

RAPPORT ANNUEL

D'ACTIVITE 2023

Année d'exercice 2022

CNR Virus des hépatites à transmission entériques (A et E)

	Organisme / Structure d'hébergement	Responsable
Laboratoire Coordonnateur	Laboratoire de Virologie / CHU Toulouse	Professeur Jacques Izopet
Laboratoire Associé	Laboratoire de Virologie / GHU Paris Saclay	Professeur Anne-Marie Roque- Afonso

GUIDE DE REMPLISSAGE

Conformément à l'arrêté du 2 mars 2022 fixant leur cahier des charges, les Centres Nationaux de Référence (CNR) sont tenus de transmettre chaque année un rapport annuel portant sur l'activité du CNR pour l'année « N » à Santé publique France avant la fin du premier semestre de l'année « N+1 ». Ce rapport doit être conforme au rapport-type national défini par le Comité des CNR aux fins de définir un cadre de présentation homogène des activités du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.

Si le CNR comporte un ou plusieurs laboratoires associés, le CNR – Laboratoire coordonnateur doit présenter un rapport commun faisant la synthèse des activités des laboratoires concourant aux missions du CNR.

Ce rapport décrit les activités du CNR et produit une analyse des données recueillies au cours de l'année « N ». Il doit être concis, éviter les redondances, privilégier les illustrations pour les résultats (graphes, cartes, tableaux). Il s'agit de fournir un travail de synthèse mettant en exergue les points forts du bilan d'activité de l'année.

Ce rapport doit inclure un résumé analytique, en français et en anglais, de 300 mots maximum (2700 caractères) destiné à être publié sur le site de Santé publique France.

Ce rapport comporte 3 annexes, regroupées à la fin du document :

- Les annexes 1 et 2 ont pour objet de rappeler les missions et l'organisation du CNR d'une part, ses capacités techniques d'autre part. Ces éléments sont pour la plupart déjà disponibles dans votre dossier de candidature. Seuls les éléments nouveaux (changement d'organisation, de locaux, nouvelles capacités ...) doivent figurer dans le corps du rapport.
- L'annexe 3 regroupe des informations confidentielles, à l'attention de Santé publique France et de son Comité des CNR, non destinées à être rendues publiques : permanence du CNR, détenteurs d'autorisations MOT (Micro-Organismes et Toxines), détenteurs d'autorisations d'exercer la biologie médicale (AEBM), résultats de recherche non encore publiés ou sous embargo, difficultés rencontrées, liste des activités menées par le CNR en lien avec des entreprises ou établissements industriels ou commerciaux dont les produits entrent dans le champ d'expertise du CNR (cf déclarations d'intérêts et engagement déontologique signé par les responsables des CNR (en précisant la nature des activités, les financements éventuels obtenus et la destination de ces financements). Cette annexe 3 doit figurer dans un document PDF distinct ou être détachable de la version papier fournie.

Il vous est demandé de respecter rigoureusement ce plan-type qui concorde avec celui de la grille d'évaluation utilisée par les experts du Comité. A l'exception de son annexe 3, ce rapport annuel d'activité a vocation à être publié sur le site web du CNR.

NB : Les contrôles de contenus insérés dans la matrice du document sont supprimés dès que vous commencez la saisie, ils rappellent ce qui est attendu par les experts du Comité des CNR

Guide de remplissage	2
Résumé analytique	5
Faits marquants	5
Executive summary	6
Highlights	6
1. Missions et organisation du CNR	7
Organigramme	7
Mission et Organisation	7
Démarche Qualité	7
2. Activités d'expertise	8
2.1 Evolution des techniques	8
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse	8
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	9
2.4 Collections de matériel biologique	9
2.5 Activités d'expertises	10
2.6 Activités de séquençage	13
2.7 Partage de séquences produites par les CNR	15
3. Activités de surveillance	16
3.1 Description du réseau de partenaires	16
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	17
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	19
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	19
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	19
4. Alertes	21
5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil	22
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	22
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	22
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	22
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	23
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	23
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	23

7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux.....	25
8. Programme d'activité pour les années suivantes	26
1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	31
1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	31
1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.....	32
1.3 Locaux et équipements	34
1.4 Collections de matériel biologique.....	37
1.5 Démarche qualité du laboratoire	37
2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR.....	39
2.1 Liste des techniques de référence.....	39
2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR	40
3. Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)	41
3.1 Permanence du CNR	41
3.2 Autorisations MOT	41
3.3 Autorisations d'exercer la biologie médicale	42
3.4 Résultats de recherches non encore publiés ou sous embargo.....	42
3.5 Difficultés rencontrées par le CNR au cours de l'année N, y compris en termes de mise à disposition de la subvention versée par Santé publique France.....	42
3.6 Liste des activités menées par le CNR en lien avec des entreprises ou établissements industriels ou commerciaux dont les produits entrent dans le champ d'expertise du CNR.....	42
3.7 Autres remarques à destination du comité des CNR	42

RESUME ANALYTIQUE

FAITS MARQUANTS

(272 mots ; 1766 caractères espaces compris)

Le CNR des virus des hépatites à transmission entérique est coordonné par le Pr Jacques Izopet en charge de l'hépatite E au CHU de Toulouse en association avec le Pr Anne-Marie Roque-Afonso en charge de l'hépatite A, au GHU Paris-Saclay.

Concernant le VHA, une diminution très importante du nombre de cas déclarés à Santé Publique France et du nombre de cas génotypés au CNR a été noté en 2020 et 2021. Cela est peut-être attribuée aux restrictions de déplacements internationaux et à l'efficacité des mesures barrière instaurées dans le cadre de la pandémie à SARS-CoV-2. Cette baisse s'est poursuivie en 2022. Les souches identifiées étaient essentiellement des souches importées ou retrouvées chez des cas secondaires d'infections importées et aucun cas groupés n'a été signalé.

Pour le VHE, la surveillance est organisée en répertoriant les cas transmis au CNR par ses partenaires publics et privés (Centres hospitaliers, laboratoires de biologie médicale libéraux) impliqués dans le diagnostic virologique en France. Il collabore également avec l'Etablissement Français du Sang et le Centre de Transfusion Sanguine des Armées. En 2022, le CNR a répertorié 2987 cas symptomatiques d'hépatite E ainsi que 252 cas asymptomatiques chez les donneurs de sang. L'analyse par séquençage haut débit de longs fragments d'acides nucléiques (technologie PacBio) de 862 échantillons a objectivé une présence majoritaire du génotype 3 et une distribution, au sein de ce génotype, en sous-types 3c (deux tiers) et 3f (un tiers) aussi bien pour les cas symptomatiques que pour les donneurs de sang. Des sous-types plus rares ont également été détectés. Des données récentes indiquent que certains sous-types, notamment 3f, pourraient être associés à des infections plus sévères.

EXECUTIVE SUMMARY

HIGHLIGHTS

(230 words; 1482 characters including spaces)

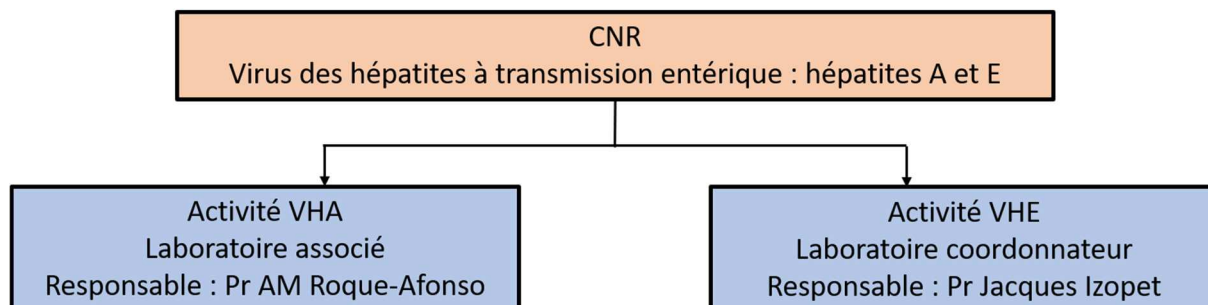
The Reference Centre for enterically transmitted hepatitis viruses is coordinated by Professor Jacques Izopet in charge of hepatitis E at Toulouse University Hospital, in association with Professor Anne-Marie Roque-Afonso in charge of the hepatitis A, at Paris-Saclay University Hospital.

Regarding HAV, a very significant decrease in the number of reported cases and in the number of cases genotyped at the CNR has been noted in 2020 and 2021. This may be attributed to international travel restrictions and the effectiveness of barrier measures introduced as part of the SARS-CoV-2 pandemic. This decline continued in 2022. The strains identified were essentially imported or found in secondary cases of imported infections, and no cluster cases were reported.

Regarding HEV, the survey in France is organized by collecting the HEV cases transmitted by its partners (public hospitals, private labs) involved in the diagnosis of HEV. A partnership with French blood organisms has also been established. In 2022, we report 2987 symptomatic cases and 252 asymptomatic cases among blood. A total of 862 samples were analysed by long read single molecule real time sequencing (PacBio technology). HEV genotype 3 was detected in most cases. The most prevalent subtypes within genotype 3 were 3c (2 third of the cases) and 3f (1 third of the cases). Other subtypes were rarely detected. Recent data indicate that some subtypes, including 3f, could be associated to more severe infections.

1. Missions et organisation du CNR

ORGANIGRAMME



- Anne-Marie Roque-Afonso, Biologiste, PU-PH
- Lina Mouna, Biologiste, PHC
- Honorine Fenaux, Biologiste, PH
- Amal Chagouri, Ingénieur
- Eric Marchadier, Technicien

- Jacques Izopet, Biologiste, PU-PH, CS
- Florence Abravanel, Biologiste, MCU-PH
- Sébastien Lhomme, Biologiste, MCU-PH
- Chloé Dimeglio, Data Scientist
- Justine Latour, Ingénieur-bioinformaticien
- Sofia Demmou, Ingénieur-bioinformaticien
- Clémentine De Smet, Ingénieur

MISSION ET ORGANISATION

Les organigrammes du laboratoire de Virologie du CHU de Toulouse (CNR-Laboratoire coordonnateur) et du laboratoire de Virologie du GHU Paris Saclay (CNR-Laboratoire associé) sont présentés en Annexe 1.

DEMARCHE QUALITE

1. Laboratoire de Virologie du CHU de Toulouse

L'activité 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.

2. Laboratoire de virologie du GHU Paris Saclay

Les sérologies VHA Anticorps totaux (COBAS) et VHA IgM (VIDAS) sont accréditées par le COFRAC selon la norme ISO 15189 depuis 2018. Selon la gestion de portée flexible, la technique de détection/quantification de l'ARN VHA Altostar® HAV RT-PCR Kit 1.5 (Altona) et l'avidité des IgG VHA vont être inscrites en 2023 comme examens représentatifs en extension de la ligne de portée BM VB01 (portée B) et BM MG01 (portée B), respectivement. La dernière évaluation COFRAC du LBM des HU Paris Sud, AP-HP (PBR/BCT/ABC), Université Paris Saclay a eu lieu en décembre 2022. Le rapport final de l'audit rapporte 29 écarts, dont un seul, non critique, concerne le service de virologie (i.e. traçabilité des maintenances et des reprises d'activité).

3. Démarche commune

Les deux laboratoires du CNR pratiquent depuis 2012 des échanges inter-laboratoire pour des marqueurs pour lesquels il n'existe pas d'organisation d'évaluation externe de la qualité notamment pour la détection de l'ARN VHA et le génotypage du VHE.

2. Activités d'expertise

La description des techniques disponibles au CNR est présentée en annexe 2.

2.1 Evolution des techniques

- **VHA**

Il n'y a pas eu d'évolution en 2022

- **VHE**

Le CNR a évalué et mis en place en juin 2022 les tests IgG et IgM anti-VHE Murex de Diasorin sur l'automate multiparamétrique Liaison XL.

Pour la détection et la quantification de l'ARN viral dans le sang, les selles, les urines et le LCR, le CNR a évalué et mis en place la plateforme Altostar® d'Altona Diagnostic en novembre 2022.

Pour le typage des souches de VHE, le CNR a développé et mis en place en 2022 une technique de séquençage haut débit de 3^{ème} génération (technologie Pacbio) basée sur le séquençage de longs fragments d'acides nucléiques par la technique Single Molecule Real Time Sequencing sur l'instrument Sequel IIe.

Ces nouvelles techniques sont accréditées COFRAC ISO 15189.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

- **VHA**

Le CNR 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.

Le CNR VHA a prévu de réévaluer la sensibilité et la spécificité analytique des tests IgM disponibles afin de modéliser leur valeur prédictive positive, en fonction de différents facteurs, âge, ALAT, intensité du signal, etc...

Les évaluations des tests moléculaires réalisées au cours du mandat précédent (Tests Altona) sont en cours de valorisation par des publications. L'évaluation des autres réactifs disponibles sera poursuivie.

- **VHE**

Evaluation des trousse sérologiques IgG et IgM anti-VHE Murex de Diasorin

Les performances cliniques des 2 tests sérologiques ont été comparées à la technique Wantai, précédemment utilisée au laboratoire. La spécificité des 2 tests était excellente (>99%). La sensibilité du test IgM évaluée au stade aigu par référence à la détection de l'ARN VHE était de 100% chez des sujets immunocompétente et 93.8% chez des sujets immunodéprimés. La sensibilité du test IgG anti-VHE était de 100% chez des sujets immunocompétente et 94.6% chez des sujets immunodéprimés. La limite de détection du test IgG anti-VHE était identique à celle de la technique Wantai (0,3 Unités OMS/ml) (Abravanel, *Viruses*, 2022).

