Rapport annuel d'activité

2018

Centre de national de référence

Virus des hépatites à transmission entérique

Année d'exercice

2017

Préambule

Résumé analytique (en français et en anglais)

Le CNR des virus des hépatites à transmission entérique a été renouvelé pour 5 ans (2017-2021) sous la direction du Pr Jacques Izopet en charge de l'hépatite E, à Toulouse en association avec le Pr Anne-Marie Roque-Afonso en charge de l'hépatite A, à Villejuif.

Concernant le VHA, 2017 a été marquée par une augmentation de l'incidence avec près de 3400 cas recensés par la Déclaration Obligatoire (DO), concernant des hommes dans près de 90% des cas. La surveillance des souches a montré que 3 souches virales, impliquées à l'échelle européenne dans des transmissions au sein de la communauté homosexuelle masculine (HSH), étaient associées à cette sur-incidence : 1224 cas diagnostiqués en 2017 ont été confirmés au CNR dont 1029 (84%) associés à ces souches, observés plus souvent chez des hommes et chez des sujets plus âgés que les cas associés aux souches non épidémiques. Ces derniers avaient les mêmes caractéristiques en termes d'âge et de sex ratio que les cas de 2016. Une modification significative de la morbi-mortalité associée à l'hépatite A est donc attendue en 2017, en raison notamment de l'âge plus élevé des cas. Le pourcentage de cas hospitalisés recensé par la DO a été plus élevé que les années précédentes et des formes sévères (présentant un taux de prothrombine <50%) ont représenté au moins 1.2% des cas confirmés au CNR, ce qui est une estimation basse en raison d'un recueil très peu exhaustif des données cliniques. Cette épidémie a montré l'insuffisance de couverture vaccinale de la population HSH pourtant ciblée par des recommandations et a été difficile à contrôler notamment du fait des tensions d'approvisionnement en vaccins.

En 2017, le CNR VHE a réalisé l'évaluation des performances de nouveaux tests sérologiques (VIDAS IgG et IgM VHE, Biomérieux) et moléculaires pour la détection-quantification de l'ARN VHE (test Cobas 6800, Roche et test Realstar HEV RT-PCR version 2, Altona). Le CNR VHE, en collaboration avec ses partenaires (Centres hospitaliers, laboratoires privés, Etablissement Français du sang) a répertorié 2245 cas d'hépatite E, chiffre similiaire à celui de 2016. L'âge moyen des sujets diagnostiqués était de 54.8±19.9 ans, avec une majorité d'hommes (60.6%).

Dans le cadre de la surveillance des souches circulant en France, le CNR a caractérisé 628 souches de VHE appartenant très majoritairement au génotype 3 (96%). Les sous-types impliqués étaient principalement le sous-type 3f (45%) et les sous-types 3chi (39%). Quatre cas de transmissions par transfusion et 3 cas de transmission par greffe d'organe ont été investigués.

The Reference Centre for enterically transmitted hepatitis viruses has been renewed for 5 years (2017-2021) under the direction of Professor Jacques Izopet in charge of hepatitis E in Toulouse, in association with Professor Anne-Marie Roque-Afonso in charge of the hepatitis A, in Villejuif.

Regarding HAV, 2017 was marked by an increase in incidence with nearly 3,400 cases identified by the mandatory declaration, of whom nearly 90% were men. Strain surveillance has shown that 3 viral strains, involved at the European level in transmissions within the male homosexual community (MSM), were associated with this over-incidence: 1224 cases diagnosed in 2017 were confirmed, including 1029 (84%) associated with these strains, observed more often in men and in older subjects than cases associated with non-epidemic strains. The latter had the same age and sex ratio characteristics as the cases confirmed in 2016. A significant change in the morbidity and mortality associated with hepatitis A is therefore expected in 2017, mainly because of the older age. The percentage of hospitalized cases identified by mandatory notification was higher than in previous years and severe forms (prothrombin time <50%) accounted for at least 1.2% of confirmed cases, which is a low estimate due to the limited availability of clinical data. This outbreak has shown an insufficient vaccine coverage of the MSM population despite targeted recommendations, and has been difficult to control, mainly due to vaccine shortage

In 2017, the French Reference Center for HEV has evaluated the performance of serological assays (VIDAS IgG and IgM VHE, Biomérieux) and molecular assays for the detection and quantification of HEV RNA (Roche Cobas 6800 assay and Altona Realstar HEV RT-PCR version 2 assay). The reference center, in collaboration with his partners (hospitals, private labs and Etablissement Français du sang) has listed 2245 cases of hepatitis E infections. Their mean age was 54.8±19.9 years, with a majority reported in male (60.6%).
In the context of the survey of HEV circulating strains, the reference center has characterized 628 HEV strains who belongs mainly to genotype 3 (96%). The major subtypes were subtype 3f (45%) and subtype 3chi (39%). Four cases of transmission by blood transmission and 3 cases of transmission by organ graft were investigated.

1 Missions et organisation du CNR

Pour le VHA, un technicien, un ingénieur et 2 biologistes ont été impliqués dans le fonctionnement du CNR. Le Pr Anne Marie Roque-Afonso coordonne le CNR VHA, le Dr Lina Mouna assure la fonction de responsable adjoint. Le Dr Laure Izquierdo participe également à l'activité du CNR. Le CNR VHA est accrédité selon la norme ISO 15189 pour les techniques sérologiques.

Pour le VHE, un ingénieur et trois biologistes ont été impliqués dans le fonctionnement du CNR VHE : Martine Dubois, Dr Florence Abravanel, Dr Sébastien Lhomme et Pr Jacques Izopet. Le Pr Jacques Izopet coordonne le CNR des virus des hépatites à transmission entérique et les Dr F Abravanel et S Lhomme assurent les fonctions de responsables adjoints.
Le CNR VHE est accrédité selon la norme ISO 15189 pour les techniques sérologiques, la détection et la quantification de l'ARN VHE dans le sang, les selles et le liquide céphalo-rachidien ainsi que le typage par séquençage de la région ORF2.

2 Activités d'expertise

- **Evaluation des tests sérologiques VIDAS IgG et IgM VHE (Biomérieux)**
- **Evaluation des tests de détection - quantification de l'ARN VHE Cobas 6800 (Roche) et Realstar HEV RT-PCR version 2 (Altona)**
- **Caractérisation de 628 souches de VHE transmises par les partenaires du CNR (Centres hospitaliers, laboratoires privés, Etablissement Français du sang)**

Les techniques disponibles au CNR sont présentées en annexe 2.

2.1 Évolutions des techniques

Pour le CNR VHA, la charge virale est déterminée depuis 2017 grâce à la trousse RealStar® HAV RT-PCR Kit (Altona Diagnostics) avec une gamme externe de quantification en UI/ml. Le typage viral par analyse des génomes complets est en cours de développement.

En 2017, le CNR VHE a accrédité la technique de RT-PCR en temps réel Realstar ARN HEV version 2 d'Altona. Il utilise depuis janvier 2018 cette technique pour quantifier l'ARN HEV en Unité Internationales par ml.
Le CNR VHE a développé une technique de séquençage haut débit permettant le séquençage de génomes complets du VHE (technologie Pacbio).

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses

- Le CNR VHA a évalué les a trousse de détection de l'ARN VHA, RealStar® HAV RT-PCR Kit (Altona Diagnostics). Celle-ci a montré une sensibilité plus grande que la technique utilisée précédemment au CNR pour le screening avant typage (Coudray-Meunier C, BMC Microbiology 2014) avec une détection de 100% des échantillons présentant 10 UI/ml.

- Le CNR VHE a évalué les performances des trousses sérologiques VIDAS® IgG et IgM VHE de Biomérieux. La sensibilité a été évaluée chez des patients immunocompétents et immunodéprimés en phase aiguë de l'infection (IgM VHE positif avec le test Wantai et ARN VHE positif) ou en phase plus tardive (IgM VHE positif avec le test Wantai et ARN VHE négatif) (Voir tableau ci-dessous). La spécificité a été évaluée pour des patients négatifs pour les anticorps anti-VHE et l'ARN viral.

Table : Performances cliniques de la trousse VIDAS

VIDAS IgM	Patients immunocompétents		Patients immunodéprimés	
Sensibilité à la phase aigue	97.7%	[91.8 ; 99.7]	78.9%	[66.1 ; 87.5]
Sensibilité à la phase tardive	59.2%	[47.5 ; 69.8]	77.8%	[61.9 ; 88.3]
Spécificité	99.3%	[97.6 ; 99.2]	99.1 %	[94.9 ; 99.9]

VIDAS IgG	Patients immunocompétents		Patients immunodéprimés	
Sensibilité à la phase aigue	95.29%	[88.39 ; 98.70]	66.67%	[53.72 ; 77.51]
Sensibilité à la phase tardive	91.55%	[82.76 ; 96.07]	88.89%	[74.69 ; 95.59]
Spécificité	96.70%	[94.01 ; 98.41]	96.26%	[90.70 ; 98.97]

- Le CNR VHE a évalué 2 techniques de détection de l'ARN VHE : Roche Cobas 6800 et Realstar HEV RNA d'Altona Version 2.

Le CNR VHE a évalué les performances du test ARN HEV de Roche, test de détection qualitative de l'ARN VHE sur l'automate Cobas 6800, en comparant les résultats avec la technique de PCR du CNR accréditée ISO15189. La sensibilité analytique a été déterminée en testant des réplicats de dilutions de souches de référence. Le test Cobas 6800 VHE a une excellente limite de détection (Table ci-dessous).

L'inclusivité a été évaluée avec 154 échantillons de plasma contenant différents HEV génotypes: génotype 3a, 3chi, 3e, 3f, 3 lapin, génotype 2. Quatre échantillons positifs avec la PCR du CNR étaient négatifs avec le test Cobas : il s'agissait de 3 échantillons de génotype 3 avec des virémies faibles (<1500 c/ml) et un échantillon de génotype 3 lapin avec une virémie élevée. L'inclusivité du test devra être vérifiée sur des virus de génotype 3 lapin et des génotypes 1 et 4. L'absence de contamination inter-échantillon a été également vérifiée. De plus, 28 échantillons de selles positives avec le test du CNR ont été testés sur le Cobas 6800 : 25 étaient positifs.

Le CNR VHE a évalué les performances du test Realstar ARN HEV version 2 d'Altona, test de détection quantitatif de l'ARN VHE en comparant les résultats avec la technique de PCR du CNR accréditée ISO15189. La sensibilité analytique a été déterminée en testant des réplicats de dilutions de souches de référence. Le test Realstar ARN VHE a une excellente limite de détection (Table ci-dessous).

L'inclusivité a été évaluée avec 93 échantillons de plasma contenant différents HEV génotypes: génotype 3a, 3chi, 3e, 3f, 3 lapin. Les 93 échantillons étaient positifs avec le test Altona et les valeurs quantitatives obtenues avec le test Altona étaient corrélées à la technique du CNR. De plus, 23 échantillons de selles positives avec le test du CNR ont été détectés avec le test Altona.

Table : Limite de détection des tests ARN VHE

	Cobas 6800 Roche UI/ml, [IC95%]	Altona V2 UI/ml, [IC95%]
Genotype 3a	26,6 (21,4-36,9)	12 (9,1 – 20,2)
Genotype 3c	6,3 (5,2 – 8,6)	23,7 (17 – 44)
Genotype 3f	10,5 (8,6 – 14,2)	26,9 (20,8 – 42)

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Aucune en 2017.

2.4 Collections de matériel biologique

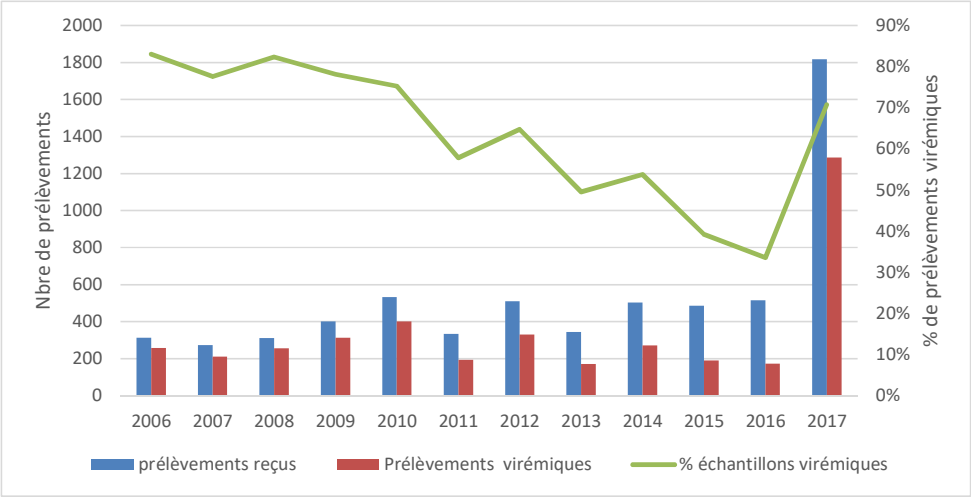
La collection de sérums et selles du CNR VHA intègre le CRB Paris Sud à l'année N+1. La collection actuelle comporte des échantillons collectés lors de la période 2013-2016 dont le volume permet une cession pour des analyses complémentaires, ou un éventuel projet de recherche. La cession de matériel est soumise à projet et nécessite l'approbation du Copil du CRB. Les échantillons de la période 2006-2015 sont en cours d'inventaire en vue de leur intégration au CRB.

Le CNR VHE dispose d'une collection clinique de plus de 1000 sérums ou selles contenant de l'ARN VHE dont la souche a été typée et stockées selon les règles du CRB du CHU de Toulouse (certifié AFNOR selon la norme NF S96-900) ainsi que d'une collection de surnageant de culture de souches cliniques (3f et 3c).
Le CNR VHE a fourni des échantillons de sérum positifs en IgM VHE au CH de Colmar pour la validation des tests sérologiques.

2.5 Activités d'expertise

HEPATITE A

En 2017, le CNR VHA a reçu 1818 échantillons vs. 516 en 2016. Parallèlement le pourcentage d'échantillons présentant un ARN viral détectable a augmenté : après son point le plus bas en 2016 à 34%, ce pourcentage atteint 71% en 2017.

