

RAPPORT ANNUEL

D'ACTIVITE 2024

Année d'exercice 2023

CNR Virus des hépatites B, C et Delta

	Organisme / Structure d'hébergement	Responsable
Laboratoire Coordonnateur	AP-HP – Hôpital Henri Mondor	Stéphane Chevaliez
Laboratoire Associé	AP-HP – Hôpitaux Universitaires de Paris Seine-Saint Denis	Ségolène Brichler

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	7
2. Activités d'expertise	8
2.1 Evolution des techniques	8
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses	8
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	14
2.4 Collections de matériel biologique	14
2.5 Activités d'expertises	16
2.6 Activités de séquençage	18
2.7 Partage de séquences produites par les CNR	21
3. Activités de surveillance	22
3.1 Description du réseau de partenaires	22
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	24
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	34
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	36
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	36
4. Alertes	37
5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil	39
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	39
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	39
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	40
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	41
6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année 2023, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	41
6.2 Liste des publications et communications de l'année 2023, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	48
7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux	51
8. Programme d'activité pour les années suivantes	52
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	67
3. Annexe 3 : Autres informations	68
3.1 Permanence du CNR	68

3.2	Autorisations MOT	68
3.3	Autorisations d'exercer la biologie médicale	69
3.4	Résultats de recherches non encore publiés ou sous embargo.....	69
3.5	Difficultés rencontrées par le CNR au cours de l'année 2023, 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 depuis le 1^{er} janvier 2023 par le Professeur Stéphane Chevaliez. Le CNR comprend également un laboratoire associé, le laboratoire de microbiologie clinique des hôpitaux universitaires Paris Seine-Saint Denis, localisé à l'hôpital Avicenne à Bobigny (Seine-Saint Denis), dirigé par la Docteure Ségolène Bricler, pour les aspects concernant le virus de l'hépatite delta.

Le CNR des Virus d'Hépatites B, C et delta 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 2023 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, en particulier pour le virus delta. L'évaluation des trousse de réactifs s'est amplifiée comme en témoignent les 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 d'addictologie, patients nouvellement pris en charge dans les Centres Experts en Hépatologie, ainsi que la surveillance de la résistance du VHB et du VHC aux antiviraux directs se sont poursuivies. La surveillance de la circulation des souches de virus delta s'est également poursuivie et amplifiée en France, mais également dans de nombreux pays d'Afrique. La surveillance viro-épidémiologique exhaustive 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 2023, 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 such as people who attend in drug and alcohol treatment services or patients newly treated for viral hepatitis in Hepatology expert Centers, 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 Virus d'Hépatites B, C et delta est constitué d'un laboratoire coordonnateur (Département Prévention, Diagnostic, Traitement des infections – Hôpitaux Universitaires Henri Mondor – Créteil – Responsable : Professeur Stéphane Chevaliez) et d'un laboratoire associé (Laboratoire de Microbiologie Clinique – Hôpitaux Universitaires Paris Seine-Saint-Denis – Responsable : Docteure Ségolène Brichler) (**Figure 1**).

Depuis l'appel à candidature, les évolutions suivantes ont eu lieu :

. Les responsables des laboratoires, coordonnateur et associé ont changé avec les remplacements du Docteur Dominique Challine par le Professeur Stéphane Chevaliez et du Docteur Emmanuel Gordien atteint par la limite d'âge par la Docteure Ségolène Brichler

. Mme Meriem Harrabi a été recrutée en tant que Chef de Projet pour la mise en place et la coordination des études épidémiologiques

. M. Quentin Lucas , technicien qui a quitté l'établissement en 2022, sera remplacé en mai 2024 par Mme Jeanne-Marie Le Glaunec

. Le recrutement du Docteur Odon Thiébault en tant qu'Ingénieur Hospitalier responsable du CNR coordonnateur en remplacement de M. Alexandre Soulier aura également lieu en mai 2024

. Les deux laboratoires ont recruté sur un contrat d'apprentissage en alternance Mme Aurélie Ferreira au sein du laboratoire coordonnateur et Mme Poussyina Hamouda au sein du laboratoire associé

. Au niveau du CNR associé, Mme Samira Dziri a été nommée sur un poste d'Ingénieur hospitalier ; Le Professeur Etienne Carbonnelle a quitté le service au mois de septembre 2023, remplace la Docteure Brigitte Lamy ; M. Franck Dupont, cadre medico-technique, a été remplacé par M Mathias Poudroux au mois de novembre 2023.

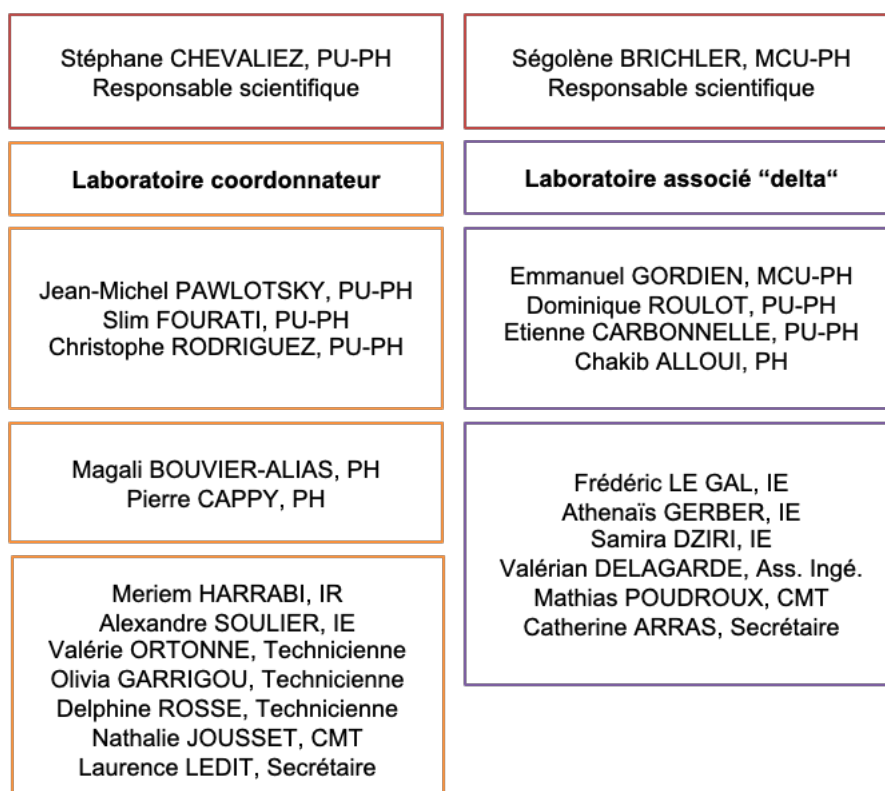


Figure 1 : Organigramme du CNR Virus des Hépatites B, C et delta

MISSION ET ORGANISATION

Aucun changement dans l'organisation des laboratoires, coordonnateur et associé, n'est intervenu au cours de l'année 2023.

DEMARCHE QUALITE

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 (Cf. Attestation d'Accréditation N°8-3372 rev.13)

Au niveau des Hôpitaux Universitaires Paris Seine-Saint-Denis, la visite du COFRAC prévue en juillet 2023 a été annulée, et le laboratoire a demandé une suspension d'accréditation pour une durée maximale de 1 an. Une nouvelle visite est prévue en septembre 2024 afin de rouvrir toutes les lignes d'accréditation.

2. Activités d'expertise

L'activité d'expertise a essentiellement consisté en (i) le développement, la standardisation et l'évaluation analytique et clinique 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 VHD à partir de spot de sang séché.

2.1 Evolution des techniques

Une nouvelle trousse de réactif (ViroKey® SQ FLEX Genotyping Assay) pour la détermination des profils de résistance du VHB aux analogues nucléos(t)idiques et du génotype viral est désormais utilisée au laboratoire au regard des performances analytique et clinique (voir ci-dessous). Une trousse supplémentaire de détection des anticorps totaux du VHD (HDV Ab DIA.PRO) est également disponible au laboratoire coordonnateur en complément de la trousse LIAISON® XL murex anti-HDV sur la plateforme d'immunoanalyse LIAISON® XL (DiaSorin, Italie).

Pour la qualification des donneurs de sang, les charges virales B et C sont désormais réalisées sur la plateforme cobas® 5800 en remplacement du cobas® 4800. De plus, le séquençage *via* la technologie Oxford Nanopore Technologies (GridION) est en cours de développement.

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 et est ainsi mise à disposition auprès des structures médico-sociales d'addictologie.

Une nouvelle trousse de réactif pour la quantification de l'ARN du VHD (EurobioPlex HDV RT-PCR EBX-071) est désormais utilisée par le laboratoire associé en remplacement de la trousse EurobioPlex EBX-004. Les performances de cette nouvelle version sont supérieures à celles de la version précédente (voir paragraphe suivant) et le fabricant a arrêté la commercialisation de la trousse EBX-004. Il faut noter que la nouvelle trousse EBX-071, mieux calibrée par rapport au standard OMS et aux autres techniques disponibles dans le monde, donne des résultats inférieurs d'environ 0,9 Log UI/mL par rapport à la trousse EBX-004.

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 diagnostique et de suivi thérapeutique des hépatites virales chroniques ont donné lieu à de nombreuses études (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Trousse et plateformes évaluées au cours de l'année 2023

Trousse/plateforme	Application(s)	Fabricant
cobas® 5800 System	Quantification de l'ADN VHB et l'ARN VHC à partir de plasma/sérum	Roche Diagnostics
ELITe InGenius®	Quantification de l'ADN VHB et l'ARN VHC à partir de plasma/sérum	ELITechGroup
NeuMoDx™ 96 Molecular System	Quantification de l'ADN VHB et l'ARN VHC à partir de plasma/sérum	Qiagen
ViroKey® SQ FLEX Genotyping Assay	Détermination du génotype du VHB et des profils de résistance du VHB aux analogues nucléos(t)idiques	Vela Diagnostics GmbH
EurobioPlex HDV RT-qPCR EBX-071	Quantification de l'ARN VHD à partir de sérum/plasma	Eurobio Scientific

RealStar® HDV RT-PCR kit 1.0	Quantification de l'ARN VHD à partir de sérum/plasma	Altona Diagnostics
AltoStar® HDV v1.0 et v2.0	Quantification de l'ARN VHD à partir de sérum/plasma	Altona Diagnostics
Robogene v2.0 et v3.0	Quantification de l'ARN VHD à partir de sérum/plasma	Roboscreen GmbH

Performances de la plateforme cobas® 5800 System pour la quantification de l'ADN VHB et l'ARN VHC à partir de plasma/sérum. Les infections par les virus de l'hépatite B et de l'hépatite C constituent un problème de santé mondial. La mesure des niveaux d'ADN du VHB ou d'ARN du VHC à l'aide de trousse moléculaires est recommandée par les sociétés savantes internationales afin de diagnostiquer, guider la décision de traitement et évaluer les réponses aux traitements antiviraux. Les performances du nouveau système cobas® 5800 pour la quantification des acides nucléiques du VHB et VHC à partir d'une large série d'échantillons collectés chez des patients infectés ou non ont été évaluées. La spécificité des tests cobas® VHB et VHC était très satisfaisante (respectivement, 99,1% et 100%). La linéarité évaluée à partir de panels AcroMetrix était également excellente ($r=0,99$). Les coefficients de variation intra- et inter-essais étaient inférieurs à 5%. Sur les 334 échantillons cliniques testés, seuls 12 (3,6%) ont donné des résultats discordants, généralement à la limite de quantification des tests cobas®. La corrélation des valeurs de charges virales était extrêmement élevée, et de faibles biais ont été observés sur l'ensemble de l'intervalle testé, sans impact clinique chez des patients éligibles à un traitement antiviral. Cette étude comparative a démontré l'équivalence des performances du nouveau cobas® 5800 System par rapport à d'autres plateformes de biologie moléculaire communément utilisées en pratique clinique pour la quantification de l'ADN du VHB ou de l'ARN du VHC (Vo-Quang et al., article soumis).

Performances de la plateforme ELITE InGenius® pour la quantification de l'ADN VHB et l'ARN VHC à partir de plasma/sérum. Les performances de la nouvelle plateforme ELITE InGenius® ont été évaluées à partir de 850 échantillons cliniques collectés chez des patients infectés ou non par le VHB ou le VHC. La spécificité des tests HBV et HCV ELITE MBG® kit était excellente (100%). Les valeurs de charges virales ont été mesurées en parallèle avec les trousse cobas sur l'automate c5800® System (comparateur). Les charges virales étaient significativement corrélées ($p<0,001$), et ce quels que soient le niveau de répllication et le génotype viral. Les biais observés étaient faibles (respectivement, $0,18\pm0,39$ Log UI/mL pour le VHB et $-0,25\pm0,37$ Log UI/mL pour le VHC), sans impact clinique chez des patients traités par analogues nucléos(t)idiques ou par antiviraux directs (Rosse et al., article en préparation).

Performances de la plateforme NeuMoDx™ 96 Molecular System pour la quantification de l'ADN du VHB et de l'ARN du VHC à partir de plasma/sérum. Les performances de la nouvelle plateforme NeuMoDx™ 96 Molecular System ont été évaluées à partir de 215 échantillons cliniques collectés chez des patients infectés par le VHB ou le VHC. Les charges virales ont été mesurées en parallèle avec les trousse cobas sur l'automate c5800® System (comparateur). Les valeurs de charges virales étaient significativement corrélées ($p<0,001$). La moyenne des différences de quantification était respectivement de $0,13\pm0,4$ Log UI/mL pour l'ADN du VHB et $0,05\pm0,37$ Log UI/mL pour l'ARN du VHC. Pour un échantillon, la différence de charge virale (ADN VHB) était >2 Log UI/mL. Il s'agissait d'un échantillon de génotype B. La séquence nucléotidique du gène *preC-C/X* (région ciblée par les amorces/sonde) ne montrait pas de substitutions nucléotidiques particulières.

Performances de la trousse ViroKey® SQ FLEX Genotyping Assay pour la détermination des profils de résistance aux analogues nucléos(t)idiques et du génotype viral. Le traitement de l'infection chronique par le VHB nécessite l'administration généralement à vie d'analogues nucléos(t)idiques ayant une barrière élevée à la résistance et une puissance antivirale importante. La principale limite du traitement au long cours est l'émergence de souches portant une ou plusieurs substitutions amino acidiques (RAS) responsables d'une diminution de sensibilité aux antiviraux. Les sociétés savantes internationales recommandent la détermination des profils de résistance du VHB aux analogues nucléos(t)idiques dans des laboratoires de référence. Au total 67 échantillons prélevés chez des porteurs chroniques de l'AgHBs ont été séquencés par 2 méthodes : séquençage direct Sanger d'une portion du gène chevauchant *P/S* et séquençage haut débit à l'aide de la trousse ViroKey® SQ FLEX Genotyping Assay (Vela Diagnostics GmbH). Le **Tableau 2** résume les caractéristiques des 67 patients inclus dans cette étude rétrospective. Tous les échantillons, sauf 3, ont été génotypés avec succès à l'aide des deux méthodes. Le niveau de charge virale pour les 3 échantillons non amplifiés par le test basé sur le séquençage haut débit était inférieur à celui recommandé par le fournisseur, ce qui pourrait expliquer l'absence d'amplification. La proportion des génotypes correctement identifiés par la trousse ViroKey® SQ FLEX Genotyping Assay était la suivante : 44,8% de génotype E, 16,4% de génotypes D et A, 10,4% de génotype C, 6% de génotype B, 4,5% de génotype G et 1,5% de génotype F (**Tableau 2**). La concordance avec la méthode de référence (analyse phylogénétique d'une

portion du gène *P/S*) était de 100%. Parmi les 28 patients naïfs de traitement, aucun n'avait de RAS détectable, et ce quelle que soit la méthode de séquençage. Trois patients avaient des mutations de "fitness" en position 78 et 163. Certaines mutations étaient uniquement détectées par la trousse ViroKey® SQ FLEX Genotyping Assay. Dans tous les cas, les mutations étaient présentes à des niveaux faibles, respectivement 3,5% et 4,7% de la quasi-espèce virale. Parmi les 36 patients traités par analogues nucléos(t)idiques, 18 (50%) avaient une ou plusieurs RAS détectables généralement associées à des mutations de "fitness", tandis que 14 patients n'avaient aucune substitution détectable, et ce quelle que soit la méthode de séquençage. Un patient supplémentaire avait des mutations de fitness non associées à des RAS. Chez 3 patients (8,3%), de multiples RAS ou des mutations de fitness étaient uniquement détectées par le test basé sur le séquençage haut débit. Dans tous les cas, les mutations étaient présentes à des niveaux faibles à modérés, représentant 5,0% à 32,2% de la quasi-espèce virale. Au total, le test ViroKey® SQ FLEX Genotyping Assay peut être utilisé en pratique clinique pour la détermination des profils de résistance du VHB et pour la détermination du génotype viral (Ortonne et al., article soumis)

Tableau 2 : Caractéristiques des patients inclus (n=67)

Age médian (années [IQR])	52 [42-61]
Sexe masculin [n (%)]	47 (70,1)
Pays de naissance [n (%)]	
France	10 (16,4)
Europe (hors France)	1 (1,6)
Afrique du Nord	4 (6,6)
Asie	9 (14,8)
Afrique sub-Saharienne	36 (59,0)
Amérique du Nord	1 (1,6)
Coinfections [n (%)]	
VIH	9 (18,75)
VHB	2 (4,2)
VHD	1 (2,1)
AgHBe-négatif [n (%)]	39 (58,2)
Charge virale médiane (ADN VHB) (Log UI/mL [IQR])	3,7 [3,1-5,2]
Titre de l'AgHBs médian (Log UI/mL [IQR])	3,4 [2,6-4,2]
Génotype viral [n (%)]	
Génotype A	11 (16,4)
Génotype B	4 (6,0)
Génotype C	7 (10,4)
Génotype D	11 (16,4)
Génotype E	30 (44,8)
Génotype F	1 (1,5)
Génotype G	3 (4,5)
Score de fibrose [n (%)]	
F0-F1	23 (60,5)
F2	5 (13,2)
F3	2 (5,3)
F4	8 (21,0)
Traitement antiviral [n (%)]	
LAM	1 (2,7)
LAM + ADV	1 (2,7)
ETV	20 (54,1)
TDF	6 (16,2)
TDF/FTC	6 (16,2)
TDF + ETV	3 (8,1)
Absence de traitement antiviral	30

Performances de la trousse EurobioPlex EBX-071 pour la quantification de l'ARN VHD à partir de sérum/plasma. L'objectif de cette étude était d'évaluer les performances de la trousse EurobioPlex EBX-071, en comparaison à celles de la trousse EurobioPlex EBX-004 (méthode de référence), et ce, en utilisant le standard OMS et un grand nombre d'échantillons issus de la collection du laboratoire associé delta. La nouvelle trousse a montré d'excellentes performances en termes d'efficacité d'amplification et une très bonne reproductibilité des

courbes de calibration (standards de quantification désormais prêts à l'emploi). Plus de 98% des échantillons (1453/1478) avaient un résultat valide. Parmi les modifications, la version EBX-071 comprend un contrôle interne endogène, et la durée du run d'amplification a été raccourcie à 1h12. Le test de répétabilité a montré un coefficient de variation (CV) <5% (échantillon avec une charge virale connue, testé 24 fois dans un même run et répété sur 5 runs différents). Les CV de reproductibilité étaient de respectivement 7,7% et de 2,9% pour des échantillons faiblement positif (ARN=2,75 Log UI/mL ; n=32 mesures) et fortement positif (ARN=4,96 Log UI/mL ; n=10 mesures). La limite de détection a été posée à 20 UI/mL, et la limite de quantification à 50 UI/mL (détection de 24/24 échantillons dosés à 25 UI/mL). La spécificité était de 100% évaluée à partir de donneurs de sang VHD négatif (n=100), de patients avec une sérologie VHD+/ARN- (n=100), d'échantillons positifs pour les virus VIH, VHA, VHB, VHC et VHE (n=25), d'échantillons avec des taux sériques de triglycérides >5 g/L (n=5) ou des taux de bilirubine >50 mg/L (n=5). Des résultats comparables ont été obtenus sur des échantillons de plasma et de sérum appariés (n=24, différence moyenne de 0,1 Log UI/mL) (**Figure 2**). De plus, 561 échantillons cliniques comprenant des souches des 8 génotypes du VHD ont été quantifiés en parallèle avec les trousse EBX-004 et EBX-071. Les résultats étaient concordants à 98,9% (6/561 tests discordants, correspondant à des échantillons ayant une charge virale <3 Log UI/mL). Une différence moyenne de 0,9 Log UI/mL a été observée entre les valeurs de quantification obtenues avec les trousse EurobioPlex EBX-071 et EBX-004, ce qui aboutit à un ciblage excellent du standard OMS (2,75 Log UI/mL dans l'évaluation pour une valeur attendue à 2,76 Log UI/mL). Enfin, un suivi longitudinal de la charge virale VHD de 11 patients (5 à 7 échantillons par patient) a été réalisé comprenant 2 patients non traités, 5 répondeurs au bulevirtide, interféron pégylé (pegIFN) + bulevirtide ou REP-2139, 1 non répondeur au pegIFN et 3 patients avec un profil de répondeur-rechuteur (**Figure 3**). Sur les 62 échantillons, tous les résultats étaient concordants sur le plan qualitatif. L'écart sur les données quantitatives était conforme aux valeurs attendues. Compte tenu de l'arrêt de commercialisation de la trousse EBX-004 par Eurobio, et à la suite de l'avis favorable rendu par le laboratoire associé delta, tous les laboratoires utilisent désormais la version EBX-071.

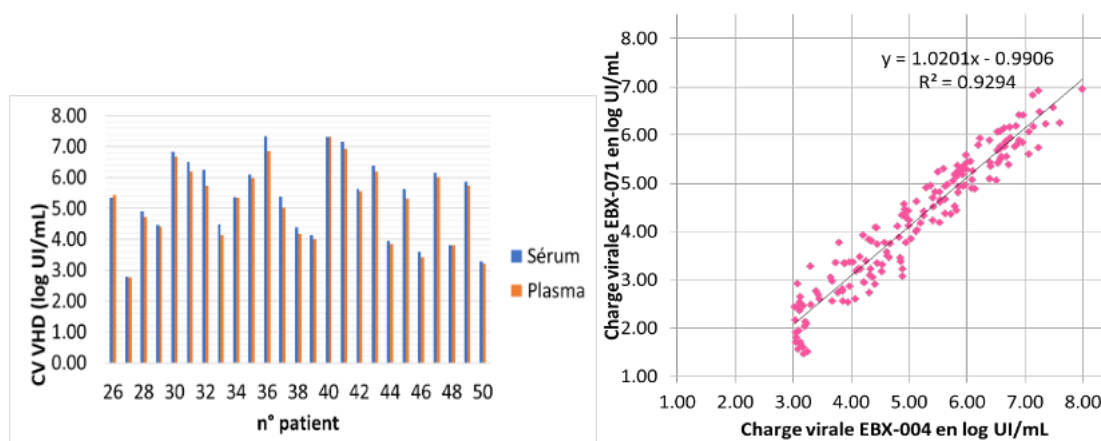
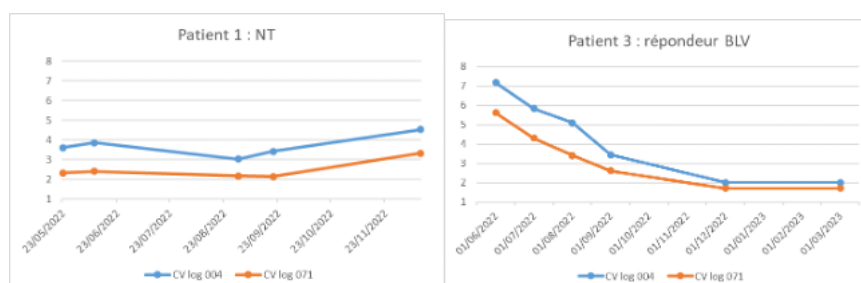


Figure 2 : Valeurs de charges virales (ARN VHD en Log UI/mL) mesurées à partir d'échantillons sériques et plasmatiques (Patient n°26 à 50) et corrélation de Deming des valeurs de charges virales mesurées à l'aide des trousse EBX-004 et EBX-071 à partir de 561 échantillons cliniques.



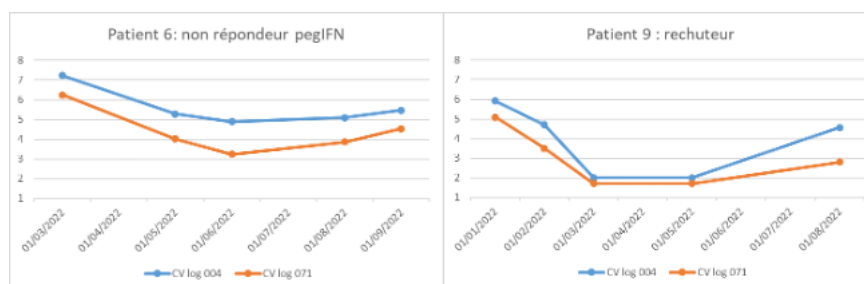


Figure 3 : Cinétiques de charges virales (ARN VHD) mesurées par les trousse EBX-004 et EBX-071 (Patients 1, 3, 6 et 9).

