

RAPPORT ANNUEL

D'ACTIVITE 2023

Année d'exercice 2022

CNR Virus des hépatites B, C et Delta

	Organisme / Structure d'hébergement	Responsable
Laboratoire Coordonnateur	AP-HP – Hôpital Universitaire Henri Mondor	Dominique Challine
Laboratoire Associé	AP-HP – Hopitaux Universitaires de Paris Seine-Saint-Denis	Emmanuel Gordien

Résumé analytique	4
Faits marquants	4
Executive summary	5
Highlights	5
1. Missions et organisation du CNR	6
Organigramme	6
Mission et Organisation	6
Démarche Qualité	6
2. Activités d'expertise	7
2.1 Evolution des techniques	7
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse	7
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	15
2.4 Collections de matériel biologique	16
2.5 Activités d'expertises	17
2.6 Activités de séquençage	20
2.7 Partage de séquences produites par les CNR	22
3. Activités de surveillance	23
3.1 Description du réseau de partenaires	23
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	25
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	38
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	40
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	40
4. Alertes	43
5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil	44
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	44
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	44
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	45
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	46
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	46
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	50
7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux	52
8. Programme d'activité pour les années suivantes	53
1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	58
1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	58
1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	59
1.3 Locaux et équipements	60
1.4 Collections de matériel biologique	64
1.5 Démarche qualité du laboratoire	65
2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	66
2.1 Liste des techniques de référence	66

2.2	Liste des techniques recommandées par le CNR	66
3.	Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques).....	68
3.1	Permanence du CNR	68
3.2	Autorisations MOT	68
3.3	Autorisations d'exercer la biologie médicale	68
3.4	Résultats de recherches non encore publiés ou sous embargo.....	68
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.....	69
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	69
3.7	Autres remarques à destination du comité des CNR.....	69

RESUME ANALYTIQUE

Faits marquants

Le Centre National de Référence (CNR) des Virus d'Hépatites B, C et delta est localisé au sein du laboratoire de virologie de l'hôpital Henri Mondor à Créteil (Val-de-Marne). Sa direction est assurée par la Docteure Dominique Challine. Le CNR comprend également un laboratoire associé, le laboratoire de microbiologie clinique des hôpitaux universitaires Paris Seine-Saint-Denis, localisé à l'hôpital Avicenne, dirigé par le Docteur Emmanuel Gordien, pour les aspects concernant le virus delta.

Le CNR coordonnateur a pour missions d'assurer l'expertise biologique et de contribuer à la surveillance des infections par les virus d'hépatites B, C et delta et de leur résistance aux antiviraux. L'ensemble de ces activités permet d'assurer un conseil technique d'expert et, en cas de phénomènes épidémiologiques inhabituels d'alerter la Direction Générale de la Santé et Santé publique France (arrêté du 29 novembre 2004, publié au JORF n°281 du 3 décembre 2004, page 20584, texte n°4).

L'année 2022 a été une année de développement de nouvelles techniques en alternative au prélèvement veineux (tests de diagnostic rapides, micro-prélèvements volumétriques, spots de sang séché, POCT moléculaires, ...) pour le dépistage, le diagnostic et le suivi des hépatites virales chroniques. L'évaluation des trousse de réactifs s'est amplifiée comme en témoignent les nombreuses publications sur le sujet. Un contrôle de qualité national pour la détection et la quantification de l'ARN du VHD a été mis en place auprès d'un grand nombre de laboratoires. La surveillance des infections par les virus B, C et delta avec la mise en place de réseaux de surveillance dans des populations particulières fréquentant les structures médico-sociales spécialisées (CSAPA, CAARUD, UCSA), ainsi que la surveillance de la résistance du VHB et du VHC aux antiviraux directs s'est poursuivie. La surveillance de la circulation des souches delta s'est également poursuivie et amplifiée en France, mais également dans de nombreux pays d'Afrique. Enfin, la surveillance des donneurs de sang s'est également poursuivie.

EXECUTIVE SUMMARY

Highlights

French National Reference Center (NRC) for hepatitis B, C and delta viruses is located at the Henri Mondor University hospital in Créteil (Université Paris-Est Créteil). NRC consists in two medical laboratories including an additional associated laboratory, the NRC's "delta hepatitis", which is located in the virology unit of the clinical microbiology of the Paris Seine-Saint-Denis University hospitals.

Missions of the French National Reference Centers are described in the Official Journal of the Republic of France (JO n°141 of June 8, 2016, text 10 of 118). Missions are based on 4 main principles: expertise, advice, epidemiological surveillance and alerts.

During 2022, establishment and development of new technologies occurred including rapid diagnostic tests, molecular point-of-care tests and dried blood spot sampling for whole blood collection. These alternatives are potentially interesting alternatives to venous whole blood for large-scale screening, diagnosis and monitoring viral hepatitis B, C and delta infections. News kits and platforms are been evaluated and their analytical and clinical performance were published in peer-review journals. Another important aspect was the development of molecular quality controls for delta hepatitis with the involvement of a large number of clinical laboratories including public and private labs. Surveillance of hepatitis B, C and delta infections in specific populations and surveillance of resistance of viral hepatitis to direct antivirals have been conducted. Surveillance of delta hepatitis strains circulating in France as well as in African and Asian countries have been also conducted. Finally, surveillance of viral hepatitis in blood donors has been persuaded.

1. Missions et organisation du CNR

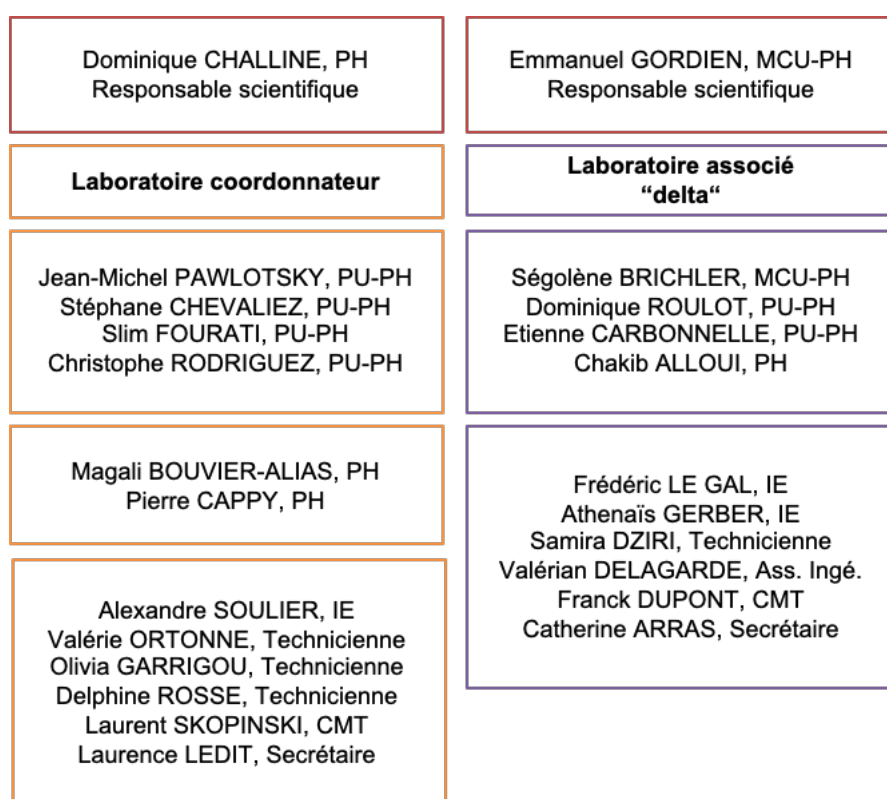
Organigramme

Le Centre National de Référence des Virus d'Hépatites B, C et delta est constitué d'un laboratoire coordonnateur (Département Prévention, Diagnostic, Traitement des infections – Hôpitaux Henri Mondor – Créteil – Responsable : Dominique Challine) et d'un laboratoire associé (Laboratoire de Microbiologie Clinique – Hôpitaux Universitaires Paris Seine-Saint-Denis – Responsable : Emmanuel Gordien).

En 2022, les changements suivants ont eu lieu :

. Le laboratoire coordonnateur a perdu M. Quentin Lucas, qui à ce jour n'a pas été remplacé faute de candidat

. Le laboratoire associé a recruté Mme Valérian Delagarde en tant qu'Assistant Ingénieur, en remplacement de Mme Rischa Oktavia.



Mission et Organisation

Aucun changement dans l'organisation des laboratoires, coordonnateur et associé, n'est intervenu au cours de l'année 2022.

Démarche Qualité

Au niveau des hôpitaux Universitaires Henri Mondor, la dernière visite du COFRAC Norme ISO 15189 a eu lieu la semaine du 23 mars 2023, semaine pendant laquelle l'ensemble de la sérologie infectieuse a été audité. Aucun écart, critique ou non critique, n'a été relevé.

Au niveau des Hôpitaux Universitaires Paris Seine-Saint-Denis, une visite de suivi du COFRAC a eu lieu en novembre 2021. Pour l'ensemble du laboratoire de biologie, 12 écarts critiques et 13 écarts non critiques avaient été constatés. La plupart des écarts ont été clôturés. La prochaine visite du COFRAC est prévue en juillet 2023.

2. Activités d'expertise

L'activité d'expertise a essentiellement consisté en (i) le développement, la standardisation et l'évaluation analytique et cliniques des tests pour la détection et la quantification des génomes viraux, (ii) le typage moléculaire des souches de VHB et du VHD, (iii) la mise au point de la détection des marqueurs virologiques du VHD à partir de spot de sang séché.

2.1 Evolution des techniques

De nouvelles trousse de réactifs (cobas® HBV Test et cobas® HCV Test) pour la quantification de l'ADN du VHB et de l'ARN du VHC sur le nouvel automate cobas 5800 (Roche Diagnostics) sont désormais utilisées au laboratoire coordonnateur en remplacement de trousse plus anciennes qui utilisaient le cobas 4800 (Roche Diagnostics). Les performances de ces nouvelles trousse et automate sont satisfaisantes (voir ci-dessous). Une nouvelle trousse sérologique de dosage de l'antigène de surface de l'hépatite B (AgHBs) sur l'Alinity i a été également implémentée [Alinity i HBsAg Next Qualitative Reagent Kit (HbsAgNx)] en place de l'ancien dosage du fait d'une sensibilité analytique accrue. En effet, la sensibilité analytique de cette nouvelle trousse est estimée à ~5 mUI/mL, soit 4 fois plus sensible que la trousse précédemment utilisée.

Le développement des méthodes alternatives au prélèvement veineux pour le dépistage, le diagnostic et le suivi des hépatites virales est en plein essor (TDR, micro-prélèvements volumétriques, spots de sang séché, POCT moléculaires, ...). Les spots de sang séché permettent la détection de marqueurs sérologiques et moléculaires. La détection des marqueurs virologiques du VHD à partir de spots de sang séché a été développée. Après une redéfinition du seuil d'interprétation, la spécificité de détection des anticorps du VHD (anti-HD) était satisfaisante (respectivement 97,5% et 87,5% selon la trousse sérologique), tandis que la sensibilité restait élevée (>90%). La détection de l'ARN du VHD est possible mais une optimisation est à envisager (voir ci-dessous).

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

Le développement, la standardisation et l'évaluation des performances analytiques et cliniques et des indications des tests et des nouvelles technologies virologiques à visée diagnostiques et de suivi thérapeutique des hépatites virales chroniques ont donné lieu à de nombreuses études (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Trousse et automates évalués au cours de l'année 2022

Trousse	Application(s)	Fabricant
cobas HBV Test	Détection/quantification de l'ADN VHB à partir de plasma/sérum	Roche Diagnostics
cobas HCV Test	Détection/quantification de l'ARN VHC à partir de plasma/sérum	Roche Diagnostics
HBV ELITe MGB kit	Détection/quantification de l'ADN VHB à partir de plasma/sérum	ELITechGroup
HCV ELITe MGB kit	Détection/quantification de l'ARN VHC à partir de plasma/sérum	ELITechGroup
LIAISON XL murex Anti-HDV	Détection des anticorps VHD à partir de spot de sang séché	Diasorin
HDV Ab DIA.PRO	Détection des anticorps VHD à partir de spot de sang séché	Diagnostic Bioprobes
EurobioPlex HDV qRT-PCR	Détection de l'ARN VHD à partir de spot de sang séché	Eurobio
Sentosa SQ HBV Genotyping assay	Détermination du génotype du VHB et des profils de résistance du VHB aux analogues nucléos(t)idiques	Vela Diagnostics
Bosphore HDV quantification – detection kit V1	Détection/quantification de l'ARN VHD à partir de plasma	Anatolia Genetics
RealStar HDV RT-PCR kit 1.0	Détection/quantification de l'ARN VHD à partir de plasma	Altona Diagnostics

Performances de la trousse cobas HBV Test pour la détection et la quantification de l'ADN du VHB à partir de plasma sur le nouveau système c5800. Les performances de la trousse cobas HBV Test ont été évaluées à partir de 341 échantillons plasmatiques collectés chez 200 porteurs chroniques de l'AgHBs et 92 individus négatifs pour l'AgHBs. La spécificité était de 99,1% (IC95% : 95,1-99,8%), seul un échantillon était détecté mais non quantifié avec la trousse cobas HBV Test. Les valeurs de charges virales (ADN VHB) ont été évaluées à l'aide de la trousse cobas HBV Test sur l'automate c5800, ainsi qu'avec la trousse cobas HBV Test sur l'automate c4800 (comparateur). Les valeurs de charges virales étaient significativement corrélées ($p < 0,0001$), et ce quel que soit le niveau de l'ADN VHB (**Figure 1**). Les biais observés entre les valeurs mesurées avec les 2 trousse étaient faibles ($-0,05 \pm 0,25$ Log UI/mL). Les cinétiques de charges virales sous traitement ont été évaluées chez 8 patients traités par analogues nucléos(t)idiques [ETV, TDF±FTC ($\pm$ pegIFN)] dont 3 patients coinfectés VIH/VHB. Dans tous les cas, les courbes de charges virales étaient rigoureusement superposables (**Figure 2**).

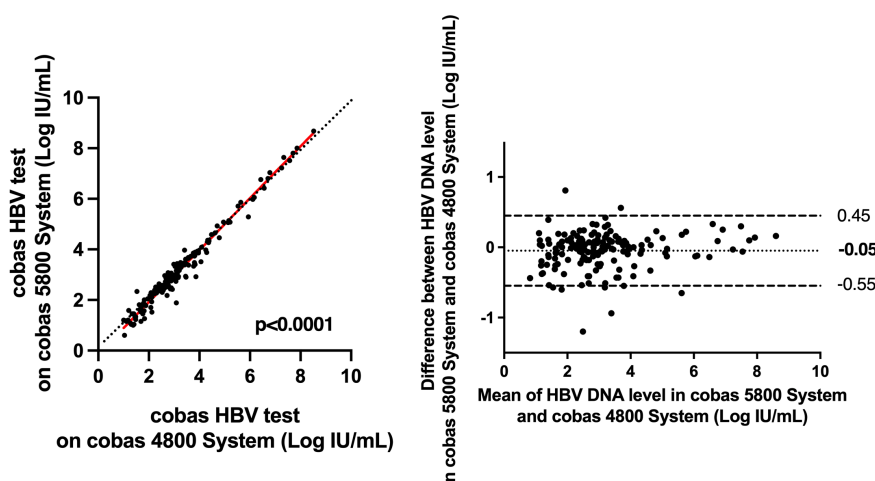


Figure 1 : Corrélation de Deming et représentation de Bland-Altman des valeurs de charges virales (ADN VHB) mesurées à l'aide des trousse cobas HBV Test sur les automates c4800 et c5800 à partir de 168 échantillons plasmatiques collectés chez des porteurs chroniques de l'AgHBs.

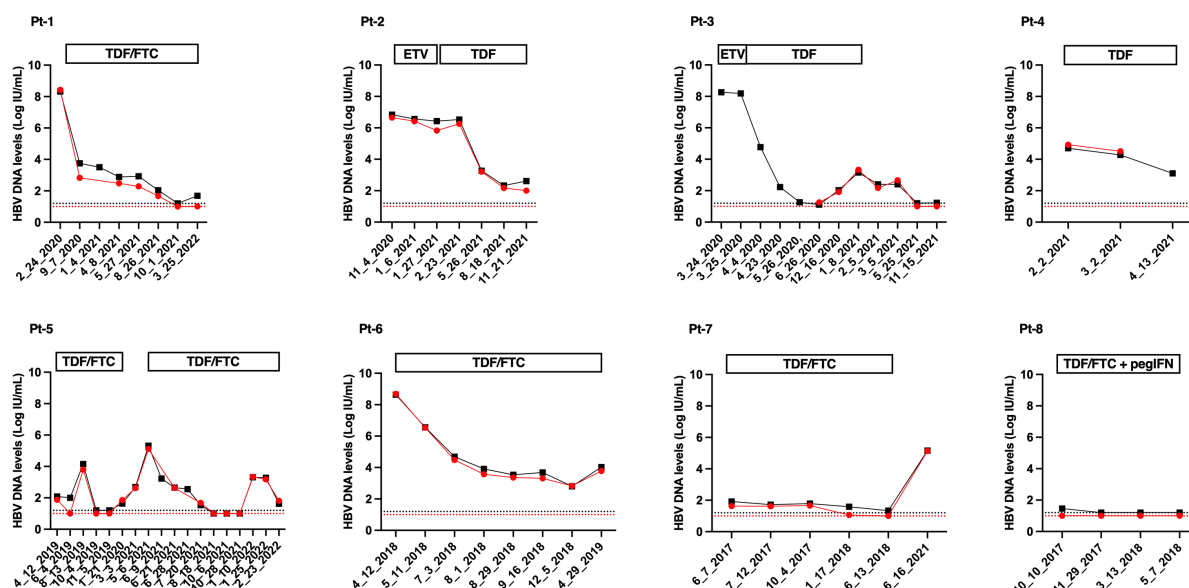


Figure 2 : Cinétiques de charges virales (ADN VHB) mesurées par la trousse cobas HBV Test sur les automates c4800 (lignes et carrés noirs) et c5800 (lignes et ronds rouges) chez 8 patients traités par analogues nucléos(t)idiques. Pt : patient ; TDF : tenofovir ; FTC : emtricitabine ; ETV : entecavir ; pegIFN : interféron pégylé.

Performances de la trousse cobas HCV Test pour la détection et la quantification de l'ARN du VHC à partir de sérum sur le nouveau système c5800. Les performances de la trousse cobas HCV Test ont été évaluées à partir de 376 échantillons sériques collectés chez 180 porteurs chroniques du VHC et 117 individus séronégatifs pour le VHC. La répartition des génotypes (disponible pour 126 patients) était la suivante : 47,6% de génotype 1 ($n=60$), 10,3% de génotype 2 ($n=13$), 25,4% de génotype 3 ($n=32$), 13,5% de génotype 4 ($n=17$) et 3,2% de

génotype 5a (n=4). La spécificité était de 100% (IC95% : 96,8-100%). L'ARN VHC a été quantifié en parallèle à l'aide de la trousse cobas HCV Test sur l'automate c5800 et avec l'une des 2 trousse suivantes (comparateurs) : Abbott Realtime HCV (Abbott) ou Alinity m HCV (Abbott). Les valeurs de charges virales étaient significativement corrélées ($p < 0,0001$), et ce quels que soient le niveau de l'ARN VHC et le génotype. Les biais observés entre les valeurs mesurées étaient faibles, et ce quelle que soit la trousse utilisée comme comparateur (respectivement, $0,11 \pm 0,28$ Log UI/mL et $0,25 \pm 0,26$ Log UI/mL avec les trousse Abbott RealTime HCV et Alinity m HCV). Les cinétiques de charges virales sous traitement ont été évaluées chez 11 patients traités par antiviraux à action directe (AAD) pendant 8 à 24 semaines. Dans tous les cas, les courbes de charges virales étaient rigoureusement superposables (Figure 3).

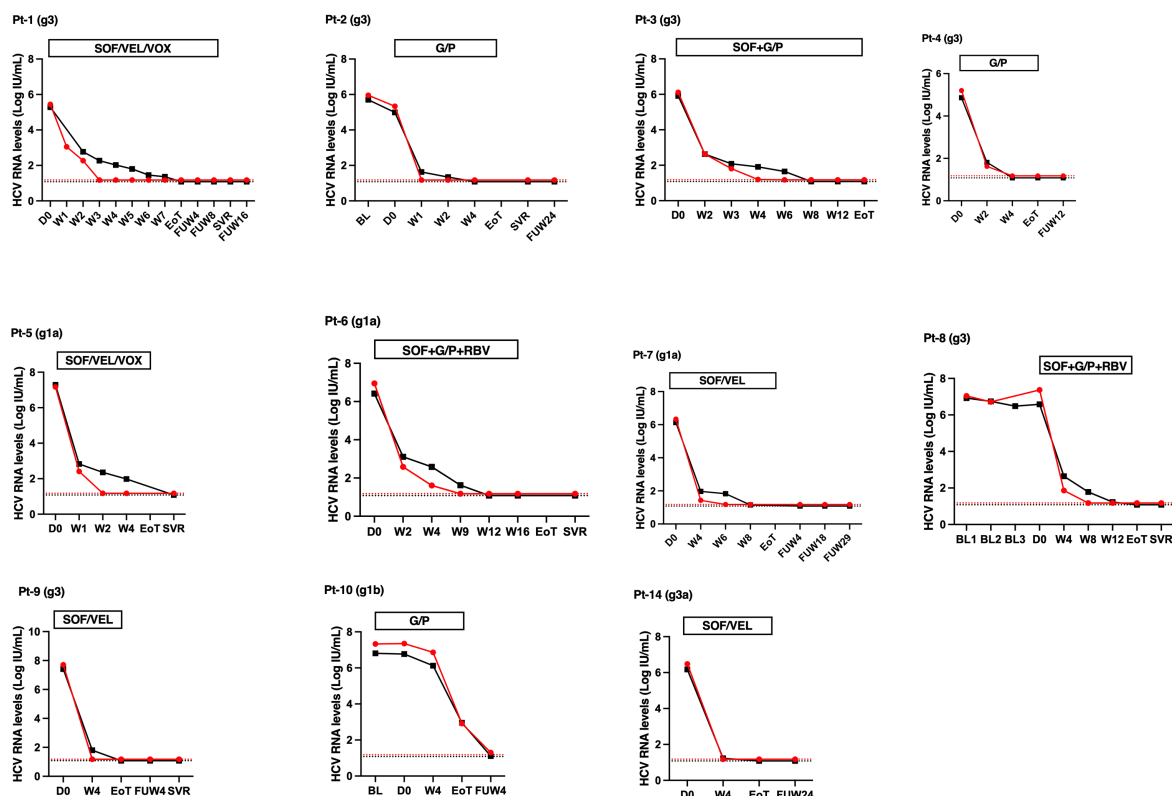


Figure 3 : Cinétiques de charges virales (ARN VHC) mesurées par la trousse cobas HCV Test sur le système c5800 (lignes et ronds rouges) et les trousse Abbott RealTime HCV ou Alinity m HCV (lignes et carrés noirs) chez 11 patients traités par différentes combinaisons d'antiviraux à action directe. Pt : patient ; g : génotype ; SOF : sofosbuvir ; VEL : velpatasvir ; VOX : voxilaprevir ; G : glecaprevir ; P : pibrentasvir ; RBV : ribavirine ; BL : baseline, D : jour ; W : semaine, EoT : fin de traitement ; FU : suivi ; SVR : réponse virologique soutenue.

Performances de la trousse HBV ELITE MGB Kit pour la détection et la quantification de l'ADN du VHB à partir de plasma sur le système ELITE InGenius. Les performances de la trousse HBV ELITE MGB kit ont été évaluées à partir de 354 échantillons plasmatiques collectés chez 200 porteurs chroniques de l'AgHBs et 102 individus négatifs pour l'AgHBs. La spécificité était de 100% (IC95% : 96,4-100%). Les valeurs de charges virales (ADN VHB) ont été évaluées en parallèle à l'aide de la trousse HBV ELITE MGB Kit, ainsi qu'avec la trousse cobas HBV Test sur l'automate c5800 (comparateur). Les valeurs de charges virales étaient significativement corrélées ($p < 0,0001$), et ce quel que soit le niveau de l'ADN VHB (Figure 4). Les biais observés entre les valeurs mesurées avec les 2 trousse étaient faibles ($0,18 \pm 0,39$ Log UI/mL). Les cinétiques de charges virales sous traitement ont été évaluées chez 8 patients traités par analogues nucléos(t)idiques [ETV, TDF±FTC (±pegIFN)] dont 5 patients coinfectés VIH/VHB. Dans tous les cas, les courbes étaient rigoureusement superposables (Figure 5).

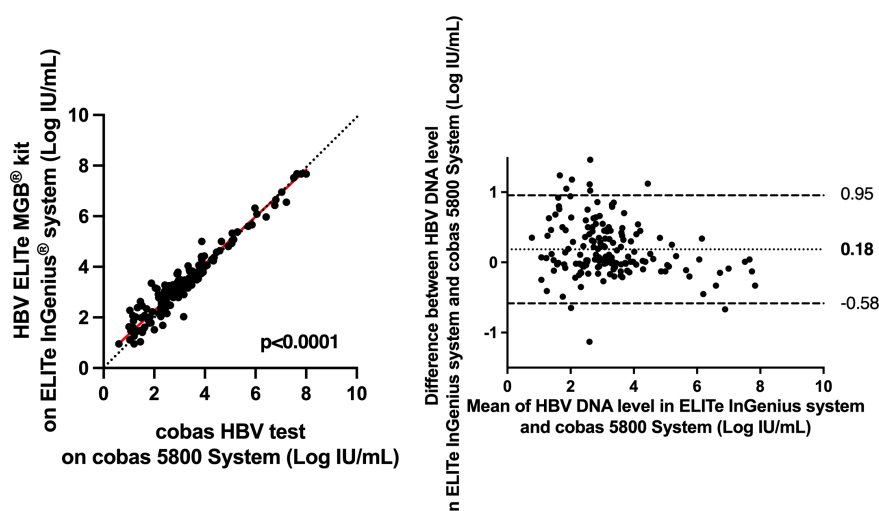


Figure 4 : Corrélation de Deming et représentation de Bland-Altman des valeurs de charges virales (ADN VHB) mesurées à l'aide des trousse HBV ELITE MGB kit et cobas HBV Test sur le c5800 à partir de 200 échantillons plasmatiques collectés chez des porteurs chroniques de l'AgHBs.

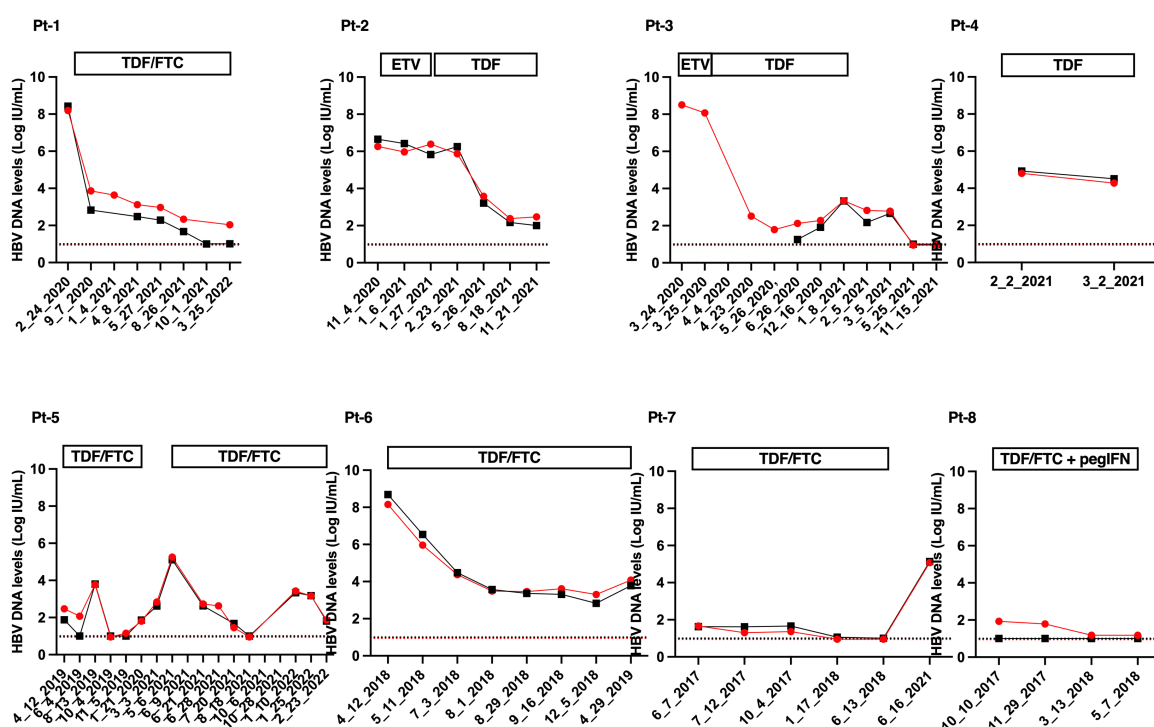


Figure 5 : Cinétiques de charges virales (ADN VHB) mesurées par la trousse HBV ELITE MGB kit (lignes et carrés noirs) et cobas HBV Test sur le c5800 (lignes et ronds rouges) chez 8 patients traités par analogues nucléos(t)idiques. Pt : patient ; TDF : tenofovir ; FTC : emtricitabine ; ETV : entecavir ; pegIFN : interféron pégylé.

Performances de la trousse HCV ELITE MGB Kit pour la détection et la quantification de l'ARN du VHC à partir de sérum sur le système ELITE InGenius. Les performances de la trousse HCV ELITE MGB Kit ont été évaluées à partir de 291 échantillons sériques collectés chez 118 porteurs chroniques du VHC et 103 individus séronégatifs pour le VHC. La répartition des génotypes (disponible pour 89 patients) était la suivante : 49,5% de génotype 1 (n=44), 6,7% de génotype 2 (n=6), 29,2% de génotype 3 (n=26), 12,4% de génotype 4 (n=11) et 2,2% de génotype 5a (n=2). La spécificité était de 100% (IC95% : 96,4-100%). L'ARN VHC a été quantifié en parallèle à l'aide des trousse HCV ELITE MGB Kit et cobas HCV Test sur l'automate c5800 (comparateur). Les valeurs de charges virales étaient significativement corrélées ($p < 0,0001$), et ce quel que soit le génotype. Les biais observés entre les valeurs mesurées avec les 2 trousse étaient faibles ($-0,25 \pm 0,37$ Log UI/mL) (**Figure 6**). Les cinétiques de charges virales sous traitement ont été évaluées chez 11 patients traités par antiviraux à action directe (AAD) administrés pendant 8 à 24 semaines. Dans tous les cas, les courbes étaient parallèles (**Figure 7**).