Evaluation de la technique de RT-PCR VHE Altostar® d'Altona Diagnostic

La plateforme automatisée d'extraction des acides nucléiques et préparation des plaques pour PCR, Altostar HEV RNA RT-PCR d'Altona Diagnostics, a été évaluée et comparée à la technique utilisée auparavant au laboratoire (extraction sur automate Magnapure96 de Roche et RT-PCR avec le kit Realstar RT-PCR d'Altona). L'extraction a été validée pour toutes les matrices. Les résultats étaient corrélés aux résultats obtenus avec la précédente technique. Les résultats ont été récemment présentés (2nd HEV international symposium, Londres mai 2023).

Evaluation de la technique de RT-PCR VHE BeGenius d'Elitech

En collaboration avec le CHU de Caen, une évaluation des performances cliniques de la plateforme BeGenius d'Elitech de détection et quantification de l'ARN VHE a été réalisée. Les résultats sont en cours d'analyse.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

• VHA

Pour le VHA, il n'y a pas de technique transférée vers d'autres laboratoires en 2022.

• VHE

Des échantillons qualifiés de plasma et de selles ont été transférés aux CHU de Lyon et Bordeaux pour mise en place de techniques quantitatives dans le plasma et validation des techniques de détection du VHE dans les selles.

2.4 Collections de matériel biologique

• VHA

Les échantillons issus de l'activité du CNR VHA sont requalifiés pour la recherche et conservés au CRB Paris Saclay après caractérisation virologique au CNR. Il s'agit de sérums (volume > 500 µl) ou de selles contenant de l'ARN VHA dont la souche a été typée et de sérums présentant des IgM VHA d'activation polyclonale (ARN négatif et avidité IgG >70%). Le CRB Paris-Saclay est certifié AFNOR selon la norme NF S96-900 depuis 2011 pour des activités de réception préparation, conservation et mise à disposition (MAD) des ressources biologiques. Les collections (tissus, fluides Acides Nucléiques), dont la collection CNR VHA, sont déclarées au ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation (Dernière mise à jour CODECOH du CRB N° DC-2019-3686). En juin 2023, 2687 échantillons étaient stockés.

Le site internet du CRB (<https://hopital-bicetre.aphp.fr/crb/>) informe les professionnels de la possibilité d'accéder à des échantillons biologiques. La demande d'échantillons peut se faire par mail (crb.paris-saclay@aphp.fr). Le demandeur doit remplir un formulaire. Cette demande est examinée par le COPIL. En cas de faisabilité, un devis est émis auprès du demandeur et une convention ou un MTA (material transfert agreement) est rédigé et signé. En 2022, 2 MAD pour évaluation de réactifs ont été effectuées, de respectivement 30 et 80 échantillons.

• VHE

Des collections de souches de référence ont été constituées :

- collection de sérums et selles contenant de l'ARN VHE dont la souche a été typée et stockée selon les règles du CRB du CHU de Toulouse.
- collection de surageants de culture de souches cliniques (3f et 3c).

Une base de données de séquences est également disponible. Les séquences partielles ou complètes de génomes VHE obtenues par le laboratoire de virologie du CHU de Toulouse ont été déposées dans GenBank.

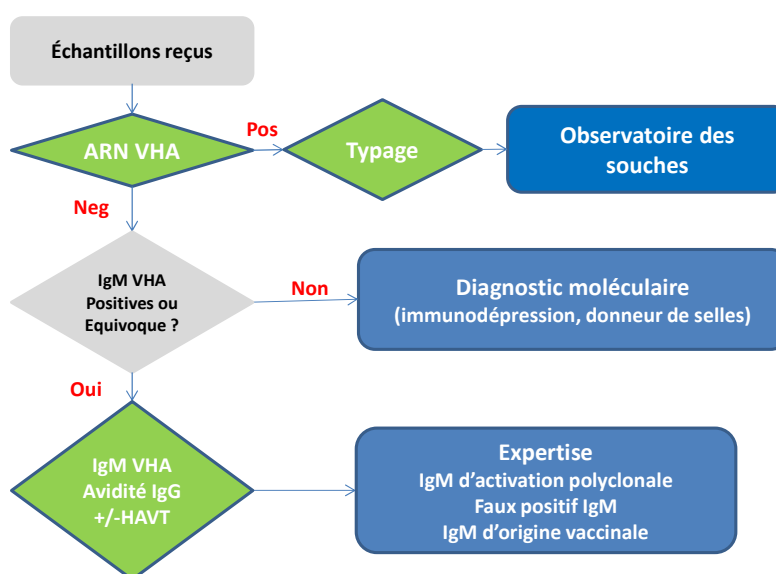
2.5 Activités d'expertises

Expertise : Eléments clés 2022	
VHA	VHE
<ul style="list-style-type: none"> - 876 prélèvements - 876 charges virales - 116 expertises sérologiques (IgM d'activation polyclonale) - 88 séquences VHA 	<ul style="list-style-type: none"> - 9749 prélèvements - 6408 analyses sérologiques - 5602 analyses de biologie moléculaire (quantification de l'ARN viral et séquençage). - 613 séquences VHE

• VHA

Prélèvements

La démarche appliquée aux prélèvements reçus au CNR VHA est la suivante :



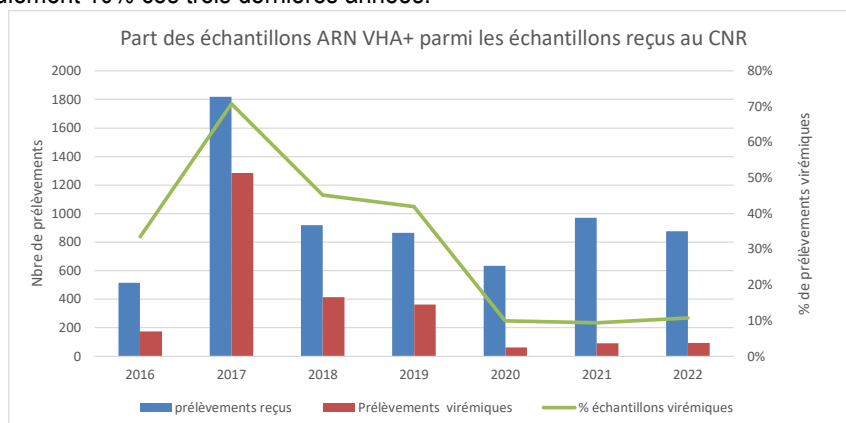
L'incidence de l'hépatite A avait atteint un plancher en 2016, avant d'augmenter en 2017 à la faveur d'une épidémie mondiale ayant pour point de départ la communauté HSH, le nombre d'échantillons reçus avait ainsi été multiplié par 3 cette année-là. Toutefois, le CNR n'ayant pas uniquement en charge l'investigation des cas groupés et l'observatoire des souches, mais aussi l'expertise sérologique et le diagnostic moléculaire, le nombre de prélèvements reçus (2017 excepté) a peu varié depuis 2016, comme le montre le tableau ci-dessous.

Nombre et contexte d'envoi des prélèvements au CNR VHA

	Nombre total de prélèvements reçus	Observatoire des souches	Investigation de cas Groupés	Expertise sérologique	Diagnostic moléculaire
2016	516	93	61	110	252
2017	1820	1105	143	201	371
2018	919	317	59	131	412
2019	865	294	45	154	372
2020	635	46	17	101	471
2021	970	81	10	126	753
2022	876	94	0	116	666

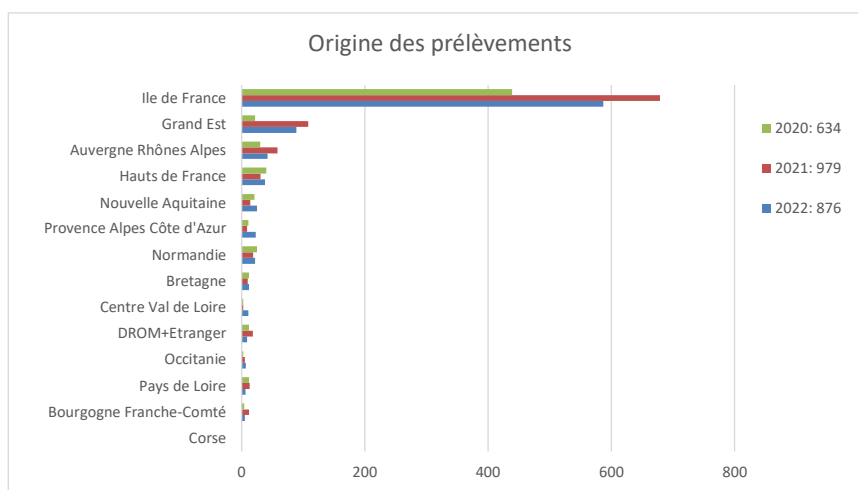
Au fil des années, le nombre de prélèvements pour expertise sérologique est resté stable, mais la proportion de prélèvements adressés pour diagnostic moléculaire a augmenté significativement ces 3 dernières années.

En miroir, le % de prélèvements virémiques, permettant le génotypage des souches a progressivement diminué pour atteindre seulement 10% ces trois dernières années.



Origine des prélèvements

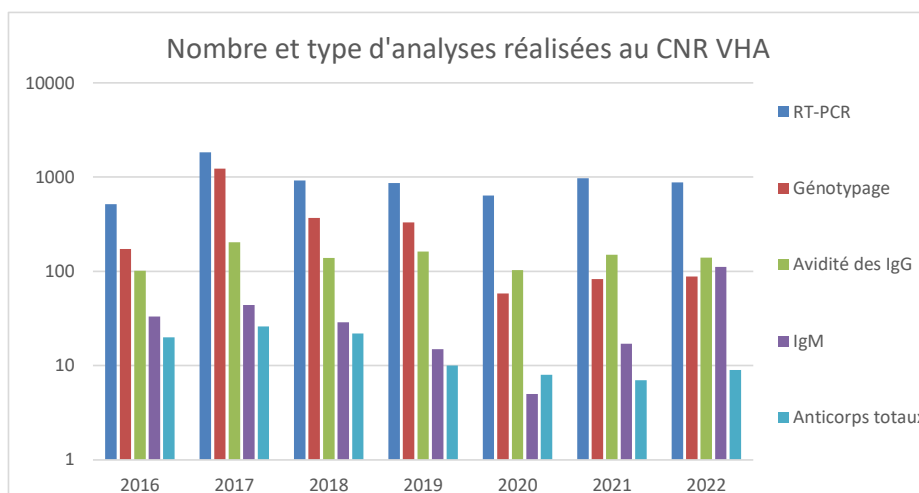
Comme les années précédentes, les prélèvements reçus proviennent majoritairement d'Ile de France : 67% en 2022, suivi du Grand Est, 10% et d'Auvergne Rhône Alpes, 5%.



Analyses réalisées et délai de rendu

- Charge virale VHA < une semaine. Une charge virale détectable permet de confirmer le diagnostic Une charge virale indétectable permet d'exclure une infection en cours et de rechercher d'autres causes à une cytolyse hépatique
- Génotypage par séquençage 2 à 3 semaines, sauf enquête urgente autour de cas groupés.
- Avidité des IgG anti-VHA réalisée en cas de positivité des IgM < 4 semaines.

L'évolution du nombre et type d'analyses réalisées au CNR VHA est présenté ci-dessous en échelle logarithmique:



• VHE

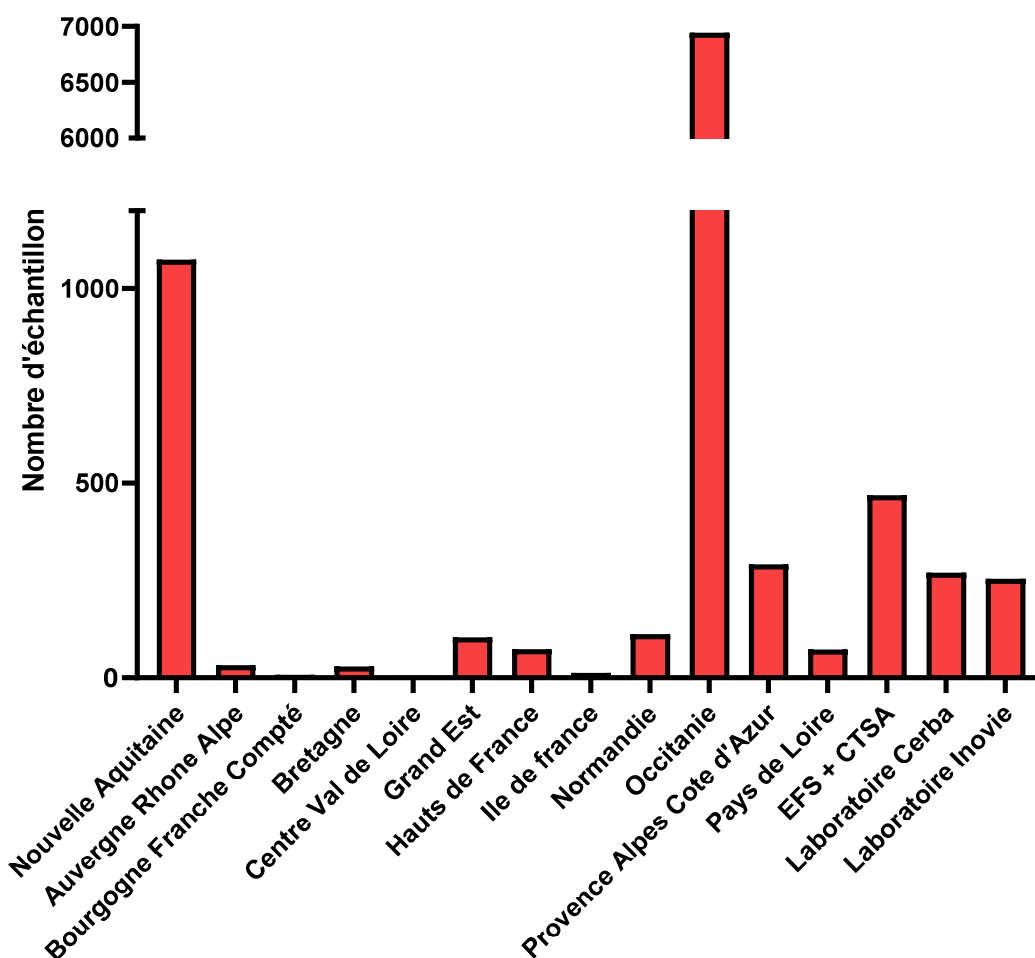
En 2022 le CNR VHE a reçu 9749 prélèvements originaires de France. Il a réalisé 6408 analyses sérologiques et 5602 analyses de biologie moléculaire (quantification de l'ARN viral et séquençage).

