de Rab5 et Rab7 ainsi qu'une acidification endosomale. Quant aux formes nues elles sont internalisées via une dynamine-2-, la clathrine et le cholestérol membranaire voie dépendante (7).

## 3. Génome

Le génome du VHE à base d'ARN simple brin de polarité positive, d'environ 7.2 kb (5) comporte deux régions non codantes en 5' et en 3' et 3 cadres ouverts de lecture (ORF).



**Figure 1** - Génome du VHE. Adapté de Fieulaine *et al*, 2023.

L'ORF-1 code une polyprotéine non structurale contenant un domaine méthyltransférase (MetY), un domaine de type FABD (Fast Acid Binding Domain), une région hypervariable riche en proline (PPR), un macrodomaine-X, un domaine hélicase (HEL/NTPase) et un domaine ARN polymérase ARN-dépendant (RdRp) (8).

L'ORF-2 code 3 formes de protéine de capside : ORF2i qui est le composant structurel des particules infectieuses, ORF2g et ORF2c qui sont sécrétées en grande quantité dans le sérum des sujets infectés (9). ORF2 est la séquence du génome la plus immunisante et rentre dans la composition de l'unique vaccin disponible contre l'hépatite E (10).

L'ORF-3 chevauche l'ORF-2 et code une petite phosphoprotéine essentielle à la morphogénèse et à la libération des virions. Cette protéine est présente à la surface des particules en association avec des lipides (5).

Il existe un quatrième cadre de lecture ORF4 spécifique au VHE de génotype 1. Il stimulerait l'activité de l'ARN polymérase ARN dépendante (11).

#### 4. Taxonomie

Le virus de l'hépatite E appartient à la famille des *Hepeviridae* qui se divise en deux sous-familles :

La sous-famille Orthohepevirinae comprend 4 genres :

- Le genre *Avihepevirus* retrouvé chez les oiseaux
- Le genre *Chirohepevirus* retrouvé chez les chauves-souris
- Le genre *Paslahepevirus* infectant à la fois l'homme et le mammifère avec 8 génotypes identifiés. Les génotypes 1 et 2 sont exclusivement humains. Les génotypes 3 et 4 sont principalement retrouvés chez le porc, le sanglier, le cerf et les lapins. Les génotypes 5 et 6 ne sont détectés que chez les sangliers, les génotypes 7 et 8 chez les camélidés. Pour chaque génotype il existe ensuite plusieurs sous types.
- Le genre *Rocahepevirus* est retrouvé uniquement chez les rongeurs. A noter cependant que l'espèce *Rocahepevirus rattii* est pathogène pour l'homme.

La sous-famille *Parahepevirinae* comprend un seul genre : *Piscihepevirus*, avec des souches isolées chez les salmonidés d'Amérique du Nord (12).

## 5. Epidémiologie

### A. Dans les pays en développement

On y retrouve les génotypes 1 et 2 : à l'origine d'épidémies ou de cas sporadiques. L'OMS estime qu'il se produit chaque année 20 millions d'infections par le VHE dans le monde, avec 3.3 millions de cas symptomatiques (13). L'Asie de l'Est, l'Asie du Sud et l'Afrique sont les régions les plus concernées. La contamination est principalement féco-orale, via l'eau contaminée par l'insuffisance d'infrastructures d'assainissement des eaux. De plus, certaines de ces épidémies ont eu lieu dans des zones de conflits ou d'urgence humanitaire, comme des zones de guerre ou des camps de réfugiés ou de déplacés et où les risques sanitaires sont d'autant plus importants (13). Une transmission de personne à personne a également été envisagée lors de ces épidémies (14).

Une étude a été menée chez les réfugiés et les populations déplacées en Afrique subsaharienne entre 2010 et 2020. Elle a révélé que 12 épidémies avaient eu lieu, entraînant un total de plus de 30 000 cas suspects ou confirmés d'hépatite E aiguë et plus de 610 décès. Elles sont survenues au Soudan, en Ethiopie, au Tchad, au Niger, en Namibie, au Burkina Faso, au Kenya et au Nigeria. Les facteurs contributifs majeurs étant la surpopulation, le mauvais assainissement et les inondations (15).

De manière générale, dans ces pays, l'infection symptomatique par le VHE touche principalement les hommes de 15 à 30 ans avec un taux de létalité compris entre 0.2% et 4% chez les adultes en zone épidémique. Ce taux s'élève jusqu'à 70% chez les sujets atteints d'une maladie hépatique chronique (16)

Les femmes enceintes sont également à risque de formes graves d'hépatite E comme l'hépatite fulminante ou des complications obstétricales. Elles le sont principalement au cours du troisième trimestre de grossesse avec un taux de mortalité pouvant atteindre 25% (17). Il est possible qu'une interaction de changements hormonaux et immunologiques durant la grossesse, en plus d'une charge virale élevée de VHE, rendent la femme enceinte plus vulnérable (18). Il y a également un risque élevé de transmission au fœtus, avec des complications pour ce dernier : accouchement prématuré, fausses couches, mortalité à la naissance ou néonatale. Une des études les plus récentes menée chez la femme enceinte, au cours d'une épidémie au Soudan de 2010 à 2011 a montré que chez 39 femmes enceintes porteuses du VHE ; 14 d'entre elles ont vécu des décès intra-utérins et 9 d'entre elles des accouchements prématurés (19).

## B. Dans les pays développés

Dans les pays développés le profil de l'hépatite E est différent : les génotypes 3 et 4 sont prédominants et font l'objet d'une transmission zoonotique. Le génotype 3 présente une répartition mondiale tandis que le génotype 4 est essentiellement retrouvé en Asie (notamment en Chine, au Japon et en Inde) (20). Une étude récente indique des séroprévalences variables (0,03% à 52%) dans les pays occidentaux, les prévalences les plus élevées étant signalées aux Pays-Bas, en Allemagne et en France (21). Le principal animal vecteur est le cochon : les fortes séroprévalences correspondent donc aux régions où la consommation d'aliments d'origine porcine insuffisamment cuits est plus fréquente comme notamment le Sud de la France. Des études montrent une prévalence du HEV comprise entre 0 et 21% dans les foies de porcs domestiques et entre 2 et 38% dans les foies de sangliers. Les produits carnés transformés (saucisse de foie type figatelli) présentent un taux de détection encore plus élevé : de 16% à 47% pouvant s'expliquer par le mélange de foies de plusieurs animaux dans un seul produit (22). Elle peut, par extension, se faire par consommation d'eau ou de fruits ou légumes non pelés et crus contaminés par des fèces d'origine

humaine ou animale et par consommation de fruits de mer souillés par des eaux contaminées (14). Elle peut se faire plus simplement par contact direct avec les animaux.

Il existe également une transmission parentérale du VHE décrite pour tous les génotypes (4). Elle a pu être prouvée par comparaison de séquences génomiques entre le donneur et le receveur qui s'avéraient être identiques dans des cas au Japon (23) en Angleterre (24) et en France (25) notamment. En France, entre 2006 et 2014, quinze cas ont été mis en évidence de manière formelle avec une imputabilité certaines pour 13 cas (comparaison de souches génomiques). Il s'agissait à chaque fois du génotype 3. Sur les 15 receveurs de produits sanguins, 14 étaient en situation d'immunodépression et 7 étaient des transplantés d'organe. Cinq d'entre eux ont développé une hépatite chronique par la suite (26).

Par ailleurs, des études de séroprévalences établies dans différents pays par l'utilisation d'un même test, sensible et spécifique, a permis d'identifier trois niveaux d'endémie pour le VHE : faible (séroprévalence IgG anti-VHE < 10%), intermédiaire (séroprévalence IgG anti-VHE comprise entre 10% et 20%) et élevé (séroprévalence IgG anti-VHE > 20%) (27). Les pays présentant un taux d'endémie élevé sont la Chine (32.6%), l'Allemagne (29.5%), les Pays-Bas (27%) et la France (22.4% mais avec des taux variants entre 8% et 86% en fonction des régions (28)).

Le dépistage génomique de l'hépatite E est dorénavant obligatoire sur tous les dons du sang depuis mars 2023 (29).

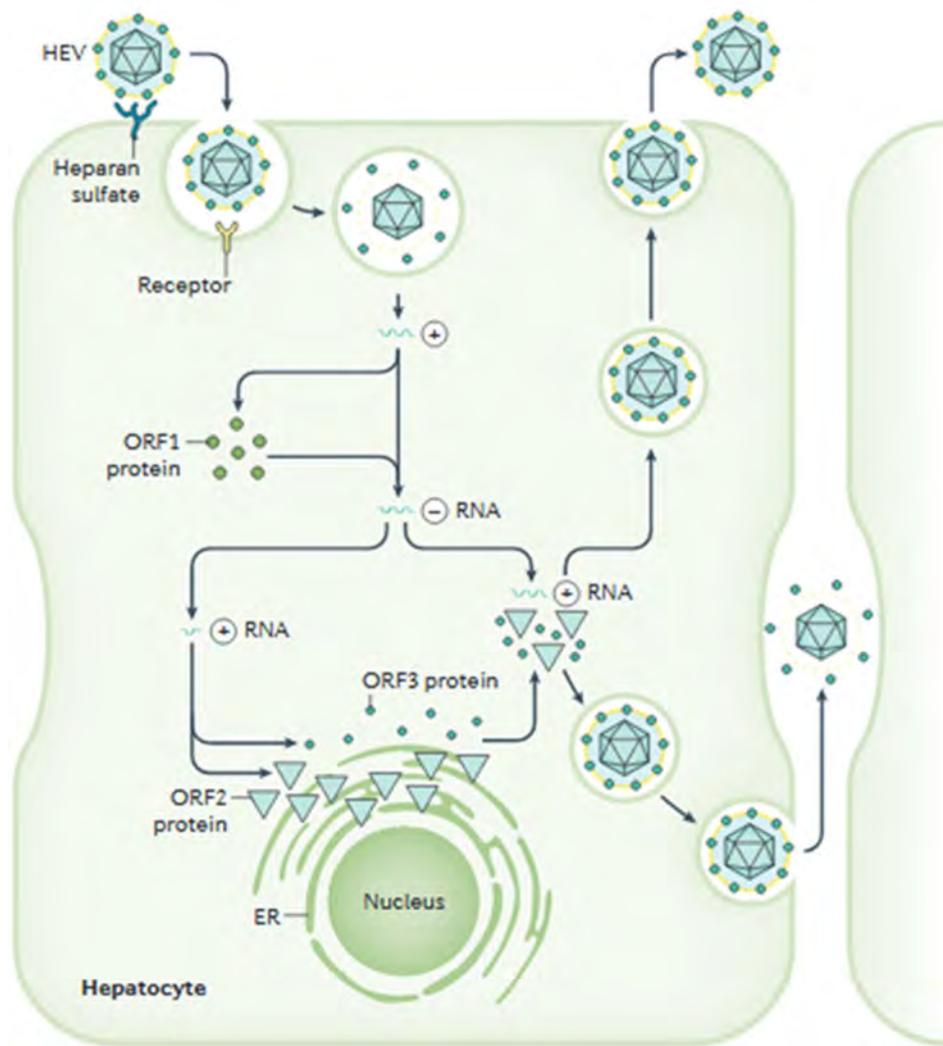
## 6. Pathogénicité

### A. Cycle de vie du VHE

Le virus de l'hépatite E se réplique dans les hépatocytes et les entérocytes (30). Il se présente sous deux formes : nue (HEV) et quasi enveloppée (eHEV). Ils entreraient dans la cellule par deux mécanismes distincts mais celui de la forme nue HEV n'est pas encore bien élucidée (7).