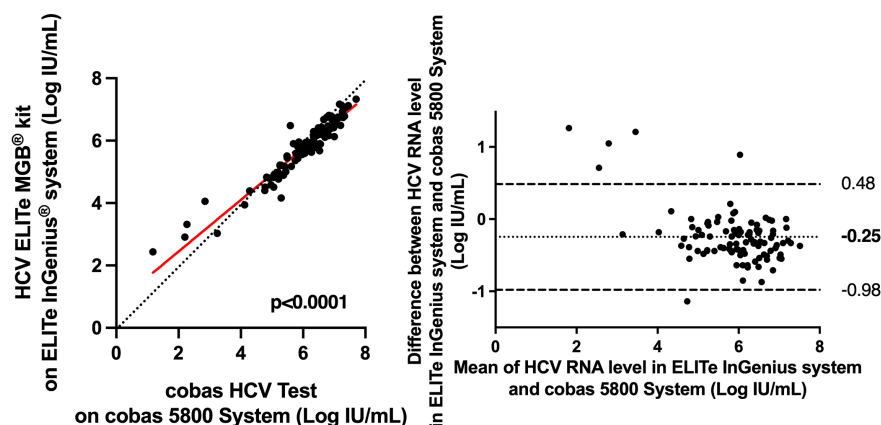


Figure 6 : Corrélation de Deming et représentation de Bland-Altman des valeurs de charges virales (ARN VHC) mesurées à l'aide des trousse HCV ELITE MGB kit et cobas HCV Test sur le c5800 à partir de 100 échantillons sériques collectés chez des porteurs chroniques du VHC.

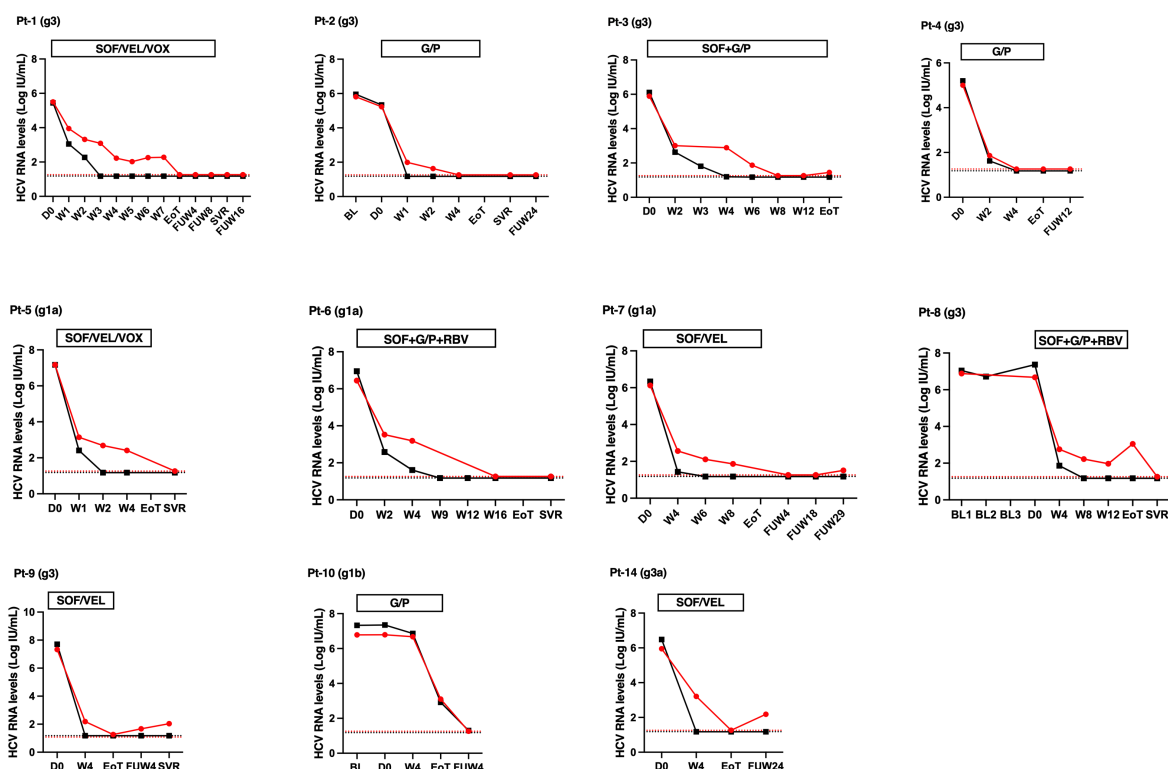


Figure 7 : Cinétiques de charges virales (ARN VHC) mesurées par la trousse HCV ELITE MGB Kit (lignes et ronds rouges) et la trousse cobas HCV Test sur le système c5800 (lignes et carrés noirs) chez 11 patients traités par différentes combinaisons d'antiviraux à action directe. Pt: patient; g: génotype; SOF: sofosbuvir; VEL: velpatasvir; VOX: voxilaprevir; G: glecaprevir; P: pibrentasvir; RBV: ribavirine; BL: baseline, D: jour; W: semaine, EoT: fin de traitement; FU: suivi; SVR: réponse virologique soutenue.

Performances des trousse sérologiques LIAISON XL murex Anti-HDV et HDV Ab DIA.PRO pour la détection des anticorps totaux VHD (anti-HD) à partir de spot de sang séché. L'objectif de cette étude était d'évaluer les performances de la trousse LIAISON XL murex anti-HDV (test basé sur la chimiluminescence sur l'automate LIAISON XL) et HDV Ab DIA.PRO (test immunoenzymatique compétitif en microplaque) pour la détection des anticorps du VHD (anti-HD). Les résultats obtenus exprimés en AU/mL (arbitrary unit per milliliter) ou par le ratio Co/S [cut-off divided by signal of the sample (OD450nm)] à partir de sang total déposé sur spots de sang séché ont été comparés à ceux obtenus sur sérum (matrice de référence) afin d'évaluer la sensibilité, spécificité et le seuil d'interprétation à partir des courbes ROC. Au total, 142 paires de plasma/spot de sang séché collectées chez des sujets séropositifs (n=102) ou séronégatifs (n=40) pour le VHD ont été analysées. Les seuils d'interprétation ont été établis à 0,2545 AU/mL avec la trousse LIAISON XL murex Anti-HDV et 0,2340 (Co/S) avec la trousse HDV Ab (Figure 8).

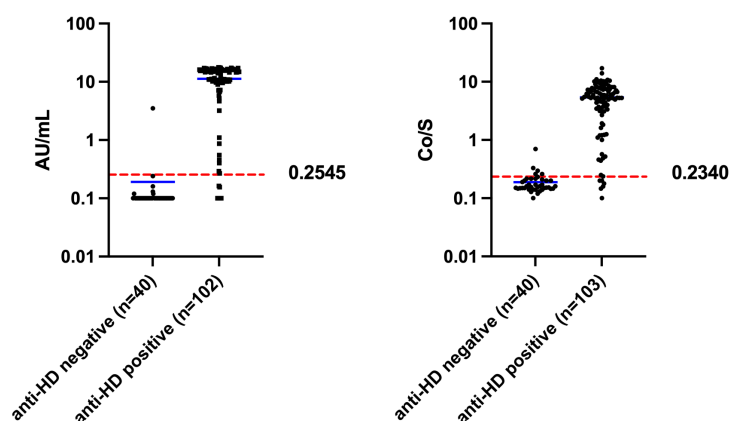


Figure 8 : Diagramme de points des valeurs AU/mL ou Co/S mesurées à l'aide des trousses LIAISON XL murex Anti-HDV sur l'automate LIAISON XL ou HDV Ab. Les lignes horizontales bleues représentent les moyennes des valeurs pour chaque groupe (anti-HD négative et positive). La ligne rouge en pointillés représente le seuil d'interprétation évalué à partir des courbes ROC.

Le seuil de 0,2545 de la trousse LIAISON XL murex anti-HDV était associé à une sensibilité et une spécificité respectivement de 93,1% et 97,5%. Le seuil de 0,2340 de la trousse HDV Ab était associé à une sensibilité comparable (94,2%) tandis que la spécificité était plus faible (87,5%).

Performance de la trousse EurobioPlex HDV qRT-PCR pour la détection et la quantification de l'ARN du VHD à partir de sang total déposé sur DBS. Au total, 80 porteurs chroniques de l'AgHB et séropositifs pour le VHD ont été inclus dans cette étude. Les échantillons de sang total "reconstitué" consistaient à mélanger aseptiquement une fraction plasmatique et un culot globulaire (groupe O, 45% d'hématocrite) selon le protocole décrit par Mourez *et al.* (EBioMedicine 2018;37:382-391). Les échantillons de sang total reconstitué ont été testés à l'aide de la trousse EurobioPlex HDV qRT-PCR EBX-004 et les valeurs de charges virales (ARN VHD) ont été ainsi comparées avec celles obtenues à partir de la matrice de référence (plasma). Parmi les 80 patients, 55 avaient un ARN du VHD détectable et quantifiable. Une corrélation, bien que faible, était observée ($r=0,52$; $p<0,001$). Les valeurs de charges virales mesurées à partir de sang total étaient sous estimées par rapport aux valeurs obtenues à partir de plasma, en moyenne de $1,70 \pm 1,0$ Log UI/mL (**Figure 9**).

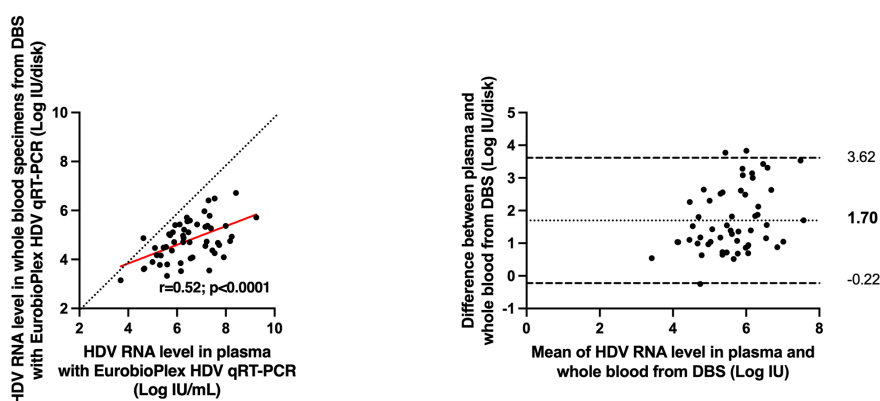


Figure 9 : Régression linéaire et représentation de Bland-Altman des charges virales (ARN VHD) mesurées par la trousse EurobioPlex HDV qRT-PCR EBX-004 sur plasma et sang total reconstitué (n=55).

Performances de la trousse Sentosa SQ HBV Genotyping Assay pour la détermination du génotype et des profils de résistance aux analogues nucléos(t)idiques. Au total, 72 porteurs chroniques de l'AgHBs traités ou non par analogues nucléos(t)idiques [LAM (n=1) ; ETV (n=13) ; ETV+TDF (n=2) ; TDF±FTC (n=12)] ont été inclus. Les échantillons plasmatiques ont été collectés chez des individus d'âge moyen $50 \pm 14,5$ ans et majoritairement de sexe masculin (70,8%), avec une charge virale (ADN VHB) moyenne de $3,9 \pm 1,8$ Log UI/mL. La répartition des génotypes, déterminés par séquençage d'une portion des gènes chevauchant S/P suivi d'une analyse phylogénétique (méthode de référence), était la suivante : 17,9% de génotype A (n=12), 4,5% de génotype B (n=3), 10,4% de génotype C (n=7), 16,4% de génotype D (n=11), 44,8% de génotype de E (n=30), 1,5% de génotype F (n=1) et 4,5% de génotype G (n=3). La détermination du génotype et des profils de résistance a été

systématiquement réalisée par séquençage direct et séquençage à haut débit avec la trousse Sentosa SQ HBV Genotyping Assay (VELA Diagnostics). En ce qui concerne le génotype (A-G), la concordance était très satisfaisante ; seule une souche de génotype G était trouvée de génotype B avec la trousse Sentosa SQ HBV Genotyping Assay. Cinq souches collectées chez des patients avec des charges virales faibles (ADN VHB ≤ 2 Log UI/mL, excepté une à 2,9 Log UI/mL) n'ont pas été amplifiées avec la trousse Sentosa SQ HBV Genotyping Assay. Par séquençage direct, 35,8% (24/67) des patients présentaient une ou plusieurs substitutions amino acidiques (RAS pour *resistance-associated substitution*) sous forme de simple (n=7 patients), double, (n=5 patients), triple (n=7 patients), quadruple (n=4 patients) ou quintuple (n=1 patient) mutants. Les positions les plus fréquemment mutées étaient les positions 204 (M204V ; n=16 patients) et 180 (L180M ; n=15 patients) (**Tableau 2**). Par séquençage à haut débit, 40,6% (26/64) des patients présentaient une ou plusieurs RAS sous forme de simple (n=7 patients), double (n=3 patients), triple (n=7 patients), quadruple (n=6 patients) ou quintuple (n=3 patients) mutants. Les positions les plus fréquemment mutées étaient les positions 204 (M204I/V, n=19 patients) et 180 (L180M, n=17 patients).

Tableau 2 : Profils de résistance du VHB aux analogues nucléos(t)idiques

	“Population sequencing” (in-house method)	Deep-sequencing (Sentosa SQ HBV Genotyping Assay)
Proportion of Pts with RAS, % (n)	35.8%	40.6%
RAS (n)		
Single mutant	7	7
Double mutants	5	3
Triple mutants	7	7
Quadruple mutants	4	6
Quintuple mutants	1	3
Most frequent RAS (position, n)	204 (M204I/V; n=16) 180 (L180M; n=15) 163 (I163V; n=7) 173 (V173L; n=5)	204 (M204I/V; n=19) 180 (L180M; n=17) 163 (I163V; n=8) 202 (S202G; n=8)

Performances de la trousse Bosphore HDV quantification – detection kit V1 pour la détection et la quantification de l'ARN du VHD. Cette évaluation a eu lieu dans le cadre du renouvellement de l'appel d'offres des trousse de quantification de l'ARN du VHD à l'APHP au premier semestre 2022. Nous avons utilisé un panel de 24 échantillons. Afin de s'assurer que le choix d'un thermocycleur n'influe pas la qualité des résultats, ces échantillons ont été quantifiés sur 3 automates de PCR en temps réel : ABI 7500 (Applied Biosystems), CFX96 (Biorad) et QuantStudio7 (Applied Biosystems).

Les principaux points positifs de la trousse étaient : une gamme de quantification prête à l'emploi, des valeurs de quantification identiques avec les trois automates, ce qui permet de s'adapter à l'équipement déjà présent dans le laboratoire utilisateur, et une quantification des échantillons de référence de l'OMS comparable à celles mesurées avec la trousse Eurobioplex. Cependant, de nombreux points négatifs ont été relevés incluant : un contrôle interne composé d'ADN synthétique, ce qui ne permet pas l'évaluation de l'étape de rétrotranscription, un programme d'amplification de près de 2h30, un rendu des résultats en copies/mL et non en UI/mL, et une sensibilité analytique nettement supérieure à celle annoncée par la firme. La trousse Bosphore HDV quantification – detection kit V1 a permis une quantification satisfaisante de seulement 10 échantillons sur un panel de 20 souches ARN+. Des souches de génotypes VHD-1 “Africain”, VHD-2, -7 et -8 n'ont pas été détectées et celles de génotypes VHD-5 et -6 sous-quantifiées de ≥ 1 Log UI/mL (**Tableau 3**). Compte tenu de l'épidémiologie des patients VHD suivis en France, la trousse Bosphore ne permettrait pas une prise en charge optimale des patients.

Tableau 3 : Synthèse des résultats obtenus avec la trousse Bosphore comparés à ceux obtenus avec la trousse Eurobioplex (les échantillons non détectés sont surlignés en rouge ; les échantillons sous-quantifiés en orange et les témoins négatifs sont en gris).

Echantillon	Génotype	Bosphore Abi7500	Bosphore CFX96	Bosphore QS7	Moyenne Bosphore	Eurobioplex QS7 (Valeurs attendues)	Écart de valeur
		log UI/ml	log UI/ml	log UI/ml	log UI/ml	log UI/ml	log UI/ml
P1	HDV-1 Afr	3,63	3,88	3,74	3,75	4,45	-0,7
P2	HDV-1 Afr	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	4,44	-4,44
P3	HDV-1 Afr	3,9	4,16	4,04	4,03	5,15	-1,12
P4	HDV-1 Afr	4,7	4,93	5,03	4,89	4,64	0,25
P5	HDV-1Eur/Asie	3,42	3,53	3,31	3,42	4,16	-0,74
P6	HDV-1Eur/Asie	6,54	6,51	6,27	6,44	6,07	-0,37
P7	HDV-1Eur/Asie	3,75	3,9	3,81	3,82	4,69	-0,87
P8	HDV-1Eur/Asie	5,35	5,4	5,45	5,4	5,44	-0,04
P9	HDV-2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	3,36	-3,36
P10	HDV-5	5,66	5,68	5,44	5,6	6,15	-0,55
P11	HDV-8	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	3,46	-3,46
P12	HDV-5	4,36	4,58	4,61	4,52	5,72	-1,2
P13	HDV-6	2,4	2,66	2,2	2,42	4,68	-2,26
P14	HDV-6	1,72	2,53	1,65	1,97	3,54	-1,57
P15	HDV-7	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	3,78	-3,78
P16	HDV-7	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	3,43	-3,43
P17	HDV-8	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	4,75	-4,75
P18	HDV-5	3,59	3,79	3,67	3,68	4,74	-1,06
P19	nd	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	<2,00	-
P20	nd	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	<2,00	-
P21	HDV-2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	5,56	-5,56
P22	HDV-4	3,86	4,17	4,04	4,02	4,87	-0,85
OMS	HDV-1Eur/Asie	3,59	3,87	3,86	3,77	4,16	-0,39
OMS	HDV-1Eur/Asie	3,65	3,82	3,82	3,76	3,95	-0,19

Performances de la trousse RealStar HDV RT-PCR kit 1.0 pour la détection et la quantification de l'ARN du VHD. Cette trousse est disponible uniquement en version RUO. Devant l'absence d'alternative commerciale en France à la trousse Eurobio, plusieurs laboratoires ont souhaité pouvoir utiliser en routine cette trousse, malgré son absence de marquage CE-IVD. Le laboratoire associé a beaucoup discuté avec la société Altona du potentiel de cette trousse, de ses performances (analyse de documents internes et de présentations de laboratoires utilisateurs), des engagements éventuels en termes de marquage CE-IVDR, et a procédé à une évaluation sur site. Deux types de tests ont été réalisés : (i) PCR à partir d'échantillons d'ARN déjà extraits dans le cadre du travail de routine, sur notre automate *m2000sp* (Abbott), avec le contrôle interne de la trousse EurobioPlex, et conservés à -80°C, (ii) extraction puis PCR à partir d'échantillons de sérum/plasma conservés à -80°C, ayant subi au maximum 1 cycle de congélation/décongélation. Dans ce cas, le CI d'Altona a été rajouté dans le flacon du tampon de lyse du *m2000sp* (240 µL / 24 extractions).

Afin de s'assurer que le choix du thermocycleur n'influe pas sur la qualité des résultats, des tests ont été faits sur 3 automates de RT-qPCR : ABI 7500 (Applied Biosystems), CFX96 (Biorad) et QuantStudio7 (Applied Biosystems). Chaque technique comportait à minima les 4 points de gamme de la trousse, un contrôle négatif et le standard international OMS dilué au 1/1000^{ème}. Nous avons ensuite utilisé un panel de 24 échantillons. Nous avons aussi repris des échantillons issus de la routine du laboratoire, quantifiés initialement avec la trousse Eurobioplex EBX-004, pour une comparaison des résultats. En comparaison avec les résultats obtenus avec la trousse Eurobioplex EBX-004, nous avons observé une différence systématique d'environ 1 Log UI/mL, "Altona" rendant toujours un résultat inférieur à celui "d'Eurobio". Cette différence était attendue, et correspond en réalité à une sur-quantification (en UI/mL) de la trousse Eurobio dans sa version EBX-004. Les résultats de quantification du standard OMS par la trousse Altona étaient proches de la valeur attendue (2,76 log UI/mL). 13 échantillons avec une charge virale faiblement positive (< 3 Log UI/mL avec la trousse Eurobioplex EBX-004) ont été testés avec la trousse Altona, et 12 d'entre eux ont été retrouvés positifs (**Tableau 4**). La même différence de quantification de 1 Log a été observée. Ces résultats préliminaires ont permis de rendre un avis favorable a priori à l'utilisation de la trousse RealStar HDV RT-PCR kit 1.0 en pratique clinique en France. Des tests complémentaires sont cependant en cours pour compléter cette évaluation.

Les principaux points positifs de la trousse Altona sont : une gamme de quantification déjà prête à l'emploi, une expression des résultats en UI/mL, des valeurs de quantification sensiblement identiques avec les trois automates, ce qui permet de s'adapter à l'équipement déjà présent dans le laboratoire utilisateur, ainsi qu'une très bonne reproductibilité. Les principaux points à considérer sont : le fournisseur préconise de réaliser un choc thermique (3 min à 95°C puis refroidissement immédiat sur bloc froid) des ARN entre l'étape d'extraction et la préparation du mix de RT-PCR et l'étape d'amplification, utilisation d'un volume supérieur d'extrait (25µL) par rapport aux autres trousses.

Tableau 4 : Synthèse des résultats obtenus avec la trousse Altona comparés à ceux obtenus avec la trousse EurobioPlex

		CV Altona	CV Eurobio	
n° éch	Génotype	log UI/mL	log UI/mL	Différence
OMS 1/1000	HDV-1Eur/Asie	2,79	4,16	1,37
P1	HDV-1 Afr	pb technique	4,45	pb technique
P2	HDV-1 Afr	pb technique	4,44	pb technique
P3	HDV-1 Afr	pb technique	5,15	pb technique
P4	HDV-1 Afr	4,14	4,64	0,50
P5	HDV-1Eur/Asie	3,01	4,16	1,15
P6	HDV-1Eur/Asie	5,13	6,07	0,94
P7	HDV-1Eur/Asie	3,65	4,69	1,04
P8	HDV-1Eur/Asie	4,27	5,44	1,17
P9	HDV-2	2,51	3,36	0,85
P10	HDV-5	4,76	6,15	1,39
P11	HDV-8	2,32	3,46	1,14
P12	HDV-5	4,56	5,72	1,16
P13	HDV-6	3,82	4,68	0,86
P14	HDV-6	2,68	3,54	0,86
P15	HDV-7	3,03	3,78	0,75
P16	HDV-7	2,59	3,43	0,84
P17	HDV-8	4,01	4,75	0,74
P18	HDV-5	3,72	4,74	1,02
P21	HDV-2	4,28	5,56	1,28
P22	HDV-4	3,91	4,87	0,96
P23	HDV-2	3,24	4,76	1,52
P24	HDV-4	3,15	4,62	1,47

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Des techniques de biologie moléculaire permettant la détermination des profils de résistance du VHC aux AAD des régions ciblées par les antiviraux (NS3, NS5A et NS5B) ont été transférées dans le cadre de projets de recherche financés par l'ANRS-MIE :

- Evaluation of HCV care and Treatment for HIV-HCV coinfecté patients in decentralized areas in Vietnam (MOVIDA-Hep2) – Institut Pasteur Paris et National Institute of Hygiene and Epidemiology, Vietnam
- HCVResiS visant à caractériser la résistance naturelle aux AAD de souches de VHC en Afrique (Mali et Gabon) et en Asie du Sud-Est (Thaïlande)

Le laboratoire associé delta a été sollicité pour aider certains laboratoires à mettre en place une technique de quantification de l'ARN du VHD, que ce soit avec la trousse EurobioPlex ou avec leur propre trousse. Notamment, des échantillons du contrôle national de qualité (CNQ-VHD) et des aliquots du standard OMS ont été fournis aux laboratoires qui en faisaient la demande (voir paragraphe dédié au CNQ-VHD). Dans le cas de Lille, des échantillons de routine (biothèques) ont également été envoyés. Le laboratoire associé delta a également initié ou a été partenaire de plusieurs collaborations de recherche avec des équipes internationales. Cette collaboration pouvait concerner le diagnostic sérologique du VHD (test ELISA ou TROD), ou moléculaire (PCR qualitative, quantification de l'ARN-VHD, géotypage partiel de la région R0).

2.4 Collections de matériel biologique

Les collections de matériel biologique concernent essentiellement des échantillons de sang total collecté sur papier filtre (spot de sang séché) des centres médico-sociaux (CSAPA, CAARUD), unités de consultation et de soins ambulatoires (UCSA) de centres pénitentiaires, ainsi que des échantillons sériques ou plasmatiques dans le cadre de demandes de laboratoires ou services cliniques répartis sur le territoire national. Au total, 156 buvards et 267 échantillons de sang (plasma ou sérum) ont été collectés au cours de l'année 2022 et sont ainsi conservés à -20°C ou -80°C.

Une sérothèque spécifique consacrée aux donneurs d'organes, tissus et cellules dans le cadre de la qualification virologique des dons est constituée depuis 2000. Cette biothèque contient aujourd'hui plus de 45 000 échantillons, dont 1812 collectés en 2022.

Dans le cadre de l'hémovigilance et de la surveillance des donneurs de sang positifs pour les marqueurs VHB ou VHC, 325 échantillons ont été reçus au laboratoire en 2022 : 134 échantillons plasmatiques dans le cadre de l'hémovigilance et 191 échantillons plasmatiques dans le cadre de la surveillance des donneurs de sang (131 dons positifs pour le VHB et 60 pour le VHC).

La collection de souches VHD du laboratoire associé delta a débuté à la fin des années 1990. Elle a pour objectif de recenser, le plus exhaustivement possible, l'ensemble de la diversité génétique du VHD circulant chez l'homme. Les souches contenues dans cette collection sont de 2 origines :

- . Souches issues de la routine du laboratoire d'Avicenne et de ses partenaires (un aliquot de sérum ou de plasma de tout nouveau patient ayant été dépisté VHD+ répliquant est conservé dans cette collection).
- . Souches issues de projets ou de protocoles de recherche avec constitution de biothèque. Ces souches ont été obtenues grâce à des collaborations nationales et internationales, *via* de multiples projets de recherche depuis 20 ans. Chaque souche virale fait l'objet d'un séquençage systématique. Le pays de naissance du patient et quelques données démographiques sont également recueillis.

La biocollection VHD comprend 4361 souches uniques ; 217 souches et séquences ont été ajoutées à la collection en 2022.

2.5 Activités d'expertise

Au total, le nombre d'échantillons biologiques envoyés au CNR coordonnateur au cours de l'année 2022 était de 420, correspondant à 818 analyses réalisées, soit une augmentation de 5,1% par rapport à l'année 2021 (**Tableau 5**). Ces échantillons provenaient essentiellement de centres hospitaliers publics ou de laboratoires privés (Cerba, Pontoise), ainsi que de structures médico-sociales spécialisées (CSAPA, CAARUD, UCSA). Treize structures prenant en charge des sujets ayant une problématique addictive ont conventionné avec le CNR coordonnateur. Au total, le nombre d'échantillons biologiques envoyés au CNR associé delta au cours de l'année 2022 était de 158, correspondant à 281 analyses réalisées.

Tableau 5 : Échantillons biologiques adressés au CNR coordonnateur et associé en 2022.

Type d'échantillons	Analyses virologiques	N	Structures demandeuses
Spot de sang séché (DBS)	Détection AgHBs	111	CSAPA/CAARUD/UCSA
	Recherche ADN VHB	70	
	Recherche anticorps HBs	5	
	Recherche anticorps HBc	1	
	Sérologie VHC	96	
	Recherche ARN VHC	152	
	Génotypage VHC	14	
	Sérologie VIH	105	
Sérum/plasma	Génotypage VHB	24	CHU/CHG (n=21)
			Laboratoires privés (n=3)
	Détermination profil de résistance VHB aux AN	56	CHU/CHG (n=47)
			Laboratoires privés (n=9)
	Génotypage VHC	97	CHU/CHG (n=97)
	Détermination profil de résistance VHC aux AAD	87	CHU/CHG (n=87)
	TOTAL	818	
Sérum/plasma	Recherche d'ARN VHD	20	CHU/CHG (n=10) Laboratoires privés (n=10)
		135	CMG Rennes (ANRS)
	Recherche anticorps delta	3	CHU/CHG (n=3)
	Quantification de l'AgHBs	123	CMG Rennes (ANRS)
	TOTAL	281	

De plus, le CNR coordonnateur a établi des conventions avec des structures médico-sociales pour l'utilisation et la validation d'examens de biologie délocalisée (EBMD, test PCR VHC à l'aide du système GeneXpert, Cepheid) dans le cadre de projets de micro-élimination de l'hépatite C. Au total, 40 résultats ont été validés dans un délai <24 heures pour les structures suivantes : CSAPA Bus Méthadone et CAARDUS 31/32 (n=20, Marseille), CAARUD Lou Passagin (n=13, Nice) et Halte Soins Addictions – Gaïa (n=7, Paris).

Le CNR-associé VHD a organisé en septembre 2022 son 9^{ème} Contrôle National de Qualité portant sur le diagnostic moléculaire de l'infection VHD (CNQ-2022), qui visait à évaluer la performance des laboratoires français pour la quantification de l'ARN du VHD. Ce contrôle de qualité a consisté en la quantification de l'ARN-VHD à partir 4 échantillons cliniques (matrice plasma).

11 laboratoires ont participé à ce contrôle de qualité :

- . Hôpital Avicenne - Service de Microbiologie Clinique (Bobigny)
- . Hôpital Pellegrin - Service de Virologie (Bordeaux)
- . Laboratoire Cerba - Pôle infectiologie (Cergy Pontoise)
- . Hôpital de Lille - Laboratoire de Virologie (Lille)
- . Laboratoire Biomnis - Service biologie moléculaire infectieuse (Lyon)
- . Hôpital de la Croix Rousse - Centre de Biologie Nord (Lyon)
- . Hôpital de l'Hôtel Dieu - Service de Virologie (Nantes)
- . Hôpital Paul Brousse - Service de Virologie (Paris)
- . Hôpital Pitié Salpêtrière - Service de Virologie (Paris)
- . Hôpital de Purpan - Laboratoire de Virologie (Toulouse)

Le laboratoire de Tours (*) a rendu des résultats hors-délai, et ses résultats individuels ont été analysés a posteriori de l'analyse globale des autres laboratoires.

Les 4 échantillons du CNQ-2022 ont été testés au préalable en triplicata par le CNR associé avec la technique de RT-PCR en temps réel utilisée en routine au sein du laboratoire. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 6**. Ces souches ont également fait l'objet d'un séquençage complet.