Provenance des échantillons :

Origine	Nombre
Centres hospitaliers	8953
Laboratoires de biologie médicale libéraux	327
EFS et Centre de transfusion sanguine des armées	469

Les délais de rendu moyens des sérologies est de 24h, la quantification de l'ARN VHE est de 48h et le séquençage de 10j, en jours ouvrables.

Origine des prélèvements reçus au CNR VHE pour la sérologie VHE ou analyse moléculaire :



En 2022, le CNR VHE avec l'aide de ses partenaires a répertorié 3239 infections par le VHE : 2987 cas étaient symptomatiques et 252 provenaient de donneurs de sang asymptomatiques.

L'évolution du nombre de cas répertoriés par le CNR depuis 10 ans figure ci-dessous

Année	Nb de patients testés	NB de cas			% de cas positifs parmi les échantillons testés
		Total	Importés	Autochtones	
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
2021	90000	2305	10	2295	2,5
2022	93000	3239	2	3237	3,5

2.6 Activités de séquençage

• VHA

Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?

<input type="checkbox"/>	NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/>	OUI	<p>Accès Interne : technologie Sanger, séquenceur 4 capillaires SeqStudio (ThermoFisher)</p> <p>Accès à la plateforme NGS de l'oncogénétique du GHU Paris Saclay : séquenceurs Illumina MiSeq et NextSeq</p>

Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?

<input checked="" type="checkbox"/>	NON	Pas encore d'expertise bioinformatique pour le NGS en 2022 car technologie en cours d'implantation : Protocoles de séquençage et pipelines informatiques en développement pour des études génome entier, aide MOABI prévue
<input checked="" type="checkbox"/>	OUI	<p>Pour le séquençage Sanger, l'expertise des biologistes est largement suffisante.</p> <p>Logiciel Bionumerics : logiciel de stockage des séquences qui permet de comparée toute nouvelle entrée avec les entrées précédentes</p>

Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?

<input type="checkbox"/> NON	Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Investigations d'épidémie et surveillance

Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrivez ci-dessous les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, serogroupe/serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...) et précisez si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquez alors lesquelles)

Analyse phylogénétique utilisée seule pour tout échantillons amplifiable

Séquençage utilisé à des fins d'investigations d'épidémies :

Oui, depuis 2002 : amplification et séquençage d'un fragment de 508 nucléotides de la région VP1/2A, méthode qui a fait l'objet d'une harmonisation européenne sous l'égide de l'ECDC en 2014 (<https://www.rivm.nl/sites/default/files/2018-11/Typing%20protocol%20HAVNET%20VP1P2A%20a1a.pdf>).

Pas d'investigation de cas groupés en 2022

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

En 2022 : 88 prélèvements séquencés : 81 séquences obtenues

Aucune sélection (séquençage de toutes les souches reçues)

Séquençage utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences :génomés assemblés ou séquences brutes (fastQ files) ?

Les fluorogrammes 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 et l'ECDC

• VHE

Le CNR VHE a reçu 862 échantillons positifs en ARN VHE. Le séquençage a été réalisé pour 613 échantillons dont la charge virale était suffisante.

Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?

<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Type d'accès (interne ou externe au CNR) ; si externe, précisez quelle(s) plateforme(s)
	Accès interne au CNR
	Technologie/matériel de la (des) plateforme(s) de séquençage auquel le CNR a accès

Séquençage 3^{ème} G PacBio
Séquençage 3^{ème} G ONT
Séquençage 2^{ème} G Illumina

Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Type d'accès (interne ou externe au CNR) ; si externe, précisez quelle(s) plateforme(s)
	Accès interne
	Outils utilisés pour l'analyse des séquences : commercial (BioNumerics par exemple), outil open source, outil maison ... Outils maison

Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Si OUI, précisez pour quelles activités. Indiquez s'il s'agit d'investigations d'épidémies ou d'investigations intervenues dans le cadre de la surveillance.
	Documentation de cas groupés Enquêtes d'hémovigilance

Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrivez ci-dessous les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, serogroupe/serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...) et précisez si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquez alors lesquelles)

Génotypage
Analyses phylogénétiques
Etude de la diversité génétique des souches

Séquençage utilisé à des fins d'investigations d'épidémies :

Aucun séquençage n'a été réalisé en 2022 à des fins d'investigation de cas groupés

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

Précisez ici le nombre de souches séquencées dans l'année : **613**

Modalités de sélection des souches pour séquençage : aucune sélection (séquençage de toutes les souches reçues), échantillonnage (préciser son type), études répétées, ...

Séquençage systématique des souches correspondant à des charges virales supérieures à 3 log UI/ml de sang (ou autre matrice)

Séquençage utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences :génomés assemblés ou séquences brutes (fastQ files) ?

Dans les bases de données fermées : **LBM du CHU de Toulouse (cluster CHU) et HEVNet**

Dans des bases de données publiques (European Nucleotide Archive (ENA) par exemple) avec ou sans métadonnées associées : **GenBank**

2.7 Partage de séquences produites par les CNR

Le CNR reçoit des échantillons cliniques (sérums ou selles majoritairement), les séquences obtenues à partir des échantillons virémiques sont partagées à l'échelle Européenne pour investigation d'événements transfrontaliers, et avec les LNR si des aliments ou des prélèvements environnementaux s'avèrent contenir de l'ARN Viral. Les séquences utilisées pour les articles scientifiques ont été déposées dans GenBank.

3. Activités de surveillance

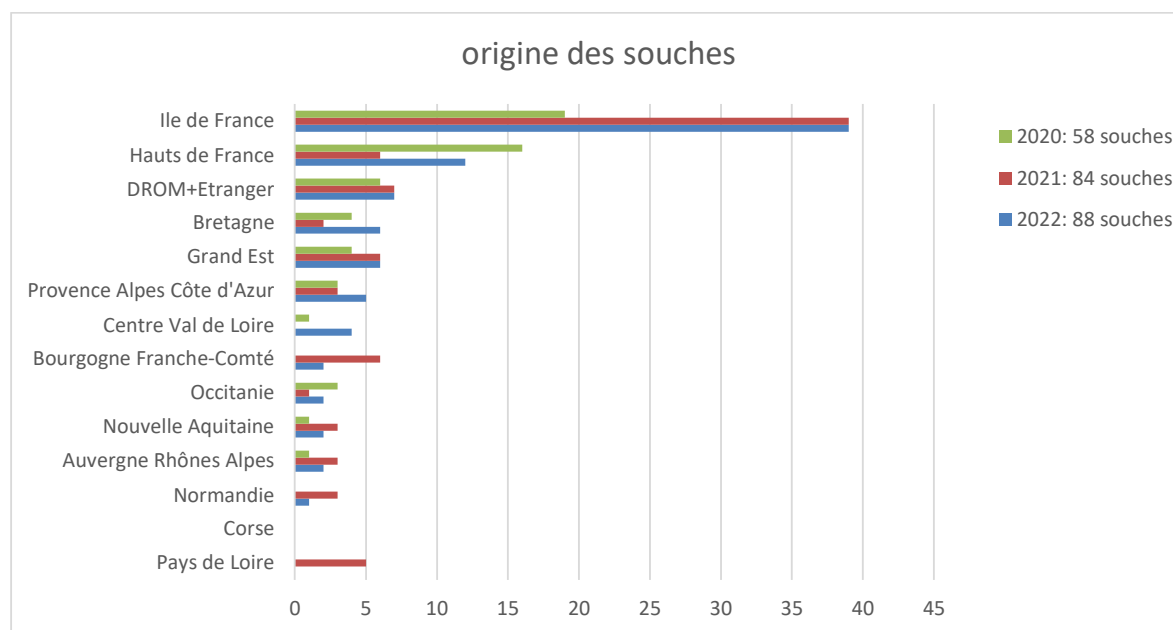
Surveillance : Eléments clés 2022	
VHA	VHE
<ul style="list-style-type: none"> - 88 patients avec souche séquencée - Retour au niveau de circulation de 2016 (pré-épidémique) - Pas de cas groupés analysés 	<ul style="list-style-type: none"> - 613 patients avec souche séquencée - Distribution des génotypes et sous-types similaire chez les cas symptomatiques et asymptomatiques

3.1 Description du réseau de partenaires

• VHA

L'envoi de sérums IgM VHA+ dans le cadre de l'observatoire des souches par les laboratoires, publics ou privés, s'effectue sur la base du volontariat. Lors de l'investigation de cas groupés, les ARS peuvent demander une recherche active de cas, en sollicitant l'envoi de sérums par les laboratoires ayant procédé à une déclaration obligatoire.

Comme pour l'ensemble des échantillons reçus, l'Ile de France est surreprésentée dans les souches identifiées au CNR, mais cette prédominance est moins marquée que pour l'ensemble des prélèvements : 44% en 2022 pour l'Ile de France, suivi des Hauts de France, 14% et des DROM (Mayotte et Réunion) ou de l'étranger, 8%. L'ensemble des régions sont ainsi représentées, comme le montre la figure ci-dessous :



• VHE

L'hépatite E n'étant pas une maladie à déclaration obligatoire, le CNR a organisé la surveillance en répertoriant les cas transmis par ses partenaires publics ou privés impliqués dans le diagnostic virologique en France.

Le laboratoire de virologie du CHU de Toulouse travaille en collaboration avec les laboratoires de virologie des CHU de France, membres du réseau ANRS-MIE et de nombreux centres hospitaliers périphériques. Il réalise la détection et la quantification de l'ARN VHE par PCR ainsi que la caractérisation des souches identifiées par séquençage des acides nucléiques. Pour les CHU d'Angers, Besançon, Brest, Poitiers, Reims et Rouen l'ensemble des tests moléculaires sont centralisés au CNR. Pour Paris (AP-HP), Amiens, Bordeaux, Clermont-Ferrand, Dijon, Grenoble, Lille, Limoges, Lyon, Nîmes Nantes, Nice, Rennes, Saint-Etienne Strasbourg et Tours, la détection/quantification est réalisée localement et les échantillons positifs sont adressés au laboratoire de virologie du CHU de Toulouse pour typage des souches.

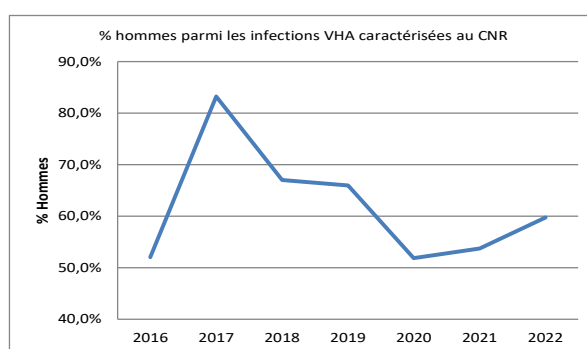
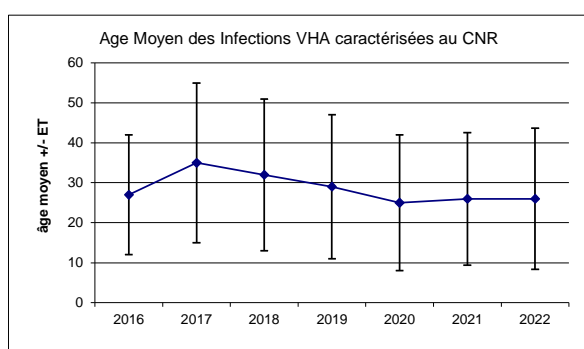
Le laboratoire de virologie du CHU de Marseille transmet également le nombre de cas identifiés dans son centre. Les laboratoires d'analyses spécialisées Biomnis, Cerba et Inovie communiquent également le nombre de cas d'hépatite E identifiés. Les laboratoires Cerba et Inovie transmettent les échantillons positifs pour quantification et caractérisation des souches au CNR, lorsque les échantillons sont disponibles.

Le CNR VHE collabore avec l'établissement Français du sang (EFS) et le centre de transfusion des armées (CTSA) qui transmettent au CNR les dons qualifiés ARN VHE positifs pour caractérisation (sérologie, quantification de l'ARN VHE et génotypage).