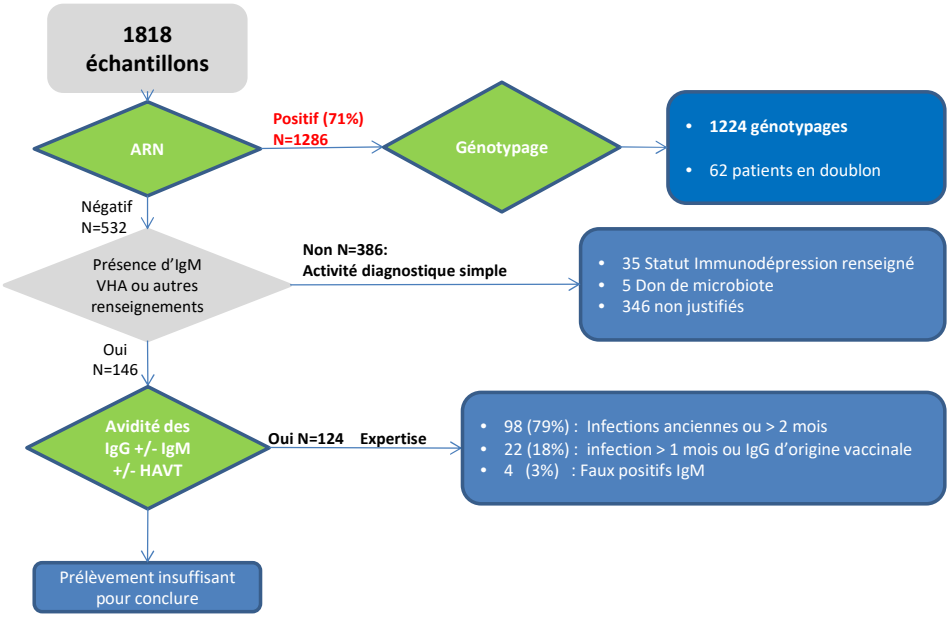


Nombre d'échantillons reçus et fréquence des échantillons virémiques (2006-2017)

La démarche diagnostique appliquée pour les 1818 échantillons (des sérums dans plus de 98% des cas) est présentée ci-dessous. Les analyses disponibles (en vert sur le diagramme) sont Détection de l'ARN viral (délai de rendu 1 sem.), Génotypage (1 à 2 sem.), Avidité des IgG VHA (1 mois), Anticorps totaux VHA et IgM VHA (1 sem.).

- 1286 échantillons (71%) avaient un ARN viral détectable, correspondant à 1224 patients différents dont les souches ont été génotypées : échantillons adressés dans le cadre de l'observatoire des souches, de l'investigation des cas groupées par les ARS, ou d'expertises du don du sang par l'EFS.
- 386 échantillons (21%) ont été adressés pour simple diagnostic, ou sans renseignements, et provenaient essentiellement d'Ile de France (77.2%). Aucun cas d'hépatite A n'a été identifié dans ce contexte. La qualification du don de selles a représenté seulement 1.3% cette l'activité diagnostique.
- 146 échantillons (8%) présentaient des IgM détectables et un ARN viral indétectable. Il n'y avait pas de prélèvement pour conclure dans 22 cas (15%), l'avidité des IgG suggérait une infection ancienne, datant de plus d'un mois, ou des IgG vaccinales dans 120 cas (82%) et des faux positifs IgM, dans 4 cas (3%).

Si l'on considère tous les échantillons avec des IgM anti-VHA initialement détectables, seulement 9% ne correspondaient pas à des infections en cours, alors que ce pourcentage est habituellement autour de 25%



HEPATITE E

Prélèvements reçus au laboratoire de virologie du CHU de Toulouse

En 2017, le laboratoire de virologie du CHU de Toulouse a réalisé 7268 analyses sérologiques (+5% par rapport à 2016) et 6153 tests moléculaires (+0,6% par rapport à 2016) pour le diagnostic et la caractérisation des souches de VHE. Les échantillons analysés étaient originaires de patients issus de France métropolitaine ou des départements et régions d'outre-mer (Polynésie française, Réunion et Guadeloupe).

Les délais de rendu des résultats sont de 1 jour pour les tests sérologiques, 3 jours pour la détection-quantification de l'ARN VHE, et 10 jours pour le génotypage.

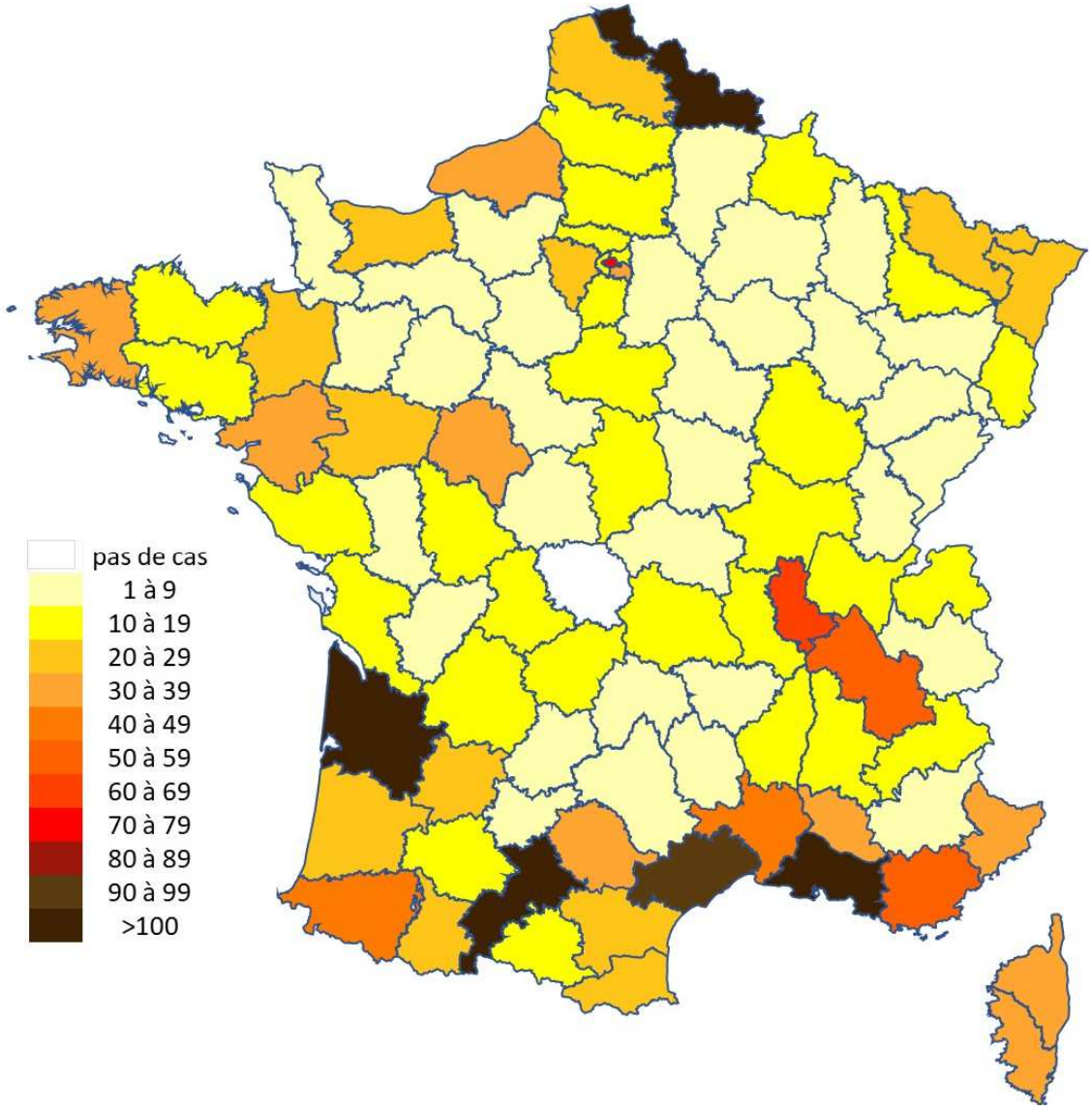
Origine des prescriptions	% sérologies	% tests moléculaires
CHU Toulouse	**72,8%**	**54,6%**
CH et CHU hors CHU Toulouse	**22%**	**27,7%**
EFS	**2,6%**	**5,5%**
Laboratoires privés	**2,5%**	**12,2%**

Prélèvements reçus par les autres laboratoires

L'Hôpital Paul Brousse à Villejuif a réalisé 7541 analyses sérologiques et 3363 tests moléculaires pour le diagnostic et la caractérisation des souches de VHE. Le laboratoire d'analyses spécialisées Cerba a réalisé 24253 analyses sérologiques et 873 PCR VHE pour des laboratoires privés de France ou des DOM-TOM. Le laboratoire d'analyses spécialisées Biomnis a réalisé 23752 tests IgM anti-VHE et 642 PCR VHE.

Synthèse : en 2017, environ 80 000 patients ont été testés et 2 245 cas d'hépatite E symptomatiques ont été diagnostiqués. La majorité des cas sont autochtones. L'âge moyen des sujets diagnostiqués était de 54.8±19.9 ans, avec une majorité d'hommes (60.6%). Ces infections sont survenues majoritairement chez des personnes immunocompétentes et dans 16,1% des cas chez des personnes immunodéprimées (transplantés d'organe solide 66,2%, patient d'hémato-oncologie sous chimiothérapie 22,5%, patients infectés par le VIH 3,8% ou recevant des immunothérapies, 7,5%). Douze hépatites sévères (TP<50%) conduisant au décès de 4 patients ont été répertoriées, ce qui représente 4.3% des cas pour lesquels l'information a été rapportée au CNR.

La répartition géographique des cas est illustrée dans la figure ci-dessous :


pas de cas
1 à 9
10 à 19
20 à 29
30 à 39
40 à 49
50 à 59
60 à 69
70 à 79
80 à 89
90 à 99
>100

L'évolution du diagnostic des cas d'hépatite E en France depuis 2002 est présentée dans le tableau ci-dessous :

	Nb patients testés	NB cas certains ou probables			% cas positifs parmi les échantillons testés
		Total	Importés	Autochtones	
2002	209	13	4	9	6,2
2003	155	14	11	3	9,0
2004	233	20	4	16	8,5
2005	327	39	19	20	11,9
2006	583	38	14	24	6,5
2007	1012	107	10	97	10,5
2008	1700	180	21	159	10,5
2009	2150	206	23	183	9,6
2010	2549	232	16	216	9,1
2011	3429	266	19	249	7,6
2012	17566	801	9	801	4,6
2013	35416	1851	3	1848	4,9
2014	44382	1825	12	1813	4,1
2015	66000	2122	4	2118	3,5
2016	76000	2302	10	2292	3
2017	80000	2245	26	2219	2,8

2.6 Activités de séquençage

HEPATITE A

Le CNR VHA n'utilise pas en routine les techniques NGS, mais une évolution vers un typage génome entier sur une fraction des souches adressées aux CNR est en projet. Le CNR aura accès à la plateforme de séquençage de l'oncogénétique du groupe hospitalier HUPS (séquenceur Illumina MiSeq). La question de l'expertise bioinformatique est encore en suspens.

Actuellement, le CNR fait appel systématiquement au séquençage Sanger pour le génotypage des souches à des fins de santé publique : surveillance et investigation d'épidémie. Celui-ci est actuellement réalisé après amplification et séquençage d'un fragment de 508 nucléotides de la région VP1/2A. La réaction de séquence est lue sur un séquenceur capillaire ABI 3130, mutualisé avec la plateforme d'oncogénétique. Le génotype est déterminé par analyse phylogénétique. Les séquences sont stockées dans le logiciel Bionumerics qui permet de comparer toute nouvelle souche à l'ensemble des souches préalablement identifiées.

Les séquences brutes (fluorogramme) et la database Bionumerics sont stockés sur un nas sécurisé hébergé par le groupe hospitalier, avec 2 sauvegardes journalières. Le dossier informatique a été déclaré à la CNIL (déclaration normale) sous le numéro 2170170. Une partie des séquences sous format fasta est partagée avec le réseau HAVNet.

En 2017, 1224 séquences ont été réalisées

HEPATITE E

Le CNR VHE dispose d'un accès à 3 types de plateformes de séquençage :
- séquençage Sanger
- séquençage haut débit sur la plateforme génomique/bio-informatique du pôle biologie du CHU de Toulouse fédérant les équipements Illumina et Life Technologies de 2 sites (Purpan et Langlade) et l'ensemble des besoins concernant le calcul, le stockage et l'archivage
- séquençage haut débit sur la plateforme génomique/bio-informatique de Genotoul (INRA) : équipements Illumina, Pacific Biosciences et Oxford Nanopores.

Le CNR VHE a accès à la cellule bio-informatique du pôle biologie constituée de 5 bio-informaticiens dont l'un est dédié aux projets d'infectiologie. Les outils utilisés sont des outils maison et libre accès. Les analyses phylogénétiques sont réalisées avec les logiciels standards (Clustal X2, PhyML, iTOL, Ugene, TreeView).

Le séquençage est utilisé dans le cadre d'investigation d'épidémies (4 enquêtes réalisées en 2017) et dans le cadre de la surveillance des souches circulantes (628 séquençages Sanger et 115 séquençages PacBio en 2017). Le séquençage Sanger a été réalisé de manière systématique (pas de sélection des souches) alors que le séquençage PacBio a été réalisé sur des échantillons pour lesquels la concentration d'ARN viral était supérieure à 5 log copies/ml.

Les séquences brutes obtenues ont été déposées dans deux bases de données fermées (celle du LBM du CHU de Toulouse et HEV Net, base de données internationale RIVM, Bilthoven, Pays-Bas). Les séquences utilisées pour les articles scientifiques ont été déposées dans GenBank.

3 Activités de surveillance

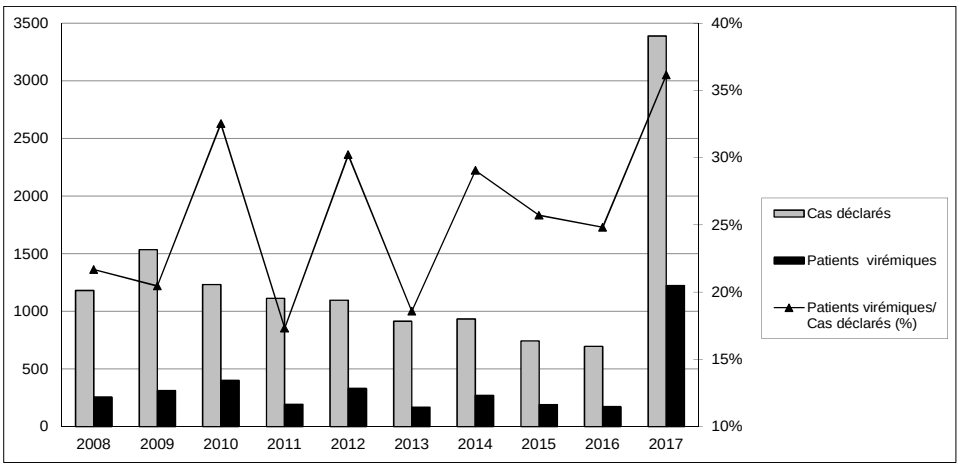
*Au début de ce chapitre, rappeler **dans un encadré** les éléments clefs de l'année en termes de surveillance.*

2017 a été marquée par une augmentation de l'incidence avec près de 3400 cas déclarés, concernant des hommes dans près de 90% des cas. La surveillance des souches a montré que 3 souches virales, impliquées à l'échelle européenne dans des transmissions au sein de la communauté homosexuelle masculine (HSH), étaient associées à cette surincidence : 1224 cas diagnostiqués en 2017 ont été confirmés dont 1029 (84%) associés à ces souches, observés plus souvent chez des hommes et chez des sujets plus âgés que les cas associés aux souches non épidémiques. Ces derniers avaient les mêmes caractéristiques en termes d'âge et de sex ratio que les cas de 2016. Une modification significative de la morbi-mortalité associée à l'hépatite A est donc attendue en 2017, en raison notamment de l'âge plus élevé des cas.
Le CNR VHE, en collaboration avec ses partenaires (Centres hospitaliers, laboratoires privés, Etablissement Français du sang) a répertorié 2245 cas d'hépatite E, chiffre similiaire à celui de 2016. Dans le cadre de la surveillance des souches circulant en France, le CNR a caractérisé 628 souches de VHE appartenant très majoritairement au génotype 3 (96%). Les sous-types impliqués étaient principalement le sous-type 3f (45%) et les sous-types 3chi (39%).

