



RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE 2023

Année d'exercice 2022

CNR Herpes Virus

	Organisme / Structure d'hébergement	Responsable
Laboratoire Coordonnateur	CHU de Limoges	Pr Sophie ALAIN
Laboratoire Associé	Hopital Necker-Enfants malades- AP-HP	Dr Marianne LERUEZ-VILLE
Laboratoire Associé	Hopital Pitié Salpêtrière – AP-HP	Dr David BOUTOLLEAU

GUIDE DE REMPLISSAGE

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

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

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

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

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

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

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

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

Guide de remplissage	2
Résumé analytique	5
Faits marquants	5
Executive summary	6
Highlights	6
1. Missions et organisation du CNR	7
Organigramme	7
Mission et Organisation	9
Démarche Qualité	9
2. Activités d'expertise	11
2.1 Evolution des techniques	11
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse	11
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	18
2.4 Collections de matériel biologique	18
2.5 Activités d'expertises	21
2.6 Activités de séquençage	23
2.7 Partage de séquences produites par les CNR	26
3. Activités de surveillance	27
3.1 Description du réseau de partenaires	27
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	29
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	38
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	51
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	51
4. Alertes	53
5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil	54
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	54
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	56
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	57
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	58
6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	58
6.2 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	63

7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux	69
8. Programme d'activité pour les années suivantes	70
1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	74
1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	74
1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	74
1.3 Locaux et équipements	75
1.4 Collections de matériel biologique	76
1.5 Démarche qualité du laboratoire	78
2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	80
2.1 Liste des techniques de référence	80
2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR	85
3. Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)	91
3.1 Permanence du CNR	91
3.2 Autorisations MOT	91
3.3 Autorisations d'exercer la biologie médicale	92
3.4 Résultats de recherches non encore publiés ou sous embargo	92
3.5 Difficultés rencontrées par le CNR au cours de l'année N, y compris en termes de mise à disposition de la subvention versée par Santé publique France	92
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	92
3.7 Autres remarques à destination du comité des CNR	92

RESUME ANALYTIQUE

Faits marquants

Le bilan de la base de données nationale sur les infections congénitales à CMV objective une augmentation des centres qui dépistent le CMV pendant la grossesse mais une grande hétérogénéité de prise en charge. Le CNR Necker a poursuivi ses développements techniques et propose une nouvelle approche de l'évaluation pronostique et de nouveaux essais thérapeutiques. Les efforts conjoints de formation sur l'infection congénitale à CMV (arbres décisionnels sur le site du CNR, MOOC), devraient permettre d'améliorer son diagnostic et sa prise en charge.

L'année 2022 a été marquée par une reprise des transplantations conjointement à une utilisation plus large du maribavir et du letermovir. Le CNR Limoges a intensifié ses actions de communication sur la prise en charge des infections à CMV et l'évaluation de la réponse immune (accompagnement sur l'utilisation du Quantiféron CMV). Les résistances aux antiviraux n'ont pas diminué et leur surveillance exhaustive depuis 2021 grâce au réseau permet d'alerter rapidement sur l'émergence de nouvelles résistances. La mise en production en 2022 de la base de données des mutations de résistances sur le site du CNR en version anglaise, permet d'analyser les génotypes et de déclarer les nouvelles mutations en temps réel pour permettre au CNR de déclencher une analyse phénotypique par virus recombinant. Le CNR intensifie également l'analyse des facteurs associés à l'émergence de résistance par le développement du séquençage NGS du génome entier.

Dans le domaine des infections à alphaherpèsvirus, le CNR Pitié-Salpêtrière a poursuivi la surveillance des résistances, élargie au pritelivir et à l'amenamévir et incluant du NGS. La cohorte rétrospective nationale RétroAlpha 14-18 permet d'identifier, à partir des échantillons adressés au CNR par l'ensemble des laboratoires de virologie, les caractéristiques et les facteurs de risque d'infection neuroméningée grave à HSV/VZV. Une analyse métagénomique de ces prélèvements permettra d'analyser les facteurs viraux et génétiques associés.

EXECUTIVE SUMMARY

Highlights

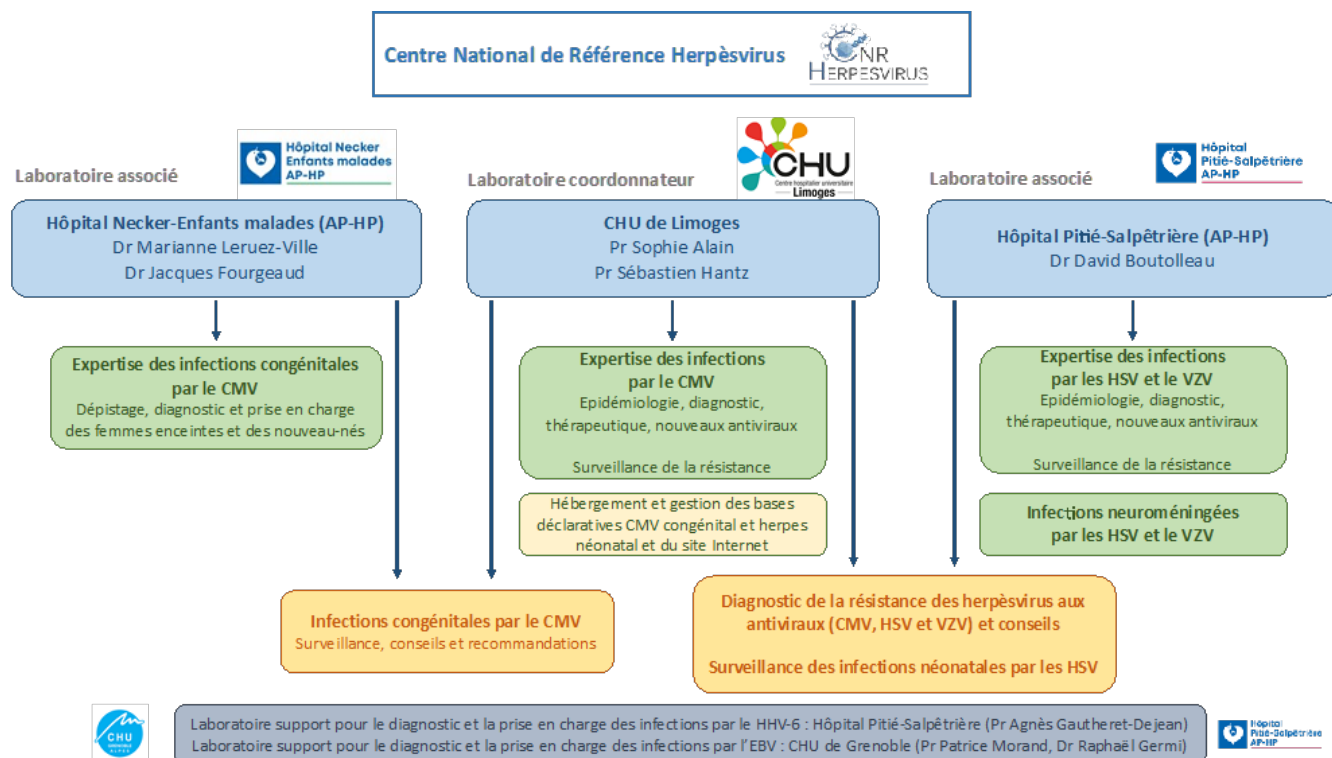
The results of the national database on congenital CMV infections show an increase in the number of centres screening for CMV during pregnancy, but disparate treatment options. The Necker laboratory has pursued its technical developments, proposing a new approach to prognostic evaluation and new therapeutic trials. Joint training efforts on congenital CMV infection (decision trees on the CNR website, MOOC) should help to improve diagnosis and management.

The year 2022 was marked by a resumption of transplants in conjunction with wider use of maribavir and letermovir. The CNR Limoges stepped up its communication campaigns on the management of CMV infections and the evaluation of the immune response (support for the use of CMV Quantiferon). Antiviral resistance has not diminished, and since 2021 the network's exhaustive monitoring of all antivirals has enabled us to provide early warning of the emergence of new resistances. The launch in 2022 of the resistance mutation database, accessible on the CNR website in English version, will enable genotypes to be analyzed and new mutations to be reported in real time, enabling the CNR to trigger phenotypic analysis using recombinant virus. The CNR is also stepping up its analysis of factors associated with the emergence of resistance through the development of whole-genome NGS sequencing.

In the field of alphaherpesvirus infections, the CNR Pitié-Salpêtrière has continued to monitor resistance, extended to pritelivir and amenamevir and including NGS. The RétroAlpha 14-18 national retrospective cohort uses samples sent to the CNR by all virology laboratories to identify the characteristics and risk factors for severe neuromeningeal HSV/VZV infection. A metagenomic analysis of these samples will make it possible to analyse the associated viral and genetic factors.

1. Missions et organisation du CNR

Organigramme



Laboratoire CNR coordonnateur Limoges :

Pas de nouveauté mais changement du technicien :

Médecins biologistes :

Pr Sophie ALAIN : Directeur du CNR Herpesvirus (0,45 ETP pour le CNR ; financement : hôpital et université)

Pr Sébastien HANTZ : Directeur adjoint (0,2 ETP pour le CNR ; financement : hôpital et université)

Médecin Gynécologue Obstétricien :

Dr Perrine COSTE-MAZEAU : Hôpital Mère Enfant, CHU de Limoges (financement Hôpital)

Technicien :

1 ETP Technicien CDD financé sur la MIG CNR Maladies transmissibles : **Guillaume FAURE** (janvier à mai) puis par **Fatoumata CONDET** (depuis mai 2022). Réception, enregistrement, analyses (génotypes de résistance CMV, HSV et VZV en Sanger, tests Quantiféron, avidités CMV, PCRs TTV, PCR CMV demandées par les laboratoires extérieurs au CNR, PCRs HSV sur échantillons extérieurs, recherche des HHV6 intégrés)

Ingénieurs :

- 1 ETP CDI financé sur les crédits MIG CNR : **Melissa GOMES-MAYERAS**
Recherches de résistance par NGS, tests sur carton de Guthrie. Réalisation des évaluations de techniques. Développe les techniques NGS.

- 1 ETP CDI Ingénieur bioinformaticien : **Valentin TILLOY** depuis juillet 2016
En charge du développement des pipe-lines et de l'analyse des données de séquence et de la mise à disposition des séquences sur la GenBank. Mise en ligne et entretien de la base de données de résistance sur le nouveau site internet.
- 1,3 ETP Ingénieur de recherche clinique :
Françoise GARNIER (0,5 ETP CDI) financée par la MIG CNR depuis 2017. Surveillance des bases de données cliniques sur la résistance, enquêtes du CNR en greffe de cellules souches, et transplantation d'organe, cohorte NaViRe en cours d'inclusion.
Elodie RIBOT (0,8 ETP CDI) Surveillance des infections congénitales à CMV avec le laboratoire associé Necker, et des infections néonatales à HSV, gestion des bases de données nationales. Responsable du site internet pour les trois laboratoires.
- **Pour assurer l'analyse des résultats issus des bases de données et des enquêtes concourant à la surveillance pour l'ensemble du CNR, nous avons obtenu 0,2 ETP de biostatisticien. La personne est recrutée (Deborah ANDOUARD) et commence ses travaux sur les bases de données résistance.**

Personnel concourant aux activités mais non financé par les crédits CNR.

Les techniciens de sérologie participent au dépistage de l'infection congénitale à CMV mis en place sous l'égide du CNR au CHU de Limoges depuis janvier 2020 par l'aide à la réalisation des tests d'avidité extérieurs en plus de ceux réalisés dans le cadre du dépistage systématique pratiqué au CHU de Limoges et accompagné par le laboratoire CNR.

Technicien 0,5 ETP CDI financé par l'INSERM et partagé avec le CNR Toxoplasmose : En 2023, Nicolas PLAUT en charge des antivirogrammes sur isolats et sur virus recombinants transfère cette technique au laboratoire CNR pour l'expertise des mutations de résistance. Il conserve et de l'entretien des modèles ex vivo et in vivo en souris SCID pour évaluer les nouveaux antiviraux.

Doctorants : Financés par Inserm et Université de Limoges

2019-2022 **Clotilde MULLER** : étude fonctionnelle du complexe terminase

2023-2025 **Maxime ROCHER** : ophtalmologiste « physiopathologie de la réactivation du CMV dans l'œil. Modèle d'infection et activité des antiviraux » : le doctorat est reporté à octobre 2023.

Laboratoire CNR associé Necker :

Pas de nouveauté à Necker.

Personnel dévolu au laboratoire CNR associé Necker (laboratoire de microbiologie Clinique) en 2022 (pas de nouveauté)

Médecins biologistes : 0,8 ETP

Dr Marianne Leruez-Ville : Cheffe de service- Praticien Hospitalier temps plein –a consacré 30% de son temps au CNR et est entièrement rémunérée par l'hôpital.

Dr Jacques Fourgeaud : Assistant Hospitalo-Universitaire a consacré 25% de son temps au CNR et est entièrement rémunéré par l'hôpital et l'université.

Dr Hanène Adib : Praticien Hospitalier Attaché qui a 5 vacations financées par les MIG versées à l'hôpital Necker dans le cadre du CNR.

Techniciens : 1,5 ETP

Mme Tiffany Guillemot a occupé le poste rémunéré par le budget du CNR (MIG). Mme Guillemot consacre 100% de son temps au CNR : réalisation des PCR CMV sur Guthrie, salive et liquide amniotique, des sérologies CMV, des expertises de trousse sérologiques CMV ou de biologie moléculaire CMV, récupération et saisies des données de déclaration de cas, biothèque du CNR.

Techniciennes du laboratoire de Virologie qui participent au fonctionnement du CNR en réalisant des techniques en lien avec l'activité du CNR (sérologie, PCR CMV) : 0.5 ETP.

Laboratoire CNR associé de la Pitié-Salpêtrière :

Pas de nouveautés en termes d'organigramme pour le CNR associé de la Pitié-Salpêtrière.

Personnel du CNR :

Dr David Boutolleau (MCU-PH, service de virologie) : responsable du CNR associé de la Pitié-Salpêtrière (0,5 ETP ; financement : hôpital et université)

Dr Sonia Burrel (MCU-PH, service de virologie) : responsable-adjointe du CNR associé de la Pitié-Salpêtrière (0,5 ETP ; financement : hôpital et université)

Olivier Bomme : technicien de laboratoire du CNR associé de la Pitié-Salpêtrière (1,0 ETP ; financement : MIG CNR)

Techniciens AP-HP du laboratoire de virologie (2,0 ETP ; financement : hôpital)

Mission et Organisation

L'organisation du CNR a été reconduite de façon similaire à celle du mandat précédent avec trois laboratoires référents en France pour leurs compétences dans le domaine des herpesvirus.