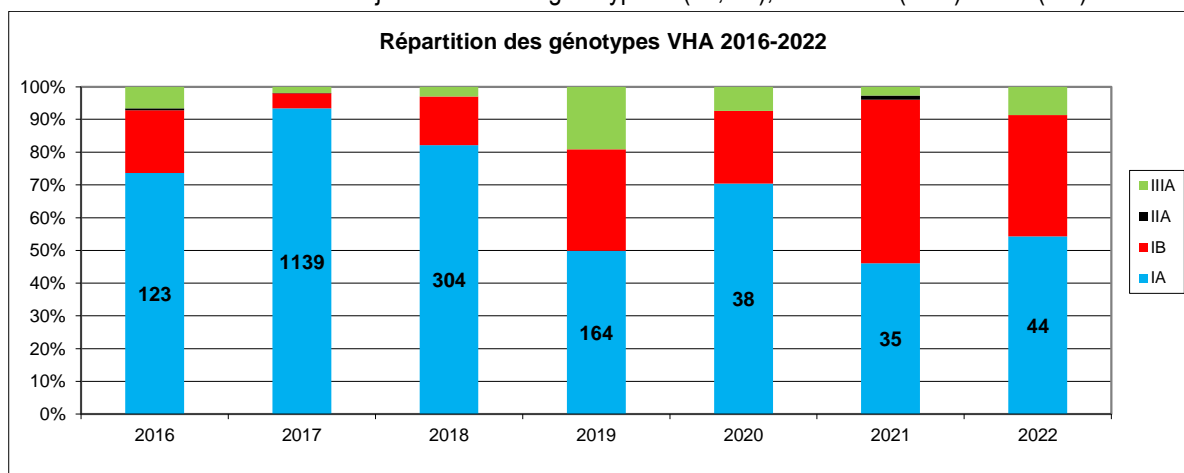
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

• VHA

En 2022, les 88 infections VHA identifiées au CNR étaient survenues chez des hommes dans 60% des cas et l'âge moyen des patients était de 26±20 ans. Depuis 2020, cet âge moyen est revenu à des valeurs similaires à celui observé avant l'épidémie de 2017.



Les souches identifiées étaient majoritairement de génotype IA (54,3%), suivi de IB (37%) et IIIA (9%) :



• VHE

En 2022, la détermination du génotype du VHE a été effectuée par séquençage pour 887 souches. 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 (Nicot Rev Med Virol, 2018 ; Smith et al, J Gen Virol, 2020 ; Nicot Front Microbiol 2021).

Surveillance nationale des cas symptomatiques

Le CNR a réalisé 635 séquençages pour des patients symptomatiques et virémiques. L'âge moyen des patients pour lesquels un séquençage a été effectué était de 60 ans. Le sex-ratio H/F était de 1,8. Le génotype n'a pas pu être déterminé pour 145 patients en raison d'une charge virale faible. Le génotype 3 est largement prédominant (98%) et les principaux sous-types sont 3c (2 tiers) et 3f (1 tiers). La technique de séquençage haut débit utilisée a permis d'identifier des co-infections avec 2 souches différentes chez 2 patients : une co-infection avec des génotypes 3c et 3f et une co-infection avec des génotypes 3f et 3i.

Les 2 infections avec un génotype 1 étaient des cas importés (Inde et Arabie Saoudite).

La répartition des génotypes caractérisés chez des patients symptomatiques était la suivante :

Génotype	1	4	3a	3b	3c	3e	3f	3h	3i	3g	3l	3m	3 lapin	3 non ss-typé	Co-infection *	Total
Nombre	2	6	2	1	272	4	179	3	4	1	1	6	2	5	2	490
(%)	(0.4)	(1.2)	(0.4)	(0.2)	(55.5)	(0.8)	(36.5)	(0.5)	(0.8)	(0.2)	(0.2)	(1.2)	(0.4)	(1)	(0.4)	

*1 co-infection 3f + 3c et 1 co-infection 3f + 3i

Surveillance nationale chez les donneurs de sang (cas asymptomatiques)

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=226) ont été adressés au laboratoire de virologie du CHU de Toulouse pour quantification et typage des souches. Les virémies des donneurs allaient de 0,5 à 5,8 log₁₀ UI/ml. Pour 114 échantillons, le génotypage n'a pas pu être déterminé du fait d'une charge virale trop faible. Le génotype 3 a été identifié dans tous les cas. La distribution des génotypes retrouvés chez les donneurs virémiques dont la charge virale était suffisante pour le séquençage était la suivante :

Génotype	3c	3f	3h	3l	3m	3 non ss typé	Total
Nombre en	72	35	1	1	1	2	112
2022 (%)	(64)	(31)	(0,9)	(0,9)	(0,9)	(1,8)	

Collaboration avec le Centre de Transfusion Sanguine des Armées (CTSA)

Dans le cadre du dépistage génomique systématique réalisé par le centre de transfusion des armées chez les donneurs de sang depuis 2019, les échantillons positifs (n=26 en 2022) ont été adressés au laboratoire de virologie du CHU de Toulouse pour quantification et typage des souches. Les virémies des donneurs allaient de 1,1 à 6,2 log₁₀ UI/ml. Pour 15 échantillons, le génotypage n'a pas pu être déterminé du fait d'une charge virale trop faible. Les 11 échantillons analysables ont permis l'identification du génotype 3 dans tous les cas sauf un (génotype 4). La distribution des génotypes retrouvés chez les donneurs virémiques dont la charge virale était suffisante pour le séquençage était la suivante :

Génotype	3c	3f	3m	3 non ss typé	4b	Total
Nombre en	5	2	1	2	1	11
2022 (%)	(45)	(18)	(9)	(18)	(9)	

Le taux de positivité et la distribution des géotypes du VHE est stable depuis 2019 dans cette population.

Synthèse

La surveillance chez les donneurs de sang (EFS et CTSA) permet d'objectiver une prévalence globale de l'infection à VHE de l'ordre de 1/1000, avec un ratio H/F de 1,9 et une distribution des géotypes/sous-types similaire à celle des cas symptomatiques. Toutes les tranches d'âges sont retrouvées sans différence significative entre elles dans les proportions de cas positifs.

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

Pour le VHA, il n'y a pas de traitement spécifique.

Pour le VHE, les échecs au traitement par ribavirine des hépatites E chroniques chez l'immunodéprimé font l'objet de travaux de recherche (voir publications).

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

• VHA

Santé Publique France et le CNR VHA ont accès à la plateforme EpiPulse, mise en place en 2021 par l'ECDC. Cette plateforme unique d'échange d'information permet de recevoir et d'envoyer des notifications à l'ensemble des partenaires européens impliqués dans la surveillance. Elle est utilisée notamment pour la surveillance de la diffusion européenne des souches (partage de séquences). Ces échanges peuvent contribuer à identifier la source de cas groupés, des contaminations alimentaires, ou des populations à risque.

Le CNR VHA peut être contacté directement par les ARS 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 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.

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

• VHE

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).

La détection de dons de sang positifs pour le VHE par l'EFS ou le CTSA est systématiquement confirmée par le CNR avec mesure de la charge virale géotypage.

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

• VHA

En 2022, le CNR VHA n'a pas été sollicité pour investiguer des cas groupés survenus en métropole.

Le CNR a pu répondre à 7 notifications EpiPulse, dont l'une (2022-FWD-00013, -00067) concernait la diffusion potentielle de nouvelles souches dans la communauté HSH. La définition de cas données par l'ECDC était une infection VHA confirmée survenue après le 1^{er} décembre 2021, avec une souche IB homologue de l'une des 4 séquences identifiées (>2707092_HUN_P1, >2823037_HUN_P58, >DE_V22-077878, >UK_VRD22_HAV055), en utilisant le protocole de séquençage HAVNet. Le CNR a ainsi pu identifier 3 patients.

Le CNR a pu analyser des échantillons reçus de Nouvelle Calédonie dans le but de caractériser une surincidence de cas survenus en 2018-21 dans ce territoire. L'origine des souches a pu être tracée au Vanuatu. Cette étude a fait l'objet d'une communication aux JNI en juin 2023.

• VHE

Etude de séroprévalence chez des patients souffrant de déficit immunitaire

Nous avons étudié l'impact du VHE chez des patients souffrant de déficit immunitaire primaire ou d'hypogammaglobulinémie en collaboration avec les équipes de Laurence Gérard et de Constance Delaugère de l'AP-HP. Nous avons testé en sérologie et PCR VHE 533 patients de la cohorte nationale DEFI (349 recevant un traitement par immunoglobulines polyvalentes et 184 n'en recevant pas). Nous avons réalisé la détection des IgG VHE dans 23 lots commerciaux d'immunoglobulines polyvalentes.

Trois patients présentaient des résultats en faveur d'une infection récente mais aucune infection chronique n'a été observée. La séroprévalence des IgG était de 50% pour l'ensemble de la cohorte, 68% chez ceux recevant des immunoglobulines polyvalentes et 16% seulement chez ceux n'en recevant pas ($p < 0.001$). Des IgG VHE ont été détectés dans tous les lots d'immunoglobulines polyvalentes. La séroprévalence des patients non traités par immunoglobuline est proche de celle observée en France dans la population générale (22%, Mansuy et al, Hepatology, 2016).

Ce travail a montré que les patients souffrant de déficit immunitaire primaire ou d'hypogammaglobulinémie ne semblaient pas être à risque d'infection chronique. L'administration d'immunoglobulines polyvalentes confère une forte séroprévalence dans cette population (Gérard, Blood transfusion, 2022).

Enquêtes lors de suspicion de contamination transfusionnelle

En 2022, le CNR a été sollicité pour réaliser 2 enquêtes avec suspicion de contamination transfusionnelle par le VHE.

- Patient allogreffé le 02/09/2021, hospitalisé au CHU de Tours. 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 (318 000 UI/mL) avec un génotype 3c. Les résultats ont montré une homologie de séquences entre les souches VHE 3c du donneur et du receveur. Le produit incriminé était un MCP, dont le volume était de 378mL, le volume du don du donneur virémique étant estimé à 80 mL. L'administration du MCP a eu le 20/09/2021. La PCR a été retrouvée positive le 30/11/2021 chez le receveur. L'infection a été spontanément résolutive.
- Patient atteint d'un lymphome de Burkitt hospitalisé au CHU de Clermont-Ferrand. 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 (1 830 UI/mL) avec un génotype 3f. Les résultats ont montré une homologie de séquences entre les souches VHE 3f du donneur et du receveur. Le produit incriminé était un MCP, dont le volume était de 177mL, le volume du don du donneur virémique étant estimé à 38 mL. L'administration du MCP a eu le 22 juin 2022. La PCR a été retrouvée positive le 18 août 2022 chez le receveur. Le patient est chroniquement infecté et n'a pas été traité par ribavirine.

4. Alertes

- **VHA**

Le CNR et ses correspondants de Santé publique France (Dr J. Figoni) échangent immédiatement sur tout phénomène anormal.

- **VHE**

- Les cas d'hépatite E ne font pas l'objet d'une déclaration obligatoire.

- En décembre 2022, le CNR a été alerté par Santé Publique France de la détection récente du VHE dans les eaux usées de la principale station d'épuration de Toulouse ainsi que d'autres villes du nord de la France. Le CNR a vérifié que cette détection n'était pas associée à une hausse des cas d'infections par le VHE répertoriées au CHU de Toulouse ni une hausse de l'incidence détectée par les principaux laboratoires privés de la ville (Réseau des laboratoires Cerba, Inovie et Biomnis). Les échantillons issus des stations d'épuration de Toulouse, Denain et Dunkerque ont été collectés par SUEZ et adressés au laboratoire IAGE réalisant la détection de l'ARN VHE dans les eaux usées. Des extraits d'acides nucléiques ont été adressés au CNR pour la caractérisation des souches. La technique de séquençage utilisée par le CNR (PacBio) a permis de séquencer de longs fragments d'acides nucléiques, d'identifier les haplotypes de régions pertinentes, et ainsi de faciliter la détection de mélange de souches.

Parmi 27 échantillons positifs, 52 souches de VHE ont été détectées, avec un mélange de souches (de génotypes identiques ou différents) dans 50% des cas. Les génotypes étaient tous de type 3, majoritairement 3c et 3f, mais des sous-types rares (3m et 3k) ont également été détectés.

La distribution observée dans les eaux usées reflétait ce qui était observé chez l'homme sur la même période :

- Sous-types majoritaires 3c et 3f
- Glissement de la distribution des souches vers le sous-type 3c qui semble dominer le sous-type 3f au cours du temps.

5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Moocs, e-learning, Webinaires

1. 2022 : 22 mars-24 mai 2022. France Université Numérique (Institut Pasteur). « Massive Open Online Course "MOOC" Waterborne Infections: Hepatitis A and E. <https://www.fun-mooc.fr/fr/cours/water-borne-infectious-diseases/>
2. 2022 : 21 avril **Webinaire Remic's** Hépatite A (sous l'égide de la SFM) : <https://www.sfm-microbiologie.org/replay-le-remics-vha/>
3. Un webinar sur le VHE a été réalisé en décembre 2021 par Florence Abravanel et Jacques Izopet et est disponible sur le site internet de Labroots : [Hepatitis E virus: the need for improved testing \(labroots.com\)](https://www.labroots.com/learn/hepatitis-e-virus-the-need-for-improved-testing).

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

Le CNR a contribué à des ouvrages de formation médicale, le REMIC et le l'EMC de biologie en rédigeant les chapitres sur le VHA et le VHE.