3.1 Description du réseau de partenaires

HEPATITE A

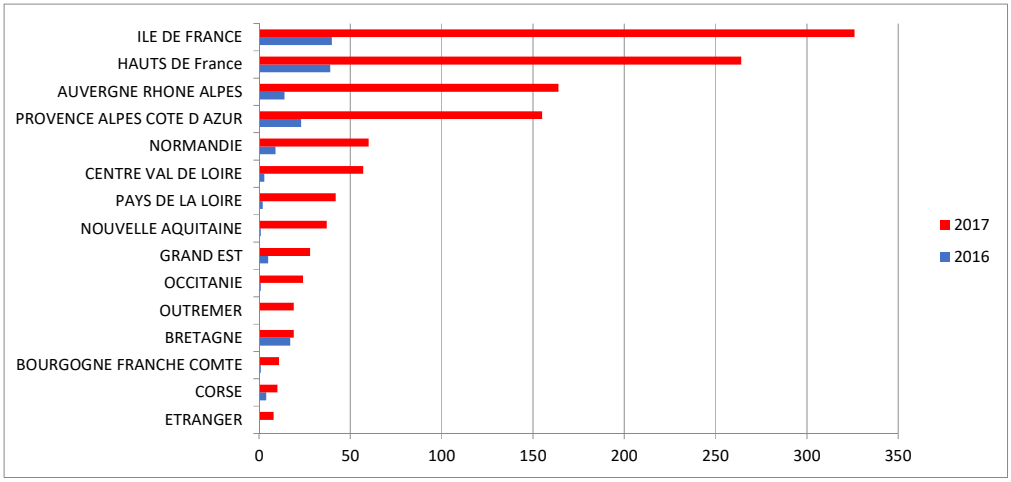
Hors investigations de cas groupés, l'envoi de sérums dans le cadre de l'observatoire des souches par des laboratoires publics ou privés est sur la base du volontariat. Entre 2006 et 2016, le nombre de souches analysées par rapport au nombre de cas déclarés a varié entre 17 et 33% et atteint 36% en 2017, sans qu'il soit possible de croiser les données pour raisons réglementaires. 2010, 2012 et 2017 ont été marquées par une recherche active de cas à la demande des ARS.



Nombre de patients virémiques par rapport au Nombre de cas déclarés (DO)

4 Répartition géographique des infections caractérisées au CNR

En 2017, 1224 patients virémiques ont été identifiés. Toutes les régions métropolitaines sont représentées, ainsi que la Réunion(Outremer).



Nombre de cas virémiques par région en 2016 et 2017

HEPATITE E

Le laboratoire de virologie de Toulouse travaille en collaboration avec les laboratoires de virologie des CHU, des centres hospitaliers généraux et des structures privées. Il réalise les PCR de détection - quantification de l'ARN VHE et assure la caractérisation des souches identifiées. C'est le cas des CHU d'Angers, Besançon, Brest, Nice, Nîmes, Poitiers, Saint-Etienne, Reims et Rouen.
D'autre part, les CHU de Bordeaux, Caen, Clermont-Ferrand, Dijon, Grenoble, Lille, Lyon, Montpellier, Nantes, Nancy, Rennes, Strasbourg et Tours réalisent les tests moléculaires localement et les échantillons positifs sont envoyés au laboratoire de virologie de Toulouse pour typage des souches.

Les laboratoires d'analyses spécialisées Biomnis et Cerba ont communiqué également le nombre de cas d'hépatite E identifiés dans leur laboratoire. Le laboratoire Cerba transmet les échantillons positifs pour quantification et caractérisation des souches lorsque les échantillons sont disponibles.

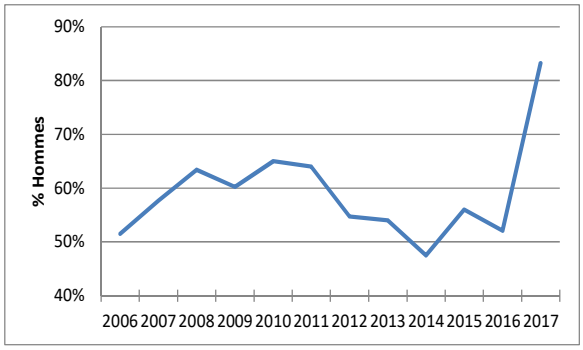
Le laboratoire de virologie de Paul Brousse a communiqué le nombre de cas d'hépatite E identifiés en 2017.

Le laboratoire de virologie du CHU de Marseille a également communiqué le nombre de cas d'hépatite E identifiés en 2017.

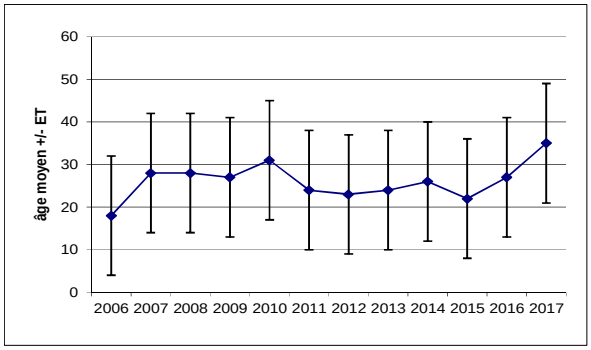
4.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

HEPATITE A

Les patients virémiques étaient de sexe masculin dans 83.2% des cas (pour une moyenne de 57% entre 2006 et 2016) et l'âge moyen significativement plus élevée qu'en 2016 35+/-14 ans vs. 27+/-19. Comme attendu du fait de cet âge plus élevé, le % de cas hospitalisés déclarés via la DO était plus élevé: 52% en 2017 vs. 43% sur la période 2006-2015.

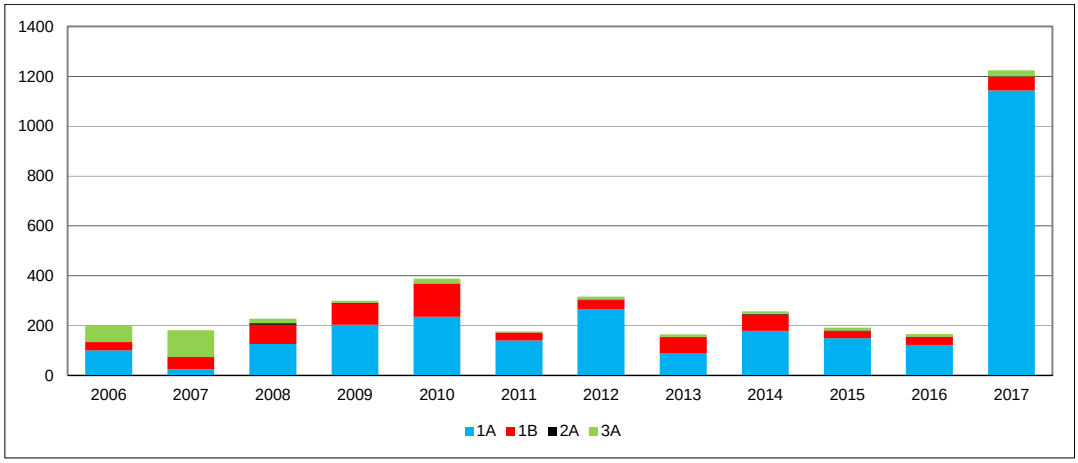


% d'Hommes parmi les infections virémiques



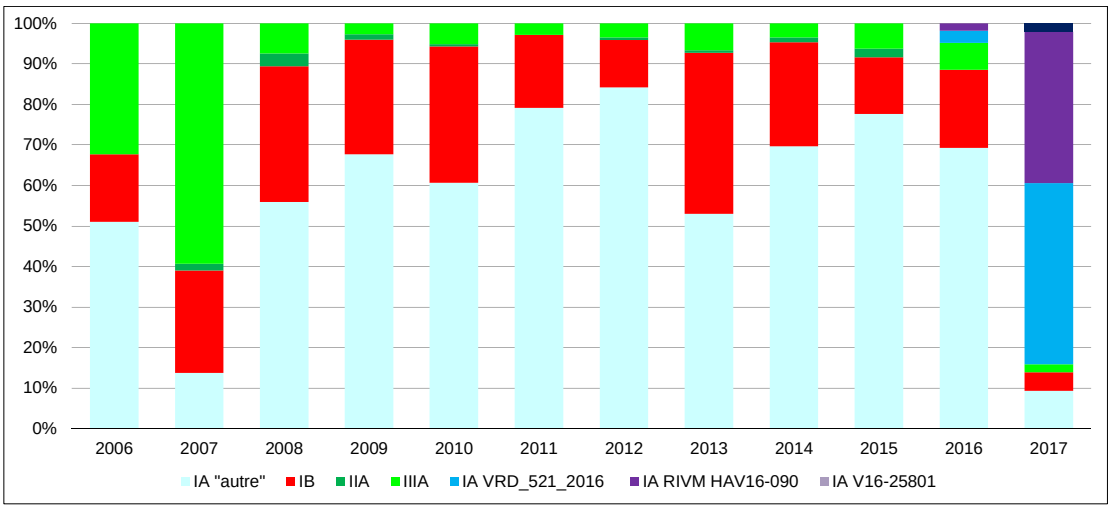
Age moyen des patients virémiques

Le génotype IA était très largement majoritaire avec 1143 infections (93%), suivi du génotype IB avec 56 infections (5%), IIIA avec 24 infections (2%) et une seule infection de génotype IIA.



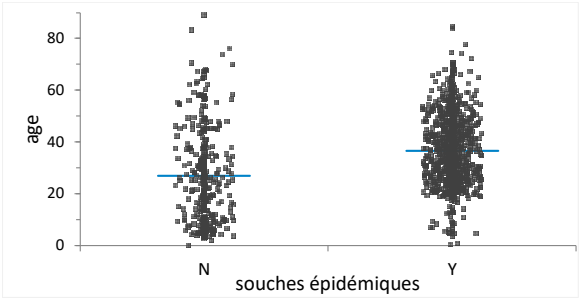
Evolution du nombre de souches par génotypes

Parmi les 1224 cas confirmés en 2017, 1029 (84%) étaient associés à 3 souches de génotype IA, impliquées à l'échelle européenne dans des transmissions au sein de la communauté HSH : VRD_851_2016, dite « UK travel to Spain »: 547 (53,2%), RIVM HAV19-090, dite « Europride » : 457 (44,4%), et V16-25801 : 25 (2,4%)

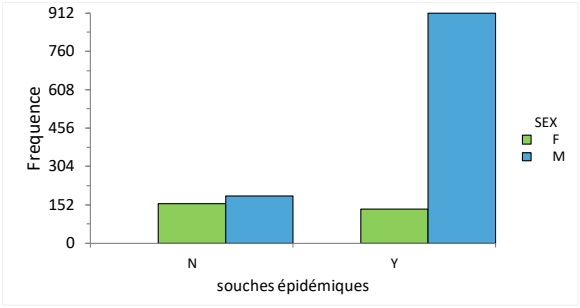


Evolution de la proportion relative des génotypes et souches isolées au CNR

Comme vu dans le graphique ci-dessus, les souches épidémiques VRD_851_2016 et RIVM HAV19-090 sont apparues en France fin 2016. La comparaison des données démographiques entre les patients infectés par l'une des 3 souches épidémiques en 2016 et 2017 (n=1046) et ceux infectés par les souches non épidémiques (n=342) montre un sex ratio et un âge plus élevé pour les sujets infectés par les souches épidémiques : 87,1% d'hommes vs 54,8% (p<0.0001) et 36,6+/-13.2 vs. 26,8+/-18,4 ans (p<0.0001), respectivement.

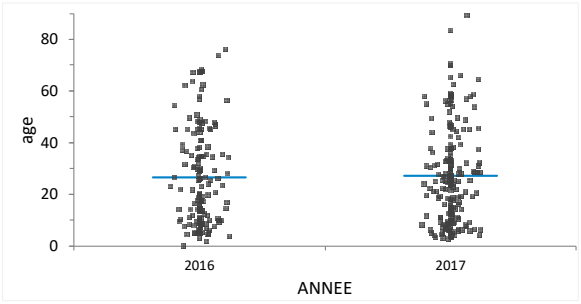


Age selon les souches

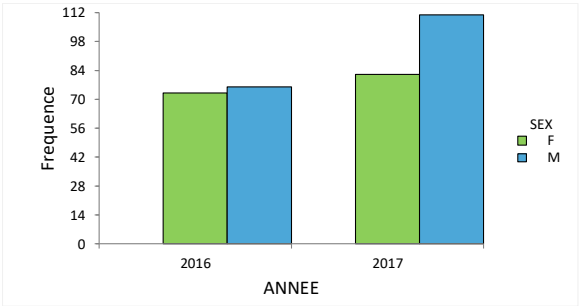


Sexe selon les souches

L'épidémie 2017 associée aux souches circulant dans la communauté HSH s'ajoute aux formes d'hépatite A habituellement rencontrées et dont les caractéristiques démographiques ont peu varié au cours des 10 dernières années avec un âge moyen et un sex ratio similaires en 2016 (n=149) et 2017 (n=193) : 26,5 vs. 27,1 ans et 51% d'hommes vs. 57,5%.



Age selon l'année



Sexe selon l'année

Les données cliniques associées aux échantillons adressés au CNR sont le plus souvent partielles. Toutefois un TP <50%, signalant une hépatite aigue sévère, était signalé pour 15 des 1224 cas (1.2%).

HEPATITE E

Surveillance nationale dans le cadre du réseau de laboratoires partenaires

Un total de 701 souches étaient disponibles pour cette analyse. Le génotype a été étudié par séquençage pour 628 échantillons ARN VHE positifs. Pour 73 souches, le génotype n'a pas pu être déterminé du fait d'une charge virale trop faible. La classification en génotype et sous-type a été réalisée selon la classification proposée par un groupe d'experts sur la base d'un panel de séquences de référence (Smith et al, J Gen Virol, 2016).

La répartition des génotypes caractérisés était la suivante :

Génotype	1	2	4	3a	3chi	3e	3f	3 lapin	3 Non ss-typé
Nombre en 2017(%)	4 0,6%	2 0,3%	20 3,2%	2 0,3%	242 38,5%	8 1,3%	285 45,4%	3 0,5%	62 9,9%

Toutes les infections par un VHE de génotype 1 ou 2 sont survenues chez des immunocompétents de retour de voyage en Asie (génotype 1, n=3) ou Afrique (génotype 1 : n=1 et génotype 2 : n=2). Les infections par un génotype 4 ont toutes été contractées en France essentiellement dans le nord ou le sud-est de la France. La proportion des souches appartenant au génotype 3f (environ 45 %) était en 2017 légèrement supérieure à celle des souches appartenant au génotype 3chi (environ 38 %).

Surveillance nationale en collaboration avec l'Etablissement Français du Sang (EFS)

Dans le cadre du dépistage génomique réalisé par l'EFS sur une partie des donneurs de plasma, les échantillons positifs (n=51) ont été adressés au laboratoire de virologie du CHU de Toulouse pour quantification et typage des souches.