Performance des trousse RealStar® HDV RT-PCR kit 1.0 et AltoStar® HDV RT-PCR v1.0 et v2.0 pour la quantification de l'ARN du VHD à partir de sérum/plasma. L'objectif de cette étude était l'évaluation des performances des trousse de quantification de l'ARN du VHD et leur validation sur le territoire français comme trousse alternatives à la trousse EurobioPlex EBX-071, avec des performances attendues au moins équivalentes. La trousse *RealStar® HDV RT-PCR 1.0* a été évaluée en 2022, sur un faible nombre d'échantillons (voir rapport 2023 sur les activités 2022). L'évaluation avait permis de confirmer les résultats présentés dans la fiche fournisseur en terme de sensibilité, de quantification de l'ARN VHD de souches de tous les génotypes viraux, de vérification de la calibration de la gamme par rapport au standard OMS et de l'obtention d'une opinion sur la facilité d'utilisation en pratique de cette trousse. La trousse *RealStar® 1.0* s'est révélée très facile d'utilisation. Les résultats quantitatifs mesurés étaient systématiquement <1 Log environ par rapport à celles obtenues avec la trousse EurobioPlex EBX-004 (correspondant en fait à la surquantification connue de la version de cette trousse). Les résultats de quantification du standard OMS par la trousse *RealStar® 1.0* étaient de 2,9 Log UI/mL, donc très proches de la valeur attendue (2,76 Log UI/mL).

En juin 2023, nous avons évalué la nouvelle trousse développée par Altona, *AltoStar® HDV RT-PCR v1.0*, constituée d'un pipeline automatisé avec extraction de l'ARN VHD sur l'automate AltoStar (après rajout du contrôle interne), distribution automatisée du mélange de RT-PCR et réalisation de la RT-qPCR. Ce pipeline entièrement automatisé facilite grandement le travail technique en routine. La calibration du standard de quantification de la trousse par rapport au standard international OMS est tout à fait correcte : quantification à 2,9 Log UI/mL pour une valeur cible à 2,75 Log UI/mL. Tous les échantillons préparés avec des charges virales théoriques de 100, 50 et 25 UI/mL ont été détectés. Les résultats quantitatifs étaient cohérents avec les valeurs attendues, que ce soit à partir des échantillons de routine ou sur le panel pangénotypique du laboratoire, à l'exception de 3 échantillons (P1, P2 et P3) du panel (**Tableau 3**) appartenant tous à un sous-groupe du génotype VHD-1 circulant en Afrique centrale (Cameroun, Centrafrique).

Tableau 3 : Quantification de l'ARN du VHD des prélèvements du "panel pangénotypique" avec les trousse AltoStar® v1.0 et EurobioPlex EBX-071.

N°	EurobioPlex EBX-071 (Log UI/mL)	AltoStar® v1.0 (Log UI/mL)	N°	EurobioPlex EBX-071 (Log UI/mL)	AltoStar® v1.0 (Log UI/mL)
P1	2,51	0,21	P12	4,73	4,89
P2	3,31	0,03	P13	3,85	3,83
P3	4,27	0,23	P14	2,64	2,68
P4	3,95	4,04	P15	2,62	3,03
P5	3,42	2,96	P16	2,22	2,61
P6	5,17	5,08	P17	3,70	4,33
P7	3,53	3,55	P18	4,01	3,81
P8	4,37	3,60	P21	4,65	4,33
P9	2,46	2,54	P22	3,98	4,47
P10	5,02	5,08	P23	3,41	3,39
P11	2,13	2,91	P24	3,23	3,48

Une expertise approfondie a été menée, en lien avec les équipes du département de recherche et développement d'Altona, pour préciser les contours du problème et y apporter une réponse (voir le Chapitre « Alerte »).

En décembre 2023, le laboratoire a été sollicité pour évaluer une nouvelle version de la trousse *AltoStar® HDV RT-PCR v2.0*, afin de vérifier si les modifications apportées restauraient la quantification correcte de ces échantillons, sans altération des performances globales de la trousse. Ainsi, 75 échantillons ont été analysés, dont les 24

échantillons du panel pangénotypique et 23 échantillons de patients originaires d'Afrique centrale infectés par une souche de VHD-1 génétiquement proche du sous-groupe non quantifié. La valeur de l'échantillon OMS sur le pipeline AltoStar® v2.0 était de 2,74 Log UI/mL (valeur attendue : 2,75 Log UI/mL). L'ensemble des résultats obtenus avec la trousse EurobioPlex EBX-071 était concordant avec ceux obtenus avec la trousse AltoStar® v2.0 avec une différence moyenne de 0,21 Log UI/mL et un coefficient de corrélation $r=0,92$ (Figure 4).

NB : pour les souches de patients d'Afrique centrale, la différence moyenne entre les deux fournisseurs était de 0,35 Log UI/mL. Il persiste, sur certaines souches génétiquement très proches, une différence de quantification > 0,5 Log UI/mL (Figure 5).

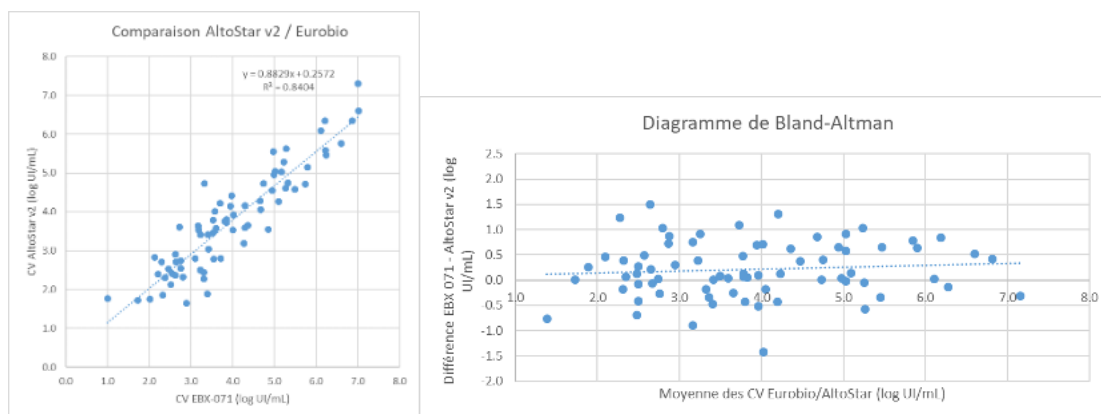


Figure 4 : Corrélation de Deming et représentation de Bland-Altman des valeurs de charges virales (ARN VHD) mesurées à l'aide des trousse AltoStar® HDV RT-PCR v2.0 et EurobioPlex EBX-071 à partir de 75 échantillons.

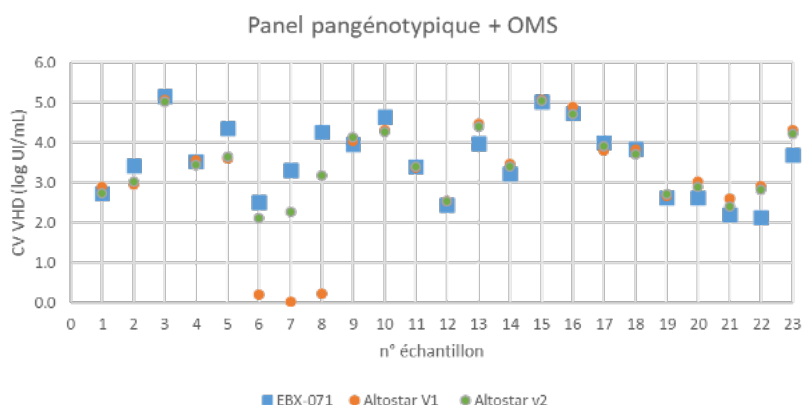


Figure 5 : Résultats comparatifs de la quantification de l'ARN du VHD à partir du panel pangénotypique.

L'ensemble des résultats obtenus lors de cette évaluation ont confirmé que les performances du pipeline AltoStar® v2.0 sont acceptables pour une utilisation en pratique clinique. Une attention particulière devra cependant être apportée au suivi des patients de génotype HDV-1 originaires du Cameroun, pour lesquels il est indispensable que le suivi de patients soit systématiquement effectué avec la même technique (et dans le même laboratoire). Les versions 2.0 des trousse RealStar® et AltoStar® devraient être distribuées au cours de l'année 2024.

Performance des trousse RoboGene HDV RNA Quantification kit 2.0 et 3.0 pour la quantification de l'ARN du VHD à partir de sérum/plasma. La société Roboscreen GmbH commercialise actuellement une trousse de quantification de l'ARN du VHD (RoboGene HDV RNA Quantification kit 2.0, CE-IVD), non distribuée en France mais largement utilisée en Allemagne ou en Italie. La trousse d'amplification 2.0 a été validée avec un système manuel d'extraction (INSTANT Virus RNA/DNA Kit), mais Roboscreen souhaite en diffuser une version automatisée (INSTANT Virus RNA/DNA Kit – FX 2.0). La société a également développé une nouvelle version de la trousse de RT-qPCR (RoboGene HDV RNA Quantification kit 3.0), qui n'est pas encore distribuée (marquage CE-IVDR en cours). La trousse RoboGene v3.0 est facile d'utilisation, les calibrateurs sont lyophilisés, et la durée du run de RT-qPCR est de 47 minutes. Au total, 222 points sur 223 étaient valides (Figure 6). L'analyse de dilutions sérieuses d'échantillons de 7 génotypes différents (excepté VHD-3, charges virales théoriques de 105 à 101 UI/mL) a validé la détectabilité et la sensibilité pangénotypique de la trousse de RT-qPCR 3.0, après une extraction automatisée ou manuelle. Le "panel pangénotypique VHD" a été utilisé pour permettre une comparaison des résultats des trousse v2.0 et v3.0, après une extraction unique, et une comparaison des 2 techniques d'extraction manuelle et automatisée, conduisant dans chaque cas à des résultats comparables

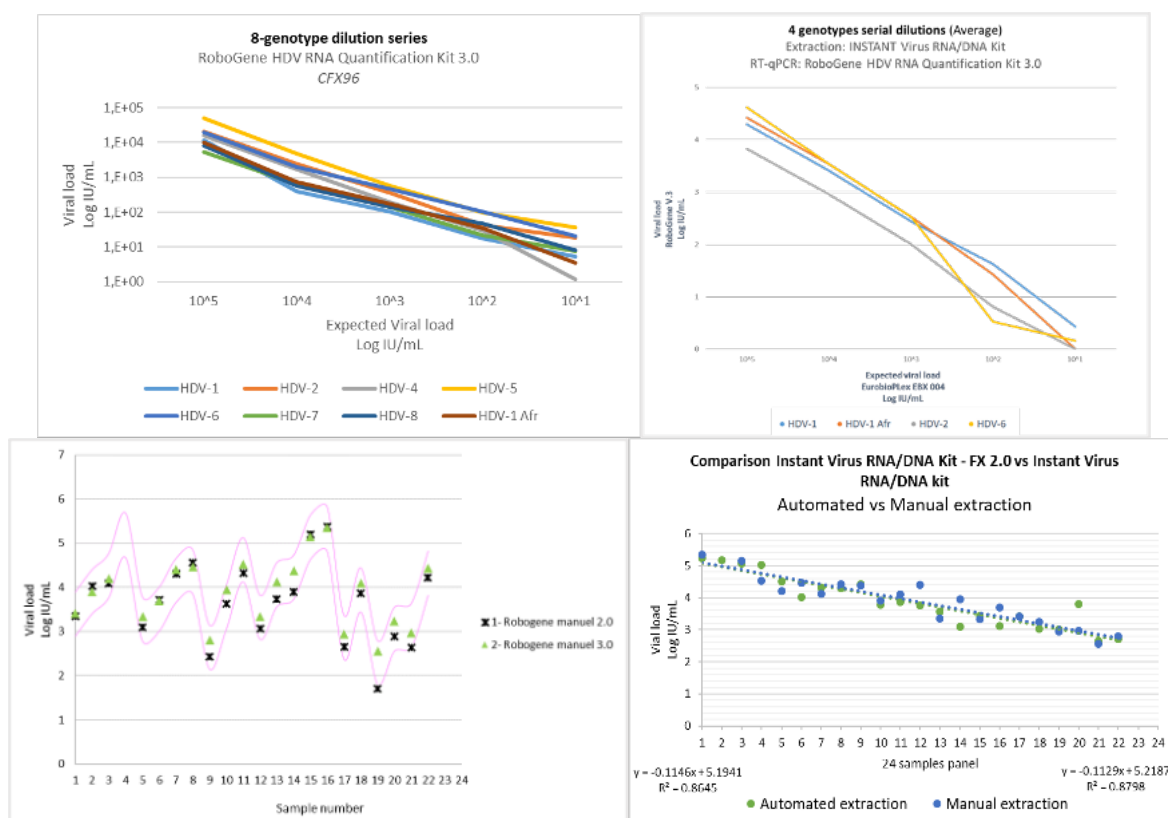


Figure 6 : Performance des trousse RoboGene HDV RNA Quantification kit 2.0 et 3.0 pour la quantification de l'ARN du VHD.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Des banques de séquences de référence ont été transférées vers des laboratoires afin de pouvoir réaliser la détermination des génotypes (1-8) et sous-types (a, b, c, ...) du VHC par analyse phylogénétique d'une portion de 286 paires de bases de la région NS5B codant l'ARN polymérase ARN-dépendante.

Le laboratoire associé delta a été sollicité pour aider certains laboratoires à la mise en place d'une technique de quantification de l'ARN du VHD, que ce soit avec la trousse EurobioPlex ou avec leur propre trousse "maison". Cette aide a notamment comporté l'envoi de prélèvements "caractérisés" comportant des souches virales des différents génotypes et avec des charges virales étendues : échantillons du contrôle national de qualité (CQ-VHD), aliquotes du standard OMS ; échantillons du "panel pangénotypique VHD". Ce dernier a notamment été fourni au laboratoire de Grenoble afin de faciliter la mise au point de l'extraction de l'ARN du VHD sur l'automate BeGenius® (ELITechGroup).

2.4 Collections de matériel biologique

Les collections de matériel biologique concernent essentiellement des échantillons de sang total collecté sur papier filtre (spots 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, 150 buvards et 258 échantillons de sang (plasma ou sérum) ont été collectés au cours de l'année 2023 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 47 000 échantillons, dont 2023 collectés en 2023. Dans le cadre de l'hémovigilance et de la surveillance des donneurs de sang positifs pour les marqueurs du VHB ou du VHC, 3143 échantillons ont été reçus au laboratoire en 2023 : 53 échantillons

plasmatisques dans le cadre de l'hémovigilance et 261 échantillons plasmatiques dans le cadre de la surveillance des donneurs de sang [190 dons positifs pour le VHB (AgHBs et/ou ADN VHB) et 59 anti-HBc isolés et 45 pour le VHC (et 10 pour le VIH)].

La collection "donneurs de sang" débutée en 2005 pour le VHB et 2008 pour le VHC contient 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. Sont disponibles : 2396 échantillons plasmatiques ADN VHB positifs de charges virales et génotypes variables, 170 échantillons plasmatiques ADN VHB positifs avec une ou plusieurs mutations du gène S pouvant affecter l'immunogénicité de l'AgHBs, 54 échantillons plasmatiques delta (anticorps et/ou ARN) positifs, et 699 échantillons plasmatiques ARN VHC positifs de charges virales et génotypes variables. Des panels de la Société Française de Transfusion Sanguine (SFTS) sont également disponibles (40 échantillons plasmatiques de 0,5 mL sérologiquement et moléculairement caractérisés représentant diverses situations clinico-biologiques et 59 échantillons anti-HBc sous un volume de 1 mL)

La collection des souches VHD du laboratoire associé delta a débuté à la fin des années 1990. Elle a pour objectif de recenser de façon exhaustive, l'ensemble de la diversité génétique des souches de 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 aliquote de sérum ou de plasma de tout nouveau patient ayant été dépisté VHD positif répliquant est conservé dans cette collection).
- . souches issues de projets et 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 plus de 20 ans. Chaque souche fait l'objet d'un séquençage, au moins partiellement de la région *R0*. Le pays de naissance du patient, ainsi que quelques données démographiques sont également recueillis.

La collection de souches VHD comprend plus de 4 500 souches uniques dont 147 souches et séquences collectées en 2023. Ces souches sont stockées 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.

2.5 Activités d'expertises

Au total, le nombre d'échantillons biologiques envoyés au CNR coordonnateur au cours de l'année 2023 était de 408, correspondant à 818 analyses réalisées, en nombre stable par rapport à 2022 (**Tableau 4**). Ces échantillons provenaient essentiellement de centres hospitaliers publics ou de laboratoires privés (Cerba, Pontoise), ainsi que de structures médico-sociales d'addictologie (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 laboratoire associé delta au cours de l'année 2023 était de 72, correspondant à 72 analyses réalisées.

Tableau 4 : Échantillons biologiques adressés aux CNR coordonnateur et associé, en 2023.

Type d'échantillons	Analyses virologiques	N	Structures demandeuses
Spot de sang séché (DBS)	Détection AgHBs	128	CSAPA/CAARUD/UCSA
	Recherche ADN VHB	71	
	Recherche anticorps HBs	41	
	Recherche anticorps HBc	9	
	Sérologie VHD	4	
	Sérologie VHC	93	
	Recherche ARN VHC	134	
	Génotypage VHC	17	
	Sérologie VIH	121	
Sérum/plasma	Génotypage VHB	26	CHU/CHG (n=12) Laboratoires privés (n=14)
	Détermination profil de résistance VHB aux analogues nucléos(t)idiques	70	CHU/CHG (n=54) Laboratoires privés (n=16)
	Quantification de l'AgHBs	42	CHU/CHG (n=42)
	Quantification de l'HBcrAg	73	CHU/CHG (n=73)
	Génotypage VHC	80	CHU/CHG (n=80)
	Détermination profil de résistance VHC aux AAD	82	CHU/CHG (n=87)
	TOTAL	991	
Sérum/plasma	Recherche d'ARN VHD	18	CHU/CHG (n=13) Laboratoires privés (n=5)
	Recherche anticorps delta	5	CHU/CHG (n=5)
	Génotypage VHD	49	CHU/CHG (n=18) Laboratoires privés (n=13) CMG Rennes (ANRS-MIE) (n=18)
	TOTAL	72	

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 (Xpert HCV Viral Load Fingerstick) à l'aide du système GeneXpert, Cepheid] dans le cadre de projets de micro-élimination de l'hépatite C. Au total, 68 résultats ont été validés dans un délai <24 heures pour les structures suivantes : CSAPA Bus Méthadone et CAARUD 31/32 (n=64, Marseille), CAARUD Lou Passagin (n=0, Nice) et Halte Soins Addictions – Gaïa (n=4, Paris). Parmi les 68 patients testés, 26 (38,2%) avaient une infection active (moyenne de la charge virale : $5,2 \pm 1,2$ Log UI/mL). L'âge médian des patients dépistés était de 45 ans (IQR : 38-51).

Le CNR associé delta, à travers son expertise, a vérifié des résultats discordants de charge virale du VHD et/ou de sérologie delta. Depuis 2 ans, le laboratoire associé delta a été également sollicité sur des dossiers pour lesquels une sérologie delta s'était trouvée positive alors que les patients étaient AgHBs-négatif. Cette expertise a concerné 23 dossiers en 2023.

En plus de ces activités rapportées dans le **Tableau 3**, le laboratoire associé delta a réalisé de nombreuses analyses de diagnostic virologique de 1^{ère} ligne, que ce soit pour la sérologie ou la charge virale du VHD. Ces activités sont comptabilisées dans le bilan du laboratoire de microbiologie clinique et non dans celles du CNR. Pour

information, en dehors du groupe hospitalier HUPSSD, un total de 1229 sérologies et 1802 charges virales VHD ont été réalisées au cours de l'année 2023.

Le laboratoire associé delta a organisé en novembre 2023 un Contrôle National de Qualité (CQ) portant sur le diagnostic moléculaire de l'infection par le VHD. L'objectif principal était d'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 du VHD de 4 échantillons cliniques (matrice plasma). Les 4 échantillons ont été testés au préalable en *triplicata* avec la trousse de RT-PCR en temps réel utilisée en routine au sein de notre laboratoire. Ces souches ont également fait l'objet d'un séquençage complet. Parmi les laboratoires participants, 12 ont rendu les résultats dans les délais. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 5**.

Tableau 5 : Résultats attendus du CQ 2023

Échantillon	Génotype	ARN VHD (UI/mL)	ARN VHD (Log UI/mL)	Coefficient de variation (%)
CNQ2023-ARNVHD1	5	4 854	3,66	4,95
CNQ2023-ARNVHD2	1	1 165	3,06	1,84
CNQ2023-ARNVHD3	8	16 017	4,15	6,02
CNQ2023-ARNVHD4	NA	<50	<1,7	NA

Nous avons demandé aux laboratoires répondeurs de préciser Les techniques d'extraction des ARN (automate, volumes d'échantillon et d'élution), ainsi que celles d'amplification (test et thermocycleur) ont été renseignées par les laboratoires. Les réponses sont présentées dans le **Tableau 6**. Une grande diversité d'extracteurs d'acides nucléiques est observée (7 automates différents en 2023, *versus* 5 en 2022).

Tableau 6 : Automates utilisés pour l'extraction, volume de prise d'essai et volume d'élution

Méthodes	Altostar (Altona)	EasyMag EMAG (bioMérieux)	EZ1 QiAsymphony (Qiagen)	InGenius (ELITechGroup)	Janus Chemagic (PerkinElmer)	m2000sp (Abbott)	Magnapure Compact (Roche)
Nombre de centres	1	4	3	1	1	1	3
Volume de prise d'essai (µL)	500	200 à 500	200 à 1000	600	500	500	200 ou 500
Volume d'élution (µL)	45	50 ou 70	60	50	100	110	50 ou 100
Contrôle interne (CI)	AltoStar	ARN endogène	ARN endogène ou GAPDH	-	ARN endogène	ARN endogène	ARN endogène

Concernant les résultats quantitatifs, ce contrôle de qualité a montré une concordance entre les centres utilisant le kit commercial Eurobioplex HDV kit et les centres utilisant un kit de la société Altona ou une technique « maison ». (**Figure 7**). Toutes les souches ont été détectées quel que soit le génotype (VHD -1, -5 et -8). Seul le centre 4, qui utilise une technique « maison », a produit des résultats avec une sur-quantification d'environ 1 log l'ensemble des CV VHD. L'amplitude des écarts de charge virale obtenue entre les différents laboratoires pour chacun des échantillons est maintenant comprise entre 1 et 1,5 log UI/mL (en excluant les résultats du centre 4). On observe donc toujours une différence entre les centres mais cette dernière est moins importante que celle observée les années précédentes. 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.

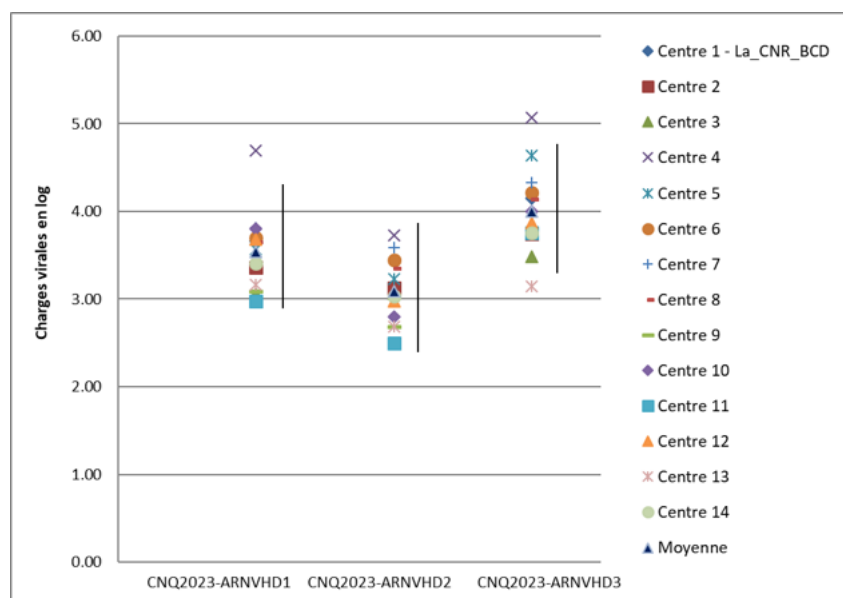


Figure 7 : Résultats de quantification de chaque échantillon par laboratoire participant. La barre verticale illustre l'intervalle de deux écarts types

Dans le cadre des enquêtes d'hémovigilance relatives au VHB (investigation sur échantillons des dons archivés en cas de séroconversion ou comportement à risque chez les donneurs de sang), le CNR coordonnateur a reçu en 2023, 35 échantillons plasmatiques et réalisé une recherche du génome viral et ou des analyses sérologiques (dépistage, confirmation, génotypage) sur :

- . 6 dons positifs ou suspects avec les résultats suivants : 2 dons ont été retrouvés AgHBs-positif avec des charges virales respectivement de 16 et 28 UI/mL ; 1 don a été contrôlé positif en anti-HBc ; 1 don a été trouvé charge virale négative (DGV pos 2/3), mais la sérologie en QBD était bien positive ; et 2 dons ont été considérés comme des faux positifs lors du dépistage en QBD.

