

Rapport annuel d'activité

2021

Centre national de référence

**Virus des hépatites à
transmission entérique**

**Années d'exercice
2019-2020**

Résumé analytique (en français et en anglais)

Le CNR des virus des hépatites à transmission entérique est coordonné par le 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.

Pour le VHA, l'année 2017 avait été marquée par une épidémie d'hépatites A de grande ampleur touchant particulièrement les homosexuels masculins (HSH). En 2018 et en 2019, la dynamique de surveillance s'est poursuivie à des niveaux plus élevés qu'avant 2017, avec 919 et 865 prélèvements reçus au CNR dont respectivement 45 et 42% étaient virémiques. Toutefois, si les souches de l'épidémie 2017 représentaient encore 47% des souches responsables des cas d'hépatite A en 2018, elles ne représentaient plus que 3% des souches identifiées au CNR en 2019. L'activité de caractérisation des souches de VHA s'est poursuivi en 2020 et est en cours d'analyse.

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 (Centres hospitaliers, laboratoires privés, Etablissement Français du sang) impliqués dans le diagnostic virologique en France. Nous avons répertorié 2577 et 2158 cas d'hépatite E symptomatique ainsi que 85 et 71 cas asymptomatiques chez les donneurs de sang en 2019 et 2020 respectivement. Le génotype a été étudié par séquençage pour 980 échantillons ARN VHE positifs.

The Reference Centre for enterically transmitted hepatitis viruses is coordinated by 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 a large outbreak among homosexual men (MSM) with an incentive for active surveillance of strains causing hepatitis A in men. In 2018 and 2019, this dynamic of sending strains to the reference centre continued, with 919 and 865 sent to the lab (45 and 42 % were HAV RNA positive). The epidemic strain represented 47% of the strains identified in 2018, it was only 3% in 2019. The activity of the NRC continued in 2020 and the data are still under investigation.

Regarding HEV, the reference centre is in charge of the survey of HEV in France by collecting the HEV cases transmitted by its partners (public hospitals, private labs and Etablissement Français

du sang) implicated in the diagnosis of HEV. We report 2577 and 2158 symptomatic cases and 85 and 71 asymptomatic cases among blood in a2019 and 2020 respectively.

1 Missions et organisation du CNR

Pour le VHA, un technicien, un ingénieur et 1 biologiste ont été impliqués dans le fonctionnement du CNR : Eric Marchadier, Dr Lisa Mouna et Pr Anne Marie Roque. Le Pr Anne Marie Roque-Afonso coordonne le CNR VHA, le Dr Lina Mouna, ingénieur, assure la fonction de responsable adjoint. Le CNR VHA est accrédité selon la norme ISO 15189 pour les techniques sérologiques.

Pour le VHE, deux ingénieurs et trois biologistes ont été impliqués dans le fonctionnement du CNR : Martine Dubois, Chloé Dimeglio, 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

- En 2019 et 2020, caractérisation de 980 souches de VHE et 363 souches de VHA transmises par les partenaires du CNR (Centres hospitaliers, laboratoires privés) et 99 souches de donneurs de sang transmises par l'Etablissement Français du sang.

Les techniques disponibles au CNR sont présentées en annexe 2.

2.1 Évolutions des techniques

Le CNR VHE a développé une technique de détection et de séquençage de l'ARN du VHE de l'espèce *Orthohepevirus C* (virus présent chez le rat).

Pas d'évolution technique pour le CNR VHA.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

Le CNR VHA a vérifié l'exactitude autour de la valeur seuil de 20 mUI/ml des tests de détection des anticorps totaux ou IgG anti-VHA. Aucun des tests analysés (Cobas Roche, Vidas Biomérieux, Liaison XL Diasorin, Biorad, Vitros, Beckman, Architect Abbott) ne produisait un résultat positif pour des titres <20 mUI/ml. Les patients candidats à une vaccination VHA sont ainsi correctement identifiés par ces tests.

Pas d'évaluations de technique en 2019-2020 pour le CNR VHE.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

La technique de détection de l'ARN VHE dans les selles a été transmise aux CHU de Lyon et de Nantes.

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.

Le CNR VHE dispose d'une collection clinique de plus de 2000 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 surnageants de culture de souches cliniques (génotypes 1, 3f et 3c).

2.5 Activités d'expertise

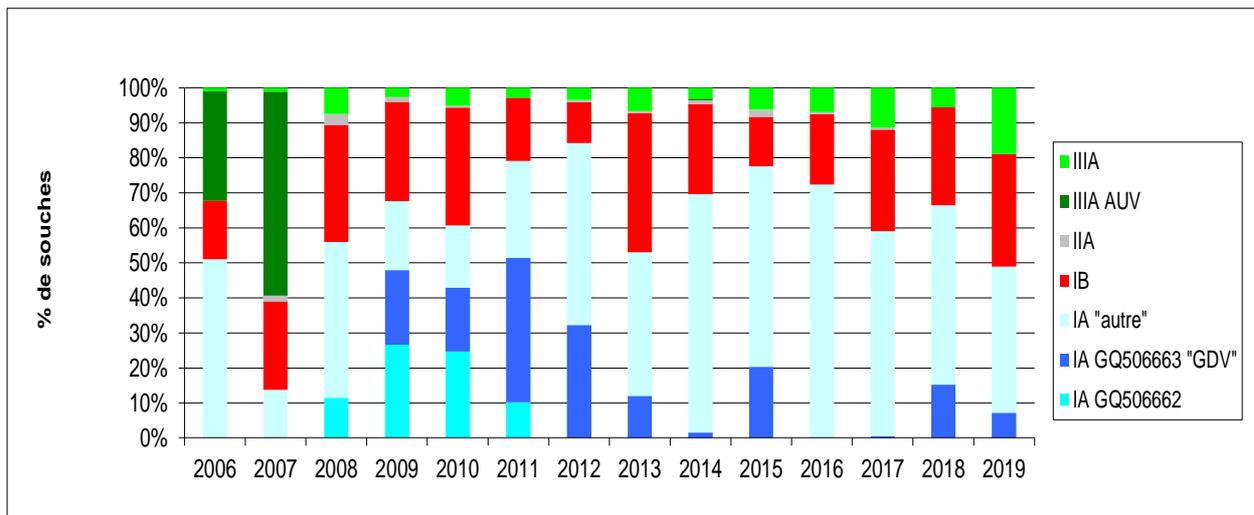
HEPATITE A

L'année 2017 avait été marquée par une épidémie d'hépatites A de grande ampleur touchant particulièrement les homosexuels masculins (HSH). En 2018 et en 2019, la dynamique de surveillance s'est poursuivie à des niveaux plus élevés qu'avant 2017, avec 919 et 865 prélèvements reçus au CNR dont respectivement 45 et 42% étaient virémiques. Toutefois, si les souches de l'épidémie 2017 représentaient encore 47% des souches responsables des cas d'hépatite A en 2018, elles ne représentaient plus que 3% des souches identifiées au CNR en 2019.

Le pourcentage d'hommes parmi les cas est redevenu proche des valeurs pré-épidémiques, passant de 83,2% en 2017, à 67 et 66% en 2018 et 2019. Il en va de même pour l'âge moyen des cas : 35±14 ans en 2017, contre 32±19 et 29±20 ans en 2018 et 2019.

Parmi les 504 échantillons non virémiques, une fraction importante (73%) correspondait à du diagnostic simple, par exemple dans le cadre de l'exploration d'une cytolyse hépatique. Le CNR rappelle régulièrement, que le diagnostic positif d'hépatite A repose sur la positivité des IgM, qu'il ne faut pas hésiter à répéter à 24-48h, en cas de négativité mais avec forte suspicion clinique. L'autre fraction d'échantillons non virémiques, correspondait à des échantillons avec IgM VHA positives mais avec avidité élevée des IgG VHA et permettaient ainsi d'exclure une infection VHA en cours.

Les souches identifiées étaient majoritairement de génotype IA (49,8%), IB (31%) et IIIA (19,2%) :



Cette surreprésentation inhabituelle du génotype IIIA tient à une surveillance active des cas de VHA survenus à Mayotte. La souche de génotype IIIA circulant à Mayotte est distincte des souches retrouvées à Madagascar et à la Réunion. Il s'agit également de souches distinctes de celles isolées au Comores (génotype IB).

Les souches typées provenaient de toutes les régions de France ; Corse exceptée. Les souches identifiées en Ile de France (37,4%) et dans les DROM (15%) représentaient à elles seules 50% des souches isolées en 2019.

HEPATITE E

En 2019, le laboratoire de virologie du CHU de Toulouse a réalisé 6545 analyses sérologiques (-5,9% par rapport à 2018) et 6974 tests moléculaires (+12% par rapport à 2018) pour le diagnostic et la caractérisation des souches de VHE.