Les missions du CNR Herpesvirus sont orientées en priorité sur le Cytomégalovirus (CMV) et les alpha herpesvirus (HSV et VZV). La configuration proposée en 2016 ayant fait la preuve de son efficacité, nous avons choisi de la reconduire sans modification pour le nouveau mandat 2022-2027. Le CNR comporte donc trois laboratoires reconnus au niveau national et international pour leurs compétences dans ce domaine : un laboratoire CNR, au CHU de Limoges, laboratoire fondateur du CNR cytomégalovirus en 2006, en pointe sur l'épidémiologie des infections à CMV et leur prise en charge notamment chez les patients immunodéprimés et leader sur la résistance aux antiviraux, et deux laboratoires associés. Le laboratoire de virologie du CHU Necker, à Paris, qui fait partie du CNR depuis sa fondation, leader dans la prise en charge des infections congénitales à CMV assume les missions plus spécifiques à l'infection congénitale à CMV. Le laboratoire du CHU Pitié Salpêtrière, Paris, a rejoint le CNR en 2016 pour assurer les missions concernant HSV et VZV a mis en place pendant le mandat précédent un réseau de surveillance des résistances des HSV et VZV aux antiviraux et une surveillance des infections neuroméningées à HSV et VZV. Ces deux bases de données viennent compléter les surveillances historiquement mises en place par le laboratoire CNR concernant les infections congénitales à CMV en collaboration avec le laboratoire associé Necker, et les résistances aux anti-CMV depuis 2006, ainsi que la surveillance des infections néonatales à Herpes simplex depuis 2012, pour répondre à l'évolution des missions du CNR en 2012. Les missions de conseil concernant les infections graves aux autres herpesvirus (Varicelle, HHV6, EBV) sont assurées par les laboratoires du CNR avec l'aide du laboratoire référent national pour EBV au CHU de Grenoble.

La mission de coordination est assurée par le laboratoire de virologie du CHU de Limoges.

Pour des raisons d'organisation pratique territoriale et de charge de travail, les activités diagnostiques et de conseil resteront partagées entre les différents laboratoires. La liste des techniques disponibles dans les différents laboratoires est disponible sur le site du CNR et au chapitre « capacités techniques du laboratoire » du présent document.

Démarche Qualité

Laboratoire CNR coordonnateur Limoges :

Le Laboratoire de Biologie du CHU de Limoges est accrédité COFRAC à la norme 15189 depuis 2014. (N°8-2607 Rév 13). La mesure de la charge virale CMV par PCR quantitative sur sang total, la sérologie VIH sur Architect et la mesure de la charge virale VIH sur automate M2000 ont été accréditées en 2016. La portée a été étendue en 2019 à toutes les PCR herpes virus. En 2018 ont été accréditées les analyses quantitatives de charge virale du VIH, VHB, VHC et la détection des chlamydia et gonocoques par les techniques de TMA Hologic. Audit Cofrac de surveillance et validation des nouvelles techniques prévu en 2023.

En 2022 la technique Quantiféron CMV a été validée sur le Liaison XL (auparavant en microplaques) avec comme principal avantage un délai de rendu de résultat, et un coût réduit par l'utilisation de réactifs communs avec le kit QTF tuberculose (Poster présenté au CMV Workshop en 2022 et résultats publiés dans JCV 2023 - voir liste publications). La dernière visite a eu lieu en 2021 avec accréditation des sérologies virales sur Liaison XL (et transfert de méthode de l'Architect sur Alinity) et du Quantiféron™ CMV. Par ailleurs, la plate-forme de séquençage Sanger et NGS du CHU de Limoges, à laquelle participe le CNR est également accréditée Cofrac.

Les dossiers d'accréditation pour les PCR de séquence des différents gènes de résistance du CMV ont été initiés au second semestre 2022.

Le laboratoire participe par ailleurs chaque année aux contrôles externes de qualité du CTCB et du QCMD (charge virale et résistance génotypique) pour tous les herpesvirus.

La sécurité informatique est assurée par l'utilisation du réseau sécurisé du CHU, avec une sauvegarde centralisée de toutes les données sur deux serveurs distants, et la mise à disposition d'un serveur de grand volume (NAS) pour sécuriser les données de génomique (NGS) de la plate forme diagnostique de séquençage. Toutes les analyses effectuées par le laboratoire CNR sont enregistrées et gérées dans le logiciel de laboratoire GLIMS du Laboratoire de Biologie du CHU.

Les collections du CNR (responsables Sophie Alain et Elodie Ribot) sont progressivement intégrées Centre de Ressources Biologiques du CHU de Limoges CRBioLim certifié NF S96-900 (N°140787/1258F) pour pouvoir être cédées ou utilisées à des fins d'évaluation ou de collaboration. Les échantillons en attente d'intégration sont conservés dans la collection biologique du CNR au laboratoire (N°: DC 2008_604) sécurisées avec alarme au sein du Laboratoire et gérées par le logiciel Glims et le logiciel sécurisé TDBioBank.

Laboratoire CNR associé Necker :

Le laboratoire de virologie de Necker est accrédité COFRAC sur tous les marqueurs sérologiques (dont la sérologie CMV : IgG, IgM et avidité des IgG) et les marqueurs de biologie moléculaire (PCR CMV, PCR HIV, PCR virus des hépatites, PCR multiplex). Le laboratoire a fait une demande d'accréditation (ouverture de la ligne MG06) au COFRAC en mars 2021 pour les techniques en NGS, un audit interne a eu lieu en mai 2022, l'audit COFRAC de surveillance et de validation de nouvelle ligne est prévu en novembre 2023.

Laboratoire CNR associé de la Pitié-Salpêtrière :

Le laboratoire de Virologie de la Pitié-Salpêtrière est engagé dans une démarche qualité.

De nombreux examens virologiques sont accrédités :

- Sérologies des herpesvirus (HSV-1, HSV-2, VZV, CMV et EBV), HIV, HAV, HBV, HDV, HCV, rubéole
- Charge virale HIV plasmatique
- Le séquençage pour le diagnostic de la résistance du HIV aux antirétroviraux.

Participation à la conception et à la réalisation de programmes d'évaluation externe de la qualité

Le laboratoire de Virologie de la Pitié-Salpêtrière participe à différents programmes d'évaluation externe de la qualité (EEQ) :

- Sérologies herpesvirus : contrôles du CTCB et de Biologie Prospective (France)
- Détection/quantification des génomes des herpesvirus : contrôles du QCMD (Ecosse)
- Résistance génotypique du CMV et des HSV aux antiviraux : contrôles du QCMD (Ecosse)

2. Activités d'expertise

Les CNR de Limoges et de la Pitié-Salpêtrière assurent une activité d'expertise et de conseil pour la prise en charge des infections à CMV, HSV et VZV chez les patients immunodéprimés. Il assure une activité d'analyse des mutations de résistance aux antiviraux et de conseil thérapeutique pour la gestion des situations complexes et l'utilisation des nouvelles molécules. L'activité est assurée 5 jours sur 7 avec un rendu des résultats entre 48 et 72h (jours ouvrés).

Les CNR de Necker et de Limoges assurent conjointement l'activité d'expertise et de conseil pour l'infection congénitale à CMV. Concernant l'infection congénitale à CMV, les activités d'expertises notamment d'interprétation de sérologie pendant la grossesse sont de plus en plus importantes. Ceci s'explique par la sensibilisation des obstétriciens et sages-femmes aux enjeux de la primo-infection chez la femme enceinte et de leur prise de connaissance de l'efficacité du traitement par valaciclovir pour prévenir la transmission materno-fœtale démontrée par une étude randomisée et deux études de confirmation. Le rôle du CNR est primordial pour apporter une aide quotidienne aux collègues confrontés à ces cas mais de façon plus large pour aider à définir des recommandations de prise en charge. Le CNR de Necker a été moteur dans l'organisation d'un workshop européen en 2022 qui a permis de réunir les leaders d'opinion européens sur le sujet et d'élaborer des recommandations de prise en charge qui sont en cours d'écriture. Le CNR de Limoges, par la mise en place du dépistage systématique depuis 2020 au CHU de Limoges, apporte son expertise au réseau des CPDPN et complète le maillage sur le territoire. Il accompagne les sites souhaitant développer le dépistage et les praticiens pour une bonne mise en œuvre des traitements par valaciclovir et dans le cadre du dépistage post natal. La base de données nationale des infections congénitales sert également de support pour identifier les carences d'organisation des soins et pour adapter les recommandations.

2.1 Evolution des techniques

Les techniques exposées dans le dossier de renouvellement sont toujours en vigueur au laboratoire de Limoges et de Necker. Il n'y a pas d'évolution des techniques utilisées dans le cadre de l'activité du CNR au cours de l'année 2022.

En 2022, le CNR associé de la Pitié-Salpêtrière s'est équipé de l'automate FilmArray TORCH pour le diagnostic des méningoencéphalites d'origine infectieuses, notamment les herpèsvirus (HSV-1, HSV-2, VZV, CMV et HHV-6). En complément de la méthode de génotypage des souches de VZV pour l'identification du caractère sauvage ou vaccinal des virus (mise en place en 2018 en partenariat avec le laboratoire MSD Vaccins dans le cadre du programme européen EU VZVIP (European Varicella-Zoster Virus Identification Programme), nous avons développé une méthode de génotypage des souches de VZV pour l'identification des clades (1 à 6, 9, VII et VIII) et participer ainsi à de études épidémiologiques. Cette méthode est fondée sur l'identification des SNP au sein des ORF21 (positions 33725 et 33728), ORF22 (positions 37902, 38055, 38081 et 38177) et ORF50 (position 87841), ORF29 (position 52365), ORF38 (position 69424) et ORF67 (position 114639).

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

Laboratoire CNR coordonnateur Limoges :

1. Comparaison des trousse de détection des anticorps HSV-1 et HSV-2 Abbott® et DiaSorin®

Objectifs

Les tests sérologiques spécifiques du type d'HSV peuvent être particulièrement utiles dans le cadre de la prise en charge des femmes enceintes et de leurs nouveau-nés pour évaluer le risque d'infection néonatale. L'objectif de cette étude est d'évaluer 2 techniques automatisées permettant la détection des anticorps spécifiques de type HSV-1 et HSV-2.

Matériels et méthodes

173 sérums ont été collectés de janvier 2020 à juillet 2021 et conservés à -20°C dans la collection biologique du CHU de Limoges. 153 sont positifs en IgG HSV1/2 (Liaison XL, DiaSorin®) et 20 négatifs. Les sérologies IgG VZV (Liaison XL, Diasorin) ont été préalablement testées en parallèle de la sérologie initiale pour évaluer d'éventuelles réactions croisées. La détection d'IgG anti-HSV-1 et anti-HSV-2 a été réalisée avec les trousse HSV-1 IgG et HSV-2 IgG Abbott® sur un

automate Alinity-i en comparaison avec les trousse HSV-1 et HSV-2 IgG Liaison® (DiaSorin®) sur un automate Liaison XL. Les techniques de dosage spécifique HSV-1 et HSV-2 utilisent des antigènes recombinants gG1 et gG2 respectivement pour HSV-1 et HSV-2. La concordance entre les trousse a été évaluée par le coefficient Kappa avec le logiciel GraphPad®.

Résultats, discussion et conclusion

Pour la sérologie HSV-1, 7 sont négatifs en Abbott®/positifs en DiaSorin®, et 1 positif en Abbott®/négatif en DiaSorin®. Les discordants (positifs initialement en HSV-1/2) présentent pour la plupart des valeurs entre 0,5 et 1 (Abbott). Pour la sérologie HSV-2, 1 est négatif en Abbott®/positif en DiaSorin®, et 13 positifs en Abbott®/négatifs en DiaSorin® alors que le test HSV1/2 était positif dans 9 cas sur 13. Les tests Kappa sont respectivement de 0,87 pour la détection des IgG HSV-1 et 0,77 pour HSV-2, témoignant donc d'une excellente concordance pour le test HSV-1 entre les techniques, et d'une bonne concordance pour le test HSV-2, permettant d'envisager une utilisation en routine de ces nouvelles trousse.

Travail présenté en communication affichée à la SFM 2022 et ayant fait l'objet de la soutenance de thèse de Marwan Haboub

V-P07

Comparaison des trousse de détection des anticorps HSV-1 et HSV-2 Abbott® et DiaSorin®



Marwan Haboub (1) (marwan.haboub@chu-limoges.fr), Aurore Clot (1), Jessica Fiammetti (1),
Charline Devilleger (1), Pauline Lefebvre (1), Sophie Alain (1,2), Sébastien Hantz (1,2)
(sebastien.hantz@chu-limoges.fr)

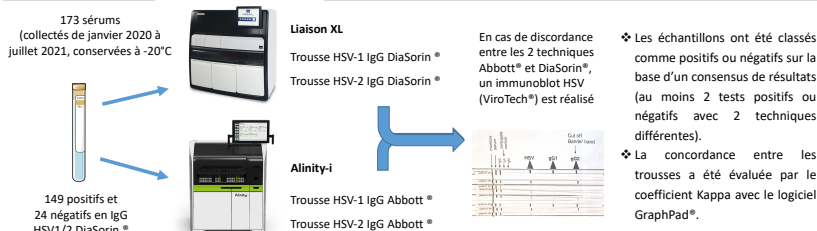
(1) Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU Limoges, France
(2) Centre national de référence des Herpèsvirus, Laboratoire Coordonnateur, Limoges



INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Le diagnostic de lésions dues aux virus herpès simplex de type 1 (HSV-1) et 2 (HSV-2) repose sur la biologie moléculaire en première intention. Cependant, en phase de latence, seuls les tests sérologiques permettent de mettre en évidence les patients séropositifs pour ces virus. Les tests sérologiques spécifiques du type d'HSV peuvent être particulièrement utiles dans le cadre de la prise en charge des femmes enceintes pour évaluer le risque d'infection néonatale. L'objectif de cette étude est de comparer les performances de 2 techniques automatisées permettant la détection des anticorps spécifiques de type HSV-1 et HSV-2.

MATÉRIELS ET MÉTHODES



RÉSULTATS

Trousses HSV-1 IgG DiaSorin et Abbott

Sur 173 sérums analysés, 132 étaient positifs et 41 négatifs avec la technique « HSV-1 IgG Abbott® ». 138 étaient positifs et 35 négatifs avec la technique « HSV-1 IgG DiaSorin® ». 8 échantillons se sont révélés discordants entre les 2 techniques, 7 négatifs en technique Abbott® (positifs en DiaSorin®), 1 positif en technique Abbott® (négatif en technique DiaSorin®). Sur les 7 négatifs Abbott, 5 ont été confirmés négatifs par immunoblot, et 2 se sont révélés positifs. Pour la technique HSV-1 IgG Abbott, les sensibilité et spécificité sont respectivement de 97,8% et 97,4%. Pour la technique HSV-1 IgG DiaSorin®, elles sont respectivement de 99,3% et 87,2%. La concordance des 2 techniques est excellente avec un coefficient kappa de 0,87.

kappa de 0,87.

		Résultats Abbott®		
		HSV 1 +	HSV 1 -	Total
Résultats DiaSorin®	HSV 1 +	131	7	138
	HSV 1 -	1	34	35
	Total	132	41	173

Tableau de contingence entre les techniques HSV-1 IgG Abbott et DiaSorin.

Trousses HSV-2 IgG DiaSorin et Abbott

Sur 173 sérums analysés, 44 étaient positifs et 129 négatifs avec la technique « HSV-2 IgG Abbott® ». 32 étaient positifs et 141 négatifs avec la technique « HSV-2 IgG DiaSorin® ». 14 échantillons se sont révélés discordants entre les 2 techniques: 13 négatifs en technique DiaSorin® et positifs en technique Abbott®, et 1 positif en DiaSorin® et négatif en Abbott®. L'analyse des 14 discordants par immunoblot a permis de conclure pour les 14 discordants: 12 faux-positifs et un vrai-positif avec la trousse Abbott, 1 faux positif avec la trousse DiaSorin. Pour la technique HSV-2 IgG Abbott, les sensibilité et la spécificité sont respectivement de 100% et 92,1%. Pour la technique HSV-2 IgG DiaSorin®, elles sont respectivement de 93,9% et 99,3%. La concordance des 2 techniques est bonne avec un coefficient kappa de 0,77.

0,77.