- . 23 dons N-1

- . 3 dons suite à une information post-don (IPD)

- . 3 contrôles de donneur

Aucun don N-1 n'a été retrouvé positif pour l'ADN de l'agent concerné.

Dans le cadre des enquêtes d'hémovigilance relatives au VHC, le CNR coordonnateur a reçu 18 échantillons de plasma répartis comme suit : 14 dons IPD, 2 dons liés à une enquête ascendantes (suite à une séroconversion receveur) : donc contrôlés DGV négatif, 1 don N-1 et 1 contrôle de donneur

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 GENOBIOMICS
	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	Surveillance des hépatites B, C et delta

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) 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) 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 :
Précisez ici le nombre de souches séquencées dans l'année
Nombre de souches séquencées par NGS ou métagénomique Shotgun en 2023 : 243 Nombre de souches séquencées par méthode Sanger en 2023 : 701
Séquençage systématique de tous les échantillons

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :
--

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

Dans les bases de données fermées : **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 a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?

☐ NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
☒ OUI	Interne au CNR : plateforme de biologie moléculaire du laboratoire
	Sanger : ABI3500 Dx, SeqStudio
	NGS : Illumina (MiSeq et NextSeq550), ThermoFisher (S5 et Genexus), Oxford Nanopore Et plateforme GENOBIONICS associée au CNR coordonnateur

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 phylogénétiques (ex : Clustal, NJ, Seaview, Beast, IQTree ...), des outils bio-informatiques internes d'analyses de données de séquençage NGS (PyroEdit, scripts internes) ainsi que les outils d'analyses statistiques (ex : « R ») Collaborations avec les experts des services intra-GH ; collaboration avec les experts du CNR coordonnateur (Christophe Rodriguez) ; accès aux plateformes bio-informatiques de l'AP-HP (Moabi) ; collaborations internationales (Stéphane Hué, Epidemiology and Bioinformatics at The London School of Hygiene and Tropical Medicine, UK)

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 et 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 phylogénétiques réalisées en routine pour la surveillance épidémiologique des souches
Analyses de datation moléculaire et de phylogéographie pour étudier l'origine du VHD
Quantification de l'Editing du VHD comme marqueur d'infection

Séquençage utilisé à des fins d'investigations d'épidémies :
Sans objet
Nombre de souche séquencées en 2023 : 147
Séquençage systématique des échantillons collectés chez tout nouveau patient
Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

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, plateforme MOABI
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 et également de l'Europe frontalière avec la France (activité en augmentation).

Dans le cadre de la surveillance épidémiologique des souches de VHD circulantes, le résultat de génotypage est adressé au laboratoire demandeur. Cette donnée est utilisable par le laboratoire pour ses propres communications et travaux de recherche. Le partage de la séquence nucléotidique est possible, mais doit faire l'objet d'une convention entre le laboratoire associé delta et le laboratoire demandeur.

3. Activités de surveillance

L'activité de surveillance au cours de l'exercice 2023 s'est focalisée sur la surveillance des virus d'hépatites au sein de la population fréquentant les structures médico-sociales d'addictologie (CSAPA/CAARUD), sur la surveillance des hépatites B et C à travers les Centres Experts en Hépatologie, 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 6 centres tertiaires sur la période 2018-2022, sur la surveillance de la résistance du VHC aux AAD et du VHB aux analogues nucléos(t)idiques, et sur l'étude de la diversité génétique des souches delta circulantes. L'activité de surveillance s'est également intéressée à 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 au sein de la population fréquentant les structures médico-sociales d'addictologie, le réseau de partenaires est essentiellement basé sur les CSAPA (Centres de Soins, d'Accompagnement et de Prévention en Addictologie) et CAARUD (Centres d'Accueil et d'Accompagnement à la Réduction des risques pour Usagers de Drogues). Ces structures, au nombre de 13 en 2023, sont réparties plutôt au Nord de la Loire (**Figure 8**).



Figure 8 : Répartition géographique des structures médico-sociales (n=13).

Dans le cadre de la surveillance de la résistance du VHC ou du VHB, respectivement aux antiviraux à action directe (AAD) et aux analogues nucléos(t)idiques, 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 9**).



Figure 9 : Répartition géographique des laboratoires participant à la surveillance de la résistance du VHC et du VHB respectivement aux AAD et aux analogues nucléos(t)idiques.

Dans le cadre de la surveillance de la circulation des souches delta, un réseau de laboratoires publics et privés a été mis en place. Le détail des laboratoires est précisé ci-dessous :

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

Hôpitaux hors AP-HP : Amiens, Angers, Auxerre, Besançon, Brest, CHI Créteil, Clermont-Ferrand, Dax, Dijon, Fougères, Levallois, Lille, Limoges, Mâcon, Montpellier, Nancy, Narbonne, Nîmes, Nice, Orléans, Poissy-St-Germain, Poitiers, Reims, Rennes, Rouen, Strasbourg, Suresnes, Tours, Versailles,

Laboratoires privés de biologie médicale : partenariat avec le laboratoire Cerba, pour un envoi de toutes leurs nouvelles souches VHD-positif ; 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 13 laboratoires répartis sur l'ensemble du territoire participe au contrôle national de qualité portant sur le diagnostic moléculaire du VHD, organisé par le laboratoire associé delta (**Figure 10**).

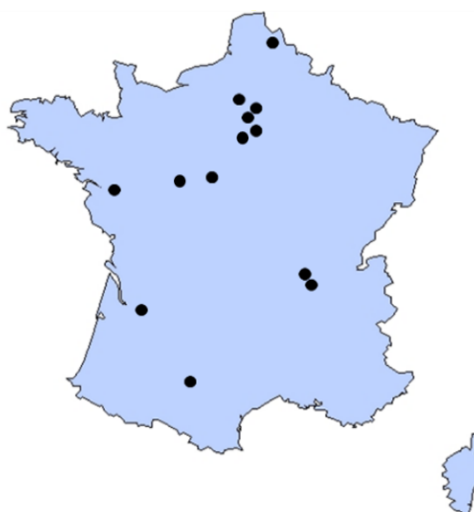


Figure 10 : Répartition géographique des laboratoires participant au contrôle de qualité moléculaire du VHD (n=13)

Dans le cadre de la surveillance des donneurs de sang, le laboratoire collabore étroitement avec l'EFS, CSA, SpF et l'ANSM. Quelques discordances entre le nombre de dons reçus par la plasmathèque nationale de l'EFS et la surveillance épidémiologique des donneurs de sang (données SpF), en particulier vis-à-vis de dons en attente en provenance des territoires ultra-marins. Par conséquent, la représentativité pour le VHB est de 94% et 97% pour le VHC.

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

Dépistage des hépatites virales (et du VIH) dans les structures médico-sociales d'addictologie. A partir de buvards (spots de sang séché) mis à la disposition des structures médico-sociales d'addictologie, le dépistage et le diagnostic des virus d'hépatites B, C et delta ainsi que du VIH sont ainsi réalisés. La détection de marqueurs sérologiques (anticorps totaux VHC, VHD, 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 2023, 150 sujets, majoritairement masculins (77,7%), âgés en moyenne de 42,9±10,3 ans ont été dépistés. Soixante-huit sujets ont rapporté un ou plusieurs facteurs de risque (consommation de substances psychoactives, injections, rapports sexuels non protégés...). La sévérité de la maladie hépatique était renseignée dans uniquement 28 cas, essentiellement par FibroScan® (médiane d'élasticité : 5,0 kPa) ; tous sauf 3 cas avaient une fibrose peu ou pas sévère. Parmi les 128 sujets dépistés pour le VHB, 5 (3,9%) étaient positifs pour l'AgHBs (également positif pour les anticorps HBc) et 2 (40%) avaient un ADN détectable. Aucun de ces 5 patients AgHBs-positif n'était coinfecté par le VHD. L'ADN du VHB était indétectable chez les 66 sujets pour lesquels une recherche d'ADN avait été demandée. Parmi les 121 sujets dépistés pour le VIH, trois sujets (2,5%) étaient séropositifs (séropositivité connue par le CSAPA chez 2 d'entre eux). Parmi les 93 sujets dépistés pour le VHC, 33 (35,5%) étaient positifs pour les anticorps VHC. Parmi les sujets séropositifs pour le VHC, 8 avaient un ARN détectable (24,2%). Dix individus supplémentaires avaient un ARN détectable. La charge virale moyenne était de 3,6±1,1 Log UI/mL. Les génotypes les plus fréquemment isolés étaient les génotypes 3 (n=7) et 1 (n=6).

Caractéristiques cliniques et virologiques des patients pris en charge pour leur hépatite chronique B dans un centre expert. 552 patients atteints d'hépatite chronique B et suivis dans le service d'hépatologie du GH Henri Mondor ont été prospectivement inclus. Les patients étaient majoritairement des hommes (67%), âgés de 47 ans au moment de l'inclusion. 82% des patients étaient originaires d'un pays de moyenne ou forte endémie pour le VHB et 88% étaient AgHBe-négatif. A l'inclusion, le niveau de charge virale et les titres de l'AgHBs et HBcrAg étaient respectivement de 1,5 Log UI/mL, 3,6 Log UI/mL et 2,7 Log U/mL. Les génotypes E (59%), A (18,1%) et D (16,0%) étaient les plus prévalents. L'atteinte hépatique évaluée par FibroScan® montrait une valeur médiane d'élasticité de 5,0 kPa. Environ la moitié des patients (51%) étaient éligibles à un traitement antiviral par ténofovir ou entécavir.

Surveillance nationale des patients nouvellement pris en charge pour leur hépatite chronique B ± D à travers les Pôles de Référence (FPRH). Sur les bases de la surveillance mise en place par l'InVS en 2008-2012, une nouvelle étude est en cours depuis le début de la mandature, dont les objectifs sont de décrire les caractéristiques démographiques, cliniques, histologiques et virologiques des patients nouvellement pris en charge pour une hépatite B au sein des Centres Experts et de les comparer à celles des patients inclus dans la surveillance InVS 2008-2012. Le réseau de virologie de l'ANRS-MIE, recréé et ré-organisé en 2023, dispose actuellement d'un groupe « hépatites virales » co-coordonné par le directeur du CNR coordonnateur qui servira de point d'appui, avec les Pôles de Référence, pour la réalisation de l'étude. Le comité de pilotage a été constitué ; il regroupe hépatologues, virologues et épidémiologistes [Françoise Roudot-Thoraval, (épidémiologiste, hépatologue) ; Véronique Loustaud-Ratti (Présidente de la FRPH, hépatologue) ; Marc Bourlière (hépatologue) ; Vincent Leroy (hépatologue) ; Ségolène Brichler (virologue) ; Charlotte Pronier (virologue) ; Yusuke Shimakawa (épidémiologiste) ; Juliette Foucher (hépatologue) ; Cécile Brouard (épidémiologiste) ; Cynthia Tamadjou (épidémiologiste) ; Florence Lot (épidémiologiste)]. Une ARC a été recrutée et chargée de coordonner l'étude. L'Unité de Recherche (URC) Clinique Henri Mondor a été contactée. Elle accompagnera ce projet dans sa mise en place auprès des Centres Experts. La rédaction de l'eCRF est en cours de finalisation. Les techniques de séquençage du génome entier du VHB ont été développées et sont disponibles. Le travail de configuration du séquençage du génome entier du VHD se poursuit. La structure très particulière de ce génome pose encore quelques problèmes techniques sur lesquels la plateforme de séquençage travaille en collaboration avec les deux laboratoires du CNR. Le recueil des données démarrera courant 2024.

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 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 1,2 Log 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. 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 (Ingiliz et al., J Hepatol 2023 ;78(S1) :S1106-S1107).

Prévalence de l'hépatite delta chez les patients nouvellement dépistés pour l'AgHBs dans 6 centres hospitaliers universitaires entre 2018 et 2022. Malgré la recommandation de dépistage systématique des sujets nouvellement positifs pour l'AgHBs, les données de vie réelle font état d'un faible taux de dépistage, et cette proportion varie en fonction de la population, des territoires et des pratiques de chaque centre. Notre étude a évalué la cascade de diagnostic de l'infection par le VHD dans 6 centres tertiaires sur une période de 5 ans (2018-2022), et a décrit les caractéristiques des patients VHD-positifs. Au total, 5748 sujets nouvellement positifs pour l'AgHBs (84,9%) ont été dépistés pour l'hépatite delta. Le taux de dépistage variait de 63% à 97% en fonction de la stratégie de dépistage menée dans les centres, incluant ou non le test réflexe (recherche des anticorps delta sur le même prélèvement ayant servi au dépistage de l'AgHBs). La prévalence de l'infection delta était de 6,3% (intervalle de confiance à 95% [IC] : 5,7%-7,0%). La recherche de l'ARN VHD a été réalisée chez 285 des 364 patients anti-HD positifs (78,3%), et 167 (58,6%, IC95% : 52,8%-64,2%) avaient une infection active (**Figure 11**). Plus de deux-tiers des patients (66,8%) étaient de sexe masculin avec un âge moyen de 43,9 ans. Au total, 97,5% étaient nés à l'étranger et 92,9% étaient AgHBe-négatifs. Au moment du diagnostic, le taux d'ARN du VHD était de 6,0 Log UI/mL tandis que le taux d'ADN VHB était de 2,3 Log UI/mL ; 60,1% avait des ALAT >40 U/L, et 60,5% avaient une fibrose avancée ($\geq F2$), dont 37,9% une cirrhose. Le génotype le plus répandu était le HDV-1 (75,4%). Les coinfections n'étaient pas rares : 7,4% étaient séropositifs pour le VIH et 14,6% pour le VHC (**Tableau 7**) (Brichler et al., article soumis).

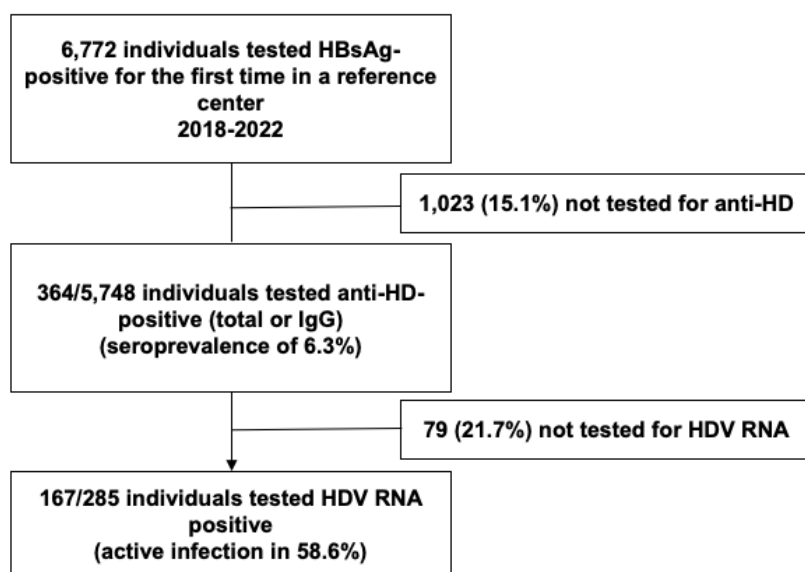


Figure 11 : Flow-Chart des patients dépistés pour la première fois pour l'AgHBs dans 6 centres tertiaires de référence au cours de la période 2018-2022.

Tableau 7 : Caractéristiques des patients ayant une infection delta (n=268)

Age moyen$\pm$DS (années)	43,9 $\pm$ 12,6
Sexe masculin [n (%)]	179 (66,8)
IMC médian (kg/m²) [IQR]	25,8 [22,6-30,0]
Consommation excessive alcool [n (%)]	33 (18,4)
Usage de drogues IV [n (%)]	20 (21,5)
Pays de naissance [n (%)]	
France	6 (2,5)
Europe (hors France)	70 (29,5)
Afrique du Nord	8 (3,4)
Moyen-Orient	5 (2,1)
Asie	24 (10,1)
Afrique sub-Saharienne	121 (51,1)

Amérique du Nord	2 (0,8)
Amérique du Sud	1 (0,4)
Coinfections [n (%)]	
VIH	18 (7,4)
VHC	35 (14,6)
AgHBe-négatif [n (%)]	235 (92,9)
ADN détectable [n (%)]	194 (76,4)
Charge virale médiane (ADN VHB) (Log UI/mL [IQR])	2,3 [1,6-3,3]
ADN VHB >2000 UI/mL [n (%)]	37 (14,6)
Titre de l'AgHBs médian (Log UI/mL [IQR])	3,7 [3,0-4,2]
Génotype VHD [n (%)]	
HDV-1	89 (75,4)
HDV-5	23 (19,5)
HDV-6	3 (2,5)
HDV-7	1 (0,8)
HDV-8	2 (1,7)
Score de fibrose [n (%)]	
Fibrose significative ($\geq$ F2)	115 (60,5)
Cirrhose	72 (37,9)
ALAT médian (U/L [IQR])	51 [28,2-88,0]
ALAT >40 [n (%)]	155 (60,1)
ASAT médian (U/L [IQR])	48 [33-83,5]
Plaquettes x10⁹/L médian [IQR]	174 [114-219]

Surveillance de la diversité génétique des souches circulantes du VHD. L'activité de surveillance de la diversité des souches circulantes de VHD s'est poursuivie en réalisant le génotypage systématique de toutes les souches ARN-positif. La quantification de l'ARN VHD a été réalisée par le laboratoire associé delta (n=83) ou un laboratoire de virologie partenaire (Pitié, Nantes ou Cerba) qui a adressé une aliquote pour génotypage (n=39). Comme le montre la **Figure 12**, les nouveaux patients diagnostiqués ARN du VHD positif en 2023 étaient pour la majorité nés en Afrique, n=54 (48%) dont 33 dans un pays d'Afrique centrale, 19 en Afrique de l'Ouest, et 2 en Afrique de l'Est. Les patients originaires d'Europe de l'Est, n=23 (21%), étaient majoritairement originaires de Géorgie (n=12) ou de Roumanie (n=8).

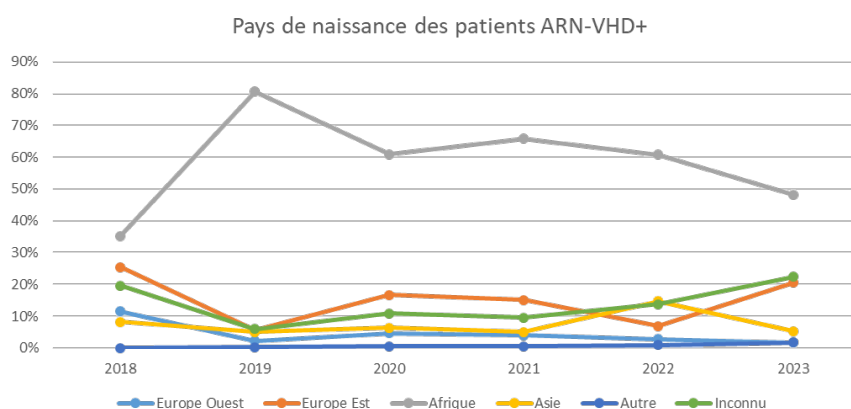


Figure 12 : Pays de naissance des patients nouvellement positifs pour l'ARN du VHD.

La répartition des génotypes est également stable au cours du temps. Le génotype VHD-1, ubiquitaire, reste largement majoritaire (75%). En 2023, seuls les génotypes VHD-1, -5, -6 et -7 ont été mis en évidence, à des taux similaires aux années précédentes (**Figure 13**).

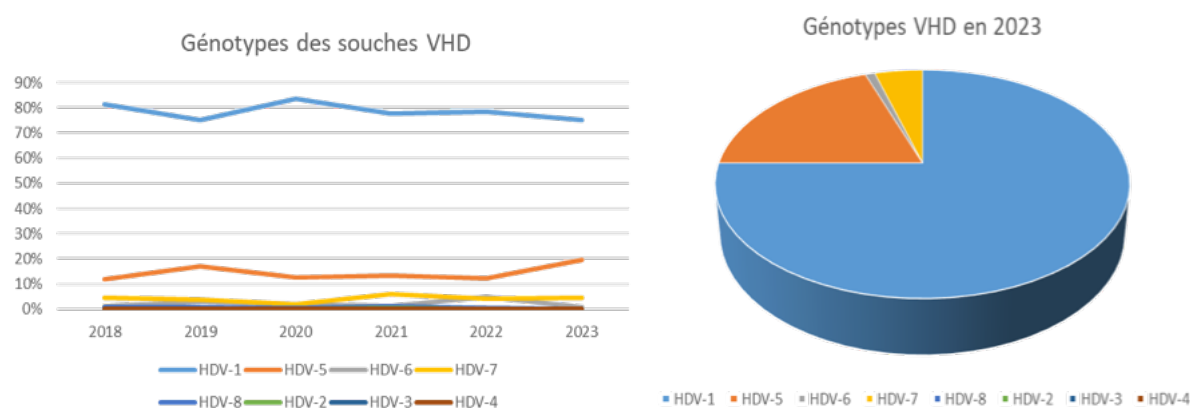


Figure 13 : Répartition des génotypes du VHD au cours du temps.

Surveillance des infections à 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 14 et les caractéristiques des dons positifs sont présentées sur les figures suivantes (Figures 15, 16 et 17).

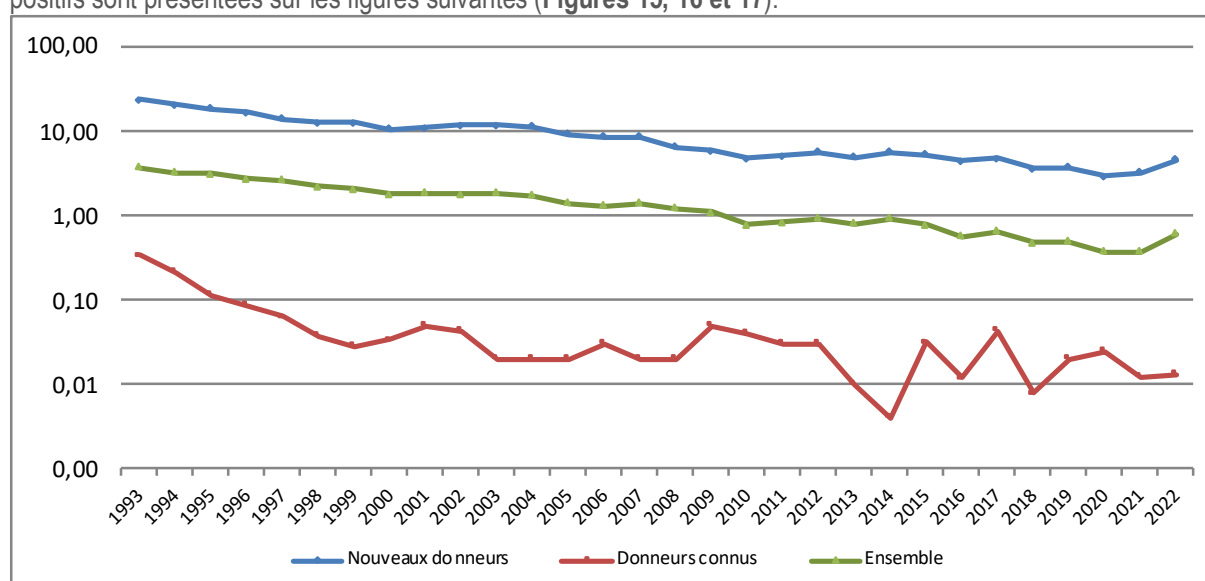


Figure 14 : Évolution du taux de dons VHB-positif observés pour 10000 dons parmi les dons de sang collectés de 1993 à 2022 (échelle logarithmique).

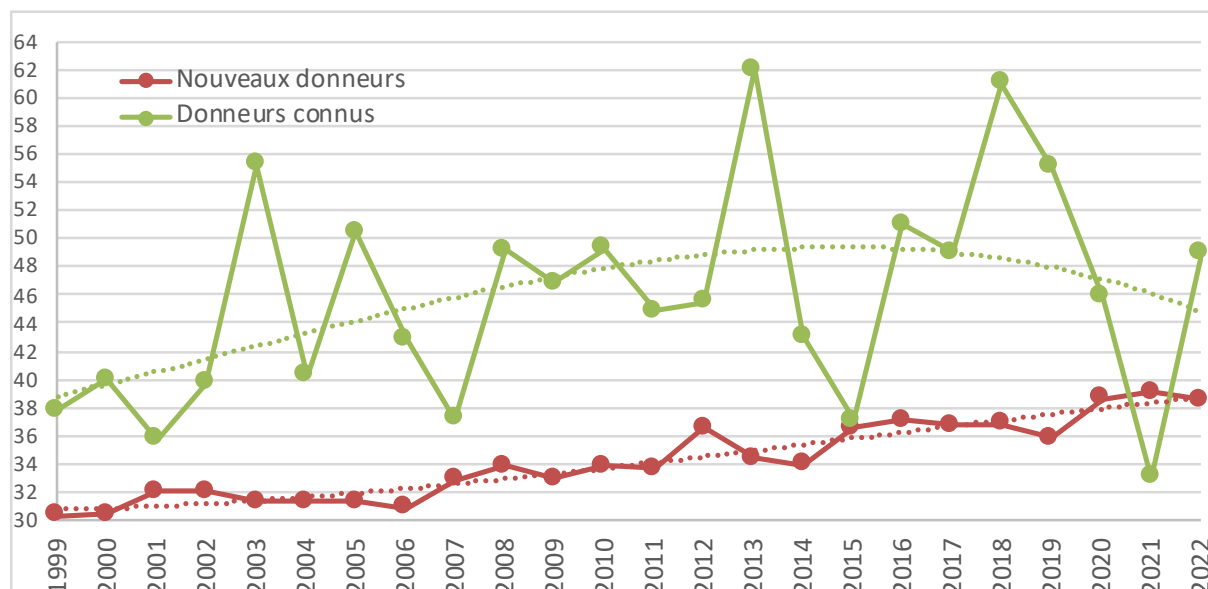


Figure 15 : Évolution de l'âge moyen des donneurs VHB-positif entre 1999 à 2022 selon leur statut.