En 2020, le laboratoire de virologie du CHU de Toulouse a réalisé 5857 analyses sérologiques (-10,5% par rapport à 2019) et 5646 tests moléculaires (-19% par rapport à 2019) pour le diagnostic et la caractérisation des souches de VHE. Cette baisse d'activité est probablement liée à la crise sanitaire. Les laboratoires partenaires du CNR ont transmis moins d'échantillons pour le typage des souches.

Les échantillons analysés étaient originaires de patients vivant en France métropolitaine ou dans les départements et régions d'outre-mer (Polynésie française, Réunion, Martinique, Nouvelle Calédonie). Nous avons également réalisé des génotypages pour des souches de VHE de donneurs de sang de Slovénie en 2019.

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

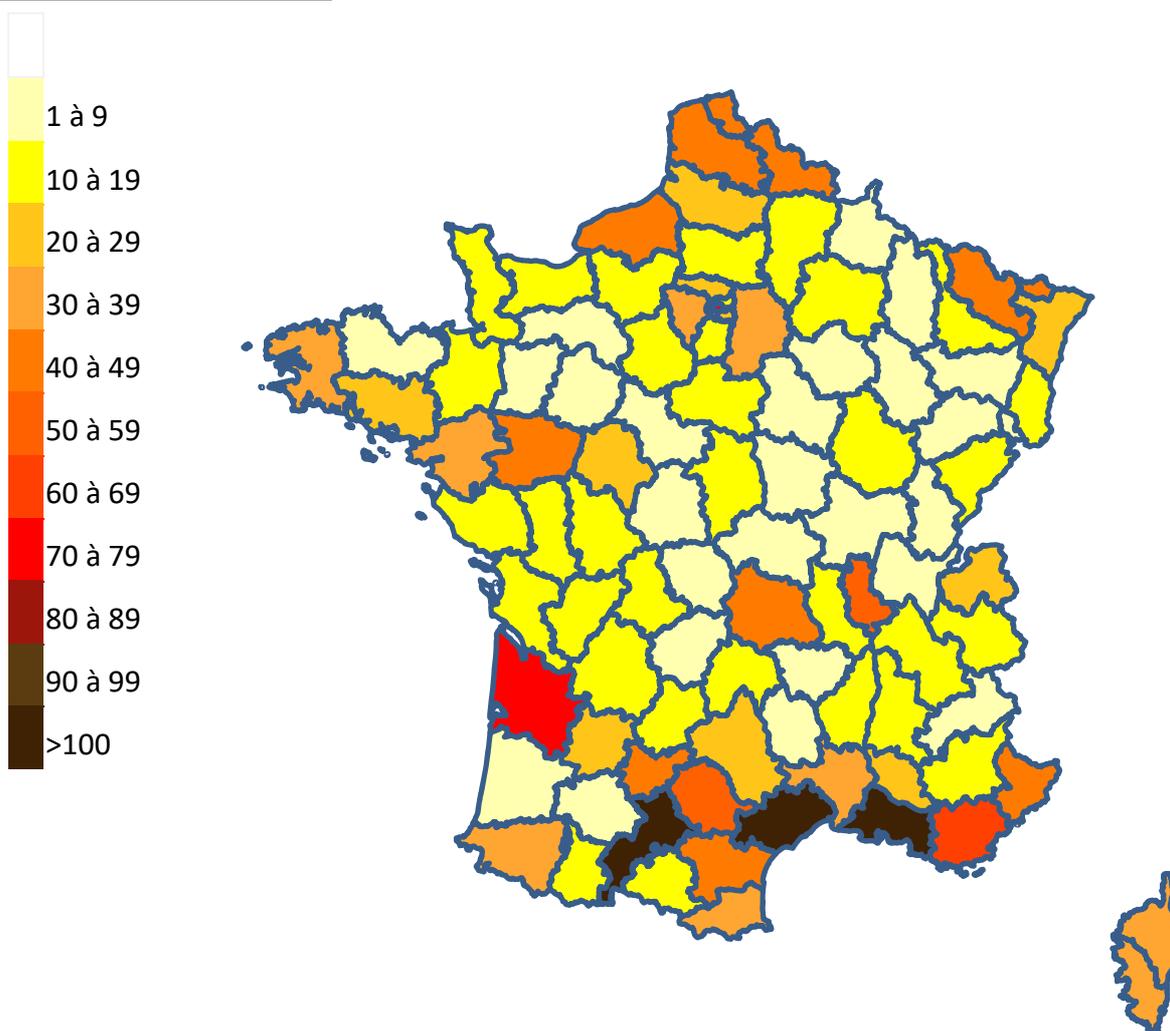
	Nb patients testés	NB cas certains ou probables			% cas positifs parmi les échantillons testés
		Total	Importés	Autochtones	
2002	209	13	4	9	6,2
2003	155	14	11	3	9,0
2004	233	20	4	16	8,5
2005	327	39	19	20	11,9
2006	583	38	14	24	6,5
2007	1012	107	10	97	10,5
2008	1700	180	21	159	10,5
2009	2150	206	23	183	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
2018	90000	2642	26	2616	2,9
2019	80000	2577	26	2551	3,2
2020	90000	2158	5	2153	2,4

Synthèse : En 2019 environ 80 000 patients ont été testés et 2577 cas d'hépatite E symptomatiques ont été répertoriés par le CNR. L'âge moyen des cas était de 55 ± 16 ans. Le rapport Homme/Femme était de 1,2.

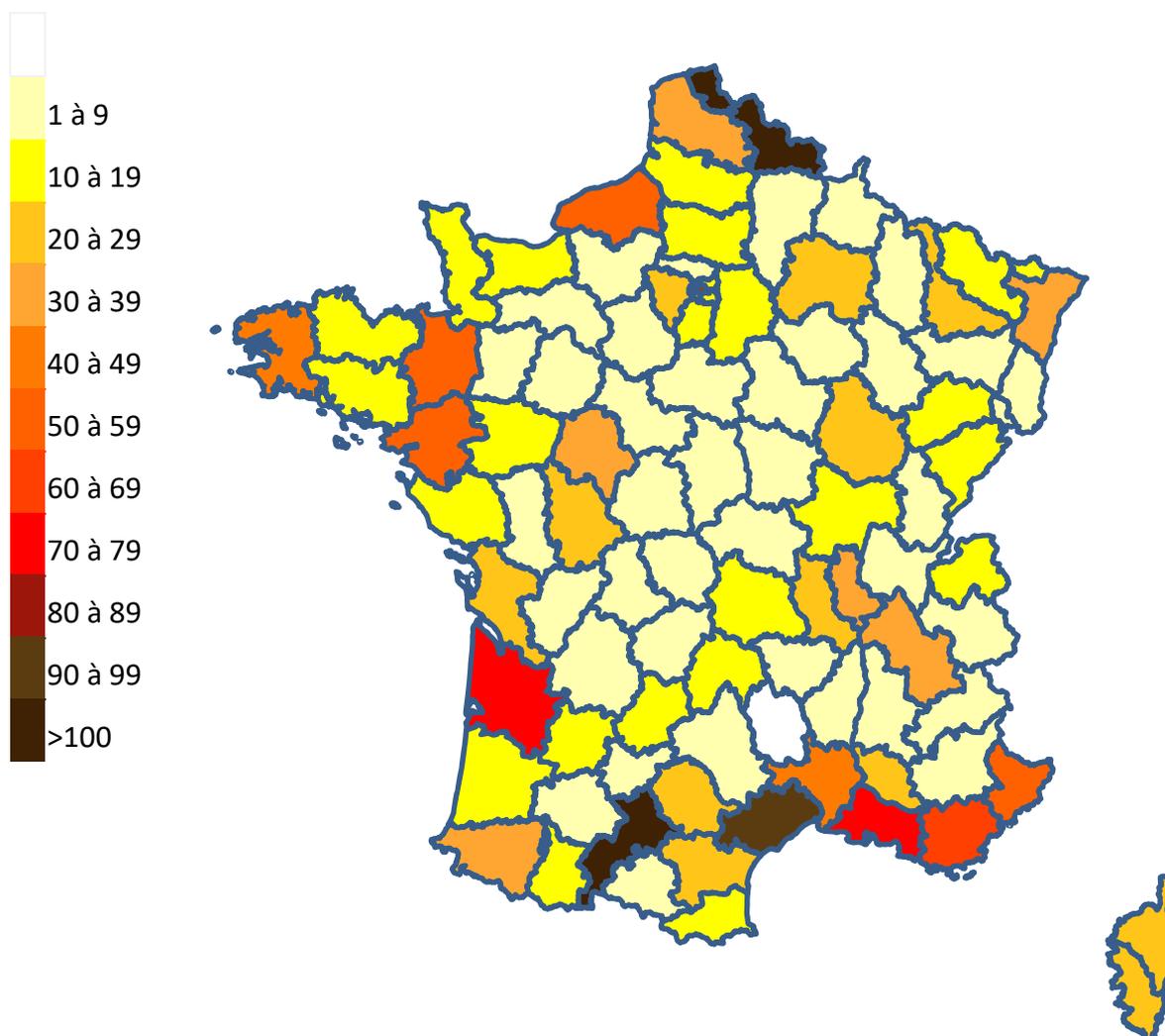
De même en 2020, environ 90 000 patients ont été testés et 2158 cas d'hépatites E symptomatiques ont été diagnostiqués. La majorité des cas sont autochtones. L'âge moyen des cas était de 55 ± 16 ans. Le rapport Homme/Femme était de 1,3.