		Résultats Abbott®		
		HSV 2 +	HSV 2 -	Total
Résultats DiaSorin®	HSV 2 +	31	1	32
	HSV 2 -	13	128	141
	Total	44	129	173

Tableau de contingence entre les techniques HSV-2 IgG Abbott et DiaSorin.

DISCUSSION & CONCLUSION

Dans le contexte des infections à herpès simplex, la sérologie est un outil indispensable pour définir le statut d'une femme enceinte ou d'un patient immunodéprimé. L'évaluation des trousse utilisées dans ces situations est indispensable afin de définir leurs performances respectives. En effet, des erreurs dans la définition du statut sérologique peuvent conduire à des modifications de stratégies thérapeutiques aux conséquences potentiellement graves. Notre évaluation met en évidence une meilleure concordance pour les trousse de détection des IgG anti-HSV-1 que celles détectant les IgG anti-HSV-2. La technique DiaSorin est la plus sensible (99,3% contre 97,4%) pour la détection d'IgG anti-HSV-1, tandis que la technique Abbott est la plus sensible (100% contre 93,9%) pour la détection d'IgG anti-HSV-2 au détriment d'une plus faible spécificité. Ces données seraient à confirmer sur un échantillon plus important de patients infectés par HSV-2.

REFERENCES

Comparison of commercial methods of immunoblot, ELISA, and chemiluminescent immunoassay for detecting type-specific herpes simplex viruses- and -2 IgG, Fernando de Ory and al, 2017.

2. Développement de la mesure de la synthèse intra-thécale HSV et VZV avec les trousse HSV1-2 et VZV de Diasorin sur Liaison XL

Objectif

Le diagnostic d'encéphalite herpétique ou varicelleuse est réalisé par biologie moléculaire sur liquide cérébro-spinal (LCS). Cependant, les PCR spécifiques peuvent être négatives malgré un tableau évocateur. La détermination d'une synthèse intrathécale (SIT) avec production d'immunoglobulines de type G (IgG) anti-HSV ou anti-VZV permet dans ces situations le diagnostic rétrospectif. L'objectif de ce travail est de doser la SIT avec les trousse HSV-G et VZV-G (DiaSorin®) sur l'analyseur LiaisonXL.

Matériels et méthodes

Nous avons réalisé les dosages HSV-G et VZV-G de 187 couples LCS/sérum à l'aide des trousse LIAISON® HSV-1/2 IgG et LIAISON® VZV IgG (DiaSorin®) sur LiaisonXL®. Les couples LCS/sérum proviennent de tableaux neurologiques divers. La détermination du bruit de fond a été réalisée sur 30 LCS, négatifs en culture bactérienne et en PCR HSV/VZV. 3 sérums positifs en VZV et 3 positifs en HSV (titres fort, moyen et faible) ont été dilués (1/2 au 1/64) dans du LCS préalablement testé négatif en sérologie et PCR. Les index d'anticorps (AI) HSV et VZV ont été calculés avec les formules de Reiber. L'AI est considéré positif si $> 1,4$.

Résultats

La valeur médiane du bruit de fond des 30 LCS a été mesurée à 3195 RLU avec 2 valeurs extrêmes à 26010 et 23159 RLU pour HSV et à 1815 RLU avec 2 valeurs extrêmes à 24602 et 19308 RLU pour VZV. Le seuil de positivité a donc été fixé à 20 000 RLU. La dilution des sérums positifs en IgG HSV et VZV a montré une bonne concordance uniquement dans les faibles valeurs. Les valeurs inférieures au seuil de positivité pour HSV-G et VZV-G ont été extrapolées à partir de l'équation de la droite déterminée à l'aide des valeurs situées dans l'intervalle de mesure. 14 LCS sur les 187 ont un signal RLU $> 20\,000$ en VZV, dont 7 ont un AI positif allant de 1,5 à 8,1 (1 AI positif également en HSV). 13 LCS ont un RLU $> 20\,000$ en HSV dont 2 avec un AI positif (1,7 et 2,6).

Conclusion

La mesure de la SIT sur l'automate LiaisonXL avec les trousse VZV-G et HSV-G est réalisable au vu des résultats obtenus malgré une dilution du LCS pouvant théoriquement entraîner une diminution de la sensibilité du dosage. Ces données préliminaires nécessitent d'être confirmées sur des échantillons prospectifs pour valider la méthode de mesure dans le cadre d'un groupe de travail national initié par le CNR Herpesvirus et le CNR ROR (cf paragraphe 3.5)

Travail présenté en communication orale à la RICAI 2022 et ayant fait l'objet de la soutenance de thèse de Marwan Haboub

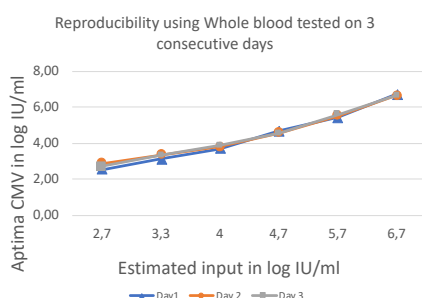
3. Evaluation de la trousse Aptima CMV (Hologic) sur sang total versus plasma :

Objectif : Evaluer les performances de la trousse Aptima® CMV sur sang total et plasma pour la quantification de la charge virale CMV.

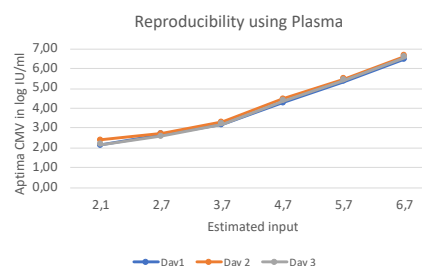
Matériel et Méthodes : Dilutions en Plasma ou sang total du panel Accrometrix, 153 échantillons de patients issus de la collection biologique du CNR associant plasma et sang total sur le même prélèvement. Extraction et amplification avec EMag et Rgene CMV (BioMérieux) en parallèle d'Aptima CMV.

Résultats : la reproductibilité du test dans les deux matrices sur le panel accrometrix est excellente : (Deviation standard sang total 0.26 pour 2,7 log UI/mL et ≤ 0.15 au dessus de 3 log UI/mL et deviation standard plasma ≤ 0.16 pour toutes les valeurs de la gamme et < 0.09 au dessus de 3 log UI/mL). La concordance plasma versus sang total sur les échantillons rétrospectifs est de 82% pour les deux méthodes. La concordance Aptima CMV versus Rgene CMV est de 87%.

Reproducibility in Wholeblood with Aptima CMV.



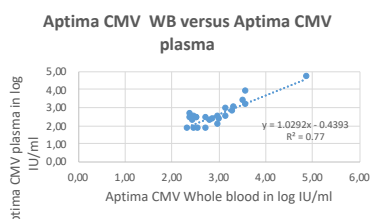
Reproducibility in Plasma with Aptima CMV.



Concordance of results using paired retrospective plasma and whole blood samples with Aptima CMV

		Aptima CMV Plasma	
		Det	not Det
Aptima CMV Whole blood	Det	58	5
	Not Det	19	55

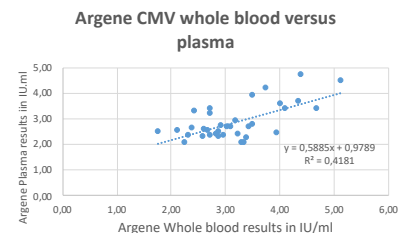
Overall concordance 82%



Concordance of results using paired retrospective plasma and Whole blood samples with Argene CMV

		Argene CMV plasma	
		Det	not Det
Argene CMV Whole blood	Det	35	19
	Not Det	6	82

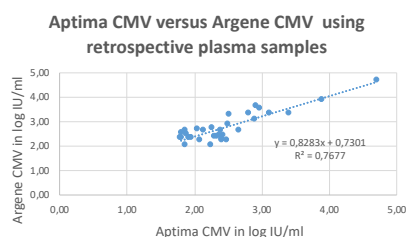
Overall concordance 82%



Concordance Aptima CMV and Argene CMV using retrospective plasma samples

		Aptima CMV Plasma	
		Det	not Det
Argene Plasma	Det	37	2
	Not Det	44	58

Overall concordance 67%



Conclusion : Le sang total est une matrice robuste et facile à utiliser, largement utilisée en Europe pour l'EBV, le CMV et d'autres virus.

L'augmentation de l'automatisation et de l'étalonnage en UI est nécessaire.

L'utilisation de sang total ou de plasma est importante pour une large utilisation intercontinentale.

Le test Aptima® CMV sur Panther montre une automatisation complète avec un échantillonnage direct à partir du tube EDTA, et des calibrateurs en UI/mL.

La reproductibilité élevée des panels de sang total et de plasma pour des charges virales élevées ou faibles montre que la méthode est robuste.

Les résultats ont été présentés en communication orale à l'ECCMID 2022.

Laboratoire CNR associé Necker :

1. Evaluation de la touse du test Alinity™ m CMV dans des échantillons d'urine et de liquide amniotique

Objectif : évaluer les performances de la trousse de PCR CMV Alinity™ m CMV dans des échantillons de liquide amniotique et salive en l'absence de marquage CE pour ces échantillons par rapport à la technique de référence du laboratoire.

Matériel et Méthodes: 76 échantillons de liquides amniotiques conservés à -80°C et 218 échantillons salivaires en milieu de transport (Amies, Copan) recueillis à la naissance (49 conservés à -80°C et 169 échantillons frais). Technique de référence : CMV-R gene (BioMérieux). La LOD du test CMV-R gene est de 116 IU/ml dans le liquide amniotique et de 174 IU/ml dans la salive. Le test Alinity m CMV (Abbott) revendique une LOD de 30 IU/mL dans le plasma.

Résultats : La concordance entre les 2 tests était de 96.1% dans les liquides amniotiques et de 92.2% dans la salive (Table 1). 17 échantillons salivaires étaient positifs avec Alinity m CMV (charges virales basses ≤2.14 log IU/ml) et négatifs avec cmv-R gene. La corrélation entre charges virales était haute R²=0.91 pour les liquides amniotiques et 0.77 pour les salives (Figures 1 et 2).

L'Alinity m CMV a montré de bonnes performances. Les charges faibles dans la salive étaient plus fréquentes. Celles-ci sont dues à la contamination du prélèvement salivaire par de l'ADN d'origine maternelle. Dans ces cas, un contrôle doit être réalisé dans les urines ou dans un autre prélèvement salivaire.

Table 1

Liquides amniotiques N=76	CMV-R gene Positif	CMV- R gene Négatif
Alinity m CMV Positif	48	1*
Alinity m CMV Négatif	2**	25
Echantillons salivaires N=218		
Alinity m CMV Positif	37	17***

Alinity m CMV Négatif	0	164
-----------------------	---	-----

*Un échantillon positif faible en Alinity négatif en CMV-R gene : patient dont le nouveau-né était infecté

** 2 échantillons avec 34 IU/ml et 514 IU/ml avec CMV-R gene mais CMV R gene négative au contrôle pour ces 2 échantillons

***17 échantillons positifs avec Alinity m CMV avec charge virale basse ≤ 2.14 log IU/ml.

Figure 1: Corrélation dans les échantillons de liquide amniotique

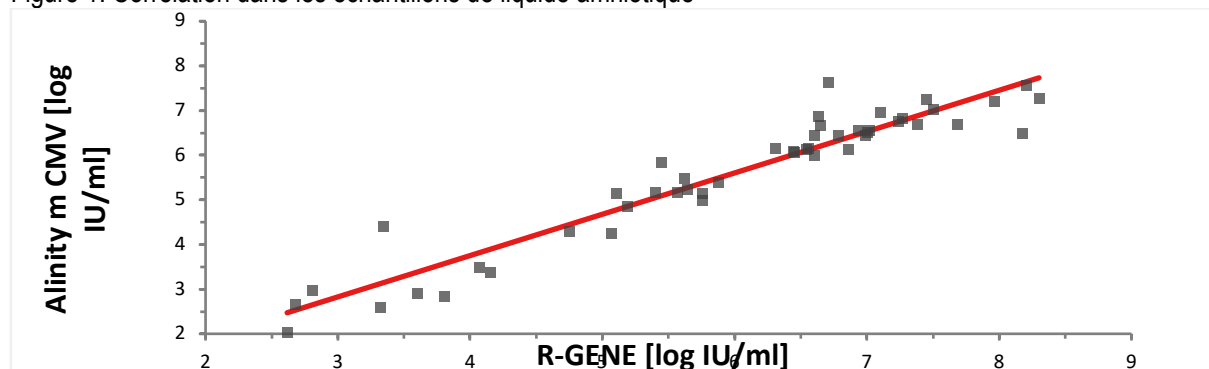
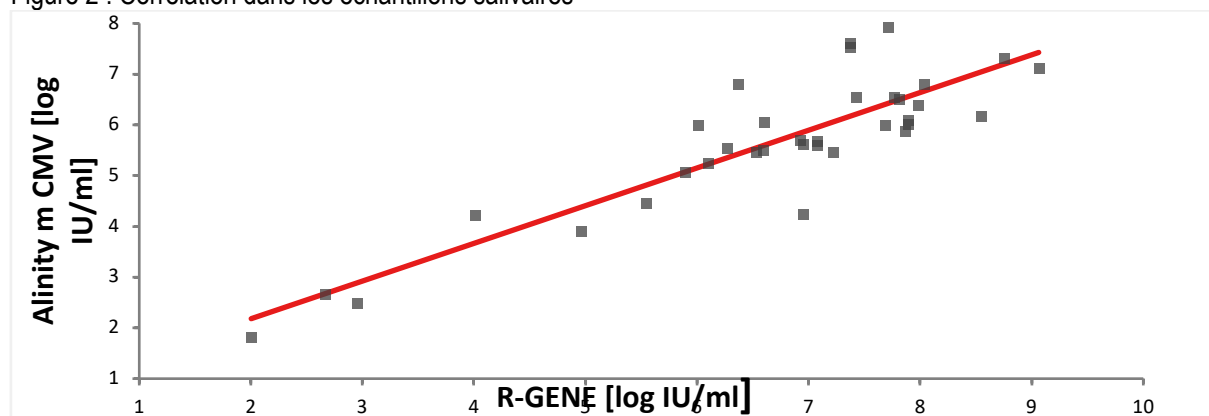


Figure 2 : Corrélation dans les échantillons salivaires



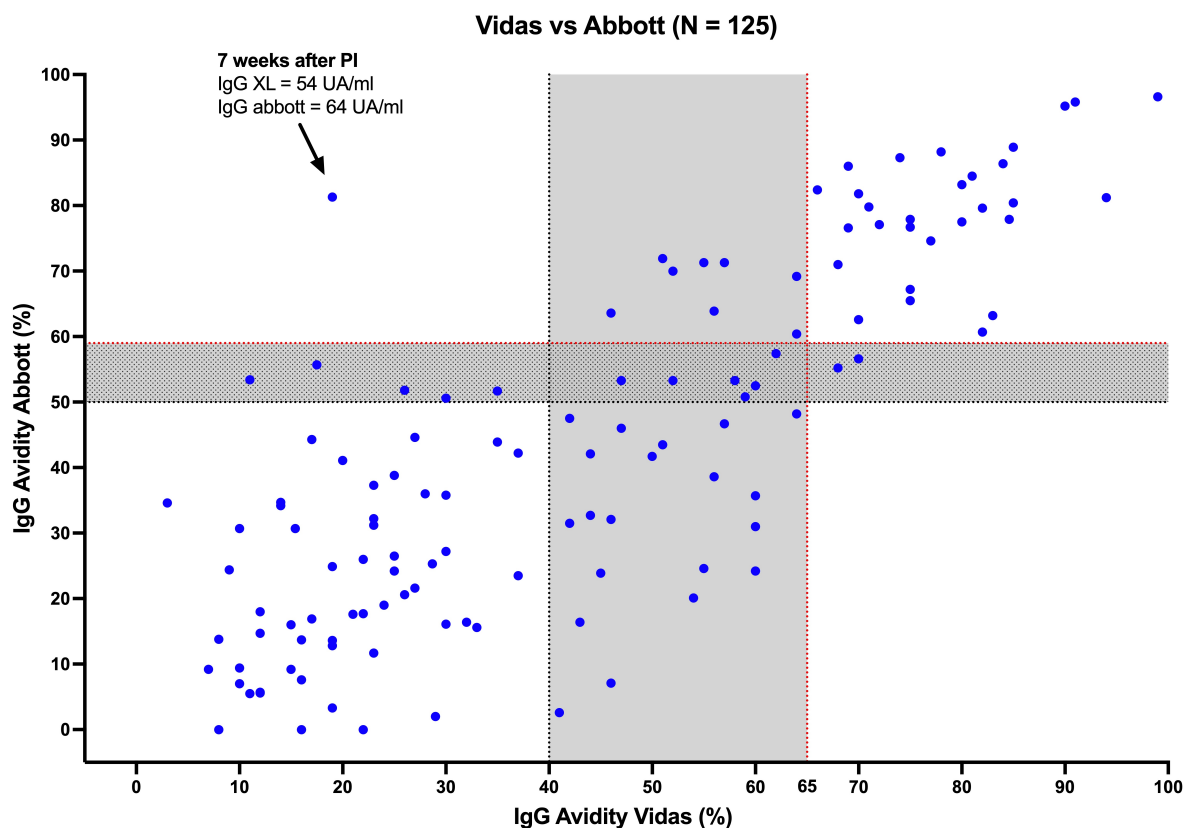
Cette comparaison de méthode a été soumise pour une présentation en poster à l'ESCV en septembre 2023.