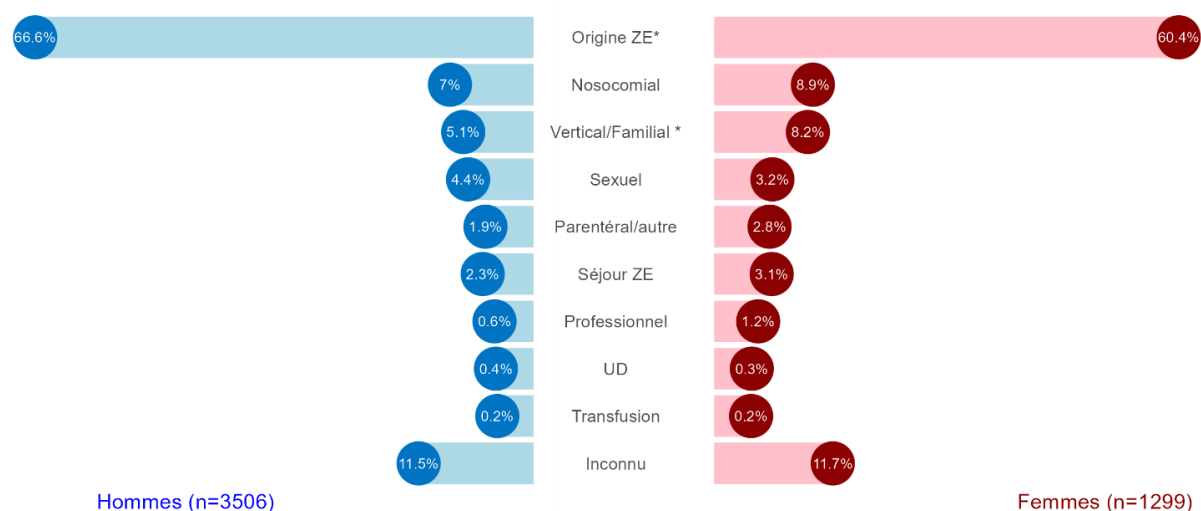


Figure 16 : Facteurs de risque hiérarchisés chez les nouveaux donneurs VHB-positif en France métropolitaine en fonction du sexe entre 1998 et 2022 (n = 4805) (autre = tatouage, piercing, acupuncture. * différence significative entre les hommes et les femmes, après correction de Bonferroni).

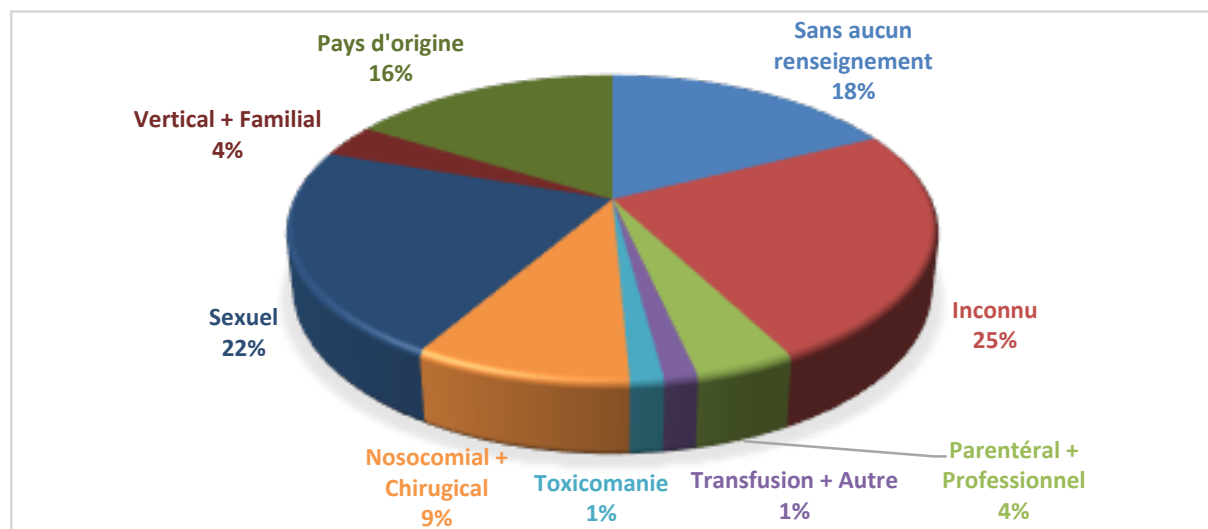


Figure 17 : Évolution de la répartition des facteurs de risque hiérarchisés chez les donneurs de sang réguliers

(connus) VHB-positif (n=142) en France métropolitaine entre 1998 et 2022.

89% des dons VHB-positif sont anticorps HBe positifs/AgHBe négatifs, cette proportion est stable dans le temps (5514/6199 dons). 4,0% des donneurs AgHBs-positif testés pour ce marqueur ont des anticorps anti-HBs à taux faible sans lien avec le génotype ni avec l'existence de mutations du gène S (data non montrées).

L'analyse moléculaire comprend la détermination du génotypage et la mise en évidence 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) et une région chevauchant la polymérase du virus (cible des molécules antivirales) et la boucle antigénique de l'AgHBs (région amplifiée : nucléotides 271 à 1140 sur la séquence de référence NC_003977). Sur 3 894 dons ADN VHB-positif collectés entre 2005 et 2022, 3 797 (97,5%) ont pu être analysés. Parmi ces 3 797 dons, 319 (9,2%) n'étaient pas génotypables (**Figure 18**).

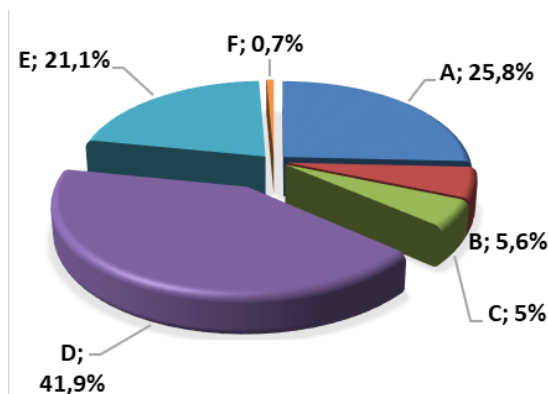


Figure 18 : Distribution globale des génotypes VHB chez les donneurs de sang (2005-2021).

Le génotype D était le génotype le plus fréquent (41,9% avec des extrêmes de 30% en 2019 et 53% en 2015). Les génotypes B, C et F étaient stables au cours du temps et occupaient à eux 3 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 (A : Europe et Afrique, B et C : Asie, D : bassin méditerranéen et Europe, E : Afrique). Pour les génotypes B et C, les charges virales moyennes étaient significativement plus élevées par rapport aux autres génotypes ($p < 0,0001$) (**Figure 19**).

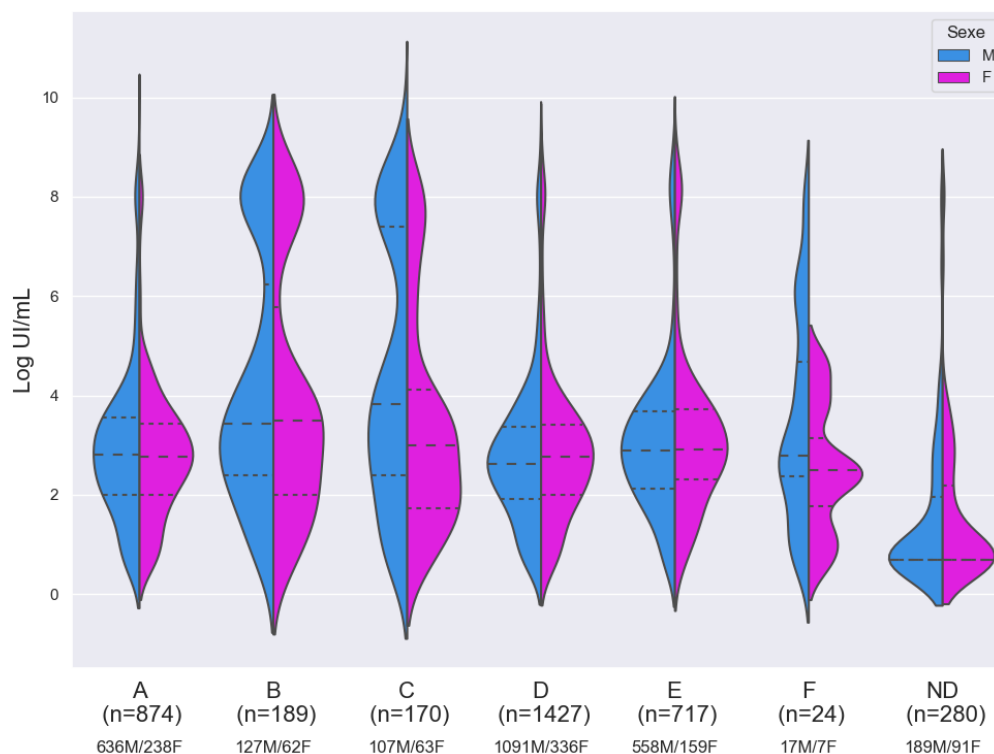


Figure 19 : Répartition des charges virales (Log UI/mL) en fonction du génotype du VHB chez 3 681 donneurs de sang entre 2005 et 2022 (ND : génotype non déterminé ; traits en pointillés serrés : quartiles, trait en pointillés : médiane).

Entre 1997 et 2022, 2% 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'élevait à 1,4%. La quantification de l'ARN VHD, réalisée sur 82 échantillons, a identifié 22 souches (24,7%) avec une charge virale détectable (10^2 - 10^9 copies/mL). Dix-neuf souches étaient de génotype HDV-1, une de génotype HDV-6, une de génotype HDV-7 et une de génotype HDV-8. Cinq souches HDV-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 dons ARN VHD négatifs (médiane à 875 UI/mL). La surveillance prospective de la séroprévalence des anticorps delta chez les donneurs AgHBs-positif montrait des fluctuations autour de 2% (**Figure 20**).

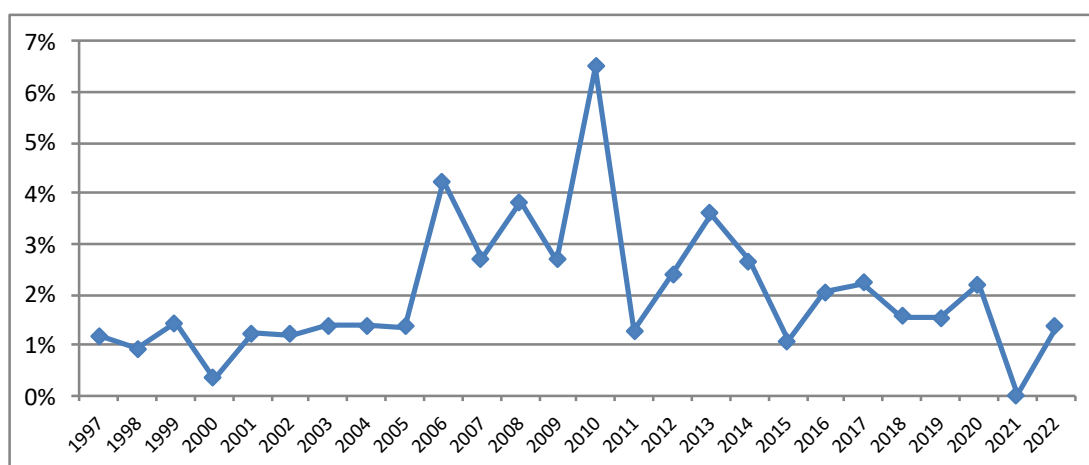


Figure 20 : Évolution de la séroprévalence du virus Delta chez les donneurs de sang de 1997 à 2021.

Surveillance des infections à 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 21** et les caractéristiques des dons positifs sont présentées dans les figures suivantes (**Figures 22, 23 et 24**).

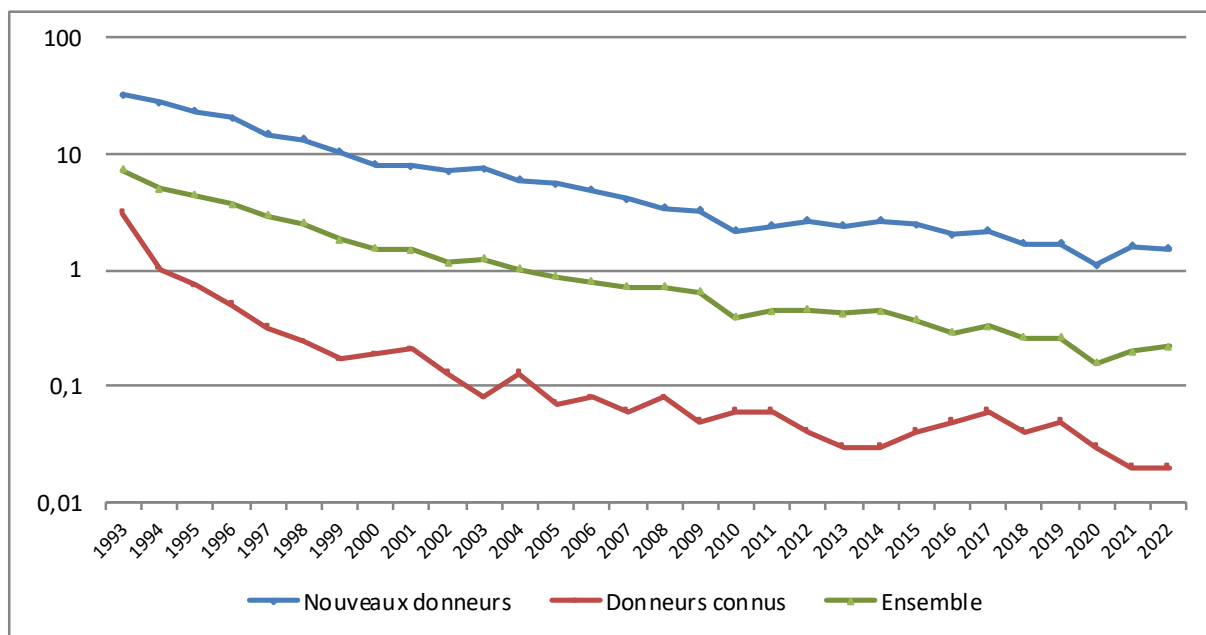


Figure 21 : Évolution du taux de dons VHC-positif observés pour 10000 dons parmi les dons de sang collectés de 1993 à 2022 (échelle logarithmique).

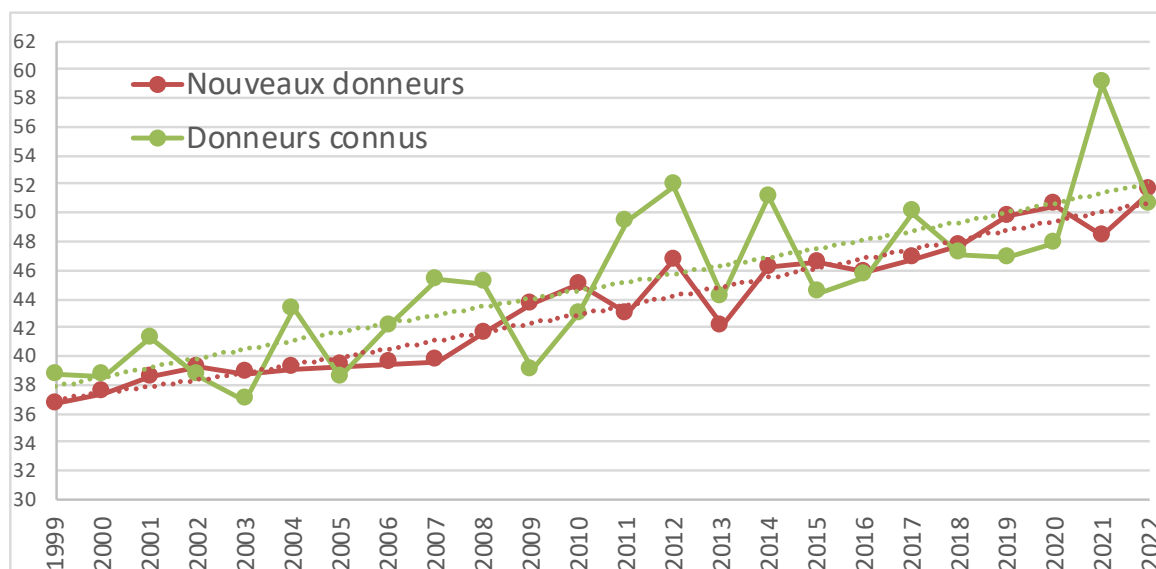


Figure 22 : Évolution de l'âge moyen des donateurs VHC-positif entre 1999 à 2022 selon leur statut.

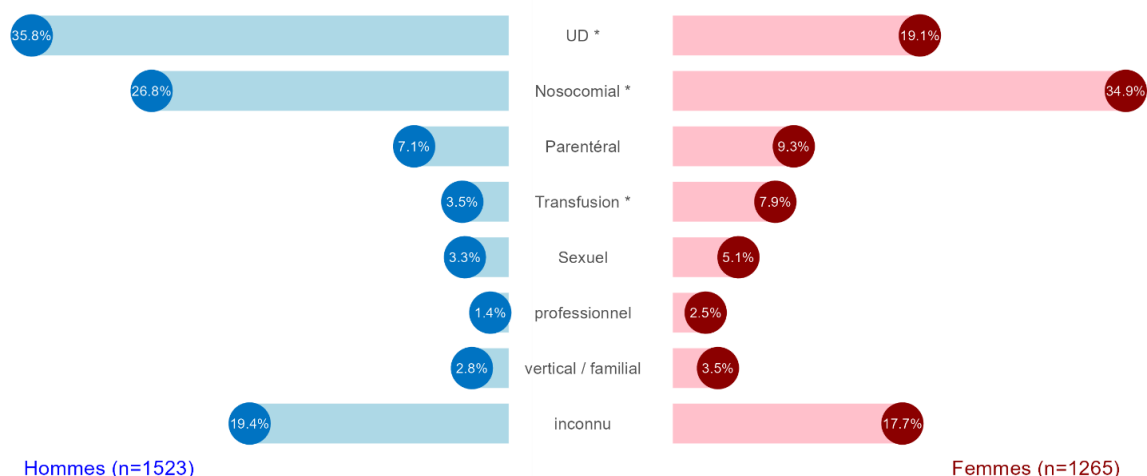


Figure 23 : Répartition des facteurs de risque hiérarchisés retrouvés chez les nouveaux donneurs VHC-positif interrogés lors de l'entretien post-don (1998-2022 ; n = 2788) (UD : usage de drogue ; * Différence significative entre donneurs masculins et féminins, après correction de Bonferroni).

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 était l'usage de drogue alors que chez les donneurs sang de sexe féminin il s'agissait d'un risque nosocomial (**Figure 23**). Toutefois, on notait une diminution du risque toxicomanie chez les hommes durant la dernière décennie au profit du risque nosocomial (39% entre 1998 et 2010 contre 27% entre 2011 et 2022). A noter que pour environ 18,6% des donneurs le facteur de risque n'était pas identifié. Chez les **donneurs connus**, l'usage de drogue était également le risque majoritairement rapporté chez les donneurs masculins, alors que les donneurs féminins, le risque nosocomial et le risque sexuel étaient tous deux majoritaires et en proportion équivalente (**Figure 24**).

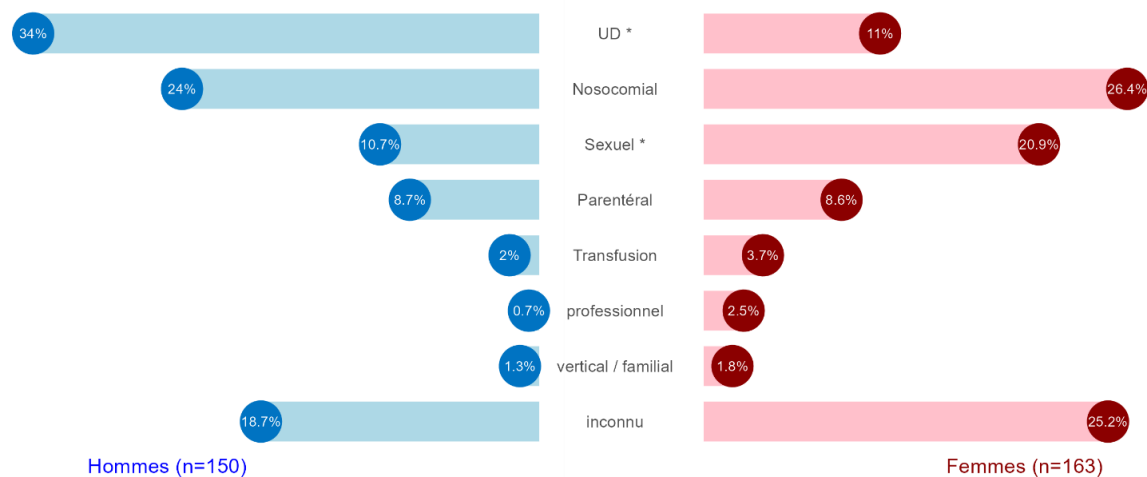


Figure 24 : Répartition des facteurs de risque hiérarchisés retrouvés chez les donneurs réguliers (connus) VHC-positif interrogés lors de l'entretien post-don (1998-2022 ; n = 313) (UD : usage de drogue ; * Différence significative entre donneurs masculins et féminins, après correction de Bonferroni).

Sur la période 2000-2021, le laboratoire a reçu 3 169 échantillons de donneurs VHC-positif. On note une chute progressive de la proportion des donneurs virémiques avec une réduction de moitié entre 2001-2003 et 2019-2021 (**Figure 25**). Sur la période 2001-2021, seuls 8 échantillons ont fourni des résultats discordants entre DGV et PCR alternative. Sur 2022, on note 3 résultats discordants, probablement dû au changement de technique du DGV. Les résultats négatifs ayant été testés en triplicate au laboratoire, il s'agit probablement de charges virales extrêmement faibles.

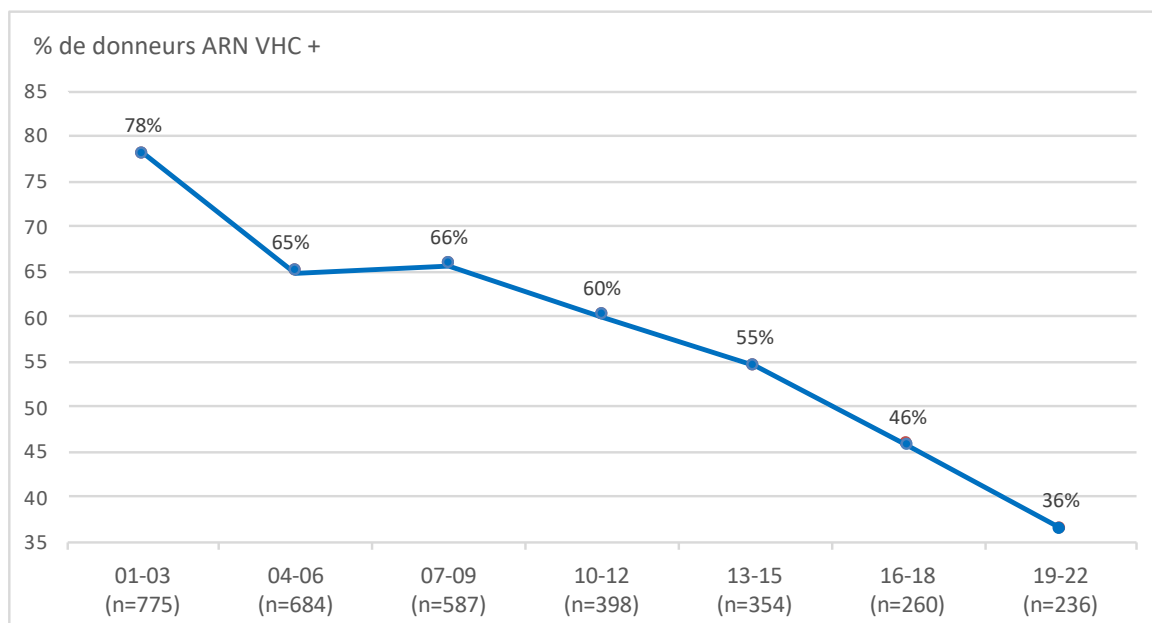


Figure 25 : Évolution de la proportion de donneurs virémiques (sur la base du DGV) parmi des donneurs VHC-positif (2001-2022).