Le virion eHEV se fixe à l'hépatocyte via le protéoglycane héparane sulfate (figure 2). Il interagit avec un récepteur cellulaire spécifique encore non identifié mais

dépendant des protéines Rab liées aux GTPases RAS (31) puis est internalisé via un processus dépendant de la clathrine. Après élimination de l'enveloppe dans les lysosomes, l'ARN viral peut être traduit en protéines non structurales au niveau ribosomal. La polymérase virale réplique l'ARN de sens positif pour former un transcrite de sens négatif. Cet ARN de sens négatif sert de matrice pour la synthèse de transcrits de sens positif pleine longueur à conditionner dans des virions de descendance, ainsi qu'un ARN sous-génomique plus court qui contient ORF2 et ORF3 (4,31). ORF2 va être traduite en ORF2i, ORF2g et ORF2c (9) tandis qu'ORF3 va être traduite en viroporine essentielle au bourgeonnement du virus. La libération du VHE implique la voie exosomale et la protéine ORF3. Ainsi les virions matures associés aux lipides grâce à la protéine ORF3 vont être libérés du côté basolatéral des hépatocytes dans le sang et du côté apical dans la bile. Dans les canalicules biliaires, ils perdent leur enveloppe lipidique sous l'action des sels biliaires détergents, sont acheminés vers le tractus gastro-intestinal et excrétés sous forme nue dans les selles (4,31).



**Figure 2** - Cycle de vie du virus de l'hépatite E. Adapté de Kamar *et al*, 2017.

## B. Pathogénèse du VHE

La pathogénèse de l'hépatite E se déroule en 3 étapes : une période d'incubation, une hépatite E aiguë (majoritairement asymptomatique) et une phase de convalescence aboutissant à une guérison progressive. Même si l'infection est presque toujours spontanément résolutive, une infection chronique persistante peut survenir chez les sujets immunodéprimés.

L'hépatite aiguë est caractérisée par une phase prodromique (1-10 jours) avec un syndrome pseudo-grippal (fièvre modérée, nausées vomissements, myalgies, malaises...) associé à une augmentation progressive des transaminases. Puis une

phase ictérique (14-28 jours) associée à une hyperbilirubinémie. Enfin, une phase de convalescence avec disparition des symptômes associée à une normalisation des transaminases (32). Elle peut dans de rares cas (sujets atteints d'hépatopathies chroniques, femme enceintes) être fulminante.

L'hépatite chronique (décrite pour les génotypes zoonotiques 3, 4 et 7) est caractérisée par une réplication persistante du VHE au-delà de 3 mois après l'infection (33). Elle concerne les sujets immunodéprimés (greffés d'organes solides, patients atteints d'hémopathies malignes traités par chimiothérapie ou encore les patients séropositifs pour le VIH). Elle peut évoluer vers la cirrhose dans les 3 à 5 ans pour 10% des cas (34) et ainsi entraîner le décès du patient (35).

L'hépatite E peut également provoquer des manifestations extra hépatiques. En effet, en plus des cas cliniques relayés, le VHE a pu être détecté dans plusieurs sites extra-hépatiques chez l'animal après expérimentation mais aussi chez l'homme :

Chez le porc, de l'ARN viral à brin négatif (reflétant une réplication virale en cours) a été détecté dans le foie mais aussi dans l'intestin grêle, le côlon et les ganglions lymphatiques (36).

Chez le lapin a été mis en évidence de l'ARN brin négatif dans le foie, les reins, l'intestin grêle, la rate et l'estomac (37).

Chez l'homme, la présence du VHE a été détectée dans le LCR (via l'ARN viral (38) et indirectement par une production intrathécale d'anticorps (39)) chez des patients présentant des manifestations neurologiques ainsi que dans le placenta (via l'ARN) de femmes enceintes (40).

Les manifestations extra-hépatiques les plus fréquentes sont les manifestations neurologiques. Une revue de la littérature a été réalisée par Belbézier *et al*/ recensant 130 cas de troubles neurologiques entre 2000 et 2017 principalement causés par le génotype 3 (41). Les sujets les plus touchés étaient les hommes immunocompétents dont les syndromes les plus décrits étaient celui de Guillain-Barré puis de Parsonage-Turner suivis de méningites et/ou de méningoencéphalites et enfin de mononeuropathies multiples. La sérologie IgM permettait de réaliser le diagnostic dans la plupart des cas comme il s'agissait de sujets immunocompétents (41). La RT-PCR

restait utile chez les sujets immunodéprimés avec mise en évidence directe du VHE dans le plasma mais également dans le LCR pour certains cas (38).

Le VHE a également été identifié comme à l'origine de troubles rénaux (42,43), pancréatiques et hématologiques (34).

### C. Rôle du système immunitaire dans la physiopathologie du VHE

L'infection par le virus de l'hépatite E entraîne la mise en place de la réponse immunitaire innée puis adaptative.

La réponse immunitaire innée débute par la reconnaissance de composants viraux par les récepteurs reconnaissant les pathogènes (pathogen recognition receptors : PRRs) situés à la surface (toll like receptors : TLRs), dans le cytoplasme (RIG-1 like receptors : RLRs) ou les endosomes (NOD like receptors : NLRs) des cellules cibles que sont les hépatocytes et les entérocytes. Ils activent une cascade de signalisation aboutissant à la production d'IFN  $\alpha$  et  $\gamma$  (44,45). L'IFN se lie ensuite à ses récepteurs spécifiques entraînant la stimulation de gènes dépendant de l'interféron (IFN-stimulated genes : ISGs) qui codent pour des protéines anti-virales. Ces dernières vont inhiber la réplication du VHE, entraîner la mort des cellules infectées ou encore recruter des polynucléaires neutrophiles (44,45).

Le VHE va mettre un certain nombre de mécanisme pour échapper au système immunitaire. ORF1 peut inhiber la production d'IFN  $\beta$  et limiter la production de ferritine atténuant ainsi la réponse immunitaire. ORF2 peut inhiber l'apoptose et la voie NF- $\kappa$ B qui serait impliquée dans la régulation de l'inflammation et le rétrocontrôle négatif de l'apoptose (44). ORF3 inhibe également la production d'IFN  $\alpha$  et  $\beta$  ainsi que l'activation des voies NF- $\kappa$ B, JAK-STAT et JNK-MAPK (ces dernières jouent aussi un rôle dans la régulation de la division cellulaire et de l'apoptose) générant ainsi un environnement favorable à l'infection par le VHE (44).

Les lymphocytes cytotoxiques NK et NKT sont également impliqués dans la réponse immunitaire innée. Des études ont montré que les lymphocytes NK activés migraient vers le foie chez les patients infectés par le VHE (44). Ils produisent de l'IFN  $\gamma$  et du TNF- $\alpha$  modulant la réponse antivirale. Il est à noter que les patients transplantés d'organe solide atteints d'une hépatite E aiguë présentent une expression augmentée

du marqueur d'activation CD69 par les lymphocytes NK. L'action cytotoxique est alors amplifiée, impactant la clairance virale mais également les dommages hépatiques (46).

La réponse immunitaire adaptative comprend deux composantes : humorale et cellulaire.

La réponse humorale correspond à l'apparition des IgA, IgM puis IgG. Ces immunoglobulines sont principalement dirigées contre l'antigène (Ag) de capsid codé par ORF2. Cependant, le VHE contraint leurs effets par deux mécanismes (9,47) :

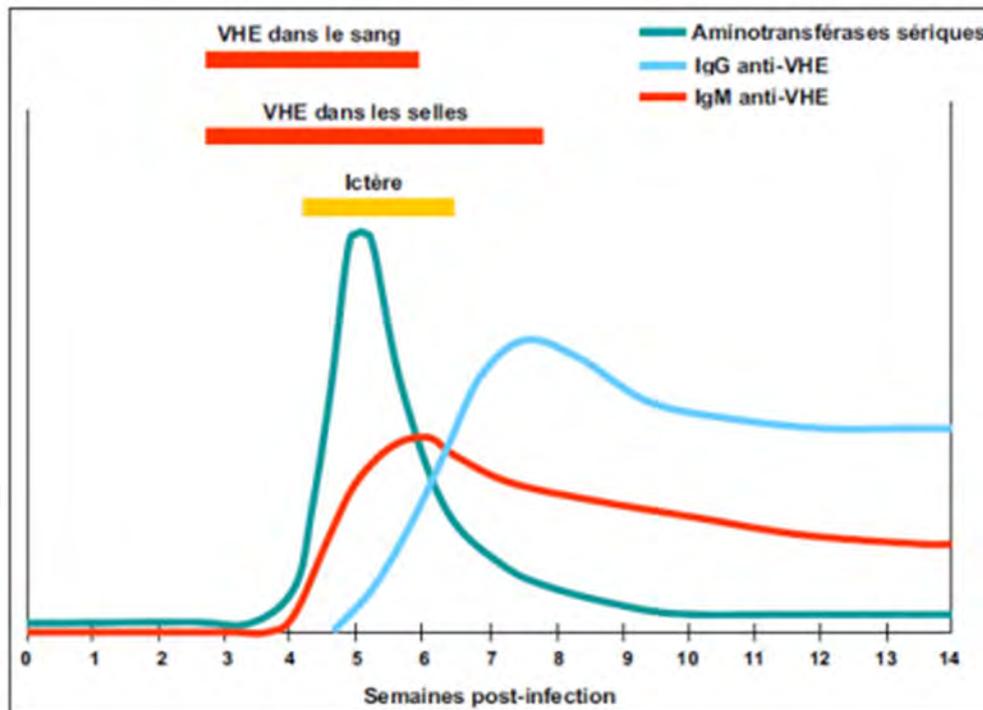
- Via sa forme quasi-enveloppée circulante : le moment le plus propice pour l'atteindre correspond au moment de l'élimination de cette pseudo-enveloppe dans les endolysosomes. Les IgM apparaissant en premier ne peuvent accéder à ce compartiment contrairement aux IgG apparaissant plus tardivement.
- Via la production de protéines de capsid ORF2g et ORF2c solubles servant de leurre aux immunoglobulines.