Tableau 6 : Résultats des échantillons du CNQ obtenus par le CNR associé delta

Échantillon	Génotype	ARN VHD (UI/mL)	ARN VHD (Log UI/mL)	Coefficient de variation (%)
CNQ2022-ARNVHD1	5	11 211	4,02	4,56
CNQ2022-ARNVHD2	-	<100	<2,00	-
CNQ2022-ARNVHD3	1	3 031	3,45	5,37
CNQ2022-ARNVHD4	2	7 069	3,84	2,45

Parmi les points importants de ce CNQ-2022, nous avons demandé aux laboratoires de préciser leur technique d'extraction (automate, volumes de la prise d'essai et d'élution), ainsi que leur technique d'amplification (test et thermocycleur). Les réponses des différents laboratoires sont présentées dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Automates utilisés pour l'extraction, volume de prise d'essai et volume d'élution

Méthodes	Janus Chemagic (PerkinElmer)	m2000sp (Abbott)	Magnapure Compact (Roche)	EasyMag/EMAG (Biomérieux)	QiAsymphony (Qiagen)
Nombre de centres	1	1	4	2	2
Volume de prise d'essai (µL)	500	500	200/400/500	500	200/1000
Volume d'élution (µL)	100	110	50/100	100/110	60
Contrôle interne	Oui	Oui	3	Oui	1/2

Parmi les dix centres participants, 2 ont utilisé une technique "maison", 7 la trousse Eurobioplex EBX-004 HDV kit (Eurobio) et 1 centre a utilisé les deux méthodes. Six laboratoires rendent leurs résultats en UI/mL, trois rendent leurs résultats en copies/mL et le dernier a rendu ses résultats avec les deux unités (avant et après conversion). Les résultats globaux sont présentés dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 : Moyenne des résultats obtenus par l'ensemble des centres pour le CNQ 2022

Échantillon	Génotype	Moyennes (Log UI/mL)	Interprétation	Valeurs attendues (Log UI/mL)
CNQ2022-ARNVHD1	5	3,92	Positif	4,02
CNQ2022-ARNVHD2	-	<2,00	Indétectable	<2,00
CNQ2022-ARNVHD3	1	3,29	Positif	3,45
CNQ2022-ARNVHD4	2	3,99	Positif	3,84

Tous les centres ont été capables de quantifier l'ensemble des échantillons virémiques pour le VHD. Aucune variation en rapport avec le génotype de la souche utilisée n'a été observée. Aucun centre n'a obtenu un biais ≥ 3 . Trois centres ont obtenu un biais compris entre 2 et 3 (**Figure 10**). Ces résultats sont très encourageants et traduisent l'effort constant des laboratoires vers un diagnostic de qualité et une harmonisation progressive des résultats de charge virales VHD entre les différents laboratoires français.

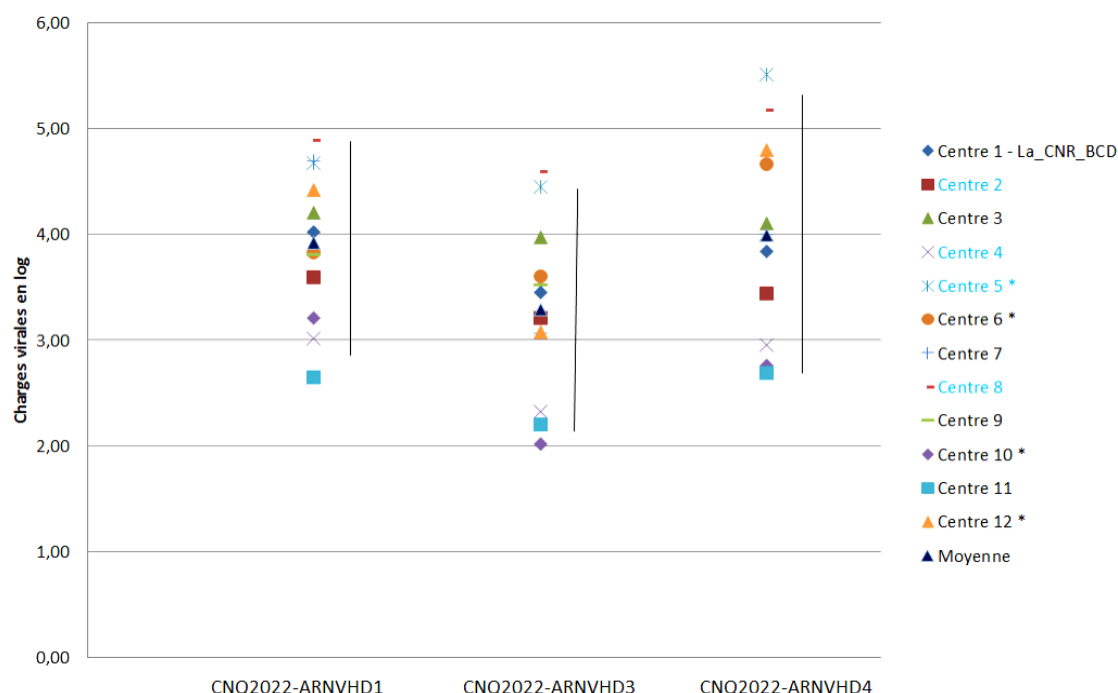


Figure 10 : Résultats de la mesure de la charge virale (ARN VHD) de chaque échantillon par chaque laboratoire participant. La barre verticale illustre l'intervalle de deux écarts types. Les centres qui ont utilisé une technique "maison" sont désignés par un astérisque. Les centres qui ont rendu leurs résultats en copies/mL sont notés en bleu.

Le CNR-associé est à la disposition de l'ensemble des laboratoires du territoire, pour réaliser des analyses spécialisées du diagnostic VHD : contrôle de la sérologie VHD (anticorps totaux) par 2 troussees différentes, recherche d'IgM anti-VHD, contrôle de la charge virale VHD, séquençage partiel ou complet pour identifier un problème d'amplification. **En 2022**, plusieurs laboratoires ont fait appel à notre expertise. Il s'agissait surtout de vérifier une ou plusieurs mesures discordantes de charge virale VHD. Quelques laboratoires nous ont contacté au sujet de patients chez qui on trouvait une sérologie VHD+ alors qu'ils n'étaient pas infectés par le VHB. Cette expertise concerne une vingtaine de dossiers par an.

L'observatoire Buledelta (ANRS HD EP01) a été initié en 2020 (avis favorable du CPP le 25/11/2019). Le promoteur est l'ANRS-MIE. Cet observatoire a pour objectif principal d'évaluer en "vraie vie" l'efficacité et la tolérance du bulevirtide chez des patients ayant une infection chronique par les virus des hépatites B et D. Il s'agit d'une recherche prospective multicentrique, non comparative, comprenant un recueil de données rétrospectif. L'évaluation de l'efficacité est basée sur la réponse thérapeutique, définie par une diminution de l'ARN du VHD >2 Log UI/mL 48 semaines après l'initiation du traitement ; la question de la quantification virale est donc un point central du projet. Le CNR associé VHD est un des 2 laboratoires de virologie choisis dans le cadre de cet observatoire pour réaliser des analyses de façon centralisée : AgHBs quantitatif, charge virale VHD, génotypage VHD. Au 31 décembre 2022, 157 patients ont été inclus dans l'observatoire. Nous avons réalisé en temps réel des analyses virologiques pour 63 patients (patients suivis dans notre groupe hospitalier et patients pour lesquels une partie des analyses virologiques nous est sous-traitée). De plus, nous avons initié une collaboration étroite avec le Conseil Scientifique et le Centre de Méthodologie et de Gestion de Rennes (Claire Fougerou). En effet, de nombreuses données virologiques sont manquantes dans les CRF remplis par les investigateurs, ce qui limite la puissance des analyses statistiques. Après identification par le CMG de toutes les données virologiques manquantes, des aliquots de biothèque correspondant ont été adressés à notre laboratoire. Nous avons ainsi réalisé 123 mesures du titre de l'AgHBs et 135 charges virales VHD. A terme, l'observatoire Buledelta devrait être élargi pour inclure tous les patients suivis en France pour une infection VHD, quel que soit leur statut réplcatif et le traitement mis en œuvre.

Le traitement de l'infection chronique par le VHD a été révolutionné par l'arrivée de nouveaux traitements, le bulevirtide en premier lieu (AMM en 2020), mais également le REP-2139 et le lonafarnib, qui sont disponibles dans le cadre d'essais cliniques ou d'un accès compassionnel. Afin de mieux comprendre les cinétiques de réponse des patients à ces nouveaux traitements, des mesures très rapprochées de la charge virale VHD sont réalisées chez ces patients. Parmi les 18 patients français ayant obtenu un accès compassionnel pour l'obtention du REP-2139,

11 font leurs charges virales sur Avicenne ; cela permet d'avoir des résultats de charge virale harmonisés et de faciliter leur interprétation. De nombreuses présentations en congrès rapportent cette expertise.

Dans le cadre des enquêtes d'hémovigilance relative à l'hépatite B, le CNR coordonnateur a reçu 107 échantillons plasmatiques sur lesquels une recherche du génome viral et/ou des analyses sérologiques complémentaires ont été réalisées. Pour les enquêtes relatives au VHC, le nombre d'échantillons était de 27.

Dans le cadre de la surveillance virologique des donneurs de sang, le CNR coordonnateur a reçu 186 échantillons plasmatiques incluant 132 dons VHB positif (ou suspectés positif) et 54 dons VHC positif (ou suspectés positif).

En raison du changement de la technique de dépistage sérologique lors de l'étape de qualification des dons au niveau de l'EFS (trousses Roche à la place des trousses Abbott), de nombreux échantillons ont été envoyés au CNR coordonnateur pour expertise. Afin d'écarter toute interférence entre la présence de marqueurs d'infection ou de vaccination de la COVID-19 et la réactivité de certains marqueurs du VHB (anticorps HBc) ou du VHC (anticorps totaux VHC), le dosage des anticorps dirigés contre la protéine spike du SARS-CoV-2 et des anticorps dirigés contre la nucléoprotéine ont été réalisés conjointement. La majorité des dons ayant un signal faiblement réactif avec la trousse Roche étaient négatifs avec la trousse Anti-HBc sur le VTROS Eci 3600. D'autre part, la plupart des donneurs quel que soit leur profil HBc étaient immunisés contre le SARS-CoV2.

2.6 Activités de séquençage

Le CNR coordonnateur a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?	
☐ NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
☒ OUI	Associée au CNR en accès privilégié : plateforme GENOBIMICS Technologies Illumina (séquenceur NovaSeq, NextSeq 500/550, MiSeq), Oxford Nanopore Technologies (GridION), Ion Torrent PGM (Sentosa SQ 301)

Le CNR coordonnateur a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?	
☐ NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
☒ OUI	Associée au CNR Outils utilisés pour l'analyse des séquences type Sanger : phylip 3.695, Clustal Outils utilisés pour l'analyse des séquences type NGS : metaMIC et autres outils variés de reconstruction génomique et outils de phylogénie adaptés

Le CNR coordonnateur a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?	
☐ NON	Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?
☒ OUI	Oui pour des investigations d'épidémies (hépatites d'origine indéterminée (25 cas testés en France) mais aussi pour des hépatites d'origine indéterminée explorées individuellement en dehors de cluster (271 cas testés en 2022)

Si le séquençage est utilisé par le CNR coordonnateur, 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)

Les analyses utilisées sont de divers niveau :

- Documentation microbiologique : utilisation de MetaMIC, outil de métégnomique Shotgun développé dans notre laboratoire
- Reconstruction génomique de novo ou contre référence : utilisation de metaSpades principalement
- Outils de phylogénie : Muscle et Mega

A noter que les techniques sont détaillées notamment dans un article récent (Rodriguez et al ; EID 2023) sur découverte d'un nouveau virus d'hépatite (pour plus de renseignements : [Unknown Circovirus in Immunosuppressed Patient with Hepatitis, France, 2022 - Volume 29, Number 5—May 2023 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC](#))

Les outils de cgMLST, wgMLST... précisés en intitulé sont des outils pour les bactéries et ne sont pas utilisés pour les virus.

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

25 dans le cadre des hépatites pédiatriques d'origine indéterminée en 2022

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

Nombre de souches séquencées par métagénomique Shotgun en 2022 : 271

Nombre de souches séquencées par "population sequencing" (Sanger) : 222

Séquençage systématique de tous les échantillons

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

Dans les bases de données fermées : **Toutes les données produites sur la plateforme font l'objet d'un archivage redondé utilisables à des fins d'autres investigations et sont conservés sans limitation de durée à ce stade**

Dans des bases de données publiques (European Nucleotide Archive (ENA) par exemple) avec ou sans métadonnées associées : **Toutes les données publiées font l'objet d'une mise à disposition des données sur NCBI**

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

☐ NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
☒ OUI	Associée au CNR : plateforme de biologie moléculaire du LBM des Hôpitaux Universitaires Paris Seine Saint Denis Sanger (ABI 3130, ABI 3500 Dx, SeqStudio) et NGS (Immulina MiSeq et NextSeq, ThermoFisher S5, Nanopore)

Le CNR associé a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?	
☐ NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
☒ OUI	Interne et externe au CNR
	Utilisation de l'ensemble des outils informatiques de lecture et d'interprétation de séquençage (ex : SeqScape) des outils informatiques d'analyses phylogéniques (Clustal, NJ, Seaview, Beast, IQTree ...) ainsi que les outils d'analyses statistiques (R, ...) Collaborations avec les experts des services intra-GH ; collaboration avec les experts du CNR-coordonnateur (C Rodriguez) ; accès aux plateformes bio-informatiques de l'AP-HP (Moabi) ; collaborations internationales (S Hué)

Le CNR associé a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?	
☐ NON	Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?
☒ OUI	Activité de surveillance de l'épidémiologie des souches de VHD circulant en France et dans le monde

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) Analyses phylogéniques réalisées en routine pour la surveillance épidémiologique des souches Analyses de datation moléculaire et de phylogéographie pour étudier l'origine du VHD

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

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :
Précisez ici le nombre de souches séquencées dans l'année : 217
Séquençage systématique des échantillons de tous les nouveaux patients

Séquençage utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences :génomés assemblés ou séquences brutes (fastQ files) ?
Dans les bases de données fermées : base de données interne du laboratoire
Dans des bases de données publiques (European Nucleotide Archive (ENA) par exemple) avec ou sans métadonnées associées : NCBI et EMBL

2.7 Partage de séquences produites par les CNR

Pour la métagénomique : Le laboratoire reçoit des demandes d'investigation de toute la France métropolitaine et territoires ultra-marins mais également un peu de l'Europe frontalière avec la France (activité pour le moment faible mais en augmentation).

3. Activités de surveillance

L'activité de surveillance au cours de l'exercice 2022 s'est focalisée sur la surveillance des virus d'hépatites au sein de la population fréquentant les structures médico-sociales (type CSAPA/CAARUD), sur l'évaluation de l'incidence de la surinfection delta chez des porteurs chroniques de l'AgHBs (cohorte Inci-D), sur l'évaluation de la prévalence du VHD chez les patients nouvellement dépistés pour l'AgHBs dans les centres tertiaires, sur la surveillance de la résistance du VHC aux AAD et du VHB aux AN, et sur l'étude de la diversité génétique des souches delta circulantes. L'activité de surveillance s'est également concentrée sur la surveillance virologique des donneurs de sang.

3.1 Description du réseau de partenaires

Dans le cadre de la surveillance de la circulation des virus d'hépatites B et C, le réseau de partenaires est essentiellement basé sur les structures médico-sociales (type CSAPA/CAARUD). Ces structures, au nombre de 12, sont réparties plutôt au nord de la Loire (**Figure 11**).

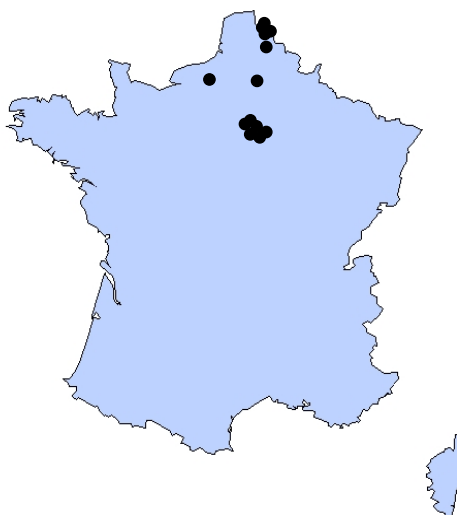


Figure 11 : Répartition géographique des structures médico-sociales (n=12).

Dans le cadre de la surveillance de la résistance du VHC ou du VHB aux antiviraux directs, un réseau de 30 laboratoires répartis sur le territoire national nous adresse des demandes de recherche de résistance, auquel il faut ajouter 2 laboratoires dans les départements et régions d'outre-mer (Guyane et Guadeloupe) (**Figure 12**).

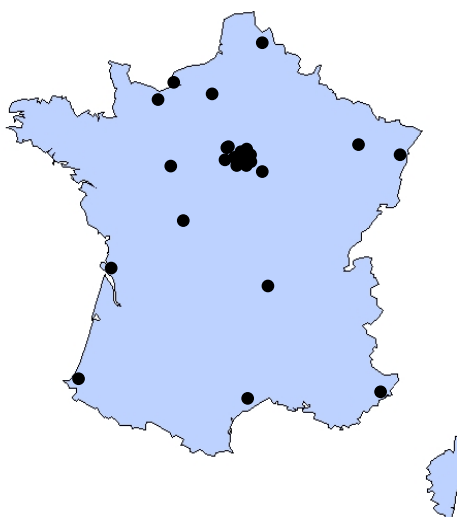


Figure 12 : Répartition géographique des laboratoires participant à la surveillance de la résistance des virus d'hépatites B et C aux antiviraux directs (n=30).

Dans le cadre de la surveillance de la circulation des souches delta, un réseau de laboratoires publics de l'APHP mais également hors APHP et aussi des laboratoires privés nous adressent des échantillons. Le détail des laboratoires est précisé ci-dessous :

Hôpitaux APHP : Ambroise Paré, Beaujon, Bichat, Cochin, HEGP, Henri Mondor, Hôtel Dieu, Lariboisière, Louis Mourier, Necker, Raymond Poincaré, Robert Debré, Saint-Antoine, Saint-Louis, Tenon, Trousseau et Pitié pour un envoi systématique de toutes leurs nouvelles souches VHD+

Hôpitaux hors APHP : Amiens, Angers, Argenteuil, Besançon, CHI Créteil, Clermont-Ferrand, Colmar, Dax, Diaconesses, Dijon, Levallois, Lille, Limoges, Montpellier, Nancy, Nîmes, Nice, Orléans, Poissy-St-Germain, Poitiers, Reims, Rennes, Rouen, Strasbourg, Suresnes, Tours

Laboratoires privés de biologie médicale : nous avons un partenariat avec le laboratoire Cerba, pour un envoi de toutes leurs nouvelles souches VHD+. Nous avons régulièrement des demandes d'expertise de la part du laboratoire Eurofins-Biomnis. Quelques patients sont également prélevés dans des laboratoires privés, avec mention sur l'ordonnance d'envoyer le prélèvement à notre laboratoire.

Un réseau de 11 laboratoires répartis sur l'ensemble du territoire participe au contrôle national de qualité portant sur le diagnostic moléculaire du VHD (CNQ-2022) (**Figure 13**).



Figure 13 : Répartition géographique des laboratoires participant au CNQ-2022 (n=11).

En ce qui concerne la surveillance des donneurs de sang, une collaboration étroite est menée avec l'EFS, le CTSA, SpF et l'ANSM.

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

Dépistage des hépatites virales (et du VIH) dans les structures médico-sociales. A partir de buvards (spots de sang séché) mis à la disposition des structures médico-sociales, le dépistage et le diagnostic des virus d'hépatites B, C et delta, ainsi que du VIH est ainsi réalisé. La détection de marqueurs sérologiques (anticorps totaux VHC, VIH1&2, anticorps totaux HBc et HBs, AgHBs et p24) et moléculaires (ARN VHC, ADN VHB, ARN VHD et détermination des génotypes par analyse phylogénique) est disponible.

En 2022, 156 sujets, majoritairement masculins (83,1%), âgés en moyenne de $44,6 \pm 10,4$ ans ont été dépistés. Quarante-cinq sujets ont rapporté un ou plusieurs facteurs de risque (consommation de substances psychoactives, injections, ...). La sévérité de la maladie hépatique était renseignée dans uniquement 41 cas ; tous sauf 2 cas avaient une fibrose peu ou pas sévère. Parmi les 111 sujets dépistés pour l'AgHBs, un seul était positif pour ce marqueur (également positif pour les anticorps HBc). L'ADN du VHB était également détectable chez un seul sujet sur les 70 sujets pour lesquels une recherche d'ADN avait été demandée. Parmi les 105 sujets dépistés pour le VIH, un sujet était séropositif (séropositivité connue par le CSAPA). Parmi les 96 sujets dépistés pour le VHC (recherche d'anticorps totaux), 36 étaient séropositifs. Parmi les sujets séropositifs, 12 avaient un ARN détectable (33,3%). Deux individus supplémentaires avaient un ARN détectable. Le niveau de charge virale était de $4,2 \pm 0,6$ Log UI/mL. Les génotypes les plus fréquemment isolés étaient les génotypes 3 (n=6) et 1 (n=5).

Incidence de la surinfection delta. La surinfection par le virus de l'hépatite delta (VHD) est un facteur majeur de la morbi-mortalité chez les porteurs chroniques de l'AgHBs, notamment en aggravant la progression de la maladie hépatique. Le taux d'incidence de la surinfection delta a été évalué dans 2 cohortes longitudinales rétrospectives : l'une gambienne (dérivée du projet PROLIFICA, cohorte A) et l'autre française (Mondor-Grenoble, cohorte B). La cohorte A dérivée du projet PROLIFICA inclut des donneurs de sang et des sujets issus de campagnes de dépistage de l'hépatite B par TDR. La cohorte B inclut des sujets venant consulter dans un service hospitalier expert pour la prise en charge des maladies du foie. Au total, 942 échantillons biologiques (915 plasmas et 27 buvards) étaient disponibles. Les sujets étaient âgés de 35 ans et majoritairement de sexe masculin (63%). L'activité des transaminases (ALAT) était de 24 U/L (médiane) et la charge virale B était de 74 UI/mL. Au moment de la prise en charge, 1,5% (14/942) étaient positifs pour les anticorps VHD (anti-HD). Parmi les porteurs chroniques de l'AgHBs, 566 ont bénéficié d'un suivi longitudinal de 6 années en moyenne. Au total, 8 individus ont séroconverti pour les anticorps delta, soit un taux d'incidence de la surinfection delta estimé à 2,37/1000 sujets-années. La prévalence de l'hépatite delta a donc augmenté de 40% par rapport au début de la période d'étude, justifiant de répéter la recherche des anticorps delta au cours du temps chez les porteurs chroniques de l'AgHBs.

Prévalence de l'hépatite delta chez les patients nouvellement dépistés pour l'AgHBs dans les centres hospitaliers universitaires. Les sociétés savantes internationales (EASL, APASL) préconisent le dépistage des anticorps du VHD (anti-HD) chez tous les porteurs de l'AgHBs. Cette étude rétrospective avait pour objectif d'évaluer la prévalence de l'hépatite delta chez les sujets nouvellement dépistés pour l'AgHBs à travers 7 centres hospitaliers universitaires français sur une période de 5 ans (2018-2022). Parmi les 459 644 sujets âgés de plus de 18 ans dépistés pour l'AgHBs, 6,772 ont été testés positifs pour la première fois pour l'AgHBs dans un des 7 centres hospitaliers sur la période 2018 à 2022. La moyenne d'âge était de 38,7 ans. La détection des anticorps delta a été réalisée chez 5 749 patients (84,9%). Au total, 364 patients étaient positifs pour les anticorps delta, tandis que 5 385 étaient négatifs. La séroprévalence delta était de 6,3% (IC95% : 5,7-7,0). La détection de l'ARN VHD a été évaluée par PCR en temps réel à l'aide de la trousse EurobioPlex HDV qRT-PCR chez 285 des 364 sujets anti-HD positifs (78,3%) et 167 patients (58,6%) avaient une infection active. Les génotypes VHD les plus prévalents étaient le génotype HDV-1 (77%), suivi des génotypes HDV-5 (19%) et HDV-7 (2%). Le taux de dépistage de l'hépatite delta dans les centres hospitaliers variait de 65,2% à 97,5% selon la stratégie mise en place. Les taux de dépistage les plus élevés étaient observés dans les centres qui pratiquaient la détection reflexe des anticorps delta, tandis que les taux les plus faibles étaient observés dans les centres qui ne pratiquaient pas la détection reflexe.

Surveillance de la diversité génétique des souches circulantes de VHD. En 2022, le CNR associé a poursuivi son activité de surveillance de la diversité des souches du VHD qui circulent en France, en réalisant le génotypage partiel des souches VHD de tous les patients nouvellement diagnostiqués ARN-VHD+. Il s'agit des patients dont la charge virale a été réalisée dans le laboratoire (n=104 en 2022), ou dans un laboratoire de virologie partenaire qui nous envoie un aliquot de toutes les nouvelles souches qu'il identifie (en 2022, Pitié n=10, Cerba, n=103). Comme le montre la **Figure 14**, les nouveaux patients diagnostiqués ARN VHD+ en 2022 étaient pour la majorité nés en Afrique (n=132, 61%) avec 84 patients nés dans un pays d'Afrique Centrale, 37 dans un pays d'Afrique de l'Ouest,

et 11 dans un pays d'Afrique du Nord. Cette répartition géographique est stable sur les 8 dernières années (2015-2022).

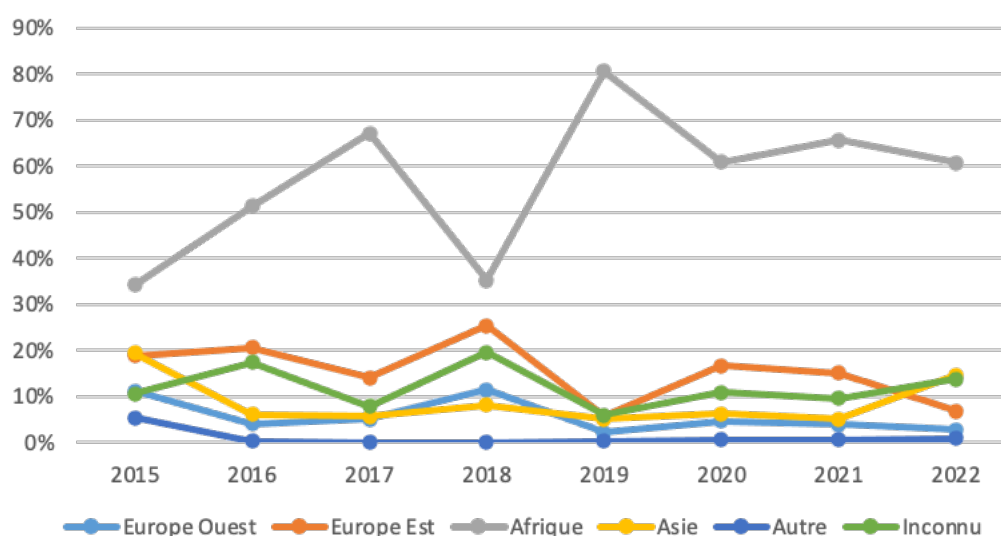


Figure 14 : Pays de naissance des patients nouvellement positifs pour l'ARN du VHD.

La répartition des génotypes est également depuis 2015. Le génotype VHD-1, ubiquitaire, reste largement majoritaire (78%). En 2022, seuls les génotypes VHD-1 et VHD-5 à -8 ont été mis en évidence, à des taux similaires aux années précédentes (**Figures 15 et 16**).

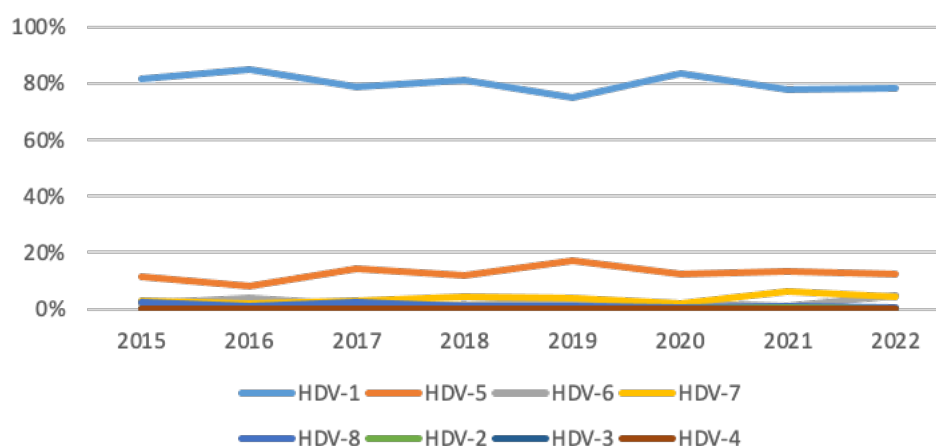


Figure 15 : Répartition des génotypes du VHD au cours du temps.

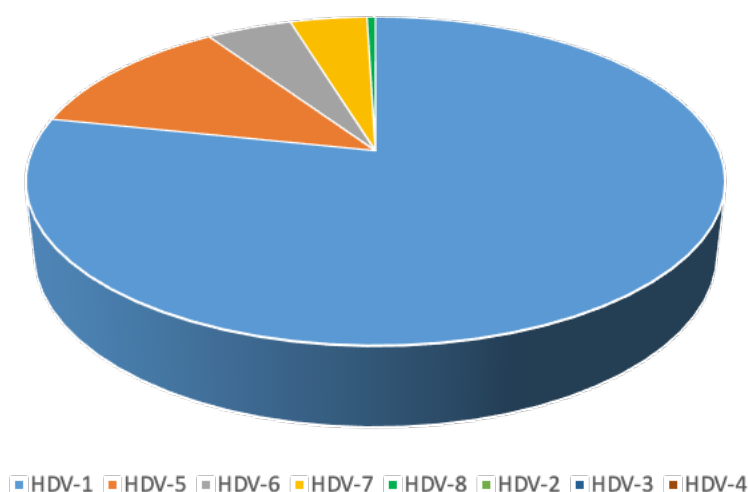


Figure 16 : Proportion des différents génotypes du VHD pour l'année 2022.

Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections VHB chez les donneurs de sang. La surveillance du taux de dons positifs pour 10 000 dons parmi les dons de sang depuis 1993 est présentée sur la Figure 17 et les caractéristiques des dons positifs sont présentées sur les figures suivantes (Figures 18, 19 et 20).