Jusqu'en 2020, la détermination du génotype était 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 pour certains échantillons. Depuis 2021, le séquençage des échantillons VHC-positif 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 d'une portion de la région NS5B est réalisé. La répartition des génotypes était stable dans le temps (**Figure 26**), et il existait une différence significative dans la répartition des facteurs de risques en fonction des génotypes : les génotypes 1b et 2 étaient plus souvent retrouvés dans un contexte nosocomial alors que les génotypes 1a, 3a et 4 dans un contexte d'usage de drogues par voie intraveineuse ($p < 0,001$) (**Figure 27**).

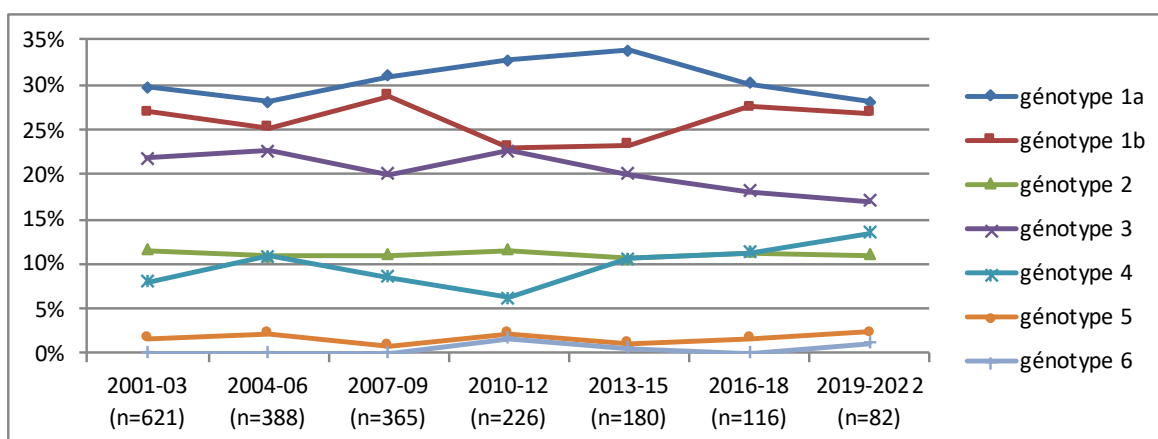


Figure 26 : Évolution des proportions relatives (en %) des génotypes du VHC chez les donneurs de sang virémiques pour la période 2000-2022 (n=2 204 soit 92,0% des 2 365 ARN positifs).

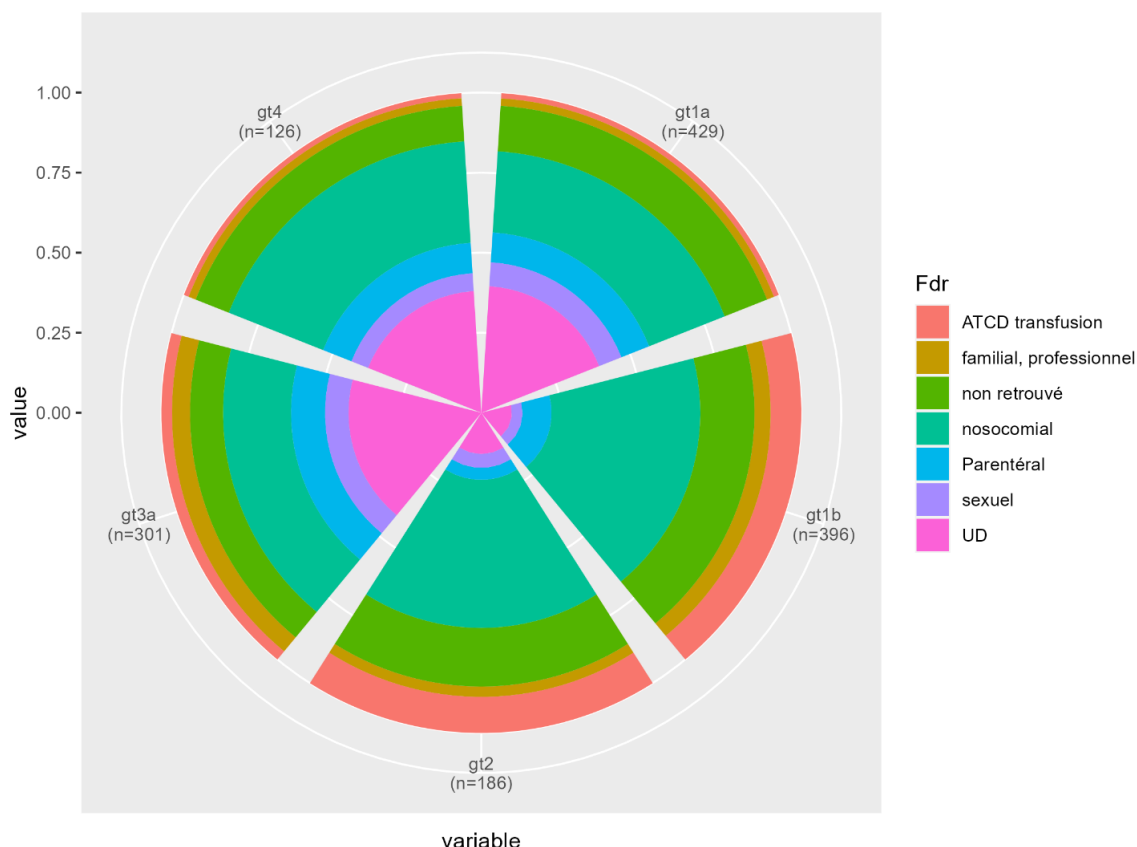


Figure 27 : Répartition des facteurs de risque du VHC (hiérarchisés) chez les donneurs de sang en fonction du génotype sur la période 2000-2022 (nombre de dons comptabilisés pour l'analyse indiqués après chaque génotype). Seuls les génotypes 1a, 1b, 2, 3a et 4 ont été pris en compte, les autres génotypes étant trop peu représentés.

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

Surveillance de la résistance du VHC aux antiviraux à action directe (AAD). Depuis 2016, trois combinaisons sont disponibles pour le traitement de l'infection par le VHC (SOF/VEL, SOF/VEL/VOX et G/P). Les AAD sont puissants, et ce quels que soient le génotype viral et la sévérité de la maladie (RVS >98%, y compris en cas de cirrhose compensée), et bénéficient d'une excellente tolérance, d'une courte durée de traitement (8-12 semaines dans la grande majorité des cas), d'une posologie orale en une prise quotidienne et d'un faible taux d'échec thérapeutique lié à la résistance). En effet, les échecs virologiques (principalement des rechutes) sont rares, excepté 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 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 (Vela Diagnostics GmbH). Au total, 75 patients (âge moyen 55,9±13,8 ans, 72% d'hommes) ont été analysés en 2023. La charge virale moyenne était 5,9±1,2 Log UI/mL. Les traitements antiviraux étaient G/P±SOF (n=14), SOF/VEL±RBV (n=8) ou SOF/VEL/VOX (n=1). La répartition des génotypes était la suivante : 47% de génotype 1 (n=35), 8% de génotype 2 (n=6), 24% de génotype 3 (n=18), 19% de génotype 4 (n=14), et 1% de génotype 5a (n=1).

Par séquençage haut débit, 64% (48/75) des patients présentaient une ou plusieurs RAS dans une (n=35 patients), 2 (n=13 patients) régions ciblées par les AAD. Aucun patient ne présentait de RAS dans les 3 régions ciblées par les AAD. Plus de la moitié des patients (54%) 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 8).

Tableau 8 : Profils de résistance des régions NS3, NS5A et NS5B

	Sentosa SQ HCV Genotyping Assay 2.0
--	-------------------------------------

	NS3	NS5A	NS5B
Proportion of Pts with RAS, [% (n)]	22% (17)	54% (41)	4% (3)
RAS (n)			
Single mutant	15	12	1
Double mutants	2	22	1
Triple mutants	0	4	1
Quadruple	0	3	0
Most frequent RAS (position, n)	36 (V36L ; n=3) 80 (Q80L/Q; n=3) 168 (D168E; Q168L; n=4)	30 (Q/L/A30K/R/C/S; n=22) 31 (L/M31M/V/R/L; n=17) 93 (Y93H/N; n=11)	556 (S556R/G; n=2)

Surveillance de la résistance du VHB aux analogues nucléos(t)idiques. En ce qui concerne la surveillance de la résistance du VHB aux analogues nucléos(t)idiques (entécavir et ténofovir), 24 laboratoires répartis sur le territoire national ainsi que dans les DROM (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 analogues nucléos(t)idiques. Au total, 70 patients (âge moyen 46,0±17,6 ans, 70% d'hommes) ont été analysés en 2023. La charge virale moyenne était de 5,3±1,7 Log UI/mL. Les traitements antiviraux étaient entécavir (ETV ; n=23), ténofovir (TDF ; n=4), TDF/FTC±ETV (n=10) et ETV plus TDF (n=7). La répartition des génotypes était la suivante : 12% de génotype A (n=7), 8% de génotype B (n=5), 8% de génotype C (n=5), 20% de génotype D (n=12) et 52% de génotype de E (n=32).

Par séquençage direct, 18,6% (13/70) des patients présentaient une ou plusieurs substitutions amino acidiques (RAS pour *resistance-associated substitution*) associées ou non à des mutations compensatoires sous forme de simple (n=5 patients), double, (n=3 patients), triple (n=7 patients), quadruple (n=3 patients) et quintuple (n=1 patient) mutants. Les positions les plus fréquemment mutées étaient les positions 204 (M204V/I, n=10 patients), 180 (L180M ; n=8 patients) et 250 (M250V/L ; n=4 patients) (**Tableau 9**).

Tableau 9 : Profils de résistance du VHB aux analogues nucléos(t)idiques

	“Population sequencing” (in-house method)
Proportion pf Pts with RAS, [% (n)]	18.6%
RAS (n)	
Single mutant	3
Double mutants	4
Triple mutants	4
Quadruple mutants	2
Most frequent RAS (position, n)	204 (M204V/I; 10 patients) 180 (L180M; 8 patients) 250 (M250V/L; 4 patients)

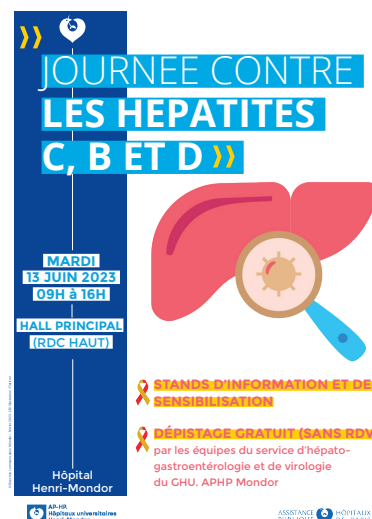
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

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 contribue également aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens et internationaux : European Blood Alliance (EBA) ou International Society of Blood Transfusion (ISBT).

Le laboratoire associé delta participe aux activités du réseau international "Hepatitis delta international Network" (HDIN) coordonné par le Pr Heiner Wedemeyer (Hannover Medical School, Germany). Ce réseau international se réunit régulièrement en marge des congrès annuels d'Hépatologie que sont l'International Liver Congress organisé par l'EASL (European Association for the Study of the Liver) et The Liver Meeting organisé par l'AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases), ou plus spécifiquement sur la thématique delta, le "Delta Cure Meeting" organisé depuis 2022. Des réunions en visioconférence ont également lieu à une fréquence de 2 par an.

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Dépistage des hépatites virales. Une journée de dépistage des hépatites virales B et C a été réalisée le mardi 13 juin 2023 dans le hall de l'hôpital Henri Mondor à l'initiative du Service d'Hépatologie en partenariat avec le CNR coordonnateur. Un test de diagnostic rapide pour l'AgHBs (TOYO HBsAg Rapid Test, Turklab) et les anticorps VHC (OraQuick HCV Rapid Antibody test, Orasure) était proposé à tout individu (consultant, accompagnant ou personnel) souhaitant se faire dépister. En parallèle, des brochures relatives aux hépatites virales étaient proposées ainsi qu'une évaluation du foie à l'aide d'un FibroScan® (examen non invasif mesurant l'élasticité du foie et qui renseigne sur une éventuelle surcharge en graisse) pour les sujets qui le souhaitaient. Au total, 120 individus comprenant 1 patient hospitalisé (0,8%), 44 consultants (36,7%), 17 accompagnants (14,2%) et 58 personnels (48,3%) ont été dépistés (âge médian 52,5 ans (35% d'hommes)). Parmi les 116 sujets dépistés pour le VHB, 1 (0,9%) était positif pour l'AgHBs. Parmi les 119 sujets dépistés pour le VHC, 1 (0,8%) était positif pour les anticorps VHC. Il s'agissait dans les deux cas de sérologies connues et suivies dans un service d'hépatologie.



4. Alertes

Transmission nosocomiale du VHC au sein du service de Néphrologie du GH Henri Mondor. Au moins d'octobre 2023 une suspicion de transmission nosocomiale du VHC impliquant 2 patients régulièrement dialysés dans l'unité d'hémodialyse du service de Néphrologie a été signalée. En effet dans le cas du bilan systématique des patients dialysés, un cas de séroconversion VHC a été constaté au mois d'août 2023. L'étude génétique et phylogénique menée au niveau de 4 régions (portion des gènes NS5B, NS3, NS5A et gène codant la glycoprotéine d'enveloppe E1) a montré que le génotype viral était identique chez les 2 individus (génotype 3a, **Figure 28**) et les séquences nucléotidiques présentaient des forts pourcentages d'homologie nucléotidique, et ce quelle que soit la région du génome viral considérée (respectivement, 99,1-100%, 99,3-100% et 99,5-100% pour les régions E1, NS3 et NS5A).

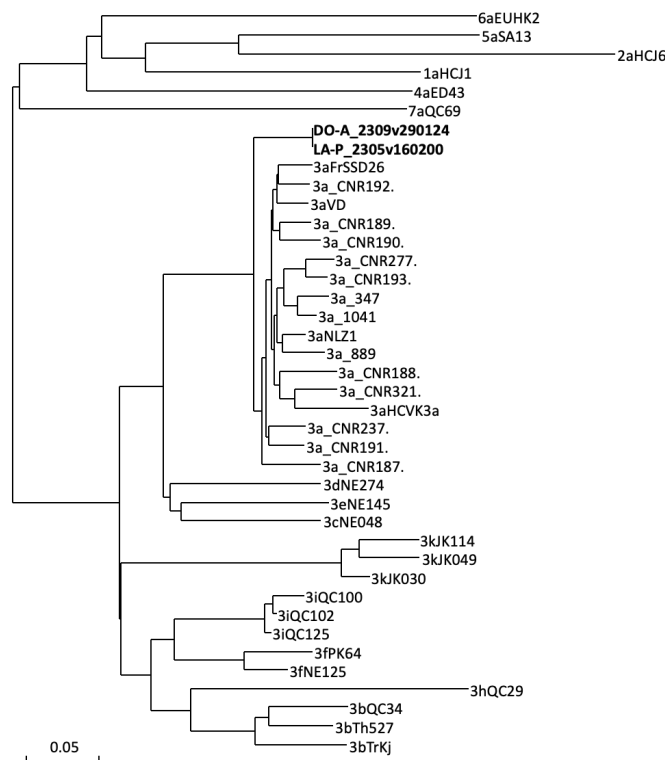


Figure 28 : Génotype et sous type par phylogénie d'une portion de la région NS5B du VHC (286 nucléotides). Analyse réalisée par DNADIST (Phylip 3.65), Kimura 2-parameter, Ts/Tv 2.0.

Défaut de quantification de la trousse AltoStar® HDV RT-PCR v1.0 vis-à-vis de certaines souches de VHD (sous-groupe de génotype HDV-1 circulant en Afrique Centrale). Cette alerte fait suite aux travaux d'évaluation des performances de la trousse réalisés en juin 2023. En effet, l'ARN VHD de 3 souches virales était fortement sous-quantifié, voire non détecté en comparaison des valeurs mesurées avec la trousse EurobioPlex EBX-071 (**Tableau 10**). Ces souches appartenaient à un même sous-groupe du génotype HDV-1 et circulaient en Afrique Centrale (Cameroun et Centrafrique) (**Figure 29**). Des résultats comparables étaient observés avec la trousse RealStar® HDV v1.0. Une expertise approfondie a donc été menée en partenariat avec les équipes du département R&D d'Altona. Au final, seules des souches génétiquement très proches, et non l'ensemble du sous-génotype, étaient concernées. La concordance des séquences des amorces et sondes était de 100%, il s'agissait d'un problème de conformation secondaire de l'ARN affectant drastiquement l'efficacité de la PCR. Des échanges avec le laboratoire de Virologie de Toulouse, utilisateur en 2023 des trousses Altona pour son activité de routine ont été entrepris, afin de les alerter et leur proposer si besoin des vérifications. Treize prélèvements ayant une charge virale VHD indétectable en Altona ont été envoyés à Avicenne et analysés avec la trousse Eurobio : aucun faux-négatif n'a été mis en évidence. Suite à ces travaux, la société Altona a décidé de modifier la composition de ses trousses RealStar® et Altostar®. La nouvelle version de la trousse AltoStar® a été testée en décembre 2023, et a permis de corriger partiellement les résultats de quantification des souches en question, sans modification des performances globales de la trousse sur les autres

souches VHD. Les versions 2.0 des troussees RealStar® et AltoStar® devraient être distribuées courant 2024.

Tableau 10 : Résultats des différentes troussees sur les 3 souches du panel pangénomique du laboratoire associé delta

Échantillon	Génotype	EurobioPlex EBX-071 (Log UI/mL)	RealStar® v1.0 (Log UI/mL)	AltoStar® v1.0 (Log UI/mL)	AltoStar® v2.0 (Log UI/mL)
Pt-1	HDV-1 Afr	2,51	1,42	0,21	2,13
Pt-2	HDV-1 Afr	3,31	0,90	0,03	2,28
Pt-3	HDV-1 Afr	4,27	1,26	0,23	3,19

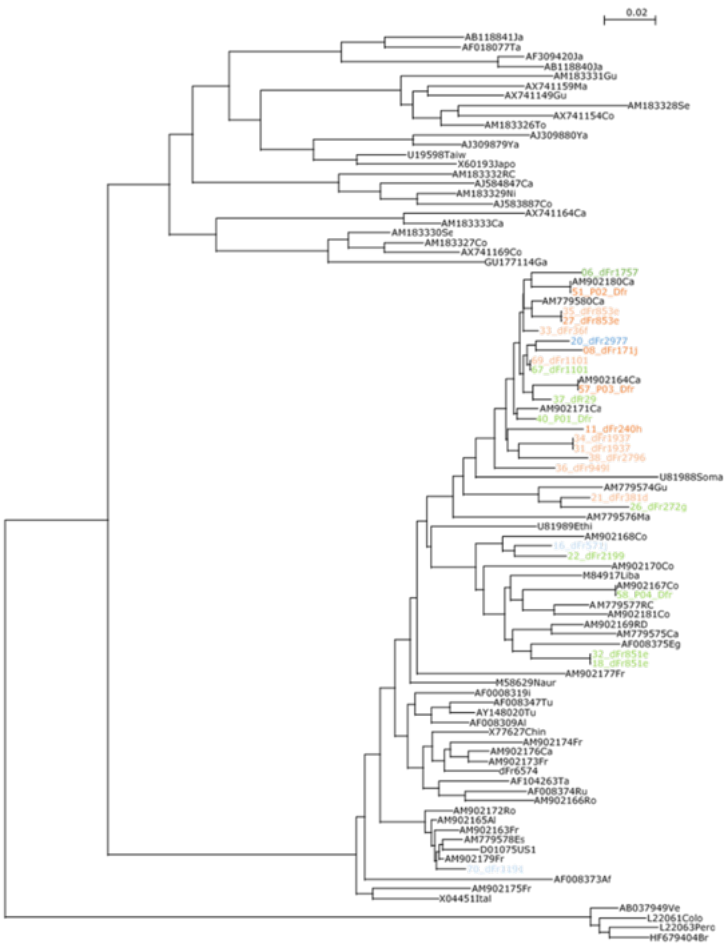


Figure 29 : Arbre phylogénétique des souches du sous-groupe de génotype HDV-1 dont l'ARN du VHD était sous-quantifié avec les troussees Altona par comparaison aux valeurs mesurées avec la trousse EurobioPlex EBX-071 (en vert et bleu : différence de quantification < 0.5 Log UI/mL versus EurobioPlex EBX-071 ; en orange : différence de quantification > 0.5 Log UI/mL).

Détection de l'ARN du VHD chez des patients séronégatifs pour le delta. Vingt-huit patients originaires de Gambie séronégatifs pour le VHD (LIAISON® XL murex anti-HDV) avaient un ARN détectable (Communication orale au 2^{ème} Delta Cure Meeting, Hannover). La question d'un éventuel défaut de sensibilité de la trousse de Diasorin a été posée, et notamment le risque de non détection éventuelle d'un sous-génotype circulant en Afrique de l'Ouest. Le laboratoire associé delta a été missionné pour investiguer ces résultats « atypiques ». Les résultats des analyses complémentaires demandées à l'équipe de Gambie devraient être disponibles courant 2024. Le laboratoire associé delta a entrepris de réaliser rétrospectivement une recherche systématique de l'ARN du VHD sur une collection >900 échantillons collectés au Sénégal, pays voisin de la Gambie, lors d'une précédente collaboration (résultats attendus en 2024).

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**
 - . Rolar Matar, Étudiante en Thèse Université à l'IMRB
 - . Aurélie Ferreira, Étudiante en Licence Professionnelle Microbiologie Industrielle & Biotechnologies (proMIB), Université Paris Cité
- **Webinaires**
 - . "Diagnostic du Virus de l'hépatite C" dans le cadre des Journée Thématique Sérologie Infectieuse à destination des personnels de santé de la Guyane et de la Guadeloupe (1^{er} et 8 juin 2023).
- **Référentiels/guides**
 - . Fiches AZAY – SFM sur le Virus de l'hépatite C et les Virus d'Hépatites B et D à destination des étudiants en 1^{er} cycle des Études Médicales
 - . Publication par la HAS en octobre 2023, et présentation officielle lors des journées de l'AFEF "Recommandations de prise en charge des personnes infectées par le virus de l'hépatite D" (pilote : Ségolène Brichler)
 - . Chapitre "Testing and diagnosis of chronic Hepatitis D" dans les prochaines recommandations de l'OMS sur le Virus de l'hépatite B (Ségolène Brichler, Frédéric Le Gal)
- **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) est très régulièrement sollicité (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

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 expert du Viral Hepatitis Prevention Board (VHPB)
- . Membre du groupe HBV Cure de l'ANRE-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 groupe Hépatites Virales du Réseau de Virologie et Pharmacologie Médicale de l'ANRS-MIE (AC43)

Slim Fourati assure les fonctions suivantes :

- . Membre élu de la Commission Scientifique Spécialisée (CSS) 5 "Immunologie, Microbiologie, Infection"
- . Membre du groupe HBV Cure de l'ANRS-MIE
- . Expert auprès de la HAS pour le rapport sur le traitement du virus de l'hépatite C

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

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 du groupe Hépatites Virales du Réseau de Virologie et Pharmacologie Médicale de l'ANRS-MIE (AC43)

Sékolène Brichler assure les fonctions suivantes :

- . Membre du groupe Hépatites Virales du Réseau de Virologie et Pharmacologie Médicale de l'ANRS-MIE (AC43)
- . Membre de l'AC45
- . Pilote du groupe de travail "Recommandations de prise en charge des personnes infectées par le virus de l'hépatite D de la HAS
- . Membre expert pour le VHD "WHO Guidelines on prevention, diagnosis, care and treatment of chronic hepatitis B infection"
- . Membre du Conseil Scientifique et du Comité de Pilotage de l'observatoire BuleDelta
- . 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
- . Membre expert pour le VHD "WHO HBV Guidelines"

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 2023, 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 2023, et ce dans des journaux à fort facteur d'impact (*Journal of Clinical Virology*, *Journal of Antimicrobial Therapy*, *Microbiology spectrum*, ...) (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 la population cristolienne ("Créteil sans hépatites") et de services de soins (service d'Accueil des Urgences), et ce 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 et les pharmaciens d'officine.

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 ses 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 anticorps HBc négatifs.

Les thématiques de recherche dans les domaines d'expertise du laboratoire associé delta 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.