La réponse cellulaire correspond à la destruction des cellules infectées par les lymphocytes T CD4+ « helpers » et T CD8+ « cytotoxiques ». Peu d'études existent sur l'impact de cette réponse dans le contrôle de l'infection. Certaines montrent une population lymphocytaire T plus importante chez les patients présentant une infection spontanément résolutive contre ceux présentant une infection chronique (48,49). De plus, les patients transplantés avec un taux plus bas de lymphocytes CD3+ et CD4+ présentent un phénomène d'« épuisement » de la réponse cellulaire. Il est dû à l'exposition permanente du système immunitaire aux antigènes du greffon appartenant au non soi et impliquerait la protéine inhibitrice PD-1 (50).

## 7. Diagnostic

L'incubation de l'infection dure entre 3 et 6 semaines puis apparaissent les IgM parallèlement à l'élévation des transaminases suivies des IgG (figure 3), plus durables et dont l'avidité augmente au cours du temps. La stratégie diagnostique du virus de l'hépatite E repose avant tout sur la recherche d'IgM anti-VHE par dosage immunoenzymatique ou des kits immunochromatographiques rapides. Elle est recommandée en première ligne à la fois chez les immunocompétents et les

immunodéprimés comme le stipule l'algorithme proposé par le Centre National de Référence (CNR) (5) et la Haute Autorité de Santé (HAS). Elles peuvent persister jusqu'à 12 mois.



**Figure 3** - Evolution des marqueurs biologiques de l'hépatite E.

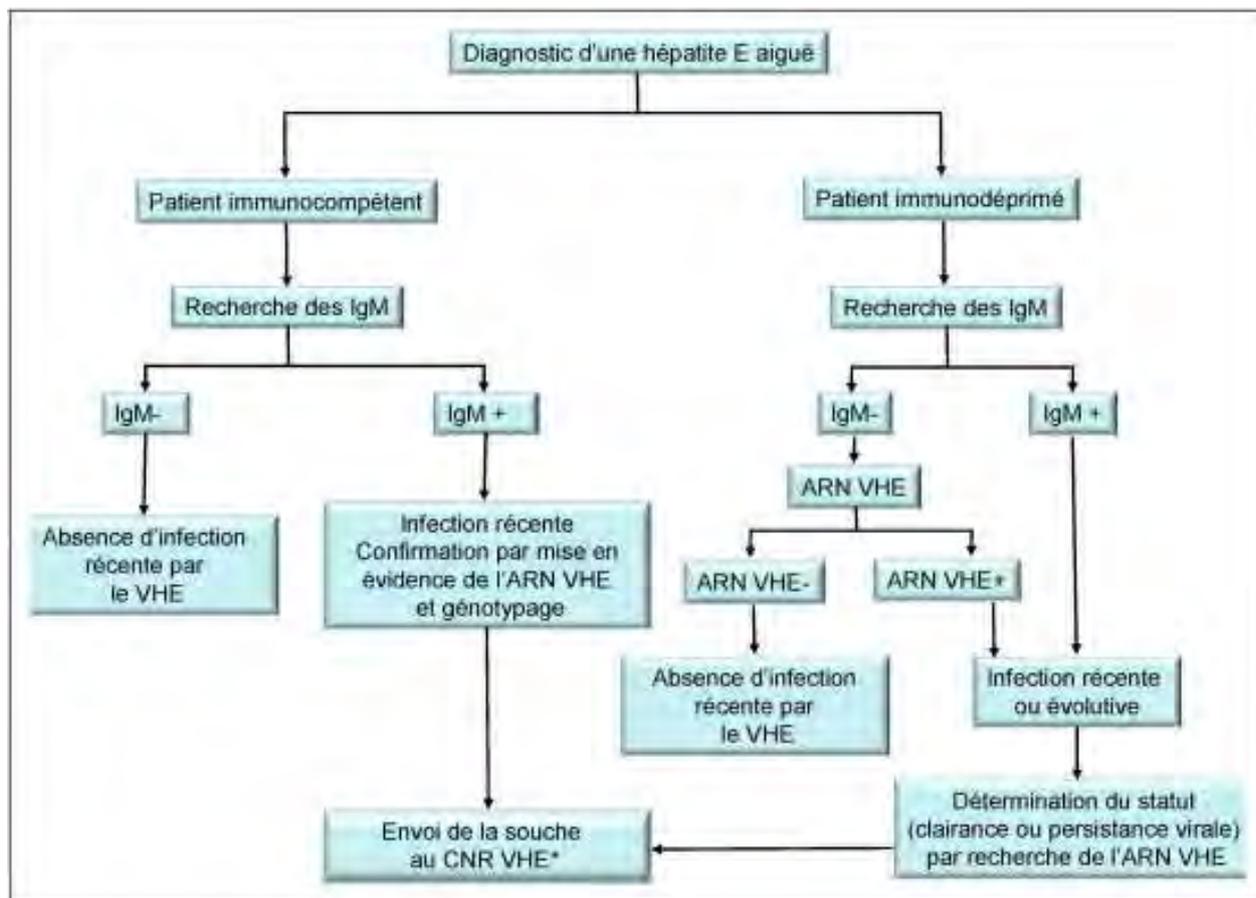
D'après Izopet *et al*, 2015.

La détection de l'immunité ou de l'exposition antérieure au VHE se fait par la détection des anticorps IgG. Ils sont assez variables en termes de sensibilité et peuvent s'avérer faussement négatifs dans les cas où les IgG sont indétectables ou ont disparu rapidement (5). Cette variabilité est à l'origine de sous estimations de la séroprévalence du VHE au sein des population par le passé. Il est désormais admis que des séroprévalences ne peuvent être comparées qu'à la condition que le même test ait été utilisé (51).

Chez les immunocompétents, la recherche d'IgM anti-VHE peut s'avérer suffisante mais chez les sujets immunodéprimés : la recherche par détection moléculaire est indispensable car les Ac peuvent être indétectables. La détection de l'ARN du VHE est une méthode importante pour le diagnostic, la confirmation et la surveillance des infections par le VHE (52). Les tests de biologie moléculaire présentaient également

une variabilité inter-laboratoire dans les débuts démontrant la nécessité de produire des Standards Internationaux pour normaliser les tests de détection et quantifier avec précision l'ARN du VHE (52). L'ARN viral doit être recherché lors d'une cytolysé hépatique chez le sujet immunodéprimé sans mise en évidence d'IgM. Il est présent dans le sang et les selles avant la phase aiguë : persiste 3-4 semaines dans le sang et jusqu'à 5-6 semaines dans les selles quand l'infection est spontanément résolutive. Il est également recherché pour confirmer une infection aiguë dans le cas d'IgM positives (figure 4). La fenêtre d'ARN détectable est relativement étroite de sorte qu'un résultat négatif chez des patients symptomatiques depuis plusieurs semaines n'exclut pas toujours une infection récente. La détection de l'ARN viral dans le sang ou les selles permet aussi de définir le passage à la chronicité quand il reste détectable 3 à 6 mois post infection (33). La recherche de l'ARN est indispensable au suivi thérapeutique des patients.

Il existe également un test ELISA permettant de détecter l'antigène du VHE. Celui-ci pourrait constituer une alternative moins coûteuse à la biologie moléculaire. Il a été testé sur des échantillons de sang de 33 patients immunocompétents et de 31 patients immunodéprimés atteints d'une infection aiguë par le VHE de génotype 3, positifs pour l'ARN du VHE. Le test était spécifique à 100%, sans réactivité croisée. Les virémies plus faibles détectées allaient de  $10^3$  copies/mL à  $10^5$  copies/mL. La sensibilité diagnostique était de 91% sans différence significative entre les patients immunocompétents (88%) et immunodéprimés (94%). Le test Ag-VHE était plus fréquemment positif chez les patients immunodéprimés à la phase aiguë (94%) que le test anti-VHE IgM. Enfin, le dosage de l'Ag VHE était corrélé à la charge virale plasmatique ARN (53).



**Figure 4** - Algorithme diagnostique du VHE proposé par le CNR.

## 8. Traitement et suivi

Dans la majorité des cas, l'infection du virus de l'hépatite E n'est pas traitée car spontanément résolutive dans le cadre d'hépatites aiguës. Dans les rares cas d'hépatite fulminante, l'unique traitement est la transplantation hépatique.

Les sujets traités pour le VHE restent avant tout les patients immunodéprimés ayant développé une infection chronique. En effet, si l'ARN viral persiste au-delà de 3 mois, l'élimination spontanée du virus est peu probable et une intervention thérapeutique doit être envisagée (54). La première stratégie consiste à restaurer leurs fonctions immunitaires en réduisant les traitements immunosuppresseurs (principalement ceux ciblant les lymphocytes T) conduisant à l'éradication du virus dans un tiers des cas (5). Mais cela n'étant pas toujours possible, deux traitements médicamenteux peuvent être utilisés : la ribavirine et l'interféron alpha pégylé.

La ribavirine constitue le traitement de référence en monothérapie. L'European Association for the Study of the Liver (EASL) préconise de la prendre pendant 3 mois. Si à l'issue des 3 mois l'ARN viral est indétectable dans le sang et les selles ; alors le traitement peut être stoppé. Si ce n'est pas le cas, la ribavirine doit être poursuivie pour 3 mois supplémentaires (55). Elle agirait sur la réplication virale par déplétion du pool cellulaire de guanosine triphosphate et exercerait un effet mutagène et immunomodulateur. Son principal effet indésirable reste la survenue d'une anémie (14). Le suivi de l'ARN viral par RT-PCR est indispensable pour juger de l'efficacité du traitement. Une étude menée chez des patients transplantés d'organe solide, atteints d'une infection chronique par le VHE et traités par ribavirine sur 3 mois a démontré qu'une réponse virologique soutenue (c'est-à-dire que l'ARN plasmatique du VHE est indétectable au moins 6 mois après l'arrêt du traitement) a été obtenue chez 63% des cas. Cette étude a également permis de montrer qu'une diminution de la concentration d'ARN plasmatique de 0.5 log copies/mL et de 1 log copies/mL à J7 montraient des valeurs prédictives positives de 88% et 100% respectivement (56).

Le suivi de l'excrétion fécale du VHE par RT-PCR peut également servir d'indicateur d'efficacité du traitement. En effet, une autre étude a été menée chez 24 patients également transplantés, atteints de façon chronique par le VHE et traités sur 3 mois par ribavirine. L'ARN du VHE a été mesuré dans les selles et le plasma avant l'instauration du traitement, à M+1 et M+3. Il a été observé que l'ARN du VHE fécal était indétectable à l'issue des 3 mois chez 15 patients ayant obtenu une réponse virologique soutenue (RVS) mais qu'il était encore détectable chez les 6 patients ayant fait une rechute (qui avaient obtenu un ARN plasmatique indétectable au bout des 3 mois mais qui est réapparu 1 à 3 mois post traitement). La persistance de l'ARN fécal malgré une négativité de l'ARN plasmatique en fin de traitement constitue donc un marqueur prédictif de rechute (57).

Ces résultats suggèrent que le suivi de l'ARN viral dans le plasma et les selles peut aider à déterminer une durée optimale de traitement et que les patients dont les selles sont toujours positives pour l'ARN du VHE après 3 mois de traitement doivent continuer à être traités (57).