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

Répartition des cas en 2019



Répartition des cas en 2020



2.6 Activités de séquençage

HEPATITE A

Le CNR VHA n'utilise pas en routine les techniques NGS, et une évolution vers un typage génome entier sur une fraction des souches adressées aux CNR est toujours 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 qui sera remplacé en 2019 par un séquenceur SeqStudio 4 capillaires. 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.

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
- Aquisition en 2020 d'un Sequel I de Pacific Biosciences (3^{ème} génération – longs fragments) au laboratoire de virologie de Toulouse afin de développer en routine un technique de séquençage de génomes complets du VHE ainsi que l'étude des quasiespèces virales.

Nous avons également accès à du séquençage très haut débit sur la plateforme génomique/bio-informatique de Genotoul (INRA) : équipements Illumina (NextSeq et navaseq 6000), Oxford Nanopore et Pacific Biosciences.

Le CNR VHE s'appuie sur à la cellule bio-informatique du pôle biologie constituée de 5 bio-informaticiens dont deux sont dédiés aux projets de virologie. 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 de cas groupés ou d'enquêtes transfusionnelles (22 enquêtes réalisées en 2019-2020) et dans le cadre de la surveillance des souches circulant chez les patients symptomatiques ARN VHE positifs ou les donneurs de sang. Le séquençage Sanger a été réalisé de manière systématique (pas de sélection des souches).

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.

Nous avons réalisé le séquençage de génome complet de 181 nouvelles souches de HEV de génotype 3 avec la technologie Pacbio Sequel (Nicot, Front Microbiol, 2021). Nous évaluons actuellement la technologie de séquençage de 3^{ème} génération d'Oxford Nanopore pour le séquençage de génomes complets.

Activités de surveillance

2.7 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. 2010, 2012 et 2017 ont été marquées par une recherche active de cas à la demande des ARS. Le nombre de souches analysées par rapport au nombre de cas déclarés varie entre 17 et 36%.

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, Brest, Nice, Poitiers, Reims et Rouen.

D'autre part, les CHU de Bordeaux, Besançon, Caen, Clermont-Ferrand, Grenoble, Limoges, Lille, Lyon, Montpellier, Nîmes, Nantes, Nancy, Rennes, Saint-Etienne, 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.

En 2020, le laboratoire Innovie a communiqué ses cas au CNR et va transmettre ses échantillons positifs pour typage à partir de 2021.

2.8 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

Un total de 652 et 496 souches étaient disponibles pour cette analyse en 2019 et 2020 respectivement. Le génotype a été étudié par séquençage pour 980 échantillons ARN VHE positifs. Pour 168 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, 2020 ; Nicot Rev Med Virol, 2018).

La répartition des génotypes caractérisés était la suivante :

Génotype	1	2	4	3a	3chi	3e	3f	3m	3 lapin	3 Non ss-typé
Nombre en 2019 (%)	9 1.6%	0	5 0.9%	7 1.3%	201 36.2%	7 1.3%	313 56.4%	10 1.8%	1 0.2%	2 0.4%
Nombre en 2020 (%)	2 0.5%	1 0.25%	5 1.2%	2 0.5%	170 40.1%	5 1.2%	221 53%	14 3.4%	1 0.25%	3 0,7%

Dans le groupe 3chi, selon la terminologie actuelle, ce sont les génotypes 3c qui sont prédominants en 2020, 3c (n=162, 95,3%) 3h (n=5, 3%) 3i (n=1 ; 0,5%) 3l (n=1 ; 0,5%).

Tous les cas d'infection avec un génotype 1 ont été identifiés chez des patients ayant voyagé en Afrique ou en Asie. En revanche, tous les cas d'infection avec un génotype 4 ont été identifiés chez des patients n'ayant pas voyagé hors de France. Parmi les 9 infections avec un génotype 3a, 3 ont été identifiés chez des donneurs de sang de Slovénie et 2 chez des sujets américains.

Surveillance nationale en collaboration avec l'Établissement 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=85 en 2019 et n=47 en 2020) ont été adressés au laboratoire de virologie du CHU de Toulouse pour quantification et typage des souches.

Les virémies des donneurs allaient de 1,5 à 7,3 log₁₀ UI/ml. La distribution des génotypes retrouvés chez les donneurs virémiques était la suivante :

Génotype	3chi	3f	3m	4b
Nombre en 2019 (%)	28 65.1%	14 32.6%	0	1 2.3%
Nombre en 2020 (%)	24 63.2%	12 31.6%	2 5.2%	0

Pour 51 échantillons, le génotype n'a pas pu être déterminé du fait d'une charge virale trop faible.

Surveillance nationale en collaboration avec le Centre de Transfusion Sanguine des Armées (CTSA)

Dans le cadre du dépistage génomique réalisé par le CTSA chez tous les donneurs de plasma, les échantillons positifs (n=20 en 2019 et n=24 en 2020) 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 5,7 log₁₀ UI/ml. La distribution des génotypes retrouvés chez les donneurs virémiques était la suivante :

Génotype	3chi	3f
Nombre en 2019 (%)	7 53,8	6 46,2%
Nombre en 2020 (%)	17 94,5%	1 5,5%

Pour 13 échantillons, le génotype n'a pas pu être déterminé du fait d'une charge virale trop faible.

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

En collaboration avec le réseau de partenaire, une étude multicentrique internationale a inclus 255 transplantés d'organe solide de 30 centres européens afin de préciser l'efficacité de la ribavirine chez les patients infectés chroniquement par le VHE. Le taux de succès thérapeutique était de 81,2%. Une sous-étude virologique a étudié les mutations dans la polymérase virale chez 112 patients qui pourraient avoir un impact sur la réponse au traitement. La fréquence des mutations dans la polymérase était similaire chez les patients en succès thérapeutique (57/82, 69,5%) et chez les patients en échec de traitement 19/30, (63,3%, $p=0.65$). La recherche de mutation dans la polymérase virale avant traitement ne présente donc pas d'intérêt clinique (Kamar, Clinical Infectious Diseases, 2019). Des études sur génome complet sont en cours.

2.10 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Le CNR des virus des hépatites à transmission entérique 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.

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

Le CNR VHE participe au réseau européen de surveillance HEVNet en collaboration avec l'ECDC.

Une harmonisation des typages fondée sur l'utilisation des souches de référence proposées par un groupe d'expert a été réalisée (Smith et al, J Gen Virol, 2020).

2.11 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

HEPATITE E

- Nous avons étudié la prévalence des infections par le VHE, le génotype circulant et les facteurs de risque d'exposition au virus au Burkina Faso. Nous avons testé 900 échantillons de patients présentant un ictère fébrile et négatif pour la fièvre jaune. Ainsi, 23/900 (2.6%) des patients avaient des marqueurs d'infection aiguë (IgM VHE et/ou ARN VHE positif). Le génotype a été déterminé pour 14 échantillons, il s'agissait du génotype 2b pour tous les patients écartant une transmission zoonotique dans ce pays. La prévalence des IgG était de 18.2% (164/900). La séroprévalence augmentait avec l'âge et était plus importante au nord du pays dans les zones arides (Diméglio, Viruses, 2019).

3 Alerte

4.1 Procédure d'alerte

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

4.2 Détection et investigation des cas groupés et phénomènes anormaux

HEPATITE A

Le CNR VHA a investigué des cas des îles de l'océan Indien. La souche de génotype IIIA circulant à Mayotte est distincte des souches retrouvées à Madagascar et à la Réunion. Il s'agit également de souches distinctes de celles isolées au Comores (génotype IB).

Pas d'enquêtes transfusionnelle pour le CNR VHA.

HEPATITE E

Enquêtes lors de suspicion de contamination transfusionnelle

En 2019, le CNR a été sollicité pour réaliser 15 enquêtes avec suspicion de contamination transfusionnelle.