2. Évaluation du test d'avidité des IgG CMV Abbott

Le test d'avidité des IgG CMV sur la plateforme Abbott est de plus en plus utilisé notamment depuis 2022 par un des laboratoires de spécialisation (Bionmis) qui auparavant utilisait le test Liaison Diasorin. De nombreux résultats sont donc maintenant rendus avec ce test.

Afin de pouvoir exercer notre expertise au mieux et en sachant qu'il existe peu de publication sur les performances de ce test nous avons voulu 1) comparer ce test avec le test avidité Vidas qui reste notre test de référence 2) regarder la performance du test dans 44 sérums prélevés chez 24 femmes dont la date de primo-infection avaient pu être calculée avec certitude (séroconversion entre 2 échantillons prélevés à moins de 4 semaines d'écart ou présence d'IgM isolées suivie d'une séroconversion).

Figure 1 : Comparaison résultats avidité Vidas et Abbott sur 125 sérums de femmes enceintes présentant des IgM anti CMV



La corrélation entre les 2 tests est globalement bonne entre les 2 techniques. Un échantillon a une avidité élevée en Abbott alors qu'il s'agissait d'un cas de primo-infection de moins de 7 semaines

Table 1 : Comparaison des avidités avec les 3 tests dans des sérums de 26 femmes enceintes ayant une primo-infection datée avec précision

Délai / PI	Abbott	Vidas	Liaison
< 30 jours	26/26 avidités basses	20/20 avidités basses	20/21 avidité basse 1 avidité à 0.154 (J14)
30 à 60 jours	13/16 avidités faibles 2 avidités élevées (J52 et J53) 1 avidité intermédiaire (J32)	14/14 avidités basses	10/14 avidités basses 4/14 avidités intermédiaires
60 à 90 jours	3/4 avidités faibles 1/4 avidités intermédiaires	2/4 avidités faibles 2/4 avidités intermédiaires	1/4 avidité faible 2/4 avidités intermédiaires 1/4 avidité élevée
>90 jours	1/3 avidité intermédiaire 1/3 avidité forte	2 avidités intermédiaires	2 avidités intermédiaires

Les 3 tests diagnostiquent les primo-infections survenues dans le mois précédent.

Pour les infections survenues entre 1 et 2 mois : l'avidité Vidas diagnostiquent tous les cas avec une avidité faible, l'avidité Liaison diagnostiquent 70% des cas avec une avidité faible et 30% avec une avidité intermédiaire. Plus préoccupant, l'avidité Abbott classe 2 cas en « infection de plus de 3 mois » alors que survenus respectivement à J53 et J52 après la primo-infection.

3. Développement d'un algorithme d'interprétation des sérologies CMV

Un système expert de datation des primo-infections à CMV chez les femmes enceintes a été mis au point. Ce système est basé sur les résultats de 179 sérums provenant de 80 femmes enceintes avec une primo-infection datée de façon précise (séroconversion ou IgM isolées). Ce système est basé sur les résultats de sérologie CMV IgG et IgM obtenus en Liaison et sur des résultats d'avidité CMV obtenus avec la trousse Vidas.

Ce système expert a été testé avec les résultats de sérologie CMV obtenus chez 100 autres femmes enceintes avec une suspicion de primo-infection. La datation a été cohérente avec celle faite par les biologistes du CNR dans 100% des cas.

est une erreur parfois commise par la technologie Oxford Nanopore elle-même. Nous prévoyons d'évaluer les performances de la plateforme iSeq 100 (Illumina) pour le diagnostic de la résistance des herpèsvirus aux antiviraux : CMV (en collaboration avec le CNR associé de Necker ; cf infra), HSV et VZV.

3. Etude de la commutabilité du CMV : intérêt de l'utilisation d'un standard externe pour l'uniformisation inter-centres des résultats de la quantification de la charge virale CMV dans le plasma.

Le CNR associé de la Pitié-Salpêtrière a participé à cette étude organisée par les laboratoires BioRad et incluant 6 laboratoires de virologie en France. Chaque laboratoire a reçu 68 échantillons de plasma (60 positifs et 8 négatifs pour le CMV) qu'il a passé dans sa technique de routine de quantification du CMV. Le panel incluait également 5 standards externes Exact Diagnostics (EDX) de chez BioRad afin de pouvoir recalculer dans chaque centre les charges virales CMV obtenues initialement par la technique de routine. Les résultats montrent que l'utilisation de ces standards externes permet de tendre vers une uniformisation des valeurs des charges virales CMV (UI/mL) obtenues dans les différents centres, sans toutefois obtenir des valeurs réellement similaires. Au vu de ces résultats, il reste recommandé de toujours suivre les charges virales CMV d'un patient dans le même laboratoire et avec la même technique de PCR. Les résultats de ce travail seront présentés lors du prochain congrès ESCV à Milan en 2023.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Laboratoire CNR coordonnateur Limoges :

- Transfert partiel de la technologie des Bacmides au laboratoire de virologie de l'Université de Barcelone (Pr Marcos-Angeles) avec accueil d'une doctorante de l'université de Barcelone au laboratoire, formation aux antivirogrammes et cultures virales et publication commune (Santos, JID 2021, Santos, Spectrum 2022).
- Transfert des techniques Quantiferon CMV avec accompagnement à l'interprétation des résultats vers les laboratoires de Grenoble, Bichat, et de la technique sur Liaison XL vers le laboratoire de virologie de Montpellier.

Laboratoire CNR associé Necker :

PCR CMV « maison » dans échantillons salivaires transférées à l'Hôpital Phu San de Hanoi dans le cadre de l'étude Cymeve.

Technique d'extraction sur carton de Guthrie transférée au CNR entérovirus de Lyon.

Laboratoire CNR associé de la Pitié-Salpêtrière :

Le CNR associé de la Pitié-Salpêtrière a accompagné le laboratoire de Virologie d'Avicenne dans la mise en place de l'automate Liaison MDX pour la réalisation des PCR HSV-1, HSV-2 et VZV sur LCS et milieu de transport. Nous avons réalisé un contrôle de qualité constitué de 20 échantillons (10 milieux de transport et 10 LCS de synthèse) contenant différentes concentrations de souches ATCC HSV-1, HSV-2 et VZV. Le laboratoire de Virologie d'Avicenne a techniqué ces échantillons en aveugle et nous a envoyé ses résultats au CNR associé : 100% de bonnes réponses.

2.4 Collections de matériel biologique

Laboratoire CNR coordonnateur Limoges :

Les collections du CNR sont progressivement intégrées au Centre de Ressources Biologiques du CHU de Limoges CRBioLim certifié NF S96-900 (N°140787/1258F) pour pouvoir être cédées ou utilisées à des fins d'évaluation ou de collaboration. Les autres échantillons sont conservés dans la collection biologique du CNR au laboratoire (N°: DC 2008_604). Les échantillons cliniques et souches issues de l'activité du laboratoire sont progressivement intégrées aux collections du CNR puis au CRBioLim. La mise à disposition se fait via le CRBioLim par création d'une sous collection et cession (Responsable de collection S Alain et gestionnaire E Ribot).

Le laboratoire CNR est le seul laboratoire en France qui isole sur fibroblastes et sur cellules endothéliales et entretient des souches de cytomégalovirus provenant de tous types de prélèvements et de patients. Ces souches sont conservées dans la collection du CNR et pour un certain nombre d'entre elles, sont caractérisées pour leur génome entier ou leur

génotype gB, gH, gN. Ces souches peuvent être mises à disposition de laboratoires de recherche via le CRBioLim.

Biothèque transférée progressivement vers la collection du CNR au sein du CRBioLim après vérification de non opposition :

- Souches d'HSV, de VZV isolées pour typage ou reçues pour phénotype de résistance antérieures à la création du CRBioLim, qui sont progressivement intégrées à la collection du CNR
- Près de 13000 échantillons de sang totaux de patients transplantés conservés à -80°C depuis 2013

Biothèque spécifique du CNR pouvant être utilisée à des fins d'expertise et conservées dans la collection du CNR au CRBioLim (souligné = en évolution en 2022)

- 6840 sangs totaux CMV positif ou négatifs aliquotés et mis en collection biologique pour les évaluations de trousse de PCR.
- 2040 plasma CMV et /ou EBV positif pour évaluation des trousse de PCR
- 1707 échantillons de sérum adressés pour primo-infection et dont les caractéristiques (IgG et IgM et avidité des IgG) sont connues. Ces sérums sont conservés à -20°C.
- 129 Echantillons de sérums de primo-infection ou de réactivation positifs pour la recherche d'IgM provenant de l'hôpital Charles Nicolle à Tunis reçus en 2009 caractérisés en 2010 pour les glycoprotéines d'enveloppe gB gH gN.
- 50 urines de nouveaux-nés positives pour la recherche de CMV par culture
- 1772 salives d'enfants en crèche (PHRC Crech MV) dont 663 positives en PCR CMV et 212 caractérisées pour leur génotype gB, gH et gN.
- 62 échantillons couplés de salive et de sérum prélevés sur volontaires sains, caractérisés pour la recherche du CMV salivaire et des anticorps sériques et salivaires issus du protocole ACMV.
- 1552 prélèvements spécifiques pour recherche de résistance de 2006 à 2016 caractérisés pour la séquence des gènes UL97 et UL54 dont 36 également caractérisés pour les glycoprotéines d'enveloppe gB, gH, gN.
- 2245 prélèvements spécifiques pour recherche de résistance de 2017 à 2022 caractérisés pour la séquence des gènes UL97 et UL54.
- 3618 prélèvements issus de l'Observatoire des résistances 2006-2010
- 6139 prélèvements issus des 402 patients inclus dans ORPhaViC
- 1785 prélèvements de plasma ou de sang total issus du protocole Quantic R+
- 1880 prélèvements issus des 371 patients inclus dans NAVIRE
- 98 prélèvements issus des 16 patients inclus dans CIRCLE
- 33 Liquides amniotiques CMV positifs issus de cas de CMV congénital déclarés dans la base
- 6 urines de nouveau-nés CMV positives issus de cas de CMV congénital déclarés dans la base

Détails des collections "épisode viral" et "souches" du CNR en CRBioLim:

Collection	Nombre de patients donneurs en 2022	Nombre de ressources primaires entrées en 2022	Nombre de tubes entrés en 2022	Nombre total de donneurs au 31/12/2022	Nombre total de ressources primaires au 31/12/2022	Nombre total d'échantillons au 31/12/2022	Cession: patients	Cession: ressources primaires	Cessions: échantillons
Sang total épisode viral	152	202	501	782	3070	6840	99	138	167
Souches CMV HSV	0	0	0	246	269	565	0	0	0
Plasma épisode viral	146	170	340	478	792	2040	107	125	253

Souchothèque : Cellules infectées conservées en azote liquide. et répertoriées au CRBioLim :

- Souches de référence : AD169, Towne, Toledo, Davis et Merlin (ATCC), VHLE, TB40E (don de S Chavanas, Toulouse).
- Souches recombinantes HCMC Bacmids, marquées à la GFP, portant des mutations de résistance au ganciclovir, au cidofovir, ou au Foscarnet, au maribavir ou au letermovir ou des polymorphismes.

Un total de 302 isolats cliniques parmi lesquels :

- 72 souches à tropisme endothélial isolées d'urines de nouveau-né atteints d'infection congénitale à CMV provenant du CNR et de laboratoires extérieurs dont 10 caractérisées pour la séquence de leur génome entier par séquençage haut débit sur Ion Proton.
- 21 Souches à tropisme endothélial isolées de liquide amniotique ou de fœtus

- 72 souches à tropisme endothélial isolées essentiellement en 2008 de la salive d'enfants de moins de trois ans (protocole FreChMV)
- 17 souches de patients transplantés caractérisées pour leur phénotype de résistance au ganciclovir, cidofovir et foscarnet dont 6 pour leur sensibilité au maribavir

Parmi ces souches 41 sont caractérisées pour leur génotype gB, gH et gN (21 souches d'infection congénitale à CMV), 25 pour la séquence des gènes-cible des antiviraux (UL97, UL27, UL54, UL56, UL89, UL104) et le génotype gB

- Plus de 100 souches d'HSV1 et 2 et de VZV (souches de référence et isolats cliniques) disponibles pour essais antiviraux et pour tester des procédés de décontamination.

Laboratoire CNR associé Necker :

Biothèque propre du laboratoire de Virologie de Necker pouvant être utilisée dans le laboratoire à des fins d'expertises :

Environ 3000 échantillons (0.5 à 2 ml) de sang total PCR CMV positive conservés à -80°C

Biothèque spécifique du CNR constituée de 2006 à 2022 :

- Souchothèque : cellules MRC5 infectées conservées à -80°C: **250 souches** (3 aliquots par souche) responsables d'infection materno-fœtale isolées de liquide amniotique ou d'urine de nouveau-nés.
- **2472 prélèvements de liquides amniotiques** testés en PCR CMV dont **360 positifs**. Ces prélèvements sont conservés à -80°C.
- **155 prélèvements de sang fœtal positifs** conservés à -80°C.
- **270 échantillons d'urine PCR CMV positive** conservés à -80°C
- **16512 échantillons salivaires** obtenus de nouveau-nés et caractérisés en PCR CMV dont **896 positifs en PCR CMV**. Ces prélèvements sont conservés à -80°C
- **1234 échantillons de sérum** obtenus chez des femmes enceintes en primo-infection et dont les caractéristiques (IgG et IgM et avidité des IgG) sont bien répertoriées. Ces sérums sont conservés à -20°C.
- **2204 échantillons de sang séché sur carton de Guthrie** caractérisés en PCR CMV : dont 1019 PCR CMV négative provenant de nouveau-nés non infectés et **212 PCR CMV positive** obtenus de nouveau-nés infectés par le CMV. Ces échantillons sont conservés à température ambiante. Par ailleurs, depuis 2021, nous stockons dans notre laboratoire tous les cartons de Guthrie prélevés en Ile de France les années N-2 et N-3 (**soit environ 360 000 cartons de Guthrie**). En effet, le Centre Régional de Diagnostic Néonatal d'Ile de France (CRDN) stocke pendant 1 an tous les cartons et ensuite au lieu de les détruire, il nous les transfère pour stockage pendant encore 2 années consécutives. Cela nous permet de répondre aux demandes de diagnostic rétrospectif plus tardives faites pour des enfants âgés de 1 à 3 ans (soit environ 25% des demandes). Cet accord a été possible car le CRDN est localisé dans le même établissement que notre laboratoire. Pour les enfants nés dans les autres régions les cartons de Guthrie ne sont stockés qu'un an.