Des mutations dans la polymérase ont été décrites chez des patients en échec mais leur rôle dans la résistance à la ribavirine n'est pas certain (51,58). Ces mutations semblent impliquées dans une meilleure réplication du virus.

Outre les infections chroniques, la ribavirine peut être utilisée dans les cas d'hépatite aiguë sévères chez les patients ayant une hépatopathie préexistante (55). Elle est en revanche contre-indiquée chez la femme enceinte.

L'interféron alpha pégylé a aussi fait preuve d'efficacité chez les patients greffés hépatiques et hémodialysés. Il ne peut cependant pas être utilisé chez les transplantés rénaux, cardiaques et pulmonaires en raison du risque de rejet aigu du greffon (5).

## 9. Prévention

Dans les pays en développement, la prévention repose sur l'amélioration des infrastructures sanitaires notamment dans les zones où il existe de fortes concentrations de populations.

Dans les pays industrialisés, la contamination se faisant principalement par voie alimentaire, il est recommandé de cuire suffisamment les aliments à risque (à base de foie cru de porc type saucisse de foie fraîches ou sèche, figatelli et à base de sanglier ou de cerf de type abats surtout). La consommation de ces produits même cuits est à déconseiller chez les personnes à risque de développer une forme grave d'hépatite E (patients immunodéprimés, patients atteints d'une hépatopathie chronique préexistante et les femmes enceintes) (14).

Il existe un vaccin recombinant nommé Hecolin® basé sur la protéine de capsid du virus mais dont la disponibilité est actuellement restreinte à la Chine et au Pakistan. L'efficacité clinique dans les études était de 100% après 3 injections (59).

Concernant la transmission par perfusion, le virus de l'hépatite E fait désormais parti des agents pathogènes systématiquement dépistés sur les dons du sang depuis mars 2023 en France.

## Objectif

L'objectif de cette étude était d'évaluer les performances du kit ALTOSTAR® HEV RT-PCR 1.5 d'Altona Diagnostics pour la détection et la quantification au sein de différentes matrices de l'ARN du virus de l'hépatite E implémenté sur l'automate d'extraction et de PCR set-up AltoStar® AM16.

## Matériels et méthodes

### 1. Echantillons

Pour évaluer la performance du kit 1.5 ALTOSTAR® HEV RT-PCR, nous avons sélectionné 81 échantillons de plasma et 10 échantillons de selles congelés provenant de patients infectés par le VHE. Ils avaient été dépistés positifs par la précédente technique à l'aide du Kit 2.0 RealStar® HEV RT-PCR d'Altona Diagnostics. La loi française de santé publique (CSP Art L 1121-1.1) ne requiert pas de consentement éclairé pour un tel protocole.

Le génotypage a été déterminé par séquençage d'un fragment ORF2 du génome et les génotypes et les sous-types ont été déterminés en utilisant la classification proposée par Smith *et al.* (39). Ainsi les 81 échantillons de plasma positifs pour le VHE sont de génotype 3c (n=41), 3f (n=24), 3m (n=1), 4b (n=3) et 12 échantillons de concentration d'ARN insuffisante pour le typage ( $2.6 \log_{10}$  UI/mL). Les 10 échantillons de selles contiennent les génotypes 1 (n=1), 3c (n=6), 3f (n=2), 3h (n=1) du VHE.

Le 1<sup>er</sup> Standard International de l'OMS pour les tests de biologie moléculaire visant à détecter et quantifier le VHE (code #6329/10) a également été utilisé. Il s'agit d'un échantillon de VHE de génotype 3a reconstitué d'une concentration de 250 000 UI/mL et dilué dans du sérum humain pour évaluer la sensibilité analytique et vérifier l'exactitude de la quantification conformément à la norme internationale de l'OMS.

## 2. Kit Altostar® HEV RT-PCR 1.5

### A. Automates

Le kit Altostar® HEV RT-PCR 1.5 est un test de diagnostic in vitro pour la détection et la quantification de l'ARN spécifique du VHE. Il s'intègre au sein du Workflow AltoStar® qui comprend les étapes suivantes : purification sur l'AltoStar® AM16 à l'aide du kit de purification AltoStar® 1.5 ; préparation de la RT-PCR sur l'Altostar® AM16 à l'aide du kit AltoStar® HEV RT-PCR 1.5 et exécution de la RT-PCR sur un CFX96TM DW Dx.

### AltoStar® AM16

#### *Principe*

L'automate AltoStar® AM16 est une station de pipetage robotisée qui permet la purification des échantillons et la configuration de la plaque destinée à la RT-PCR avec les extraits d'ARN obtenus.



**Figure 5** - AltoStar AM16.

### *Pré-requis*

Le portoir d'échantillons destinés à l'extraction est préparé la veille au niveau du plateau pré-analytique. Les échantillons parviennent aux techniciens chargés d'enregistrer les analyses. Chaque demande de diagnostic direct HEV entre autres est associée à la technique d'analyse ALTONA. Quand l'analyse est acquittée, une étiquette munie d'un code-barre s'imprime et contient les informations suivantes : nom, prénom, numéro de dossier MOLIS, type d'analyse, type de matrice, recherche quantitative ou qualitative. Elle sera collée sur l'aliquot correspondant. Une première vérification du volume est ensuite effectuée par l'automate préanalytique.

Le technicien de virologie récupère les tubes et dédie un portoir spécifique aux RT-PCR HEV. Il va créer une liste de travail HEV destinée à l'AltoStar® AM16 puis scanner tous les tubes concernés. Il vérifie en même temps que le volume soit bon : 500 µL minimum requis pour l'extraction + 250 µL de volume mort soit 750 µL au total. Si ce dernier est insuffisant : une dilution est nécessaire et sera intégrée à la liste de travail directement sur l'automate.

### *Avant purification*

Le technicien récupère le portoir de la veille et vérifie que le nombre de tubes corresponde à la liste de travail importée. Il précise les dilutions s'il y en a eu. Il peut ensuite placer aléatoirement les tubes sur le portoir spécifique à l'AltoStar® AM16 sans oublier le contrôle interne qui sera ajouté automatiquement avant le run et jugera de la validité de l'extraction.

Avant de lancer le run l'AltoStar® AM16 réalise un dernier check-up : lisibilité et unicité des codes-barres, concordance de lot des composants du kit de purification, non-péremption des réactifs chargés, suffisance des volumes de réactifs, positionnement correct de la plaque d'éjection des cônes.

### *Purification*

La purification ou extraction consiste à isoler l'ARN du VHE contenu dans les échantillons biologiques. Elle se déroule en trois étapes automatisées sur l'AltoStar® AM16 (figure 6) :

1. Au cours de la première étape, les acides nucléiques sont libérés par une lyse chimique et mécanique grâce à des concentrations élevées en sels chaotropiques. Les acides nucléiques sont stabilisés en solution et vont se lier

aux billes magnétiques recouvertes de silice. Le contrôle interne est ajouté automatiquement par l'AltoStar® AM16.

2. Puis plusieurs étapes de lavage s'enchaînent pour faire disparaître les protéines et autres impuretés.
3. Enfin, les acides nucléiques sont libérés des billes magnétiques à l'aide d'un tampon d'éluat et transférés sur la plaque d'éluat.

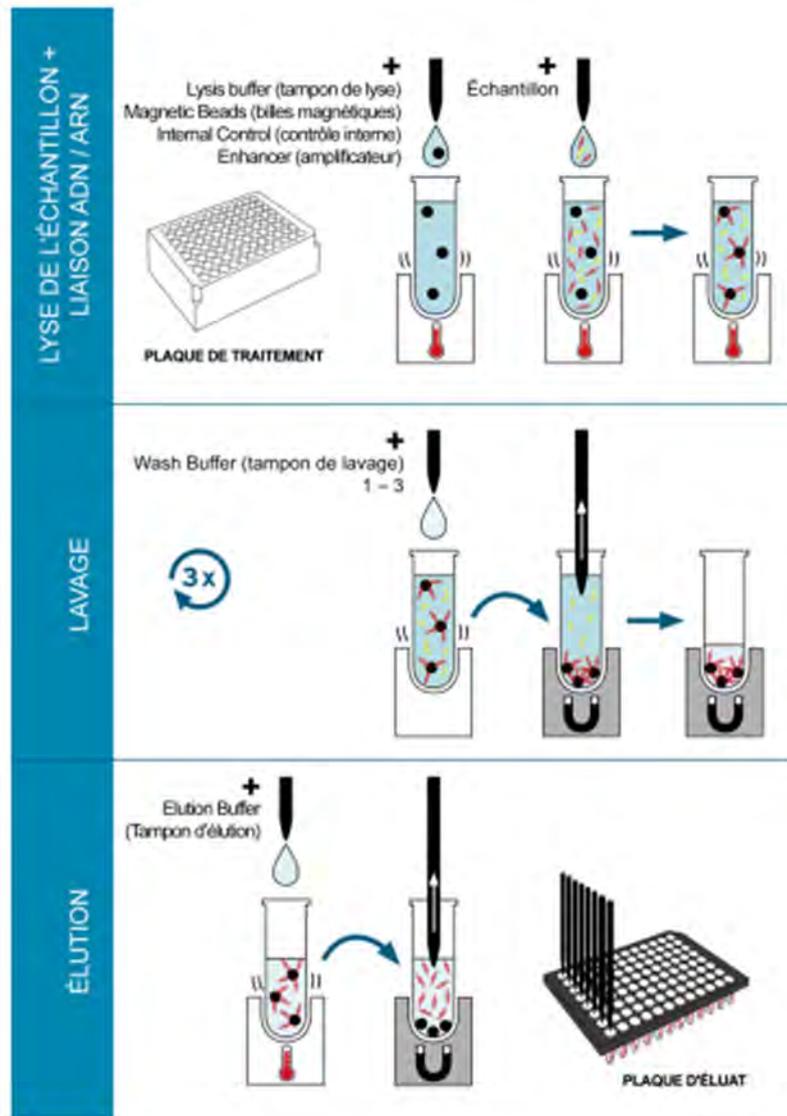


Figure 6 - Processus de purification.

### Configuration RT-PCR

Un des principaux intérêts de cet automate consiste en l'automatisation de la configuration de la plaque RT-PCR ; étape réalisée manuellement via la précédente

technique. Limitant ainsi nettement le risque d'erreurs et de contamination inter échantillon.

### *Avant PCR-set up*

Avant de configurer la plaque, l'automate estime la quantité de réactifs nécessaires en fonction du nombre de tubes : Masters A et B, Standards de quantification, contrôle négatif.

### *Description du kit de RT PCR AltoStar® HEV RT-PCR 1.5*

#### Masters A et B

Ils contiennent tous les composants (tampon PCR, transcriptase inverse, ADN-polymérase, sel de magnesium, amorces et sondes) utiles à la transcription inverse, à l'amplification médiée par PCR et à la détection de l'ARN spécifique au HEV et au contrôle interne en une seule réaction.