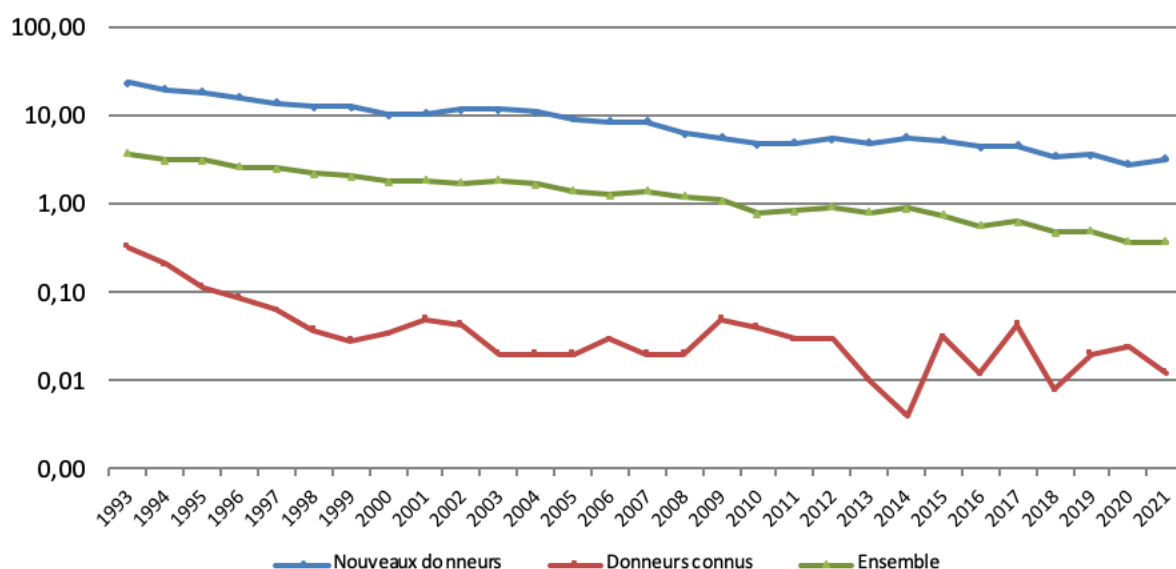


Figure 17 : Évolution du taux de dons VHB positifs observés pour 10 000 dons parmi les dons de sang collectés de 1993 à 2021 (échelle logarithmique).

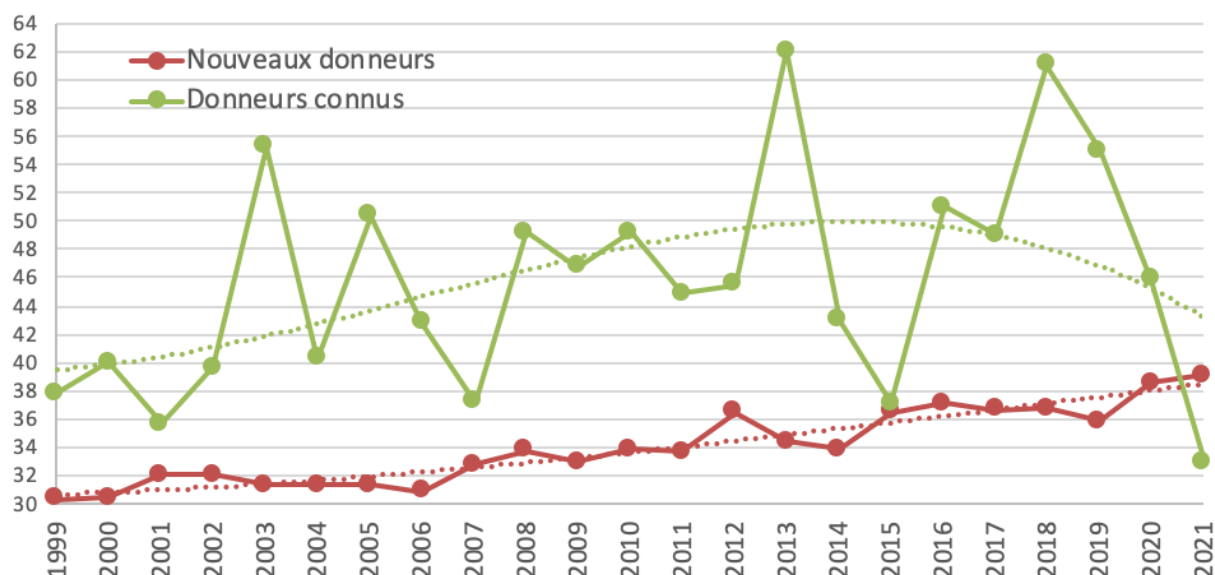


Figure 18 : Évolution de l'âge moyen des donneurs VHB positifs entre 1999 et 2021 selon leur statut.

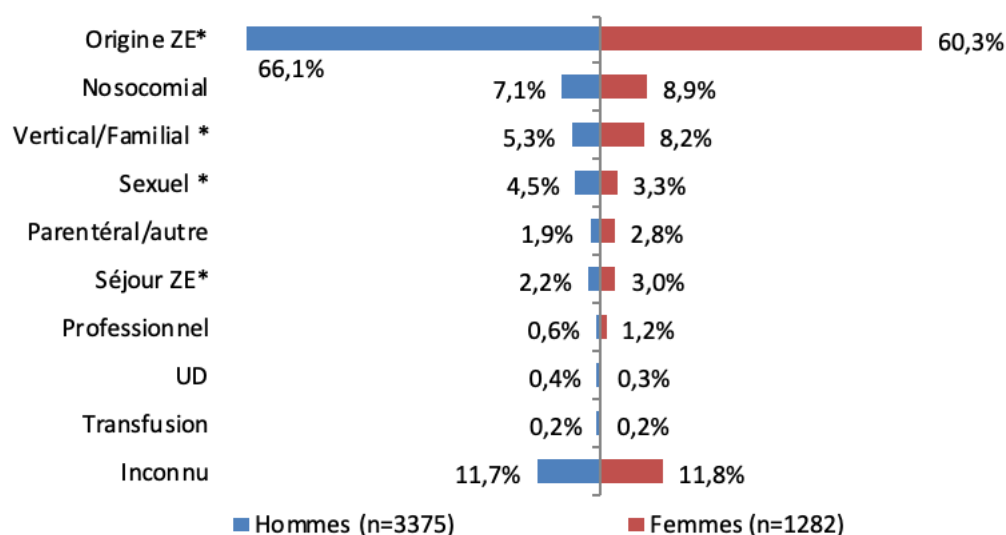


Figure 19 : Facteurs de risque hiérarchisés chez les nouveaux donneurs VHB positifs en France métropolitaine en fonction du sexe et des facteurs de risque entre 1998 et 2021 (n=4657). Autres : tatouage, piercing, acupuncture. *:différence significative entre les hommes et les femmes.

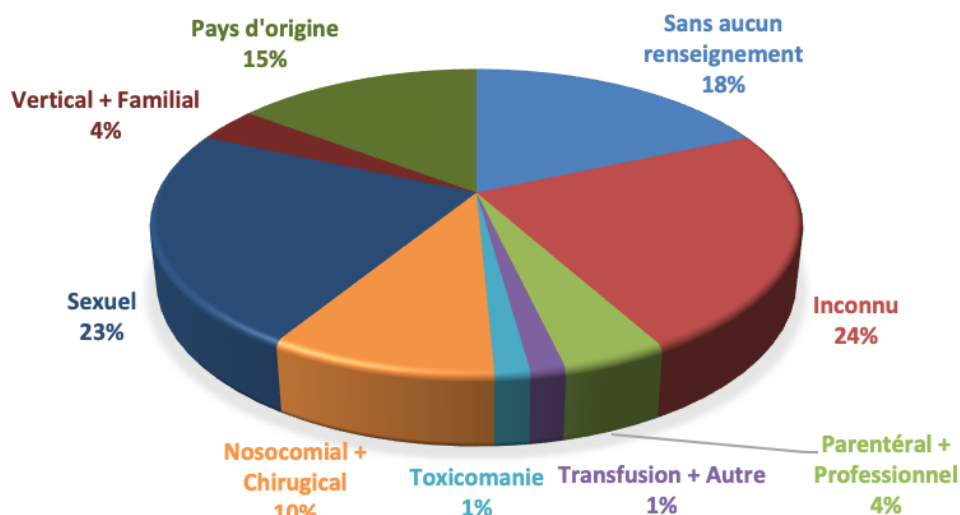


Figure 20 : Évolution de la répartition des facteurs de risque hiérarchisés chez les donneurs de sang réguliers (connus) VHB positifs (n=136) en France métropolitaine entre 1998 et 2021.

89% des dons VHB positifs étaient anti-HBe positifs et AgHBe négatifs, cette proportion étant stable dans le temps (5384/6052 dons). 4,1% des donneurs AgHBs-positif testés pour ce marqueur ont des anti-HBs à taux faible sans liaison avec le génotype, ni avec l'existence de mutations du gène S (12,7% des AgHBs +/AcHBs + présentent des mutations dans le gène S contre 6,3% des dons AgHBs+/ AcHBs-, différence non significative) (données jusqu'en 2020). La moyenne du taux d'anti-HBs chez ces donneurs est de 41 mUI/mL avec une médiane de 18 mUI/mL (10-1490) (**Tableau 9**).

Tableau 9 : Fréquence des anti-HBs chez les donneurs AgHBs positifs en fonction du génotype (2008-2021)

Ac HBs	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	Total
N testés	313	301	204	238	252	196	229	188	147	179	128	132	98	93	2698
N Ag/Ac HBs Pos	8	5	7	7	14	4	10	5	11	8	13	11	6	1	110
% Ag/Ac HBs Pos	2,6%	1,7%	3,4%	2,9%	5,6%	2,0%	4,4%	2,7%	7,5%	4,5%	10,2 %	8,3%	6,1%	1,1%	4,1%
Titre (mUI/mL)	10-145	17-46	10->100	17-25	12-1490	11-15	11-79	13-19	10-49	13-96	11-60	10-91	14-29	76-269	10-1490
Ac HBe	7	5	6	6	12	4	10	5	10	7	13	11	5	1	102
génotype A	1	2	1	1	3	0	2	0	2	4	3	2	2	0	23
génotype B	0	0	1	2	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	9
génotype C	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	4
génotype D	3	1	3	3	6	2	2	4	4	1	4	1	2	0	36
génotype E	1	1	0	1	2	1	2	0	4	1	4	6	1	1	25
génotype F	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3
ND	1	1	1	0	1	1	3	0	0	1	1	1	0	0	11
Mutations AgHBs	1	1	2	1	0	0	1	0	0	1	3	3	0	1	14

ND : non déterminé

L'analyse moléculaire comprend la détermination du génotype et recherche de mutations dans l'enveloppe virale par séquençage : de la région hydrophile majeure de la protéine d'enveloppe "S" (Servant-Delmas A *et al.*, Transfusion 2010) ; d'une région chevauchant la polymérase du virus (cible des molécules antivirales) et de la boucle antigénique de l'AgHBs (région amplifiée : nucléotides 271 à 1140 nt sur la séquence de référence NC_003977).

Sur 3741 dons ADN positifs collectés entre 2005 et 2021, 3 660 (97,8%) ont pu être analysés (**Figure 21**). Parmi ces 3 660 dons, 307 (8,4%) n'étaient pas génotypables.

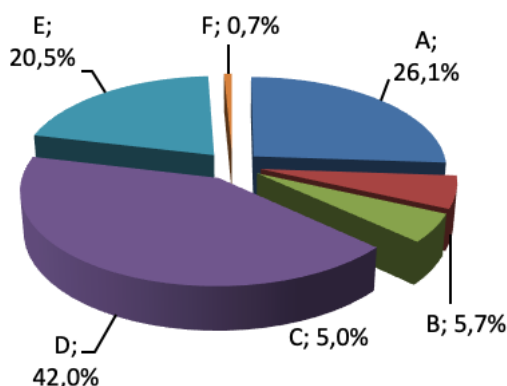


Figure 21 : Distribution des génotypes VHB chez les donneurs de sang (2005-2021)

Le génotype D est le génotype le plus fréquent (42% avec des extrêmes de 30% en 2019 à 53% en 2015). Les génotypes B, C et F sont stables au cours du temps et occupent conjointement moins de 12% des souches. On observe depuis 2016 une tendance à l'augmentation du génotype E au détriment du génotype A. Ceci peut s'expliquer par une augmentation de la proportion des donneurs d'origine Africaine parmi les donneurs infectés par le VHB avec en parallèle un possible effet de la vaccination dans la population des donneurs d'origine métropolitaine ou du bassin méditerranéen. Cette répartition est en accord avec l'origine géographique des donneurs.

Sur les 3311 souches analysées, les mutations du gène S codant l'AgHBs décrites comme pouvant affecter le diagnostic ou l'échappement à la vaccination, ou aux immunoglobulines et hors polymorphisme naturel concernent 221 échantillons (6,7%) (**Figure 22**) dont 187 souches avec une seule mutation et 34 souches avec plusieurs mutations [2 mutations (n=23), 3 mutations (n=5) et >3 mutations (n=6)].

La mutation majoritairement identifiée (28,1%) portait sur la position 133 (62 cas dont 11 en association avec au moins une autre mutation), puis sur les positions 144 (n=33 soit 14,9%) et 129 (n=25 soit 11,3%). La proportion de ces mutants par génotype est présentée dans la **Figure 22**. Il existe une différence significative au profit du génotype B ($p < 10^{-3}$), comme observé dans une récente revue montrant que ce génotype présente un taux plus élevé de mutations que les autres génotypes (Araujo *et al.*, Frontiers in Microbiology 2020).

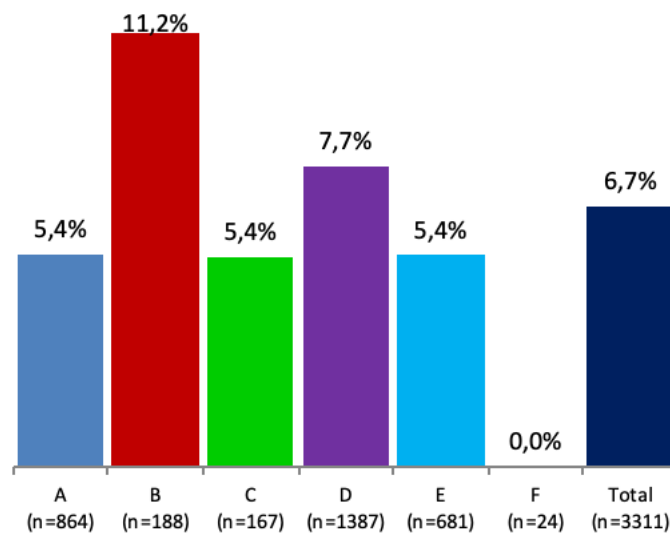


Figure 22 : Proportion de souches présentant une mutation dans le gène S du VHB par génotype (2005-2021).

Depuis 2012, la proportion de mutants de l'AgHBs a tendance à augmenter jusqu'en 2019 et entame une décroissance à partir de 2020, à confirmer dans le suivi des années ultérieures (**Figure 23**).

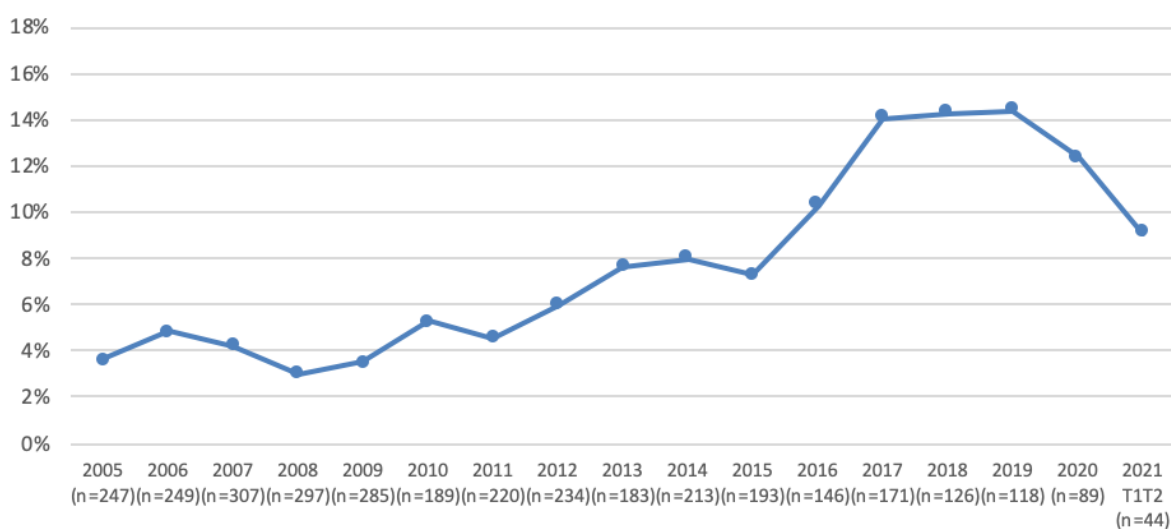


Figure 23 : Évolution de la proportion des mutants de l'AgHBs au cours du temps.

Pour les génotypes B et C, les charges virales moyennes étaient significativement plus élevées ($p < 10^{-4}$) (**Figure 24**).

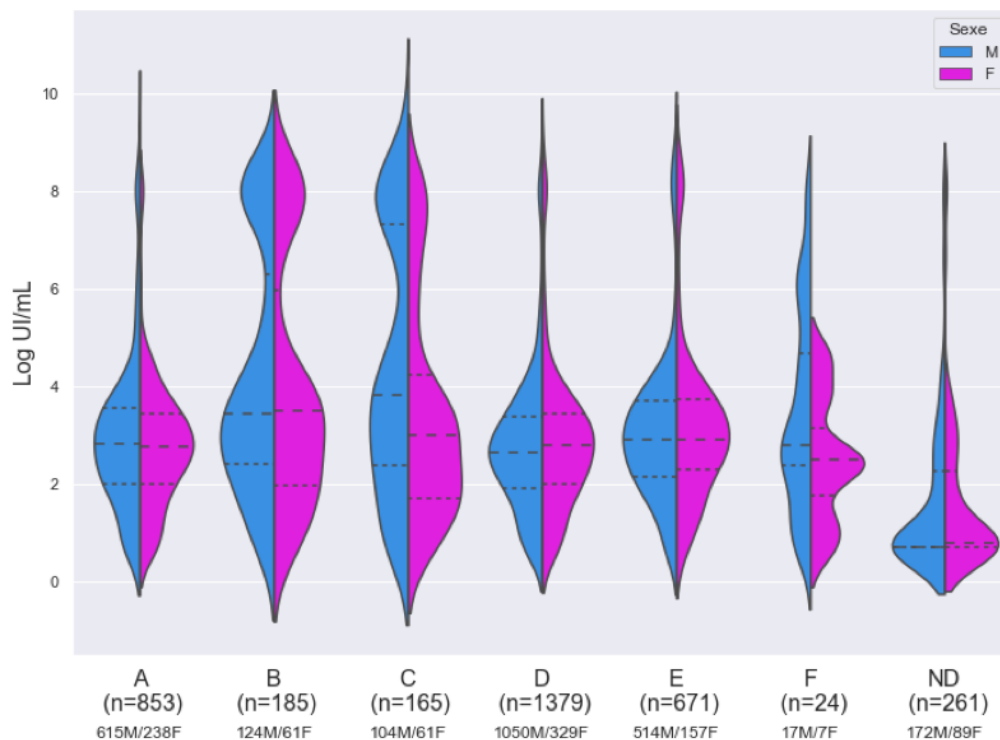


Figure 24 : Répartition des charges virales (Log UI/mL) en fonction du génotype du VHB chez 3 538 donneurs de sang entre 2005 et 2021 (ND : génotype non déterminé. Traits en pointillés serrés : quartiles, trait en pointillés : médiane).

Entre 1997 et 2021, 2,03% des donneurs AgHBs-positif avaient des anticorps VHD, témoignant d'une coinfection VHB-VHD. En ne prenant en compte que les "vrais positifs", le taux de prévalence moyen des anticorps delta s'élève à 1,37%. La quantification de l'ARN VHD, réalisée sur 82 échantillons était positive chez 22 souches (24,7%) avec une charge virale allant de 10^2 à 10^9 copies/mL. La distribution des génotypes était : génotype 1 (n=19), génotype 6 (n=1), génotype 7 (n=1) et génotype 8 (n=1). Cinq souches VHD-1 ont été isolées chez des donneurs européens, 2 chez des donneurs originaires du bassin méditerranéen, 9 chez des donneurs originaires d'Afrique Sub-Saharienne, 1 chez un donneur originaire des DOM et 2 sans renseignement sur l'origine géographique. La charge virale VHB des 22 donneurs ARN-VHD positifs était plus basse (médiane à 34 UI/mL) que celle des donneurs ARN-VHD négatifs (médiane à 875 UI/mL). La surveillance prospective de la séroprévalence des anticorps delta chez les donneurs AgHBs positifs montre des fluctuations autour de 2% (**Figure 25**).

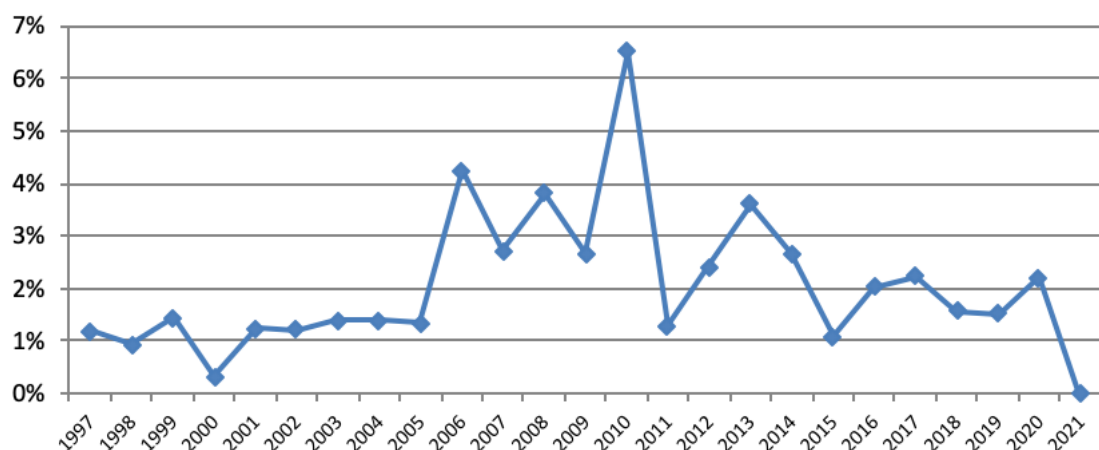


Figure 25 : Évolution de la séroprévalence du VHD chez les donneurs de sang de 1997 à 2021.

La détection du génome viral (DGV) est pratiquée en unitaire dans les DOM depuis janvier 2005 et au CTSA depuis

2006 et a été étendu à la métropole en 2010 avec une introduction progressive entre mai et octobre. Sur les 111 dons DGV+/AgHBs-, 84 dons étaient anti-HBc+ (infection B occulte) et 27 correspondaient à des infections aiguës. La **Figure 26** montre la répartition des infections aiguës au cours du temps. Les charges virales des dons ADN+/AgHBs-/AchBc- étaient basses (médiane : 1,15 Log UI/mL ; intervalle : <0,8– 2,7 Log UI/mL.).

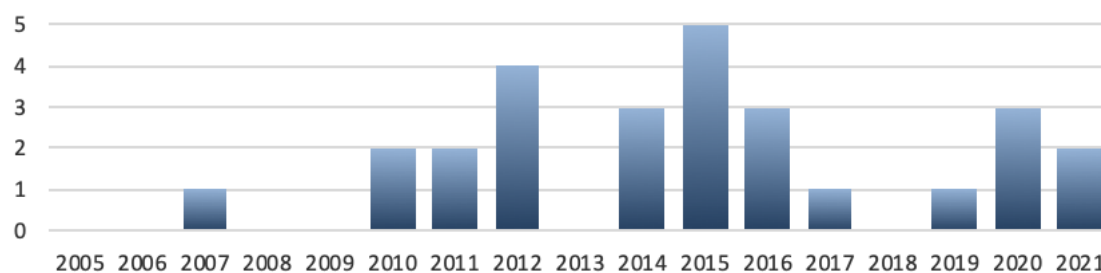


Figure 26 : Répartition des cas de DGV positifs, AgHBs et Anti-HBc négatifs en fonction du temps.

Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections VHC chez les donneurs de sang. La surveillance du taux de dons positifs pour 10 000 dons parmi les dons de sang depuis 1993 est présentée à la **Figure 27** et les caractéristiques des dons positifs sont présentées dans les figures suivantes (**Figures 28, 29 et 30**). Globalement, pour les donneurs ayant été interrogés sur leur(s) facteur(s) de risque, le facteur de risque principal chez les nouveaux donneurs de sang de sexe masculin est l'usage de drogue alors que chez les donneurs sang de sexe féminin il s'agit le plus souvent d'un risque nosocomial (**Figure 29**). Toutefois, on note une diminution du risque de toxicomanie chez les hommes durant la dernière décennie au profit du risque nosocomial (39% entre 1998 et 2010 et 29 % entre 2011 et 2020). A noter que pour environ 18% des donneurs, le facteur de risque n'est pas identifié. Chez les donneurs connus, l'usage de drogue est également le risque majeur chez les hommes, alors que chez les femmes, le risque nosocomial et le risque sexuel sont tous deux majoritaires et en proportion équivalente (**Figure 30**).

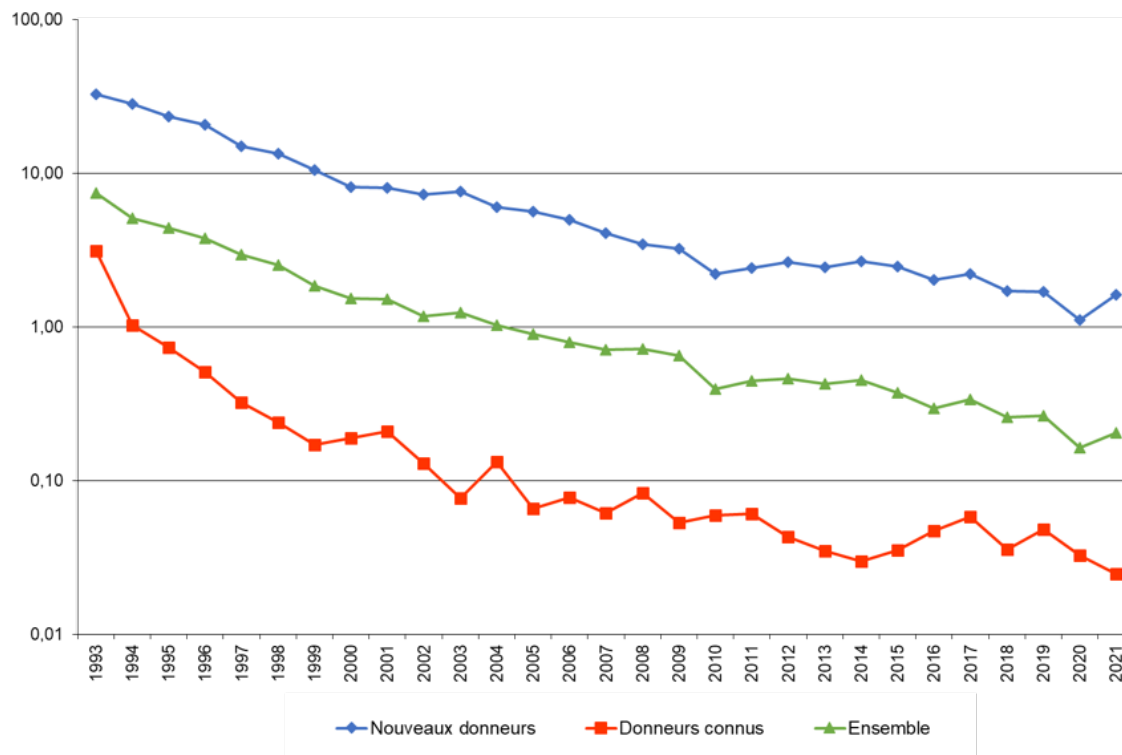


Figure 27 : Évolution du taux de dons VHC positifs pour 10 000 dons parmi les dons de sang collectés de 1993 et 2021 (échelle logarithmique).

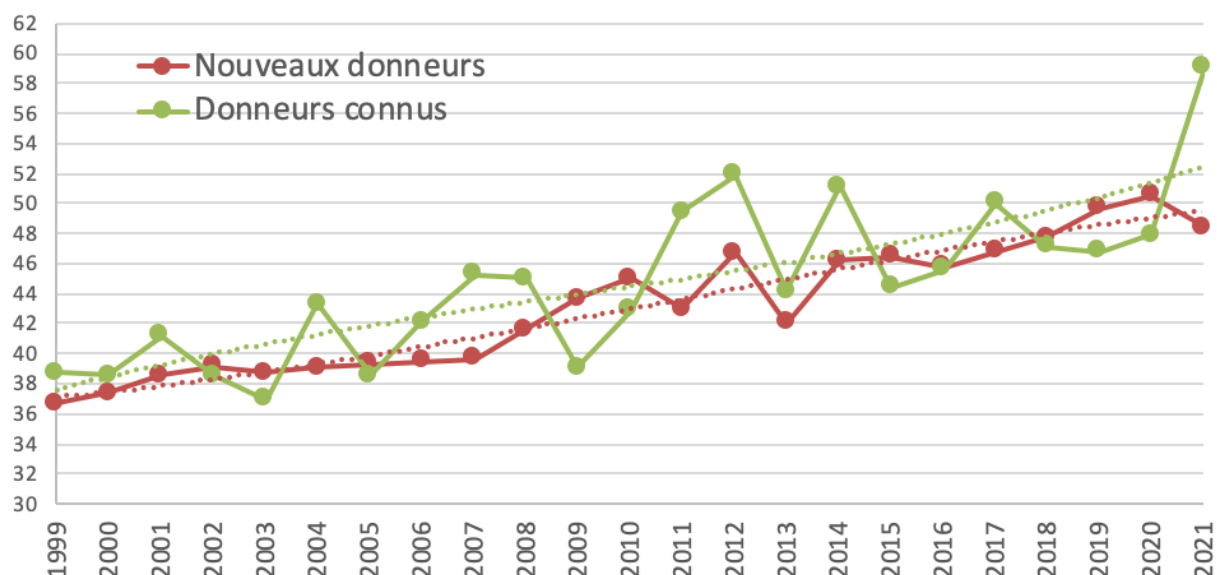


Figure 28 : Évolution de l'âge moyen des donneurs VHC positifs entre 1999 et 2021 selon leur statut.