Laboratoire CNR associé de la Pitié-Salpêtrière :

Le CNR associé de la Pitié-Salpêtrière conserve dans une biothèque spécifique l'ensemble des prélèvements biologiques positifs en PCR HSV et en PCR VZV, ainsi que l'ensemble des prélèvements biologiques reçus au laboratoire pour effectuer une recherche de résistance des HSV, du VZV et du CMV aux antiviraux. Ces prélèvements sont conservés dans un congélateur -80°C uniquement dédié au CNR Herpèsvirus équipé d'une sonde de surveillance de la température 24h/24, 7j/7 (système Sirius) reliée à l'usine de l'hôpital. Pour l'année 2022, cela représente environ **2000 prélèvements de différentes natures (LCS, LBA, sangs totaux, prélèvements cutanéomuqueux, prélèvements génitaux, prélèvements oculaires...) positifs pour HSV ou VZV et environ 300 prélèvements biologiques pour recherche de résistance aux antiviraux.**

Le CNR associé de la Pitié-Salpêtrière conserve également l'ensemble des souches de HSV-1, HSV-2 et VZV isolées en culture cellulaire à partir des prélèvements biologiques positifs en PCR de diagnostic. Ces souches virales sont conservées dans un congélateur -80°C uniquement dédié au CNR Herpèsvirus équipé d'une sonde de surveillance de la température 24h/24, 7j/7 (système Sirius) reliée à l'usine de l'hôpital. Comme indiqué dans les rapports précédents, cette activité d'isolement des souches virales avait dû être momentanément suspendue du fait de la pandémie de COVID-19 et de la ré-organisation du laboratoire P2 du laboratoire de virologie pour le seul traitement des prélèvements biologiques suspectés d'être positifs pour le SARS-CoV-2. Cette activité a finalement pu être remise en place à la fin au cours du dernier trimestre 2022. Ainsi, le CNR associé de la Pitié-Salpêtrière a pu reprendre ses activités de culture cellulaire,

d'isolement de souches virales, ainsi que la réalisation de tests phénotypiques de résistance des HSV aux antiviraux (antivirogramme) pour la caractérisation de mutations détectées par séquençage des gènes UL23 (thymidine kinase) ou UL30 (ADN polymérase) non décrites à ce jour et dont le rôle dans la résistance aux antiviraux est méconnu.

Dans le cadre de l'étude RetroAlpha 14-18, menée auprès de 49 laboratoires de virologie de France métropolitaine et d'Outre-mer (réseau French HSV VZV Study Group) sur les infections neuroméningées dues aux alphaherpèsvirus (HSV et VZV), une biothèque de près de **300 reliquats de prélèvements de LCS positifs en HSV-1, HSV-2 ou VZV**, prélevés dans le cadre du soin médical, a pu être constituée grâce à la contribution de certains laboratoires du réseau. Une étude transcriptomique et métatranscriptomique est actuellement conduite à partir de ces LCS en collaboration avec le Pr Christophe RODRIGUEZ (Hôpital Henri Mondor). Cette collection biologique a fait l'objet d'une déclaration de type CODECOH auprès du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (DC-2022-5365).

2.5 Activités d'expertises

Laboratoire CNR coordonnateur Limoges :

CMV

Au cours de l'année 2022, le CNR de Limoges a reçu 228 sérums pour expertise essentiellement dans le cas de suspicion de primo-infection maternelle à CMV et pour quelques cas de discordances sérologiques lors de changement de technique. Ces prélèvements proviennent de différents CH, CHU et laboratoires privés de France (métropole et DROM) et de Suisse.

La sérologie de contrôle et l'avidité des IgG sont réalisées en priorité sur Liaison XL DiaSorin puis sur VIDAS bioMérieux si le centre demandeur utilise déjà le Liaison XL. En cas d'avidité ne permettant pas de dater l'infection, le test avidité Vidas est également réalisé par celui du Liaison XL.

Depuis janvier 2020, un suivi régulier de la sérologie CMV a été émis en place pour les femmes suivies en gynécologie-obstétrique au CHU de Limoges. Une sérologie CMV (IgG + IgM) est réalisée au 1er, 2e, 3e trimestre et à l'accouchement. Toutes les patientes accouchant au CHU de Limoges n'ayant pas un suivi complet au CHU, les 4 prélèvements ne sont pas disponibles pour l'ensemble des patientes accouchant au CHU. L'année 2021 semblait montrer une tendance à la détection de plus de primo-infections chez les femmes enceintes.

Dans le cadre du dépistage mis en place au CHU de Limoges, 6323 sérologies ont été réalisées pour 3217 femmes soit en moyenne 2 prélèvements par patiente en 2022. Nous avons mis en évidence une séroprévalence du CMV de 60% dans cette population.

En 2022, nous avons détecté 14 primo-infections avec le Liaison XL et 6 avec le VIDAS.

Suite au dépistage sérologique, nous avons analysé 11 liquides amniotiques. Une infection congénitale à CMV a été détectée par PCR chez 1 patiente.

Dans le cadre du dépistage de l'infection congénitale à CMV à la naissance, le screening des nouveau-nés est effectué par PCR sur urine ou salive devant tout RCIU, tout signe compatible avec une primo-infection CMV ou suite à une infection maternelle durant la grossesse. Le dépistage mis en place pour toutes les grossesses suivies au CHU a permis de mettre en évidence la détection plus spécifique des nouveau-nés infectés. Au cours de l'année 2022, nous avons réalisé 128 PCR sur urine et 22 PCR sur salive permettant de détecter 3 nouveau-nés infectés dont une grossesse gémellaire.

Pour le diagnostic rétrospectif de l'infection congénitale à CMV, nous avons également réalisé 10 PCR sur des cartons de Guthrie. Un diagnostic confirmé d'infection congénitale à CMV a pu être posé chez un enfant.

Nous avons également reçu 346 échantillons pour génotype de résistance CMV (cf surveillance), 145 échantillons pour test Quantiféron CMV (cf surveillance), des plasmas pour dosages d'antiviraux (ganciclovir, letermovir, maribavir) (environ 40 par an) et des souches pour antivirogramme (moins de 10 par an). Le détail de ces analyses est précisé dans le paragraphe sur la surveillance assurée par le CNR.

HSV / VZV

Au cours de l'année 2022, le laboratoire du CNR Limoges a réalisé des analyses de sérologie et de biologie moléculaire provenant de laboratoires extérieurs (CHU, CH et laboratoire privés) pour expertise :

- **Sérologies HSV1-2** pour contrôler des résultats obtenus par une autre technique (n=8)
- **PCR HSV-1, HSV-2 ou VZV** effectuées sur des prélèvements cutanéomuqueux, du LCR ou du sang total (n= 71)

- **Résistance génotypique des HSV et VZV aux antiviraux.** Le CNR de Limoges a reçu 26 prélèvements pour recherche de résistance des HSV (n=21), VZV (n=5). Les données ont été transférées aux CNR de la Pitié-Salpêtrière pour colliger l'ensemble des données nationales sur la résistance des alpha-herpesvirus aux antiviraux (cf *chapitre correspondant*).

Laboratoire CNR associé Necker :

Activités d'expertise Necker 2022	Sérologie maternelle IgG, IgM et IgG avidité	Diagnostic prénatal PCR CMV liquide amniotique, sang fœtal, biopsie trophoblaste	Diagnostic néonatal PCR CMV salivaire	Diagnostic post natal PCR CMV sang séché Guthrie
Nombre total	276	305	2171	369
Provenance	Ile de France (APHP, CHG, LABM)	APHP, Foch, Hôpital Américain, Amiens, Orléans	Ile de France (APHP, CHG)	Ile de France, Caen, Rouen, Brest, Rennes, Nantes, Toulouse, Grenoble, Lille, Réunion, Reims, Nancy, Lyon, St Etienne, Mayotte CHU, CHG, ORL ville, CAMPS
Délai de rendu moyen	4 jours	2 jours	2 jours	3 semaines
Caractéristiques des cas	124 primo-infections du 1 ^{er} trimestre ou périconceptionnelle 102 traitées par valaciclovir en préventif : 10% de fœtus infecté à l'amniocentèse	16 fœtus infectés après infection maternelle du 1^{er} trimestre 4 IMG pour lésions sévères 3 naissances avec surdité unilatérale 1 naissance avec surdité bilatérale 8 naissances asymptomatiques 1 fœtus infecté après infection maternelle non-primaire : naissance asymptomatique 1 fœtus infecté après infection du T2 : asymptomatique	10 positifs Six infectés après primo-infection du 1 ^{er} trimestre (4 asymptomatiques, 1 surdité bilatérale, 1 surdité unilatérale) Deux infectés après infection maternelle secondaire (asymptomatiques) Un infecté après primo-infection du 2 ^{ème} trimestre (asymptomatique) Un non documenté	23 positifs 18 dans le cadre d'un diagnostic rétrospectif devant une surdité+/- signes neurologiques 5 asymptomatiques, diagnostic fortuit devant une PCR CMV positive après 3 semaines de vie

Laboratoire CNR associé de la Pitié-Salpêtrière :

Dans le cadre de son activité d'expertise, le CNR associé de la Pitié-Salpêtrière a effectué les actes suivants au cours de l'année 2022 :

- **Sérologies HSV et VZV** effectuées sur des sérums en provenance de laboratoires extérieurs (CHU, CH, privés) pour contrôler des résultats obtenus par une autre technique ou pour effectuer la sérologie différenciée HSV-1/ HSV-2 (environ 30 prélèvements)
- **PCR HSV-1, HSV-2 ou VZV** effectuées sur des prélèvements biologiques divers (LCS, cutanéomuqueux, LBA...) en provenance de laboratoires extérieurs (CHU, CH, privés) pour contrôler des résultats obtenus par une autre technique de biologie moléculaire (notamment des résultats obtenus sur LCS avec le panel méningoencéphalite FilmArray

(BIOMERIEUX) ou parce que certains prélèvements ne sont pas pris en charge par certains laboratoires (ex : sang total) (environ 30 prélèvements)

- **Identification du caractère sauvage ou vaccinal du VZV** effectué sur des échantillons biologiques (LCS, cutanéomuqueux) : un prélèvement a été reçu dans le cadre du programme européen VZVIP (*Varicella-Zoster Virus Identification Programme*) pour lequel nous avons mis en place une collaboration avec le laboratoire MSD Vaccins, et 2 prélèvements nous ont été envoyés par des laboratoires d'autres CHU (Grenoble, CH de Créteil). Au total, nous avons identifié 3 souches sauvages de VZV.

- **Résistance génotypique des herpèsvirus aux antiviraux.** Le CNR associé de la Pitié-Salpêtrière a reçu 310 prélèvements pour recherche de résistance des HSV (n=145), VZV (n=26) et CMV (n=139) aux antiviraux. Pour 77 prélèvements, l'analyse n'a pas été effectuée pour les raisons suivantes : charge virale trop faible, prescription hors indication. Un test génotypique de résistance aux antiviraux a finalement été effectué pour 233 prélèvements (soit 75% des prélèvements reçus) : 145 pour les HSV, 26 pour le VZV et 139 pour le CMV (cf *infra*).

2.6 Activités de séquençage

Laboratoire CNR coordonnateur Limoges :

Le CNR de Limoges a reçu 382 demandes de recherche de résistance (CMV, HSV et VZV) au cours de l'année 2022. Cette activité a conduit à la production de 694 séquences Sanger pour les gènes *UL97* et *UL54* du CMV, 184 séquences pour les gènes *UL56* et *UL89* du CMV, 38 séquences pour le gène *UL27*, 42 séquences pour les gènes *UL23* et *UL30* d'HSV et 10 séquences pour les gènes *ORF36* et *ORF28* du VZV.

L'activité de séquençage NGS porte sur 48 échantillons séquencés pour les gènes de résistance aux antipolymérase.

L'ensemble de ces données sont stockées sur le serveur du CHU de Limoges.

Le laboratoire CNR réserve le séquençage haut débit à l'analyse de l'émergence des souches résistantes, à la vérification de l'absence de résistances, ainsi qu'à la caractérisation de génome entier du CMV sans amplification préalable (travail en cours de soumission). Le séquençage par la technologie nanopore Minlon étant moins sensible (cf détail des méthodes dans le rapport 2018) nous avons conservé la technologie Ion Torrent, et fait évoluer notre équipement vers un proton S5 plus, permettant d'analyser des fragments longs, de 700 bases.

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

<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	<p>Interne au bâtiment :</p> <p>Plateforme de séquençage du CHU de Limoges dont le CNR est responsable (S Alain responsable d'UF)</p> <p>Au sein du laboratoire CNR : préparation des librairies pour séquençage NGS avec une enceinte de protection ADN et un matériel/paillasse dédiés. Dans cette pièce se trouvent 1 préparateur de Librairies AB Library Builder (Life Technologies) et un automate de préparation des séquences Ion Chef et de chargement des puces pour les séquenceurs NGS proton (Life technologies) depuis 2020.</p> <p>Sur la plate-forme de génomique médicale :</p> <p>Sanger :</p> <ul style="list-style-type: none"> 1 séquenceur 3500 XL Dx 24 capillaires CEIVD en remplacement des 16 capillaires depuis de 2017 pour les analyses génotypiques par méthode Sanger <p>NGS :</p> <ul style="list-style-type: none"> 2 séquenceurs S5 (Ion Torrent Life technologies) depuis fin 2018, mise en fonction en 2019. 1 mini séquenceur long range « min Ion » CNR depuis décembre 2016. 2 Miseq (Illumina) En 2022 : achat d'un séquenceur moyen-Haut débit par le CHU de Limoges Next-Seq 1000, Illumina

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

<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Interne : UF de bioinformatique médicale auquel le CNR participe (V Tilloy bioinformaticien du CNR) Logiciel Geneious pour l'analyse des séquences Sanger Outils Maison développés par Valentin Tilloy pour le NGS: AsPiCMV (pipeline d'analyse des séquences whole genome ou gene par gene du CMV) et base de données des mutations de résistance, et polymorphismes du CMV en libre accès

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

<input type="checkbox"/> NON	Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Si OUI, précisez pour quelles activités. Indiquez s'il s'agit d'investigations d'épidémies ou d'investigations intervenues dans le cadre de la surveillance.

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)

Genotypage des souches de CMV, génotype de résistance, en première ligne, analyse whole genome CMV, phylogénie, analyse de variabilité et prédiction de structure, analyse en PCA à visée épidémiologique et physiopathologique ou en réponse à des demandes d'autres équipes.

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

Sans objet pour les Herpesvirus

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

Séquençage des gènes de résistance de toutes les souches reçues

Whole genome CMV des souches d'infection congénitales à CMV et de souches de crèche (en cours).