#### Standards de quantification

Les 4 standards fournis contiennent des concentrations normalisées d'ARN spécifique au HEV. Ils ont été calibrés par rapport au standard de l'OMS. Ils sont utilisés pour vérifier la fonctionnalité du système d'amplification et générer une courbe d'étalonnage permettant la quantification de l'ARN spécifique au HEV dans un échantillon.

#### Contrôle négatif

Il ne contient pas d'ARN spécifique au HEV mais contient la matrice du contrôle interne. Il permet de mettre en évidence une possible contamination du Master A et du Master B ou inter-échantillon.

### *PCR set-up*

L'automate prépare la plaque de PCR en ajoutant les échantillons ou les standards dans la plaque et le mix dans chaque puits.

## B. Thermocycleur CFX96TM DW Dx

### *Principe*

Le thermocycleur va permettre, via le kit AltoStar® HEV RT-PCR 1.5 d'amplifier et de quantifier l'ARN du HEV au sein de différentes matrices. Le technicien récupère la plaque configurée précédemment et scanne le code-barre associé sur le CFX : toutes

les informations relatives aux échantillons et au positionnement des patients sont alors transmises.



**Figure 7 - CFX96TM DW Dx.**

Il s'agit d'une technique RT-PCR en temps réel qui consiste en plusieurs étapes :

- Conversion de l'ARN en ADN complémentaire par la transcriptase inverse
- Amplification des séquences cibles spécifiques au HEV et des sondes spécifiques marquées par fluorescence par la polymérase pour la détection de l'ADN amplifié

En plus du système d'amplification et de détection spécifique de l'ARN du HEV, le test comprend des oligonucléotides pour l'amplification et la détection du contrôle interne.

A noter que les sondes spécifiques à l'ARN du HEV sont marquées avec le fluorophore FAM et la sonde spécifique au contrôle interne est marquée avec le fluorophore JOE détectable dans le canal VIC.

### C. Délai de rendu des résultats

La durée totale du processus de l'extraction par l'Altostar® AM16 à l'amplification par le CFX96™ DW Dx est d'environ 8 heures. Il est donc possible de rendre un résultat pour les patients testés dans la journée.

### 3. Comparaison avec le kit RealStar® HEV RT-PCR 2.0

La précédente technique utilisait le kit RealStar® HEV RT-PCR 2.0 avec l'étape d'extraction sur le MagNAPure 96™ (Roche) et l'étape d'amplification sur le Light Cycler 480 (Roche).

#### A. Automates

##### *MagNAPure 96™*

A la différence de l'Altona AM16®, il y avait deux trousseaux d'extractions sur le MagNA en fonction du type de matrice : MagNA Pure DNA and Large Volume kit™ pour le plasma/sérum et MagNA Pure DNA and Viral NA Small volume kit™ pour les selles. Le volume requis était de 500 µL pour l'extraction Large volume et de 200 µL pour l'extraction Small volume.

Le technicien devait établir une plaque manuellement à partir des échantillons primaires en intégrant le contrôle interne sans oublier que les matrices selles et plasma devaient être extraites séparément. Une fois l'extraction terminée, les extraits d'ARN étaient à nouveau répartis dans les eppendorfs préalablement identifiés et disposés selon le plan de plaque établi. A ce moment-là devaient être rajoutés manuellement les réactifs utiles à l'amplification : mix RT-PCR (Master A et B, contrôle interne), témoin positif et témoin négatif.

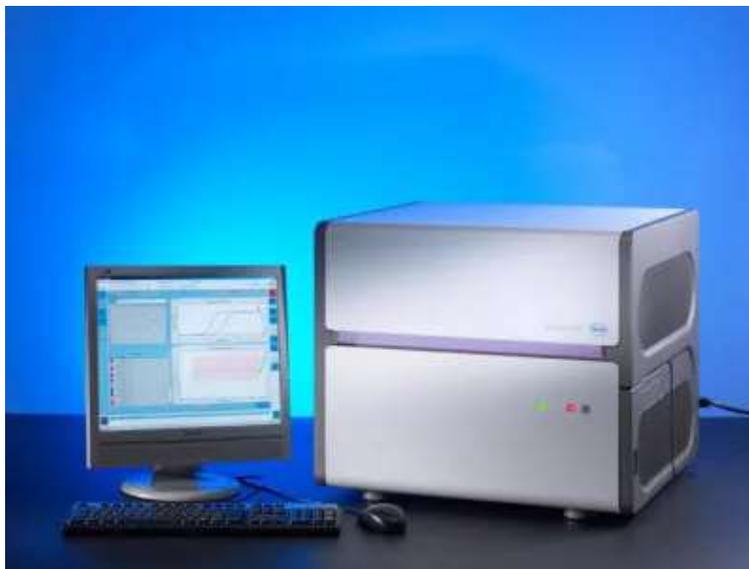
Toutes ces étapes sont dorénavant automatisées sur l'AltoStar® AM16.



**Figure 8** - MagNa Pure 96.

*Thermocycleur Light Cycler 480*

Le principe est le même que pour le CFX96TM DW Dx : amplification et quantification de l'ARN du HEV au sein de différentes matrices.



**Figure 9** - LightCycler 480.

## B. Délai de rendu des résultats

De part les deux types d'extraction et la configuration manuelle de la plaque RT-PCR ; un jour était nécessaire pour la purification et un jour pour l'amplification. Ainsi, il fallait 48h pour rendre un résultat qualitatif ou quantitatif quant à la détection d'ARN viral dans l'échantillon.

## 4. Analyses statistiques

Plusieurs tests statistiques ont permis de comparer les deux techniques

- Le test de Spearman et la droite de régression linéaire ont permis d'évaluer la force de corrélation.
- Le graphe de Bland-Altman : il s'agit d'un diagramme de dispersion des différences entre les mesures appariées par rapport à leurs moyennes. Il a permis d'évaluer l'ampleur du désaccord entre les deux techniques et d'estimer un biais global.

Il a fallu dans un premier temps transformer les valeurs obtenues d'ARN du VHE en logarithme et les analyser à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9.

## Résultats

Une validation de méthode a été réalisée afin d'utiliser le kit 1.5 ALTOSTAR® HEV RT-PCR intégré au sein du Workflow AltoStar® selon la norme ISO15189 au laboratoire. Il vient substituer le kit 2.0 RealStar® HEV RT-PCR d'Altona Diagnostics utilisé précédemment après une extraction sur le MagNapture 96. Plusieurs aspects ont été évalués : répétabilité, reproductibilité, justesse, exactitude, incertitudes, spécificité et inclusivité, étendue de mesure et enfin comparaison de méthodes.

Il s'agit d'un examen de biologie médicale de portée A : c'est-à-dire que la méthode utilisée est reconnue et marquée CE au titre de la directive 98/79/CE ou a déjà fait l'objet de publications internationales validées.

### 1. Répétabilité

La répétabilité montre l'erreur systématique d'un automate. Elle se calcule par le dosage répété d'un ou de plusieurs échantillons, par un même opérateur, dans des conditions identiques pour toutes les mesures (réactif, calibration, appareil, opérateur) et dans un délai le plus court possible (44).

Elle a été effectuée sur le plasma ; unique matrice où la mesure est quantitative. Elle a permis de calculer la moyenne, l'écart-type (ET) et le coefficient de variation (CV) (quotient de l'écart type sur la moyenne). Les valeurs ont été répertoriées dans le tableau suivant :

Echantillons	Nombre de Valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (fournisseur si disponible)	ET retenu par le laboratoire	Conclusion
Echantillon positif (CIQI)	5	2.3 log UI/mL	0.09 log UI/mL	4%	3.5% de CV selon la notice en inter-lot	<0.25 log UI/mL	Conforme

## 2. Reproductibilité

La reproductibilité peut être intra-laboratoire (fidélité intermédiaire) ou inter-laboratoire (reproductibilité externe). On parle alors ici de fidélité intermédiaire. Elle est déterminée par la mesure répétée d'échantillons selon des conditions opératoires plus variables (temps, lots de réactifs, étalonnages, opérateurs et équipements). Les valeurs trouvées lors de la validation de méthode sont les suivantes :

Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV fournisseur	ET retenu par le laboratoire	Conclusion
Contrôle interne indépendant	177	2.31 log UI/mL	0.31 log UI/mL	13%		<0.5 log UI/mL	Conforme

Le suivi régulier des contrôles internes de qualité réalisés sur une longue période (8 mois) faisant intervenir plusieurs lots de réactifs a permis de confirmer l'ET acceptable de 0.31 log UI/ml (45).

## 3. Justesse

La justesse correspond à l'écart de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence. Il s'agit ici d'une moyenne de 3 concentrations obtenue à partir d'une dilution du standard international délivré par le Paul Ehrlich Institute (PEI) dont la concentration admise sert de référence.

Les valeurs obtenues sont les suivantes :

Echantillons	Nombre de valeurs	Moyenne obtenue	Valeur attendue :	Biais = Moyenne - Valeur attendue
Ehrlich D2	3	3.79 log UI/mL	3.40 log UI/mL (2500 UI/mL)	-0,39

#### 4. Exactitude

Elle repose sur l'exploitation des Evaluation Externes de la Qualité (EEQ). Elle consiste à comparer le résultat d'un seul dosage d'un échantillon inconnu (x) à celui d'une valeur cible consensuelle (m). Cette valeur est généralement la moyenne du groupe de pairs d'une évaluation externe de la qualité lorsque les participants sont en nombre suffisant.

Les valeurs obtenues sont les suivantes :

Echantillons	Valeur Labo	Moyenne (groupe de pairs)	Ecart-type (groupe de pairs)	z-score	Conclusion
Echantillon de contrôle CTCB 2022 2211	3.56	3.42	0.231	0.60	Conforme
Echantillon de contrôle CTCB2022 2212	2.67	2.607	0.235	0.26	Conforme
Echantillon de contrôle CTCB 2022 2212	2.18	2.24	0.263	-0.22	Conforme
Echantillon de contrôle CTCB 2022 2223	4.11	4.16	0.241	-0.20	Conforme

Le z-score se calcule par la formule suivante :  $(\text{valeur labo} - \text{moyenne des pairs}) / \text{écart-type des pairs}$ . Il permet de conclure à la conformité ou non :

- Quand Z-score compris entre -2 et 2 : conforme
- Quand Z-score compris entre -3 et -2 ou +2 et +3 : alerte à analyser
- Quand Z-score  $< -3$  ou  $> +3$  : non conforme

## 5. Incertitude

C'est la marge d'erreur associée aux valeurs mesurées. C'est un indicateur de la qualité d'un résultat et de la fiabilité qu'on peut lui accorder : elle doit faire l'objet d'une réévaluation régulière. Elle a été calculée ici à partir du Standard PEI par la formule suivante :

$$U = 2 \sqrt{(Et)^2 + \frac{(Biais)^2}{3}}$$

Avec Et : écart-type déterminé sur un niveau choisi pour déterminer l'incertitude et Biais : déterminé à partir du standard international.

L'incertitude calculée est de 0.45 log UI/mL.