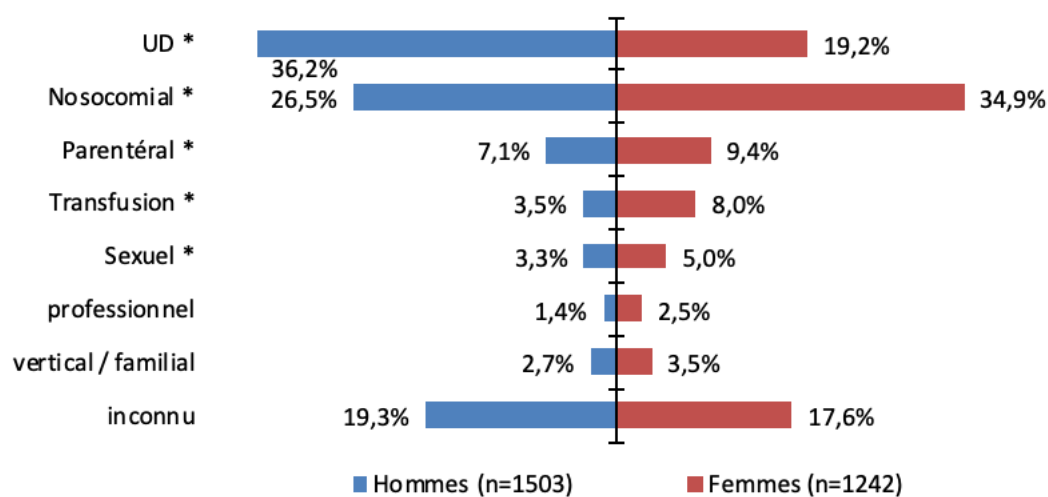


Figure 29 : Répartition des facteurs de risque hiérarchisés retrouvés chez les nouveaux donneurs VHC+ interrogés lors de l'entretien post-don (1998-2021 ; n = 2745). UD : Usage de drogue ; * Différence significative entre hommes et femmes.

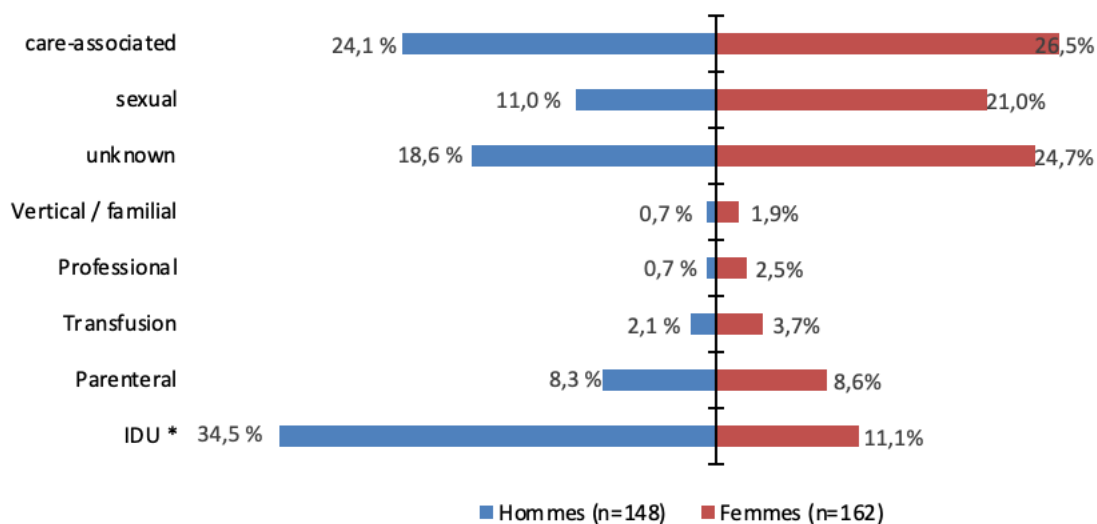


Figure 30 : Répartition des facteurs de risque hiérarchisés retrouvés chez les donneurs réguliers (connus) VHC+ interrogés lors de l'entretien post-don (1998-2021 ; n = 310). UD : Usage de drogue ; * Différence significative entre hommes et femmes.

Sur la période 2000-2021, le laboratoire a reçu 3 169 échantillons de donneurs VHC positifs. On note une chute progressive de la proportion des donneurs virémiques avec une réduction de moitié entre 2001-2003 et 2019-2021 (Figure 31).

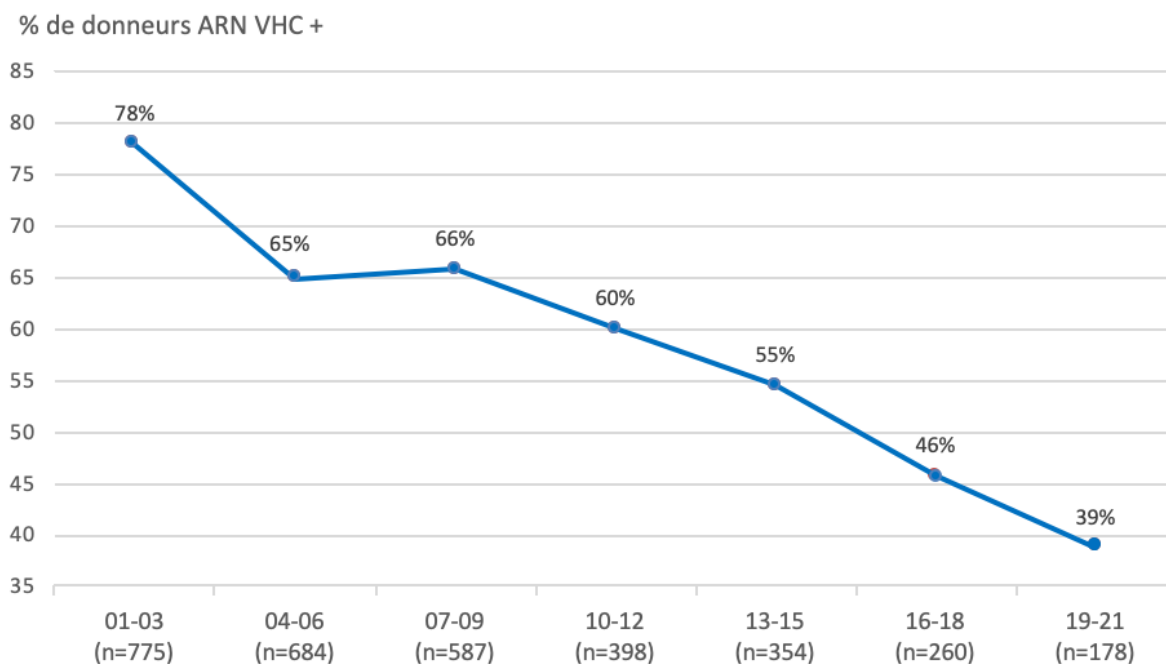


Figure 31 : Évolution de la proportion de donneurs virémiques (sur la base du DGV) parmi des donneurs VHC positifs (2001-2021).

Pour mémoire, tous les dons présentant un marqueur VHC positif (anticorps ou ARN) sont testés à l'arrivée au laboratoire par une PCR "alternative" au DGV. Sur la période 2001-2021, seuls 8 échantillons ont fourni des résultats discordants entre DGV et PCR alternative : 3 DGV positifs non détectés avec le test Amplicor d'une moindre sensibilité et 5 DGV négatifs qui présentaient des charges virales faibles (non quantifiables). Ainsi sur la dernière période d'étude correspondant à la stratégie actuellement en vigueur, nos résultats suggèrent que 0,6% des anticorps positifs et DGV négatif (soit environ 1 don tous les 5 ans) présentent en réalité une virémie faible (Cappy *et al.*, Blood Transfusion 2021).

Jusqu'en 2020, la détermination du génotype a été réalisée sur chaque échantillon virémique par hybridation

inverse en première intention (VERSANT HCV GENOTYPING ASSAY LiPA 2.0, Siemens), et en cas de résultat non concluant, par séquençage d'un fragment d'environ 340 paires de bases de la région NS5B. Depuis 2021, le séquençage des échantillons VHC+ est réalisé par métagénomique, qui permet un séquençage "sans a priori", avec obtention des génomes complets pour la plupart des échantillons, étant donné les charges virales élevées. En cas d'échec, le séquençage de la région NS5B est réalisé. La répartition des génotypes est stable dans le temps (**Figure 32**), et il existe une différence significative dans la répartition des facteurs de risques en fonction des génotypes : les génotypes 1b et 2 sont plus souvent retrouvés dans un contexte nosocomial alors que les génotypes 1a, 3a et 4 sont plus souvent retrouvés dans un contexte d'usage de drogues par voie intraveineuse ($p < 10^{-3}$) (**Figure 33**).

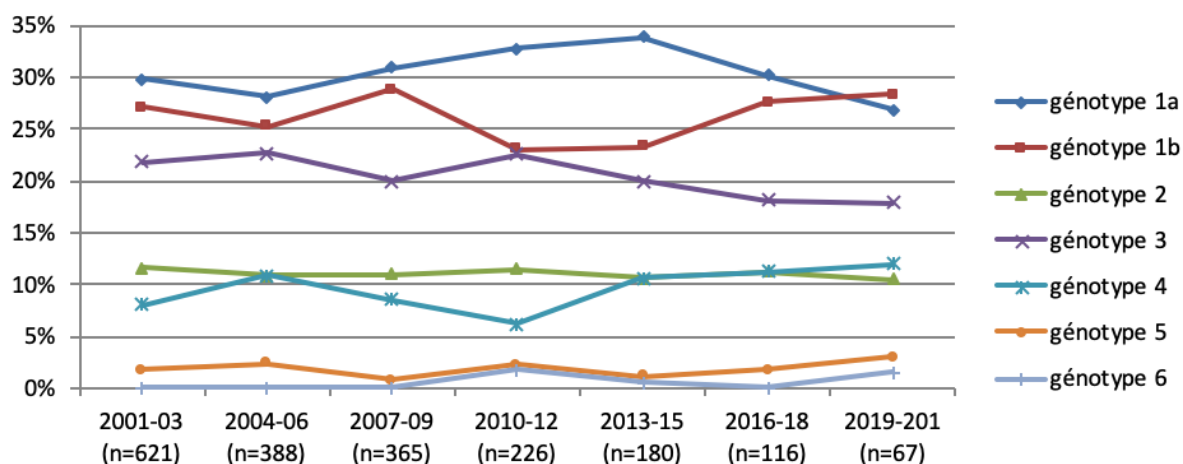


Figure 32 : Évolution des proportions relatives des génotypes du VHC chez les donneurs de sang virémiques pour la période 2000-2021 (n=2 189 soit 93,2% des 2 348 ARN positifs).

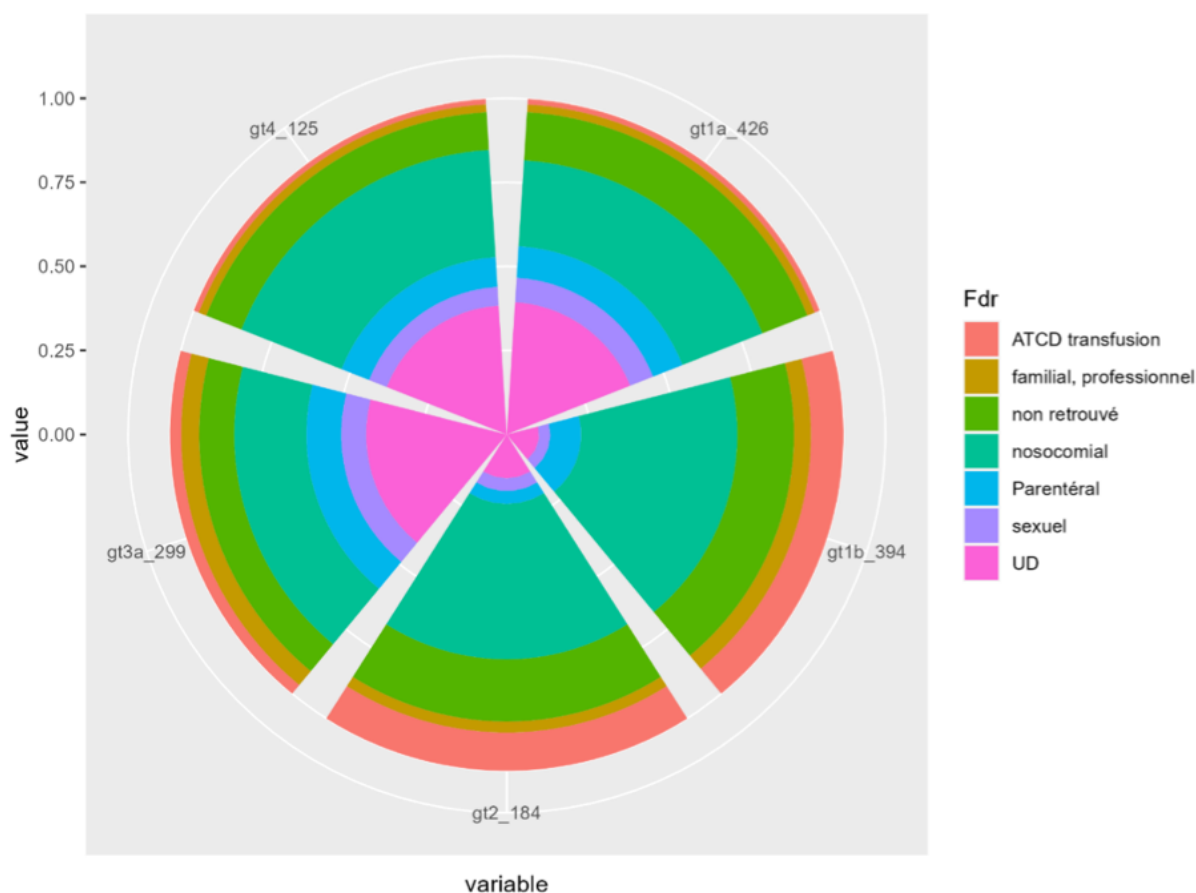


Figure 33 : Répartition des facteurs de risque du VHC (hiérarchisés) chez les donneurs de sang en fonction du génotype sur la période 2000-2021 (nombre de dons comptabilisés pour l'analyse indiqués après chaque génotype). Seuls les génotypes 1a, 1b, 2, 3a et 4 ont été pris en compte, les autres génotypes étant trop peu représentés.

Contrairement à la première décennie (2001-2010) de DGV pratiqué en pool durant laquelle 14 cas d'infections aiguës séronégatives ont été identifiées, lors de la dernière décennie (2011-2021) avec une pratique majoritairement en unitaire, seuls deux tels cas ont été observés suggérant une absence de lien avec les performances techniques mais plutôt une diminution de l'incidence de l'infection.

3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux antiviraux

Surveillance de la résistance du VHC aux antiviraux à action directe (AAD). Le développement des antiviraux à action directe (AAD) pangénotypiques a bouleversé la prise en charge thérapeutique de l'infection par le VHC. Désormais, les traitements disponibles [sofosbuvir/velpatasvir (SOF/VEL), glecaprevir/pibrentasvir (G/P) et sofosbuvir/velpatasvir/voxilaprevir (SOF/VEL/VOX)] permettent une guérison virologique de la plupart des patients (>95%). Les échecs virologiques (principalement des rechutes) sont rares, exceptés chez les patients infectés par des génotypes dits "non usuels" généralement en raison de la présence de substitutions amino acidiques au niveau du gène *NS5A* capables de conférer une diminution de sensibilité aux antiviraux (Vo-Quang et al., Hepatology 2023).

Vingt et un laboratoires répartis sur le territoire national nous ont fait parvenir des échantillons biologiques collectés chez des patients en échec de traitement par AAD pour la détermination des profils de résistance à l'aide de la trousse Sentosa SQ HCV Genotyping Assay version 2.0. Au total, 87 patients (âge moyen 55,0±13,8 ans, 76,4% d'hommes) ont été analysés en 2022. La charge virale moyenne était 5,9±1,0 Log UI/mL. Les traitements antiviraux étaient G/P (n=23), SOF/VEL±RBV (n=18) ou SOF/VEL/VOX (n=3). La répartition des génotypes était la suivante : 37% de génotype 1 (n=30), 9% de génotype 2 (n=7), 38% de génotype 3 (n=31), 15% de génotype 4 (n=12), et 1% de génotype de 5a (n=1).

Par séquençage haut débit, 76,7% (66/86) des patients présentaient une ou plusieurs RAS dans une (n=56 patients), 2 (n=9 patients) ou 3 régions (n=1 patient) ciblées par les AAD. Près de trois-quarts des patients avaient une ou plusieurs RAS dans le gène *NS5A*. Les positions les plus fréquemment mutées étaient les positions 30, 31 et 93 du gène *NS5A* (Tableau 9).

Tableau 9 : Profils de résistance des régions NS3, NS5A et NS5B

	Sentosa SQ HCV Genotyping Assay 2.0		
	NS3	NS5A	NS5B
Proportion of Pts with RAS	15,1% (13)	73,3% (63)	2,3% (2)
RAS (n)			
Single mutant	11	28	2
Double mutants	2	25	0
Triple mutants	0	6	0
Quadruple	0	3	0
Quintuple	0	1	0
Most frequent RAS (position, n)	80(Q80K/R; n=4) 156 (A156S/T/V/G; n=4) 122 (S122N/T; n=3)	30 (R/Q/L/A30K/R/H/S; n=26) 31 (L31M/V/I/L; n=24) 93 (Y93H/S/C; n=17)	556 (S556G; n=2)

Surveillance de la résistance du VHB aux analogues nucléos(t)idiques (AN). En ce qui concerne la surveillance de la résistance du VHB aux analogues nucléos(t)idiques (entecavir et tenofovir), 15 laboratoires répartis sur le territoire national ainsi que dans les DROM (Guadeloupe et Guyane) nous ont fait parvenir des échantillons biologiques collectés chez des patients en échec ou ayant des charges virales détectables après 12 mois de traitement. La détermination des profils de résistance a été réalisée après amplification d'une portion des gènes partiellement chevauchants *P/S*, cibles des AN. Au total, 56 patients (âge moyen 45,4±15,4 ans, 63,3% d'hommes) ont été analysés en 2022. La charge virale moyenne était de 4,5±1,7 Log UI/mL. Les traitements antiviraux étaient entecavir (ETV ; n=20), tenofovir (TDF ; n=14), TDF/FTC ou LAM (n=6) et ETV plus TDF (n=5). La répartition des génotypes était la suivante : 18% de génotype A (n=9), 6% de génotype B (n=3), 2% de génotype C (n=1), 16% de génotype D (n=8), 52% de génotype de E (n=26) et 6% de génotype G (n=3).

Par séquençage direct, 30,0% (15/50) des patients présentaient une ou plusieurs substitutions amino acidiques (RAS pour *resistance-associated substitution*) sous forme de simple (n=8 patients), double, (n=1 patient), triple (n=5 patients) et quadruple (n=1 patient) mutants. Les positions les plus fréquemment mutées étaient les positions

204 (M204V, n=7 patients), 180 (L180M ; n=7 patients) et 163 (I163V, n=4 patients) (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Profils de résistance du VHB aux analogues nucléos(t)idiques

	“Population sequencing” (in-house method)
Proportion pf Pts with RAS, % (n)	30.0%
RAS (n)	
Single mutant	8
Double mutants	1
Triple mutants	5
Quadruple mutants	1
Most frequent RAS (position, n)	204 (M204V; 7 patients) 180 (L180M; 7 patients) 163 (I163V; 4 patients) 173 (V173L; 3 patients)

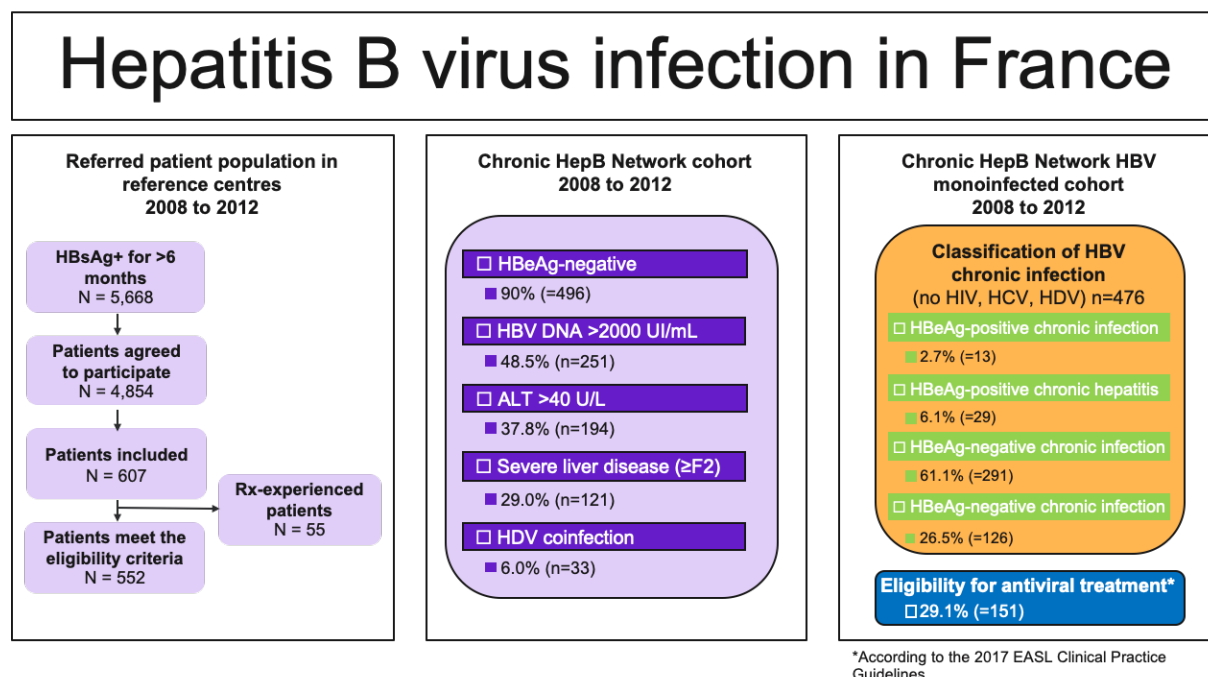
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

L'intégralité de la surveillance épidémiologique et son analyse des donneurs positifs pour les infections à VHB et VHC, sont générées à partir des données fournies par les opérateurs (EFS, CTSA). Le CNR coordonnateur peut également contribuer aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens et internationaux : European Blood Alliance (EBA) ou International Society of Blood Transfusion (ISBT).

Les cliniciens, virologues et chercheurs s'intéressant à l'infection par le VHD ont pour habitude de se retrouver pour une session d'échanges en parallèle des congrès annuels d'hépatologie européen (EASL Congress) et américain (AASLD, The Liver Meeting). Des membres du CNR associé delta y participent régulièrement.

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Caractéristiques cliniques et virologiques des patients nouvellement pris en charge pour leur hépatite chronique B dans un centre Expert (2008-2012). Parmi les sujets vivants avec le VHB, seule une fraction de porteurs chroniques de l'AgHBs nécessite un traitement antiviral, et cette proportion varie selon la population et la région considérée. 552 patients naïfs de traitement ont été prospectivement inclus entre 2008 et 2012. Les données démographiques, cliniques et biologiques ont été analysées. Les patients étaient majoritairement des hommes (61,1%) âgés de 37,5 ans au moment de l'inclusion. 64% étaient originaires d'un pays de moyenne ou forte endémicité pour le VHB et 90% étaient AgHBe-négatif. A l'inclusion, le niveau de charge virale et le titre de l'AgHBs étaient respectivement de 3,3 et 3,6 Log UI/mL. Près de 40% des patients avaient des ALAT >40U/L et 29% avaient une fibrose significative ($\geq F2$) dont 9,4% avaient une cirrhose. Les génotypes D (34,7%), E (27,4%) et A (25,7%) étaient les plus prévalents. Les coinfections étaient rares : 2,4% étaient coinfectés par le VIH, 4% par le VHC et 6% par le VHD. Selon les recommandations de l'EASL 2017, 2,3% des patients étaient classés en infection chronique B AgHBe-positif (immunotolérant), 5,9% hépatite chronique B AgHBe-positif, 25,4% hépatite chronique B AgHBe-négatif et 63,2% infection chronique B AgHBe-négatif (portage asymptomatique). Les performances de la mesure du titre de l'AgHBs pour identifier les patients ayant une hépatite chronique B AgHBe-négatif était faible avec une AUC de 0,591. Plus d'un tiers des patients (32,2%) étaient éligibles à un traitement antiviral. La plupart des patients éligibles à un traitement ont initié un traitement de 1^{ère} ligne [tenofovir (45,3%), entecavir (36,8%) ou interféron pégylé (11,6%)] (Chevaliez *et al.*, JHEP Rep 2022;4(12):100593).



Caractéristiques des échecs de traitement aux AAD chez des patients infectés par un génotype 1 “non usuel” du VHC (2015-2021). Bien que les traitements actuels contre l'hépatite C permettent une guérison

virologique de la plupart des patients (>95%), une réponse suboptimale a été rapportée chez les patients infectés par un sous-type dit "non usuel" de génotype 1, i.e non 1a/non 1b. L'objectif de cette étude était d'évaluer la proportion de patients infectés par un sous-type 1 "non usuel" parmi les patients en échec de traitement et de caractériser l'échec virologique et la réponse à un retraitement. Au total, 640 patients en échec de traitement incluant un inhibiteur NS5A ont été inclus dans cette étude rétrospective (2015-2021). L'analyse virologique a montré que 47 des 640 patients (7,3%) étaient infectés par un génotype 1 "non usuel" [1d (n=8), 1e (n=13), 1f (n=1), 1g (n=2), 1i (n=2), 1k (n=1), 1l (n=18) et sous type indéterminé (n=2)]. La plupart des patients (92,5%) étaient originaires d'Afrique avec près de la moitié du Cameroun. Avant traitement, les positions 80 de la protéine NS3 et les positions 24, 30, 31, 58 et 93 de la protéine NS5A connues pour diminuer la sensibilité aux antiviraux à action directs étaient mutées. A l'échec, la plupart des patients abritaient des virus résistants au niveau d'une ou plusieurs régions ciblées par les AAD. Les positions les plus fréquemment mutées étaient les positions 31, 58 et 93 de la protéine NS5A, et 80 et 168 de la protéine NS3. Tous les patients retraités sauf un ont eu une réponse virologique soutenue (guérison virologique) après un retraitement de 12 semaines par une combinaison associant un antiprotéase et un anti-NS5A (**Vo-Quang et al., Hepatology 2023, sous presse**).

Identification d'un virus appartenant à la famille des Circoviridae et au genre Circovirus responsable d'une hépatite sévère chez une patiente immunodéprimée. Une hépatite d'origine indéterminée peut être causée par une variété de micro-organismes. Ce cas clinique rapporte l'identification d'un circovirus jusqu'ici inconnu par métagénomique shotgun à l'origine d'une hépatite sévère chez une femme de 61 ans doublement transplantée (cœur-poumons) pour un syndrome d'Eisenmenger. Hospitalisée en mars 2022 pour hépatite aiguë d'origine indéterminée (cytolyse hépatique avec ALAT à 23xLSN et ASAT à 47xLSN), la ponction-biopsie hépatique montrait des signes d'hépatite aiguë sans étiologie clairement identifiée. Les marqueurs les plus fréquemment recherchés devant un tableau d'hépatite aiguë étaient tous négatifs (IgM VHA, ADN VHB, ARN VHC, ARN VHD, ARN VHE, ARN VIH, ADN HSV-1/2, ADN VZV, ADN CMV, ADN EBV, ADN HHV-6, ADN ADV, ARN EV, ADN parvovirus B19, marqueurs de la leptospirose). Les marqueurs en faveur d'une hépatite auto-immune étaient également négatifs. Les médicaments éventuellement responsables d'une hépato-toxicité ont tous également été arrêtés, sans effet sur la cytolyse hépatique. Néanmoins, les transaminases ont spontanément diminué 7 semaines après l'admission. Devant ce tableau clinique et biologique, une demande de métagénomique shotgun a été adressée au laboratoire en vue d'identifier un éventuel agent infectieux à l'origine de l'hépatite aiguë. L'analyse bio-informatique des séquences ADN (31 431 784 séquences) et ARN (579 324 séquences) générées montraient que ces dernières étaient phylogéniquement proches des séquences des virus de la famille des Circoviridae (Figure 17). Un nouveau virus dénommé provisoirement Circovirus parisii a été ainsi identifié (**Rodriguez et al., Emerg Infect Dis 2023;29(5):1051-1054**).

4. Alertes

En 2022, à la suite d'un contrôle dans une clinique dentaire située à Chevigny Saint Sauveur (Côte-d'Or) avec mise en évidence d'écarts majeurs aux bonnes pratiques de la part des chirurgiens-dentistes, un dépistage des hépatites virales et du VIH a été organisé et centralisé par l'ARS de Bourgogne Franche-Comté. Au total, 13 individus porteur de l'AgHBs et 4 sujets infectés par le VHC ayant bénéficié de soins dentaires dans ce centre ont été répertoriés. Aucun individu n'était séropositif pour le VIH. La prise en charge médicale de ces patients a été assurée par le Service des Maladies Infectieuses du CHU de Dijon (Pr Piroth). Treize échantillons ont été reçus au laboratoire de l'hôpital Henri Mondor incluant 10 échantillons positifs pour l'AgHBs et 3 échantillons séropositifs pour le VHC (2 échantillons collectés chez le même patient). Une détection/quantification des acides nucléiques a été réalisée à l'aide des trousse cobas HBV Test et cobas HCV Test sur l'automate c4800 et, sur les échantillons dont la charge virale était >2.3 Log UI/mL une détermination du génotype par analyse phylogénique d'une portion du gène *P/S* ou *NS5B* (méthode de référence) a été réalisée. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 11**.

En ce qui concerne l'hépatite B, seuls 4 échantillons avaient une charge virale détectable incluant 2 échantillons avec une charge virale quantifiable (respectivement 1,3 et 2,8 Log UI/mL pour les échantillons 31 et 38) et non quantifiable pour les 2 autres échantillons (échantillons 41 et 48). Les souches virales étaient de génotype D et A.

En ce qui concerne l'hépatite C, seuls 2 échantillons (collectés chez le même patient, respectivement les 21 et 27 juillet 2021) avaient une charge virale détectable et quantifiable (5,3 et 5,1 Log UI/mL). La souche virale était de génotype 1b.

Tableau 11 : Résultats des analyses virologiques

N° anonymat	Charge virale (Log UI/mL)	Génotype
Hépatite B		
31	1,3	D
38	2,8	A
41	<1	Non déterminé
48	<1	Non déterminé
6	Non détectée	Non déterminé
25	Non détectée	Non déterminé
33	Non détectée	Non déterminé
53	Non détectée	Non déterminé
Hépatite C		
1	5,4	1b
1	5,1	-
HL1	Non détectée	Non déterminé

Hépatites pédiatriques d'origine indéterminée.