- Deux patientes hospitalisées en oncohématologie au CHU de Brest. Les 2 patientes étaient infectées par un virus de génotype 3. Le donneur de produits sanguins labiles administrés au patient a été testé en PCR et était ARN VHE positif (727 000UI/mL) avec un génotype 3. Les résultats ont montré une homologie de séquences entre les souches VHE 3 du donneur et des 2 receveuses.
- Patient hospitalisé dans le privé. Le patient était infecté par un virus de génotype 3c. Le donneur de produits sanguins labiles administrés au patient a été testé en PCR et était ARN VHE positif (358 000UI/mL) avec un génotype 3c. Les résultats ont montré une homologie de séquences entre les souches VHE 3c du donneur et du receveur.
- Patiente hospitalisée au CHU de Nantes. La patiente était infectée par un virus de génotype 3c. Le donneur de produits sanguins labiles administrés au patient a été testé en PCR et était ARN VHE positif (57 900UI/mL) avec un génotype 3c. Les résultats ont montré une homologie de séquences entre les souches VHE 3c du donneur et de la receveuse.
- Patient ayant reçu une allogreffe suite à une leucémie aiguë hospitalisée au CHU de Clermont Ferrand. Le patient était infecté par un virus de génotype 3c. Le donneur de

produits sanguins labiles administrés au patient a été testé en PCR et était ARN VHE positif (4 130 UI/mL) avec un génotype 4b, écartant une contamination transfusionnelle.

- Patient allogreffé hospitalisé au CHU de Nantes. Le patient était infecté par un virus de génotype 3f. Le donneur de produits sanguins labiles administrés au patient a été testé en PCR et était ARN VHE positif (470 000UI/mL) avec un génotype 3c, écartant une contamination transfusionnelle.
- Patiente atteinte d'une LAM-0 hospitalisée au CHU de Clermont Ferrand. La patiente était infectée par un virus de génotype 3c. Les 55 donneurs de produits sanguins labiles administrés au patient ont été testés en PCR. Un donneur était ARN VHE positif (8990 UI/mL) avec un génotype 3f. Un donneur était ARN VHE positif (208 000 UI/mL) avec un génotype 3c. Les résultats n'ont pas montré d'homologie de séquences entre les souches VHE 3c du donneur et du receveur.
- Patiente hospitalisée au CHU de Montpellier. Les 25 donneurs de produits sanguins labiles administrés au patient ont été testés en PCR. Les dons étaient tous négatifs.
- Patient atteint d'un myélome multiple réfractaire hospitalisé au CHU de Lille. Le patient était infecté par un virus de génotype 3f. Les 16 donneurs de produits sanguins labiles administrés au patient ont été testés en PCR. Les dons étaient tous négatifs.
- Patient hospitalisé au CHU de Lille. Le patient était infecté par un virus de génotype 3f. Les 124 donneurs de produits sanguins labiles administrés au patient ont été testés en PCR. Quatre donneurs étaient ARN VHE positif (316 ; 312 ; 365 et 45 UI/mL) dont 3 avec un génotype 3c, le génotype du virus du 4^{ème} donneur n'ayant pu être déterminé.
- Patient hospitalisé au CHU de Lille. Le patient a été infecté par un virus de génotype 3c. Les 33 donneurs de produits sanguins labiles administrés au patient ont été testés en PCR. Les dons étaient tous négatifs.
- Patiente hospitalisée au CHU de Montpellier. Les 29 donneurs de produits sanguins labiles administrés au patient ont été testés en PCR. Les dons étaient tous négatifs.
- Patiente hospitalisée en oncohématologie au CHU de Nice. La patiente était infectée par un virus de génotype 3c. Les 39 donneurs de produits sanguins labiles administrés au patient ont été testés en PCR. Les dons étaient tous négatifs.
- Patient ayant reçu une greffe cardiaque au CHU de Marseille. Le patient a été infecté par un virus de génotype 3. Les 5 donneurs de produits sanguins labiles administrés au patient ont été testés en PCR. Les dons étaient tous négatifs.
- Patiente atteinte d'une LAM hospitalisée au CHU de St Etienne. La patiente était infectée par un virus de génotype 3c. Les 36 donneurs de produits sanguins labiles administrés au patient ont été testés en PCR. Les dons étaient tous négatifs.

- Patiente hospitalisée en gastroentérologie au CHU de Caen. La patiente était infectée par un virus de génotype 3c. Les 3 donneurs de produits sanguins labiles administrés au patient ont été testés en PCR. Les dons étaient tous négatifs.

En 2020, le CNR a été sollicité pour réaliser 7 enquêtes avec suspicion de contamination transfusionnelle.

- Patiente suivie à l'hôpital Saint Louis transfusée pour aplasie suite à une greffe de cellules souches hématopoïétiques. La patiente était infectée par un virus de génotype 3f. Les 12 donneurs de produits sanguins labiles administrés à la patiente ont été testés en PCR. Un donneur était ARN VHE positif (77600 UI/mL) avec un génotype 3f. Les résultats ont montré une homologie de séquences entre les souches VHE 3f du donneur et du receveur.
- Patient hospitalisé au CHU de Nice. Le patient était infecté par un virus de génotype 3f. Les 70 donneurs de produits sanguins labiles administrés au patient ont été testés en PCR. Un donneur était ARN VHE positif (354 UI/mL) avec un génotype 3f. Les résultats ont montré une homologie de séquences entre les souches VHE 3f du donneur et du receveur.
- Patient greffé de moelle osseuse hospitalisé au CHU de Bordeaux. Le patient était infecté par un virus de génotype 3c. Le donneur était ARN VHE positif (946 000 UI/mL) avec un génotype 3c. Les résultats ont montré une homologie partielle de séquences entre les souches VHE 3c du donneur et du receveur, rendant possible une transmission transfusionnelle.
- Patiente hospitalisée au CHU de Bordeaux. La patiente était infectée par un virus de génotype 3c. Le donneur était ARN VHE positif (946 000 UI/mL) avec un génotype 3c. Les résultats ont montré une homologie partielle de séquences entre les souches VHE 3c du donneur et du receveur, rendant possible une transmission transfusionnelle.
- Patient hospitalisé dans le service de gastroentérologie au CHU de Lille. Le patient était infecté par un virus de génotype 3c. Les 4 donneurs de produits sanguins labiles administrés au patient ont été testés en PCR. Les dons étaient tous négatifs.
- Patient allogreffé hospitalisé au CHU de Bordeaux. Le patient était infecté par un virus de génotype 3f. Les 222 donneurs de produits sanguins labiles administrés au patient ont été testés en PCR. Les dons étaient tous négatifs.
- Patient hospitalisé au CHU d'Angers. Le patient était infecté par un virus de génotype 3e. Les 20 donneurs de produits sanguins labiles administrés au patient ont été testés en PCR. Les dons étaient tous négatifs.

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

Ce chapitre concerne principalement les activités à destination des professionnels de santé (notamment

formation aux techniques de laboratoire); les activités liées à l'enseignement et la formation universitaires sont exclues.

4.1 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 paru début 2019.

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

Le CNR a rédigé les fiches sur le VHE accessibles sur le site de la Société Française de Microbiologie (SFM).

Le CNR a rédigé le chapitre Hepatitis A and E Viruses in Manual of Clinical Microbiology, 12th edition.

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 2018, 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 et conditions d'acheminement.

- **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.

4.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

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 ; et 22 mars 2019 ; 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 ...)

Le Pr J. Izopet a réalisé un interview sur le VHE pour France 3 en 2019.

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

6.1 Activités de recherche en cours ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

- Nous avons développé un modèle de culture de cellules primaires épithéliales intestinales ou de lignées hépatocytaires polarisées en système transwell. Nous avons pu montrer la réplication de souches cliniques du VHE dans les 2 systèmes. Nous avons montré que les virus de génotypes 1 et 3 peuvent se multiplier dans des entérocytes ou les hépatocytes polarisés avec une libération préférentielle des particules infectieuses vers le pôle apical de la cellule sous une forme quasi-enveloppée. Nous avons observé une localisation de la protéine de capsid au niveau des cryptes intestinales d'une patiente chroniquement infectée (Marion, Gut 2019 et Capelli, J Virol, 2019).
- Une fraction des donneurs de plasma est screenée pour le VHE depuis 2014. Nous avons étudié la fréquence de détection de l'ARN viral, les charges virales et les génotypes retrouvés chez les donneurs de sang en les comparant aux patients symptomatiques diagnostiqués au CNR. Le taux de détection de dons positifs était de 0,10%. Les charges virales des donneurs de plasma asymptomatiques étaient inférieures aux charges virales des patients symptomatiques (médiane 717 UI/mL vs 282 000 IU/mL, $p < 0,01$). La distribution des génotypes viraux retrouvés chez les donneurs asymptomatiques et chez les patients symptomatiques était similaire (Lhomme, J Viral Hepatitis, 2019).
- Nous avons analysé les données cliniques et biologiques de patients infectés par le sous type 3c et 3f en France. Nous avons observé que le génotype 3f était associé à plus de fièvre (OR: 6.1 95%CI: 1.4-26.1), des virémies plus élevée (OR: 7.4; 95%CI: 1.3-42.2) et une hospitalisation plus fréquente (OR: 7.6; 95%CI: 1.1-51.4) (Abravanel, Liver Int, 2020). Ces résultats sont concordants avec une étude belge qui a rapporté un risque plus élevé d'hospitalisation lors d'infection avec le sous-type 3f par rapport au sous-type 3c.
- A partir de 114 séquence de génome complet du HEV de génotype 3, nous avons pu montrer que la fréquence des insertions ou duplications dans la région riche du génome viral était de 6,1%. Ces virus recombinants ont été retrouvés chez des patients à la phase aiguë et à la phase chronique de l'infection. Ces insertions augmentent la charge nette de la protéine et augmente potentiellement le nombre de sites de régulation de la protéine virale (Lhomme, Frontiers Microbiol, 2020).