Caractérisations génomique et phénotypique des mutations de résistance conférant une diminution de sensibilité du VHD au bulevirtide. Le transporteur d'acides biliaires NTCP (*sodium taurocholate co-transporting polypeptide*) quasi-exclusivement exprimé à la membrane basolatérale des hépatocytes est le récepteur d'entrée du VHB et VHD. Le bulevirtide (BLV) bloque la liaison de preS1 au NTCP au niveau des régions amino acides 84-87 et 157-165. L'efficacité et la bonne tolérance du BLV ont été rapportées dans des essais cliniques de phase 2 et 3. Par conséquent, le BLV a obtenu une approbation conditionnelle de l'Agence européenne des médicaments (EMA) en 2020 pour le traitement de l'infection chronique delta chez des patients ayant une maladie hépatique compensée. En "vie réelle", le bulevirtide induit une réduction des niveaux d'ARN VHD au cours du temps et une normalisation des transaminases chez une proportion substantielle de patients après 12 mois de traitement. La proportion de patients présentant une réponse virologique (définie comme un ARN VHD indétectable ou une diminution >2 Log par rapport à la valeur pré-thérapeutique) était de respectivement de 68% et 94% dans le groupe de patients recevant le BLV en

monothérapie ou recevant la combinaison BLV plus pegIFN. Les objectifs de cette étude sont premièrement la caractérisation génomique des génomes complets du VHD et du VHB à l'aide d'une méthode basée sur le séquençage nouvelle génération récemment développée dans le laboratoire en partenariat avec le laboratoire d'Avicenne (Oxford Nanopore technology) à partir d'échantillons de patients inclus dans le programme d'accès compassionnel. L'analyse se concentrera sur différentes régions y compris les gènes codant preS1, l'antigène delta et le cotransporteur d'acides biliaires NTCP, et ce chez des non-répondeurs et des patients ayant une réponse virologique. Deuxièmement, les motifs d'intérêt identifiés à l'étape précédente seront insérés dans des plasmides par mutagenèse dirigée et transfectés dans des cellules humaines d'hépatomes afin de produire des particules delta. La sensibilité des mutants au bulevirtide sera évaluée par la détermination des EC50 et la mesure de la capacité de réplication en comparaison des souches sauvages.

Mécanismes moléculaires viraux de la persistance à bas niveau du VHB et conséquences cliniques à long terme. L'OMS s'est fixé l'objectif ambitieux d'éradiquer l'infection par le VHB d'ici 2030. Jusqu'à présent, les vaccins thérapeutiques et les traitements antiviraux disponibles permettent rarement d'éradiquer le VHB en raison de la présence de l'ADNcc et de l'ADN intégré du VHB dans les chromosomes de l'hôte. Bien que l'élimination du VHB des hépatocytes infectés semble difficile dans un avenir prévisible, une "guérison fonctionnelle" plus réaliste semble réalisable, qui implique la perte durable de l'AgHBs, avec ou sans développement d'anticorps HBs, en même temps qu'un AgHBe et un ADN VHB sérique indétectables, et la persistance d'un ADNccc avec une activité transcriptionnelle faible ou inexistante. Cet état est similaire à une forme naturelle particulière d'infection chronique asymptomatique par le VHB récemment découverte, appelée infection occulte par le VHB (OBI), qui se caractérise par un AgHBs indétectable associé à une charge virale extrêmement faible avec ou sans anti-HBc et/ou anti-HBs. Cependant, l'impact à long terme de l'OBI la survenue et la progression d'une fibrose hépatique n'est pas clair, mais des preuves indirectes de plus en plus nombreuses suggèrent qu'il s'agit d'un facteur de risque pour le développement du carcinome hépatocellulaire (CHC). De même, les patients atteints d'une infection chronique par le VHB nécessitent généralement un traitement à vie sans que le risque de développement d'un CHC soit totalement éliminé. Nos études précédentes sur les variants viraux associés à l'OBI (23 articles de recherche) et des données préliminaires récemment obtenues dans le laboratoire ont montré que l'AgHBs indétectable pourrait être associé à des variations antigéniques conduisant à un échappement immunitaire partiel, à une réduction de la transcription du gène S et à une altération de la sécrétion de l'AgHBs par les hépatocytes infectés. Notre objectif est maintenant d'étudier : (1) les variations antigéniques de souches virales potentiellement associées à un échappement immunitaire chez des individus vaccinés mais malgré tout infectés ; (2) les mécanismes viraux associés à une baisse de la production d'AgHBs par la caractérisation moléculaire et fonctionnelle des variants OBI en tant que modèle, avec la perspective que les données recueillies puissent aider à définir de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles ; (3) le potentiel des variants S du VHB associés à l'altération de la sécrétion de l'AgHBs et des virions pour constituer une menace oncogénique de maladie hépatique et de CHC dans les cas d'infection chronique à VHB de faible niveau. Dans ce but, nous avons initié une étude collaborative internationale (France, Chine, Pologne, et Suisse) visant à caractériser génétiquement et fonctionnellement *in vitro* les variants de la protéine S du VHB associés à un échappement immunitaire partiel pouvant conduire à une OBI anti-HBs seule persistante dans certains cas. Cette étude est cofinancée par l'ANRS-MIE, Grifols Diagnostics Ltd, et ISBT. Les investigations génétiques sont en cours d'extension aux séquences de VHB obtenues à partir de plasma et/ou de biopsies hépatiques de porteurs asymptomatiques négatifs pour l'AgHBs (donneurs de sang) et de patients à différents stades de la maladie hépatique, afin d'identifier les mutations spécifiques associées à l'altération de la sécrétion de l'AgHBs. L'étude bénéficie d'installations avancées de séquençage de nouvelle génération et implique une collaboration étroite avec des collègues des départements d'hépatologie et d'anatomopathologie (cohortes cliniques) et du laboratoire coordonnateur (dépôt d'échantillons/séquences VHB), ainsi que des collaborations internationales bien établies avec le Dalian Blood Center, en Chine, et le Service interrégional de transfusion sanguine SRC, à Berne, en Suisse (échantillons prospectifs). Le phénotype de sécrétion est confirmé dans des hépatocytes primaires et des cultures de lignées cellulaires. L'impact physiologique des variants du VHB sur la fonction des cellules hépatiques sera étudié *in vitro* dans des cultures cellulaires, et à plus long terme *in vivo* dans un modèle d'infection de souris humanisées. Nous menons également en collaboration avec le centre de transfusion de Dalian en Chine une étude de suivi des paramètres viraux et cliniques chez des porteurs asymptomatiques d'infection B occulte sur une période de 3 à 12 ans. Les données obtenues de 2012 à 2023 sont en cours d'analyse. De plus, des données préliminaires récemment obtenues suggèrent l'existence d'un nouvel élément génétique cis-régulateur qui pourrait contrôler la production d'AgHBs en modulant le traitement post-transcriptionnel de l'ARNm pré-S2/S viral via un mécanisme encore indéterminé, et qui se superpose à un épissage alternatif complexe mais conservé au cours de l'évolution de l'ARNm pré-S2/S. Des recherches sont menées pour identifier la séquence et les caractéristiques fonctionnelles (exportation nucléaire de l'ARNm, localisation subcellulaire, traduction ou stabilité) de ce nouvel élément ARN viral cis-régulateur potentiel. L'existence et la distribution *in vivo* de l'épissage alternatif

conservé des ARN S du virus sont en cours de confirmation dans des foies de souris humanisées infectées et dans des biopsies de foie de patients infectés à différents stades de la maladie hépatique à l'aide de technique de séquençage profond de troisième génération en développement dans le laboratoire.

Intérêt d'un "panel pangénotypique de souches VHD" pour l'évaluation des trousse moléculaires pour la quantification de l'ARN VHD. La quantification de la charge virale plasmatique du VHD est essentielle pour évaluer la sévérité de la maladie, décider de l'indication du traitement antiviral et mesurer l'efficacité de celui-ci. Les techniques actuellement disponibles sur le marché ont des performances très inégales, notamment du fait de la grande diversité génétique du VHD. Nous avons donc constitué un panel d'échantillons de génotypes et de charges virales variées pour permettre l'évaluation des techniques maison de RT-qPCR ou des trousse commerciales disponibles sur le marché. Ce panel de référence est composé de 24 échantillons de plasma : 2 échantillons négatifs, 8 échantillons de génotype HDV-1 (d'origine africaine et européenne), 3 de génotype HDV-2, 2 de génotype HDV-4, 3 de génotype HDV-5, 2 de génotype HDV-6, 2 de génotype HDV-7 et 2 de génotype HDV-8, avec des charges virales allant de 2 à 5 Log UI/mL. Ce panel est conservé à -80°C en aliquotes de 1 mL.

Premièrement, des pipelines complets tels que préconisés par les différents fournisseurs (dispositifs d'extraction - trousse RT-qPCR - thermocycleurs) ont été comparés. Sept pipelines ont fait l'objet d'une évaluation en 2023, ce qui a permis de mettre en évidence un défaut de détection et de quantification sur certaines souches par les trousse Altona (voir chapitre « Alerte ») (**Figure 30**).

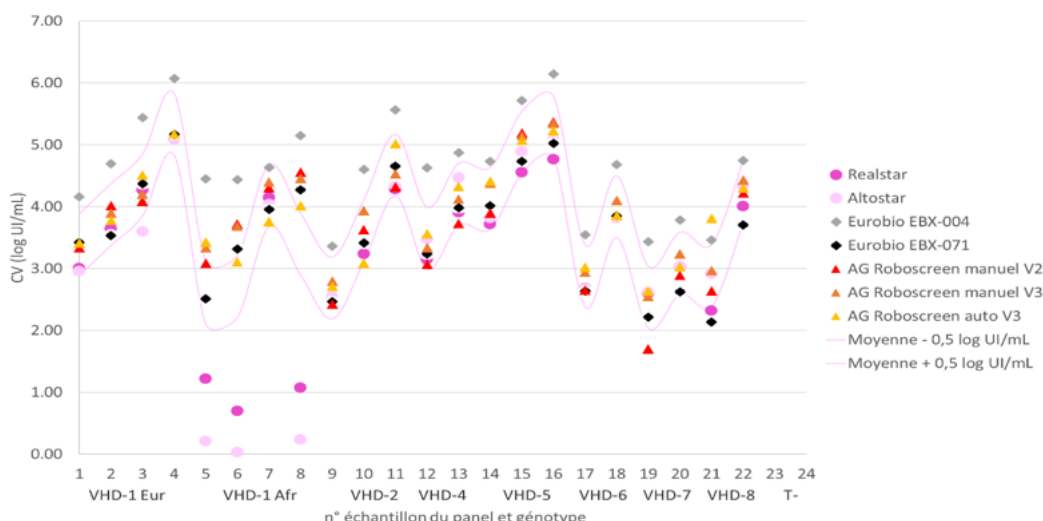


Figure 30 : Quantification de l'ARN VHD (Log UI/mL) du panel d'échantillons avec 7 pipelines.

Deuxièmement, 6 extracteurs d'acides nucléiques différents ont été comparés ; les RT-qPCR en temps réel étaient faites avec la trousse EurobioPlex EBX-071 (Eurobio) sur CFX96 (Biorad), et ce par le même opérateur. Les résultats ont été comparés avec ceux obtenus avec la méthode d'extraction utilisée en routine au laboratoire associé delta (m2000_{SP}, Abbott Molecular). Les résultats sont présentés dans la **Figure 31**.

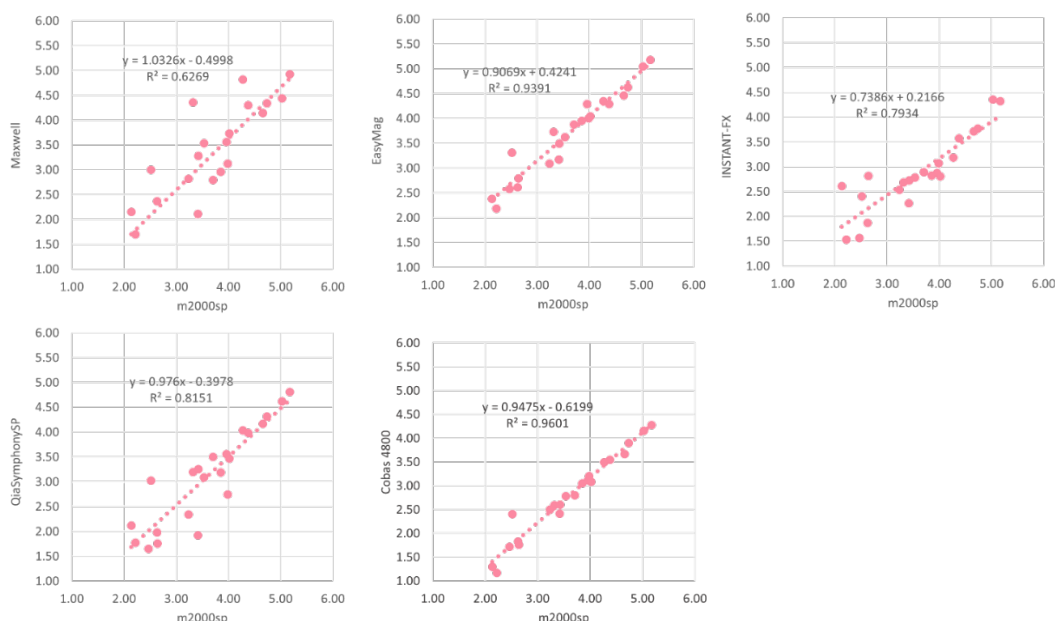


Figure 31 : Comparaison des charges virales (ARN VHD en Log UI/mL) mesurées avec les différents extracteurs versus les charges virales mesurées avec l'automate m2000sp (Abbott Molecular).

Performances des tests diagnostiques à partir de spots de sérum, plasma et sang total déposé sur papier buvard (DBS). Le développement des méthodes alternatives au prélèvement veineux pour le dépistage, le diagnostic et le suivi des hépatites virales est en plein essor. Les spots de sang séché sur papier buvard permettent la détection de marqueurs sérologiques et moléculaires. Une étude préliminaire avait été menée en 2022 par le laboratoire coordonnateur (Matar *et al.*, GHS 25-28 avril 2023). Des échantillons de sang total à partir de sérum et de plasma congelés de patients VHD-positif avaient été reconstitués selon la technique publiée par Mourez *et al* (EBioMedicine 2018). Après une redéfinition du seuil d'interprétation, la spécificité et la sensibilité de détection des anticorps du VHD étaient satisfaisantes. La détection de l'ARN du VHD (n=38) était possible mais les performances étaient mitigées. Une seconde étude a donc été menée en 2023 au sein du laboratoire associé delta. Elle comportait un volet rétrospectif et un volet prospectif. L'objectif était de valider les résultats préliminaires sur un nombre plus important de prélèvements, et à partir de prélèvements de sang total veineux : dépôt de sérum (n=133), de plasma (n=138) ou de sang total veineux frais (n=38, étude en cours) (issu de prélèvements sanguins au pli du coude) (**Figure 32**).

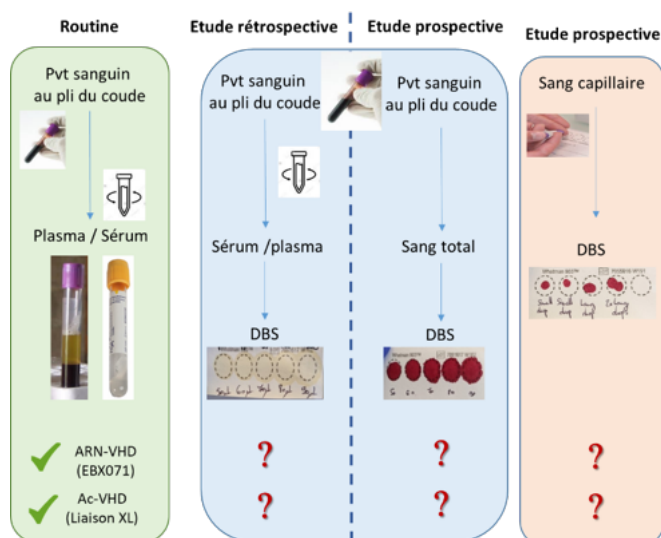


Figure 32 : Schéma des études réalisées au laboratoire associé delta.

De très bonnes performances ont été observées pour la détection des anticorps VHD, en utilisant le seuil spécifique de 0,150 UA/mL (Liaison XL). Malgré ce seuil, certains échantillons avec un taux faible d'anticorps risquent de ne pas être détectés ; mais il s'agit généralement de patients négatifs pour l'ARN VHD. Pour la quantification de l'ARN du VHD, le seuil de détection était de 2 Log UI/mL pour les échantillons de plasma et de 3 Log UI/mL pour les échantillons de sang total (**Figure 33**).

Le dernier volet de l'étude évaluera de façon prospective le diagnostic du VHD à partir de sang capillaire déposé sur papier buvard (projet **SACADE**, présenté dans le chapitre « Programme de Recherche pour les années suivantes »).

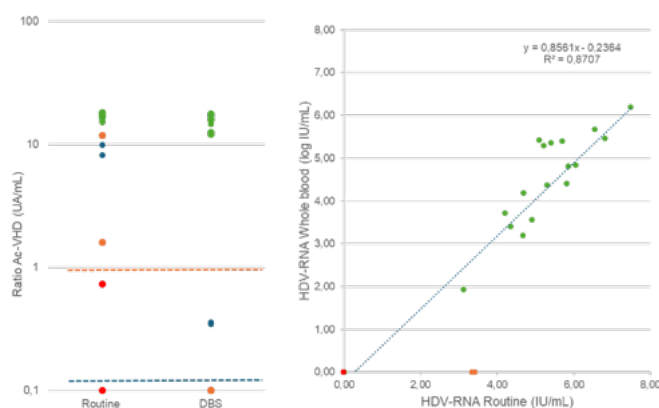


Figure 33 : Résultats de la détection des anticorps VHD et de la quantification de l'ARN du VHD pour les échantillons de sang total veineux déposé sur papier buvard.

Cinétique de l'ARN du VHD chez les patients traités par bulevirtide et rôle de l'interféron pégylé (pegIFN).

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 avait 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'équipe de Jérémie Guedj (Université Paris Cité, IAME, Paris) a réalisé une modélisation mathématique de la cinétique de décroissance de l'ARN du VHD chez 183 patients ayant reçu du bulevirtide $\pm$ pegIFN pendant au moins 48 semaines. Puisqu'il s'agit d'un recueil de "vraie vie", les charges virales ont été effectuées selon les procédures locales (analyse sur site ou sous-traitance habituelle), générant de fait une certaine hétérogénéité des mesures. Malheureusement, les biothèques n'étaient pas disponibles pour tous les prélèvements, ce qui empêchait une quantification centralisée *a posteriori* des charges virales delta. Afin d'harmoniser au maximum les données avant modélisation, le conseil scientifique de BuleDelta a décidé de générer des facteurs de correction, spécifiques à chaque laboratoire de virologie, en se basant sur les résultats rendus par ces laboratoires aux contrôles nationaux de qualité annuels organisés par le laboratoire associé delta.

L'efficacité du bulevirtide à bloquer l'infection cellulaire a été estimée à 90,3%, alors que le pegIFN bloquait la production virale avec une efficacité de 92,4%. L'ajout du pegIFN au bulevirtide était associé à un déclin plus rapide de la charge virale VHD (86,9% vs 56,1% de diminution de l'ARN >2 Log à 48 semaines). Le modèle a permis de prédire une probabilité de guérison virologique de 8,8% pour le bulevirtide et de 18,8% pour l'association bulevirtide plus pegIFN (**Figure 34**) (Messaoudi *et al*, JHep Rep 2024).

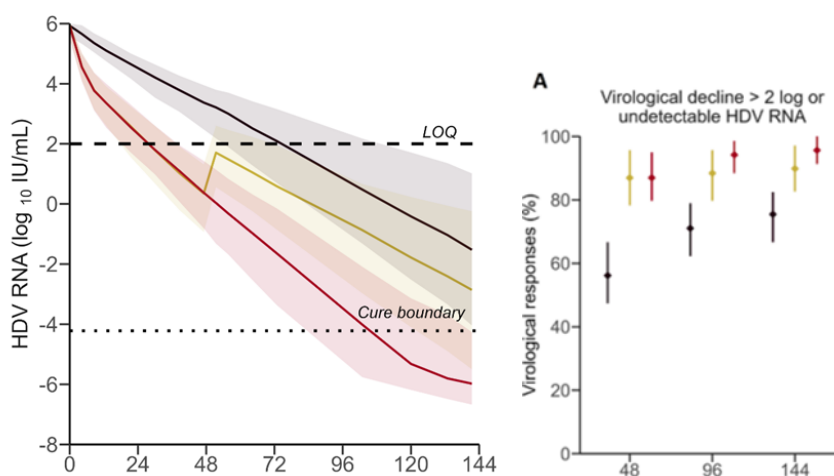


Figure 34 : Prédiction des cinétiques virales pour les patients recevant du bulevirtide (en noir), du bulevirtide plus pegIFN pendant 2 ans (en rouge), et du bulevirtide plus pegIFN pendant 1 an suivi du bulevirtide seul la deuxième année (en jaune).

Évaluation du rôle prédictif du taux d'édition du VHD dans la réponse virologique au bulevirtide. Le génome du VHD possède un seul cadre de lecture ouvert codant, situé sur un intermédiaire de réplication, l'antigénome, qui code deux protéines, la petite protéine (s-HDAg) et la grande protéine (L-HDAg). Cette dernière est produite à la suite d'un processus d'édition (ou editing) de l'antigénome qui modifie le codon amber/stop de l'ARNm de s-HDAg en codon tryptophane, permettant la synthèse de L-HDAg par l'ajout de 19 (ou 20) acides aminés C-terminaux. Les deux protéines delta jouent des rôles différents dans le cycle cellulaire viral : s-HDAg active la réplication du génome, tandis que L-HDAg bloque la réplication et favorise la morphogénèse et la propagation des virions. La protéine L-HDAg est également impliquée dans la pathogénicité du VHD. Nous avons récemment montré que le taux d'editing était différent selon le génotype de la souche VHD infectante. La cinétique d'évolution du taux d'editing sous traitement antiviral est inconnue. Une étude ancillaire a été proposée au conseil scientifique de BuleDelta visant à étudier si le taux d'editing à J0 pouvait être un facteur prédictif de réponse au traitement antiviral par bulevirtide $\pm$ pegIFN. Une étude longitudinale a également été prévue pour mesurer la cinétique d'évolution du taux d'editing sous traitement. Dans une analyse préliminaire, 96 échantillons provenant des bibliothèques de BuleDelta ont été testés par la technique NGS mise au point au laboratoire (Dziri S *et al.*, Viruses 2021). 80 fastq de bonne qualité, correspondant à des souches de génotype HDV-1 ont été sélectionnés (n=46 à J0, n=21 à S12 et n=13 à S24). Les premiers résultats indiquaient un taux d'editing moyen de 31,2 % à J0 qui ne diffère pas en fonction du statut répondeur (1, correspondant à une diminution de la charge virale VHD >2 Log UI/mL à S24) ou non répondeur (0) du patient. A S24, le taux d'editing moyen est de 29,7% (différence non significative avec J0), mais on observait cependant une plus grande disparité des résultats. Compte tenu du faible nombre de patients inclus dans l'analyse longitudinale (13 suivis longitudinaux), des analyses supplémentaires vont être menées (**Figure 35**).

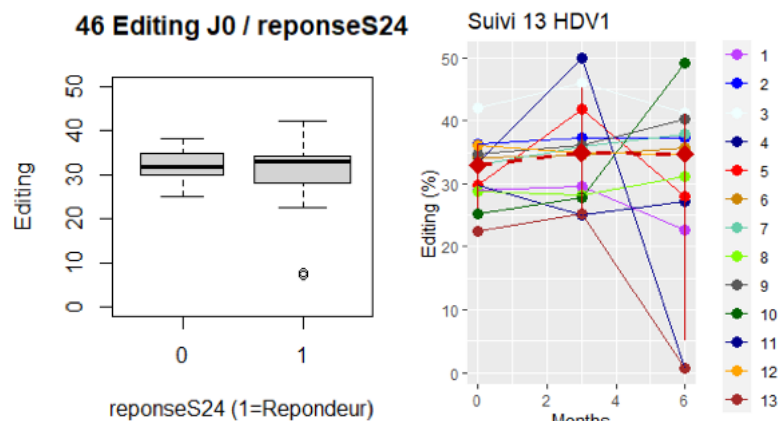


Figure 35 : Taux d'editing à J0, selon le statut répondeur (1) ou non-répondeur (0) à S24 (à gauche). Suivi longitudinal de 13 patients (à droite).