Le CNR coordonnateur a participé dès le début du signalement partagé par le Royaume-Uni en avril 2022. Il s'agissait de cas d'hépatites aiguës sévères d'origine inconnue chez de jeunes enfants. Le CNR a participé aux nombreuses conférences téléphoniques qui ont permis à l'échelon national et européen le partage des informations ainsi que la définition des cas. Un circuit de signalement a pu être mis en place pour détecter les potentiels cas sur le territoire national. Tous les cas suspects ont été centralisés au niveau du CNR coordonnateur et investigués par la plateforme GENOBIOMICS adossée au CNR coordonnateur. Au total, 25 cas suspects d'hépatites pédiatriques d'origine indéterminée ont été explorées par métagénomique shotgun.

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

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Les formations dispensées aux professionnels de santé se répartissaient comme suit :

- **Accueil de stagiaires**
 - . Erwan Vo-Quang, Interne en Médecine, Master 2 recherche
 - . Ryme Touati, Pharmacienne, spécialiste en microbiologie au Centre Hospitalo-Universitaire d'Alger
 - . Rolar Matar, Étudiante en Master 2 recherche à l'IMRB
 - . Julia Draï, Étudiante en Licence Biologie, Université de Bordeaux
 - . Rose Debaisieux, Étudiante à SupBiotech Paris
- **Webinaires de la SFM**
 - . Le Remic's – VHC : stratégies diagnostiques (Février 2022)
 - . Le Remic's – VHD : comment améliorer la cascade de soins ? (Septembre 2022)
- **Référentiels/guides**
 - . "Virus de l'hépatite C". Référentiel en microbiologie médicale (REMIC), 7^{ème} édition (chapitre 88 : 795-801)
- **Site internet dédié au CNR des Virus d'Hépatites B, C et delta**
<https://www.vhc-henrimondor.com/centre-national-de-referencedes-hepatites-b-c-et-delta/mission-de-service-public/>

Le CNR (laboratoires coordonnateur et associé) sont très régulièrement sollicités (messagerie électronique : cnr.hepatites-bcd@aphp.fr, téléphone) pour des conseils aux professionnels de santé (cliniciens, biologistes des laboratoires publics et privés). Le volume de cette activité est très difficilement quantifiable.

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

Dominique Challine assure les fonctions suivantes :

- . Membre du Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP), groupe de travail permanent sur la Sécurité des Éléments et Produits du Corps Humain (Cesproh)
- . Membre de l'agence de Biomédecine (ABM) : groupe greffes dérogatoires

Stéphane Chevaliez assure les fonctions suivantes :

- . Coordination du groupe Hépatites Virales du Réseau de Virologie et Pharmacologie Médicale de l'ANRS-MIE (Agence Nationale de Recherche sur le SIDA, les Hépatites Virales et Maladies infectieuses Émergentes) (AC43).
- . Membre auditionné du groupe de travail "hépatites, épidémiologie, prévention" de la HAS
- . Membre du groupe HBV Cure de l'ANRS-MIE

Jean-Michel Pawlotsky assure les fonctions suivantes :

- . Responsable du Programme Chercheurs Émergents de l'ANRS-MIE
- . Membre du comité de coordination de la Task Force HBV Cure de l'ANRS-MIE
- . Membre du réseau de laboratoires de virologie médicale de l'ANRS-MIE

Slim Fourati assure les fonctions suivantes :

- . Membre élu de la Commission Scientifique Spécialisée (CSS) 5 "Immunologie, Microbiologie, Infection"

- . Membre du Comité de rédaction des recommandations de prise en charge des patients infectés par le VHC de la HAS
- . Membre du Conseil Scientifique de la cohorte HEPATHER de l'ANRS-MIE
- . Membre du groupe HBV Cure de l'ANRS-MIE

Pierre Cappy assure les fonctions suivantes :

- . Participation au groupe de travail Secproch (HCSP) relatif à la sécurité des produits originaires du corps humain (greffe – transfusion)
- . Membre du Comité de Sécurité Transfusionnelle et d'Hémovigilance central de l'APHP

Emmanuel Gordien assure les fonctions suivantes :

- . Membre du Conseil Scientifique de l'observatoire BuleDelta
- . Membre de l'AC43

Ségolène Brichler assure les fonctions suivantes :

- . Membre de l'AC43
- . Pilote du groupe de travail "Recommandations de prise en charge des personnes infectées par le virus de l'hépatite D" de la HAS
- . Membre de la Commission Médicale d'Établissement (CMEL, GH Avicenne)

Dominique Roulot assure les fonctions suivantes :

- . Membre de l'AC45 de l'ANRS
- . Présidente du Comité Scientifique de l'observatoire BuleDelta
- . Membre de la Commission Médicale d'Établissement (CMEL, GH Avicenne)
- . Présidente de la Commission des Effectifs (GH Avicenne)

Frédéric Le Gal assure les fonctions suivantes :

- . Membre de l'AC45 de l'ANRS

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

Sans objet.

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 2022, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

Les thématiques de recherche dans les domaines d'expertise du laboratoire coordonnateur se répartissent en 3 axes complémentaires qui couvrent largement les champs de la virologie des hépatites virales, de l'investigation technologique à la recherche clinique et translationnelle. Ces axes sont l'expertise technologique (développement, standardisation et évaluation des performances des tests et nouvelles technologies), l'épidémiologie moléculaire (surveillance des types circulant, études interventionnelles de santé publique), et la recherche clinique et translationnelle (variabilité génétique, mécanisme de résistance aux antiviraux).

Axe 1 : Expertise technologique. Le développement, la standardisation, l'évaluation des performances intrinsèques et des indications des tests virologiques ont donné lieu à de nombreuses publications en 2022, et ce dans des journaux à fort facteur d'impact (*Journal of Clinical Virology*, *Journal of Infectious Diseases*, *mShpere*, *Microorganisms*, ...) (Cf. liste de publications).

Axe 2 : Épidémiologie moléculaire. Le laboratoire hospitalier est le "partenaire privilégié" de l'agence nationale de santé publique (SpF) à travers les enquêtes permettant l'évaluation des données de prévalence et d'incidence des hépatites virales dans la population générale ou dans certaines populations particulières à l'aide d'outils virologiques tels que les buvards (spots de sang séché) ou des tests rapides immunologiques ou moléculaires (biologie délocalisée). Un accent tout particulier est mis sur le développement de projets de micro-élimination des hépatites virales avec des actions au niveau de services de soins (service d'accueil des urgences) et de la population cristolienne ("Créteil sans hépatites") en lien avec les services d'Hépatologie du GH Henri Mondor et du Centre Intercommunal de Créteil (CHIC), d'Immunologie Clinique, des Urgences et la ville de Créteil, ainsi que des médecins généralistes via la Communauté Professionnelle Territoriale de Santé (CPTS) Unifiées des Boucles de Marne.

Axe 3 : Recherche clinique et translationnelle. L'échec thérapeutique et la résistance du VHB, du VHC et du VHD aux antiviraux constituent l'une des principales thématiques du laboratoire et de l'équipe INSERM, qui accueille les membres du CNR coordonnateur et du CNR associé, à la fois dans ces aspects cliniques et plus fondamentaux, avec un intérêt tout particulier pour les mécanismes sous-tendant l'efficacité et l'échec thérapeutique et le rôle de la résistance antivirale dans l'échec thérapeutique. Sur le plan plus fondamental, le laboratoire s'intéresse également au développement de nouvelles approches thérapeutiques à large spectre et aux mécanismes des lésions hépatiques, à l'aide de différents modèles murins et transgénique et de modèles cellulaires. On peut également souligner un axe de recherche à propos des infections VHB occultes à partir de souches de génotypes B et C chez des adultes immunocompétents vaccinés et anti-HBc négatifs.

Les thématiques de recherche dans les domaines d'expertise du laboratoire associé se focalisent essentiellement sur des enquêtes visant à évaluer la prévalence de l'hépatite delta et de l'hépatite B, de caractériser les souches virales sur le plan moléculaire d'une part, et de préciser l'origine du VHD (horloge moléculaire) d'autre part. Un axe également important est le rôle du VHD dans la progression de la maladie hépatique.

Étude en Guinée-Conakry. Dans la cohorte de patients infectés par le virus de l'hépatite B (VHB) au Centre Hospitalier Régional Spécialisé de Macenta, région forestière de la République de Guinée, 22% à 25% des participants avaient une fibrose ou une cirrhose avancée. Nous avons émis l'hypothèse que la coinfection par le virus de l'hépatite D (VHD) pourrait expliquer en partie la forte prévalence de la une fibrose ou une cirrhose avancée. Tous les patients avec au moins un AgHBs positif enregistrés dans la base de données électronique hospitalière au 02/11/2022 ont été inclus dans cette analyse. La une fibrose ou une cirrhose avancée a été diagnostiquée si élastométrie $\geq 9,0$ kPa (recommandations EASL 2017) ou si score APRI (aspartate-to-platelet ratio index) $>2,0$ (recommandations OMS 2015). Selon la disponibilité des prélèvements sur buvard (DBS), les patients ont été testés pour la présence d'anticorps contre le VHD. Chez les patients séropositifs, une mesure de la charge virale ((ARN VHD) et un génotypage ont été effectués. L'association entre la coinfection par le VHD et une fibrose ou une cirrhose avancée a été évaluée

à l'aide d'une régression logistique multivariée, ajustée pour les facteurs de confusion potentiels tels que l'âge, le sexe, la distance de Macenta (> ou <100 kms), le statut VIH, le statut socio-économique. Comme les données sur la consommation d'alcool manquaient chez 80% des patients, ces données n'ont pas été incluses dans le modèle. Sur les 251 patients avec une sérologie VHD réalisée, 24 étaient positifs (9,4%). Les caractéristiques des patients sont présentées sur la **Figure 17**.

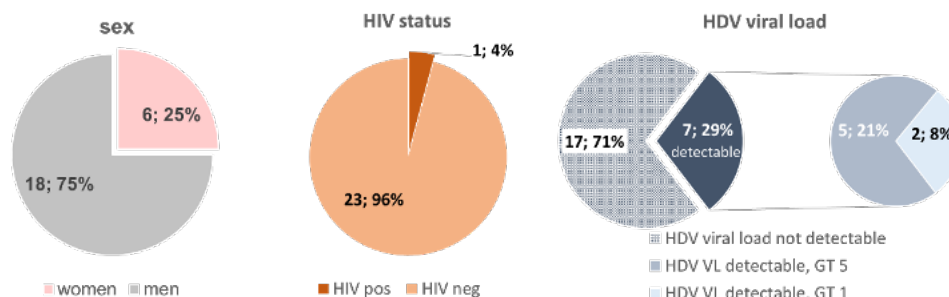


Figure 17 : Caractéristiques des patients (sexe, statut VIH, charge virale D, génotype VHD).

Les facteurs suivants étaient significativement associés à un risque accru de fibrose ou cirrhose avancée dans un modèle univarié : sexe masculin (OR : 2,1 ; intervalle de confiance [IC] à 95 % 1,3 - 3,3) et sérologie VHD positive (OR : 6,6 ; IC95% : 2,6-16,4), tandis qu'un statut socio-économique plus élevé était associé à un risque plus faible de fibrose ou cirrhose avancée (OR 0,54 ; IC95% : 0,33-0,90). Dans un modèle multivarié, ces associations n'ont pas changé de manière substantielle. Dans cette cohorte de patients, près de 1 personne sur 10 vivant avec une hépatite B active chronique est coinfectée par l'hépatite D. La coinfection par le VHD est associée à une multiplication par 7 de la progression vers une fibrose avancée ou une cirrhose.

Étude au Cameroun. Le Cameroun, situé en Afrique centrale, est connu pour être un pays à forte prévalence d'infections par le virus de l'hépatite B (VHB) et le virus Delta (VHD), ainsi qu'avec une forte variabilité génétique des souches circulantes. Dans une large étude nationale (Besombes *et al.*, Gut 2020), la prévalence moyenne du portage de l'AgHBs était de 11,9% et celle du VHD de 10,6%, avec une très grande hétérogénéité selon les régions (1% à 54%) (les plus fortes prévalences étant retrouvées dans les régions du Sud, correspondant à un climat subéquatorial et à de grands espaces forestiers). Dans cette étude, nous avons cherché à réaliser une étude sur la diversité moléculaire des souches VHD qui se sont propagées dans tout le pays. Tous les échantillons AgHBs positifs envoyés au Centre Pasteur du Cameroun entre janvier 2018 et décembre 2020 ont été pris en compte. L'âge, le sexe et la ville de résidence ont été enregistrés. Le diagnostic du VHD a été réalisé par dépistage des anticorps du VHD et quantification de la charge virale (ARN VHD) sur des échantillons positifs à l'aide de tests commerciaux validés. Le génotypage du VHD a été réalisé à l'aide de la méthode de séquençage Sanger d'un amplicon de la région R0, suivie d'une analyse phylogénétique. Au total, 520 prélèvements étaient positifs pour les anti-VHD. 74% des échantillons testés étaient ARN-VHD positif. Le génotype VHD-1 était prédominant (76%), suivi des génotypes VHD-7 (13%), VHD-6 (7%), VHD-5 (3%) et VHD-8 (1%). De façon remarquable, il existait une répartition géographique particulière de souches de VHD selon les régions de résidence des patients : la plupart des souches VHD-1 étaient retrouvées dans le nord et l'ouest du pays, seules des souches VHD-6 et VHD-7 étaient présentes à l'est, et le VHD-5 était absent de la partie sud (**Figure 18**).

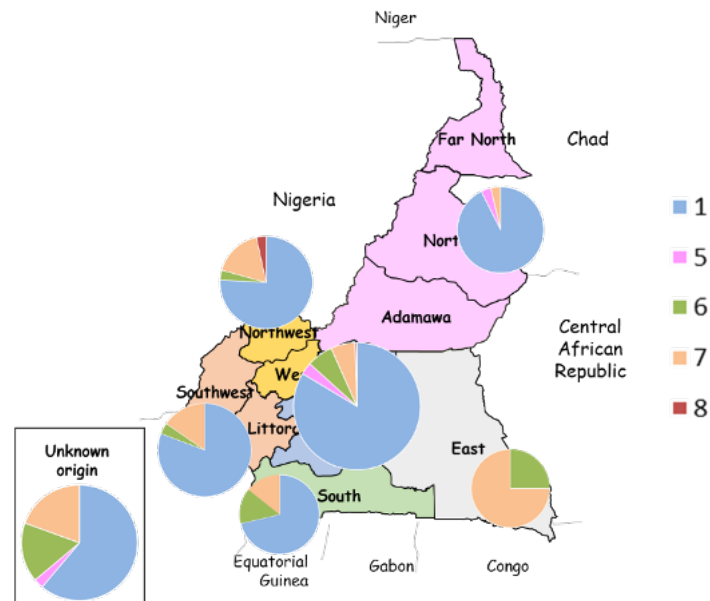


Figure 18 : Répartition géographique des géotypes du VHD.

Origine du VHD. Grâce à nos travaux depuis plus de 20 ans sur la variabilité génétique du VHD, la classification du genre *Deltavirus* en 8 clades ou géotypes a été unanimement acceptée par la communauté internationale sur la base d'une divergence > 20% et >10% pour les sous-clades. Ces travaux ont d'ailleurs contribué en 2019 à la classification de ce virus dans le règne Ribozviria, famille *Kolmioviridae* et genre *Deltavirus* par le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV). L'origine de ce virus n'est toujours pas à ce jour identifiée. Parmi les hypothèses évoquées, quelques études anciennes ont proposé une origine humaine par réarrangement de gènes et d'une structure de type ribozyme, sans être confirmée. En revanche, l'existence d'une similarité de "structure-fonction" avec une activité d'autoclivage de type ribozyme de certains introns eucaryotes ainsi que la découverte récente de séquences très proches de celle du génome du VHD dans le transcriptome de nombreux animaux d'Amérique du Nord (chauve-souris, rongeurs, serpent, oiseaux, cerf de Virginie, marmotte, ...) relancent l'hypothèse d'une origine animale. Enfin une origine viroïde à partir d'une plante ne peut pas être exclue du fait de l'homologie flagrante de structure de son ARN. Début 2022, nous avons débuté une étude sur l'origine de ce virus. L'objectif de ce travail, financé par l'ANRS (projet ECTZ161740, 120K€ + Post Doc 2 ans), était de préciser la date de l'origine du VHD et de reconstruire la dynamique de sa propagation mondiale par inférence phylodynamique. Pour cela, nous avons séquencé le génome complet de plus de 280 nouvelles souches de différents géotypes à partir d'échantillons de la collection du CNR-VHD et pour certains à partir de nouvelles collaborations internationales (Taiwan et Australie) (**Figure 19**). Tous ces échantillons avaient une provenance recouvrant de nombreuses régions du globe avec une répartition sur 38 années (1983-2021). Pour les analyses finales, nous avons pu ainsi sélectionner les 484 séquences les plus pertinentes, incluant les séquences obtenues précédemment par le CNR-VHD et certaines extraites des bases de données publiques. Des analyses spécifiques à chaque géotype ont été menées pour reconstruire l'histoire évolutive du virus et évaluer la corrélation entre les nœuds phylogénétiques et l'échelle temporelle par maximum de vraisemblance estimée avec TimeTree. Nos résultats ont montré que tous les géotypes avaient des propriétés évolutives similaires. Nous avons pu démontrer pour la première fois, que l'infection par le VHD chez l'homme remontait à la période de la fin du néolithique, et que sa diversification génétique et expansion s'est produite juste avant notre ère. Nous avons également identifié une large distribution de lignées du VHD avec des racines africaines, l'Afrique centrale (Gabon, Cameroun) étant le site d'introduction probable du VHD chez l'homme.

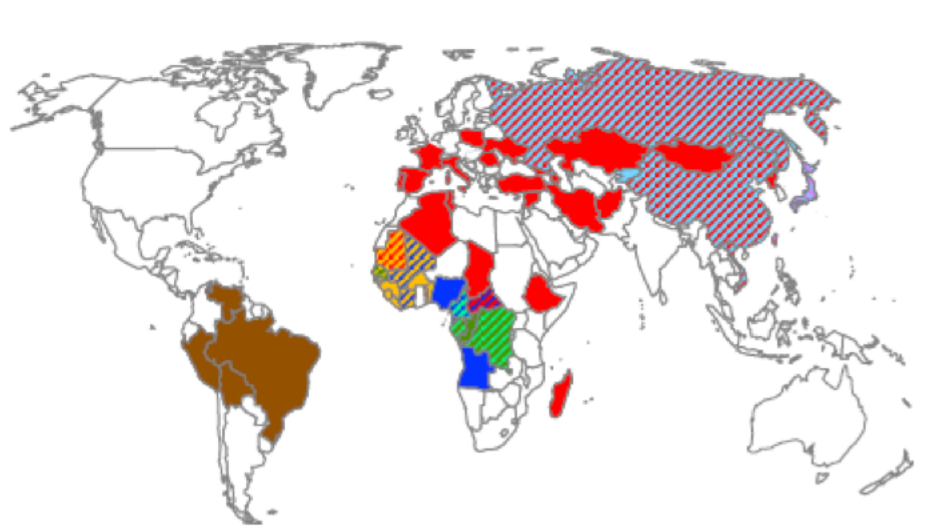


Figure 19 : Origine des souches incluses dans l'étude.

Rôle du VHD dans la progression de la maladie hépatique. Le rôle de l'infection par le VHD dans le développement du carcinome hépatocellulaire (CHC) reste controversé. Le but de cette étude était d'évaluer les incidences de CHC dans de grands groupes homogènes de patients cirrhotiques coinfectés par le VHB-VHD et monoinfectés par le VHB. Les patients des cohortes nationales françaises ANRS CO12 CirVir et DeltaVir avec une cirrhose histologiquement prouvée, sans antécédent de décompensation et sans coinfection par le VIH ou le VHC ont été inclus dans l'étude. Au total, 142 patients coinfectés par le VHB et le VHD et 271 patients monoinfectés par le VHB ont été étudiés. Le critère de jugement principal était l'incidence du CHC. Les patients coinfectés par le VHB et le VHD étaient plus jeunes que les patients monoinfectés par le VHB (37,2 ans contre 53,8 ans) ; ils étaient plus souvent originaires d'Afrique subsaharienne avec moins de comorbidités et des tests hépatiques plus altérés. Après ajustement sur l'âge, les incidences cumulées de CHC chez les patients coinfectés et monoinfectés à 1, 3 et 5 ans étaient respectivement de 5,2%, 11,8% et 20,2% vs 1,1%, 2,5% et 4,4% ($p < 0,001$). En analyse multivariée, l'infection par le VHD était un facteur indépendant associé au développement du CHC (HR 2,94 ; 1,19-7,25 ; $p = 0,019$). Les autres facteurs indépendants étaient l'âge (HR 1,08 ; 1,05-1,11 ; $p < 0,001$), le surpoids (HR 0,45 pour l'IMC [25 ; 30 kg/m² ; 0,22-0,93 ; $p = 0,031$), le tabagisme passé ou en cours (HR 2,26 ; IC 1,23 - 4,16 ; $p = 0,009$), une augmentation de la GGT entre N et 2N (HR 2,73 ; 1,24-6,00 ; $p = 0,013$), une bilirubine totale $> 17 \mu\text{mol/L}$ (HR 2,68 ; 1,33-5,42 ; $p = 0,006$) et des plaquettes $< 150.000/\text{mm}^3$ (HR 3,11 ; 1,51-6,41 ; $p = 0,002$). La coinfection par le VHD n'était pas un facteur indépendant de décompensation hépatique, de transplantation hépatique ou de décès. L'incidence du CHC est significativement plus élevée chez les patients cirrhotiques coinfectés par le VHB-VHD que chez les patients cirrhotiques monoinfectés par le VHB. L'infection par le VHD apparaît comme un facteur de risque indépendant pour le CHC, indiquant que le VHD joue un rôle causal pour le CHC, indépendamment du VHB.

Tests non invasifs et évaluation de la fibrose dans la coinfection B-delta. L'infection par le VHD est associée à une progression accélérée de la maladie du foie vers la cirrhose. L'identification de la fibrose sévère chez les patients infectés par le VHD chronique nécessitant un traitement urgent est cruciale. L'élastographie transitoire (ET) non invasive a transformé la prise en charge de l'infection chronique par les virus de l'hépatite B et C. Chez les patients atteints d'hépatite D chronique, la biopsie hépatique reste la procédure de référence pour la détermination du stade de fibrose. Le but de cette étude était d'évaluer les performances de l'ET (FibroScan) pour le diagnostic de la fibrose hépatique chez les patients infectés par le VHD. L'ET a été évaluée chez des patients VHD ARN-positifs avec biopsie hépatique (PBH) inclus dans une cohorte nationale. Les paramètres de la PBH et les tests de laboratoire ont été effectués dans les 6 mois précédent ou suivant l'ET. La fibrose hépatique a été évaluée en utilisant les stades METAVIR (F0-4). Les performances diagnostiques de l'ET dans l'identification de la cirrhose (F4), de la fibrose sévère (F3) et de la fibrose significative (F2) ont été comparées à celles des tests non invasifs de fibrose, tels que l'indice du rapport aspartate aminotransférase sur plaquettes (APRI), le score de fibrose-4 (FIB-4) et le score de fibrose Delta-4 (D4FS). L'AUC et les indices de Youden ont été utilisés pour établir de nouvelles valeurs seuils. Les données de 192 patients infectés par le VHD avec des mesures valides d'ET ont été analysées (66% d'hommes, âge médian de 35 [29-43] ans, IMC médian de 24,0 [21,6-27,3] kg/m²). La prévalence des stades de fibrose histologique était de 22,6% pour F0F1, 25,5% pour F2, 8,4% pour F3 et 33,5% pour F4. L'ET a démontré une excellente précision diagnostique pour la détection de la cirrhose avec un AUC de 0,87, comparé à celui d'APRI (0,72), FIB-4 (0,75) et D4FS (0,84) ($p =$

0,002). L'ET était également supérieure pour la détection de la fibrose sévère (AUROC de 0,84, contre 0,70 pour l'APRI et 0,74 pour le FIB-4 ($p = 0,002$). Les performances de l'ET n'étaient cependant pas meilleures pour la détection de la fibrose importante (AUROC de 0,78 contre 0,73 pour APRI et 0,70 pour FIB-4). A la valeur seuil optimisée de 11 kPa pour déterminer la cirrhose, l'ET a montré une sensibilité de 79%, une spécificité de 80%, une valeur prédictive positive (VPP) de 67% et une valeur prédictive négative (VPN) de 88%, 80% des patients étant correctement classés. À la valeur seuil optimisée de 9 kPa pour la détermination de la fibrose sévère, l'ET avait une sensibilité de 81%, une spécificité de 72 %, une VPP de 77% et une VPN de 77%, avec 77% de patients correctement classés. En résumé, sur la base de ces données provenant d'une grande cohorte de vie réelle, l'ET a une bonne performance diagnostique pour déterminer la fibrose et la cirrhose sévères chez les patients atteints d'une infection chronique par le VHD. La forte probabilité de fibrose sévère ou de cirrhose chez les patients avec LSM >9 kPa nécessite un traitement rapide et adapté. En cas de LSM <9kPa, une biopsie hépatique est recommandée. Des études supplémentaires évalueront la performance diagnostique supérieure potentielle de la combinaison de l'ET avec des biomarqueurs.

6.2 Liste des publications et communications de l'année 2022, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

(i) Publication Nationales

1. Brouard C, Parenton F, Hassani Y, Chevaliez S, Gordien E, Jean M, Bruyand M, Vaux S, Lot F, Ruello M pour le groupe Unono Wa Maore. Hépatites virales B, C et delta en population générale adulte vivant à Mayotte, enquête Unono Wa Maore 2018-2019. Bull Epidemiol Hebd 2022;(3-4):48-57.
2. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Virus de l'hépatite C. Référentiel en microbiologie médicale (Rémic), 7^{ème} édition ; Eds. Société Française de Microbiologie, 7^{ème} édition 2022 ; 88 :795-801.

(ii) Publications Internationales

1. Tran A, Shili-Masmoudi S, Moga L, Chevaliez S, Luciani A, Ruiz I, Ganne-Carrié N, Bureau C, Bourlière M, de Ledinghen V. Non-invasive diagnosis and follow-up of chronic infection with hepatitis C virus. Clin Res Hepatol Gastroenterol 2022;46(1):101771.
2. Leroy V, Chevaliez S, Decraecker M, Roulot D, Nana J, Asselah T, Causse X, Durantel D, Thibaut V, Ganne-Carrié N, Bureau C, de Ledinghen V, Boulière M. Non-invasive diagnosis and follow-up of chronic infection with hepatitis B virus. Clin Res Hepatol Gastroenterol 2022;46(1):101773.
3. Catlett B, Hajarizadeh B, Cunningham E, Wolfson-Stofko B, Wheeler A, Khandaker-Hussain B, Feld JJ, Martrò E, Chevaliez S, Pawlotsky JM, Bharat C, Cunningham PH, Dore GJ, Applegate T, Grebely J. Diagnostic accuracy of assays using point-of-care testing or dried blood spot samples for the determination of hepatitis C virus RNA: a systematic review. J Infect Dis 2022;226(6):1005-1021.
4. Howe AYM, Rodrigo C, Cunningham EB, Douglas MW, Dietz J, Grebely J, Popping S, Sfalain JA, Parczewski M, Sarrazin C, de Salazar A, Fuentes A, Sayan M, Quer J, Kjellin M, Kileng H, Mor O, Lennerstrand J, Fourati S, Di Maio VC, Chulnov V, Pawlotsky JM, Harrigan PR, Ceccherini-Silberstein F, Gracia F, SHARED Collaborators. Characteristics of hepatitis C virus resistance in an international cohort after a decade of direct-acting antivirals. JHEP Rep 2022;4(5):100462.
5. Ortonne V, Lucas Q, Garrigou O, Soulier A, Challine D, Pawlotsky JM, Leroy V, Chevaliez S. Alinity m, a random-access system, for hepatitis B virus DNA quantification in plasma and whole blood collected on dried blood spot. mSphere 2022;7(3):e0008222.
6. Brouard C, Parenton F, Youssouf H, Chevaliez S, Gordien E, Jean M, Bruyand M, Vaux S, Lot F, Ruello M, and Unono Wa Maore group. Hepatitis B, C and delta in the general population in Mayotte: hepatitis B as a major public health problem. BMC Infect Dis 2022;22(1):716.
7. Chevaliez S, Roudot-Thoraval F, Brouard C, Gordien E, Zoulim F, Brichler S, Brodard V, Pioche C, Pawlotsky JM, Leroy V and the Hepatology Reference Centers and Laboratories Network for chronic hepatitis B surveillance. Clinical and virological features of chronic hepatitis B in the French national surveillance program, 2008-2012: a cross-sectional study. JHEP Rep 2022;4(12):100593.
8. Matthews PC, Campbell C, Săndulescu O, Matičić M, Ruta SM, Rivero-Juárez A, van Welzen BJ, Tan BK, Garcia F, Gherlan GS, Çınar G, Hasanoğlu İ, Gmizić I, Nicolini LA, Santos L, Sargsyants N, Velikov P, Habibović S, Fourati S, Židovec-Lepej S, Herder V, Dudman S, Miron VD, Irving W, Şahin GÖ; and ESCMID Study Group for Viral Hepatitis (ESGVH). Acute severe hepatitis outbreak in children: a perfect storm. What do we know and what questions remain? Front Pharmacol 2022; 13: 1062408.
9. Gasmi I, Machou C, Rodrigues A, Brouillet A, Nguyen TC, Rousseau B, Guillot A, Rodriguez C, Demontant V, Ait-Ahmed Y, Calderaro J, Luciani A, Pawlotsky JM, Lafdil F. Interleukin-17 programs liver progenitor cell transformation into cancer stem

cells through miR-122 downregulation with increased risk of primary liver cancer initiation. *Int J Biol Sci* 2022;18(5):1944-1960.