Les virémies des donneurs allaient de 1,7 à 5.9 log_{10} copies/ml. La distribution des génotypes retrouvés chez les donneurs virémiques était la suivante :

Génotype	3chi	3e	3f	3 lapin	3 non sous-typé
Nombre en 2017 (%)	19 52,8 %	1 2,8 %	12 33,3 %	2 5,6 %	2 5,6 %

Pour 15 échantillons, le génotype n'a pas pu être déterminé du fait d'une charge virale trop faible.

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

- En collaboration avec les équipes de l'Hôpital de La Pitié-Salpétrière, nous avons observé l'absence d'efficacité *in vivo* du sofosbuvir associé à la ribavirine chez un sujet immunodéprimé préalablement non répondeur à la

ribavirine (Todesco, Antiviral Therapy, 2018). Ce résultat va dans le même sens que l'étude réalisée auparavant en collaboration avec des collègues du Royaume Uni (Donelly, Gastroenterology 2017).

- En collaboration avec le réseau de partenaire, une étude multicentrique internationale est en cours afin de préciser l'efficacité de la ribavirine chez les transplantés d'organes solides infectés chroniquement par le VHE. Plus de 300 patients ont été inclus et une sous-étude virologique vise à étudier les mutations dans la polymérase virale qui pourraient avoir un impact sur la réponse au traitement.

4.3 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Le CNR est contacté directement par les ARS/CIRE en cas de cas groupés, avec échange d'informations entre Santé Publique France et CNR. Un retour d'information (nombre de prélèvements reçus, résultats) vers les ARS/CIRE et Santé Publique France est réalisé.

Pour identifier les sources éventuelles à l'origine de cas groupés, le CNR collabore avec l'ANSES (Laboratoire de sécurité des Aliments, unité Virus Eau et Aliments, S Perelle), avec la DGCCRF (Service commun des laboratoires à Montpellier) et avec L'IFREMER (S Leguyader). Des cibles communes pour le typage des souches ont été développées.

HEPATITE A

En 2017, un retour régulier sur le nombre de cas associés aux souches épidémiques a été fait à Santé Publique France et aux ARS les plus touchées (Hauts de France, Ile de France et Provence Alpes Côte d'Azur) permettant la publication de plusieurs points de situation.

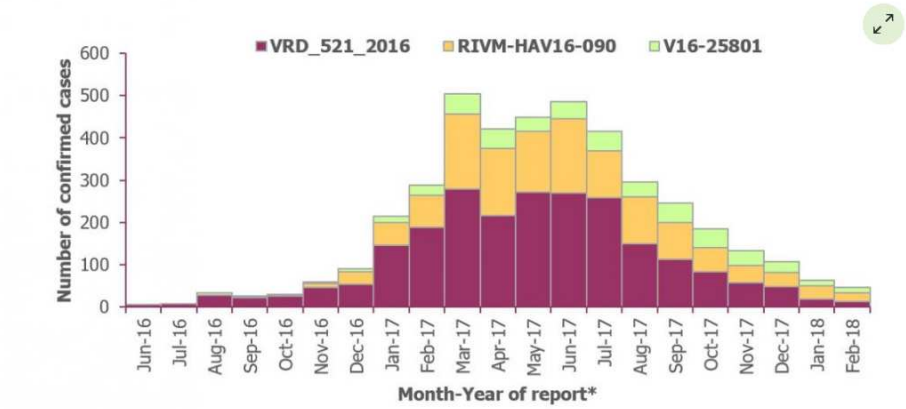
La détection de dons de sang positifs pour le VHA par l'Etablissement Français de Sang (EFS) (technologie Grifols) est systématiquement confirmée par le CNR

Le CNR participe au réseau européen de laboratoires animé par le RIVM aux Pays Bas (HAVNet). Le logiciel Bionumérics (base de données de séquences) permet de répondre immédiatement à nos partenaires sur l'éventuelle circulation en France d'une souche isolée dans un autre pays et inversement. L'identification d'épidémies transfrontalières associées à un facteur de risque donné, notamment alimentaire est ainsi possible.

Les alertes européennes issues de l'ECDC font l'objet d'échanges d'informations : Santé Publique France redescend au CNR les données postées sur la plateforme EPIS-FWD (Epidemic Intelligence Information System) ou, pour les alertes alimentaires, le système RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Ces données sont le plus souvent relayées par le réseau HAVNet, avec échange de données de séquences.

Fin 2016, le CNR a ainsi répondu au 1er Rapid Risk Assessment sur la circulation des souches épidémiques et en 2017, un retour régulier sur le nombre de cas associés a été fait à l'ECDC ; plusieurs points de situations à l'échelle Européenne ont été publiés, le dernier datant du 23/03/2018 :

Figure 1. Distribution of hepatitis A outbreak-confirmed cases, by month of onset and genetic sequence, June 2016 to February 2018, as of 19 March 2018, EU/EEA (n=4 101)



*Month-Year of report: month of onset; where month of onset was unavailable, we used month of sampling or month of receipt by the reference laboratory.

Countries included: Austria (until November 2017), Belgium, Croatia, the Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland (until November 2017), France, Germany, Greece, Ireland, Italy, Latvia, Luxembourg (until November 2017), Malta, the Netherlands, Norway, Portugal, Slovenia, Spain, Sweden and the United Kingdom-England.

https://ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-hepatitis-outbreak-eueea-mostly-affecting-men-who-have-sex-men-1

HEPATITE E

Le CNR VHE participe au réseau européen de surveillance HEVNet en collaboration avec l'ECDC. Un échantillon représentatif des souches circulant en France a été communiqué. Une harmonisation des typages fondée sur l'utilisation des souches de référence proposée par un groupe d'expert (Smith et al 2016) est en cours.

4.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

HEPATITE A

- HAV outbreak in French HIV-infected MSM and PrEP users despite a high immunization rate. (Charre et al. Etude réalisée par les services de virologie, de maladies infectieuses et d'hépatologie du CHU de Lyon, publiée dans Eurosurveillance en 2017)

Un taux d'attaque élevé d'infections VHA a été observé chez des HSH co-infectés par le VIH (2.7%) et chez des HSH usagers de PrEP (2.9%), malgré un taux d'immunisation important (78.2% et 75.7%).

- Hepatitis A immunity in pre-exposure prophylaxis users and HIV-infected MSM before and after an outbreak and an intervention program: Situational analysis and challenge from the field (Robineau et al. Etude en collaboration avec les ARS et Cire Hauts de France et le service de maladies infectieuses de Tourcoing, manuscrit en préparation)

Etude rétrospective évaluant l'immunité anti-VHA chez des HSH co-infectés par le VIH et chez les HSH usagers de PrEP avant (2016) et après l'épidémie (2017). Une augmentation de la séroprévalence dans les deux cohortes est observée soit par vaccination, soit par infection passant de 73% à 93% chez les sujets co-infectés VIH avec un taux d'attaque de l'infection de 6% (taux d'attaque particulièrement élevé malgré le taux d'immunisation important), et passant de 48% à 90% chez les usagers de PrEP, avec un taux d'attaque de 9%.

- Hepatitis A outbreak disproportionately affecting men who have sex with men (MSM) in the European Union and European Economic Area (EU/EEA), June 1st 2016 – May 31st 2017. (Ndumbi et al. Etude collaborative conduite par l'ECDC; manuscript soumis à Eurosurveillance)

Description de l'épidémie à l'échelle Européenne

- Improving preparedness to respond to cross-border hepatitis A outbreaks in the European Union/European Economic Area: towards comparable sequencing of hepatitis A virus (Enkirch et al. Enquête conduite par l'ECDC, manuscrit soumis à Eurosurveillance)

Description des techniques de génotypage du VHA en Europe

- Hepatitis A: an epidemiological survey in blood donors, France 2015-2017 (Gallian et al. étude réalisée en collaboration avec l'EFS, le LFB et Santé Publique France, soumise à Eurosurveillance)

La recherche d'ARN VHA dans le don du sang est obligatoire pour le plasma destiné au fractionnement pour fabrication de médicaments dérivés du sang par le LFB. Cette analyse est sous-traitée par le LFB à l'EFS qui utilise le réactif Procleix HAV/B19 assay (Tigris System automation-Grifols).

La prévalence de l'ARN VHA dans les dons était ~5 fois plus élevée en 2017 que dans la période 2015-2016 ($4,4/10^6$ vs. $0,85/10^6$, p=0.0005) : 18 donneurs ont été identifiés (13 en 2017, 5 en 2015-2016), tous asymptomatiques au moment du don, avec des charges virales variant de 1.2 à 8.59 log10 IU/mL. En 2017, 12/13 donneurs étaient infectés par l'une des 3 souches « épidémiques » circulant dans la communauté homosexuelle masculine (HSH). Malgré un ratio homme/femme plus élevé (5,5 vs 0,7 avant 2017) et l'identification des souches épidémiques, seul 1/11 des donneurs masculins rapportait des pratiques homosexuelles. Des facteurs de risque alimentaires ou professionnels étaient retrouvés chez 10/17 donneurs évaluables. Dès connaissance de la positivité de l'ARN VHA, les produits sanguins ont été détruits. Toutefois, 3 culots globulaires et 9 concentrés plaquettaires ont été transfusés. Une contamination transfusionnelle a été confirmée en 2017.

HEPATITE E

En collaboration avec le CH de Bayonne, le CNR VHA a étudié la prévalence du VHE chez les patients HIV. La sérologie VHE a été réalisée chez 307 patients. La séroprévalence était de 20,8%. En analyse multivariée, aucun facteur alimentaire ou hydrique n'était associé à la séroprévalence des IgG. Les patient présentant des marqueurs de syphilis étaient plus souvent IgG VHE positifs conduisant à émettre l'hypothèse d'une transmission sexuelle: OR= 2,84 ($p < 0.05$) pour les patients avec un TPHA positif et OR = 3.79 ($p = 0.002$) pour les patients avec le VDRL positif (Vareil et al, CROI 2018). Il importe toutefois de noter que cette association n'a pas été retrouvée chez des patients infectés par le HIV ayant fait l'objet d'une étude antérieure au CHU de Toulouse (Abravanel et al, J Infect 2017).

5 Alerte

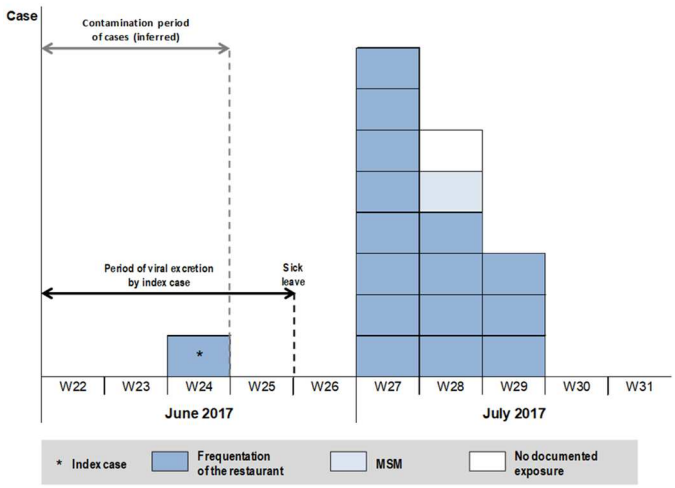
HEPATITE A

- Relevance of sex-ratio in the detection of a foodborne hepatitis A outbreak in a context of epidemic among men who have sex with men, Gironde, France, June-July 2017 (Lambert et al. Etude en collaboration avec l'ARS et La Cite Nouvelle Aquitaine, manuscript en preparation)

  Comme ailleurs en France, une augmentation du nombre de cas notifiés a été observée en Nouvelle Aquitaine avec 150 cas entre janvier et septembre 2017 (nombre multiplié par 5 / 2016). Toutefois, 8 cas ont été notifiés la même semaine de Juillet dans plusieurs villes proches de Bordeaux avec une augmentation du nombre de femmes parmi les cas. De plus 10 des 30 cas notifiés en Juillet résidaient dans la même ville. Ces éléments (modification du sex ratio et regroupement spatial) ont suggéré un événement surajouté à l'épidémie nationale en cours.

  Le CNR a analysé 22 des 46 cas déclarés entre le 1er juin et le 31 juillet et a identifié un variant de la souche VRD_521_2016 chez 18 cas, avec une courbe épidémique suggérant une source unique de contamination. Un questionnaire standardisé administré à ces 18 personnes a identifié la fréquentation d'un même restaurant de la ville dans 16 cas. Le cas index avait travaillé dans le restaurant pendant sa phase d'incubation, période compatible avec les périodes de contamination des autres cas.

Distribution des dates de début des signes cliniques des sujets infectés par un variant de la souche VRD_521_2016, Gironde, June-July 2017 (n = 18) :



- Recrudescence des cas d'hépatite A à la Réunion (Point épidémiologique de la Cire Océan Indien- N° 42 du 24 août 2017).
  Entre Janvier at Aout 2017, 32 cas d'hépatite A ont été notifiés à la Réunion dont 13 importés (Madagascar essentiellement) et 19 autochtones (14 hommes, 5 femmes d'âge moyen 22 ans) (*vs.* 3 cas autochtones en moyenne par an sur la période 2006-2016).
  Les laboratoires hospitaliers de l'île ont transmis 12 souches au CNR. Des souches de génotype IIIA ont été identifiées chez 9 patients (3 cas importés de Madagascar puis 6 cas autochtones, compatibles avec des transmissions secondaires). Une souche IB a été identifiée chez un cas importé de Maurice et la souche IA RIVM HAV16-090 chez deux patients avec un lien épidémiologique entre eux. La recrudescence des cas observée à la Réunion en 2017 n'était donc pas liée aux souches observées en Europe à la même période dans la communauté HSH.

HEPATITE E

o Procédure d'alerte

Le CNR et ses correspondants de Santé publique France (V. Vaillant et E. Couturier) échangent immédiatement sur tout phénomène anormal. Les cas d'hépatite E ne font pas l'objet de déclaration obligatoire.

o Détection et investigation des cas groupés et phénomènes anormaux

Enquêtes lors de suspicion de contamination transfusionnelle

En 2017, le CNR a été sollicité pour réaliser 4 enquêtes avec suspicion de contamination transfusionnelle.

- Patient avec une pathologie onco-hématologique au CHU de Bordeaux. Le patient était infecté par un virus de génotype 3f. Les 10 donneurs de produits sanguins labiles administrés au patient ont été testés en PCR. Un donneur était ARN VHE positif (66 900 copies/mL) avec un génotype 3f. Les séquences ont été comparées. Les résultats ont montré une homologie de séquences entre les souches VHE 3f du donneur et du receveur.
- Patient avec une pathologie onco-hématologique du CHU de Montpellier. Le patient était infecté par un virus de génotype 3c. Les 5 donneurs de produits sanguins labiles administrés au patient ont été testés en PCR. Un donneur était ARN VHE positif (496 copies/mL) avec un génotype 3c. Les séquences ont été comparées. Les résultats ont montré une homologie de séquences entre les souches VHE 3c du donneur et du receveur.
- Patient avec une pathologie onco-hématologique au CHU de Rennes. Le patient était infecté par un virus de génotype 3c. Les 52 donneurs de produits sanguins labiles administrés au patient ont été testés

en PCR. Un donneur était ARN VHE positif (38 500 copies/mL) avec un génotype 3c. Les séquences ont été comparées. Les résultats ont montré une homologie de séquences entre les souches VHE 3c du donneur et du receveur.