Prévalence de l'infection VHD au Sénégal (collaboration avec l'équipe de Gilles Wandeler, Suisse). Cette étude transversale a inclus des participants de la cohorte SEN-B entre octobre 2019 et octobre 2021. Tous les participants ont subi des évaluations cliniques et virologiques, ainsi qu'une élastographie transitoire (ET). Les anticorps VHD ont été testés à l'aide de la trousse Liaison XL murex Anti-HDV et la présence de l'ARN du VHD a été vérifiée par RT-PCR sensible de la région *R0* du génome viral. Le génotypage a été déterminé par séquençage. Nous avons utilisé la régression logistique multivariée pour évaluer l'association entre la positivité des anticorps VHD et la fibrose hépatique (ET $>7,0$ kPa). Au total, 13/914 participants (1,4%) étaient positifs pour les anticorps VHD, dont 8 (61,5%) présentaient une réplication active. Le génotype HDV-5 était prédominant (6/8, 75%). La consommation de cannabis (odds ratio ajusté [aOR] : 57,5, intervalle de confiance [IC] à 95 % : 3,59-956,00), des ASAT élevées (aOR : 8,5, IC95% : 1,01-63,90) et une fibrose hépatique (aOR : 10,7, IC95% : 2,17- 56,60) étaient significativement associées à une infection par le VHD. Ajustée en fonction du sexe, du taux d'ALAT et de l'AgHBe, la séropositivité pour le VHD (aOR 12,0, IC95% : 3,19-47,70) était associée de manière indépendante à la fibrose hépatique (**Figure 36**). La prévalence de l'hépatite delta était faible dans cette vaste cohorte de personnes vivant avec le VHB au Sénégal ; les personnes touchées présentaient un risque très élevé d'avoir une cirrhose hépatique. Des efforts visant à améliorer le dépistage et la gestion du VHD sont ainsi apparus nécessaires de toute urgence dans ce pays d'Afrique de l'Ouest. Ce travail a été présenté en poster à la conférence IAS (2023) et est en cours de publication.

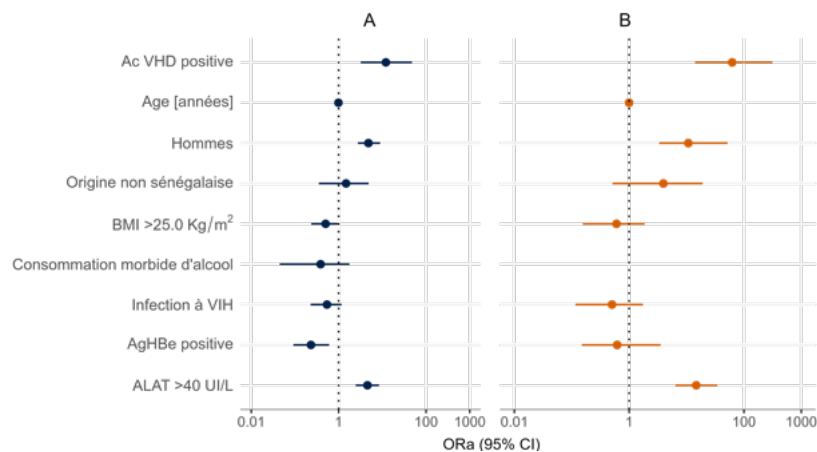


Figure 36 : Facteurs associés à la fibrose significative (A) et la cirrhose (B) hépatique

Origine du VHD. Ce résultats. Ce travail est le résultat d'une collaboration étroite entre le CNR coordonnateur et le laboratoire associé. Grâce à nos travaux depuis plus de 20 ans sur la variabilité génétique du VHD, la classification du genre *Deltavirus* en 8 clades ou génotypes 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 à ce jour pas 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 par homologie flagrante de structure de son ARN et de son mode de réplication. Début 2022, nous avons débuté une étude sur l'origine de ce virus. L'objectif de ce travail, financé par l'ANRS (projet ECTZ161740), 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 génotypes à partir d'échantillons de la collection du laboratoire et pour certains à partir de nouvelles collaborations internationales (Taiwan et Australie). Tous ces échantillons avaient une provenance recouvrant de nombreuses régions du globe avec des dates d'échantillonnage réparties sur 38 années (1983 à 2021). Pour les analyses finales, nous avons pu ainsi sélectionner les 484 séquences les plus pertinentes, incluant les séquences obtenues précédemment par le laboratoire et certaines extraites des bases de données publiques. Des analyses spécifiques pour chaque génotype ont été menées pour reconstruire l'histoire évolutive du virus et évaluer la corrélation entre les nœuds phylogéniques et l'échelle temporelle par maximum de vraisemblance estimée avec TimeTree. Nous avons pu montrer que le VHD a été introduit chez *Homo sapiens* en Afrique centrale au milieu du Néolithique, environ 5 500 ans avant l'ère commune (AEC). Une première exportation hors d'Afrique vers le Croissant fertile (Mésopotamie) a eu lieu vers 3 900 ans avant notre ère, conduisant à l'émergence du génotype 1 et à sa propagation ultérieure sur l'ensemble du continent eurasiatique au cours de l'âge du bronze. Les génotypes 5, 6, 7 et 8 sont apparus entre 2 400 et 1 600 ans avant notre ère mais sont restés circonscrits à l'Afrique subsaharienne du fait de la re-désertification du Sahara à la fin du néolithique. Les génotypes 2 et 4 sont arrivés en Asie probablement par deux introductions indépendantes vers 2 100 ans avant notre ère. L'origine du génotype 3 sud-américain n'a pas pu être déduite avec certitude en raison du manque d'échantillons représentatifs. Notre étude a ainsi fourni la première échelle de temps estimée de l'évolution du VHD (**Figure 37**), qui coïncide étroitement avec les dates des premières dispersions humaines, confortant l'hypothèse selon laquelle le VHD a co-migré avec les populations humaines au cours des périodes néolithiques et de l'âge du bronze (article soumis).

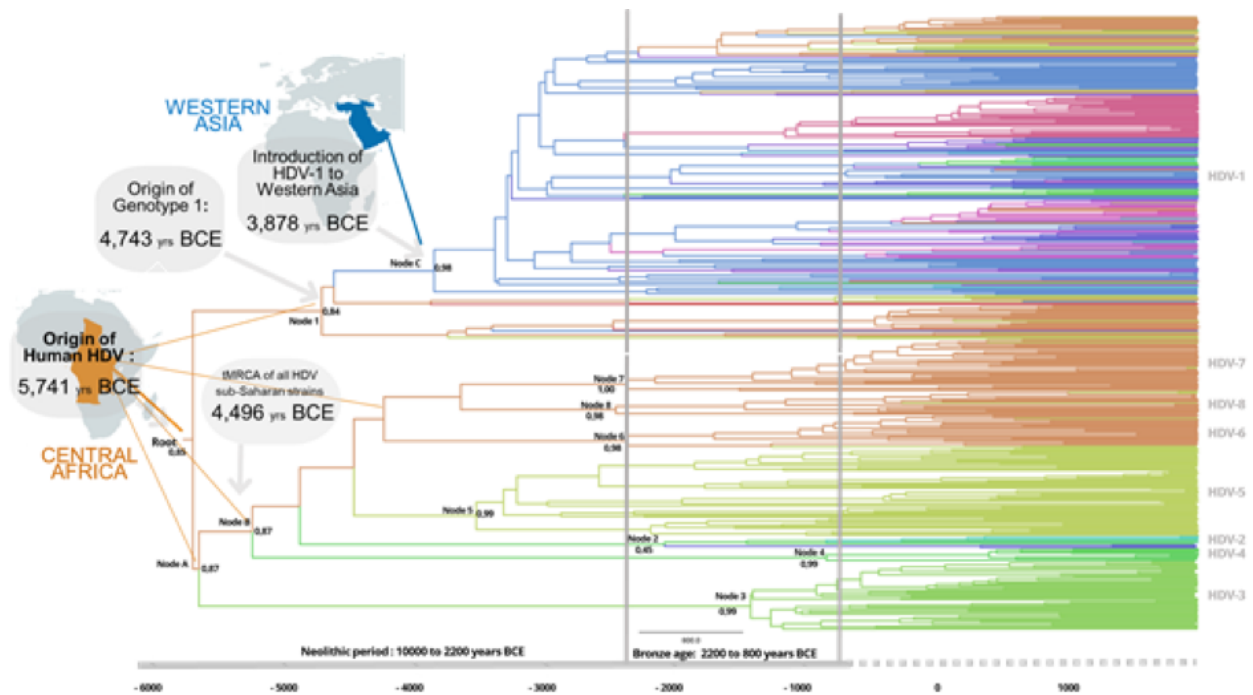


Figure 37 : Arbre phylogéographique pour estimer la date et le lieu géographique de l'origine du VHD chez l'Homme.

6.2 Liste des publications et communications 2023, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

(i) Publication Nationales

1. Chevaliez S. Les nouveaux outils diagnostiques de l'hépatite C. *Revue de Biologie Médicale* 2023 ; n°372 – Juillet-Aout : 1-9.
2. Chevaliez S. Tests rapides d'orientation diagnostique : intérêt pour le médecin généraliste. *Revue Preuves & Pratique* 2023 ; N°99- 2^e trimestre : 16-22.
3. Chevaliez S. Carcinome hépatocellulaire et virus de l'hépatite C : stratégies diagnostiques et thérapeutiques. *Revue Francophone des Laboratoires* Janvier 2024 ; N°558 :59-66.

(ii) Publications Internationales

1. Vo-Quang E, Soulier A, N'Debi M, Rodriguez C, Chevaliez S, Leroy V, Fourati S, Pawlotsky JM and EPIRES-C ANRS/MIE Study Group. Virological characterization of treatment failures and retreatment outcomes in patients infected with "unusual" HCV genotype 1 subtypes. *Hepatology* 2023;78(2):607-620.
2. Rodriguez C, Boizeau L, Soulier A, N'Debi M, Demontant V, Trawinski E, Seng S, Fontaine H, Woerther PL, Marchand S, Fourati S, Chevaliez S, Cappy P, Pol S, Pawlotsky JM. Unknown circovirus in immunosuppressed patients with hepatitis, France. *Emerg Infect Dis* 2023;29(5):1051-1054.
3. Rodriguez C, Marchand S, Sessa A, Cappy P, Pawlotsky JM. Orthohepevirus C hepatitis, an underdiagnosed disease? *J Hepatol* 2023;in press.
4. Kimseng H, Rossi G, Danjean M, Jimenez-Araya B, Chaligne C, Galy A, Souhail B, Bert F, Leflon V, Fihman V, Caillault A, Demontant V, Seng S, Trawinski E, N'Debi M, Boizeau L, Jacquier H, Ronot M, Reizine E, Le Roy V, Lefort A, Rodriguez C, Lepeule R, Woerther PL. Evaluation of the contribution of shotgun metagenomics in the microbiological diagnosis of liver abscesses. *J Infect* 2023;87(5):365-372
5. Candotti D, Drews SJ, Faddy HM; ISBT Transfusion-Transmitted Infectious Diseases Working Party, Subgroup on Viruses. Monitoring viral genomic sequences in transfusion-transmitted viruses. *Vox Sang* 2023;118:551-558.
6. Deng X, Dan L, Delcourt MP, Gao H, Zhou L, Candotti D. No hepatitis Delta virus seropositivity among blood donors with overt and occult hepatitis B infection in Dalian, Liaoning province, China. *Viruses* 2023;15:1509.
7. Tang X, Yang L, Zhang P, Wang C, Luo S, Liu B, Fu Y, Candotti D, Allain JP, Zhang L, Li C, Li T. Occult hepatitis B virus infection is associated with Chinese patients' liver fibrosis. *J Infect Dis* 2023;228:1375-84.
8. Polaris Observatory Collaborators. Global prevalence, cascade of care, and prophylaxis coverage of hepatitis B in 2022: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2023;8(10):879-907.
9. Polaris Observatory Collaborators. Hepatitis D double reflex testing of all hepatitis B carriers in low-HBV- and high-HBV/HDV-prevalence countries. *J Hepatol* 2023;79(2):576-580.

10. Wedemeyer H, Leus M, Battersby TR, Glenn J, Gordien E, Kamili S, Kapoor H, Kessler HH, Lenz O, Lütgehetmann M, Mixson-Hayden T, Simon CO, Thomson M, Westman G, Miller V, Terrault N, Lampertico P; HDV RNA Assays Writing Group at the HBV Forum. HDV RNA assays: Performance characteristics, clinical utility, and challenges. *Hepatology* 2023;in press.
- 11.

(iii) Communications nationales

1. Delagarde V, Gerber A, Dziri S, Le Gal F, Gordien E et Brichler S. Améliorer l'accès aux tests virologiques du VHD grâce aux papiers buvard. Journées de l'Association Française d'Étude du Foie, Rennes, 4-6 octobre 2023.

(iv) Communications internationales

1. Matar R, Soulier A, Ortonne V, Garrigou O, Cappy P, Leroy V, Pawlotsky JM, Chevaliez S. Dried blood spot: a new tool for screening, diagnosis and monitoring of hepatitis D virus infection. Global Hepatitis Summit, 18th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (ISVHLD), Paris, France, April 25-28, 2023.
2. Roulot D, Brichler S, Layese R, D'Alteroche L, Ganne-Carrie N, Stern C, Saviano A, Leroy V, Roudot-Thoraval F, De Ledinghen V. Liver stiffness measurement to detect severe fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis D infection. AASLD meeting, Boston, 10-14 novembre 2023.
3. Bourliere M, Loustaud-Ratti V, Stern C, Benali S, Bardou-Jacquet E, Alric L, Bazinet M, Lecomte L, Francois S, De-Freitas C, Levacher A, Brichler S, Gerber A, Gordien E, Chevaliez S, Vaillant A. Rescue of cirrhotic HBV/HDV infection from bulevirtide failure by subcutaneous REP 2139-Mg. AASLD meeting, Boston, 10-14 novembre 2023.
4. Lampertico P, Wedemeyer H, Brunetto MR, Bogomolov P, Bourliere M, Fontaine H, Chee G, Manuilov D, Lau QAAH, Da BL, Flaherty JF, Mercier RC, Frenette C, Osinusi AO, Gherlan GS, Zeuzem S, Cornberg M, Roulot D, Zoulim F, Aleman S, Asselah T. Continued treatment of early virologic non-responder or partial responders with bulevirtide monotherapy for chronic hepatitis D leads to improvement in virological and biochemical responses: results from an integrated analysis at week 96. AASLD meeting, Boston, 10-14 novembre 2023.
5. Delagarde V, Gerber A, Dziri S, Le Gal F, Gordien E, Brichler S. Improving access to Hepatitis Delta Virus testing using Dried Blood Spots. 2nd HDIN meeting, Hanovre, 5-6 octobre 2023.
6. Roulot D, Brichler S, Layese R, Ganne-Carrie N, Stern C, Loustaud-Ratti V, Gouton M, Roudot-Thoraval F, De Ledinghen V. Transient elastography efficiently detects severe fibrosis in patients with chronic hepatitis D. EASL meeting, Vienne, 21-24 juin 2023.
7. de Ledinghen V, Fougere-Leurent C, Subic-Levrero M, Scholtes C, Gordien E, Pol S, Lacombe K, Alfaïate D, Billaud E, Ratzu V, Ganne-Carrie N, Pageaux GP, Leroy V, Rosa I, Loustaud-Ratti V, Mathurin P, Tual C, Le Pabic E, Coulibaly F, Roulot D, Zoulim F. Treatment with Bulevirtide, with or without PEG-interferon, in HIV-HBV/HDV co-infected patients in a real-life setting. EASL meeting, Vienne, 21-24 juin 2023.
8. Stern C, De-Freitas C, Bazinet M, Mackiewicz V, Brichler S, Gordien E, Chevaliez S, Bourliere M, Vaillant A. Safety and efficacy of REP 2139-Mg in association with TDF in chronic hepatitis delta patients with decompensated cirrhosis. EASL meeting, Vienne, 21-24 juin 2023.
9. Gerber A, Toumansie Mfonkou JD, Brichler S, Le Gal F, Njouom R, Gordien E. High molecular diversity and remarkable molecular distribution of Hepatitis Delta Virus strains that are spreading in Cameroon. Global Hepatitis Summit, Paris, 25-28 avril 2023.
10. Pawlotsky JM. New hepatitis B drug development disillusion: time to reset? *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2023; 8: 192-197.
11. Moreau C, Roux M, Riou J, Canivet CM, Audureau E, Lusivika-Nzinga C, Nahon P, Carrat F, Boursier J, ANRS CO12 CirVir group, ANRS CO22 HEPATHER group. Dynamic personalized prediction of the individual liver-related risk after sustained viral response in HCV patients. *J Viral Hepat* 2023; 30: 567-577.
12. Pawlotsky JM. Burden of hepatitis B and C in Europe calls for political impetus to accelerate elimination efforts. *Lancet Public Health* 2023;8:e666-e667.
13. Kheyar A, Ahnou N, Ahmed-Belkacem A, Hulin A, Pressiat C, Ghaleh B, Guichou JF, Morin D, Pawlotsky JM, Teixeira-Clerc F. The novel cyclophilin inhibitor C105SR reduces hepatic ischaemia-reperfusion injury via mitoprotection. *JHEP Rep* 2023; 5: 100876.
14. Zeng Q, Klein C, Caruso S, Maille P, Allende DS, Minguez B, Iavarone M, Ningarhari M, Casadei-Gardini A, Pedica F, Rimini M, Perbellini R, Boulagnon-Rombi C, Heurgué A, Maggioni M, Rela M, Vij M, Baulande S, Legoix P, Lameiras S; HCC-AI study group; Bruges L, Gnemmi V, Nault JC, Campani C, Rhee H, Park YN, Iñarrairaegui M, Garcia-Porrero G, Argemi J, Sangro B, D'Alessio A, Scheiner B, Pinato DJ, Pinter M, Paradis V, Beaufrère A, Peter S, Rimassa L, Di Tommaso L, Vogel A, Michalak S, Boursier J, Loménie N, Ziol M, Calderaro J. Artificial intelligence-based pathology as a biomarker of sensitivity to atezolizumab-bevacizumab in patients with hepatocellular carcinoma: a multicentre retrospective study. *Lancet Oncol* 2023; 24: 1411-1422.
15. Calderaro J, Ghaffari Laleh N, Zeng Q, Maille P, Favre L, Pujals A, Klein C, Bazille C, Heij LR, Uguen A, Luedde T, Di Tommaso L, Beaufrère A, Chatain A, Gastineau D, Nguyen CT, Nguyen-Canh H, Thi KN, Gnemmi V, Graham RP, Charlotte F, Wendum D, Vij M, Allende DS, Aucejo F, Diaz A, Rivière B, Herrero A, Evert K, Calvisi DF, Augustin J, Leow WQ, Leung HHW, Boleslawski E, Rela M, François A, Cha AW, Forner A, Reig M, Allaire M, Scatton O, Chatelain D, Boulagnon-Rombi C, Sturm N, Menahem B, Frouin E, Tougeron D, Tournigand C, Kempf E, Kim H, Ningarhari M, Michalak-Provost S, Gopal P, Brustia R, Vibert E, Schulze K, Rüther DF, Weidemann SA, Rhaïem R, Pawlotsky JM, Zhang X, Luciani A, Mulé S, Laurent A, Amaddeo G, Regnault H, De Martin E, Sempoux C, Navale P, Westerhoff M, Lo RC, Bednarsch J, Gouw A, Guettier C,

Lequoy M, Harada K, Sripongpun P, Wetwittayaklang P, Loménie N, Tantipisit J, Kaewdech A, Shen J, Paradis V, Caruso S, Kather JN. Deep learning-based phenotyping reclassifies combined hepatocellular-cholangiocarcinoma. *Nat Commun* 2023; 14: 8290.

(v) Conférences sur invitation

Stéphane Chevaliez

1. "Simplified approaches for HBV/HDV screening and diagnosis". Global hepatitis Summit 2023, The 18th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (ISVHLD), Paris, April 25-28, 2023.
2. "Intérêts des spots de sang séché (DBS) dans la prise en charge des hépatites B&C". Réunion scientifique des utilisateurs de l'Alinity m, Abbott, Paris, 14 septembre 2023.
3. "Actualités sur les hépatites virales : HDV". Synergie et Résistances & Immunosuppression (20^e édition), Aix-en-Provence, 4-6 octobre 2023.
4. "Point-of-care tests et prise en charge des hépatites B et C en République Démocratique du Congo". Kinshasa, 10 octobre 2023.

Christophe Rodriguez

1. Metagenomics for pathogen diagnosis and discovery. Global hepatitis Summit 2023, The 18th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (ISVHLD), Paris, April 25-28, 2023.

Slim Fourati

1. Unusual HCV genotypes and subtypes. Global hepatitis Summit 2023, The 18th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (ISVHLD), Paris, April 25-28, 2023.
2. Different algorithms for virus evolution. European Meeting on HIV & Hepatitis, Roma, June 7-9, 2023.

Jean-Michel Pawlotsky

1. "Solving the HCV elimination puzzle: increasing HCV awareness and improving care for migrants". Abbvie Symposium, Global Hepatitis Summit 2023, Paris (France), 25-28 avril 2023.
2. "Outlining chronic viral hepatitis: epidemiology, overcoming challenges and patient management". Gilead Symposium, Global Hepatitis Summit 2023, Paris (France), 25-28 avril 2023.
3. 727. "A patient is waiting for a liver transplant: what can we do now and what could we have done better?". Medscape programme, Global Hepatitis Summit 2023, Paris (France), 25-28 avril 2023.
4. 728. "Unmet needs in HCV". 5th Central and Eastern European Meeting on Viral Hepatitis and HIV, Vilnius (Lithuania), 19-20 septembre 2023.
5. 729. "HBV Forum MAPPED Working Group Session", HBV Forum, EASL Congress 2023, Vienna (Austria), 20-24 juin 2023.
6. 730. "Hepatitis C and hepatitis B: elimination goals for a silent epidemic". Online program "HCV & HBV Accelerator Hub to Advance Primary Care Roles in Global Elimination: Bringing PCPs Up-to-Speed with the Latest Recommendations for Universal Testing, Linkage to Care, and Treatment", PRIME Education, Boston (USA), 14 novembre 2023.
7. 731. "Universal hepatitis C and hepatitis B testing and linkage to care". Online program "HCV & HBV Accelerator Hub to Advance Primary Care Roles in Global Elimination: Bringing PCPs Up-to-Speed with the Latest Recommendations for Universal Testing, Linkage to Care, and Treatment", PRIME Education, Boston (USA), 14 novembre 2023.
8. 732. "Simplified hepatitis C treatment strategies". Online program "HCV & HBV Accelerator Hub to Advance Primary Care Roles in Global Elimination: Bringing PCPs Up-to-Speed with the Latest Recommendations for Universal Testing, Linkage to Care, and Treatment", PRIME Education, Boston (USA), 14 novembre 2023.
9. 733. "Simplified hepatitis B treatment strategies". Online program "HCV & HBV Accelerator Hub to Advance Primary Care Roles in Global Elimination: Bringing PCPs Up-to-Speed with the Latest Recommendations for Universal Testing, Linkage to Care, and Treatment", PRIME Education, Boston (USA), 14 novembre 2023.
10. 734. "Culturally competent hepatitis C and hepatitis B care". Online program "HCV & HBV Accelerator Hub to Advance Primary Care Roles in Global Elimination: Bringing PCPs Up-to-Speed with the Latest Recommendations for Universal Testing, Linkage to Care, and Treatment", PRIME Education, Boston (USA), 14 novembre 2023.

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).

Surveillance nationale des patients nouvellement pris en charge pour leur hépatite chronique B (et D) à travers les Pôles de Référence (FPRH). Sur les bases de la surveillance mise en place par l'InVS en 2008-2012, les objectifs de l'étude en cours sont de décrire les caractéristiques démographiques, cliniques, histologiques et virologiques des patients nouvellement pris en charge pour leur hépatite B dans les Centres Experts et de les comparer à celles des patients inclus dans la surveillance InVS 2008-2012. Une 1^{ère} réunion du Comité de Pilotage (voir plus haut) sera organisée au printemps. Les données démographiques, cliniques, histologiques biochimiques et virologiques seront recueillies par les cliniciens des pôles de références et/ou virologues du réseau de virologie et pharmacologie médicale de l'ANRS/MIE participants à partir des dossiers médicaux après information des patients et recueil de non opposition. Le recueil et la transmission des données se fera à partir d'un questionnaire numérique sécurisé (eCRF). L'Unité de Recherche (URC) Clinique Henri Mondor accompagnera ce projet dans sa mise en place auprès des Centres Experts. Les échantillons seront caractérisés sur le plan virologique à l'aide de technologies de séquençage de nouvelle génération permettant la détermination de la séquence des génomes entiers et des ARN messagers qui n'étaient pas disponibles au moment de l'étude précédente, démarrée il y a 12 ans, en collaboration étroite avec la plateforme GENOBIOICS de l'hôpital Henri Mondor.

Dépistage des hépatites B et C (et du VIH) dans la population cristolienne (Créteil SANS Virus). 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 (AFEF) 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 >40 ans sans antécédent dépistage au cours de l'année précédente et de proposer aux sujets nouvellement dépistés une prise en charge rapide et efficace grâce à un parcours de soins simplifié. Elle impliquera le réseau de médecins généralistes (MG) de la CPTS Unifiée des Boucles de Marne et les pharmaciens d'officine 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. Un article est paru dans le magazine de la ville "Vivre Ensemble" au mois de Mars 2024 afin de sensibiliser la population cristolienne au dépistage des hépatites virales et du VIH. Des trousse d'auto-prélèvement buvard seront remises par les MG et les pharmaciens d'officine, 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 la mairie de Créteil.

Dépistage des hépatites B et C (et du VIH) dans le service d'accueil des urgences au CHU d'Henri Mondor (Étude DEPIVUR). Le dépistage des hépatites virales est basé sur des facteurs de risque (dépistage ciblé) bien que la société savante d'Hépatologie (AFEF) 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 respectivement de 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 est 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 µL) 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.