10. Nguyen CT, Caruso S, Maillé P, Beaufrère A, Augustin J, Favre L, Pujals A, Boulagnon-Rombi C, Rhaïem R, Amaddeo G, Di Tommaso L, Luciani A, Regnault H, Brustia R, Scatton O, Charlotte F, Brocheriou I, Sommacale D, Soussan P, Leroy V, Laurent A, Le VK, Ta VT, Trinh HS, Tran TL, Gentien D, Rapinat A, Nault JC, Allaire M, Mulé S, Zucman-Rossi J, Pawlotsky JM, Tournigand C, Lafdil F, Paradis V, Calderaro J. Immune profiling of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma reveals distinct subtypes and activation of gene signatures predictive of response to immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2022; 28: 540-551.
11. Zeng Q, Klein C, Caruso S, Maille P, Laleh NG, Sommacale D, Laurent A, Amaddeo G, Gentien D, Rapinat A, Regnault H, Charpy C, Nguyen CT, Tournigand C, Brustia R, Pawlotsky JM, Kather JN, Maiuri MC, Loménie N, Calderaro J. Artificial intelligence predicts immune and inflammatory gene signatures directly from hepatocellular carcinoma histology. *J Hepatol* 2022; 77: 116-127.
12. Cappy P, Boizeau L, Candotti D, Caparros R, Lucas Q, Garrabé E, Martinaud C, LeCam S, Gallian P, Morel P, Pillonel J, Laperche S. Effectiveness of the HCV blood screening strategy through eighteen years of surveillance of HCV infection in blood donors in France. *Blood Transfusion* 2022;20(1):1-7.
13. Cappy P, Boizeau L, Candotti D, Le Cam S, Martinaud C, Pillonel J, Tribout M, Maugard C, Relave J, Richard P, Morel P, Laperche S. Insights on 21 Years of HBV Surveillance in Blood Donors in France. *Viruses* 2022;14,:507.
14. Deng X, Guo X, Gu H, Wang D, Laperche S, Allain JP, Zang L, Candotti D. Anti-HBc non-reactive occult hepatitis B infections with genotypes B and C in vaccinated immunocompetent adults. *J Viral Hepat* 2022;29:958-967.
15. Deng X, Guo X, Li T, Laperche S, Zang L, Candotti D. Alternative hepatitis B virus DNA confirmatory algorithm identified occult hepatitis B virus infection in Chinese blood donors with non-discriminatory nucleic acid testing. *Blood Transfus* 2022;20(1):8-17.
16. Candotti D. Viruses Special Issue "Transfusion-Transmitted Viral Infections". *Viruses* 2022;15(1):86.
17. Deng X, Zang L, Candotti D. Re-Entry Evaluation of Chinese Blood Donors with Unconfirmed Hepatitis B Screening Results. *Viruses* 2022;14(11):2545.
18. Lampertico P; Roulot D; Wedemeyer H. Bulevirtide with or without pegIFN for patients with compensated chronic hepatitis delta: from clinical trials to real-world studies. *J Hep* 2022; 77:1422-1430.

(iii) Communications nationales

1. Brichler, S; Roulot, D; Dziri, S; Gerber, A; Le Gal, F; Delagreverie, H; Alloui, C; Gordien, E. Test sérologique VHD réflexe chez les patients infectés par le VHB et impact sur la cascade de dépistage du VHD : retour sur 10 années d'expérience en centre expert. Journées de l'Association Française d'Étude du Foie, Dijon, 4-6 octobre 2022.
2. Gerber, A; Brichler, S; Gordien, E; Le Gal, F. Performances du diagnostic virologique de l'infection par le VHD en France : retour sur 10 années de contrôle qualité. Journées de l'Association Française d'Étude du Foie, Dijon, 4-6 octobre 2022.

(iv) Conférences sur invitation

Stéphane Chevaliez

1. "Élimination des hépatites virales et nouveaux outils virologiques : le point de vue du virologue. Symposium Gilead, Journée d'Hépatologie, EPU de l'Université de Paris, Paris, 30 avril 2022.
2. "Les décisions complexes en RCP (Virus B, C, D)". Collégium des Hépatologues de l'Est Parisien, Paris, 7 juin 2022.

Jean-Michel Pawlotsky

1. "The importance of the primary care physician in the management of patients with hepatitis C virus". Medscape educational online program, 8 avril 2022.
2. "Impact of the COVID-19 pandemic on HCV elimination". 108th National Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology (JSGE), Tokyo (Japan), 21-23 avril 2022.
3. "ILC2022 Wrap-up: Viral hepatitis". International Liver Congress 2022, Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), London (UK), 22-26 juin 2022.
4. "Keeping viral hepatitis at the top of the agenda". International Hepatology Exchange 2022, Brussels (Belgium), 30 septembre-1er octobre 2022.
5. "Les hépatites virales en 2022 : quels enjeux ? Quel futur ?". CHEP 2022, Paris, 7 juin 2022.

Emmanuel Gordien

1. "Diagnostic et suivi virologique de l'infection par le virus de l'hépatite delta". 42^{ème} Congrès RICAI, Paris, 12 décembre 2022.

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

Sans objet.

8. Programme d'activité pour les années suivantes

Le CNR des Virus d'Hépatites B, C et delta (laboratoires coordonnateur et associé) poursuivra en étroite collaboration avec l'ensemble des industriels du diagnostic l'évaluation des nouvelles techniques sérologiques ou moléculaires standardisées d'étude des marqueurs d'infection par le VHB, VHC et le VHD. Pour cela seront utilisés les parcs d'automates et les collections d'échantillons biologiques (plasma, sérum et spot de sang séché).

Évaluation des performances de la plate-forme NeuMoDx™ Molecular Systems et des trousse NeuMoDx HBV Quant Assay et NeuMoDx HCV Quant Assay pour la détection et la quantification de l'ADN du VHB et de l'ARN du VHC. Des techniques sensibles d'amplification des acides nucléiques sont désormais recommandées par les sociétés savantes pour la détection et la quantification de l'ADN du VHB et de l'ARN du VHC. La firme QIAGEN met à disposition une nouvelle plate-forme de PCR en temps réel qui est plus rapide (<1,5 heures) et offre une flexibilité supplémentaire avec un traitement aléatoire des échantillons. Les performances de la plate-forme de PCR en temps réel NeuMoDx Molecular Systems (QIAGEN) seront évaluées pour la quantification de l'ADN du VHB et de l'ARN du VHC dans un contexte clinique à partir d'échantillons biologiques (plasma, sérum) collectés chez des patients infectés par les différents génotypes du VHB et du VHC, traités ou non par antiviraux directs. Ceci permettra d'évaluer l'influence des génotypes sur la capacité des trousse à détecter et à quantifier les acides nucléiques d'une part, et de mesurer les cinétiques virales sous traitement d'autre part.

Évaluation de l'intérêt clinique des nouveaux marqueurs de l'hépatite B (HBcrAg et ARN du VHB). A côté des marqueurs classiques de l'hépatite B (AgHBs, AgHBe, anti-HBc, anti-HBs, ADN VHB), de nouveaux marqueurs sont désormais disponibles ; il s'agit de l'antigène du VHB lié au core (HBcrAg) et de l'ARN du VHB. L'HBcrAg est facilement quantifiable à l'aide d'une trousse immunologique (Lumipulse® G HBcrAg, Fujirebio Inc.). Des études récentes suggèrent que ce marqueur permettrait de diagnostiquer différents niveaux de charges virales B (2000, 20 000 et 200 000 UI/mL) ayant un intérêt dans la prise en charge thérapeutique et dans la prévention de la transmission mère-enfant du VHB (PTME). L'ARN du VHB est un marqueur moléculaire qui reflète l'activité transcriptionnelle du cccDNA. Ce marqueur est détectable et quantifiable à l'aide de trousse "maison" ou standardisées (Abbott sur le m2000). La cinétique de l'ARN du VHB pourrait être un marqueur de la réponse au traitement, en particulier pour prédire le risque de rechute après arrêt des traitements par analogues nucléos(t)idiques (AN). A partir de cohortes longitudinales de patients infectés par le VHB ($\pm$ VHD $\pm$ VIH, en lien étroit avec les services d'Hépatologie et d'Immunologie Clinique), traités ou non par AN, les cinétiques des marqueurs seront évaluées. 439 patients, majoritairement des hommes (65,1%), âgés en moyenne de 47 ans et majoritairement nés dans un pays de moyenne ou forte endémicité pour l'hépatite B (82%) ont été inclus. Environ la moitié des patients (52%) recevait un traitement [tenofovir (54%), entecavir (43%) ou interféron pégylé (0,9%)] La répartition des génotypes était la suivante : 12,6% de génotype A, 1,3% de génotype B, 5,1% de génotype C, 19% de génotype D, et 62% de génotype de E.

Évaluation de la détection et de la quantification des marqueurs AgHBe et HBcrAg à partir de spots de sang séché. L'antigène HBe et l'HBcrAg sont des marqueurs indirects de la réplication virale, et de ce fait constituent des alternatives à la détection de l'ADN du VHB en particulier pour les pays ne disposant pas de laboratoire de biologie médicale ou n'ayant pas accès aux technologies de biologie moléculaire. Une étude récente a montré que l'HBcrAg est détectable à partir de sang total collecté sur DBS (Shimakawa *et al.*, J Viral Hepat 2021 ;28(5) :837-843). Les performances de ces marqueurs à partir de sang total déposé sur DBS ou de sang total reconstitué à partir de culot globulaire (groupe O, hémocrite 45%) seront évaluées.

Développement et évaluation d'un test d'infection récente pour l'hépatite C. L'avidité des anticorps est la capacité de liaison des anticorps matures à leurs antigènes, qui augmente au cours du temps. Un agent chimique (urée, diéthylamine) est capable de dissocier certaines de ces liaisons, en particulier des anticorps peu matures. L'index d'avidité peut alors être mesuré à partir d'une technique immunologique modifiée en microplaque en comparant les densités optiques (DO) d'échantillons traités par un agent dissociant et des échantillons non traités. Les anticorps synthétisés précocement au cours de l'infection ont une capacité faible à lier leurs antigènes, contrairement aux anticorps matures présents plus tardivement au cours de l'infection. Nous souhaitons développer et évaluer l'index d'avidité afin de différencier à l'aide d'une méthode simple les infections récentes des infections anciennes. Ceci pourra avoir un intérêt afin de différencier les réinfections des rechutes tardives après échec des AAD d'une part et d'autre part de documenter les infections aiguës ou récentes qui restent à l'heure actuelle difficiles à diagnostiquer sur le plan virologique en dehors d'un contexte de séroconversion.

Évaluation des performances d'un test rapide pour la détection des anticorps delta au Burkina Faso. Un test rapide d'orientation diagnostique a été développé par l'équipe de Stefan Urban en Allemagne. Une validation de ce test rapide avait été réalisée au sein du CNR associé. Un accord de partenariat a été finalisé avec une firme pour un développement et une fabrication industrielle de ce test. Une validation en "vraie vie" a été ajoutée au projet d'évaluation du TROD VIH/VHB/VHC de Biosynex qui a débuté en 2021.

Évaluation des trousse moléculaires pour la détection et la quantification de l'ARN du VHD. En analysant les résultats des différents participants aux contrôles de qualité nationaux (CNQ-VHD) successifs organisés par le laboratoire associé, nous avons mis en évidence un certain degré de variabilité des résultats. Cela est en partie dû à l'utilisation par les laboratoires de trousse différentes de RT-qPCR (Eurobio, Altona, test maison), mais on note aussi une certaine variabilité pour des laboratoires utilisant la même trousse commerciale de RT-qPCR (EurobioPlex EBX-004). Nous pensons que cette variabilité est liée à tous les éléments variables du « pipeline » de l'analyse : nature de l'extracteur, volume d'échantillon extrait et volume de l'éluat, choix du thermocycleur, dextérité technique du personnel, analyse des résultats par les logiciels. Nous allons explorer cette question dans 2 directions :

- . Comparaison de pipelines complets tels que préconisés par les différents fournisseurs (dispositif d'extraction - kit RT-qPCR - thermocycleur), en utilisant à chaque fois un panel de 24 échantillons de plasma de différentes charges virales et génotypes, constitué par notre équipe, et pour lequel de nombreux aliquotes de 1mL chacun ont été conservés à -80°C.

- . Comparaison des extracteurs d'acides nucléiques présents dans les laboratoires de virologie, avec la même trousse d'amplification (EurobioPlex EBX-071 sur un thermocycleur CFX96).

Évaluation des techniques de NGS pour le séquençage complet du VHD. Le génome du virus de l'hépatite delta présente des particularités (structure pseudo-double brin, fort taux d'appariement, diversité génétique) qui compliquent l'obtention d'une séquence complète fiable. Les problèmes sont à la fois techniques et bio-informatiques. Jusqu'à aujourd'hui les études de caractérisation du génome complet des souches analysées se faisaient par des techniques utilisant le séquençage de type Sanger. L'avènement des nouvelles technologies de séquençage (NGS) permet d'envisager des procédés plus simples et surtout l'exploration des quasi-espèces virales et des mutations minoritaires au sein d'un même échantillon. Ce projet a pour objectif de comparer 4 techniques de séquençage du VHD à partir d'échantillons de la collection du CNR associé pour l'hépatite delta au CHU Avicenne afin de déterminer celle la plus adaptée pour l'analyse de la variabilité et des mutations, à partir d'un panel de 98 échantillons ARN-VHD positifs selon les critères suivants :

- . Sensibilité de réalisation en fonction de la charge virale VHD
- . Qualité de la séquence obtenue
- . Taux de couverture du génome
- . Sensibilité de détection des mutations (profondeur de l'analyse)
- . Facilité du process
- . Coût

Les techniques suivantes seront comparées :

- . Technique Sanger : Extraction des acides nucléiques + Amplification par RT-PCR de 4 régions chevauchantes du génome viral + Séquençage des 2 brins en Sanger + Analyse bio-Informatique
- . Technique métagénomique shotgun NGS : Extraction des acides nucléiques + Fragmentation + Séquençage direct Short Reads de l'ensemble des AN par NGS (Illumina) + Analyse bio-Informatique
- . Technique Short Reads-Amplicon : Extraction des acides nucléiques + Amplification par RT-PCR de l'ensemble du génome viral + Fragmentation + Séquençage Short Reads par NGS (Illumina) + Analyse bio-Informatique
- . Technique Long Reads-Amplicon : Extraction des acides nucléiques + Amplification par RT-PCR de l'ensemble du génome viral + Séquençage Short Long génome complet par NGS (Nanopore) + Analyse bio-Informatique

Grâce aux résultats que nous espérons obtenir, nous pourrions communiquer à l'ensemble de la communauté scientifique la technologie la plus adaptée pour séquencer le plus facilement et avec le plus d'information possible le génome complet du VHD. Cette technologie pourra ainsi être utilisée pour toutes les applications et études qui nécessitent des données génétiques sur ce virus : polymorphismes, génotypes, sous génotypes, mutants, mutations de résistance, évolution génétique

Le CNR des Virus d'Hépatites B, C et delta (laboratoires coordonnateur et associé) poursuivra en étroite collaboration avec SpF, la FPRH, l'AFEF et les laboratoires du réseau de Virologie et Pharmacologie médicale de l'ANRS-MIE les enquêtes ou études concourant à la surveillance épidémiologique.

Caractéristiques cliniques et virologiques des patients nouvellement pris en charge pour leur hépatite chronique B (et delta) dans un Centre Expert de la FPRH. L'objectif principal de cette étude sera de décrire les caractéristiques épidémiologiques, cliniques, histologiques, biochimiques et virologiques des personnes nouvellement prises en charge pour une hépatite chronique B ($\pm$ delta) à travers les Centres Experts de la FPRH et de les comparer à celles de la précédente enquête réalisée en 2008-2012 (Chevaliez *et al.*, JHEP Rep 2022;4(12):100593). Elle contribuera à l'évaluation des politiques publiques mises en place depuis la dernière enquête et d'envisager les axes d'amélioration. Cette enquête débutera en 2024, suite aux travaux préparatoires : (i) Recrutement d'un Attaché de Recherche Clinique pour la mise en place et le suivi de cette étude nationale. Meriem Harrabi rejoindra le CNR au mois de juillet 2023. De formation scientifique (PhD), Meriem Harrabi a une expérience en recherche clinique ; elle a assuré le suivi du protocole CYCLOVID qui évaluait l'efficacité et la tolérance de l'alisporivir chez des patients hospitalisés pour une COVID-19 (étude de phase 2, randomisée, ouvert). (ii) Restructuration du réseau de laboratoires de virologie médicale de l'ANRS-MIE en janvier 2023. Un réseau de 25 laboratoires répartis sur le territoire national a été identifié avec dans chaque laboratoire au moins un virologue médical identifié. L'étude ainsi que ces objectifs a fait l'objet d'une présentation lors de la réunion plénière de du réseau de laboratoires de virologie de l'ANRS-MIE le 26 juin 2023.

Dépistage des hépatites B et C (et du VIH) dans le service d'accueil des urgences au CHU d'Henri Mondor. Le dépistage des hépatites virales est basé sur des facteurs de risque (dépistage ciblé) bien que la société savante d'Hépatologie (AFEH) recommande un dépistage systématique combiné des 3 virus (VIH, VHB et VHC) chez les hommes de 18 à 60 ans au moins une fois dans l'existence et chez les femmes lors d'une grossesse et/ou de la première consultation prénatale. Le Val-de-Marne (300 000 personnes issues de l'immigration avec 40% en provenance d'Afrique et un taux de précarité élevé) est un territoire où la prévalence de ces infections pourrait être plus élevée que dans d'autres territoires. Une expérience similaire réalisée au service des urgences de Bichat entre juin 2018 et juin 2020 a été réalisée : 3 000 sujets dépistés parmi les 185 000 consultants aux urgences. La prévalence du VHB, VHC et du VIH était de respectivement 3,1%, 3,3% et 2,7%. Les nouveaux cas dépistés pour chacun des 3 virus représentaient respectivement 69,4%, 59% et 58%, soient 59 sujets nouvellement diagnostiqués pour le VHB, 58 pour le VHC et 47 pour le VIH. Les sujets VHB nouvellement diagnostiqués étaient tous originaires d'Afrique, de l'Europe de l'Est ou d'Amérique du Sud. 8 sujets (13,6%) étaient coinfectés par le VHD et 3 avaient un ARN VHD positif. Parmi les sujets nouvellement diagnostiqués pour le VHC, près de la moitié des patients avaient une maladie hépatique sévère (fibrose F3 ou F4), tous étaient répliquants et ont initié un traitement par AAD. Le taux de guérison virologique était de 100% (RVS12). L'objectif principal de cette étude sera d'évaluer l'efficacité d'une stratégie de dépistage systématique des hépatites B et C et du VIH des consultants aux urgences de l'hôpital Henri Mondor sur la prise en charge des sujets nouvellement diagnostiqués avec la mise en place d'un parcours de soins spécialisé. Les principaux objectifs secondaires seront : (i) estimer la prévalence du VHB, VHC et du VIH, (ii) décrire les caractéristiques démographiques et cliniques des patients nouvellement dépistés, (iii) évaluer le nombre de patients dépistés mais non pris en charge, (iv) évaluer la cascade de soins des patients pris en charge, (v) évaluer le taux de dépistage secondaire (entourage familial, partenaires, ...), et (vi) évaluer la satisfaction des patients pris en charge aux urgences. Tout consultant aux urgences (>18 ans, non opposition) bilanté (i.e., bénéficiant déjà d'un prélèvement sanguin) ou non (un prélèvement de sang total avec dépôt sur buvard sera alors proposé) sera éligible et se verra proposer un dépistage systématique des 3 virus. Pour les sujets bilantés, un tube supplémentaire de sang prélevé sur EDTA sera collecté ; des spots de sang (50-70 μ L) seront réalisés en parallèle sur buvard. Ceci permettra également d'évaluer les seuils d'interprétation des tests immunologiques pour la détection des anticorps VHC, de l'AgHBs et des anticorps VIH, et ce à partir d'une population de faible-moyenne prévalence pour ces infections. Cette étude impliquera les équipes des services des Urgences, d'Hépatologie, d'Infectiologie et de Virologie du GH Henri Mondor.

Dépistage des hépatites B et C (et du VIH) dans la population cristolienne. Si le dépistage de l'infection par le VIH est recommandé chez tous les adultes au moins une fois dans l'existence (hors risque d'exposition à un risque de contamination), ce n'est hélas pas le cas pour les virus des hépatites B et C. Néanmoins, l'élargissement de la stratégie de dépistage en combinant les 3 virus (VHB, VHC et VIH) aux adultes, âgés de plus de 40 ans n'ayant pas été testés auparavant est recommandé par la société française d'hépatologie (AFEH) si l'on veut envisager l'élimination des virus d'hépatites B et C. Agir au niveau du territoire semble être actuellement l'échelon le plus pertinent. Il permet d'agir directement sur le terrain de façon efficace comme cela a été démontré dans de nombreuses villes ou agglomérations qui ont avec succès expérimenté cette approche. La proportion d'individus méconnaissant leur statut est importante (82.5% dans le cas de l'hépatite B et de 19% dans le cas de l'hépatite C au niveau national d'après les données de l'enquête Baromètre Santé 2016) et le nombre de sujets restant à dépister s'élève à plusieurs dizaines de milliers en Ile-de-France. L'objectif de cette étude est d'améliorer le recours au dépistage des infections par le VHB, le VHC et le VIH dans la population cristolienne et de proposer aux sujets nouvellement dépistés une prise en charge rapide et

efficace grâce à un parcours simplifié. Elle impliquera fortement un réseau de médecins généralistes (MG) et sera proposée à tous les habitants de Créteil >40 ans non connu comme infectés par l'un des 3 virus et sans dépistage documenté dans l'année précédente. Des trousse d'auto-prélèvement buvard seront remises par les MG, qui colligeront pour chaque participant un certain nombre d'informations socio-démographiques et cliniques. Le prélèvement sera réalisé au domicile par le patient et envoyé par voie postale au laboratoire de virologie du GH Henri Mondor. Cette étude sera réalisée en partenariat avec l'ARS Ile-de-France et la mairie de Créteil.

Cartographie des génotypes du VHC. L'étude du Gemhep (Groupe Français d'Études Moléculaire des Hépatites) réalisée en 2015-2016 auprès de 9 hôpitaux avait inclus 584 patients naïfs de traitement avec un score de fibrose F0-F2. La distribution des génotypes était la suivante : 60,4% de génotype 1, 8,6% de génotype 2, 14,9% de génotype 3, 13,7% de génotype 4, 1,7% de génotype 5, 0,5% de génotype 6 et 0,2% de souches recombinantes 2k/1b (Semenova *et al.*, *Epidemiol Infect* 2019;147:e234). Ces résultats confirmaient les résultats de la méta-analyse publiée en 2019 (Petruzziello *et al.*, *J Clin Lab Anal* 2019;33(5):e22876), avec néanmoins des différences en ce qui concerne les proportions de patients infectés par les génotypes 3 et 4. La mobilisation des laboratoires du réseau de virologie de l'ANRS-MIE permettra d'évaluer la distribution des génotypes VHC et de comparer les résultats avec la précédente études qui date depuis plus de plus 9 ans (petit nombre de laboratoires impliqués, 9 au total), qui s'adressait uniquement aux patients avec un score de fibrose F0-F2 et qui ne renseignait pas systématiquement le sous-type. Cette étude permettrait également d'évaluer la proportion de sujets infectés par des génotypes "non usuels" grâce à la disponibilité des nouvelles techniques de séquençage (séquençage haut débit) adaptée à la détermination correcte des génotypes et sous-types. En effet, plusieurs études ont montré que les patients infectés par des génotypes "non usuels" avaient un taux de réponse au traitement par AAD plus faibles que ceux infectés par des génotypes classiques (1a, 1b, 2a, 4a, 4d, etc...) (Fourati *et al.*, *Hepatology* 2019;69(2):513-523; Pawlotsky JM, *J Hepatol* 2019;71(6):1070-1072).

Caractérisation de la résistance naturelle aux AAD du VHC en Afrique et en Asie du Sud-est (HCVResiS study). L'utilisation des antiviraux à action directe (AAD) aujourd'hui disponibles permet d'obtenir des taux de guérison ≥95%. Cependant, les données d'efficacité et de tolérance disponibles proviennent majoritairement d'études conduites dans les pays du "Nord", tandis que très peu d'études ont été réalisées dans les pays d'Asie ou d'Afrique Subsaharienne où circulent une proportion plus élevée de génotypes non usuels (1l, 4r et 3b). Ces génotypes sont caractérisés par la présence de polymorphismes naturels qui entraînent une diminution de sensibilité aux AAD, y compris de dernière génération. L'objectif principal de cette étude sera de caractériser les polymorphismes naturels de souches VHC circulant dans différentes régions d'Afrique et d'Asie du Sud-Est et d'évaluer leur impact sur les niveaux de sensibilité aux AAD, à l'aide d'approches originales innovantes de séquençage des génomes viraux par métagénomique et d'analyse bio-informatique des données de séquences combinées à une caractérisation phénotypique permettant la mesure du niveau de résistance primaire des souches circulantes. Les objectifs secondaires seront d'étudier par analyse phylogénique les génomes viraux séquencés en intégralité qui circulent dans ces régions afin d'identifier de nouveaux génotypes et/ou sous-types non décrits à ce jour, et d'identifier et de mesurer le niveau de résistance conféré par les polymorphismes naturels sur les gènes cibles (*NS3*, *NS5A* et/ou *NS5B*) présents au sein des quasi-espèces virales avant traitement. L'étude sera réalisée à partir d'une cohorte de 300 patients infectés par le VHC (incluant 100 patients provenant de chacun des sites suivants : Mali et Gabon en Afrique ; Thaïlande en Asie du Sud-Est) pour lesquels des prélèvements sanguins avant traitement sont disponibles. Cette étude se fera en partenariat avec l'ANRS-MIE.

Évaluation de la prévalence et caractérisation moléculaire des souches de VHD dans différents pays (Asie, Amérique du Sud, Afrique). En Asie, peu de données récentes existent concernant le VHD. Par exemple l'Indonésie, plus grand pays d'Asie du Sud-Est, a été classé comme pays d'endémie intermédiaire à élevée pour l'hépatite B et cette maladie est devenue officiellement un problème majeur de santé publique. Cependant la dernière mise à jour date de 2013. Dans ce pays, les données VHD sont anciennes et surtout très localisées sur une certaine partie de ce vaste pays. Notre objectif sera de déterminer la prévalence de l'hépatite delta dans l'ensemble de l'archipel indonésien à partir de patients AgHBs positifs, et de comparer les patients monoinfectés par le VHB et les coinfectés par le VHB/VHD. L'objectif secondaire sera de caractériser les souches VHB et VHD qui circulent dans tout le pays. Un contact a été établi avec l'Association Peduli Hati Bangsa et les centres hospitaliers d'hépatologie de 34 provinces d'Indonésie afin de collecter des échantillons de sérum de volontaires. Si possible, ces prélèvements seront associés à un questionnaire épidémiologique. Ce projet sera soumis et examiné par le comité d'éthique local du ministère de la santé. L'anonymisation des données garantira la confidentialité des volontaires. Nous espérons que cette étude permettra une mise à jour des informations concernant les infections par le VHB et le VHD dans l'archipel indonésien, ainsi que la cartographie de la propagation des deux virus sur le territoire indonésien en relation avec les souches

trouvées en Asie du Sud, en Australie et dans les îles du Pacifique.

En Amérique du Sud, le CNR-delta a initié une collaboration avec le Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (MSPBS - Paraguay) afin de réaliser une évaluation de la prévalence et de l'épidémiologie moléculaire du VHD à travers le territoire du Paraguay. En effet, alors que le VHD semble être très répandu dans la région amazonienne (Brésil et Bolivie), aucune étude n'a encore été publiée au Paraguay. Ainsi il est prévu de recueillir un minimum de 40 échantillons HBsAg-positifs par site représentant toutes les régions politiques, échantillons prélevés chez les donneurs de sang et/ou les patients consultant à l'hôpital. D'autre part, des échantillons positifs pour l'AgHBs sélectionnés de manière rétrospective seront utilisés à partir des 8 principaux sites des centres de donneurs de sang : Boquerón, Amambay, Concepción, Ñeembucu, Itapúa, Alto Paraná, Caaguazú, Central. Après prélèvement et stockage à -30°C (1ml de plasma), les échantillons seront acheminés sous carboglace au CNR-delta pour toutes les analyses de sérologie et de biologie moléculaire VHD.

D'autre part, le CNR-delta s'intéresse à la partie nord de la forêt amazonienne du fait, d'une part d'une prévalence élevée de l'infection par le VHD, d'autre part de la présence endémique des souches VHD de génotype 3. Un travail collaboratif préliminaire avec une équipe du Brésil vient d'être initié pour à la fois le transfert d'expertise du CNR-delta mais aussi la possibilité de réaliser des analyses sérologiques et de biologie moléculaire sur des échantillons prélevés au sein de territoires reculés d'Amazonie. Cette étude sera complétée par le projet lancé par SpF et le CNR coordonnateur sur l'épidémiologie VHC, VHB et VHD en Guyane le long du fleuve Maroni.

Au Sénégal, une collaboration a été montée avec l'équipe de Gilles Wandeler en Suisse. Celui-ci dispose d'une collection de 580 échantillons sur DBS de patients AgHBs+. Il s'agira de déterminer la prévalence de l'infection VHD (sérologie, charge virale) et l'épidémiologie moléculaire (génotype).

1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR et de son laboratoire associé

Le Centre National de Référence (CNR) des virus des hépatites B, C et delta est localisé au sein du Département "Prévention, Diagnostic et Traitement des infections" des hôpitaux universitaires Henri Mondor à Créteil (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris) depuis 2006. Il est constitué d'un CNR coordonnateur (Responsable scientifique à partir de 2023 : Stéphane Chevaliez) et d'un laboratoire associé en charge de l'hépatite delta (Responsable à partir de 2023 : Ségolène Brichler). Le laboratoire associé est le laboratoire de Microbiologie Clinique des hôpitaux universitaires Paris-Seine-Saint-Denis, localisé à l'hôpital d'Avicenne à Bobigny.

Cette structure permet au CNR de répondre à l'ensemble des missions définies par le décret n°2016-806 du 16 juin 2016 relatif aux Centres Nationaux de Référence pour la lutte contre les maladies transmissibles et par l'arrêté de mars 2022 fixant le cahier des charges des centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles en s'articulant autour de 4 axes majeurs :

1. Expertise microbiologique
2. Conseil
3. Contribution à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'agence nationale de santé publique
4. Contribution à l'alerte

1. Le développement, la standardisation et l'évaluation des performances analytiques et cliniques, des indications des tests et des nouvelles technologies virologiques à visée diagnostique et de suivi thérapeutique des hépatites virales fait l'objet de nombreuses études.

Le développement et la validation de tests de dépistage rapides (TROD) sur des matrices non conventionnelles (sang total capillaire, salive) ou de supports spécifiques permettant le recueil de sang total capillaire (papier filtre, micro-prélèvement volumétriques) utilisés comme alternative au prélèvement veineux seront poursuivis et amplifiés, en particulier pour le virus delta. Ces tests ont un intérêt tout particulier vis-à-vis de populations marginalisées sans accès aux structures de soins classiques, et un intérêt majeur dans les pays à ressources limitées afin non seulement de dépister les populations éloignées géographiquement des structures de soins mais également de tester les infections transmissibles par les produits sanguins.