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 une fiche de synthèse sur le site internet de la société française de microbiologie (SFM) : [VIRUS HEPATITE-E.pdf \(sfm-microbiologie.org\)](https://www.sfm-microbiologie.org/virus-hepatite-e.pdf).

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 (secrétariat du laboratoire ou téléphone direct de 9h à 18h du lundi au vendredi) ou par courrier électronique (disponibles sur le site web) pour répondre aux interrogations des professionnels : conseils diagnostiques, type de prélèvement et conditions d'acheminement.

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

Anne-Marie Roque Afonso est Membre du groupe de travail Sécurité des éléments et produits du corps humain (Secproch) du HCSP.

Jacques Izopet a contribué à l'avis du HCSP de 2023 concernant la recherche de l'ARN du VHE chez les donneurs d'organes et de cellules souches hématopoïétiques.

Le CNR a collaboré avec l'EFS et le CTSA pour estimer le nombre de dons ARN-VHE positifs en France (environ 1/1000) (Laperche Blood Transfusion 2023). Cette estimation a pu être affinée après ajustement sur 3 variables (établissement, sexe, âge) à 1/1682 pour l'ensemble de la population des donneurs (Pillonel Vox sanguinis 2023).

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

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

• VHA

- Etude de la réponse vaccinale
Il n'existe pas de test commercialisé pour distinguer une immunité vaccinale d'une infection naturelle guérie chez des patients porteurs d'IgG ou d'anticorps totaux anti-VHA. Il n'existe pas de techniques permettant de déterminer si des sujet mauvais répondeurs au vaccin, notamment les cirrhotiques, restent protégés après négativation des anticorps anti-VHA. Nous avons mis au point des méthodes d'évaluation de la réponse humorale : IgA sériques, IgG et IgA salivaires.
- Développement de protocoles de séquençage du génome complet en cours
- Analyse systématique des données 2010-2019 du PMSI disponibles sur le site de l'ATIH pour évaluer l'évolution dans le temps du nombre d'hospitalisations pour hépatite A aigüe, les variations régionales, et les facteurs associées aux formes sévères (hospitalisation >5j, réanimation, transplantation hépatique, décès)

• VHE

- Etude de la réponse immune lors du traitement par ribavirine des hépatites E chroniques chez les transplantés d'organe solide (ANRS-MIE)
- Etude des mécanismes améliorant la capacité répliquative des variants recombinants du virus de l'hépatite E (ANRS-MIE)
- Etude de la libération vectorielle du virus de l'hépatite E dans un modèle d'organoïdes intestinaux et effets de la ribavirine (ANRS-MIE)

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

• VHA

Publication Nationales

1. Roque-Afonso AM, Izopet J. Virus de l'hépatite A. **REMIC 2022**
2. Izopet J, Roque-Afonso AM. Virus de l'hépatite E. **REMIC 2022**
3. AM Roque-Afonso. Le virus de l'hépatite A. **EMC biologie médicale 2023**

Publications internationales

1. L Mouna, S Akhavan, A Jadoui, S Chevaliez, F Griscelli, S Laperche, AM Roque-Afonso. Accuracy assessment of total or IgG Immunoglobulin to hepatitis A virus tests around immunity threshold. **J Clin Virol. 2021 Dec 18;146:105059. doi: 10.1016/j.jcv.2021.105059.**
2. C Lefeuvre, R Mahieu, F Boyer, S Le Cam, L Mouna, AM Roque-Afonso, C Lefort, H Le Guillou-Guillemette. Hepatitis A virus, a transfusion-transmissible infection excluded from routine screening and not prevented by pathogen inactivation system. **Emerg Infect Dis. 2022 Jan ;28(1):219-223. doi: 10.3201/eid2801.210403**

Communications nationales et conférences nationales sur invitation

1. C Tijani Hamed, E Marchadier, T Soumbara, M Ahmed Aiche, M Mahmoud El Yezid, AM Roque-Afonso. Séroprévalence de l'hépatite E chez les donneurs de sang en Mauritanie, étude préliminaire. (P59). **JFV, Paris, 2023**
2. AC. Gourinat, A. Cannet, L. Dupont, N. Bargeolle, MR. Waia, A Pfannstiel, L. Flourey, L. Mouna, AM. Roque-Afonso, S. Laumond. Epidémie d'hépatite A dans un territoire outre-mer du Pacifique associée à un taux d'hospitalisation inhabituel. **JNI, Grenoble, 2023.**

• VHE

Publications nationales

1. Lhomme S, Abravanel F, Chapuy-Regaud S, Izopet J. Virus de l'hépatite E. EMC Biologie Médicale 2022
2. Hanotte B, Gaultier JB, Abravanel F, Pozzetto B, Féasson L, Cathébras P. Rhabdomyolysis with tetraparesis secondary to hepatitis E virus infection in a patient on statins. Rev Med Interne 2022;43:252-255.
3. Roque-Afonso AM, Izopet J. Virus de l'hépatite A. REMIC 2022
4. Izopet J, Roque-Afonso AM. Virus de l'hépatite E. REMIC 2022
5. Izopet J, Xia N. Hepatitis E vaccines, PLOTKIN'S Vaccine 2022, 8th Edition
6. Izopet J, Kamar N. Hepatitis A and E viruses, Manual of Clinical Microbiology, 13th Edition (in press)

Publications internationales

1. Lhomme S, Fayard A, Mirafzal S, Carcenac R, Boyer P, Latour J, Brebion A, Bay JO, Henquell C, Izopet J. Persistence of hepatitis E virus in the cerebrospinal fluid despite apparently successful ribavirin therapy. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2022;77:2300-2303.
2. Abravanel F, Parraud D, Chapuy-Regaud S, Miedouge M, Bonnin E, Larrieu M, Aversenq A, Lhomme S and Izopet J. Diagnostic performance of an automated system for assaying anti-hepatitis E virus immunoglobulins M and G. Viruses 2022;14:1065.
3. Gerard L, Garzaro M, Ferrer V, Malphettes M, Fieschi C, Garnier JL, Just N, Masseur A, Delaugerre C, Izopet J, Oksenhendler E, Abravanel F. Hepatitis E infection in adults with primary immunodeficiency with or without immunoglobulin replacement therapy. Blood Transfusion 2022;20:516-524.
4. Kamar N, Del Bello A, Abravanel F, Pan Q, Izopet J. Unmet needs for the treatment of chronic hepatitis E virus infection in immunocompromised patients. Viruses 2022;14:2116.
5. Abravanel F, Lhomme S, Marion O, Péron JM, Kamar N, Izopet J. Diagnostic and management strategies for chronic hepatitis E infection. Expert Review of Anti-infective Therapy 2023;21:143-148.
6. Laperche S, Maugard C, Lhomme S, Lecam S, Ricard C, Dupont I, Richard P, Tiberghien P, Abravanel F, Morel P, Izopet J, Gallian P. Seven-years (2015-2021) of blood donor screening for HEV-RNA in France: lessons and perspective. Blood Transfusion 2023;21:110-118.
7. Peron JM, Larrue H, Izopet J, Buti M. The pressing need for a global HEV vaccine. Journal of Hepatology (sous presse).
8. Lhomme S, Magne S, Perelle S, Vaissière E, Abravanel F, Trelon L, Martin-Latil S, Izopet J, Figoni J, Spaccaverri G. Clustered cases of waterborne hepatitis E virus infection, France. Viruses (sous presse).

Communications et conférences nationales sur invitation

1. Abravanel F. Actualités sur le Virus de l'Hépatite E. Congrès BIOMEDJ – Paris (2022).
2. Izopet J. Un nouveau test de dépistage : l'ARN du virus de l'hépatite E. XIVème Congrès National de la Société Française de Vigilance Thérapeutique Transfusionnelle – Montpellier (2022).
3. Allieux C, Paronetto O, Pucelle M, Lhomme S, Izopet J, Chapuy-Regaud S. The capsid protein of the Hepatitis E virus interacts with the autophagy marker LC3B. Congrès CFATG10 2022 – Besançon (2022).
4. Izopet J. Hépatite E : pourquoi, quand et comment ? Journée Collège de Bactériologie-Virologie-Hygiène des Hôpitaux – Paris (2023).

Communications et conférences internationales sur invitation

1. Laperche S, Maugard C, Lhomme S, Le Cam S, Ricard C, Dupont I, Richard P, Tiberghien P, Abravanel F, Morel P, Izopet J, Gallian P. From selective to universal HEV-RNA blood donor screening in France : lessons from 7 years of HEV-NAT (2015-2021). ISBT Virtual (2022).
2. Lhomme S, Fayard A, Mirafzal S, Carcenac R, Boyer P, Latour J, Brebion A, Bay JO, Henquell C, Izopet J. Persistence of hepatitis E virus in the cerebrospinal fluid despite apparently successful ribavirin therapy. 28th Symposium on Hepatitis C Virus, Flaviviruses, and Related Viruses – Ghent, Belgique (2022).
3. Izopet J. Mechanisms of HEV persistence in immunocompromised patients. Global Hepatitis Summit – Paris (2023).
4. Abravanel F, Lhomme S, Sottit P, Chapuy-Regaud S, Izopet J. Performance of the Altostar HEV RNA RT-PCR Kit for quantifying HEV RNA in plasma and stool. 2nd International Hepatitis E Symposium – Londres (2023).
5. Lhomme S, Fayard A, Mirafzal S, Carcenac R, Boyer P, Latour J, Brebion A, Bay JO, Henquell C, Izopet J. Persistence of hepatitis E virus in the cerebrospinal fluid despite apparently successful ribavirin therapy. 2nd International Hepatitis E Symposium – Londres (2023).

7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux

IFREMER

- Le CNR collabore avec Soisick LEGUYADER, dans le domaine de 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

- Le CNR collabore avec Sylvie Pérelle et Sandra Martin-Latil, ANSES, dans le domaine de la détection du VHA et du VHE des 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 collabore 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

8.1 Activités d'expertise

• VHA

a) Séquençage

Les protocoles de séquençage NGS et les pipelines informatiques sont en développement pour des études génome entier du VHA. Ces séquences permettront d'apprécier de manière fine la circulation du VHA et les modes de transmission : introduction, diffusion et éventuelle persistance environnementale.

Ce développement nous permettra également de reprendre nos recherches de hotspots de recombinaison à partir de co-cultures de souches de génotypes différents et d'estimer la fréquence de ces événements à partir de la collection de souches du CNR.

a) Caractérisation de la réponse vaccinale

Nous allons poursuivre le développement de techniques permettant l'évaluation de la réponse cellulaire anti-VHA (test IGRA : dosage de l'interféron gamma après stimulation des PBMC par de l'Ag VHA) et d'un test de neutralisation en culture cellulaire. Ce dernier test contribuera à la validation du « seuil protecteur » d'anticorps anti-VHA.

Nous caractériserons la réponse vaccinale dans différentes cohortes de patients.

• VHE

a) Evaluation des techniques d'immuno-analyse et moléculaires proposées par les industriels

Compte-tenu de la fréquence et de l'impact en santé publique des infections par le VHE, de nombreuses firmes ont développé des tests d'immunoanalyse permettant la détection des anticorps anti-VHE (IgG et IgM) sous différents formats (microplaques, tests rapides immunochromatographiques, automates multiparamétriques). Les performances de ces techniques, notamment en termes de sensibilité et de spécificité, doivent être évaluées et des études comparatives sont indispensables.

Les évaluations seront réalisées grâce à des panels d'échantillons recueillis à différents stades de l'infection par le VHE (infection aiguë, infection chronique, infection guérie naturellement ou après traitement par ribavirine). Ces échantillons parfaitement caractérisés sur le plan clinique et virologique (génotypes 1-4) sont disponibles dans la bibliothèque VHE du laboratoire de virologie du CHU de Toulouse (CRB – Toulouse Bioressources – n°AC-2021-4822). Les tests de référence sont les tests actuels ayant fait l'objet d'études de validation et accrédités selon la norme ISO 15189.

Pour les IgM anti-VHE, une caractéristique importante réside dans la durée de détection de ce marqueur dans le contexte d'une primo-infection. Pour les IgG anti-VHE, la limite de détection du test est essentielle car elle permet d'expliquer une grande partie de la variabilité des résultats de séroprévalence dans une même population. La quantification des IgG anti-VHE par référence au standard international est également un élément essentiel et il importe donc de déterminer le domaine de linéarité et d'objectiver une corrélation des résultats obtenus avec les tests commerciaux disponibles.

Des tests de détection de l'antigène de capsid du VHE ont également été développés. Les firmes sont en nombre limité mais les performances semblent avoir évolué en fonction des versions. La détection et la quantification de ce marqueur pourraient être intéressantes dans le sang mais aussi dans l'urine. Les performances cliniques et analytiques devront être comparées à celles obtenues avec un test moléculaire ARN VHE conventionnel.

Des tests moléculaires fondés sur la PCR ou la TMA (Transcription Mediated Assay) permettant la détection et la quantification de l'ARN VHE sont à présent disponibles. Si ces tests semblent adaptés à l'ensemble des génotypes de l'espèce *Paslahepevirus balayani* (HEV 1-8), ils ne détectent pas les souches du genre *Rocahepevirus* pouvant conduire à des infections humaines. Les nouvelles versions des tests actuels devront être évaluées.

b) Développement et optimisation de méthodes mesurant les anticorps neutralisants et la réponse immunitaire cellulaire.