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

HEPATITE A

- 1- Gallian P, Barlet V, Mouna L, Gross S, Morel P, Le Cam S, Ricard C, Maugard C, Pouchol E, Flan B, Visse C, Djoudi R, Figoni J, De Valk H, Tiberghien P, Roque-Afonso AM. Persisting higher prevalence of hepatitis A virus RNA in blood donors, France, 2018. Euro Surveill. 2019 Nov;24(47):1900695
- 2-Izquierdo L, Mellon G, Buchaillet C, Fac C, Soutière MP, Pallier C, Dulioust A, Roque-Afonso AM. PLoS One. 2019 Jun 26;14(6):e0218482. Prevalence of hepatitis E virus and reassessment of HIV and other hepatitis virus seroprevalences among French prison inmates. Izquierdo L, Mellon G, Buchaillet C, Fac C, Soutière MP, Pallier C, Dulioust A, Roque-Afonso AM. PLoS One. 2019 Jun 26;14(6):e0218482.
- 3-Abi Nader E, Girard M, Leruez-Ville M, Sissaoui S, Lacaille F, Roque-Afonso AM, Debray Seroprevalence of Hepatitis E virus infection in children after liver transplantation: A single-center experience in France. D.Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2020 Apr;44(2):174-180.
- 4-Guillaume M, Mouna L, Coustillères F, Lemée V, Roque-Afonso AM, Mourez T, Lefaucheur R. Invasive meningoencephalitis as the first manifestation of hepatitis A. J Viral Hepat. 2019 Nov;26(11):1330-1333
- 5-Enkirch T, Severi E, Vennema H, Thornton L, Dean J, Borg ML, Ciccaglione AR, Bruni R, Christova I, Ngui SL, Balogun K, Němeček V, Kontio M, Takács M, Hettmann A, Korotinska R, Löve A, Avellón A, Muñoz-Chimeno M, de Sousa R, Janta D, Epštein J, Klamer S, Suin V, Aberle SW, Holzmann H, Mellou K, Ederth JL, Sundqvist L, Roque-Afonso AM, Filipović SK, Poljak M, Vold L, Stene-Johansen K, Midgley S, Fischer TK, Faber M, Wenzel JJ, Takkinen J, Leitmeyer K. Improving preparedness to respond to cross-border hepatitis A outbreaks in the European Union/European Economic Area: towards comparable sequencing of hepatitis A virus. Euro Surveill. 2019 Jul;24(28):1800397
- 6- Nicolay N, Le Bourhis-Zaimi M, Lesourd A, Martel M, Roque-Afonso AM, Erouart S, Etienne M, Ndeikoundam Ngangro N. A description of a hepatitis A outbreak in men who have sex with men and public health measures implemented in Seine-Maritime department, Normandy, France, 2017. BMC Public Health. 2020 Sep 22;20(1):1441

HEPATITE E

- 1- Marion O, Abravanel F, Izopet J, Kamar N. Failure to respond to ribavirin despite elevated intracellular zinc level in transplant-patients with chronic hepatitis E virus infection. Transpl Infect Dis. 2019 Jan 21:e13050.
- 2- Marion O, Capelli N, Lhomme S, Dubois M, Pucelle M, Abravanel F, Kamar N, Izopet J. Hepatitis E virus genotype 3 and capsid protein in the blood and urine of immunocompromised patients. J Infect. 2019 Mar;78(3):232-240.
- 3- Marion O, Lhomme S, Abravanel F, Izopet J, Kamar N. Should 12 or 24 weeks post-ribavirin follow-up be considered to define sustained virological response in transplant-patients treated for chronic hepatitis E virus infection? Transpl Infect Dis. 2019 Mar 12:e13065.
- 4- Abravanel F, Goutagny N, Joffray R, Eichenlaub E, Baron S, Aversenq A, Bourg S, Mercier L, Larue Triolet A, Poirault D, Loubet M, Daniel S, Luciani F, Pothion C, Tourneur C, Dugua JM, Lhomme S, Izopet J. Performance characteristics of the VIDAS® ANTI-HEV IgM and IgG assays. J Clin Virol. 2019 Mar;112:10-14

- 5- Marion O, Lhomme S, Del Bello A, Abravanel F, Esposito L, Hébral AL, Lavayssière L, Cointault O, Ribes D, Izopet J, Kamar N. Monitoring hepatitis E virus fecal shedding to optimize ribavirin treatment duration in chronically infected transplant patients. *J Hepatol*. 2019 Jan;70(1):206-209.
- 6- Capelli N, Marion O, Dubois M, Allart S, Bertrand-Michel J, Lhomme S, Abravanel F, Izopet J, Chapuy-Regaud S. Vectorial Release of Hepatitis E Virus in Polarized Human Hepatocytes. *J Virol*. 2019 Feb 5;93(4).
- 7- S. Lhomme, F. Abravanel, N. Kamar, J. Izopet. Screening, diagnosis and risks associated with Hepatitis E infection. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 2019;17:403-418.
- 8- C. Diméglio, D. Kania, J. Mbombi Mantono, T. Kagoné, S. Zida, S. Tassebedo, A. Dicko, B. Tinto, S. Yaro, H. Hien, J. Rouamba, B. Bicaba, I. Medah, N. Meda, O. Traoré, E. Tuillon, F. Abravanel, J. Izopet. Hepatitis E virus infections among patients with acute febrile jaundice in Burkina Faso. *Viruses* 2019;554:1-9.
- 9- J. Izopet, P. Trémeaux, O. Marion, M. Miguères, N. Capelli, S. Chapuy-Regaud, JM. Mansuy, F. Abravanel, N. Kamar, S. Lhomme. Hepatitis E virus infections in Europe. *Journal of Clinical Virology* 2019;120:20-26.
- 10- P. Gallian, E. Pouchol, R. Djoudi, S. Lhomme, L. Mouna, S. Gross, P. Bierling, A. Assal, N. Kamar, V. Mallet, AM. Roque-Afonso, J. Izopet, P. Tiberghien. Transfusion-transmitted hepatitis E virus infection in France. *Transfusion Medicine Reviews* 2019;33:146-153.
- 11- S. Lhomme, S. DebRoy, N. Kamar, F. Abravanel, D. Metsu, O. Marion, C. Dimeglio, SJ. Cotler, J. Izopet, H. Dahari. Plasma Hepatitis E Virus Kinetics in Solid Organ Transplant Patients Receiving Ribavirin. *Viruses* 2019;11:7.
- 12- S. Lhomme, P. Gallian, C. Diméglio, F. Abravanel, P. Tiberghien, J. Izopet. Viral load and clinical manifestations of hepatitis E virus genotype 3 infections. *J Viral Hepatitis* 2019;26:1139-1142.
- 13- IM. Sayed, L. Verhoye, C. Montpellier, F. Abravanel, J. Izopet, L. Cocquerel, P. Meuleman. Study of hepatitis E virus ORF2 antigen kinetics in human-liver chimeric mice and its impact on HEV diagnosis. *Journal of Infectious Diseases* 2019;220:811-819.
- 14- A. Del Bello, F. Abravanel, L. Alric, L. Lavayssière, S. Lhomme, J. Bellière, J. Izopet, N. Kamar. No evidence of occult hepatitis C or E virus infections in liver-transplant patients with sustained virological response after therapy with direct acting agents. *Transplant Infectious Disease* 2019;21:e13093.
- 15- A. Xhaard, AM. Roque-Afonso, V. Mallet, P. Ribaud, S. Nguyen-Quoc, PS. Rohrlisch, R. Tabrizi, J. Konopacki, S. Lissandre, F. Abravanel, RP. Latour, A. Huynh. Hepatitis E and Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A French Nationwide SFGM-TC Retrospective Study. *Viruses* 2019;11(7).
- 16- Protin, F. Abravanel, L. Alric, S. Tavitian, L. Obéric, J. Izopet, G. Martin-Blondel, L. Ysebaert. Ribavirin for chronic Hepatitis E virus infection in ibrutinib-exposed patients. *Open Forum Infect Dis* 2019;6:ofz345.
- 17- I.B. Olsoy, S. Henriksen, F.H. Weissbach, M. Larsen, K. Borgen, F. Abravanel, N. Kamar, E.J. Paulsen, H.H. Hirsch, C.H. Rinaldo. Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) in a general adult population in Northern Norway: the Tromsø study. *Med Microbiol Immunol*, 2019, 208 :715-725
- 18- N. Capelli, M. Dubois, M. Pucelle, I. Da Silva, S. Lhomme, F. Abravanel, S. Chapuy-Regaud, J. Izopet. Optimized HEV culture and its application to measurements of HEV infectivity. *Viruses* 2020;12:1-11.
- 19- S. Lhomme, O. Marion, F. Abravanel, J. Izopet, N. Kamar. Clinical manifestations, pathogenesis and treatment of hepatitis E virus infections. *Journal of Clinical Medicine* 2020;9:1-25.
- 20- A. Yroni, J. Salles, JM. Péron, M. Sporer, S. Taib, A. Gallini, C. Noilhan, C. Dimeglio, F. Entajan, M. Crequy, J. Izopet, L. Schmitt. The Prevalence of Hepatitis E in a Patient Cohort Presenting With Addictive Injection Behavior. *Front Psychiatry*. 2019;10:832.
- 21- L. Capai, N. Hozé, J. Chiaroni, S. Gross, R. Djoudi, R. Charrel, J. Izopet, S. Priet, S. Cauchemez, X. De Lamballerie, A. Falchi, P. Gallian. Seroprevalence and quantification of antibodies anti-HEV IgG among