- Patient avec une pathologie onco-hématologique au CHU de Brest. Le patient était infecté par un virus de génotype 3f. Les 12 donneurs de produits sanguins labiles administrés au patient ont été testés en PCR. Un donneur était ARN VHE positif (87 500 copies/mL) avec un génotype 3f. Les séquences ont été comparées. Les résultats ont montré une homologie de séquences entre les souches VHE 3f du donneur et du receveur.

Enquêtes lors de suspicion de contamination par greffe d'organe

En 2017, le CNR a été sollicité par l'agence de Biomédecine afin d'étudier des cas d'hépatite E transmis par la greffe d'organe. Ceci a été réalisé dans le contexte du signalement d'une hépatite E chez un transplanté d'organe (transplanté rénal). Le CNR a mis en évidence une virémie VHE positive à 66 copies/ml de génotype 3c chez le donneur d'organe (CH de Bayonne). Les investigations complémentaires réalisés par le CNR de Toulouse et le CNR associé de Villejuif, ont permis de déterminer que 3 des 6 receveurs d'organes de ce donneur ont été infectés par le génotype 3c. Les séquences ont été comparées. Les résultats ont montré une homologie de séquences entre les souches VHE 3c du donneur et des receveurs.

6 Activités de rétro-information, de formation et de conseil

6.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Les membres du CNR participent activement sous forme de séminaires ou de conférences à la diffusion des connaissances sur les virus des hépatites à transmission entérique (cf. liste des communications)

Le CNR a rédigé les chapitres sur l'hépatite A et sur l'hépatite E de la nouvelle mouture du Traité de Virologie Médicale à paraitre fin 2018.

Le CNR a rédigé la mise à jour 2018 du Référentiel en Microbiologie Médicale (REMIC) pour l'hépatite A et l'hépatite E

Des articles de revue sont publiés régulièrement dans des journaux nationaux et internationaux (cf. liste des publications).

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

Le rapport d'épidémiologie moléculaire est adressé aux ARS en cas d'épidémie et au service d'hémovigilance de l'EFS en cas de contamination transfusionnelle.

Un site web (http://www.cnrvha-vhe.org/), créé en 2012 qui comporte tous les rapports d'activité de 2011 jusqu'à 2016, présente les informations récentes ainsi que les coordonnées du CNR (téléphone, fax et mail) et les modalités d'envoi des prélèvements. Le rapport d'activité est mis en ligne dès réception de son évaluation par le comité des CNR. Le site liste également les publications du CNR.

Les membres du CNR sont disponibles par téléphone (accueil des laboratoires) ou par courrier électronique (disponibles sur le site web) pour répondre aux interrogations des professionnels : conseils diagnostiques, type de prélèvement, conditions d'acheminement, etc...

- **Activités de conseil aux professionnels de santé** : Les biologistes du CNR VHE sont disponibles de 9h à 19h

en semaine et le samedi de 9h jusqu'à 16h pour réceptionner les appels ou les e-mails. Le CNR VHE transmet des informations ou des résultats par mails ou par téléphone environ 2 à 4 fois par jour.

6.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

Le CNR VHA a participé à plusieurs conférences téléphoniques organisées par la DGS au 1er trimestre 2017 concernant la gestion de l'épidémie d'hépatite A dans un contexte de pénurie vaccinale et à plusieurs conférences téléphoniques organisées par l'ECDC au 1er semestre 2017 sur la magnitude de l'épidémie d'hépatite A

Le CNR VHE a une activité d'expertise auprès de Santé Publique France et des ARS auprès de qui il transmet des informations. Le Pr Jacques Izopet participe au groupe de travail de l'ANSM sur l'évaluation du risque de transmission du VHE par transfusion. Il participe également au groupe HEVNet mis en place par l'ECDC (ECDC meeting 26-27 October 2017, RIVM, Bilthoven ; travaux en cours).
Le CNR VHE a été audité par l'HAS dans le cadre des recommandations publiées en 2017 (actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic et au suivi de l'hépatite E).

5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public …)

Des séminaires pour les biologistes libéraux ont été réalisés.

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

6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

HEPATITE A

- **Evaluation des techniques sérologiques commerciales pour le dosage des IgG et ou des anticorps totaux anti-VHA :** 8 réactifs en cours de réévaluation.
- **Description des formes cliniques observées lors de l'épidémie 2017.** Un financement pour un technicien d'études cliniques a été demandé dans le cadre d'un appel à projet de l'AP-HP intitulé CRC-bases de données (avril 2018). Il s'agit de valoriser la base de données virologique du CNR en y ajoutant des données cliniques recueillies via un questionnaire qui sera adressé à tous les médecins ayant pris en charge des hépatites A en 2017. C'est une étude descriptive ayant pour objectif principal de déterminer la fréquence des formes d'hépatite A compliquées (hépatite aiguë sévère, hépatite fulminante, ou hépatite à rechute) et pour objectifs secondaires d'identifier les facteurs pronostiques d'évolution vers une forme compliquée.

HEPATITE E

- Description d'infections humaines avec des souches de génotype 3 lapin

  Nous avons confirmé la transmission zoonotique du génotype 3 lapin (HEV3-ra) chez 5 patients français (Patients des CHU de Lille, Reims et Toulouse). Nous avons étudié les caractéristiques physiopathologiques liées à l'infection par ce sous-type. L'infection a provoqué une décompensation hépatique chez un patient présentant une hépatopathie sous-jacente et elle a conduit à des infections chroniques chez 4 patients immunodéprimés dont 3 ont éliminé le virus grâce à un traitement par ribavirine. Aucun patient n'avait eu de contact direct avec des lapins suggérant une contamination alimentaire ou environnementale (Abravanel, Emerging Infectious Diseases, 2017)

- Caractérisation des lipides associés à la particule virale du VHE

Il est maintenant reconnu que le virus présent dans le sang des patients est associé à des lipides. Nous avons étudié la composition lipidique de la particule virale et montré que celle-ci était similaire à celle des exosomes. Ce virus associé aux exosomes est 10 fois moins infectieux que le virus nu excrété dans les selles de patients. Toutefois, il n'est pas neutralisé par les anticorps ce qui a des implications en cas de contamination transfusionnelle (Chapuy-regaud, Biochimie, 2017).

- Séquençage de 115 génomes complets de souches française du VHE circulant en France

  Nous avons utilisé la technologie de séquençage haut débit de 3ème génération PacBio afin de séquencer l'intégralité du génome de 115 souches françaises. Cela nous a permis d'étudier la diversité génétique des virus de génotype 3 circulant en France ainsi que polymorphisme de la région de la polymérase virale en fonction du sous-type (Nicot et al. manuscrit soumis)

6.2 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

Equipe du Pr Roque-Afonso

(i) Publication Nationales

- E Couturier, L Mouna, MJ Letort, D Van Cauteren, AM Roque-Afonso, H De Valk. Dix premières années de surveillance de l'Hépatite A par la déclaration obligatoire, France 2006-2015. **Bull Epidémiol Hebd**. 2018 ; (5) :68-77.
- AM Roque-Afonso. Les enjeux de la vaccination contre l'hépatite A. **Rev Prat**. 2018. Tome 68_N°3 : 291-2.

(ii) Publications internationales

1. P Ndumbi, G. S. Freidl, C. Williams, O. Mardh, C. Varela, A. Avellón, I. Friesema, H. Vennema, K. Beebeejaun , S. L. Ngui, M. Edelstein, A. Smith-Palmer, N. Murphy, J. Dean, M. Faber, J. Wenzel, M. Kontio, L. Müller, S. Midgley, L. Sundqvist, J. Ederth, A. Roque-Afonso, E. Couturier, S. Klamer, J. Rebolledo, V. Suin, S. W. Aberle, D. Schmid, R. de Sousa, G. F. Augusto, V. Alfonsi, M. Del Manso, A. Ciccaglione, K. Mellou, C. Hadjichristodoulou, A. Donachie, M. Borg, M. Sočan, M. Poljak, Ettore Severi and The European Hepatitis A outbreak team. Hepatitis A outbreak disproportionately affecting men who have sex with men (MSM) in the European Union and European Economic Area (EU/EEA), June 1st 2016 – May 31st 2017. **Eurosurveill**. In press
2. M Kaiser, D Delaune, O Chazouillères, J Blümel, AM Roque-Afonso, S. A. Baylis. A World Health Organization human hepatitis E virus reference strain related to similar strains isolated from rabbits. *Genome Announc.* 2018 Apr 19;6(16). pii: e00292-18. doi: 10.1128/genomeA.00292-18
3. R Sberro, AM Roque-Afonso, A Vallet-Pichard, B Deau-Fischer, A Portal, ML Chaix, L Hauser, A Beyloune, A Mercadier, J Izopet, C Legendre, S Pol, V Mallet. Transmission of hepatitis E virus with plasma exchange in kidney-transplant recipients: a retrospective cohort study. Transplantation**.** 2018 Mar 20. doi: 10.1097/TP.0000000000002185
4. Todesco E, Mazzola A, Akhavan S, Abravanel F, Poynard T, Roque-Afonso AM, Peytavin G, Marcelin AG, Calmus Y, Lecuyer L, Guillemain R, Conti F. Chronic Hepatitis E in a heart transplant patient: sofosbuvir and ribavirin regimen not fully effective. **Antivir Ther**. 2018 Mar 5. doi: 10.3851/IMP3227. [Epub ahead of print]
5. Alnuaimi K, Lavolé J, Lascoux-Combes C, Roque-Afonso AM, Sogni P, Pol S, Mallet V. Chronic hepatitis E in patients with indolent lymphoma after treatment with rituximab and bendamustine. Hepatology, 2017 Dec 1. doi: 10.1002/hep.29697. [Epub ahead of print].
6. Bisseux M, Colombet J, Mirand A, Roque-Afonso AM, Abravanel F, Izopet J, Archimbaud C, Peigue-Lafeuille H, Debroas D, Bailly JL, Henquell C. Monitoring human enteric viruses in wastewater and relevance to infections encountered in the clinical setting: results of a one-year experiment in Central France, 2014-2015. Eurosurveill**.** 2018 Feb;23(7). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.7.17-00237
7. Charre C, Ramière C, Roque-Afonso AM, Chidiac C, Zoulim F, Godinot M, Koffi J, Scholtès C, Livrozet JM, HAV Lyon Study Group, Cotte L. HAV outbreak in French HIV-infected MSM and PrEP users despite a high immunization rate. Eurosurveill**.** Euro Surveill. 2017 Nov;22(48). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.48.17-00742
8. Mallet V, Bruneau J, Zuber J, Alanio C, Leclerc-Mercier S, Roque-Afonso AM, Kraft ARM, Couronné L, Roulot D, Wedemeyer H, Albert ML, Hillon P, Laroche L, Pol S, Hermine O.Hepatitis E Virus-Induced Primary Cutaneous CD30(+) T cell Lymphoproliferative Disorder. J Hepatol. 2017 Aug 28. pii: S0168-8278(17)32250-X. doi: 10.1016/j.jhep.2017.08.011

9. Todesco E, Demeret S, Calin R, Roque-Afonso AM, Thibault V, Mallet V, Akhavan S, Jaspard M, Peytavin G, Poynard T, Katlama C, Pourcher V. Chronic hepatitis E in HIV/HBV coinfectde patient: lack of power of sofosbuvir-ribavirin. AIDS**.** 2017 Jun 1;31(9):1346-1348.
10. H Neffatti, P Lebraud, C Hottelet, J Gharbi, T Challouf, AM Roque-Afonso. Southern Tunisia: a still high endemicity area for Hepatitis A. **PlosOne** 2017 Apr 20;12(4):e0175887. doi: 10.1371/journal.pone.0175887. eCollection 2017.
11.

(iii) Communications Nationales

1. L Mouna, L Izquierdo, G Decombe, E Couturier, AM Roque-Afonso. Caractéristiques et Evolution des cas d'hépatite A confirmés entre 2016 et 2017 en France. **RICAI** Paris 2017.
2. L Izquierdo, G Mellon, C Fac, MP Soutière, C Pallier, C Buchaillet, A Dulioust, AM Roque-Afonso. Prévalence de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine et les virus des hépatites chez les personnes incarcérées en France. **JFV** Paris 24-25 mars 2018
3. Antonini T, Roque-Afonso AM, Samuel D, Duclos-Vallée JC, Coilly A, Gagnard JC, Derradji O, Wyplosz B. Couverture vaccinale des candidats à une transplantation hépatique : état des lieux chez 76 malades et évaluation d'une vaccination en hospitalisation. **JNI**, St Malo 2017.

(iv) Communications Internationales

L Izquierdo, G Mellon, C Fac, MP Soutière, C Pallier, C Buchaillet, A Dulioust, AM Roque-Afonso. Prevalence of human immunodeficiency virus and hepatitis viruses among French prison inmates. ECCMID, Madrid, Spain Apr 2018

(v) Conférences sur invitation, séminaires

1. AM Roque-Afonso 2017, 29-mar. ; EPSNF, Fresnes : Hépatite E : Epidémiologie et Populations à risque.
2. AM Roque-Afonso 2017, 22-23 jul. 4th International HIV/Viral Hepatitis Co-infection Meeting. Paris, France. Hepatitis A: Still there.
3. AM Roque-Afonso 2017, 20 Oct. Journée du réseau Bastille (FMC Artemis Medica). Hépatite A.
4. AM Roque-Afonso GEMHEP, Paris : Hépatite A, actualités
5. AM Roque-Afonso Journées Hépatobiliaires (DPC), Paris : Nouvelles épidémiologie de l'Hépatite A
6. AM Roque-Afonso 2018, 18 mai. Journée annuelle du groupe vaccination-prévention de la SPLIF, Paris. Point sur l'épidémie européenne d'hépatite A
7. AM Roque-Afonso 2018, 29-30 May. ESCV Hepatitis Whorshop, Copenhague, Denmark. Transfusion transmitted HEV infections
8. AM Roque-Afonso 2018, 31 mai. Actualités et Conséquences Pratiques dans les Hépatites Virales, Paris. Recommandations Vaccinales et Cirrhose

Equipe du Pr J. Izopet

Publications nationales

1. J. Izopet, S. Lhomme, S. Chapuy-Regaud, JM. Mansuy, N. Kamar, F. Abravanel. HEV and transfusion-recipient risk. Transfusion Clinique et Biologique 2017;24:176-181.
2. J. Izopet. Hépatite E : épidémiologie et transmission. La Lettre de l'Infectiologue 2017
3. J. Izopet. HEV et risque de transmission par transfusion. Annales pharmaceutiques 2018
4. O. Marion, J. Izopet, N. Kamar. Hépatite E : Désormais première cause d'hépatite aiguë virale en France. La Revue du Praticien 2018

Publications internationales

1. S. Lhomme, L. Bardiaux, F. Abravanel, P. Gallian, N.Kamar, J. Izopet. Hepatitis E virus infection in solid

organ transplant recipients, France. Emerging Infectious Diseases 2017;23:353-356.