Pour les anticorps neutralisants, une approche conventionnelle en dilution limite utilisant un système cellulaire et une souche clinique sera mise en œuvre. L'objectif sera de déterminer la concentration d'anticorps conférant une protection contre une réinfection. La corrélation avec les résultats des IgG anti-VHE mesurés par immuno-analyse sera également étudiée.

Pour la réponse immunitaire cellulaire, une approche par ELISPOT après stimulation des lymphocytes par des pools de peptides sera développée.

c) **Activité de séquençage**

Le protocole de séquençage de 3^{ème} génération développé par le CNR basé sur la technologie PacBio permet le séquençage de longs fragments d'acides nucléiques avec une exactitude proche de 100%. Cette approche permet le génotypage mais aussi la détection de variants minoritaires, de mélanges de variants, et de virus recombinants. Une optimisation des conditions de réaction sera réalisée pour obtenir des séquences génomiques complètes de VHE sur une plus grande proportion d'échantillons dont la charge virale est inférieure à 3 log copies/ml.

Les autres techniques de séquençage de 3^{ème} génération (ONT) ou de 2^{ème} génération (Illumina) seront également évaluées par le CNR.

d) **Autres activités d'expertise**

- Réalisation de tests sérologiques et moléculaires pour les laboratoires confrontés à des difficultés diagnostiques
- Conception de dossiers cliniques proposés aux partenaires du réseau
- Transfert de souches et sérums afin de faciliter la validation de méthode des laboratoires
- Transfert de techniques

8.2 Activités de conseil, formation et information

Ces activités basées sur l'expertise des membres du CNR incluant la veille scientifique et technologique seront poursuivies selon les modalités suivantes.

Elles s'adressent:

- aux professionnels de santé : biologistes, médecins spécialistes et généralistes, épidémiologistes
- aux autorités de santé (Santé Publique France, ARS, autres agences, ministère en charge de la santé)
- au grand public

Le vecteur de communication sera bien sûr adapté aux interlocuteurs :

- rapports d'examens ou d'investigation
- publications didactiques
- conférences, séminaires : nous souhaitons en particulier organiser un séminaire CNR annuel sur les activités VHA et VHE.
- enseignement aux étudiants et formation continue (DPC)
- réunion dans le cadre de groupes de travail, notamment le groupe « Attribution des sources des maladies infectieuses d'origine alimentaire » de l'ANSES récemment créé en réponse à une saisie de la direction générale de l'alimentation, la direction générale de la santé et la direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes.

Contrairement au VHA dont les caractéristiques en termes de risque lié aux aliments sont bien documentées, la situation pour le VHE est très différente compte tenu de son caractère zoonotique et des données épidémiologiques récemment révélées grâce à l'optimisation des outils virologiques et aux études réalisées notamment en France.

Enfin, le site internet du CNR contient des informations pratiques sur les techniques et des recommandations sur les algorithmes diagnostiques ainsi que des informations scientifiques (publications clefs).

8.3 Surveillance épidémiologique

Les orientations proposées dans le cadre de la mandature reposent sur 5 points principaux :

- Mise en commun du réseau de laboratoires pour la surveillance du VHE et du VHA. Ce réseau est constitué par l'ensemble des hôpitaux universitaires, les hôpitaux généraux et les laboratoires privés incluant les laboratoires CERBA, Biomnis et Innovie. Pour chacun de ces laboratoires, des correspondants ont été identifiés. Une animation commune du réseau est prévue.
- Renforcement du partenariat avec l'EFS pour la surveillance chez les donneurs de sang.
- Utilisation des techniques de séquençage à haut débit de 2^{ème} et 3^{ème} génération.
- Coordination avec la surveillance épidémiologique des autres pays européens.
- Coordination avec la surveillance des souches détectées chez les animaux (VHE) et dans l'environnement (VHE et VHA).

• VHA

- a) **Caractérisation des souches VHA circulant dans les DROM : Mayotte et Nouvelle Calédonie**
- b) **Réévaluation de la fréquence des IgM VHA positives en l'absence d'infection aiguë par le VHA (faux positifs ou activation polyclonale)**

• VHE

- a) **Etude des cas symptomatiques d'hépatite E**

La survenue de manifestations cliniques d'hépatite aiguë ou la mise en évidence d'une élévation des aminotransférases sériques à l'occasion de la prescription d'examens biologiques conduit, selon les recommandations actuelles (HAS 2017 et EASL 2018), à la recherche d'IgM anti-VHE au même titre que la détermination des marqueurs sériques des autres hépatites virales A, B et C, indépendamment de la notion de voyage dans un pays étranger. Les données actuelles indiquent une augmentation progressive, au cours de ces dernières années, de la prescription des IgM anti-VHE mais ces prescriptions sont environ deux fois moins fréquentes que les prescriptions d'IgM anti-VHA, ce qui contribue au sous-diagnostic des hépatites aiguës à VHE. Une adhésion plus étroite aux recommandations concernant le VHE, notamment en médecine de ville, est attendue dans les prochaines années. Grâce au réseau de laboratoires partenaires publics et privés, une meilleure exhaustivité des cas d'hépatite E aiguë sera obtenue. Comme lors de la mandature précédente, les reliquats de sérum IgM anti-VHE positifs seront transmis au CNR pour la réalisation d'examens moléculaires complémentaires (quantification de l'ARN VHE et génotypage). La transmission concomitante des données clinico-biologiques (fiche CNR VHE) permettra d'identifier un lien entre le génotype et le phénotype clinique (nature et sévérité des manifestations cliniques). Des données préliminaires permettent de formuler deux hypothèses :

- une plus grande sévérité des infections à VHE - génotype 4 (rares en France) comparativement aux infections à VHE de génotype 3 (Jebblaoui et al, Clin Infect Dis 2013 ; Micas et al, Frontiers in Microbiology 2021)
- une plus grande sévérité des infections à VHE - génotype 3c comparativement aux infections à VHE - génotype 3f (Subissi et al, Epidemiol Infect 2019 ; Abravanel et al, Liver International 2020)

Par ailleurs, la distribution des sous-génotypes chez les personnes présentant des manifestations neurologiques (syndrome de Parsonage-Turner, syndrome de Guillain-Barré, méningo-encéphalite), associées à une infection à VHE-génotype 3 sera étudiée.

- b) **Etude des cas asymptomatiques d'hépatite E chez les donneurs de sang**

Depuis le 20 mars 2023, l'EFS a mis en place le dépistage génomique du VHE pour l'ensemble des dons à visée thérapeutique. Le plasma d'aphérèse à destination exclusive du fractionnement est exclu du périmètre. Le dépistage est réalisé dans 4 laboratoires de qualification biologique des dons en métropole et 3 laboratoires en territoire ultramarin. Le dépistage est réalisé en pools de 6 dons sur 90% des dons (Cobas VHE, Cobas 8800, Roche Diagnostic) et en unitaire pour 10% des dons de métropole et pour les territoires ultramarins (Ultrioplex E, Panther, Grifols).

Les échantillons testés positifs sont adressés au CNR avec une fréquence mensuelle pour quantification de l'ARN VHE et détermination du génotype.

Les donneurs positifs sont informés de l'infection par un courrier spécifique et invités à consulter leur médecin traitant. Par ailleurs un questionnaire épidémiologique est complété par le donneur et retourné par courrier à l'EFS.

Le CNR prévoit de déterminer la charge virale et le génotype chez environ 3000 individus par an dépistés par l'EFS. Le CNR poursuivra également la détermination de la charge virale et du génotype VHE chez les militaires donneurs

de sang testés par le CTSA. Le caractère systématique de cette approche permettra d'éliminer les biais liés à l'hétérogénéité des pratiques de dépistage et de préciser l'épidémiologie de l'infection à VHE en France. Une estimation précise de la prévalence dans les différentes régions françaises et l'évolution de celle-ci dans le temps permettra la mise en place de mesures préventives et le suivi de leur efficacité.

Les données de distribution des génotypes et sous-génotypes, obtenues en métropole et outre-mer, seront comparées aux données européennes et internationales. En Europe, le dépistage universel du VHE a été introduit en Irlande, au Royaume-Uni, aux Pays-Bas et en Suisse. Un dépistage sélectif est réalisé en Autriche, au Luxembourg, en Allemagne et en Espagne. Au Danemark, en Suède, aux USA et au Canada, il n'y a pas de dépistage mais des études ponctuelles sont réalisées.

c) Etude de la séroprévalence du VHE en France

Une étude similaire à celle réalisée en 2012 chez les donneurs de sang sera réalisée (Mansuy et al, Hepatology 2016). La méthodologie pour l'échantillonnage et le questionnaire seront identiques. L'objectif de ce travail sera de comparer la prévalence des marqueurs sérologiques du VHE (IgG anti-VHE et IgM anti-VHE) sur un intervalle d'une dizaine d'années à l'échelle nationale et de préciser l'évolution de l'exposition au VHE dans les différentes régions françaises. En effet, l'étude avait objectivé en 2012 une grande hétérogénéité régionale. Cette étude analysera également les facteurs associés à la séroprévalence du VHE et ceux-ci seront comparés à ceux de 2012.

d) Etude des mutations, délétions et insertions du génome VHE associées à une résistance à la ribavirine chez les sujets immunodéprimés traités pour une hépatite chronique E

La ribavirine est devenue le traitement de choix des hépatites E chroniques mais son mécanisme d'action reste inconnu. Des échecs thérapeutiques surviennent chez environ 20% des patients traités chez lesquels l'ARN VHE reste détectable dans le sang. Alors que des études in vitro suggéraient que des mutations de la polymérase virale pouvaient être associées à une résistance à la ribavirine, les travaux du CNR ont montré que ces mutations n'avaient pas d'influence sur l'effet antiviral de la molécule in vivo (Kamar Clin Infect Dis 2020). L'étude des séquences génomiques complètes du VHE chez des sujets répondeurs et non répondeurs avec appariement sur des critères démographiques, cliniques et virologiques sera réalisée afin de rechercher des séquences signatures d'un échec thérapeutique.

e) 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 à l'origine de cas groupés, dont un fatal, dans le Cantal. Le VHE a été également détecté dans les eaux usées près de Clermont-Ferrand par le CNR Entérovirus (Bisseux, EuroSurveillance 2018).

En collaboration avec des équipes ayant une compétence dans la recherche des virus dans les eaux (IFREMER, ANSES), des études préliminaires ont été réalisées (Miura et al, Food Environ Virol 2016). 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 Entérovirus et des virus des gastroentérites tant sur le plan méthodologique que technologique. Un lien avec les projets conduits sur le SARS-CoV-2 dans le cadre du consortium Emergen (WP6-Aubépine) nous paraît également pertinent.

f) Comparaison des distributions des génotypes et sous-génotypes VHE chez l'homme et chez les animaux réservoirs

Plusieurs travaux ont été réalisés antérieurement en collaboration avec les organisations compétentes en santé animale (ANSES), l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maison-Alfort et l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (Bouquet et al, Emerg Infect Dis 2011 ; Izopet et al, Emerg Infect Dis 2012 ; Lhomme et al, J Clin Virol 2013 ; Lhomme et al, Emerg Infect Dis 2015). Une des difficultés actuelles réside dans l'absence d'échantillonnage systématique dans les élevages porcins, principal réservoir animal de VHE. Ainsi la proportion relative des différents sous-types du génotype 3 chez le porc n'a pas été déterminée en France depuis environ 15 ans. Une étude en collaboration avec les mêmes partenaires Nicole Pavio (Ecole Nationale Vétérinaire de Maison-Alfort), Jean-Luc Guérin (Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse), et Nicolas Roses (ANSES) est envisagée.

Ce travail nécessitera l'obtention d'un financement spécifique pour la réalisation des prélèvements, la détection de l'ARN VHE et la caractérisation des souches chez les porcins.

8.4 Alerte

• VHA

Le fonctionnement reposera comme lors du précédent mandat avec des échanges mails immédiats entre CNR et correspondants de Santé Publique France sur tout phénomène anormal : augmentation inhabituelle de cas, apparition de cas groupés signalés par les ARS, modification des formes cliniques (répartition, modification de l'expression clinique, formes inhabituelles).

De plus, Santé Publique France et le CNR ont accès à la plateforme Epipulse, mise en place en 2021 par l'ECDC. Cette plateforme unique d'échange d'information permet de recevoir et d'envoyer des notifications à l'ensemble des partenaires européens impliqués dans la surveillance. Elle est utilisée notamment pour la surveillance de la diffusion européenne des souches. Ces échanges peuvent contribuer à identifier la source de cas groupés, des contaminations alimentaires, ou des populations à risque.

Les expertises dans le contexte transfusionnel ou dans le cadre de dons d'organes, tissus ou cellules seront réalisées avec l'EFS, l'agence Biomédecine et les autorités sanitaires.

• VHE

Les augmentations inhabituelles de cas, l'apparition de cas groupés, la modification des formes cliniques ou l'émergence de souches particulières seront signalées à Santé Publique France.

Les expertises effectuées à la demande des ARS seront réalisées en lien avec Santé Publique France selon les modalités de la précédente mandature.

Les expertises dans le contexte transfusionnel ou dans le cadre de dons d'organes, tissus ou cellules seront réalisées avec l'EFS et les autorités sanitaires.