## 6. Spécificité et inclusivité

L'inclusivité a pu être évaluée au laboratoire avec les 91 échantillons testés. Elle est de 100% avec le kit Altostar pour la détection des génotypes et sous-types 3c, 3f, 3m et 4b dans le plasma et des génotypes et sous-types 1, 3c, 3f et 3h dans les selles.

La spécificité n'a pas été évaluée au laboratoire et repose sur des données bibliographiques (cf paragraphe « Discussions »).

## 7. Etendue de mesure

### A. Limite de détection

C'est la concentration minimum pour laquelle un résultat positif est obtenu pour 95% des échantillons testés. Selon les spécifications indiquées dans la notice, elle doit être de 3.4 UI/mL grâce au standard international du PEI. Ce standard reconstitué, d'une concentration de départ de 250 000 UI/mL a été dilué en série dans du sérum humain. Chaque dilution a été mesurée de manière répétée (3 à 10 fois). Les résultats ont été répertoriés dans le tableau suivant :

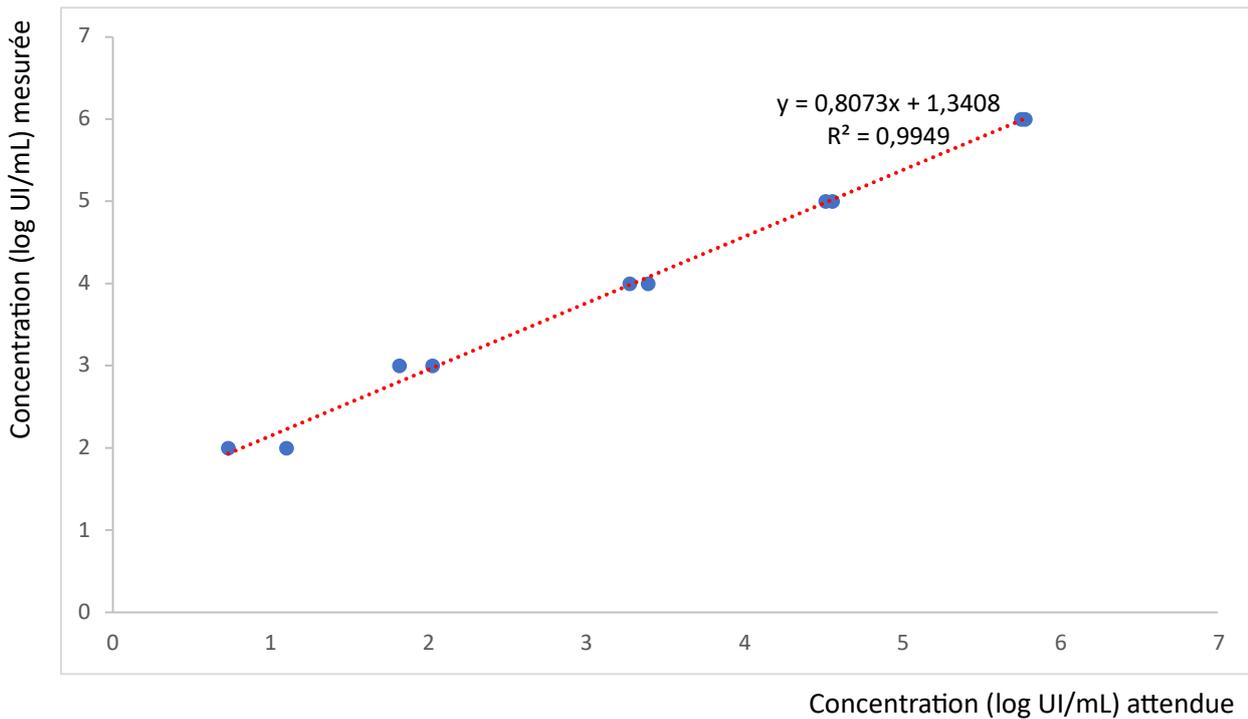
Concentration attendue (UI/mL)	Nombre de répliques positifs
2500	3/3
250	3/3
125	3/3
66	3/3
33	3/3
16	3/3
8	3/3
4	6/10
2	6/10
1	1/10

En conclusion, la limite de détection communément admise calculée grâce à l'analyse probit est de 7,6 [4,4-52,5] UI/mL.

#### B. Linéarité

Elle doit être vérifiée en portée A et établie en portée B. Elle consiste, après la dilution d'un échantillon de concentration très élevée, à vérifier l'existence d'une relation linéaire entre les dilutions effectuées et les concentrations observées. D'après la notice, la linéarité doit s'étendre de 10 à 100 000 UI/mL et le coefficient de régression linéaire  $R^2$  doit être  $> 0.95$ .

Elle a été mesurée à partir d'un échantillon de génotype 3f et donne la courbe suivante :



**Figure 10 - Vérification de la linéarité à partir du Standard PEI**

On obtient une linéarité entre 2 et 6 log UI/mL avec un  $R^2 > 0.95$ .

### C. Limite de quantification

Elle correspond à la plus petite valeur mesurée exprimée en concentration, fournie avec un niveau de fiabilité acceptable et d'inexactitude connue. Elle a été déduite de la linéarité. Elle est estimée à 100 UI/mL

## 8. Contamination

La contamination inter-échantillon s'appuie sur les études bibliographiques et sur une étude expérimentale. Ont été alternés 5 échantillons positifs à 9 log UI/mL pour le BKV et 5 négatifs : on note une absence de contamination inter-échantillons vérifiée sur les 3 AltoStar® AM16 du laboratoire.

## 9. Comparaison de méthodes

Il s'agit de comparer l'ancien kit RealStar® HEV RT-PCR 2.0 au nouveau kit AltoStar® HEV RT-PCR 1.5. Les résultats sont affichés dans le tableau suivant :

		RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0	
		POSITIF	NEGATIF
AltoStar® HEV RT-PCR Kit 1.5	POSITIF	55	0
	NEGATIF	0	20

La sensibilité et la spécificité du diagnostic obtenues à l'aide du kit AltoStar® HEV RT-PCR Kit 1.5 par rapport au kit RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 étaient de 100%.

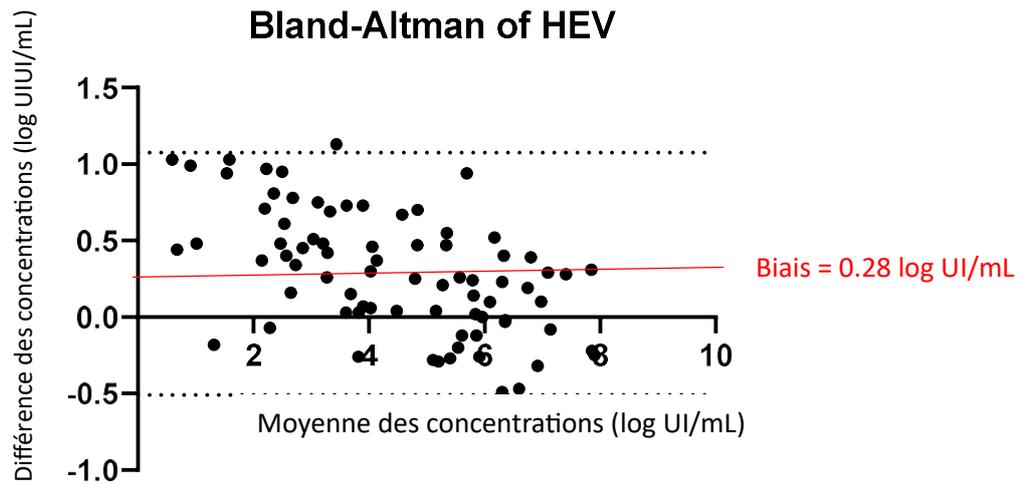
### A. Analyse de la concordance des résultats qualitatifs

La cible idéale est de 100%. Une concordance de 97.5% a été retrouvée pour les 81 plasmas et 10 selles testés avec la précédente technique. Deux échantillons faiblement positifs n'ont pas été détectés par la nouvelle technique (avec des concentrations de 1.41 log UI/mL et de 1.64 log UI/mL respectivement) : peut-être s'agit-il d'un problème de stabilité lié à la congélation.

### B. Analyse de la concordance des résultats quantitatifs

Le coefficient de Spearman calculé est de  $\rho=0.98$  soit proche de 1 : il n'y a pas de différences significatives entre les deux techniques pour un même échantillon.

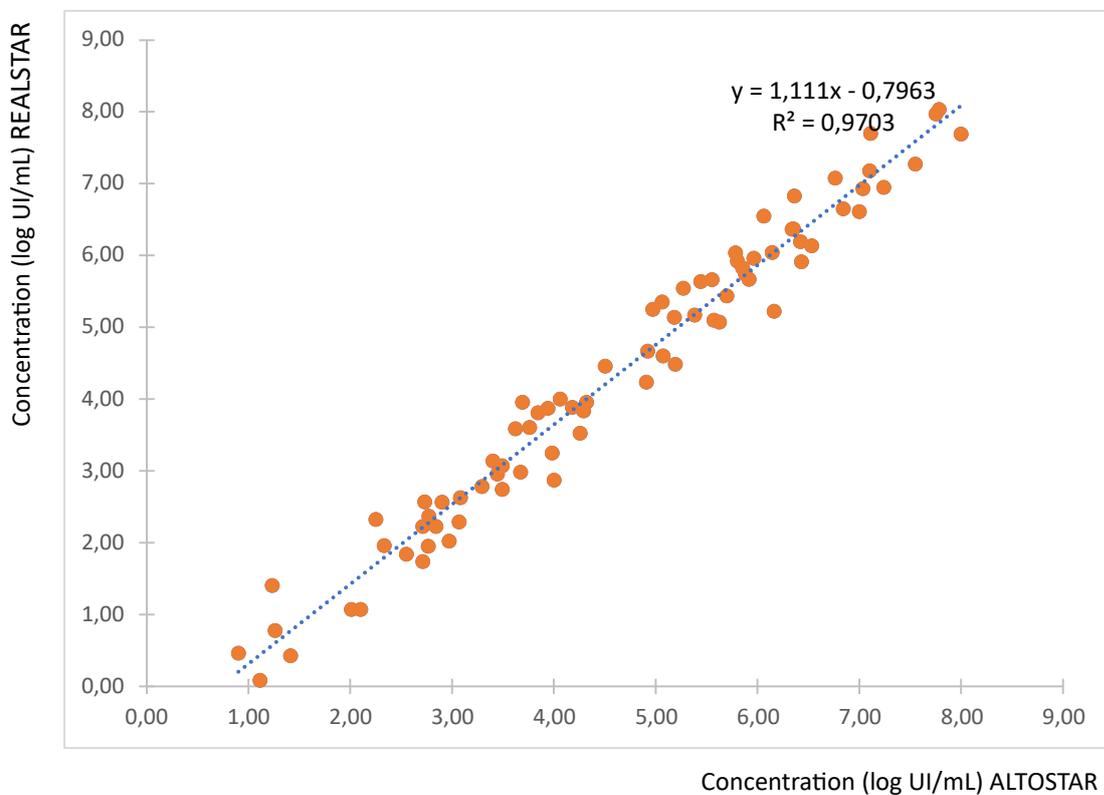
Le biais global (Realstar-Altostar) estimé grâce au Graph de Bland-Altman est de 0.28 log UI/mL. Celui-ci est considéré comme non significatif car inférieur à 0.5 log UI/mL :



**Figure 11** - Graphe de Bland-Altman

### C. Régression linéaire

L'équation de la droite de régression obtenue est donnée sur la figure ci-dessous. La pente est proche de 1 et l'ordonnée à l'origine proche de 0 : l'analyse est faite via le test t de Student. En conclusion : les deux techniques sont fortement corrélées.