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 de 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...) lié à la présence de substitutions naturelles conférant la résistance aux antiviraux (Fourati *et al.*, *Hepatology* 2019;69(2):513-523; Pawlotsky JM, *J Hepatol* 2019;71(6):1070-1072 ; Vo-Quang & Pawlotsky, *Gut* 2024 ; in press). Les sous-types et la présence de substitutions associées à la résistance seront caractérisés par séquençage NGS sur la plateforme Genobiomics de l'hôpital Henri Mondor.

Évaluation d'un test sérologique de détection des anticorps VHD (prototype). Un accord a été signé à l'été 2023 entre le laboratoire associé et la société Roche Diagnostics. Le département de R&D travaille sur la mise au point d'un test sérologique de détection des anticorps VHD au sein de leur gamme Elecsys®. Il s'agira d'une étude préliminaire, sur 2 tests "prototypes", portant principalement sur la capacité des tests à détecter les anticorps VHD chez tous les patients, quel que soit le génotype de la souche. Une centaine d'échantillons feront partie de cette première étude, qui aura lieu début 2024 à Avicenne ; les tests seront réalisés sur un automate de type Cobas e601, utilisé en routine par le laboratoire de biochimie d'Avicenne.

Évaluation des performances des tests VHD à partir de sang capillaire déposé sur papier buvard. L'utilisation de la matrice DBS est largement validée pour le dépistage des infections par le VIH, le VHB ou le VHC (tests sérologiques et moléculaires). En ce qui concerne le VHD, des études ont été menées depuis 2 ans dans les 2 laboratoires du CNR (voir le rapport d'activité 2022 et le chapitre « Activité de recherche » de ce rapport). Cependant, jusqu'à présent, les tests ont été effectués entièrement au laboratoire, avec dépôt sur papier buvard de sérum, de plasma EDTA, de sang total reconstitué, ou de sang total veineux issus de prélèvements sanguins effectués au pli du coude. L'objectif du projet **SACADE** est de déposer des gouttes de sang capillaire sur une carte de papier buvard, geste réalisé par une infirmière spécifiquement formée, lors de la consultation du patient dans un service spécialisé (**Figure 38**). Les résultats des analyses sérologiques et moléculaires obtenus à partir de cette matrice seront comparés aux résultats obtenus à partir d'un prélèvement sanguin sur tube EDTA. Des seuils spécifiques seront établis pour la sérologie VHD (test CLIA Liaison XL et ELISA Diapro) et la charge virale VHD (EurobioPlex EBX-071). La capacité à réaliser un génotypage par séquençage Sanger sera également évaluée. L'étude sera réalisée en 2024-2025 au sein

de 8 services d'hépatologie et de maladies infectieuses de l'AP-HP, l'objectif est d'inclure 120 patients VHD positif, avec une majorité de patients répliquant le virus. Le promoteur de cette étude est l'IMEA.

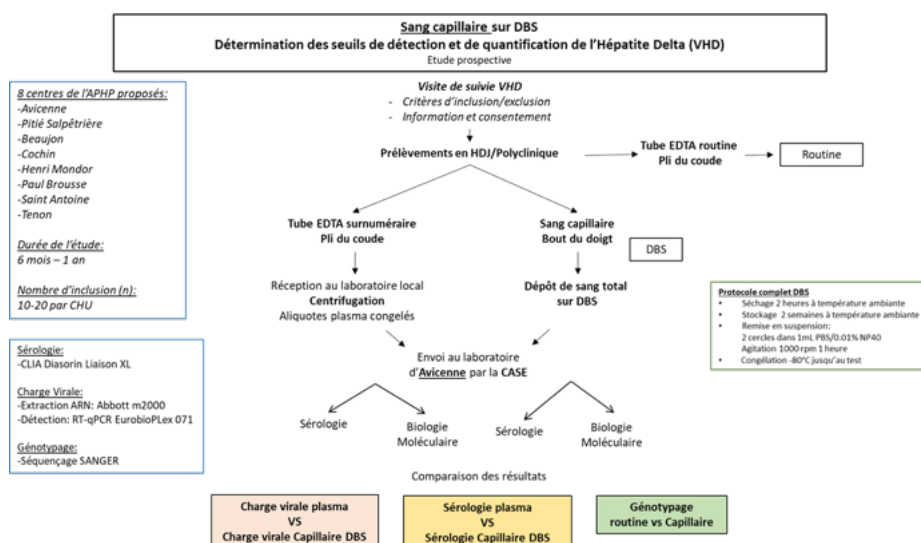


Figure 38 : Schéma de l'étude SACADE

Évaluation de l'impact de la mise en place d'un protocole de reflex testing VHD dans des laboratoires privés d'analyses biomédicales : Projet UniDelta. Les principales sociétés savantes recommandent d'effectuer une sérologie du VHD chez tous les patients AgHBs-positif et une quantification de l'ARN du VHD chez tous les patients séropositifs pour le VHD. Cependant, y compris en France, ce dépistage est loin d'être systématique. Une étude récente réalisée à l'échelle nationale a estimé le taux de dépistage à seulement 22,7% (étude DeltaDescribe, AASLD 2023). Un test réflexe simple (sérologie VHD) ou double (sérologie + ARN si sérologie positive) a été mis en place dans plusieurs laboratoires hospitaliers universitaires français spécialisés (Brichler *et al.*, manuscrit soumis pour publication), permettant d'obtenir d'excellents taux de dépistage (63-97% pour la recherche des anticorps VHD et 82-87% pour la quantification de l'ARN-VHD), permettant ainsi une augmentation du nombre de patients VHD-positif diagnostiqués. En France, les laboratoires privés, désormais organisés en réseaux de taille régionale ou nationale, sont des acteurs majeurs dans le domaine de la biologie. Une récente enquête nationale sur les données de 2021 a estimé que les réseaux de laboratoires privés réalisent 78% des tests sérologiques du VHB [4,2/5,4 millions de tests AgHBs annuels], permettant d'identifier plus de 20 000 nouveaux patients AgHBs-positif (enquête LaboHep, Bull epidemiol Hebd 2023). Cependant, aucune donnée spécifique n'est disponible sur le dépistage du VHD. Pour cette étude, nous avons sélectionné 5 réseaux privés de laboratoires, tous répartis de manière régionale à nationale sur l'ensemble du territoire français, représentant environ 25% de l'ensemble de l'activité de sérologie VHB. L'étude est coordonnée par le laboratoire associé delta. Un conseil scientifique composé de virologues et d'hépatologues ayant un intérêt particulier pour le VHD approuvera et supervisera l'ensemble du projet. Les aspects méthodologiques, réglementaires et éthiques seront supervisés par le Service de Recherche Clinique de l'Hôpital Avicenne (Bobigny, AP-HP). Nous faisons l'hypothèse que la complexité de la cascade du diagnostic VHD dans les soins primaires et les laboratoires privés a un impact sur le dépistage et la prise en charge inadéquates des patients VHD-positif en France, et que la mise en place d'un test réflexe VHD par les laboratoires privés, acteurs majeurs du diagnostic biologique en France, améliorera de façon significative le nombre de patients VHD-positif dépistés, permettant un adressage plus précoce aux hépatologues. L'objectif principal est d'évaluer le taux de dépistage du VHD dans 5 réseaux de laboratoires privés, avant et après mise en place d'une stratégie de simple ou double test réflexe. Les objectifs secondaires sont de : (1) comparer le taux de dépistage du VHD entre les laboratoires publics/hospitaliers et privés ; (2) évaluer l'efficacité d'une stratégie de rattrapage envers les prescripteurs ; (3) évaluer la faisabilité pratique des stratégies de simple et de double test réflexe VHD dans les laboratoires privés ; (4) calculer le coût des stratégies de simple et de double test réflexe VHD ; (5) décrire les caractéristiques globales et la distribution géographique des patients VHD en France. Le projet a été accepté fin 2023 pour un financement à hauteur de 200 000 euros par Gilead Sciences, et va débuter au premier semestre 2024.

Résistance du VHC aux antiviraux à action directe (AAD) en Afrique et Asie du Sud-est (HCVResiS study). L'utilisation des antiviraux à action directe (AAD) aujourd'hui disponibles permet d'obtenir des taux de guérison $\geq 95\%$. Cependant, les données d'efficacité et de tolérance 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 dits “non usuels” (1l, 4r et 3b notamment). 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 est de caractériser les polymorphismes naturels des 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 *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 prise en charge de l'hépatite C chez les patients coinfectés par le VIH en zone décentralisée au Vietnam. L'organisation mondiale de la Santé (OMS) a lancé un plan ambitieux d'élimination des hépatites virales à l'horizon 2030. Cependant dans les zones décentralisées des pays à ressources limitées, l'élimination du VHC se heurte à des difficultés incluant l'accès aux techniques de biologie moléculaire pour la mesure de la charge virale afin d'identifier les patients éligibles au traitement et de s'assurer de l'efficacité de ce dernier. L'OMS recommande l'usage du papier buvard (DBS) afin d'augmenter l'accès à la charge virale, en facilitant le transfert vers un laboratoire central. Le Vietnam est l'un des pays où la prévalence du VHC est la plus élevée, en particulier dans les populations clefs que sont les usagers de drogues injectables et les patients infectés par le VIH. Afin de lutter contre l'épidémie due au VHC, le Vietnam a pour objectif de rendre les AAD disponibles sur l'ensemble du territoire, avec une dispensation limitée à certains sites. Lors de discussions avec le Ministère de la Santé du Vietnam, il a été porté à notre attention que tous les sites cliniques prenant en charge le VIH ne seront pas habilités à dispenser les AAD. Ainsi, certains patients coinfectés par le VIH et le VHC seront suivis dans le même site clinique pour ces deux infections, tandis que d'autres seront suivis dans 2 sites, l'un prenant en charge l'infection VIH et l'autre assurant la dispensation des AAD. A travers une cohorte prospective “en vie réelle” en zone décentralisée une comparaison de l'observance de 12 semaines de traitement sera réalisée entre (1) les patients suivis dans le même site de prise en charge des 2 infections, VIH et VHC ; (2) et les patients suivis dans 2 sites de prise en charge différents. Les critères d'évaluations secondaires comprennent : le taux de succès suite au traitement par DAA qui sera estimé en comparant les sujets qui ont bien observé les 12 semaines de traitements et les autres patients, et le génotype des souches virales par technique Sanger. Du fait que l'accès à la mesure de la charge virale VHC n'est pas disponible localement en zone décentralisée, des DBS seront collectés au niveau des sites cliniques puis transférés par la poste vers un laboratoire central à Hanoi où la mesure de la charge virale VHC sera réalisée. Le traitement par DAA associera les versions génériques du sofosbuvir et du daclatasvir qui ont une pré-qualification de l'OMS. En cas d'échec du traitement par AAD, des analyses par métagénomique seront réalisées afin de mieux caractériser les souches. Tous les patients seront suivis 30 mois et la charge virale VHC sera mesurée régulièrement afin d'étudier les réinfections.

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.

Mise en place du diagnostic et description de la prévalence et des facteurs associés aux infections par l'hépatite Delta dans un hôpital national de référence au Cambodge : projet HDVtest4Cambodia. Les données sur la prévalence de la coinfection VHB-VHD et de son poids dans les maladies chroniques du foie en Asie du Sud Est sont parcellaires et montrent une grande hétérogénéité géographique. Aucune donnée sur le VHD n'est disponible à ce jour au Cambodge ni au Laos. Au Vietnam voisin, les coinfections sont décrites comme fréquentes et représentaient 16% des cas dans une étude récente et avaient un génotype 1 prédominant. Le carcinome

hépatocellulaire (CHC) représente la première cause de cancer au Cambodge. Dans ce pays, on estime la prévalence du VHB entre 3% et 5%. La plupart des infections sont le résultat d'une transmission materno-infantile du virus. Le gouvernement royal du Cambodge s'est fixé pour objectif d'éliminer l'hépatite C et l'hépatite B d'ici 2030, conformément aux objectifs de l'OMS. Dans cet objectif, le Ministère de la Santé a édité un plan national stratégique, lequel ne comprend cependant aucun volet sur le diagnostic ou le traitement du VHD. Aucun laboratoire au Cambodge ne réalise le diagnostic du VHD. Les cliniciens doivent envoyer à l'étranger (Thaïlande ou Corée) à grand frais les échantillons, ce qui est, en pratique, réalisé rarement. L'objectif principal de l'étude est d'évaluer la prévalence de l'hépatite delta de façon prospective au Cambodge. Les objectifs secondaires seront d'analyser les facteurs sociodémographiques et cliniques associés aux infections par le VHD, de réaliser un transfert de compétences pour le diagnostic sérologique et moléculaire du VHD, d'identifier par séquençage les génotypes circulants, ainsi que d'évaluer sur 200 participants un TDR VHD. Par la suite, des ateliers de travail avec l'ensemble des partenaires seront organisés afin d'améliorer la prise en charge du diagnostic biologique des hépatites B et D dans le pays. L'ANRS-MIE finance et promeut actuellement plusieurs projets sur les hépatites au Cambodge dont TAPRHOM, CAM-C et HEPEDIAC. Une bourse ANRS site a été attribuée pour 2023-2024 à un jeune médecin hépatologue (Dr Kim) pour travailler sur l'étude rétrospective des cas de CHC à l'Hôpital Calmette. Il sera encadré par le Dr Ky (chef de service d'hépatologie à l'Hôpital Calmette et le Dr Mosnier ETI ANRS à l'Université des Science et de la Santé-UHS). Dans le cadre de son master le Dr Kim aidera à la mise en place des tests sérologiques et de biologie moléculaire du VHD à l'hôpital Calmette. Un budget pour une mission de formation de 4 semaines à Avicenne est déjà financé dans le cadre de la bourse.

Caractérisation des profils transcriptomiques intra-hépatiques chez des patients coinfectés par le VHB et le VHD : comparaison avec des patients mono-infectés par le VHB. L'hépatite chronique D est la plus sévère des hépatites virales chroniques. Chez les patients VHB coinfectés par le VHD, la fibrose hépatique évolue plus rapidement que chez les patients uniquement infectés par le VHB avec un risque 3 fois plus élevé de développer une cirrhose. Les raisons de cette évolution plus sévère ne sont pas connues. Le but de ce projet est de caractériser les profils transcriptomiques intra-hépatiques des patients coinfectés VHB-VHD pour comprendre les mécanismes de la fibrogenèse hépatique et le rôle du micro-environnement hépatique et en particulier celui des cytokines. Ces profils seront comparés à ceux de patients infectés par le VHB. Les patients mono-infectés et coinfectés ayant eu une biopsie hépatique, suivis à Avicenne, Mondor et Strasbourg, ont été appariés 1 pour 1 en fonction du degré de fibrose, de l'âge, du sexe et du centre. Pour Avicenne, 69 biopsies de patients VHB-VHD et 80 de patients VHB ont été identifiées et transférées en anatomopathologie à Mondor. L'extraction et le séquençage d'ARN humains et viraux sont en cours. Le RNA sequencing et l'analyse transcriptomique spatiale réalisés sur la plateforme Genobionics de l'hôpital Henri Mondor permettront de comparer les 2 profils de patients et d'identifier des facteurs d'évolution fibrosante plus sévère chez les coinfectés.

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 laboratoire associé delta afin de déterminer la plus adaptée pour l'analyse de la variabilité et des mutations, à partir d'un panel de 98 échantillons ARN-VHD positif 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 en collaboration des deux laboratoires du CNR avec la plateforme Genobionics de l'hôpital Henri Mondor :

- . 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 : polymorphisme, génotypes, sous génotypes, mutants, mutations de résistance, évolution génétique.

1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

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: Stéphane Chevaliez) et d'un laboratoire associé en charge de l'hépatite delta (Responsable scientifique : Ségolène Brichler). Le laboratoire associé est le laboratoire de Microbiologie Clinique des hôpitaux universitaires Paris-Seine-Saint-Denis, localisé à l'hôpital 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 (plateforme "GENOBIOIMICS") 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 virologie de l'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 est 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 : 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 l'ex CNR Risques Infectieux Transfusionnels (RIT) depuis avril 2021. L'activité d'expertise du CNR RIT dans le domaine des hépatites virales se poursuit 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) sont 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'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 >40 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 sont 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 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, formes cliniques inhabituelles, ...).

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Personnels dévolus dans les activités du laboratoire coordonnateur :

	Qualification	ETP	Organisme payeur
Stéphane CHEVALIEZ	PU-PH	0,5	UPEC/APHP
Jean-Michel PAWLITSKY	PU-PH	0,1	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
Daniel CANDOTTI	Chargé de mission	0,2	APHP
Meriem HARRABI	ARC	1,0	Dotation CNR
Odon THIEBEAULD	Ingénieur	1,0	Dotation CNR
Valérie ORTONNE	Technicienne	1,0	APHP
Olivia GARRIGOU	Technicienne	1,0	APHP
Delphine ROSSE	Technicien	1,0	APHP
Jeanne-Marie LE GLAUNEC	Technicienne	1,0	APHP
Nathalie JOUSSET	CMT	0,1	APHP
Aurélien FERREIRA	Apprenante proLIB	0,5	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	USPN/APHP
Emmanuel GORDIEN	MCU-PH	0,2	USPN/APHP
Etienne CARBONNELLE	PU-PH	0,1	USPN/APHP
Frédéric LE GAL	Ingénieur	0,5	APHP
Chakib ALLOUI	PH	0,2	APHP
Athénais GERBER	Ingénieure	1,0	Dotation CNR
Samira DZIRI	Ingénieure	0,3	APHP
Valérian DELAGARDE	Assistant Ingénieure	1,0	Dotation CNR
Poussyina HAMOUDA	Technicienne	0,5	Dotation CNR
Franck DUPONT	CMT	0,1	APHP
Dominique ROULOT	PU-PH	0,2	USPN/APHP
Catherine ARRAS	Assistante	0,2	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 plateforme 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 plateforme automatisée de sérologies, ainsi qu'une plateforme intégrée de biologie moléculaire en maladies infectieuses et une plateforme 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 plateforme 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 près de 50 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 par tranches sur la période 2027-2029. 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.

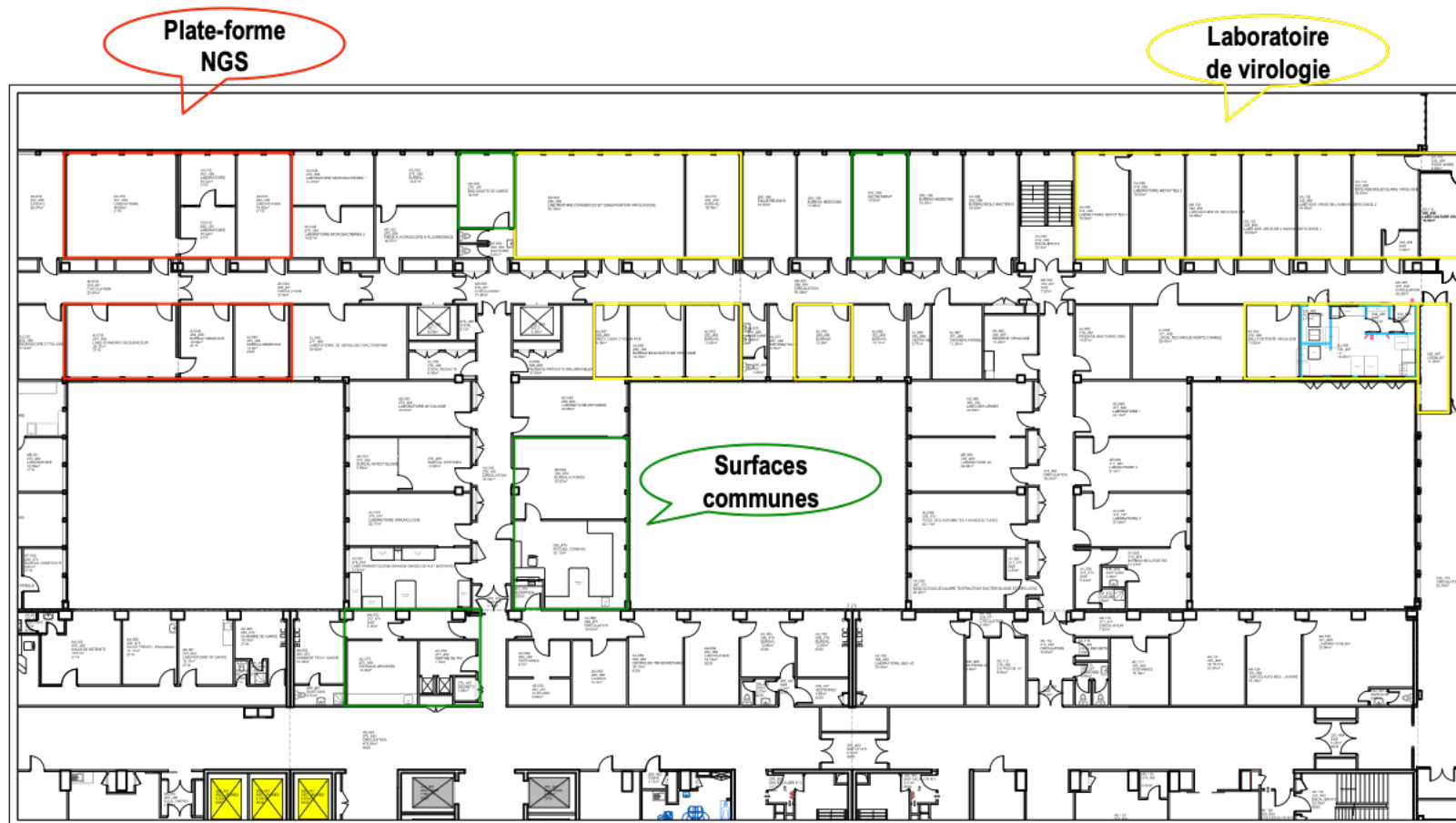


Figure 1 : Plan actuel du Département “Prévention, Diagnostic et Traitement des infections” avec les locaux dédiés au laboratoire de Virologie représenté en jaune, la plate-forme de NGS en rouge et les surfaces communes en vert. Cette organisation est appelée à évoluer avec l’ouverture de la plateforme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

Les équipements à la disposition du laboratoire coordonnateur sont les suivants :
Automates de sérologies virales



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/thermocycleur TMA en temps réel Panther (Hologic)
- . 1 extracteurs/thermocycleur TMA/PCR en temps réel Panther/Fusion
- . 3 extracteurs QIASymphony SP/AS (Qiagen)
- . 1 extracteur EMAG (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 plateforme de NGS

- . 2 Chemagic Prime (Perkin) (Extracteurs haut débit)
- . 1 Qiasymphony (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 PGMTM (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 ABI 3500DX (8 capillaires) (Applied Biosystems)
- . 1 Séquenceur SeqStudio (4 capillaires) (ThermoFisher)
- . 2 Ion Chief (ThermoFisher) (Préparateur de banque ThermoFisher)
- . 1 Séquenceur S5 (ThermoFisher) (NGS)
- . 1 Genexus (ThermoFisher) (préparateur de banque et séquenceur ThermoFisher) (NGS)
- . 1 MySeq (Illumina) (NGS)
- . 1 NextSeq 550 (Illumina) (NGS)
- . 2 automates de pipetage : 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 bibliothèque 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 bibliothèque spécifique consacrée aux donneurs d'organes, tissus et cellules contenant aujourd'hui plus de 47 000 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 bibliothèque spécifique consacrée aux donneurs de sang positifs pour les marqueurs VHB ou VHC est disponible.

Toute nouvelle souche ARN VHD-positif est conservée au laboratoire associé 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. Au 31 décembre 2023, la collection VHD comprenait 4 508 souches uniques. 147 souches et séquences ont été ajoutées à la collection en 2023.

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.

En plus de la quantification de l'ARN du VHD, le laboratoire associé réalise systématiquement un séquençage des souches envoyées dans le cadre de ces EEQ. Malheureusement, la majorité des échantillons contenus dans ces enquêtes appartiennent au génotype HDV-1, et ces programmes ne permettent pas de tester vraiment la capacité pangénomique des techniques. C'est pourquoi le laboratoire organise chaque année, à destination des laboratoires français, un contrôle national de qualité de biologie moléculaire. Les résultats du laboratoire de virologie d'Avicenne font l'objet d'une analyse individuelle comme l'ensemble des participants.

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 capsid du VHC (AgC), de l'AgHBe et de l'antigène lié à la capsid 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 (méthode automatisée et manuelle).
- . Techniques de biologie moléculaire pour la détection et la quantification des acides nucléiques (ADN VHB, ARN VHC et ARN 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 PreS ou par NGS (trousse ViroKey® SQ FLEX Genotyping Assay).
- . Techniques d'identification des VHB mutants de la région PreC/C par séquençage direct, hybridation inverse (Inno-LiPA HBV precore) ou par NGS (trousse ViroKey® SQ FLEX 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 (Inno-LiPA HBV DR v3) ou par NGS (trousse ViroKey® SQ FLEX 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 preS 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 VHB, ARN VHC et ARN VHD), de la détermination du génotype VHC, VHD et VHB, 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 :

- . Méthodes 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 quantification de l'ARN VHD (EurobioPlex HDV RT-PCR EBX-071, 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.