1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR du virus des hépatites à transmission entérique : hépatite A et E

Le laboratoire du CHU de Toulouse (Pr Jacques Izopet) est en charge de l'activité hépatite E et le laboratoire du GHU Paris Saclay, à Villejuif (Pr Anne-Marie Roque-Afonso) est en charge de l'activité hépatite A. La coordination est assurée par le Pr Izopet. Les compétences des deux laboratoires pour le VHE et le VHA sont complémentaires et permettent de répondre avec efficacité aux missions d'expertise, de conseil et d'alerte. Pour la mission de surveillance, les deux laboratoires se sont engagés à renforcer la synergie sur les aspects logistiques, technologiques et scientifiques.

- Mise en commun du réseau de laboratoires avec partage des mêmes correspondants pour les hôpitaux universitaires, les hôpitaux généraux et les laboratoires privés afin de faciliter le transfert des souches et des informations. Une animation commune VHE/VHA pour ce réseau avec des réunions annuelles est également prévue.
- Organisation en commun de dossiers cliniques pour les laboratoires partenaires concernant le VHE et le VHA.
- Utilisation pour le VHE et le VHA de la plateforme de séquençage haut débit et des compétences bio informatiques du laboratoire de virologie du CHU de Toulouse.
- Conception de projets communs notamment avec le CNR des virus des gastroentérites et le CNR Entérovirus dans le domaine de l'étude des virus dans l'environnement.

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Laboratoire de Virologie du CHU de Toulouse, CNR-Laboratoire coordonnateur

- **Ressources humaines** : Etat des emplois affectés au CNR

L'équipe dédiée au CNR pour l'activité VHE est constituée de 3 biologistes (0.6 ETP), 1 data scientist et 3 ingénieurs

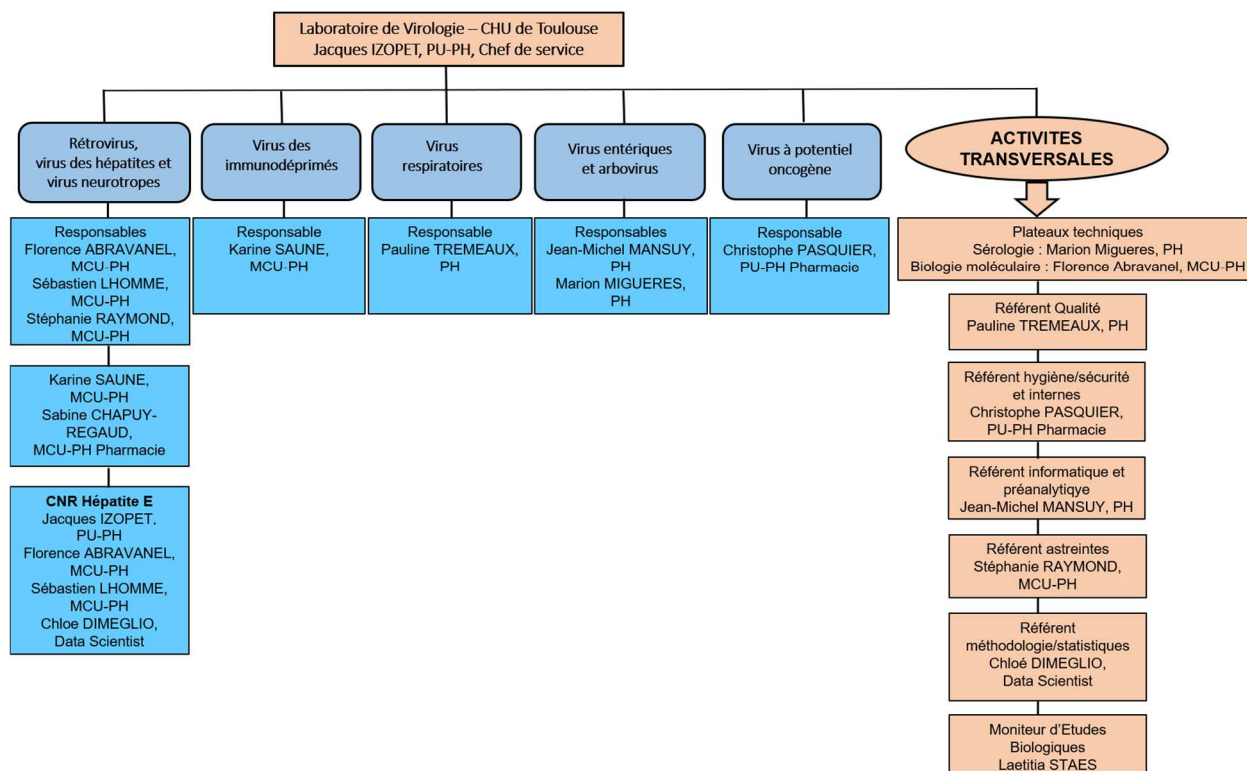
Nom	ETP	Qualification	Statut	Organisme payeur
Jacques Izopet	0.2	Biologiste, CS, Directeur du CNR coordonnateur	PU-PH	CHU Toulouse
Florence Abravanel	0.2	Biologiste	MCU-PH	CHU Toulouse
Sébastien Lhomme	0.2	Biologiste	MCU-PH	CHU Toulouse
Chloé Dimeglio	1	Data Scientist		
Justine Latour	1	Ingénieur-bioinformaticien		
Sofia Demmou	1	Ingénieur-bioinformaticien		
Clémentine De Smet	1	Ingénieur		

En complément de l'équipe dédiée au CNR, l'organisation ci-dessous permet l'implication d'autres personnels en fonction des projets et des activités du CNR :

Flore Staes : moniteur d'études biologiques / gestion des biothèques

Nicolas Jeanne : ingénieur bio-informaticien

- **Organigramme du laboratoire de virologie du CHU de Toulouse : Accréditation ISO 15189 – n° 8-1769**



Laboratoire de Virologie du GHU Paris Saclay, CNR-Laboratoire associé

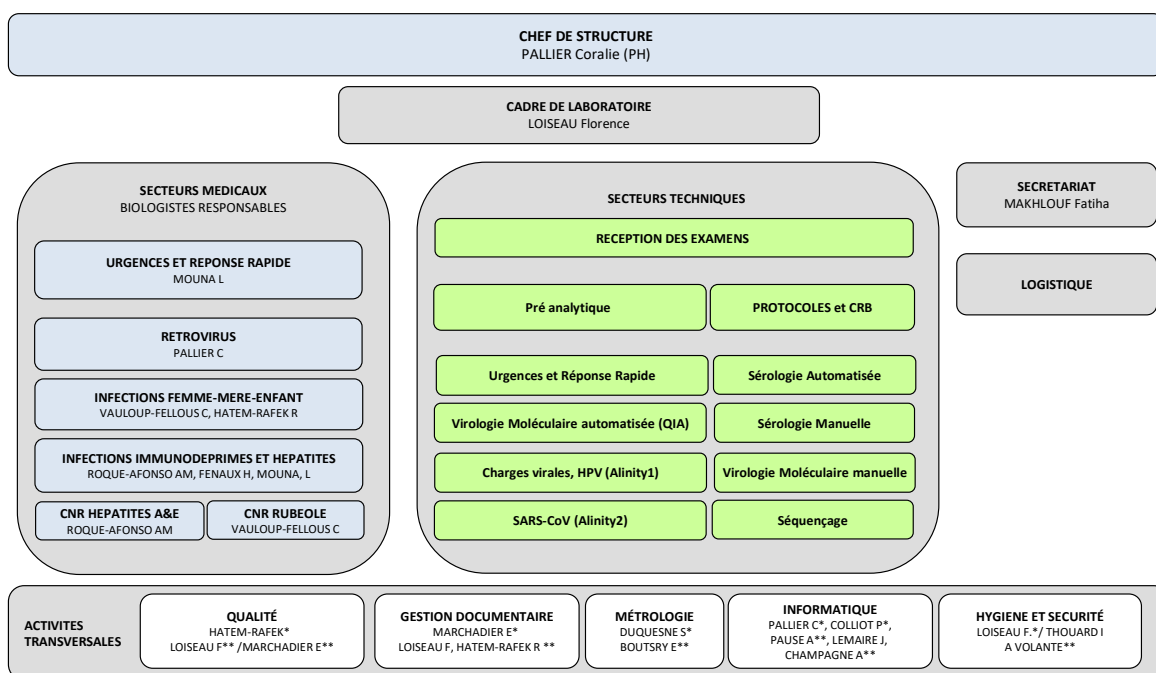
- **Ressources humaines** : Etat des emplois affectés au CNR

L'équipe dédiée au CNR pour l'activité VHA est constituée de 3 biologistes (0.5 ETP), 1 ingénieur (1 ETP) et 1 technicien (0.5 ETP). Le Pr Anne Marie Roque-Afonso (PU-PH) coordonne le CNR VHA. Le Dr Lina MOUNA (PH) assure la fonction de responsable adjoint.

Nom	ETP	Qualification	Statut	Organisme payeur
Anne-Marie Roque-Afonso	0.2	Médecin Biologiste, Directeur du CNR Associé	PU-PH	APHP
Lina Mouna	0.2	Pharmacien biologiste, Directeur Adjoint du CNR Associé	PHC	APHP
Honorine FENAU	0.1	Médecin Biologiste	PH	APHP
Amal CHAGOURI	1	Ingénieur d'études	Ingénieur	CNR
Eric Marchadier	0.5	Technicien	TLM	CNR

Le CNR est intégré au service de Virologie (LBM des Hôpitaux universitaires Paris Sud, accréditation ISO 15189). En complément de l'équipe dédiée au CNR, l'organisation ci-dessous permet l'implication d'autres personnels en fonction des projets et des activités du CNR, notamment pour la gestion des biothèques.

- **Organigramme du laboratoire de virologie du GHU Paris Saclay :**



*Titulaire ; **Suppléant

1.3 Locaux et équipements

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.

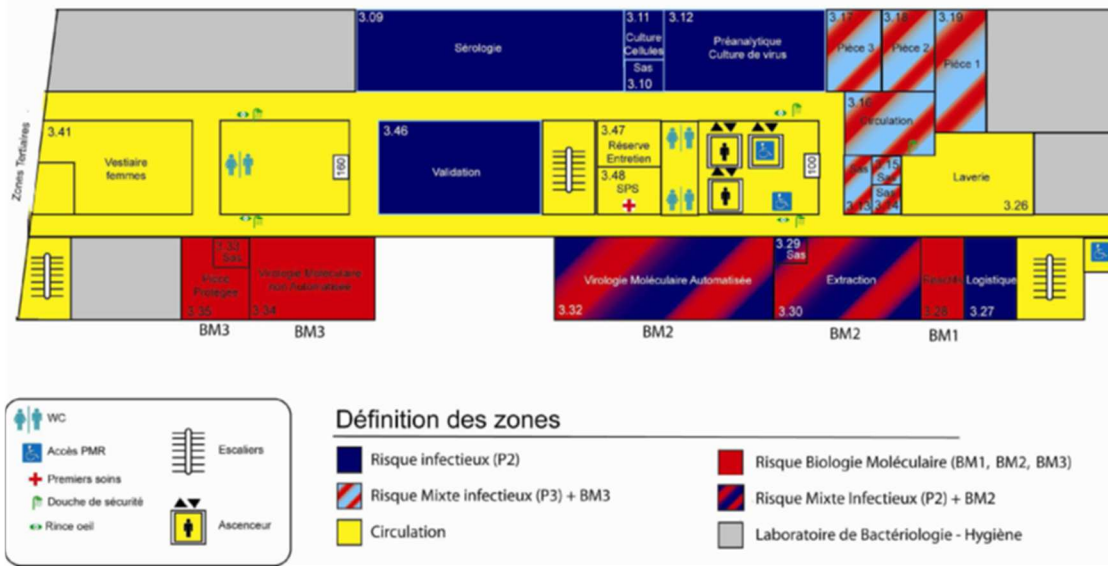
Le laboratoire est ouvert tous les jours 24h/24h.