- blood donors in Corsica, France, 2017. *Eurosurveillance* 2020; 25:pii=1900336.
- 22- H. Larrue, F. Abravanel, JM. Péron. Hepatitis E, what's the real issue? *Liver International* 2020;Suppl 1:43-47.
 - 23- S. Lhomme, F. Nicot, N. Jeanne, A. Roulet, C. Lefèbvre, R. Carcenac, M. Manno, M. Dubois, JM. Péron, L. Alric, N. Kamar, F. Abravanel, J. Izopet. Insertions and duplications in the polyproline region of the hepatitis E virus. *Frontiers in Microbiology* 2020;11:1.
 - 24- F. Abravanel, C. Diméglio, M. Castanier, JM. Péron, N. Kamar, S. Lhomme, J. Izopet on behalf of the HEV study group. Does HEV-3 subtype play a role in the severity of acute hepatitis E? *Liver International* 2020;40:333-337.
 - 25- N. Kamar, F. Abravanel, P. Behrendt, J. Hofmann, GP. Pageaux, C. Barbet, V. Moal, L. Couzi, T. Horvatits, RA. De Man, E. Cassuto, AM. Elsharkawy, A. Riezebos-Brilman, A. Scemla, S. Hillaire, MC. Donnelly, S. Radenne, J. Sayegh, C. Garrouste, J. Dumortier, F. Glowaki, M. Matignon, A. Coilly, L. Figueres, C. Mousson, A. Minello, S. Dharancy, JP. Rerolle, P. Lebray, I. Etienne, P. Perrin, M. Choi, O. Marion, J. Izopet. Ribavirin for hepatitis E virus infection after organ transplantation: a large European retrospective multicenter study. *Clinical Infectious Diseases* 2020;71:1204-1211
 - 26- O. Marion, S. Lhomme, M. Nayrac, M. Dubois, M. Pucelle, M. Requena, M. Miguères, F. Abravanel, JM. Péron, N. Carrère, B. Suc, P. Delobel, N. Kamar, J. Izopet. Hepatitis E virus replication in human intestinal cells. *Gut*, 2020; 69:901-910
 - 27- A. Belbézier, A. Deroux, F. Sarrot-Reynault, B. Colombe, A. Bosseray, C. Winternberger, P. Dumanoir, M. Lugosi, I. Boccon-Gibod, V. Leroy, M. Maignan, R. Collomb-Muret, D. Viglino, M. Vaillant, L. Minotti, E. Lagrange, O. Epaulard, C. Dumestre-Perard, S. Lhomme, J. Lupo, S. Larrat, P. Morand, C. Schwebel, A. Vilotitch, JL. Bosson, L. Bouillet. Screening of hepatitis E in patients presenting for acute neurological disorders. *J Infect Public Health* 2020;13:1047-1050.
 - 28- S. Lhomme, F. Abravanel, M. Miguères, N. Kamar, J. Izopet. Hepatitis E virus: how to escape the host innate immunity? *Vaccines* 2020;8:E422.
 - 29- P. Gallian, S. Lhomme, P. Morel, S. Gross, C. Mantovani, L. Hauser, X. Tinard, E. Pouchol, R. Djoudi, A. Assal, F. Abravanel, J. Izopet, P. Tiberghien. Risk for hepatitis E virus transmission by Solvent/Detergent-treated plasma. *Emerg Infect Dis* 2020;26:2881-2886.
 - 30- DB. Smith, J. Izopet, F. Nicot, P. Simmonds, S. Jameel, XJ. Meng, H. Norder, H. Okamoto, WHM. Van der Poel, G. Reuter, MA. Purdy. Update : proposed reference sequences for subtypes of hepatitis E virus (species Orthohepevirus A). *Journal of General Virology* 2020;101:692-698
 - 31- M. Mulder, R.A. de Man, N. Kamar, G. Durmaz, J. de Bruijne, T. Vanwolleghe, J. Izopet, P. Gandia, A.A. van der Eijk, T. van Gelder, D.A. Hesselink, B.C.M. de Winter. Determining The Therapeutic range for ribavirin in transplant recipients with chronic hepatitis E virus infection. *Journal of Viral Hepatitis* 2021;28:431-435.
 - 32- H. Barragué, J. Fontaine, F. Abravanel, E. Mauré, JM. Péron, L. Alric, M. Dubois, J. Izopet and E. Champagne. Mobilization of $\gamma\delta$ T cells and IL-10 production at the acute phase of Hepatitis E virus infection in cytomegalovirus carriers. *Journal of Immunology* 2021;206:1027-1038.
 - 33- H. El Costa, J. Gouilly, F. Abravanel, E. Bahraoui, JM. Peron, N. Kamar, N. Jabrane-Ferrat, J. Izopet. Effector memory CD8 T cell response elicits Hepatitis E Virus genotype 3 pathogenesis in the elderly. *Plos Pathogens* 2021;17:e1009367.
 - 34- F. Nicot, C. Dimeglio, N. Jeanne, J. Latour, F. Abravanel, N. Ranger, A. Harter, M. Dubois, S. Lameiras, S. Baulande, S. Chapuy-Regaud, N. Kamar, S. Lhomme, J. Izopet. Classification of the zoonotic hepatitis E virus genotype 3 into distinct subgenotypes. *Frontiers in Microbiology* 2021;11:634430.
 - 35- F. Micas, V. Suin, JM. Péron, C. Sholtes, E. Tuailon, T. Vanwolleghe, L. Bocket, S. Lhomme, C. Diméglio, J. Izopet, F. Abravanel. Analyses of Clinical and Biological Data for French and Belgian Immunocompetent Patients Infected With Hepatitis E Virus Genotypes 4 and 3. *Frontiers in Microbiology* 2021;12 :645020.

Communications nationales

J. Izopet. Hépatite E. Conseil Scientifique FICT – Paris, France, 2019

F. Abravanel. Hépatite E : actualités sur la première cause d'hépatite aiguë en France et dans le monde. 15^{ème} journée de microbiologie Clinique, Paris, France, janvier 2020

Communications internationales

1. J. Izopet, When and how to screen for HEV infection? The International Liver Congress, Wien, Austria, 2019.
2. J. Izopet, Transmission and pathogenesis of HEV infection, European Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition, Monothematic Conference, Florence, Italy, 2019.
3. O. Marion, N. Capelli, S. Lhomme, M. Dubois, M. Pucelle, F. Abravanel, N. Kamar, J. Izopet. Quasi-enveloped virus and capsid protein in the urine and blood of hepatitis E virus genotype 3-infected immunocompromised patients. 1st Essen HEV Workshop – Essen, Germany, 2019.
4. J. Izopet, Chair HEV Virology & Immunology, 1st Essen Hepatitis Symposium, Essen, Germany, 2019.
5. F. Abravanel, Actualités sur les hépatites virales; Symposium des biologistes de Marrakech; Maroc, 2019.
6. S. Lhomme, Hepatitis E virus infection in immunocompromised patients, 5th International congress of Viral Infection in Immunocompromised Patients, Varese, Italy, 2020.