2. M. Carré, A. Thiebaut-Bertrand, S. Larrat, V. Leroy, P. Pouzol, N. Sturm, S. Lhomme, JY. Cahn, F. Garban, P. Morand. Fatal autochthonous fulminant hepatitis E early after allogeneic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplantation 2017;1-3.

3. Donnelly MC, SN. Imlach, F. Abravanel, S. Ramalingam, I. Johannessen, J. Petrik, AR. Fraser, JD. Campbell, P. Bramley, HR. Dalton, PC. Hayes, N. Kamar, KJ. Simpson. Sofosbuvir and Daclatasvir anti-viral therapy fails to clear HEV viremia and restore reactive T cells in a HEV/HCV co-infected liver transplant recipient. Gastroenterology 2017;152:300-301.

4. Abravanel F, S. Lhomme, M. Fougère, K. Sauné, M. Alvarez, JM. Péron, P. Delobel, J. Izopet. HEV infection in French HIV-infected patients. Journal of Infection 2017;74:310-313.

5. Abravanel F, N. Goutagny, C. Perret, S. Lhomme, F. Vischi, A. Aversenq, A. Chapel, N. Dehainault, N. Piga, J. Dupret-Carruel, J. Izopet. Evaluation of two VIDAS® prototypes for detecting anti-HEV IgG. Journal of Clinical Virology 2017;89:46-60.

6. HR. Dalton, JJJ. Van Eijk, P. Cintas, RG. Madden, CJ. Jones, GW. Webb, B. Norton, J. Pique, S. Lutgens, N. Devooght-Johnson, K. Woolson, J. Baker, M. Saunders, L. Househam, J. Griffiths, F. Abravanel, J. Izopet, N. Kamar, N. van Alfen, BG. Van Engelen, JG. Hunter, AA. van der Eijk, RP. Bendall, BN. Mclean, BC. Jacobs. Hepatitis E virus infection and acute non-traumatic neurological injury: a prospective pilot multicentre study. Journal of Hepatology 2017;67:925-932.

7. J. Belliere, F. Abravanel, MB. Nogier, S. Martinez, P. Cintas, S. Lhomme, L. Lavayssière, O. Cointault, S. Faguer, J. Izopet, N. Kamar. Transfusion-acquired hepatitis E infection misdiagnosed as severe critical illness polyneuromyopathy in a heart-transplant patient. Transplant Infectious Disease 2017;19:6.

8. A Velay, W. Kack-Kack, F. Abravanel, S. Lhomme, P. Leyendecker, L. Kremer, P. Chamouard, J. Izopet, S. Fafi-Kremer, H. Barth. Parsonage-Turner syndrome due to autochthonous acute genotype 3f hepatitis E virus infection in a nonimmunocompromised 55-year-old patient. Journal of Neurovirology 2017;23:615-620.

9. S. Chapuy-Regaud, M. Dubois, C. Plisson-Chastang, T. Bonnefois, S. Lhomme, J. Bertrand-Michel, B. You, S. Simoneau, PE. Gleizes, B. Flan, F. Abravanel, J. Izopet. Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response. Biochimie 2017;141:70-79.

10. JJJ. van Eijk, HR. Dalton, P. Ripellino, RG. Madden, CJE. Jones, M. Fritz, C. Gobbi, G. Melli, E. Pasi, J. Herrod, RF. Lissmann, HH. Ashraf, M. Abdelrahim, O. Almasri, M. Fraga, D. Benninger, T. Kuntzer, V. Aubert, R. Sahli, D. Moradpour, H. Blasco-Perrin, S. Attarian, R. Gerolami, P. Colson, MT. Giordani, J. Hartl, S. Pischke, NX. Lin, BN. Mclean, RP. Bendall, M. Panning, JM. Peron, N. Kamar, J. Izopet, BC. Jacobs, N. van Alfen, BGM. van Engelen. Clinical phenotype and outcome of hepatitis E virus associated neuralgic amyotrophy; an international multicenter retrospective comparative study. Neurology 2017:909-917.

11. F. Abravanel, S. Lhomme, H. El Costa, B. Schvartz, JM. Peron, N. Kamar, J. Izopet. Rabbit Hepatitis E virus infections in humans, France. Emerging Infectious Diseases 2017;23:1191-1193.

12. H. Barragué, B. Condat, N. Petitdidier, E. Champagne, C. Renou, J. Izopet, F. Abravanel. Chronic hepatitis E virus infection in a cirrhotic patient: a case report. Medicine 2017;96 :e7915.

13. IM Sayed, L. Foquet, L. Verhoye, F. Abravanel, A. Farhoudi, G. Leroux-Roels, J. Izopet, P. Meuleman. Transmission of hepatitis E virus infection to human-liver chimeric FRG mice using patient plasma. Antiviral Research 2017 141:150-154.

14. IM. Sayed, L. Verhoye, L. Cocquerel, F. Abravanel, L. Foquet, C. Montpellier, Y. Debing, A. Farhoudi, C. Wychowski, J. Dubuisson, G. Leroux-Roels, J. Neyts, J. Izopet, T. Michiels, P. Meuleman. Study of Hepatitis E virus infection of genotype 1 and 3 in mice with humanized liver. Gut 2017;66:920-929.

15. N. Kamar, J. Izopet, N. Pavio, R. Agarwal, A. Labrique, H. Wedemeyer, H. Dalton. Hepatitis E virus infection. Nature Reviews Disease Primers 2017;3 :17086

16. X. Yin, X. Li, C. Ambardekar, Z. Hu, S. Lhomme, Z. Feng. Hepatitis E virus persists in the presence of a type III interferon response. PLoS Pathog. 2017 May 30;13(5):e1006417.

17. H. Dalton, J. Izopet. Transmission and Epidemiology of HEV genotype 3 and 4 infections. Cold Spring Harb Perspect Med 2018.

18. C. Montpellier, C. Wychowski, IM. Sayed, JC. Meunier, JM. Saliou, M. Ankavay, A. Bull, F. Abravanel, F. Helle, E. Brochot, H. Drobecq, R. Farhat, CM. Aliouat, J. Izopet, P. Meuleman, A. Goffard, J. Dubuisson, L. Cocquerel. Hepatitis E Virus lifecycle and identification of 3 forms of the ORF2 capsid protein. Gastroenterology 2018;154:211-223.

19. M. Bisseux, J. Colombet, A. Mirand, AM. Roque-Afonso, F. Abravanel, J. Izopet, C. Archimbaud, H. Peigue-Lafeuille, D. Debroas, JL. Bailly, C. Henquell. Monitoring human enteric viruses in wastewater and relevance to infections encountered in the clinical setting: results of a one-year experiment in Central France, 2014-2015. EuroSurveillance 2018;23:7.

20. N. Kamar, A. Del Bello, J. Izopet. Should persistent hepatitis E virus replication in transplant patients be tolerated? Transplantation 2018;102:e84-e85.

21. V. Mallet, R. Sberro-Soussan, AM. Roque-Afonso, A. Vallet-Pichard, B. Deau, A. Portal, ML. Chaix, L. Hauser, A. Beylouné, A. Mercadier, J. Izopet, C. Legendre, S. Pol. Transmission of hepatitis E virus with plasma exchange in kidney-transplant recipients: a retrospective cohort study. Transplantation (sous presse).

22. E. Todesco, A. Mazzola, S. Akhavan, F. Abravanel, T. Poynard, AM. Roque-Afonso, G. Peytavin, AG. Marcelin, Y. Calmus, L. Lecuyer, R. Guillemain, F. Conti. Chronic hepatitis E in a heart transplant patient: sofosbuvir and ribavirin regimen not fully effective. Antiviral Therapy 2018 (sous presse).

23. X. Yin, D. Ying, S. Lhomme, Z. Tang, C. Walker, NS. Xia, Z. Zheng, Z. Feng. Origin, antigenicity, and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection. PNAS 2018 (sous presse).

Communications nationales

1. J. Izopet - Synthèse en infectiologie. Hépatite E : nouvelles pièces du puzzle - Symposium Janssen-Cilag – Paris (2017)

2. S. Chapuy-Regaud - Les exosomes produits par des cellules infectées par le virus de l'hépatite E propagent l'infection à l'abri des anticorps neutralisants - 17ème réunion du réseau national Hépatite ANRS – Paris (2017)

3. F Abravanel - Actualité sur le VHE, 22e Journée annuelle *GEMHEP (Groupe moléculaire d'étude des hépatites)* - Paris (2017)

4. F Abravanel - Actualités pratiques sur les Hépatites. VHE, qui et comment dépister - Symposium Gilead Paris - (2017)

5. J. Izopet – VHE & Transplantation - Ecole d'Eté LabEx Transplantex – Strasbourg (2017)

6. J. Izopet – Actualités sur l'hépatite E – Journées Francophones de Biologie Médicale – Bordeaux (2017)

7. J. Izopet - VHE : nouveau pathogène émergent ? – Journée Roche – Paris (2017)

8. J. Izopet - Emergence de l'hépatite E – RICAI – Paris (2017)

9. S. Lhomme- Etude de la polyprotéine non structurale du virus de l'hépatite E- RICAI- Paris (2017)

10. F Abravanel. La Journée de Médecine Transfusionnelle. VHE free or not VHE free. Symposium Octapharma. Paris (2017)

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

Le CNR VHA collabore avec Soisick LEGUYADER, pour ce qui touche la détection du VHA dans les coquillages et les effluents et les enquêtes épidémiologiques autour de cas groupés impliquant des coquillages: échanges de souches, de techniques (séquençage).

Le CNR VHA collabore avec Sylvie Pérelle, ANSES, pour ce qui touche les produits alimentaires : échanges de souches, de techniques, accueil ponctuel d'étudiants. Validation inter-laboratoire de la RT-PCR temps réel pour la détection du VHA.

Le CNR VHE collabore avec Nicole Pavio, ANSES Maisons-Alfort, dans le cadre d'enquêtes alimentaires et dans le cadre du réseau CoVetLab.
Le CNR VHE collabore avec Soizick Le Guyader de l'Ifremer.

Le CNR des virus hépatotropes à transmission entérique a collaboré avec le CNR des entérovirus pour la détection des du VHA et du VHE dans les eaux usées (surveillance microbiologique ponctuelle) et la comparaison avec les souches humaines (Monitoring human enteric viruses in wastewater and relevance to infections encountered in the clinical setting: results of a one-year experiment in Central France, 2014-2015 ; Bisseux et al. Eurosurveillance 2018)

8 Programme d'activité pour les années suivantes

8.1 Hépatite A

Finalisation de l'évaluation des techniques sérologiques commerciales pour le dosage des IgG et ou des anticorps totaux anti-VHA

Analyse et publication de la description des formes cliniques observées lors de l'épidémie 2017. (AO CRC bases de données)

Développement du séquençage du génome entier par NGS

8.2 Hépatite E

a- Evaluation des techniques sérologiques et moléculaires proposées par les industriels

Compte tenu de la fréquence et de l'impact en santé publique désormais reconnus des infections par le VHE dans les pays industrialisés dont la France, de nombreuses firmes développent des tests d'immunoanalyse et des tests moléculaires pour la détection et la quantification du VHE. Ces nouveaux dispositifs présentent de nouvelles caractéristiques en termes d'automatisation ou de miniaturisation.

b- Etudes ciblées

- **Etude des mutations de la polymérase virale associées à une résistance au traitement par ribavirine chez les sujets traités au stade chronique.**

La ribavirine, dont on ne connait pas précisément le mécanisme d'action, est devenue le traitement de choix des hépatites E chroniques. Malgré l'efficacité clinique et virologique de la molécule, un échec thérapeutique est observé dans environ 20 % des cas.

La nature et l'impact sur la résistance virale de mutations dans la polymérase virale sont aujourd'hui très peu connus. Des études *in vivo* et expérimentales dans différents systèmes cellulaires seront conduites. Ce projet sera réalisé en collaboration avec le réseau des laboratoires de virologie.

- **Etude de la présence du VHE dans l'environnement**

L'ARN du VHE a été détecté dans les eaux usées, dans de l'eau de rivière, et dans les coquillages. Nous ne disposons pas de données quantitatives et le caractère infectieux du matériel détecté n'a pas été déterminé. Une étude nationale suggère que la transmission hydrique du VHE est probable en France (Mansuy, Hepatology 2016). Cette source de transmission a d'ailleurs été récemment à l'origine de cas groupés, dont un fatal, dans le Cantal. Le VHE a été également détecté par des techniques moléculaires dans des eaux usées du centre de la France (M. Bisseux, Eurosurveillance 2018). Cependant, la relation entre la quantification génomique et l'infectiosité n'a pas été étudiée. Nous souhaitons mettre en place un travail dans la région Occitanie, région de forte endémie pour le VHE, mais qui se caractérise par une grande hétérogénéité de la séroprévalence des IgG dans la population générale en fonction des départements (Mansuy, Eurosurveillance 2015). D'une manière générale, nous pensons que cette thématique pourra faire l'objet d'une collaboration avec le CNR des virus entériques tant sur le plan méthodologique que technologique.

c- Développement de méthodes spécialisées

En biologie moléculaire, ce volet concernera surtout les protocoles de séquençage sur les plateformes haut débit de 2ème génération (Illumina) ou 3ème génération (Pacific Biosciences/Roche) ainsi que le développement de pipelines bioinformatiques.

.

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR des virus des hépatites à transmission entérique

1.1 Missions et objectifs majeurs du CNR et des laboratoires associés

Le CNR des hépatites A et E a des missions d'expertise microbiologique, de surveillance épidémiologique et d'alerte.

Dans sa mission d'expertise, le CNR évalue des tests commercialisés et développe des tests sérologiques et moléculaires pour le diagnostic et la confirmation des infections et le typage moléculaire des souches.

Dans sa mission de surveillance, le CNR contribue à l'investigation d'épidémies par la caractérisation des souches épidémiques, la recherche des sources de contamination et la participation aux réseaux de surveillance internationaux.

L'incidence de l'hépatite A est déterminée grâce à la déclaration obligatoire.

L'hépatite E n'est pas une maladie à déclaration obligatoire. Le CNR VHE organise la surveillance des cas d'hépatite E en répertoriant les cas qui lui sont transmis par ses partenaires publics ou privés impliqués dans le diagnostic virologique en France.

Dans sa mission d'alerte, le CNR signale à Santé Publique France tout phénomène inhabituel : cas groupés, modification des formes cliniques, apparition de nouvelles souches, nouveaux modes de contamination. En particulier, il est impliqué dans les études de transmission transfusionnelle, en collaboration avec l'EFS.

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

1.2 Equipes

Créé en 2002, le CNR des virus des hépatites à transmission entérique a été renouvelé en 2016 sous la direction du Pr Izopet en charge de l'hépatite E (Toulouse) en association avec le Pr Roque-Afonso en charge de l'hépatite A (Villejuif). L'activité du CNR est intégrée aux deux laboratoires de Virologie.