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

Dans les bases de données fermées : NAS du CHU de Limoges (stockage sécurisé) et banque de séquence Fasta pour les génotypes de résistance Sanger, dans le serveur sécurisé du CHU.

Dans des bases de données publiques (European Nucleotide Archive (ENA) par exemple) avec ou sans métadonnées associées : **GenBank pour les génomes entiers et les nouvelles mutations publiées.**

Laboratoire CNR associé Necker :

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

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

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

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

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)

Genotypage des souches de CMV

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

Sans objet pour les Herpesvirus

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

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

Sans objet pour le CNR Necker

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

Dans les bases de données fermées : Précisez

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

Laboratoire CNR associé de la Pitié-Salpêtrière :

En 2022, le CNR associé de la Pitié-Salpêtrière a réalisé les séquençages suivants :

- Séquençage de résistance des herpèsvirus aux antiviraux par méthode Sanger pour 233 prélèvements : 145 pour les HSV, 26 pour le VZV et 139 pour le CMV.
- Evaluation de l'automate GridION pour le diagnostic de la résistance génotypique du CMV aux antiviraux : 63 prélèvements.

L'ensemble des séquences obtenues dans le cadre de la recherche de résistance des HSV (UL23, UL30, UL5, UL52), du VZV (ORF36, ORF28, ORF55, ORF6) et du CMV (UL97, UL54, UL56, UL89) aux antiviraux par méthode Sanger sont conservées au CNR dans une banque de séquences dédiée (format FASTA) (près de 700 séquences en 2022).

Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Type d'accès (interne ou externe au CNR) ; si externe, précisez quelle(s) plateforme(s)
	Technologie/matériel de la (des) plateforme(s) de séquençage auquel le CNR a accès

Le CNR associé de la Pitié-Salpêtrière a accès en interne aux différentes plateformes de séquençage suivantes : séquenceur capillaire (Sanger) ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems), séquenceur NGS GridION (Oxford Nanopore Technologies), séquenceur NGS iSeq 100 (Illumina).

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

Un ingénieur (poste universitaire Sorbonne Université) participe à l'analyse des données bio-informatiques du CNR associé de la Pitié-Salpêtrière. En 2023, le CNR a recruté un ingénieur dédié qui va se former pour ces analyses.

2.7 Partage de séquences produites par les CNR

Laboratoire CNR coordonnateur Limoges :

Séquences Herpes virus déposées dans bases de données (depuis 2019)

- SRA : 166 échantillons (fastq : fichiers de reads NGS) d'Herpesvirus
- GenBank : 85 séquences consensus (13 issues de séquençage Sanger et 72 de NGS) d'Herpesvirus
- Nous avons ainsi mis à disposition à ce jour dans la GenBANK 35 séquences de genome entier de CMV provenant essentiellement des hôpitaux de Lyon et de Limoges.
- **Ces séquences de génome entier y compris celles non encore disponibles dans la GenBank, ont été mises à profit par nos collaborateurs académiques pour l'analyse de gènes cibles d'anticorps monoclonaux ou pour l'analyse de variabilité des gènes de la réponse immune, de cibles d'antiviraux ou l'analyse du comportement en placenta du CMV (travaux 2023), et seront partagées dans le cadre du projet européen H2020 HoRUS 2023-2027 (voir site internet du projet) auquel nous participons pour l'analyse virologique.**

Mise à disposition de pipelines

- En 2020, conformément à la vocation des plateformes NGS des CNRs de proposer leurs moyens à d'autres applications microbiologiques, nous avons mis en place un pipeline d'analyse pour le séquençage du génome du SARS-COV2 (Tilloy V. et al., plos pathogens 2021) et aidé les équipes en place à développer le séquençage ampliseq du SARS-COV2.

Ce pipeline ASPICov était indispensable pour les analyses de prélèvements complexes mais a été largement utilisé pour les analyses des prélèvements de patients, couplé à Pangolin. Il a servi d'essai pour développer le pipeline AspiCMV actuellement en place au laboratoire CNR et qui sera rendu public en 2023.

ASPiCmv est un pipeline dérivé de ASPICov utilisé pour le traitement des données NGS (Iontorrent ou Illumina) des séquences Herpesvirus (génomés entiers ou amplicons).

Le pipeline a été développé dans un environnement Nextflow associé à des outils encapsulés (conteneurs Singularity) afin d'assurer une analyse de données portable, rapide et reproductible.

Le principe est d'estimer la qualité des données, effectuer un trimming si nécessaire, réaliser un alignement, un appel de variants, un consensus et de générer un rapport récapitulatif sur chacun des échantillons du run. Chaque étape a été optimisée et est accompagné de fichiers et figures de résultats.

3. Activités de surveillance

3.1 Description du réseau de partenaires

Faits marquants :

Elargissement net du réseau de partenaires pour la surveillance des infections maternofoetales

Mise en place d'un réseau entre le CNR de Limoges et le laboratoire de Pharmacologie de Bichat, paris, pour rassembler les informations concernant les dosages d'antiviraux.

Consolidation du réseau « HSV VZV French Study Group »

Laboratoire CNR coordonnateur Limoges :

Réseau de surveillance des infections maternofoetales (HSV et CMV)

On note un élargissement net du réseau de partenaires (137 médecins déclarant sur la plateforme de déclaration en ligne)

Pour la surveillance des infections materno-fœtales (infections néonatales à HSV, infections congénitales à CMV), le réseau de partenaire était composé en 2022 de 70 CPDPN/obstétriciens, 55 laboratoires, 76 pédiatres et autres spécialités (pour le suivi de l'enfant), réparties dans 43 villes recouvrant les 12 régions de la France métropolitaine et 5 départements d'outre mer.

Evolution du réseau de partenaires pour la surveillance des infections néonatales à HSV et des infections congénitales à CMV			
Année	2020	2021	2022
Laboratoires	52	55	55
CPDPN / Obstétriciens	54	69	70
Pédiatres / ORL	61	74	76
Médecins ayant un accès à la plateforme Voozanoo (déclaration en ligne / CMV congénital)	102	131	137

Au sein de ce réseau, 137 médecins ont un accès à la plateforme de déclaration en ligne des infections congénitales à CMV, ce qui représente 35 de plus par rapport à l'année 2020.

Cf annexe: Réseaux de surveillance : Réseau de partenaires pour le recueil de déclarations et de souches pour les infections materno-fœtales

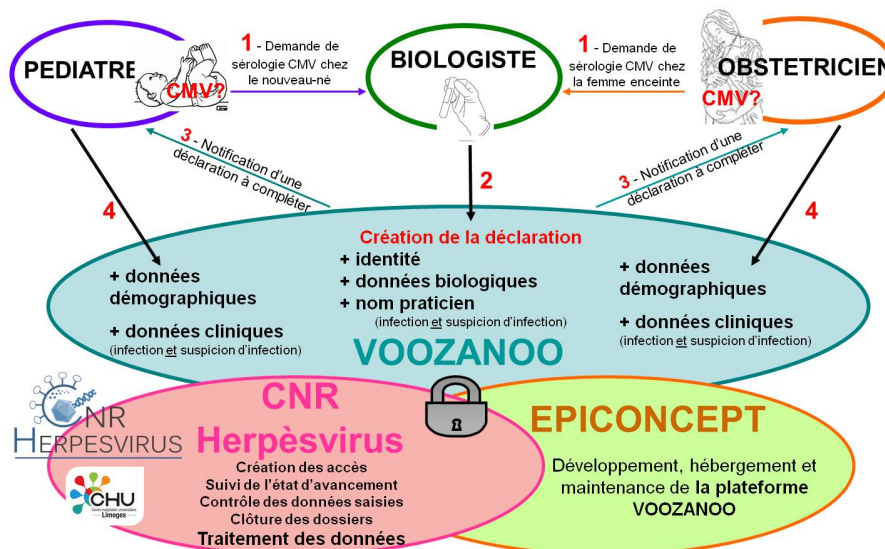
Cf annexe : Réseaux de surveillance : Réseau de partenaires pour la déclaration en ligne des cas d'infection congénitale à CMV (plateforme Voozanoo)

Cf site internet de « la Fédération Française des Centres Pluridisciplinaires de Diagnostic Prénatal » : <http://www.cpdpn.fr/>

La base CMV congénitale est une base de données nationale utilisant le logiciel VOOZANO, par le laboratoire coordonnateur au CHU de Limoges. Elle est opérationnelle et autorise des développements vers des bases d'imagerie notamment échographique ou RMN permettant également aux praticiens de confronter leurs cas cliniques aux cas déjà identifiés. Cette base a reçu l'autorisation du CCTIRC et de la CNIL le 24 Novembre 2015.

En termes de réseau de collection d'échantillons, le laboratoire CNR collecte les liquides amniotiques et les urines de nouveaux-nés correspondant aux déclarations et reçoit les tests de Guthrie de la région Nouvelle Aquitaine, Rhone Alpes et de quelques départements (Réunion, Nouméa...). (Couverture de territoire complémentaire de celle du Laboratoire associé Necker).

**Déclaration au CNR des infections et suspicions d'infection par le CMV chez la femme enceinte et le nouveau-né
Procédure en ligne VOOZANOO**



Résistance du CMV aux antiviraux

Le réseau couvre déjà le territoire national. Nous avons développé des collaborations avec les laboratoires espagnols qui nous envoient leurs mutations à expertiser. Nous recevons également régulièrement les demandes de recherche de résistance provenant de Suisse (CH Lausanne et CH Genève).

Les centres effectuant leurs propres analyses de recherche de résistance (CHU Saint Louis, Paris (anciennement laboratoire associé au CNR), Nantes et Rennes) nous envoient les données afin que nous puissions établir un bilan des mutations de résistance sur le territoire et tester les nouvelles mutations à l'aide de virus recombinants.

S'ajoutent à ce réseau les données des cohortes mises en place par le Laboratoire CNR pour une surveillance des facteurs de risque de résistance et de l'utilisation des nouveaux antiviraux (OrPhaViC, PHRC National 2012-2016) puis NaViRe (en collaboration avec la SFGMTC, en greffe de cellules souches, depuis juillet 2020). Et la surveillance des molécules en ATU par le Laboratoire CNR, pour le letermovir (2018-2019), puis pour le maribavir (en cours).

Laboratoire CNR associé Necker :

Les échantillons reçus proviennent des laboratoires d'Ile de France (APHP, CHG et LABM) pour l'expertise sérologique et le dépistage néonatal.

Le CNR associé Necker collecte les liquides amniotiques des hôpitaux de l'APHP, de l'hôpital Foch, de l'hôpital américain, du CHU d'Amiens et du CH d'Orléans ainsi que les cartons de Guthrie de nombreux CH et CHU (Ile de France, Caen, Rouen, Brest, Rennes, Nantes, Toulouse, Grenoble, Lille, Réunion, Reims, Nancy, Lyon, St Etienne, Mayotte)

Laboratoire CNR associé de la Pitié-Salpêtrière :

Réseau « HSV VZV French Study Group » constitué de 49 laboratoires de virologie ou microbiologie répartis sur l'ensemble du territoire national (47 en Métropole et 2 en Outre-Mer) : 10 CHU AP-HP, 26 CHU hors AP-HP, 10 CH, 1 HIA, 2 laboratoires privés. Il a notamment permis le recueil des données épidémiologiques, biologiques, cliniques et thérapeutiques, ainsi que les échantillons de LCS, dans le cadre de l'étude RetroAlpha 14-18.

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

Laboratoire CNR coordonnateur Limoges :

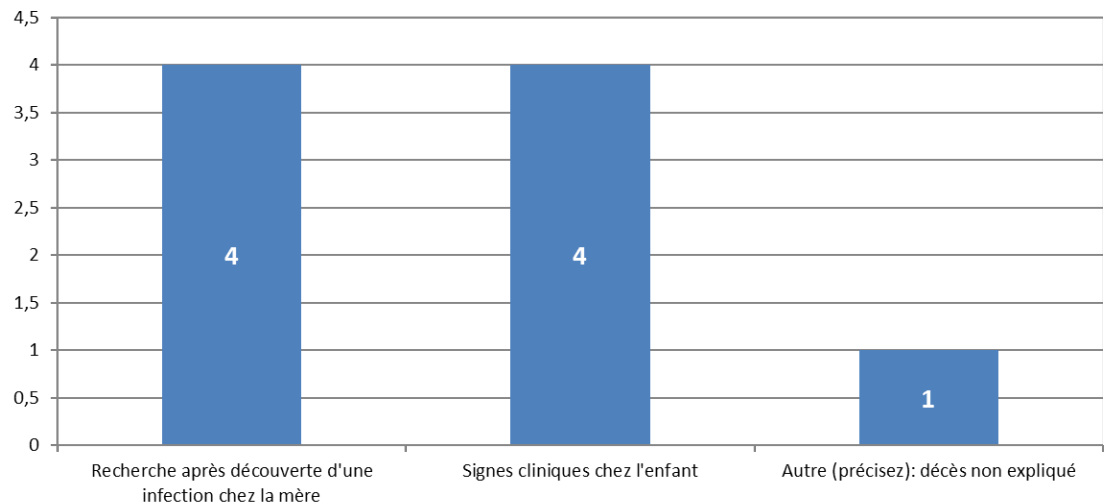
3.2.1 Surveillance des infections néonatales à Herpes simplex

De 2017 à 2022, la fréquence se situe aux alentours de **2,1 cas d'infection néonatale à HSV déclarés pour 10000 naissances** :

Nombre de cas de HSV néonatal déclarés	Nombre de naissances annuel dans les centres concernés
85	407966
Incidence	
0,021%	

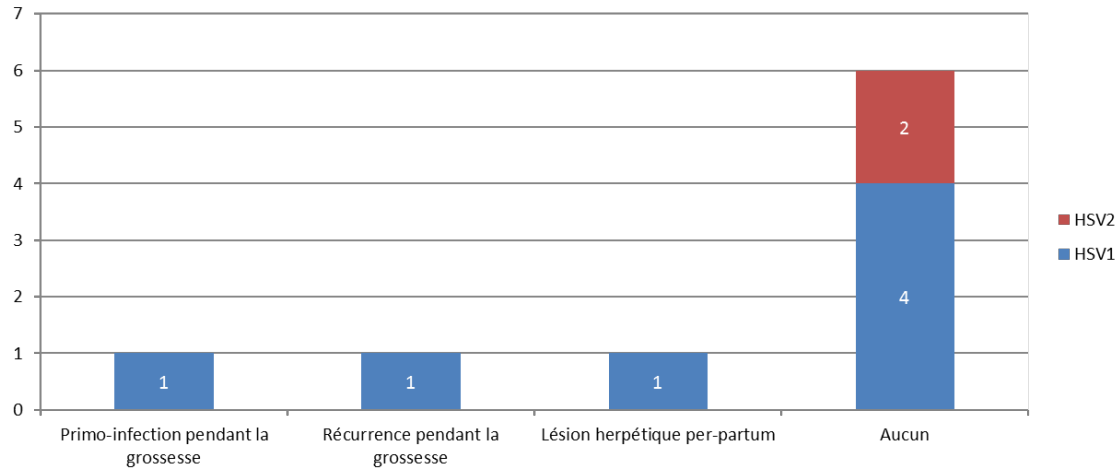
En 2022, 9 cas d'herpès néonatal ont été déclarés :

Contexte de la découverte des infections néonatales à HSV déclarés en 2022



Dans 66% des cas, il n'y avait pas d'antécédent maternel d'herpès génital :

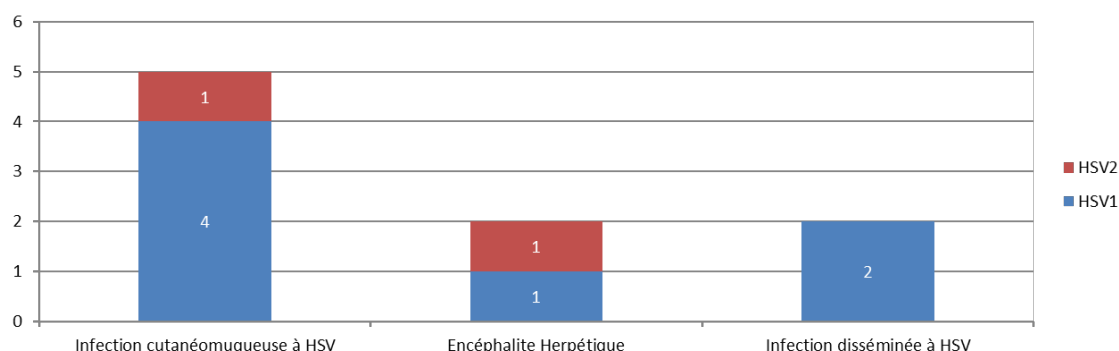
Antécédents maternels d'herpès génital et types d'infection néonatale en 2022



En 2022, ont été déclarés 5 infections cutanéomuqueuses à HSV, 2 encéphalites herpétiques et 2 infections disséminées à HSV.