**Figure 12** - Droite de régression linéaire Altostar/Realstar

## Discussion

Les paramètres testés au laboratoire répondent aux critères de la validation de méthode selon la norme 15189. La répétabilité est conforme avec un écart-type bien inférieur à celui considéré comme pouvant présenter une conséquence clinique en virologie ( $>0.5 \log \text{ UI/mL}$ ). Les données de reproductibilité, de justesse, d'exactitude (via le calcul du z-score) et d'incertitude sont conformes. La linéarité est vérifiée avec un  $R^2 > 0.95$  ainsi que l'absence de contamination inter-échantillons. Enfin, les données de comparaison de méthode (biais global de Bland-Altman, coefficient de corrélation de Spearman et coefficient de corrélation linéaire) prouvent que les deux techniques sont fortement corrélées. Il n'y a pas d'impact sur le suivi des charges virales et donc pas d'informations à donner aux cliniciens.

L'infection par le VHE est très répandue dans le monde, que ce soit dans les pays en développement ou industrialisés. Face aux complications qu'elle peut entraîner (personnes à risques) et à ses possibilités de transmission parentérale, il paraît indispensable d'avoir des outils de biologie moléculaire performants pour le diagnostic. Le kit ALTOSTAR® HEV RT-PCR, comparativement au kit RealStar® HEV RT-PCR d'Altona Diagnostics propose une meilleure limite de détection (7.6 UI/mL contre 30 UI/mL). Il s'agit de plus de l'une des meilleures actuellement recensée par comparaison notamment à celles indiquées dans une étude de Gallien *et al.* Celle-ci a évalué les limites de détection (LOD) de deux techniques d'amplification d'acides nucléiques automatisées : le test Cobas HEV opéré sur le système Cobas 6800 (Roche Molecular Systems) et le test Procleix HEV opéré sur le système Procleix Panther (Grifols Diagnostic Solutions). Ils doivent donc obéir à une stratégie de dépistage très sensible et de rendement conséquent. Des dilutions en série ont été réalisées à partir du même standard international (PEI 6329/10) : 40, 25, 15.6, 9.8, 6.1, 3.8, 2.4, 1.5, 0.93 et 0  $\log \text{ UI/mL}$  avec 24 répétitions pour chaque point. Les LOD à 95% calculées grâce à l'analyse Probit sont de 11.76 UI/mL [IC à 95%, 8.58-18.97] pour le test Cobas HEV et de 12.78 UI/mL [IC à 95%, 9.47-20.01] pour le test Procleix HEV (60). L'AltoStar® propose donc une technique à la fois qualitative de très bonne sensibilité et à la fois quantitative. Elle permet par ailleurs à l'issue du process de récupérer de l'ARN extrait pour les séquençages ultérieurs ce qui n'est pas le cas des systèmes Cobas ou Panther.

L'extraction opérée sur l'AM16 présente de plus un nombre de repasses des selles (lié aux inhibiteurs de PCR) bien inférieure à celle effectuée sur le MagNa Pure (9 repasses sur un an contre 229 pour le MagNa Pure). A cela s'ajoute les bénéfices en termes d'identitovigilance, de limitation des risques de contaminations, d'optimisation du temps de travail technique et du délai de rendu des résultats à J+1 avec le WorkFlow AltoStar® contre J+2 avec le kit RealStar.

Des limites existent pour la validation de méthode. Elles concernent les paramètres non testés au laboratoire et devant s'appuyer sur les données bibliographiques (s'agissant d'un examen de portée A) :

Pour la spécificité : pas de réactivité croisée avec CMV, EBV, HAV, HBV, HCV, HSV1 et 2, HIV1, B19 et VZV selon la notice.

Pour l'inclusivité : elle est de 100% selon la notice avec tous les échantillons du 1<sup>er</sup> panel international de génotypes HEV (#8578/13) distribué par le Paul Erlich Institute (génotypes 1a, 1e, 2a, 3b, 3c, 3e, 3f, 3 type lapin, 4c, 4g)

Ces données respectent les spécifications requises en virologie : soit 100% de sensibilité pour l'ensemble des génotypes existants et >99.5% de spécificité.

Les paramètres d'interférences, de robustesse et de stabilité des réactifs s'appuient également sur les données bibliographiques.

Concernant les interférences, l'impact de l'hémolyse et de l'héparine a tout de même pu être évaluée : l'analyse des résultats des contrôles internes obtenus sur un très grand nombre d'échantillons plasmatiques pour les techniques de détection et quantification des virus HIV, HBV, HCV et des virus EBV, CMV a montré l'absence d'inhibition de la PCR en cas d'hémolyse et de présence d'héparine respectivement.

Une autre limite à soulever du kit ALTOSTAR® HEV RT-PCR dont les amorces sont spécifiques du genre *Paslahepevirus* est de ne pas pouvoir détecter la souche du rat *Rocahepevirus rattii* à l'origine d'hépatites E émergentes et dont la répartition est mondiale (cas identifiés en Chine (61), en Espagne (62) et au Canada notamment (63)).

En conclusion, le kit ALTOSTAR® HEV RT-PCR paraît optimal pour le diagnostic et le suivi de patients atteints de forme aiguë ou chronique d'hépatite E du fait de ses aspects techniques (validation de méthode) et pratiques (fluidité de prise en charge des échantillons, optimisation du temps de travail technique et du délai de rendu des résultats). Il fera l'objet d'une publication ultérieure mettant en relief ses avantages et ses inconvénients.

## Bibliographie

1. Khuroo MS. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis: Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am J Med.* 1980;68(6):818-24.
2. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, et al. Evidence for a Virus in Non-A, Non-B Hepatitis Transmitted via the Fecal-Oral Route. *Intervirology.* 2008;20(1):23-31.
3. Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, Luk KC, Young LM, Fry KE, et al. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science.* 1990;247(4948):1335-9.
4. Kamar N, Izopet J, Pavio N, Aggarwal R, Labrique A, Wedemeyer H, et al. Hepatitis E virus infection. *Nat Rev Dis Primer.* 2017;3:17086.
5. Izopet J, Lhomme S, Abravanel F, Roque AM, Kamar N. Le virus de l'hépatite E. *Presse Médicale.* 2015;44(3):328-32.
6. Lhomme S, Abravanel F, Capelli N, Marion O, El Costa H, Jabrane-Ferrat N, et al. [Hepatitis E virus: from the infected organism to the cellular response]. *Viol Montrouge Fr.* 2018;22(5):239-50.
7. Yin X, Ambardekar C, Lu Y, Feng Z. Distinct Entry Mechanisms for Nonenveloped and Quasi-Enveloped Hepatitis E Viruses. *J Virol.* 2016;90(8):4232-42.
8. Fieulaine S, Tubiana T, Bressanelli S. De novo modelling of HEV replication polyprotein: Five-domain breakdown and involvement of flexibility in functional regulation. *Virology.* 2023;578:128-40.
9. Ankavay M, Montpellier C, Sayed IM, Saliou JM, Wychowski C, Saas L, et al. New insights into the ORF2 capsid protein, a key player of the hepatitis E virus lifecycle. *Sci Rep.* 2019;9(1):6243.
10. Buisson Y. What are we waiting for to vaccinate against hepatitis E ? *Science directe.* 2017. Consulté le 26 sept 2023. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001407919304522>
11. Nair VP, Anang S, Subramani C, Madhvi A, Bakshi K, Srivastava A, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Induced Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus. *PLoS Pathog.* 2016;12(4):e1005521.
12. Smith DB, Simmonds P et al. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol.* 2014;95(10):2223-32.
13. OMS. Principaux repères sur l'hépatite E. 2023. Consulté le 24 août 2023. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>

14. SantéPubliqueFrance. Hépatite E. 2019. Consulté le 24 août 2023. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/hepatites-virales/hepatite-e/la-maladie/#tabs>
15. Desai AN, Mohareb AM, Elkarsany MM, Desalegn H, Madoff LC, Lassmann B. Viral Hepatitis E Outbreaks in Refugees and Internally Displaced Populations, sub-Saharan Africa, 2010–2020. *Emerg Infect Dis.* 2022;28(5):1074-6.
16. Larrue H, Abravanel F, Péron JM. Hepatitis E, what's the real issue? *Liver Int.* 2020;40(S1):43-7.
17. Ranger-Rogez S, Alain S, Denis F. [Hepatitis viruses: mother to child transmission]. *Pathol Biol.* 2002;50(9):568-75.
18. Jilani N, Das BC, Husain SA, Baweja UK, Chattopadhyaya D, Gupta RK, et al. Hepatitis E virus infection and fulminant hepatic failure during pregnancy. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22(5):676-82.
19. Rayis DA, Jumaa AM, Gasim GI, Karsany MS, Adam I. An outbreak of hepatitis E and high maternal mortality at Port Sudan, Eastern Sudan. *Pathog Glob Health.* 2013;107(2):66-8.
20. Nicand E, Bigaillon C, Tessé S. Hépatite E : maladie émergente ? *Pathol Biol.* 2009;57(2):203-11.
21. Aspinall EJ, Couturier E, Faber M, Said B, Ijaz S, Tavoschi L, et al. Hepatitis E virus infection in Europe: surveillance and descriptive epidemiology of confirmed cases, 2005 to 2015. *Eurosurveillance.* 2017;22(26):30561.
22. Velavan TP, Pallerla SR, John R, Todt D, Steinmann E, Schemmerer M, et al. Hepatitis E: An update on One Health and clinical medicine. *Liver Int.* 2021;41(7):1462-73.
23. Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, Sato S, Fukai K, Kato T, et al. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion.* 2004;44(6):934-40.
24. Boxall E, Herborn A, Kochethu G, Pratt G, Adams D, Ijaz S, et al. Transfusion-transmitted hepatitis E in a 'nonhyperendemic' country. *Transfus Med.* 2006;16(2):79-83.
25. Colson P, Coze C, Gallian P, Henry M, De Micco P, Tamalet C. Transfusion-associated Hepatitis E, France. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(4):648-9.
26. Gallian P, Piquet Y, Assal A, Djoudi R, Chiaroni J, Izopet J, et al. Virus de l'hépatite E, implications en transfusion sanguine. *Transfus Clin Biol.* 2014;21(4):173-7.
27. Petrik J, Lozano M, Seed CR, Faddy HM, Keller AJ, Prado Scuracchio PS, et al. Hepatitis E. *Vox Sang.* 2016;110(1):93-103.