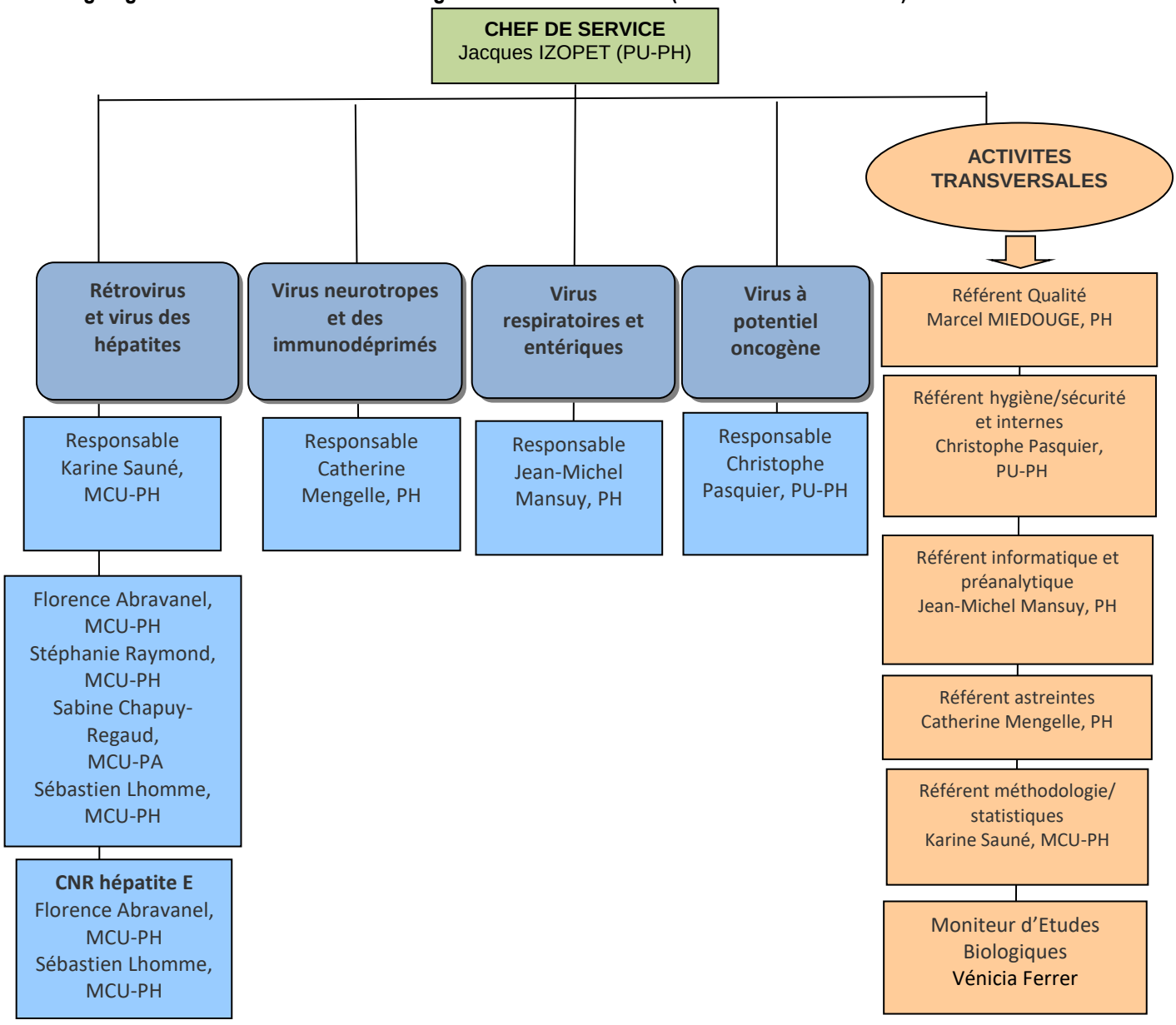
CNR VHE: Pr Izopet, Toulouse

L'équipe dédiée au CNR à Toulouse est constituée de 3 biologistes, et d'un ingénieur :

Personnels :

Nom	ETP	Qualification	Statut	Organisme payeur
Jacques Izopet	0.2	Biologiste	PU-PH/ Chef de service	CHU Toulouse / Université Toulouse
Florence Abravanel	0.2	Biologiste	MCU-PH	CHU Toulouse / Université Toulouse
Sébastien Lhomme	0.2	Biologiste	MCU-PH	CHU Toulouse / Université Toulouse
Martine Dubois	1	Ingénieur		CHU Toulouse

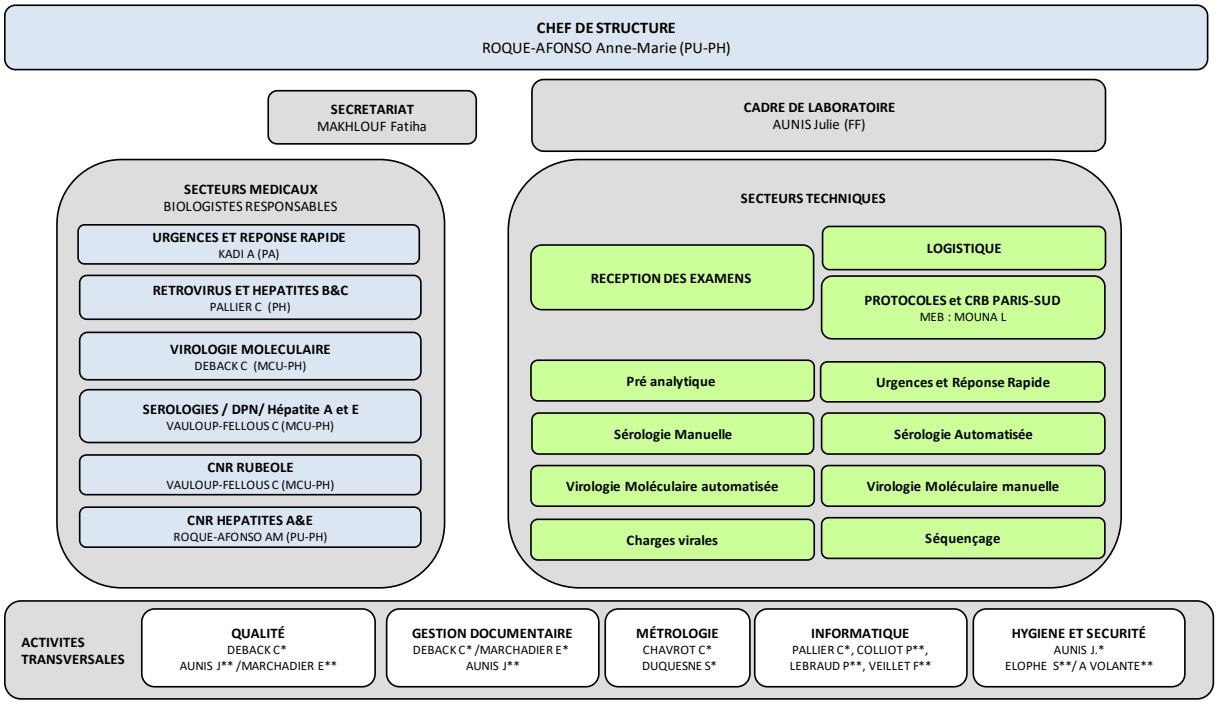
Organigramme du laboratoire de Virologie du CHU de Toulouse (Accréditation ISO15189)



CNR VHA : Pr Roque-Afonso, Villejuif

Nom	ETP	Qualification	Statut	Organisme payeur
Anne-Marie Roque-Afonso	0.2	Médecin Biologiste	PU-PH / Chef de service	APHP / Université Paris Sud
Lina Mouna	0.2	PhD	Ingénieur	APHP
Laure Izquierdo	0.1	Pharmacien	AHU	APHP / Université Paris Sud
Eric Marchadier	1	Technicien		APHP

Organigramme fonctionnel du laboratoire :



*Titulaire ; **Suppléant

1.2.2

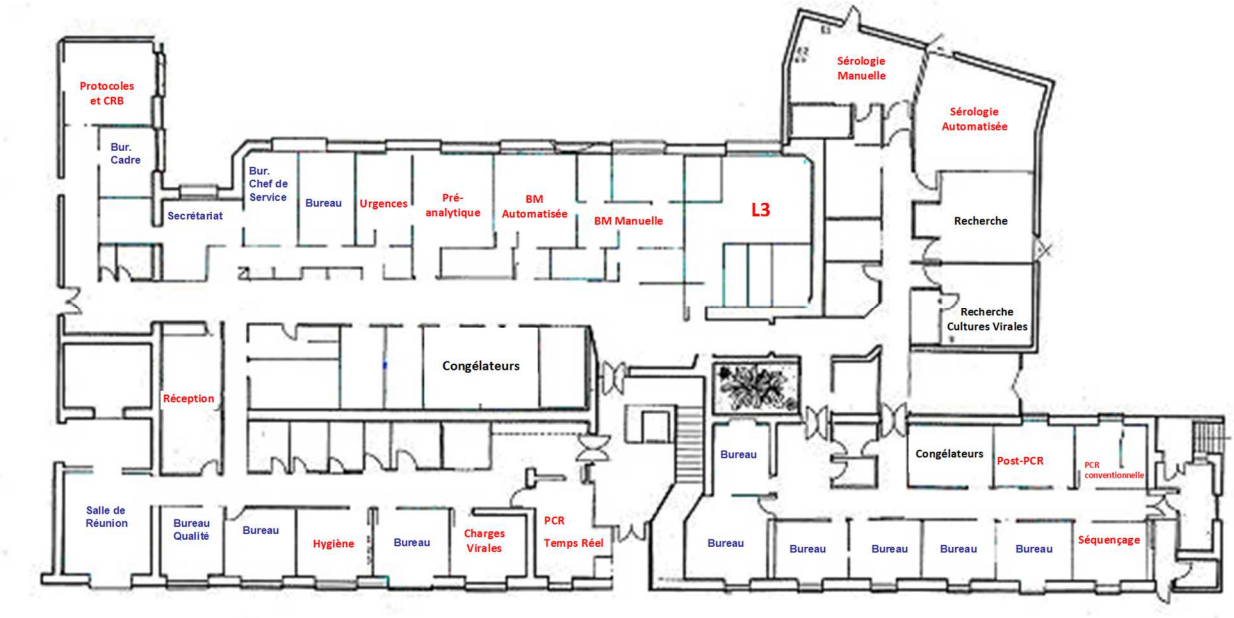
1.3 Locaux et équipements

1.3.1 Laboratoire de Virologie des Hôpitaux Paris Sud, Villejuif

Le CNR est intégré au service de Virologie (LBM des Hôpitaux universitaires Paris Sud, **(Accréditation ISO15189)**.

Le laboratoire de virologie est organisé autour d'une réception et de secteurs techniques (Pré-analytique, Protocoles et Centre de Ressources Biologiques, Urgences et réponse rapide, Sérologie manuelle et automatisée, Biologie moléculaire Manuelle et automatisée et Séquençage). Il est équipé d'un laboratoire L3 et possède 3 chambres froides, une laverie et de nombreuses réserves. Quatre salles climatisées (3 au rez-de-chaussée et 1 au sous-sol) accueillent les congélateurs.

Plan du laboratoire (RCH):