77% de ces infections étaient de type HSV1.

Tableau clinique des infections néonatales à HSV déclarées en 2022



Sur les 9 cas d'infection néonatale à HSV déclarés en 2022, 6 ont été traités par un antiviral (aciclovir) et 3 nourrissons n'ont pas été traités.

En 2022, 1 infection a conduit à la mort du nourrisson. Il s'agissait d'une encéphalite herpétique à HSV2. L'enfant n'a pas eu le temps d'être traité. La découverte de son infection a fait suite à son décès à 6 jours de vie.

3.2.2 Surveillance nationale des cas d'infection congénitale à CMV

Fin 2016, a été instaurée la déclaration en ligne sur la Plateforme Voozanoo™ (Epiconcept). Les données maternelles, fœtales et néonatales sont collectées directement sur ce site. La transition vers ce mode de déclaration est encourageante. Tous les cas ont été saisis dans cette base de données, soit par les médecins, soit par le CNR Herpès Virus à partir de fiches papier, tableur Excel ou comptes rendus d'hospitalisation.

A noter, les fiches papier ont été supprimées fin 2018.

Entre 2017 et 2022 la grande majorité des cas sont déclarés en ligne. Les cas 2022 ont tous été déclarés en ligne.

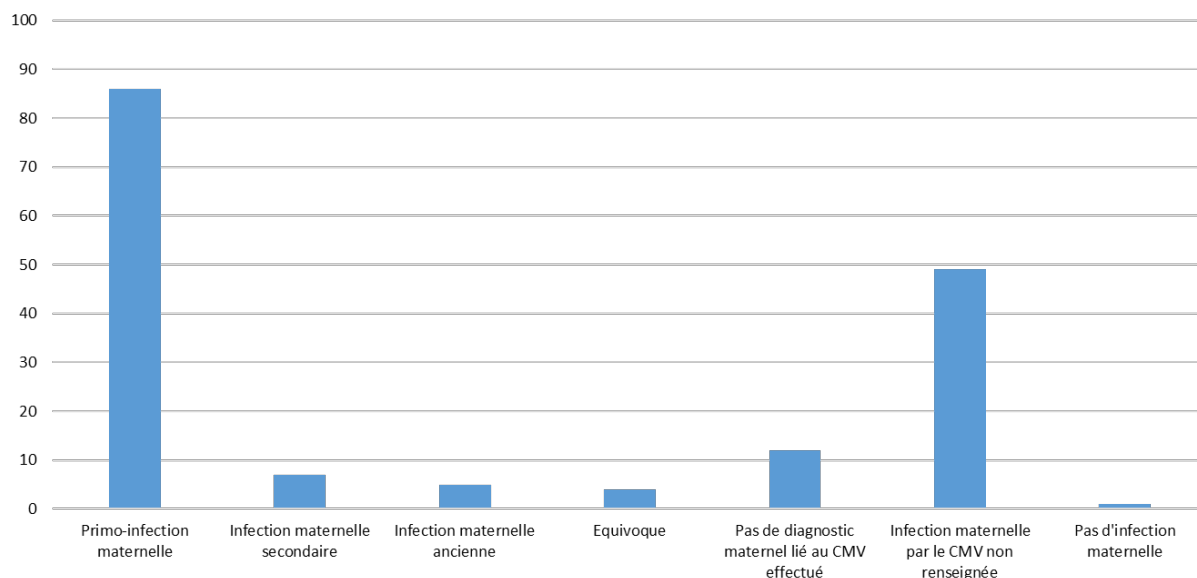
A) En 2022

En 2022, 164 fiches ont été enregistrées dans la base. Elles regroupent :

- Les infections maternelles documentées
- Les suspicions d'infection maternelle
- Les infections diagnostiquées en période anténatale
- Les suspicions d'infection en période anténatale
- Les infections des nouveau-nés
- Les suspicions d'infection des nouveau-nés

Toutes ne sont pas complètement renseignées, selon la période à laquelle de diagnostic a été posé (difficulté à récolter les données sur la grossesse au moment du diagnostic du nouveau-né, grossesses perdues de vue...) :

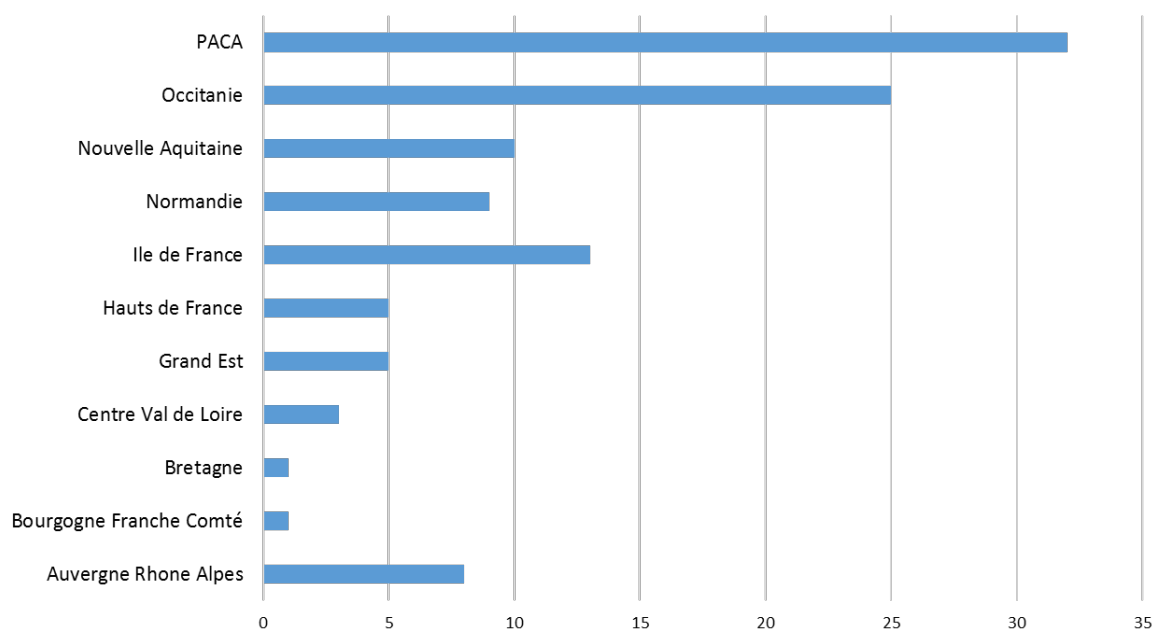
Diagnostic maternel des 164 fiches déclarées



Au total, en 2022, dans la base de données du CNR Herpès Virus, 112 infections congénitales ont été recensées soit en cours de grossesse, soit à la naissance :

La répartition des cas dans les différentes régions de France est présentée ci-dessous :

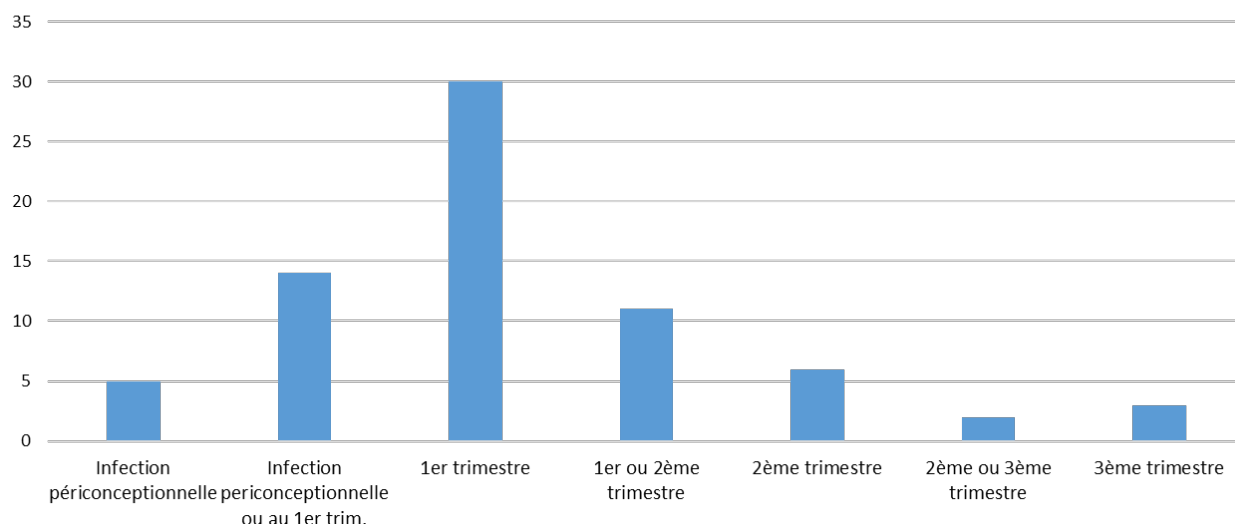
Infections congénitales 2022: répartition géographique



1) Primo-infections maternelles en 2022

Nombre total de **primo-infections maternelles** par le CMV en 2022 : **86** (15 dont le trimestre de séroconversion est non documenté).

Primo-infections maternelles par le CMV en 2022: trimestre d'infection



2) Investigations anténatales en 2022

Parmi les 164 fiches déclarées, 67 ont été le sujet d'investigations anténatales.

Sur **54 échographies** réalisées et renseignées, sont recensés :

- 9 cas d'anomalies abdominales
- 15 cas d'anomalies cérébrales
- 10 retards de croissance intra-utérine
- 2 cas d'anomalies du liquide amniotique
- 1 cas d'anomalies du placenta
- 2 cas d'anomalie du thorax

9 IRM ont été effectuées et renseignées, qui retrouvent 3 cas d'anomalies cérébrales.

59 amniocentèses ont été réalisées et renseignées, pour lesquelles on retrouve :

- 45 PCR CMV positives

Aucune ponction de sang fœtal n'a été réalisée et renseignée en 2022.

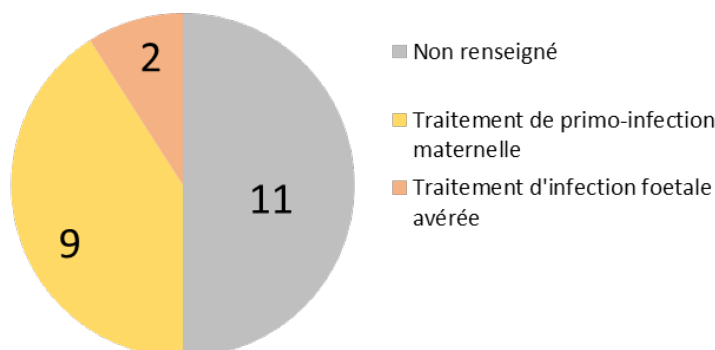
Au total, 45 diagnostics anténataux ont conclu à une infection congénitale par le CMV : aucun après examen biologique anténatal seul, 1 seul après imagerie fœtale seule, 33 après les deux types d'investigation.

3) Traitement antiviral pendant la grossesse en 2022

22 patientes ont été traitées pendant la grossesse par Valaciclovir.

Ci-dessous les raisons du traitement en cas de primo-infection maternelle :

Raison du traitement maternel en 2022



Les issues de grossesse ont été 11 naissances, 1 interruptions médicales de grossesse, 1 interruptions volontaires de grossesse (9 issues de grossesse sont non renseignées).

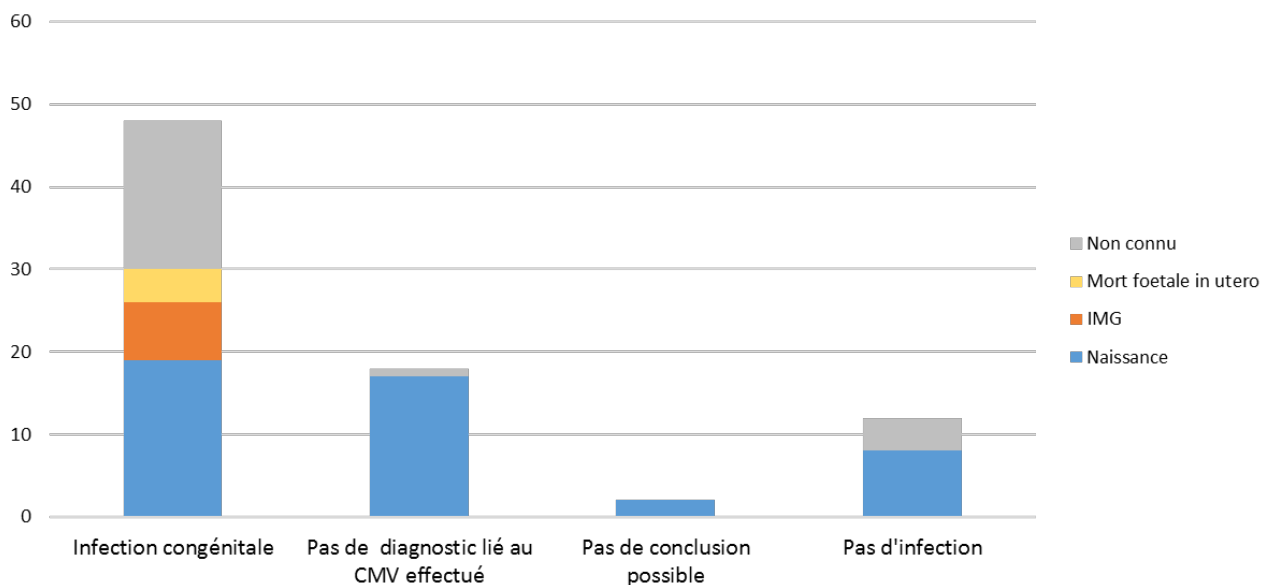
Sur les 11 naissances issues de mères traitées pendant la grossesse, 7 enfants avaient une infection congénitale, et 1 n'avait pas d'infection (3 non renseignés).

3 enfants infectés sont nés asymptomatiques et 2 avaient une symptomatologie sévère (2 non renseignés).

4) Issue des grossesses en 2022

En 2022, sur le total des 164 déclarations, **108 naissances** ont été répertoriées, ainsi que **10 interruptions médicales de grossesse (IMG)**, **4 interruptions volontaires de grossesse (IVG)** et **4 mort foetale *in utero* (MFIU)**.