28. Mansuy JM, Gallian P, Dimeglio C, Saune K, Arnaud C, Pelletier B, et al. A nationwide survey of hepatitis E viral infection in French blood donors. *Hepatology*. 2016;63(4):1145-54.
29. Coulomb D. L'hépatite E désormais systématiquement recherchée dans les dons de sang. *Le Quotidien du Médecin*. 2023. Consulté le 25 août 2023. Disponible sur: <https://www.lequotidiendumedecin.fr/specialites/infectiologie/lhepatite-e-desormais-systematiquement-recherchee-dans-les-dons-de-sang>
30. Izopet J, Marion O, Kamar N, Lhomme S. Réplication du virus de l'hépatite E dans les cellules intestinales - Une nouvelle facette de ce virus dévoilée. *Médecine/sciences*. 2021;37(4):320-2.
31. Kenney SP, Meng XJ. Hepatitis E Virus Genome Structure and Replication Strategy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019;9(1):a031724.
32. Aggarwal R, Goel A. Natural History, Clinical Manifestations, and Pathogenesis of Hepatitis E Virus Genotype 1 and 2 Infections. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019;9(7):a032136.
33. Kamar N, Rostaing L, Legrand-Abravanel F, Izopet J. How Should Hepatitis E Virus Infection Be Defined in Organ-Transplant Recipients? *Am J Transplant*. 2013;13(7):1935-6.
34. Kamar N, Abravanel F, Lhomme S, Rostaing L, Izopet J. Hepatitis E virus: chronic infection, extra-hepatic manifestations, and treatment. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015;39(1):20-7.
35. Kamar N, Selves J, Mansuy JM, Ouezzani L, Péron JM, Guitard J, et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med*. 2008;358(8):811-7.
36. Williams TP, Kasorndorkbua C, Halbur PG, Haqshenas G, Guenette DK, Toth TE, et al. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol*. 2001;39(9):3040-6.
37. Liu P, Bu QN, Wang L, Han J, Du RJ, Lei YX, et al. Transmission of hepatitis E virus from rabbits to cynomolgus macaques. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(4):559-65.
38. Kamar N, Izopet J, Cintas P, Garrouste C, Uro-Coste E, Cointault O, et al. Hepatitis E virus-induced neurological symptoms in a kidney-transplant patient with chronic hepatitis. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2010;10(5):1321-4.
39. Smith DB, Izopet J, Nicot F, Simmonds P, Jameel S, Meng XJ, et al. Update: proposed reference sequences for subtypes of hepatitis E virus (species Orthohepevirus A). *J Gen Virol*. 2020;101(7):692-8.
40. Bose PD, Das BC, Hazam RK, Kumar A, Medhi S, Kar P. Evidence of extrahepatic replication of hepatitis E virus in human placenta. *J Gen Virol*. 2014;95(Pt 6):1266-71.

41. Belbézier A, Lagrange E, Bouillet L. Trouble neurologique et hépatite E : revue de la littérature. *Rev Médecine Interne*. 2018;39(11):842-8.
42. Kamar N, Mansuy JM, Esposito L, Legrand-Abravanel F, Peron JM, Durand D, et al. Acute hepatitis and renal function impairment related to infection by hepatitis E virus in a renal allograft recipient. *Am J Kidney Dis*. 2005;45(1):193-6.
43. Kamar N, Weclawiak H, Guilbeau-Frugier C, Legrand-Abravanel F, Cointault O, Ribes D, et al. Hepatitis E virus and the kidney in solid-organ transplant patients. *Transplantation*. 2012;93(6):617-23.
44. Li Y, Qu C, Yu P, Ou X, Pan Q, Wang W. The Interplay between Host Innate Immunity and Hepatitis E Virus. *Viruses*. 2019;11(6):541.
45. Feng Z, Lemon SM. Innate Immunity to Enteric Hepatitis Viruses. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019;9(3):a033464.
46. Abravanel F, Barragué H, Dörr G, Sauné K, Péron JM, Alric L, et al. Conventional and innate lymphocytes response at the acute phase of HEV infection in transplanted patients. *J Infect*. 2016;72(6):723-30.
47. Sayed IM, Verhoye L, Montpellier C, Abravanel F, Izopet J, Cocquerel L, et al. Hepatitis E Virus (HEV) Open Reading Frame 2 Antigen Kinetics in Human-Liver Chimeric Mice and Its Impact on HEV Diagnosis. *J Infect Dis*. 2019;220(5):811-9.
48. Brown A, Halliday JS, Swadling L, Madden RG, Bendall R, Hunter JG, et al. Characterization of the Specificity, Functionality, and Durability of Host T-Cell Responses Against the Full-Length Hepatitis E Virus. *Hepatology*. 2016;64(6):1934-50.
49. Suneetha PV, Pischke S, Schlaphoff V, Grabowski J, Fytilli P, Gronert A, et al. Hepatitis E virus (HEV)-specific T-cell responses are associated with control of HEV infection. *Hepatology*. 2012;55(3):695-708.
50. Sanchez-Fueyo A, Markmann JF. Immune Exhaustion and Transplantation. *Am J Transplant*. 2016;16(7):1953-7.
51. Roque-Afonso A. Hépatite E. *FMC-HGE*. 2016. Consulté le 5 sept 2023. Disponible sur: [https://www.fmcgastro.org/textes-postus/no-postu\\_year/hepatite-e/](https://www.fmcgastro.org/textes-postus/no-postu_year/hepatite-e/)
52. Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Xia NS, Ijaz S, Izopet J, et al. Hepatitis E. *The Lancet*. 2012;379(9835):2477-88.
53. Trémeaux P, Lhomme S, Chapuy-Regaud S, Peron JM, Alric L, Kamar N, et al. Performance of an antigen assay for diagnosing acute hepatitis E virus genotype 3 infection. *J Clin Virol*. 2016;79:1-5.
54. AFEF. Hépatite E. 2020. Consulté le 5 sept 2023. Disponible sur: <https://afef.asso.fr/la-maladie/maladies/hepatite-e/>

55. Dalton HR, Kamar N, Baylis SA, Moradpour D, Wedemeyer H, Negro F. EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. *J Hepatol*. 2018;68(6):1256-71.
56. Kamar N, Lhomme S, Abravanel F, Cointault O, Esposito L, Cardeau-Desangles I, et al. An Early Viral Response Predicts the Virological Response to Ribavirin in Hepatitis E Virus Organ Transplant Patients. *Transplantation*. 2015;99(10):2124.
57. Abravanel F, Lhomme S, Rostaing L, Kamar N, Izopet J. Protracted Fecal Shedding of HEV During Ribavirin Therapy Predicts Treatment Relapse. *Clin Infect Dis*. 2015;60(1):96-9.
58. Kamar N, Abravanel F, Behrendt P, Hofmann J, Pageaux GP, Barbet C, et al. Ribavirin for Hepatitis E Virus Infection After Organ Transplantation: A Large European Retrospective Multicenter Study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2020;71(5):1204-11.
59. Zhu FC, Zhang J, Zhang XF, Zhou C, Wang ZZ, Huang SJ, et al. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. 11 2010;376(9744):895-902.
60. Gallian P, Couchouron A, Dupont I, Fabra C, Piquet Y, Djoudi R, et al. Comparison of hepatitis E virus nucleic acid test screening platforms and RNA prevalence in French blood donors. *Transfusion*. 2017;57(1):223-4.
61. Situ J, Hon-Yin Lo K, Cai JP, Li Z, Wu S, Hon-Kiu Shun E, et al. An immunoassay system to investigate epidemiology of Rocahepevirus ratti (rat hepatitis E virus) infection in humans. *JHEP Rep Innov Hepatol*. 2023;5(9):100793.
62. Rivero-Juarez A, Frias M, Perez AB, Pineda JA, Reina G, Fuentes-Lopez A, et al. Orthohepevirus C infection as an emerging cause of acute hepatitis in Spain: First report in Europe. *J Hepatol*. 2022;77(2):326-31.
63. Andonov A, Robbins M, Borlang J, Cao J, Hatchette T, Stueck A, et al. Rat Hepatitis E Virus Linked to Severe Acute Hepatitis in an Immunocompetent Patient. *J Infect Dis*. 2019;220(6):951-5.

## SERMENT DE GALIEN

*En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :*

*- D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances*

*- 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 Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement :*

*- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité*

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

*- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession*

*- De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens*

*- De coopérer avec les autres professionnels de santé*

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

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

*Date*

*Signature de l'étudiant et du Président du jury*

**AUTEUR : SOTTIL PAULINE**

---

**TITRE : PERFORMANCE DU KIT ALTOSTAR HEV RNA POUR DETECTION ET LA QUANTIFICATION DE L'ARN DU VIRUS DE L'HEPATITE E**

**DIRECTEUR DE THESE : ABRAVANEL FLORENCE**

**HOPITAL PIERRE PAUL RIQUET, 26 OCTOBRE 2023**

---

**Résumé en français :**

Le virus de l'hépatite E est répandu dans le monde, à la fois dans les pays en développement et les pays industrialisés. Même s'il est à l'origine d'infections asymptomatiques la plupart du temps, il peut tout de même causer des hépatites aiguës et chroniques ainsi que des manifestations extra-hépatiques chez les sujets à risque. Il est donc important d'avoir des outils de biologie moléculaires performants pour le diagnostic et le suivi de cette infection, pratiques à utiliser en routine et disposant d'un délai de rendu de résultats optimal. C'était l'objet de cette étude : évaluer le kit Altostar® 1.5 RT-PCR HEV récemment utilisé au laboratoire de Toulouse et le comparer au kit Realstar® 2.0 RT-PCR HEV précédemment utilisé.

**Titre et résumé en Anglais : PERFORMANCE OF THE ALTOSTAR HEV RNA KIT FOR DETECTION AND QUANTIFICATION OF HEPATITIS E VIRUS RNA**

The hepatitis E virus is widespread throughout the world, in both developing and industrialized countries. Although it causes asymptomatic infections most of the time, it can nevertheless cause acute and chronic hepatitis, as well as extra-hepatic manifestations in subjects at risk. It is therefore important to have high-performance molecular biology tools for diagnosing and monitoring this infection, which are practical to use on a routine basis and offer optimum turn-around times for results. This was the aim of this study: to evaluate the Altostar® 1.5 RT-PCR HEV kit recently used in the Toulouse laboratory and compare it with the Realstar® 2.0 RT-PCR HEV kit previously used.

**DISCIPLINE administrative : Virologie**

**MOTS-CLES : Virus de l'Hépatite E, biologie moléculaire, diagnostic et suivi.**

**INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :**

**Institut Fédératif de Biologie – CHU Toulouse Purpan**

**Laboratoire de Virologie**

330 Av. de Grande Bretagne 31300 Toulouse.

**Directeur de thèse : Dr Abravanel Florence**