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

IFREMER

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

ANSES/Laboratoire de sécurité des aliments

- Les CNR VHA et VHE collaborent 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.
- Les CNR VHA et VHE collaborent avec Nicole Pavio, ANSES Maisons-Alfort, dans le cadre d'enquêtes alimentaires et dans le cadre du réseau CoVetLab.

8-Programme d'activité pour les années suivantes

- o **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.

- **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 et le laboratoire de l'ANSES tant sur le plan méthodologique que technologique.

- **Développement de méthodes spécialisées**

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

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

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.

1.1 Equipes

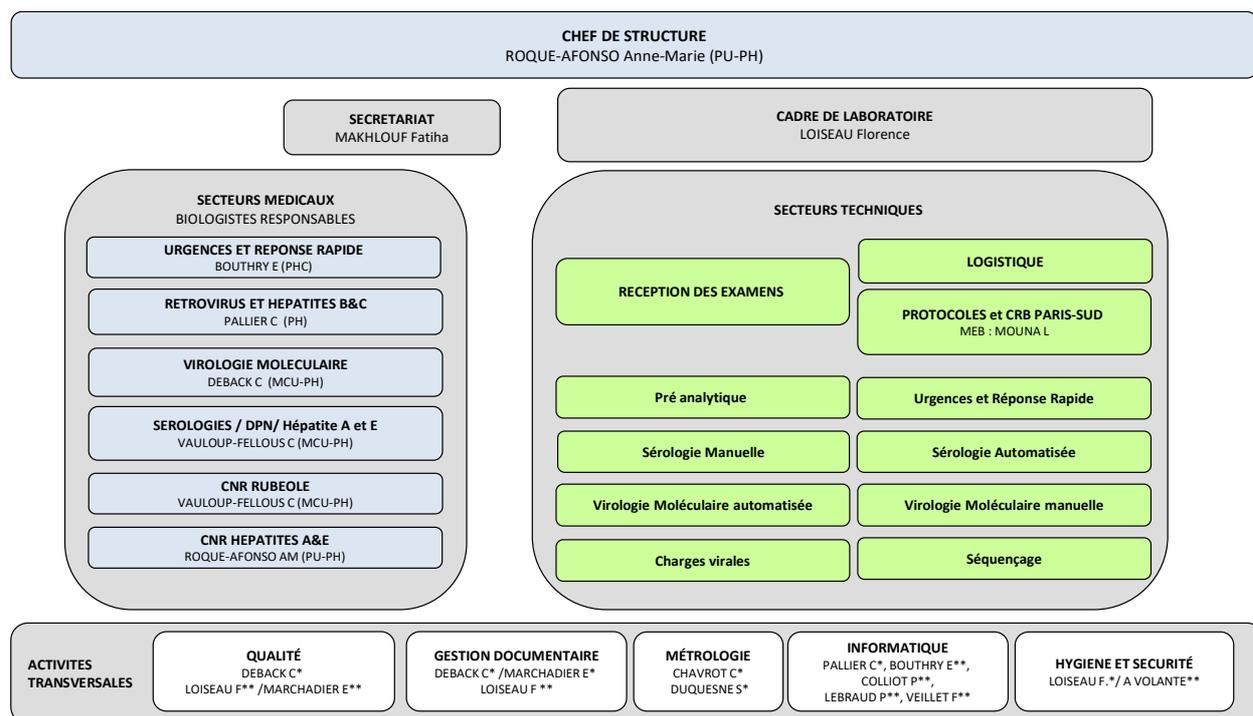
Créé en 2002, le CNR des virus des hépatites à transmission entérique a été renouvelé en 2016 sous la direction du Pr Izopet en charge de l'hépatite E (Toulouse) en association avec le Pr Roque-Afonso en charge de l'hépatite A (Villejuif). L'activité du CNR est intégrée aux deux laboratoires de Virologie.

CNR VHA Laboratoire Associé –Villejuif

Personnels :

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
Eric Marchadier	1	Technicien		APHP

Organigramme fonctionnel du laboratoire :



*Titulaire ; **Suppléant

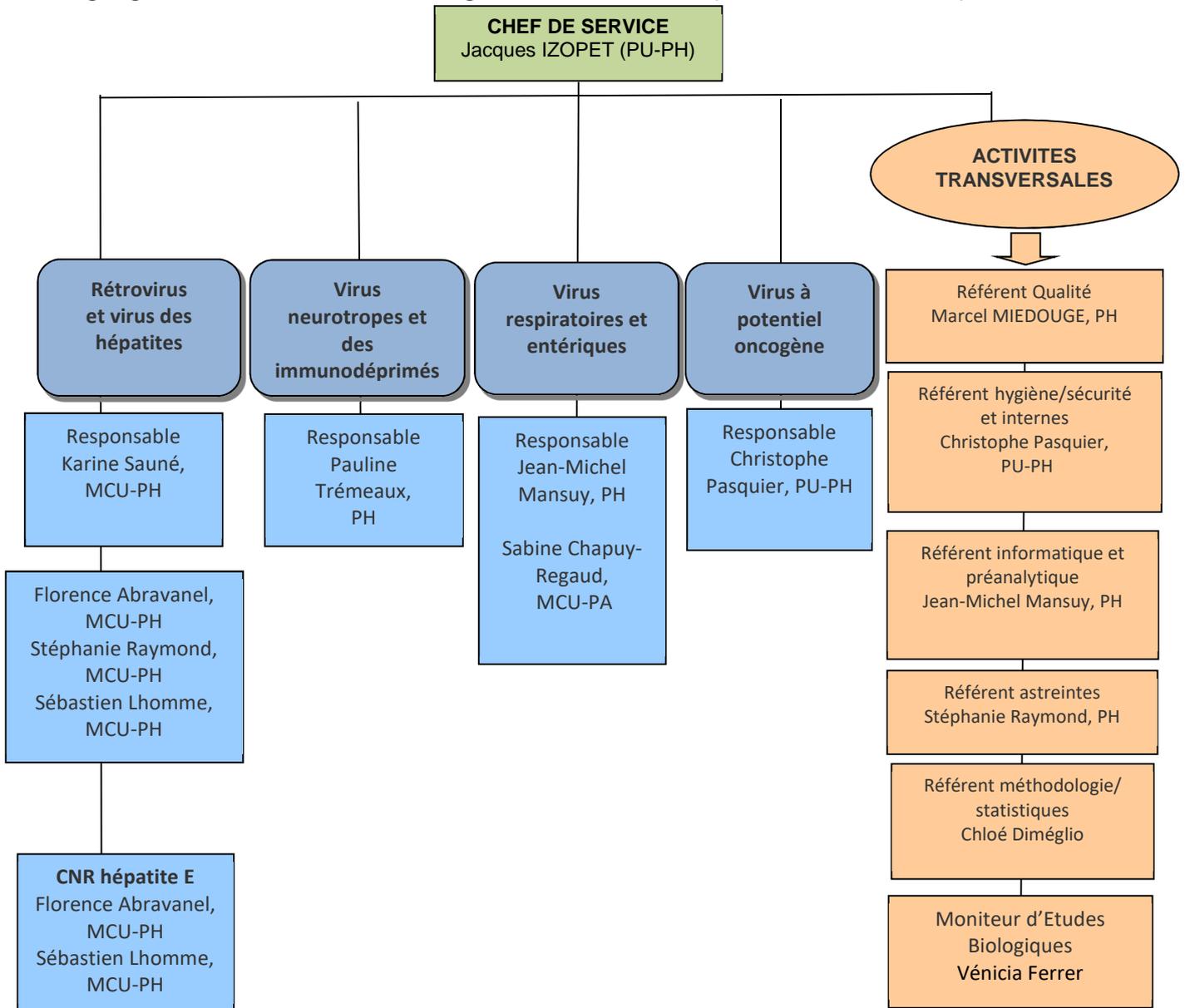
CNR VHE: Pr Izopet, Toulouse

L'équipe dédiée au CNR à Toulouse est constituée de 3 biologistes et de 2 ingénieurs :

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	0.2	Ingénieur		CHU Toulouse
Chloé Diméglio	0.8	Ingénieur	Biostatisticienne	CHU Toulouse

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



Locaux et équipements

HEPATITE A

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

Le laboratoire de virologie (500 m²) 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, dont ceux du Centre de Ressources Biologiques.