Une des missions importantes du CNR concernera le typage moléculaire des souches d'hépatites B, C et delta à l'aide d'analyses phylogéniques. Le développement de la biologie moléculaire au cours de la dernière décennie, avec en particulier le développement des méthodes de séquençage à haut débit de nouvelle génération (plate-forme "GENOBIOMICS") regroupant les dernières technologies et des approches bio-informatiques (metaMIC) est implantée au cœur des locaux de l'hôpital Henri Mondor, le laboratoire associé disposant également de séquenceurs haut débit, permet d'investiguer des situations complexes d'intérêt médical et scientifique. Ces nouvelles technologies sont mises à profit dans les études de cas isolés, cas groupés, épidémies, auxquelles les CNR sont régulièrement confrontés.

La détection et l'investigation virologique de "nouveaux agents viraux" potentiellement impliqués dans la survenue d'hépatites chez l'homme reste d'actualité, et ce avec les cas d'hépatites aiguës sévères pédiatriques d'étiologie inconnue observées dans plusieurs pays européens dont le Royaume-Uni ou l'identification par métagénomique shogun au sein du laboratoire d'un nouveau virus chez une femme immunodéprimée (doublement transplantée cœur-poumons) souffrant d'une hépatite aiguë sévère de cause indéterminée (Rodriguez *et al.*, Emerg Infect Dis 2023;29(5):1051-54).

L'étude de la résistance des virus d'hépatites aux antiviraux à action directe se fait en étroite collaboration avec le réseau de laboratoire de l'AC43 (ANRS-MIE) à travers la caractérisation de la résistance primaire du VHC aux antiviraux directs de souches circulant en Afrique (Mali et Gabon) et en Asie du Sud-Est (Thaïlande) (étude HCVResiS). L'expertise microbiologique en sécurité transfusionnelle et des dons d'organes, qui recouvre notamment l'évaluation des réactifs de dépistage et de confirmation, la collecte d'échantillons via l'EFS et le CTSA et la surveillance des donneurs de sang sera assurée par le laboratoire coordonnateur. Ce dernier abrite en effet le laboratoire Central de Qualification Virologique des Organes, Tissus et Cellules de l'AP-HP (Responsable : Dr Dominique Challine), qui couvre un large territoire allant de l'Ile-de-France à la région Centre-Val de Loire et la Normandie ainsi que les Antilles

françaises, ainsi que le CNR des Risques Infectieux Transfusionnels (RIT) depuis avril 2021. L'activité d'expertise du CNR RIT dans le domaine de hépatites virales se poursuivra malgré la suppression de ce dernier.

L'évaluation du risque de transmission après accident d'exposition au sang dans le cadre d'un milieu de soins ou autre sera assurée par le CNR des virus des hépatites B, C et delta, dans le cadre des activités diagnostiques.

2. Une prestation de conseil dans les domaines couvrant largement le champ des hépatites virales sera réalisée [chimiothérapie anti-infectieuse (antiviraux), risques de transmission, méthodes de dépistage, diagnostic et typage, stratégies de traitement, etc...] auprès des professionnels ou instances de santé qui en font la demande auprès de l'un des laboratoires du CNR des virus des hépatites B, C et delta.

3. La surveillance des types viraux en France et la détection des virus mutants émergents susceptibles de poser des difficultés diagnostiques, de prise en charge thérapeutique ou d'échappement à la vaccination (pour le VHB) seront assurées conjointement par les 2 laboratoires dans leurs domaines de compétences respectives. Cette surveillance épidémiologique bénéficiera de l'expertise de participants extérieurs au CNR ; on pourra citer le réseau de laboratoires de virologie médicale de l'AC43 de l'ANRS-MIE, en particulier pour la surveillance des types viraux circulants et la surveillance de la résistance aux antiviraux directs pour l'hépatite B, C et delta. La surveillance des types viraux permet ainsi de mieux renseigner la prévalence et/ou l'incidence des hépatites B, C et delta (ainsi que celle du VIH avec un dépistage systématique des 3 virus) au sein de différentes populations [population consultant le Service d'Accueil des Urgences de l'hôpital Henri Mondor, population générale âgée >45 ans habitant Créteil en lien avec la médecine générale, incidence de la surinfection du virus delta dans 2 cohortes longitudinales de porteurs chroniques de l'AghBs (France et Gambie), prévalence du VHB, VHC (et du VIH) dans la population générale à travers le volet biologique BaroTest de la neuvième vague des Baromètres Santé] ou dans certaines régions (Guyane) dans le cadre des projets de micro-élimination de l'hépatite C,. Des études visant à la cartographie des types circulant pour le VHC mais également pour le VHB en partenariat avec le réseau des laboratoires de l'AC43 seront prochainement mises en place. Elles permettront entre autres de comparer l'évolution des types circulant en France par rapport aux études antérieures.

4. Les deux laboratoires qui constituent le CNR des virus des hépatites B, C et delta contribuent et contribueront à l'alerte en signalant à l'agence nationale de santé publique tout événement sanitaire inhabituel (suspicion de cas groupés, émergence d'une souche particulière, forme cliniques inhabituelles, ...).

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Personnels dévolus dans les activités du CNR coordonnateur :

	Qualification	ETP	Organisme payeur
Jean-Michel PAWLOTSKY	PU-PH	0,1	UPEC/APHP
Stéphane CHEVALIEZ	PU-PH	0,5	UPEC/APHP
Slim FOURATI	PU-PH	0,2	UPEC/APHP
Christophe RODRIGUEZ	PU-PH	0,2	UPEC/APHP
Magali BOUVIER-ALIAS	PH	0,2	APHP
Dominique CHALLINE	PH	0,2	APHP
Pierre CAPPY	PH	0,5	APHP
Valérie ORTONNE	Technicienne	1,0	APHP
Olivia GARRIGOU	Technicienne	1,0	APHP
Quentin LUCAS	Technicien	1,0	APHP
Delphine ROSSE	Technicienne	1,0	APHP
Laurent SKOPINSKI	CMT	0,1	APHP
Laurence LEDIT	Assistante	0,1	APHP
12 ETP techniciens			APHP

Personnels dévolus dans les activités du laboratoire associé delta :

	Qualification	ETP	Organisme payeur
Ségolène BRICHLER	MCU-PH	0,3	Paris 13/ APHP
Emmanuel GORDIEN	MCU-PH	0,2	Paris 13/ APHP
Etienne CARBONNELLE	PU-PH	0,1	Paris 13/ APHP
Frédéric LE GAL	Ingénieur	0,5	APHP
Alloui Chakib	PH	0,2	APHP
Athenaïs Gerber	Ingénieur	1	Dotation CNR
Samira Dziri	Technicienne	0,3	APHP
Valérian Delagarde	Technicienne	1	Dotation CNR
A recruter	Technicienne	0,5	Dotation CNR
Franck Dupont	Cadre	0,1	APHP
Catherine Arras	Secrétaire	0,2	APHP
Dominique Roulot	PU-PH, Hépatologue	0,2	Paris 13/ APHP
7 ETP techniciens			APHP

1.3 Locaux et équipements

Le laboratoire hospitalo-universitaire de Virologie du Département “Prévention, Diagnostic, Traitement des infections” occupe 430 m² de laboratoire, 105 m² de bureau, 175 m² de surface d'accueil, laverie et réserves, bibliothèque (certains locaux sont communs avec le laboratoire de Bactériologie-Hygiène et la plate-forme de séquençage de nouvelle génération “GENOBIOMICS”) ; 30 m² sont réservés à la garde de nuit (**Figure 1**). Le laboratoire fonctionne 24 heures sur 24 et 7 jours sur 7. Le CNR bénéficie d'une plate-forme automatisée de sérologies, ainsi qu'une plate-forme intégrée de biologie moléculaire en maladies infectieuses et une plate-forme de séquençage de nouvelle génération à haut débit (next-generation sequencing, NGS). Cette plateforme est localisée dans des locaux dédiés, contigus au Département “Prévention, Diagnostic et Traitement des Infections”, sous la responsabilité du Pr Christophe Rodriguez. La Figure 1 présente les surfaces occupées par le laboratoire de virologie, la plate-forme de NGS, ainsi que les surfaces communes au Département.

Dans un avenir proche, les laboratoires des hôpitaux universitaires Henri Mondor seront entièrement rénovés et réorganisés grâce à un investissement de 30 millions d'euros permettant la mise en place d'une plateforme de 9 000 m², dont 6 000 m² dédiés aux espaces techniques. Cet investissement permettra la mutualisation et l'automatisation des activités qui se répartiront, pour l'ensemble des disciplines de Biologie et de Pathologie, sur deux grands types de plateformes hyper-équipées : (i) La plateforme à haut débit 24/24 (PHD 24), qui assurera toutes les activités dites de grande routine, dont les activités de virologie ; (ii) Un réseau de plateformes technologiques, qui accueillera en particulier la plateforme “GENOBIOMICS” de biologie moléculaire et de séquençage, d'ores et déjà très développée et appelée à poursuivre son extension. L'ouverture de ce nouveau laboratoire est prévue pour 2027. Elle permettra la mise à la disposition du CNR de technologies et d'une organisation moderne, plus efficaces, à la pointe de l'innovation en biologie.



Figure 1 : Plan actuel du Département "Prévention, Diagnostic et Traitement des Infections" avec les locaux dédiés au laboratoire de Virologie représenté en jaune, la plate-forme de NGS en rouge et les surfaces communes en vert. Cette organisation est appelée à évoluer avec l'ouverture de la plateforme hospitalo-universitaire de territoire de Biologie et Pathologie des hôpitaux universitaires Henri Mondor en 2027.

Le laboratoire de Microbiologie Clinique est situé dans le bâtiment Lavoisier, qui regroupe l'ensemble des laboratoires d'analyses de l'hôpital Avicenne. Ses locaux techniques ainsi que les bureaux des personnels sont répartis sur 2 niveaux (Figure 2).

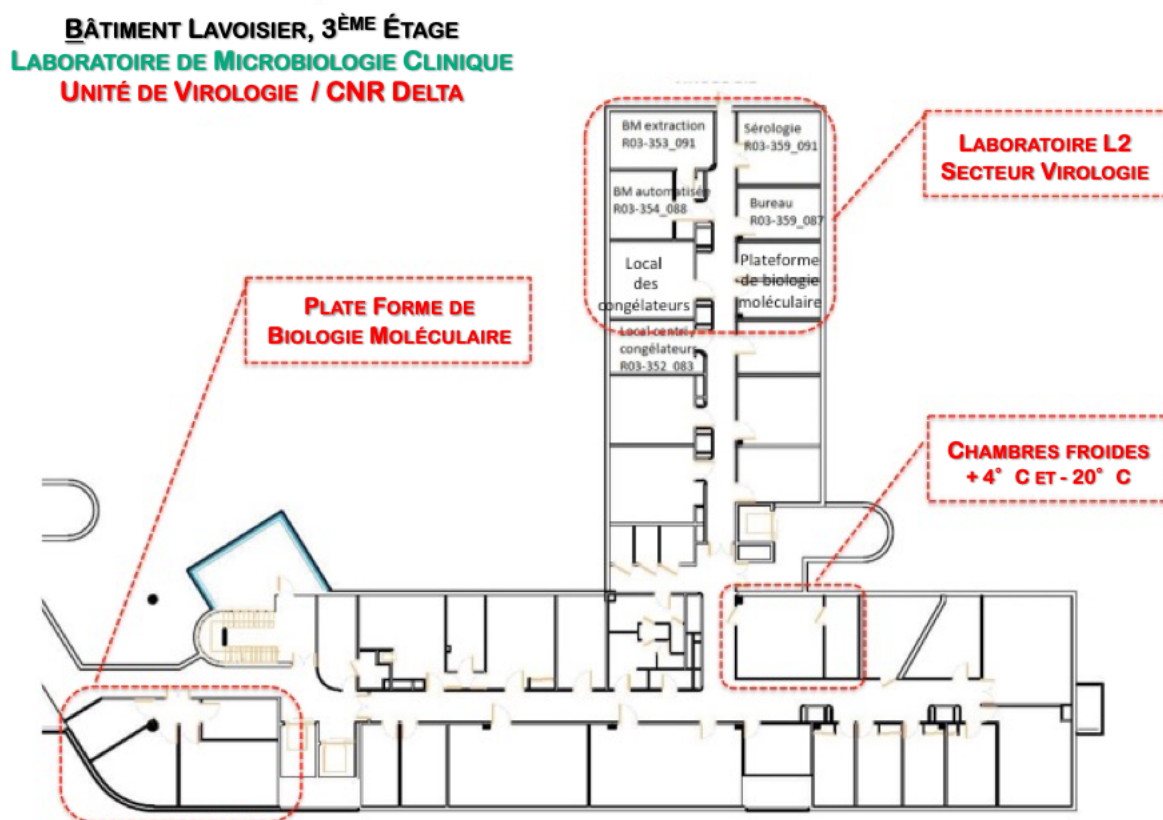
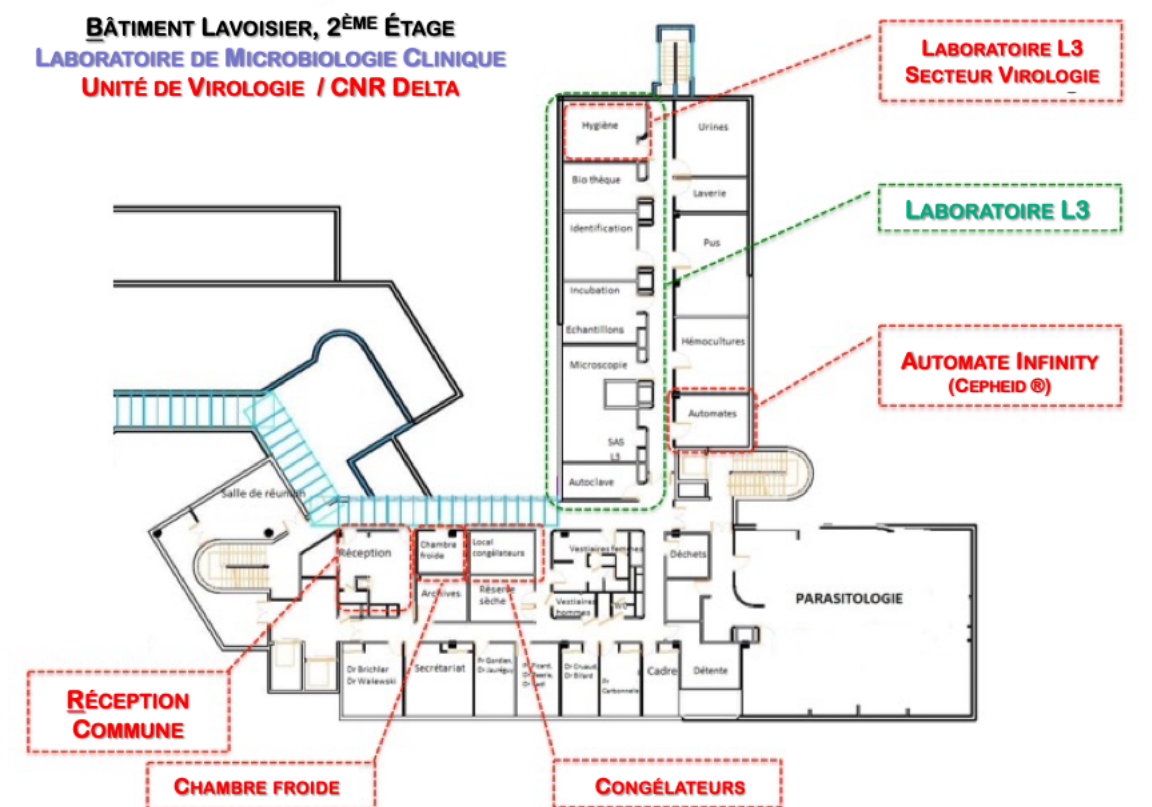


Figure 2 : Plan du laboratoire de Microbiologie Clinique.

Principaux équipements

Les équipements à la disposition du laboratoire coordonnateur sont les suivants :

Automates de sérologies virales

- . 3 VIDAS 3 (bioMérieux)
- . 1 LIAISON XL (DIASORIN)
- . 1 VITROS 3600 (Ortho-Clinical Diagnostics)
- . 1 ARCHITECT (Abbott)
- . 1 ALINITY i (Abbott)

Automates dédiés à la détection et à la quantification des acides nucléiques

- . 1 extracteur/thermocycleur PCR en temps réel Alinity *m* (Abbott Molecular)
- . 1 extracteurs/thermocycleurs TMA en temps réel Panther (Hologic)
- . 1 extracteur Cobas X480 (Hamilton)/thermocycleur Cobas *z* 480 PCR en temps réel (Roche Molecular)
- . 3 extracteurs QIA Symphony SP/AS (Qiagen)
- . 1 extracteur e-mag (bioMérieux)
- . 2 thermocycleurs pour PCR en temps réel StepOnePlus (Applied Biosystems)
- . 1 thermocycleur pour PCR en temps réel ABI7300 (Applied Biosystems)
- . 2 Rotor-Gene Q (Qiagen)
- . 1 thermocycler à gradient (Life Technologies)
- . 1 thermocycler ABI GENEAMP 9700 (Applied Biosystems)
- . 1 thermocycler ABI GENEAMP 2700 (Applied Biosystems)
- . 2 thermocyclers ABI GENEAMP 9600 (Applied Biosystems)
- . 1 thermocycleur UNO II (Biometra)

Automates dédiés à la caractérisation de la séquence des génomes viraux

- . 1 automate d'analyse des hybridations inverses AUTOBLOT 3000 (Siemens)

Matériel destiné à la constitution et la conservation des thèques

- . Hottes à flux laminaires
- . Congélateurs -80°C
- . Chambres froides et congélateurs -20°C
- . Cuves d'azote liquide

Équipements pour la plate-forme de NGS

- . 2 Chemagic Prime (Perkin) (Extracteurs haut débit)
- . 1 QIA Symphony (Qiagen) (extracteur moyen débit)
- . 3 préparateurs de bibliothèques DreamPrep Fluent (Tecan)
- . 1 Sentosa SX (Agilent) (Préparateur de banque Vela Diagnostics)
- . 1 Ion Chief (ThermoFischer) (Préparateur de banque ThermoFischer)
- . 16 Veriti (ThermoFischer) (Thermocyclers)
- . 1 LC480 (Roche) (qPCR)
- . 1 ABI7900 (ThermoFischer) (qPCR)
- . 1 RotorGene Q (Qiagen) (qPCR)
- . 1 QX200 (Biorad) (PCR digitale)
- . 1 Varioskan (ThermoFisher) (Lecteur absorbance, fluorescence haut débit)
- . 1 Tape Station2000 (Agilent) (migration sur gel automatisée)
- . 2 MiSeq (Illumina) (NGS)
- . 2 NextSeq 500 (Illumina) (NGS)
- . 1 NextSeq2000 (Illumina) (NGS)
- . 1 NovaSeq6000 (Illumina) (NGS)
- . 1 PGM-TM (ThermoFisher) (NGS)
- . 1 S5 (ThermoFischer) (NGS)
- . 1 Genexus ThermoFischer (NGS)
- . 1 Gridion (Oxford Nanopore) (NGS)
- . 3 ABI3130 (ThermoFischer) (Sanger)
- . 2 SeqStudio (ThermoFischer) (Sanger)

Équipements de traitement bio-informatique des données (NGS)

- . 2 serveurs Dragen (Illumina) (Core FPGA dédié aux analyses génomiques)
- . 2 serveurs GPU
- . 7 serveurs polyvalents en grappe comprenant 5 serveurs de production et 2 en développement (220 Core ; 1,5 To)
- . 1 serveur de stockage chaud (120 To SSD)

Les équipements à la disposition du laboratoire associé delta sont les suivants :

Automates de sérologies virales

- . 1 LIAISON XL (DIASORIN)
- . 2 ARCHITECT i1000 (ABBOTT)
- . 1 ETIMAX 3000 (DIASORIN)
- . 1 EVOLIS (BIORAD)
- . 1 AUTOBLOT (BIORAD)

Automates dédiés à la détection et à la quantification des acides nucléiques

- . 2 extracteurs d'acides nucléiques (Maxwell Promega)
- . 1 extracteur d'acides nucléiques (NucliSENS EasyMag Biomérieux)
- . 1 extracteur/thermocycleur PCR en temps réel Alinity m (Abbott Molecular)
- . 1 extracteur automatique d'acides nucléiques m2000_{SP} (Abbott Molecular)
- . 1 thermocycleur pour PCR en temps réel m2000_{RT} (Abbott Molecular)
- . 1 thermocycleur pour PCR en temps réel ABI7500 (Applied Biosystems)
- . 2 thermocycleurs pour PCR en temps réel QuantStudio 7 (Applied Biosystems)
- . 1 automate LIAISON MDX
- . 1 robot Infinity (Cepheid) avec 16 modules indépendants
- . 8 modules de FilmArray Torch (Biomérieux)
- . 4 thermocycleurs point final (Applied Biosystems)

Automates dédiés à la caractérisation de la séquence des génomes viraux

- . 1 Séquenceur ABI3100 (4 capillaires)
- . 1 Séquenceur ABI 3500DX (8 capillaires) (Applied Biosystems)
- . 2 Ion Chief (ThermoFischer) (Préparateur de banque ThermoFischer)
- . 1 MiSeq (Illumina) (NGS)
- . 1 NextSeq 500 (Illumina) (NGS)
- . 1 S5 (ThermoFischer) (NGS)
- . 2 préparateurs de banque d'ADN : Biomek 4000 et Biomek NXP (Beckman Coulter)

Matériel destiné à la constitution et la conservation des thèques

- . 5 Hottes à flux laminaire de type PSM2
- . Congélateurs à -20°C et à -80°C
- . Congélateurs à -150°C
- . Chambres froides à +4°C et -20°C

Laboratoire L3

. Espace dédié à la virologie incluant tous les équipements nécessaires à la culture virale B-delta (2 étuves CO2, 1 microscope inversé, 1 PSM2, 1 congélateur à -20°C et 1 congélateur à -80°C)

1.4 Collections de matériel biologique

Toute nouvelle souche est conservée en biothèque dans les différents laboratoires du CNR. Les échantillons sont caractérisés (génotypage, charge virale, etc...) systématiquement selon les méthodes de référence disponibles. Un volume minimum de 500 microlitres minimum est conservé dans des cryotubes à pas de vis externe. Une biothèque spécifique consacrée aux donneurs d'organes, tissus et cellules contenant aujourd'hui plus de 45 000 échantillons dont environ 10 000 provenant de donneurs d'organes. Il s'agit d'une collection unique d'échantillons qui continuera à s'enrichir au sein du CNR à raison d'environ 1500-2000 nouveaux échantillons par an. De même, une biothèque spécifique consacrée aux donneurs de sang positifs pour les marqueurs VHB ou VHC.

Toute nouvelle souche ARN-VHD positif est conservée au CNR-delta en congélation à -80°C avec un volume minimum de 500 microlitres. Ces échantillons sont systématiquement génotypés. La collection de souches du CNR-VHD est stockée dans 2 congélateurs à -80°C au niveau de la Plateforme de Ressources Biologiques (PRB) du groupe

hospitalier Paris Seine Saint Denis (GHPSSD), localisée sur le site de l'hôpital Avicenne. La PRB est sous la direction de Mairanne Ziol, et Ségolène Brichler est la biologiste responsable de l'UG PRB Virologie/Bactériologie. Une déclaration des collections de la PRB auprès du département de la recherche clinique et du développement, est enregistrée sous le numéro AC 2021-4368. Grâce à une collaboration avec l'Unité de Recherche Clinique d'Avicenne, et avec les collègues de la PRB, la base de données du CNR a été totalement nettoyée en 2022, en vue de la basculer sur une base Access en 2023, et de la référencer au sein des collections de la PRB, en suivant l'ensemble de la réglementation associée.

Concernant la collection d'échantillons issus de donneurs de sang, constitué depuis 2005 pour le VHB et 2008 pour le VHC, regroupe plusieurs centaines d'échantillons plasmatiques, et est régulièrement alimentée par des échantillons informatifs (précoces de l'infection, différents génotypes, porteurs chroniques) centralisés sous des volumes pouvant aller jusqu'à 250 ml, correspondant à du plasma de donneurs de sang infectés par les virus des hépatites B et C.

Parmi les collections, sont disponibles :

- . 2249 échantillons plasmatiques ADN VHB positifs de charges virales et génotypes variables
- . 170 échantillons plasmatiques ADN VHB positifs avec une souche présentant 1 ou plusieurs mutations du gène S pouvant affecter l'immunogénicité de l'AghBs
- . 52 échantillons plasmatiques delta (anticorps et/ou ARN) positifs
- . 684 échantillons plasmatiques ARN VHC positifs de charges virales et génotypes variables

Parmi les panels de la SFTS (Société Française de Transfusion Sanguine), sont disponibles :

- . 40 échantillons plasmatiques VHC de 0.5 ml sérologiquement et moléculairement caractérisés représentant diverses situations clinico-biologiques
- . 59 échantillons plasmatiques VHB de 1 ml

Une plasmasthèque en provenance de donneurs de sang issus d'Afrique sub-saharienne est également disponible. Au total, 16 000 échantillons plasmatiques sont stockés -80°C. cette biothèque a été constituée grâce à divers travaux collaboratifs avec des pays francophones d'Afrique sub-saharienne.

1.5 Démarche qualité du laboratoire

Un effort important a été consacré et sera consacré à l'accréditation du laboratoire coordonnateur et associé. L'ensemble des analyses utilisées pour le dépistage et le diagnostic des infections par le VHB, VHD et le VHC sont accréditées par le COFRAC selon la Norme ISO 15189. Les laboratoires coordonnateur et associé participent au programme d'évaluation externe de la qualité proposé par le CTCB et le QCMD.

2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

Les différentes techniques de référence disponibles au laboratoire de virologie de l'hôpital Henri Mondor pour le dépistage, le diagnostic l'identification des virus d'hépatites et l'évaluation de la sensibilité aux antiviraux sont les suivantes :

- . Méthodes sérologiques automatisées permettant la détection et/ou la quantification d'antigènes viraux et d'anticorps, comme la détection et la quantification de l'AgHBs, de l'antigène de capside du VHC (AgC), de AgHBe et de l'antigène lié à la capside du VHB (HBcrAg), la détection des anticorps HBc totaux et IgM, la quantification des anticorps HBs et la détection des anticorps HBe, des anticorps VHC totaux et des anti-HD IgG (méthode automatisée et manuelle).
- . Techniques de biologie moléculaire pour la détection et la quantification des acides nucléiques (ADN du VHB, ARN du VHB, ARN du VHC et ARN du VHD) par PCR "classique" ou par PCR/TMA en temps réel automatisée.
- . Techniques de biologie moléculaire pour la détermination du génotype du VHC par séquençage direct des régions NS5B et core/E1, et par NGS des régions NS3, NS5A et NS5B (trousse Sentosa SQ HCV Genotyping version 2) ou du génome complet (métagénomique shotgun).
- . Techniques de biologie moléculaire pour la détermination du génotype du VHB par séquençage direct de la région codant l'AgHBs et/ou la région PréS ou par NGS (trousse Sentosa SQ HBV Genotyping Assay).
- . Techniques d'identification des VHB mutants de la région PréC/C par séquençage direct, hybridation inverse (Inno-LiPA HBV precore) ou par NGS (trousse Sentosa SQ HBV Genotyping Assay).
- . Techniques de biologie moléculaire pour l'étude de la séquence des régions hypervariables HVR1 et de la glycoprotéine E1 du VHC, destinée aux études de transmission virale.
- . Techniques de biologie moléculaire pour la détection des mutations de résistance du VHB associées à la chimiothérapie antivirale, fondées sur le séquençage direct du domaine transcriptase inverse de l'ADN polymérase, l'hybridation inverse (Ino-LiPA HBV DR v3) ou par NGS (trousse Sentosa SQ HBV Genotyping Assay) ; la caractérisation de la dynamique des populations virales sous traitement par l'étude des quasi-espèces de la transcriptase inverse du VHB par des techniques de clonage-séquençage ; et les techniques de détection des mutations de résistance et de caractérisation de leurs dynamiques par pyroséquençage à haut débit suivi de l'analyse des données par notre package de logiciels développés au sein du laboratoire PyroPack® (UDPS).
- . Techniques de biologie moléculaire pour la détection des mutations de résistance du VHC aux inhibiteurs directs, fondées sur le séquençage direct des protéines NS3 (protéase), NS5B (polymérase) et NS5A ; la caractérisation de la dynamique des populations virales sous traitement par l'étude des quasi-espèces des régions virales ciblées par les antiviraux du VHC par clonage-séquençage ; et les techniques de détection des mutations de résistance par la trousse Sentosa SQ HCV Genotyping version 2.0 Assay (Vela Diagnostics).
- . Techniques de biologie moléculaire pour l'analyse de la séquence du gène S codant préS et l'AgHBs, en particulier la région hydrophile majeure (MHR) contenant des déterminants importants de la réponse humorale, appliquées aux études de transmission du VHB et à la recherche de mutants de l'AgHBs non détectés par les tests sérologiques (hépatites B dites "à virus mutant de l'AgHBs").
- . Techniques de biologie moléculaire pour la détection des acides nucléiques (ADN du VHB, ARN du VHC et ARN du VHD), de la détermination du génotype, ainsi que la détection des mutations de résistance du VHC à partir de sang total déposé sur papier buvard (DBS).
- . Techniques de détection des marqueurs sérologiques (anticorps VHC, AgHBs, anticorps HBs et HBc totaux, anticorps delta) à partir de sang total déposé sur papier buvard (DBS).

Les différentes techniques de référence disponibles au laboratoire de Microbiologie Clinique de l'hôpital Avicenne pour le dépistage, le diagnostic l'identification des virus d'hépatites et l'évaluation de la sensibilité aux antiviraux sont les suivantes :

- . Méthode sérologiques automatisées ou manuelles pour la détection des anticorps VHD (Liaison XL murex Anti-HDV et HDV Ab DIA PRO) et des IgM anti-VHD (EIAgen anti-HDV IgM kit, DIA.PRO).
- . Techniques de biologie moléculaire pour la détection et la quantification de l'ARN VHD (EurobioPelex HDCV qRT-PCR EBX-004, Eurobio).

- . Techniques de biologie moléculaire pour la détermination du génotype du VHD (analyse phylogénique de la région *R0*).
- . Techniques de biologie moléculaire pour l'analyse de nombreuses régions du VHD (R1, R2 et R3) et la reconstitution de la séquence complète du génome viral.
- . Techniques de biologie moléculaire pour la détermination du taux d'Editing du VHD (NGS Illumina).

2.2 . Liste des techniques recommandées par le CNR

Sans objet.