Le laboratoire comporte des espaces tertiaires et 3 plateaux techniques :

- sérologie
- virologie moléculaire
- culture de virus en laboratoires L2 et L3



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 : 1 MagnaPure 96, 3 Altostars AM16 et 1 MGI SP960.
- Thermocycleurs 1 GenAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) ; 6 Mastercycler Nexus (Eppendorf) ; 3 Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems)
- Appareils de PCR en temps réel : 2 Light Cycler 2 (Roche), 7 Light Cycler 480 (Roche) ; 2 QuantStudio 5 (ThermoFisher) ; 6 CFX 96 (Biorad)
- 1 appareil de PCR digitale (Biorad)
- Séquenceur automatique d'acides nucléiques conventionnel, 3500 XL 24 capillaires (Applied Biosystems)
- Séquenceurs automatiques d'acides nucléiques NGS : NGS 3^{ème} génération Sequel IIe (Pacific Biosciences) et accès à des séquenceurs NGS 2^{ème} génération Illumina (NextSeq et Novaseq) et NGS 3^{ème} génération Oxford Nanopores).
- Robot de distribution : 1 instrument Hamilton
- Gestionnaires de microplaques ELISA
- Système Luminex
- Laboratoire de sécurité L3 avec ultracentrifugeuse et luminomètre

Le laboratoire dispose d'un accès direct aux différents plateaux techniques d'INFINITY, centre de recherche Inserm UMR1291/CNRS UMR5051 :

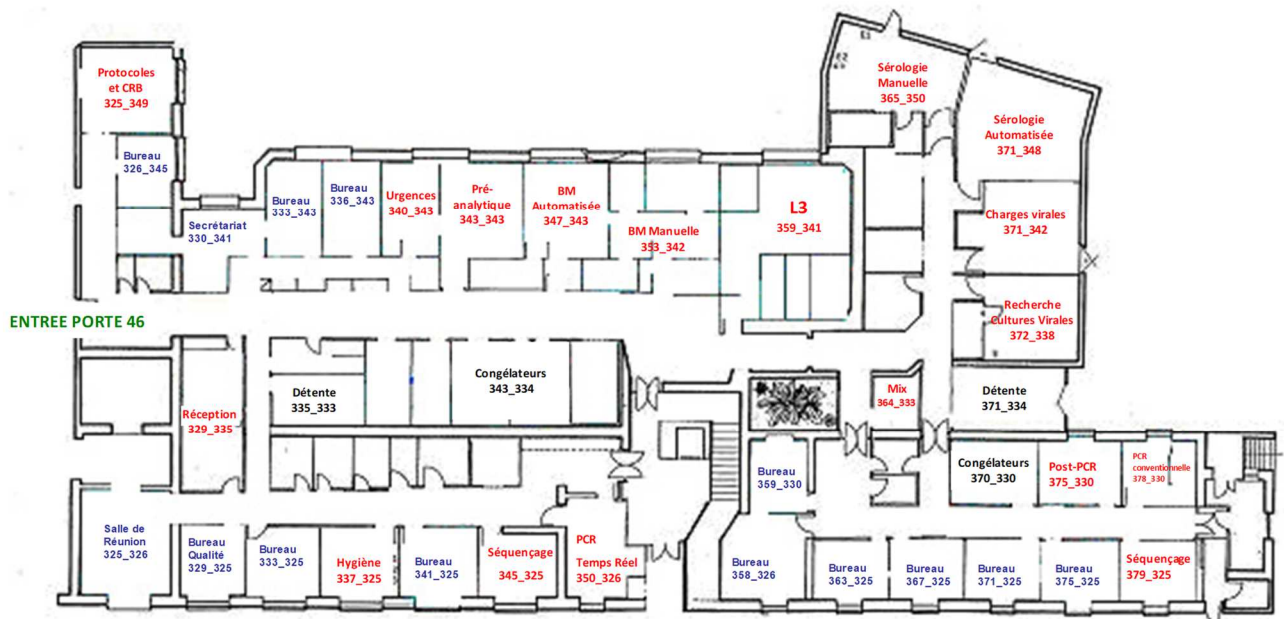
- . cytométrie en flux
- . imagerie cellulaire
- . génomique / transcriptomique
- . immunomonitoring

Laboratoire de Virologie du GHU Paris Saclay

Le laboratoire de virologie d'une surface de près de 500m² est situé au RCH du bâtiment Leriche, organisé autour d'une réception dédiée à la virologie, de secteurs techniques (Préanalytique, Protocoles et Centre de Ressources Biologiques, Urgences et réponse rapide, Sérologies manuelle et automatisée, Biologie moléculaire Manuelle et automatisée et Séquençage). Il est équipé d'un laboratoire L3, de 3 chambres froides, et de salles climatisées accueillant les congélateurs, dont ceux du CRB. Les bureaux sont intégrés dans cette organisation.

Le laboratoire est ouvert 6 jours /7 de 8h30 à 18h.

Plan du laboratoire



Les principaux équipements sont listés ci-dessous

- Congélateurs et enceintes froides avec surveillance centralisée des températures (Sirius, JRI)
- Automates d'immunoanalyse : Vidas (Biomérieux), Liaison XL (Diasorin), Cobas e6000 (Roche), IFlash (Orgentec)
- Automates d'extraction d'acides nucléiques : QiaSymphony (Qiagen), EasyMag et eMag (Biomérieux)
- Appareils de PCR en temps réel (7500, QuantStudio, RotorGeneQ) et thermocycleurs conventionnels
- Séquenceurs automatiques d'acides nucléiques : séquenceur capillaires SeqStudio (Applied Biosystems)
- Laboratoire L3 équipé d'1 ultracentrifugeuse Beckman

L'équipe de virologie a également un accès aux séquenceurs NGS de la plateforme de génétique somatique MiSeq (Illumina), un NextSeq est en cours d'acquisition pour assurer des créneaux en virologie.

Nous disposons d'un accès direct aux plateformes de l'IAL André Lwoff (UMS 33), sur Paul Brousse : cytométrie en flux, imagerie cellulaire, microscopie électronique et bioinformatique, notamment.

1.4 Collections de matériel biologique

Laboratoire de Virologie du CHU de Toulouse

Des collections de souches et antigènes de référence ont été constituées (n° DC-2015-2450) et stockés selon les règles du CRB du CHU de Toulouse (autorisation initiale AC-2015-2518 puis AC-2021-4822) :

- collection de plus de 4000 sérums ou selles contenant du VHE génotypé.
- collection de surnageants de culture de souches cliniques (3f et 3c).

Laboratoire de Virologie du GHU Paris Saclay

Les échantillons issus de l'activité du CNR VHA sont requalifiés pour la recherche et conservés au CRB Paris Saclay après caractérisation virologique au CNR. Le CRB Paris-Saclay est certifié AFNOR (NF S96-900). Les collections (tissus, fluides Acides Nucléiques), dont la collection CNR VHA, sont déclarées au ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation : dernière mise à jour CODECOH N° DC-2019-3686.

En juin 2023, 2687 échantillons étaient stockés : sérums (volume > 500 µl) ou selles contenant de l'ARN VHA dont la souche a été typée et sérums présentant des IgM VHA d'activation polyclonale (ARN négatif et avidité IgG >70%).

1.5 Démarche qualité du laboratoire

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.

Laboratoire de Virologie du GHU Paris Saclay

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). Les examens effectués au sein du CNR des hépatites à transmission entérique appartiennent à deux lignes de portée MG01 et VB01. Le laboratoire est déjà accrédité pour ces deux lignes en portée A, l'extension en portée B est prévue courant 2022. Il s'engage également à ouvrir en accréditation les lignes MG05 et VB04 auxquelles appartiennent les examens syndromiques et les analyses NGS effectués

- MG01 : portée A, Sérologies (IgM), Sérologies (IgG, Ac Totaux), portée B : Avidité IgG VHA
- VB01 : portée A : PCR VHE, portée B : PCR VHA, Génotypage VHA/VHE (Sanger)

L'organisation du système de management de la qualité se décline en approche processus/sous-processus, identifiés sur la cartographie des processus :

- Processus Management (M1 Stratégie et organisation, M2 Amélioration, M3 Système documentaire)
- Processus Réalisation (R1 Pré-analytique, R2 Analytique, R3 Post-analytique)
- Processus Support (S1 Ressources humaines, S2 Matériels, réactifs et consommables, S3 Exigences en matière de locaux, S4 Système d'information)

Les risques associés à chaque processus sont identifiés, hiérarchisés ; des actions d'amélioration prioritaires peuvent être identifiés, au regard du niveau de maîtrise du risque. L'évaluation de l'efficacité, de la pertinence et de la maturité des processus est réalisée lors d'une Revue annuelle : pour les sous-processus de réalisation, elle est assurée au sein de chaque structure interne. Celles des sous-processus management et support sont faites de manière transversale au sein du LBM. La gestion documentaire, le suivi des non-conformités et les actions d'amélioration continue sont réalisées grâce au logiciel Kalilab.

Les examens effectués dans le cadre du CNR et les préconisations à l'usage des professionnels de santé sont inclus dans le guide des examens du LBM VISKALI : <https://hups.manuelprelevement.fr/GHT/hups/> . L'ensemble des exigences pré-analytiques sont précisé ainsi que les documents indispensables à la bonne réalisation des explorations biologiques (Nature de prélèvement, conditions d'acheminement, délai de rendu des résultats, délai d'ajout d'examen et cotations, feuille de demande et fiches de renseignements cliniques).

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 associé pour la Rubéole, au sein du CNR Rougeole Oreillons Rubéole. Au titre de cette activité, le laboratoire est accrédité en tant que laboratoire National OMS pour la Rubéole depuis Février 2014.

Démarche commune

Les deux laboratoires du CNR pratiquent depuis 2012 des échanges inter-laboratoire pour des marqueurs pour lesquels il n'existe pas d'organisation d'évaluation externe de la qualité notamment pour la détection de l'ARN VHA et le génotypage du VHE.

2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

Laboratoire de Virologie du CHU de Toulouse

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

Le CNR VHE est équipé d'un séquenceur automatique (Sanger) et d'un instrument NGS de 3^{ème} génération (long fragments), Sequel Ile (Pacific Biosciences). Le laboratoire dispose également d'un accès à du séquençage très haut débit (Novaseq 6000, Illumina) sur la plateforme génomique/bio-informatique Get-PlaGe (INRAE) et à du séquençage rapide sur Minion (Oxford Nanopore) en collaboration avec l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Les analyses bioinformatiques sont réalisées par les deux bioinformaticiens du laboratoire en lien avec la cellule bioinformatique du pôle biologie (5 bioinformaticiens) permettant le calcul, le stockage et l'archivage.

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 chez les donneurs de sang.

Les tests sérologiques sont les suivants :

- Test de détection des anticorps IgM et IgG anti-VHE par EIA (Wantai Biological Pharmacy Enterprise Co, China) (Mansuy et al, Emerg Infect Dis, 2011 ; Abravanel et al, J Clin Virol 2013) et technique Liaison Murex anti-HEV IgG et IgM (Abravanel et al, Viruses 2022).
- Etude de l'avidité des IgG VHE (par adaptation de la technique EIA IgG Wantai)
- Titrage des IgG anti-VHE à l'aide du standard international NIBSC 95/584 (par adaptation de la technique IgG Wantai) (Abravanel et al, J Infect Dis 2014) et technique Liaison Murex IgG anti-VHE.
- Détection de l'antigène de capsid du VHE par EIA sandwich (Trémeaux et al, J Clin Virol, 2016)

Les tests moléculaires sont les suivants :

- Détection et quantification du génome viral : RT-PCR en temps réel développée au laboratoire ciblant la région ORF3 du génome (Abravanel et al, J Clin Microbiol, 2012) et technique commercialisée Altona (Abravanel et al, J Clin Microbiol, 2013)
- Caractérisation des souches:
 - o Séquençage et analyse phylogénétique de la région ORF2 ou ORF1 (Legrand-Abravanel et al, Emerg Infect Dis, 2009).
 - o Séquençage de génomes complets (Legrand-Abravanel et al, Emerg Infect Dis, 2009 ; Izopet et al, Emerg Infect Dis 2012, Nicot et al, Rev Med Virol 2018, Nicot et al, Front Microbiol 2020).
 - o Séquençage de la polymérase virale pour caractériser l'impact des mutations du génome sur l'efficacité du traitement par ribavirine (Kamar et al, Clinical Infect Dis 2019).
- Analyse des quasi-espèces par clonage et séquençage des variants ou séquençage haut débit (Kamar et al, Am J Transplant, 2010 ; Lhomme et al, J Virol 2012, Lhomme et al, J Infect Dis 2014 ; Lhomme et al, Antimicrobiol Agent and Chemother 2015, Abravanel et al, Vaccines 2021)
- Le CNR VHE a développé une technique de détection et de séquençage de l'ARN du VHE du rat génotype HEV-C (Parraud, Front Med 2021) (Technique non accréditée)

Des techniques de culture cellulaire du VHE ont été développés sur les lignées hépatocytaires PLC/PRF-5 et HepG2/C3A ainsi que sur la lignée pulmonaire A549 (Lhomme et al, J Virol 2012). Des lignées hépatocytaires polarisées (Capelli et al, J Virol 2019) et des cultures sur entérocytes primaires ou explants intestinaux (Marion et al, Gut, 2020) sont également utilisées.

Plusieurs souches cliniques de génotype 1, 3f et 3c ont été adaptées sur ces systèmes.

Base de données de séquences

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.

Le laboratoire a contribué à un travail collectif international visant à établir un panel de séquences de référence afin de faciliter le génotypage des souches et les études d'épidémiologie moléculaire (Smith et al, J Gen Virol, 2020).

Laboratoire de Virologie du GHU Paris Saclay

Tests Sérologiques

- Détection des anticorps totaux (Cobas, Roche), quantification des anticorps totaux (Biorad) et détection des IgM (Vidas, BioMérieux)
- Avidité des IgG VHA (Desbois et al, J Clin Microbiol 2004 ; Roque-Afonso et al, Clin Infect Dis 2006). Cette technique est réalisable si le titre d'IgG anti-VHA est > 200 mUI/ml.
- IgM Salivaires et IgA sériques et salivaires

Détection et quantification du génome viral

- Adaptation à la quantification du test Altostar HAV RT-PCR kit (Altona), par utilisation du standard international

Caractérisation des souches

- RT-PCR de la région VP1-2A (500 nucléotides) permettant le génotypage par séquençage sanger et analyse phylogénétique de la région VP1/2A
- Séquençage du génome complet par marche en avant (NGS en développement)

Culture cellulaire

- Lignées fibroblastiques FRh-K4 et hépatocytaires Huh7. La souche cytopathique HM175-18f et plusieurs souches cliniques sont cultivables sur ces systèmes.

Base de données de séquences

La Base de données de séquences VHA est gérée par le logiciel Bionumerics (>2500 séquences génotypées et annotées sur l'origine géographique et certains facteurs de risque). Bionuméric permet le croisement rapide des données en cas d'alerte transfrontalière, par échange avec nos correspondants européens.

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

- Tests sérologiques commercialisés
- Tests moléculaires commercialisés