Plan du service de virologie de l'hôpital Paul Brousse (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 : 3 QiaSymphony (Qiagen), 2 EasyMag (Biomérieux),
- Appareils de PCR en temps réel (2 7500, 2 VIIA7, 4 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)

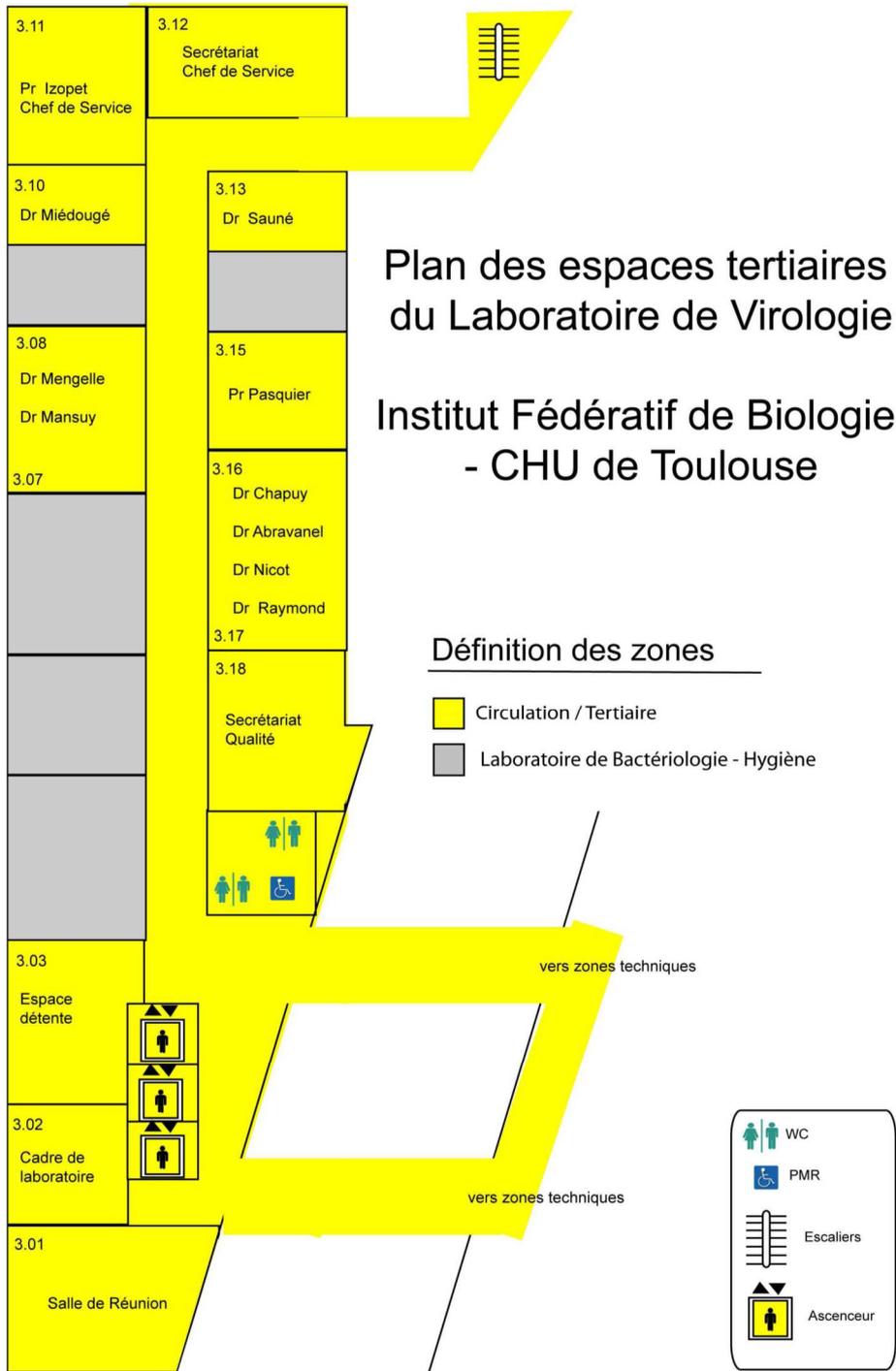
HEPATITE E

Laboratoire de Virologie du CHU de Toulouse

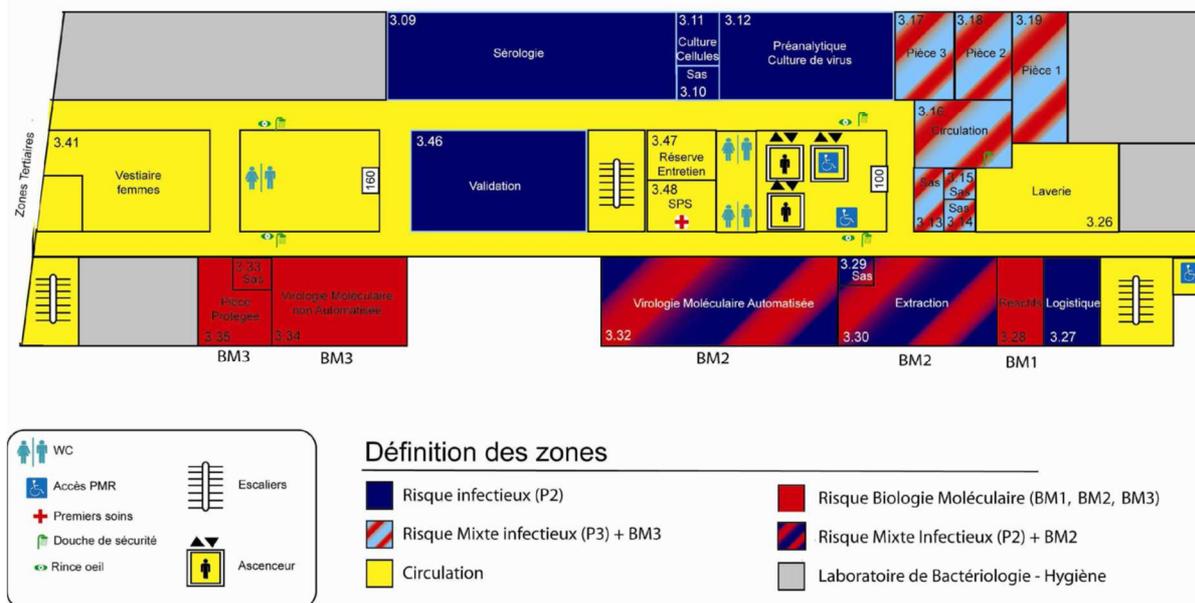
Le CNR hépatite E est intégré au laboratoire de virologie appartenant au plateau technique d'infectiologie à l'Institut Fédératif de Biologie (IFB), sur le site de Purpan du LBM du CHU de Toulouse.

Le laboratoire comporte des espaces tertiaires et 3 plateaux techniques :

- sérologie
- biologie moléculaire
- culture de virus en P2 et P3



Plan des espaces techniques du Laboratoire de Virologie Institut Fédératif de Biologie - CHU de Toulouse



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 (3 Light Cycler 2, 6 Light Cycler 480, 2 QS5)
- Séquenceurs automatiques d'acides nucléiques : 2 séquenceurs conventionnels, ABI 3500 16 capillaires (Applied Biosystems) et séquenceurs NGS (Illumina, Life Technologies) et Sequel I (Pacific Biosciences)
- 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

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

HEPATITE A, Laboratoire de virologie CHU Paul Brousse, 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.

HEPATITE E, Laboratoire de Virologie du CHU Purpan, 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.

1.2.1 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.

1.3 Collections de matériel biologique

HEPATITE A

Le CNR possède une collection clinique de plus de 500 sérums ou selles contenant de l'ARN VHA dont la souche a été typée ainsi qu'une collection de surnageants de culture de souches cliniques. Il détient également une collection de sérums présentant des IgM anti-VHA d'activation polyclonale (ARN négatif et avidité des IgG >70%)

Ces échantillons sont conservés au sein du Centre de Ressources Biologiques Paris Sud (numéro BRIF : BB-0033-00089), certifié AFNOR selon la norme NF S96-900). Dans sa charte, il garantit la qualité, la traçabilité de ces ressources biologiques et le respect de la réglementation en vigueur. <http://maladiesrares-paris-sud.aphp.fr/centre-de-ressources-biologiques/>

HEPATITE E

- Collection clinique de plus de 2000 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 (1, 3f et 3c).
- Banque de séquences accessibles dans GenBank

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

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 géotypage 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 le titrage des IgG anti-VHE à l'aide du standard international NIBSC 95/584 (par adaptation de la technique IgG Wantai).
- Test ELISA permettant l'étude de l'avidité des IgG VHE (par adaptation de la technique IgG Wantai).
- Test ELISA sandwich permettant la détection de l'antigène de capsid du VHE (Wantai Biological Pharmacy Enterprise 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

- Géotypage 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, Nicot, Review Med Virol 2018 ; Nicot, Frontiers in Microbiology 2021)
- 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 génotypes 1, 3f et 3c ont été adaptées sur ces systèmes (Capelli, Viruses 2020).

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