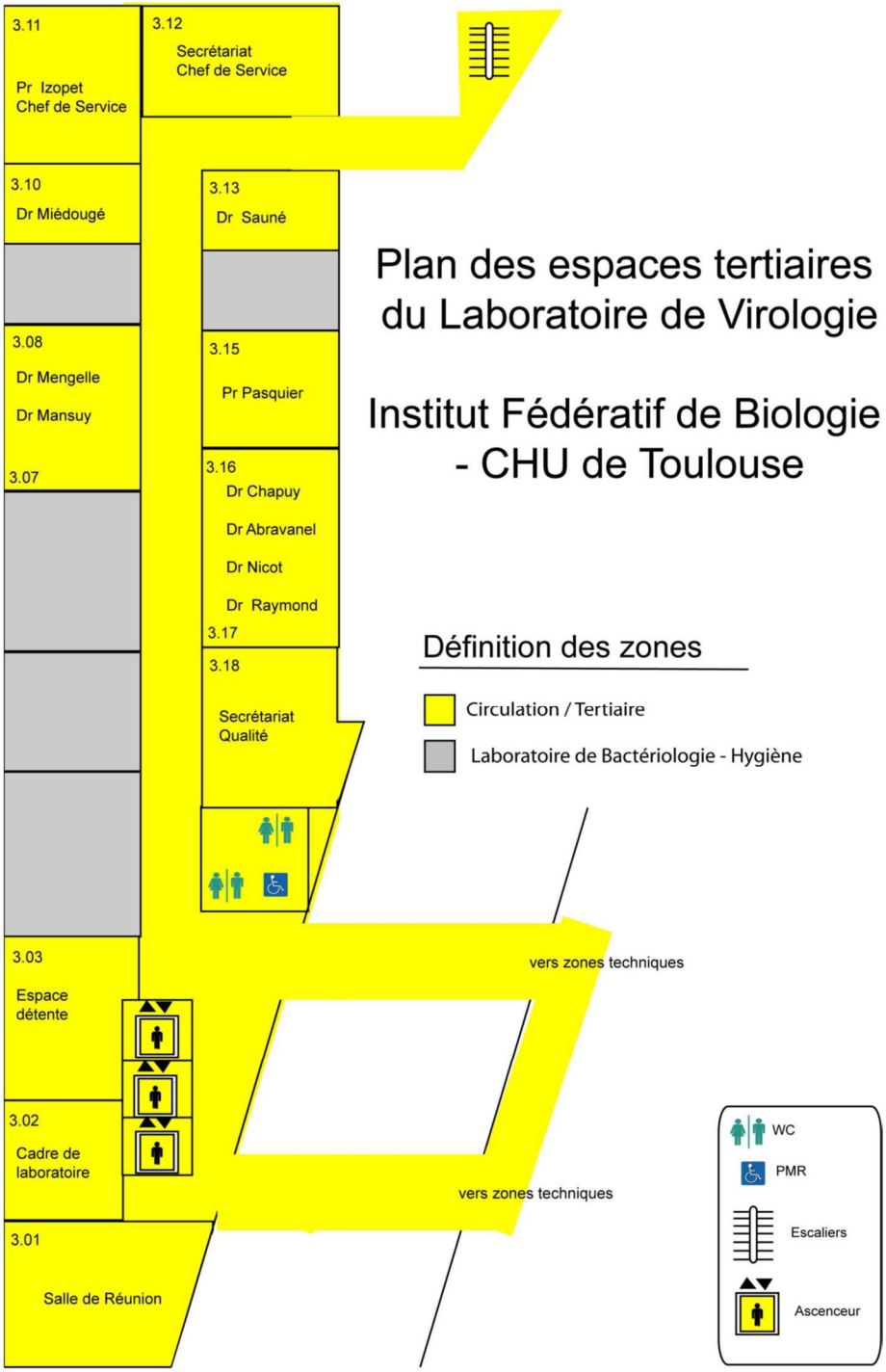
Principaux équipements

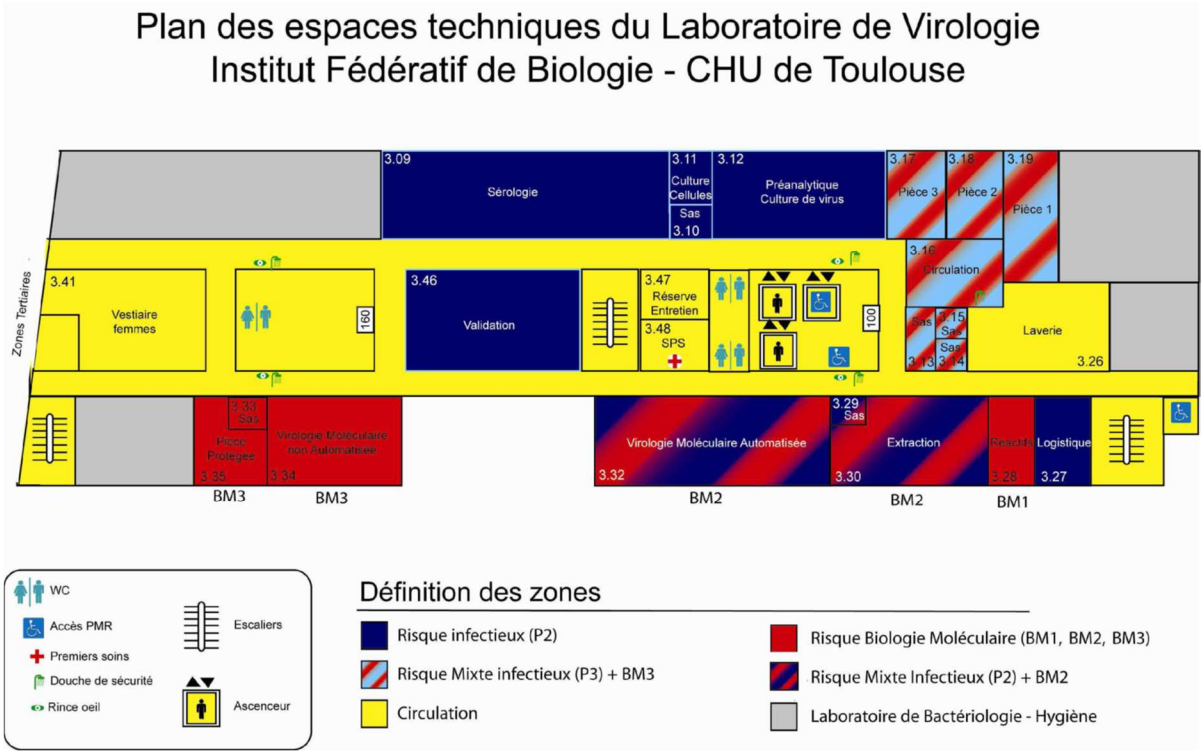
- Congélateurs et réfrigérateurs reliés à une centrale de surveillance des températures (JRI)
- Gestionnaire de microplaques ELISA (Etimax)
- Automates d'immunoanalyse : Vidas3 (Biomérieux), Liaison XL (Diasorin), Cobas e6000 (Roche)
- Automates d'extraction d'acides nucléiques : 2 QiaSymphony (Qiagen), 2 EasyMag (Biomérieux), 2 m2000sp (Abbott)
- Appareils de PCR en temps réel (2 7500, 2 VIIA7, 3 RotorGeneQ, 2 m2000rt) et thermocycleurs conventionnels
- Séquenceurs automatiques d'acides nucléiques : séquenceur conventionnel ABI 3130 16 capillaires (Applied Biosystems) et NGS (MiSeq), mutualisés avec la plateforme de génétique des tumeurs (labellisée INCA)
- 1 ultracentrifugeuse (dans le L3)

1.3.2 Laboratoire de Virologie du CHU de Toulouse

Le CNR hépatite E est intégré au laboratoire de virologie appartenant au plateau technique d'infectiologie à l'Institut Fédératif de Biologie (IFB), sur le site de Purpan du LBM du CHU de Toulouse.

Le laboratoire comporte des espaces tertiaires et 3 plateaux techniques :
- sérologie
- biologie moléculaire
- culture de virus en P2 et P3





Les secteurs pré-analytiques et logistiques sont des activités mutualisées au sein de l'IFB. Ceci permet un traitement 24h/24h, dimanches et jours fériés, d'échantillons biologiques destinés à des examens virologiques.

Les principaux équipements du laboratoire sont les suivants :
- Congélateurs et réfrigérateurs reliés à une centrale de surveillance de température (Vigitemp)
- Automates d'extraction d'acides nucléiques : MagnaPure 96
- Thermocycleurs 9700
- Appareils de PCR en temps réel (5 Light Cycler 2, 4 Light Cycler 480)
- Séquenceurs automatiques d'acides nucléiques : séquenceur conventionnel ABI 3130 16 capillaires (Applied Biosystems) et séquenceurs NGS (Illumina, Life Technologies)
- Gestionnaire de microplaques ELISA
- Système Luminex
- Laboratoire de sécurité P3

Le laboratoire dispose d'un accès direct à différents plateaux techniques (Inserm U1043/CNRS 5282) :
. cytométrie en flux
. imagerie cellulaire
. microscopie électronique

1.4 Description de la démarche qualité du laboratoire : GBEA, participation à un contrôle de qualité externe, programmes, accréditation, certification, ...

Laboratoire de Virologie des Hôpitaux Universitaires Paris Sud, Villejuif

Le laboratoire de Virologie est partie intégrante du LBM des Hôpitaux universitaires Paris Sud, accrédité par le COFRAC selon la norme ISO 15189 depuis 2013 (n°8-1128). La gestion documentaire, le suivi des non-conformités et les actions d'amélioration continue sont réalisées grâce au logiciel Kalilab.

Le Laboratoire de Virologie a intégré, en juin 2012, le Centre de Ressources Biologiques Paris-Sud, certifié selon le référentiel AFNOR NF S96-900. Cette activité est auditée sur une base annuelle.

Outre le CNR des hépatites à transmission entérique, le Laboratoire héberge également le CNR des infections rubéoleuses materno-fœtales. Au titre de cette activité, le laboratoire est accrédité en tant que laboratoire National OMS pour la Rubéole depuis février 2014.

Les techniques réalisées exclusivement dans le cadre du CNR (Avidité des IgG VHA, Charge virale VHA et génotypage par séquençage) seront progressivement accréditées dans les délais requis selon la gestion de portée flexible.

1.4.1 Laboratoire de Virologie du CHU de Toulouse

L'activité de Virologie du CHU de Toulouse est accréditée par le COFRAC selon la norme ISO 15189 depuis avril 2007 (n° 8-1769). L'accréditation concerne 98 % des examens virologiques incluant en particulier les techniques sérologiques (IgM et IgG anti-VHE) et les techniques de quantification et de typage de l'ARN VHE.

A la suite de l'audit initial, le laboratoire a été régulièrement audité sur une base annuelle. La gestion documentaire, la gestion des stocks, le suivi des non-conformités et les actions d'amélioration continue sont réalisées grâce à un logiciel spécialisé.

Conformément à la norme ISO 15189, des audits internes, des contrôles de qualité externes et internes, des enquêtes de satisfactions et un suivi des indicateurs pertinents de l'activité du laboratoire sont réalisés.

1.4.2 Démarche commune

Les deux laboratoires du CNR pratiquent des échanges inter-laboratoire pour des marqueurs pour lesquels il n'existe pas d'organisation d'évaluation externe de la qualité : détection de l'ARN VHA, génotypage du VHE.

ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR

1.1 Liste des techniques de référence: diagnostic/identification, typage

HEPATITE A

Tests Sérologiques

- Détection et quantification des anticorps totaux (ECLIA Cobas Roche et ELISA Diasorin) et détection des IgM (Vidas HAV IgM, BioMérieux et ELISA DiaSorin) – **techniques accréditées**
- Avidité des IgG VHA (Desbois, J Clin Microbiol 2004 ; Roque-Afonso, Clin Infect Dis 2006).

Détection et quantification du génome viral

- RT-PCR en temps réel ciblant la région 5'NC pour le screening (HAV realStar, Altona Diagnostics)

Caractérisation des souches

- RT-PCR de la région VP1-2A (500 nucléotides) permettant le génotypage par séquençage et analyse phylogénétique de la région VP1/2A
- Séquençage du génome complet
- Analyse de la quasi-espèce par clonage et séquençage des variants et par NGS

Techniques de culture cellulaire

- Lignée fibroblastiques FRh-K4. La souche cytopathique HM175-18f et plusieurs souches cliniques sont cultivables sur ce système.

HEPATITE E

Les techniques sérologiques et les techniques de quantification et de typage de l'ARN HEV sont accréditées COFRAC selon la norme ISO 15189.

Tests Sérologiques

- Test ELISA de détection des anticorps VHE ELISA IgM et IgG de Wantai (Wantai Biological Pharmacy Enterprise Co, China) (Mansuy, Emerg Infec Dis, 2011, Abravanel J Clin Virol 2013)
- Test ELISA permettant l'étude de l'avidité des IgG VHE (par adaptation de la technique IgG Wantai).
- Test ELISA permettant le titrage des IgG anti-VHE à l'aide du standard international NIBSC 95/584 (par adaptation de la technique IgG Wantai).
- Test ELISA sandwich permettant la détection de l'antigène de capside du VHE (Wantaï Biological Pharmacy Entreprise Co ; China).

Détection et quantification du génome viral

- La RT-PCR en temps réel développée au laboratoire de Toulouse cible la région ORF3 du génome (Abravanel, J Clin Microbiol, 2012).
- RT-PCR en temps réel RealStar HEV RNA version 2 d'Altona

Caractérisation des souches

- Génotypage par séquençage et analyse phylogénétique de la région ORF2 ou ORF1 (Legrand-Abravanel, Emerg Infec Dis, 2009).
- Séquençage de génomes complets (Legrand-Abravanel, Emerg Infec Dis, 2009 ; Izopet Emerg Infec, Dis 2012)
- Analyse de la quasi-espèce par clonage et séquençage des variants (Kamar, Am J Transplant, 2010 ; Lhomme, J Virol 2012, Lhomme, J Infec Dis 2014 ; Lhomme, Antimicrobiol Agent and chemother 2015)

Techniques de culture cellulaire

Nous disposons des lignées hépatocytaires PLC/PRF-5, HepG2/C3A et de la lignée pulmonaire A549. Plusieurs souches cliniques de génotype 3f et 3c ont été adaptées sur ces systèmes.

1.2 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence :

Hépatite A

- Collection clinique de plus de 500 sérums ou selles contenant de l'ARN VHA dont la souche a été typée. Ces échantillons sont conservés selon les règles du Centre de Ressources Biologiques Paris Sud (certifié AFNOR selon la norme NF S96-900)
- Collection de surnageants de culture de souches cliniques
- Base de données de séquences sur le logiciel Bionumerics (séquences génotypées et annotées sur l'origine géographique et certains facteurs de risque). Permet le croisement rapide des données en cas d'alerte transfrontalière.

Hépatite E

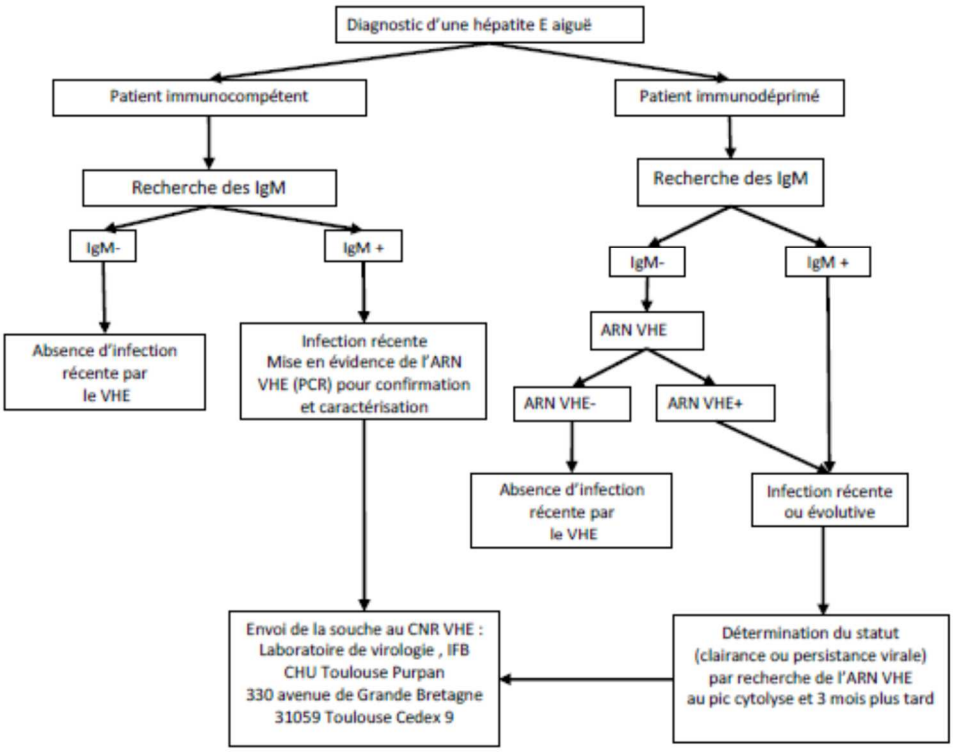
- Collection clinique de plus de 1000 sérums ou selles contenant de l'ARN VHE dont la souche a été typée et stockées selon les règles du CRB du CHU de Toulouse (certifié AFNOR selon la norme NF S96-900).
- Collection de surnageants de culture de souches cliniques (3f et 3c).
- Banque de séquences accessibles dans GenBank

1.3 Liste des techniques (diagnostic/identification, typage, sensibilité aux anti-infectieux...) recommandées par le CNR

Hépatite A

Le diagnostic de l'infection aiguë repose sur la détection des IgM spécifiques. Toutefois, la valeur prédictive positive de ce marqueur est faible en l'absence de cytolyse et en dehors d'un contexte aigu. Le CNR propose la démarche diagnostique suivante (Roque-Afonso, Future Virology 2010) :

Situation clinique	Indication des IgM	Que faire d'un résultat positif	Diagnostic à évoquer
Symptomatologie aigue / transaminases élevées +/- ictère et	Définition d'une hépatite aigue	Excellente VPP des IgM VHA +	Hépatite A aigue
Absence de symptômes / transaminases normales	Indication non ciblée (erreur) ou dépistage autour d'un cas	Recherche d'une virémie VHA Avidité des IgG VHA si virémie négative	**Virémie détectable** : infection asymptomatique **Virémie indétectable** +/- avidité élevée : faux positif ou activation polyclonale
Transaminases élevées et faible probabilité épidémiologique d'hépatite A	Hépatite	Recherche d'une virémie VHA Avidité des IgG VHA si virémie négative	**Virémie détectable** : infection aigue **Virémie indétectable** +/- avidité élevée : faux positif ou activation polyclonale ⇨ **Rechercher d'autres causes de cytolyse**

Hépatite E

Les performances des trousses de détection des IgM anti-VHE (Legrand-Abravanel Clin Vaccine Immunol, 2009 ; Abravanel J Clin Virol, 2013 ; Abravanel J Clin Virol, 2015) et de l'ARN VHE (Abravanel J Clin Microbiol 2012 ; Abravanel J Clin Microbiol 2013) ayant fait l'objet de plusieurs évaluations par le CNR, un algorithme diagnostique des infections par le VHE a été proposé dès 2013 (Kamar Clin Microbiol Rev 2014). Cet algorithme a permis d'accroitre de manière substantielle le nombre d'infections à VHE répertoriées en France.