Diagnostics anténataux et issues de grossesse en 2022



5) Investigations néonatales

84 recherches d'infection congénitale à CMV à la naissance par **analyses biologiques** ont été recensées :

- **20 PCR CMV sur salive** (17 résultats positifs)
- **60 PCR sur sang total** (47 résultats positifs)
- **70 PCR CMV sur urines** (61 résultats positifs)

Ce qui porte à 112 le nombre total d'infections congénitales diagnostiquées.

49 issues de primo-infection documentées, 5 issues d'infections secondaires, 1 avec des avidités équivoques, 10 sans diagnostic maternel posé et 47 non documentées.

6) Symptomatologie des nouveau-nés infectés en 2022

La classification des cas est la suivante :

- infections sévères : cas associés à des signes cérébraux
- infections modérées : cas associés à des signes extra-cérébraux
- infections légères : cas associés à des signes extra-cérébraux isolés
- infections asymptomatiques
- cas non documentés

Sur **les 112 infections congénitales à CMV**, nous avons répertorié 7 IMG, 4 MFIU et 83 enfants nés vivants.

A la naissance :

Parmi les enfants infectés nés : **24 nouveau-nés** sont symptomatiques avec **signes cliniques** d'infection congénitale à CMV à la naissance, 44 asymptomatiques et 15 non documentés.

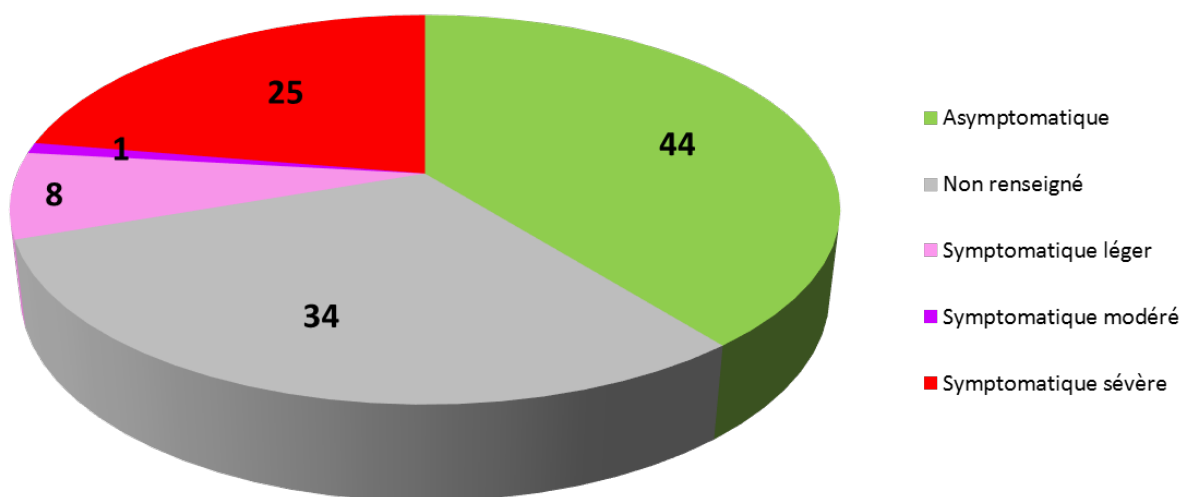
A la déclaration :

Sur ces **107 infections congénitales à CMV**, 44 sont asymptomatiques, 34 sont symptomatiques (8 légers, 1 modérée, 25 sévères), et 34 sont non documentés.

Pour 49 primo infections documentées : 10 sévères, 1 légers, 21 asymptomatiques et 17 non documentés.

Pour 5 infections secondaires documentées : 2 asymptomatiques et 2 sévères (1 non renseigné).

Classification des infections congénitales à CMV déclarées en 2022 (n=112)



Signes cliniques à la naissance des 34 cas symptomatiques en 2022 :

- 12 cas de surdité à la naissance (5 unilatérales, 7 bilatérales)
- 3 cas de microcéphalie
- 6 cas de RCIU
- 1 naissances prématurées
- 2 cas d'hépatosplénomégalie
- 1 cas de purpura

Aucun cas d'infection congénitale déclaré en 2022 n'a conduit au **décès du nouveau-né**.

7) Traitement des 83 nouveau-nés vivants infectés en 2022

38 n'ont pas été traités

- 31 étaient asymptomatiques,
- 5 étaient symptomatiques légers
- 1 étaient symptomatiques sévères

29 nouveau-nés ont été traités par un antiviral (27 par valganciclovir, 2 par ganciclovir) :

- 11 étaient asymptomatiques
- 3 étaient symptomatiques légers
- 1 était symptomatique modéré
- 14 étaient symptomatiques sévères

16 e sont pas documentés

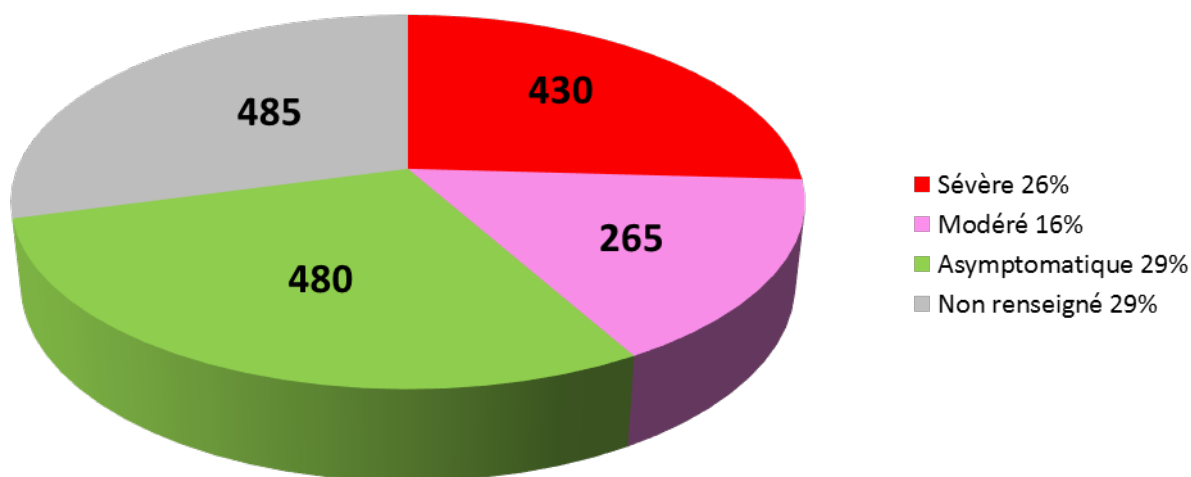
B) Bilan 2006 à 2022

De 2006 à 2022, nous avons recueilli **1660 cas d'infections congénitales à CMV** :

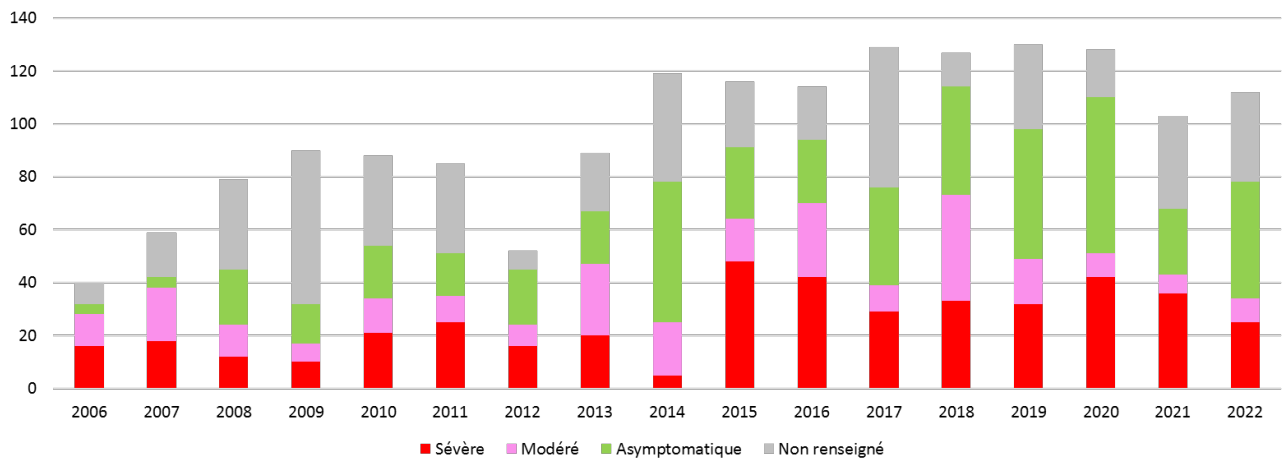
Les cas déclarés ont été classés en fonction des signes cliniques associés

- infections sévères : cas associés à des signes cérébraux
- infections modérées : cas associés à des signes extra-cérébraux
- infections asymptomatiques
- cas non documentés

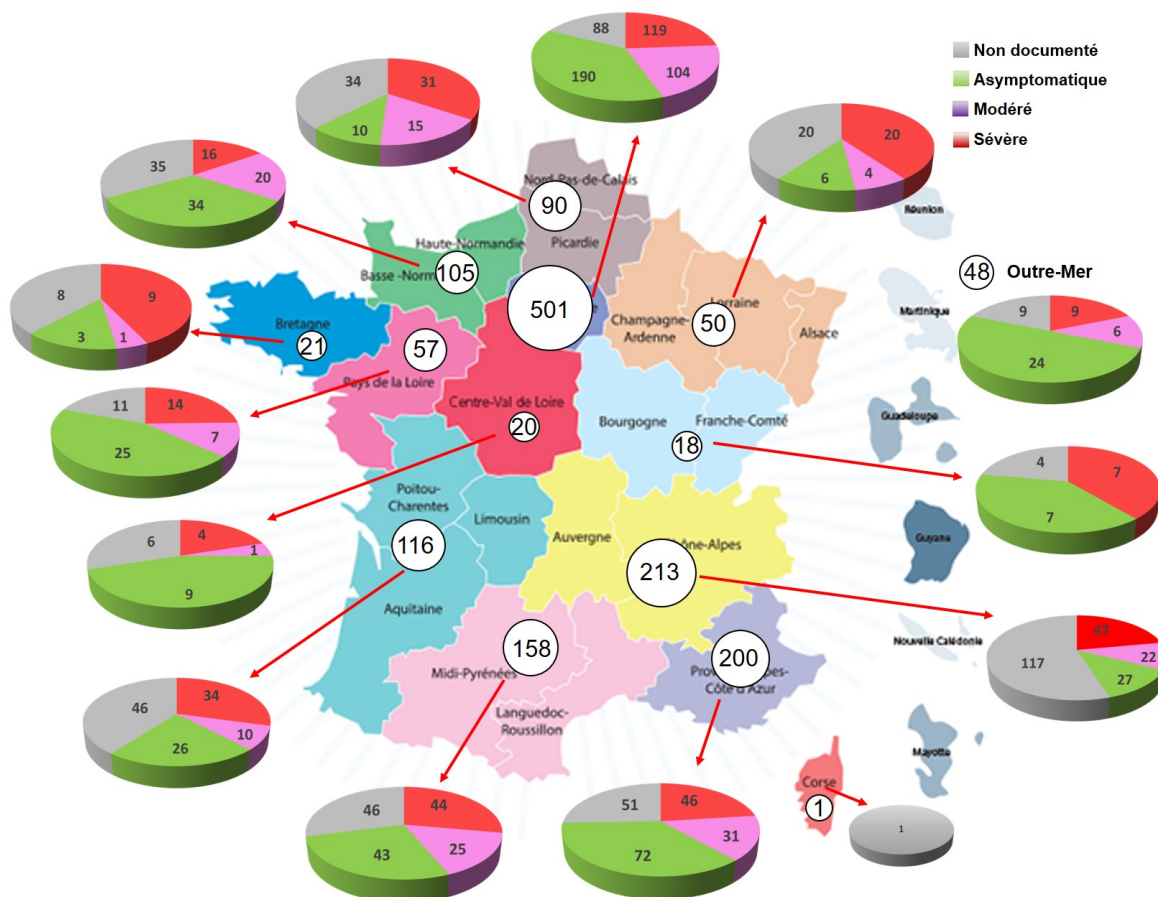
Classification des infections congénitales à CMV déclarées depuis 2006



Nombre de cas d'infection congénitale déclarés depuis 2006



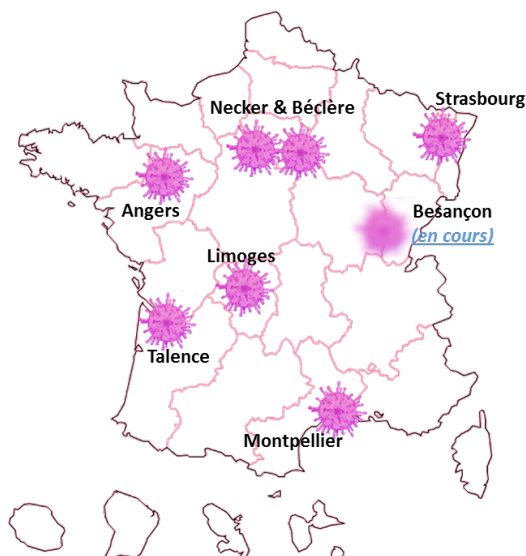
Répartition des cas déclarés d'infection congénitale à CMV sur le territoire français de 2007 à 2022



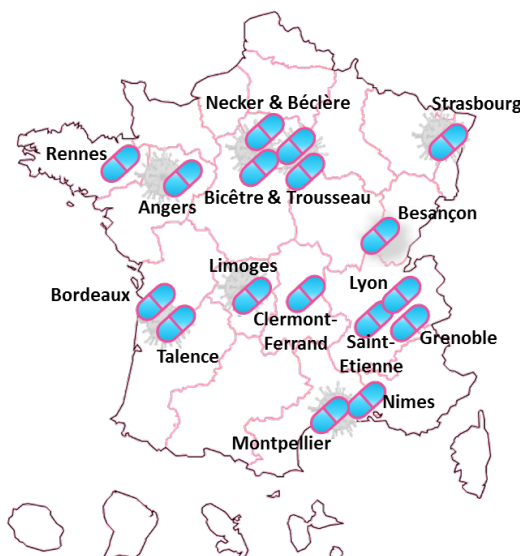
C) Etat du dépistage maternel de l'infection congénitale à CMV en France en 2022

Une enquête a été menée par le Laboratoire CNR en octobre 2022 sur le dépistage de l'infection à CMV en France, dont les résultats ont été présentés au congrès d'Athènes sur le CMV congénital. Ci-dessous le recensement des centres qui dépistent pendant la grossesse et l'impact potentiel sur la prise en charge thérapeutique des primo-infections :

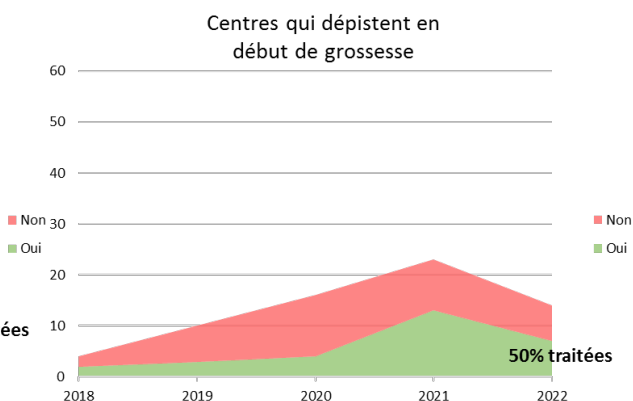
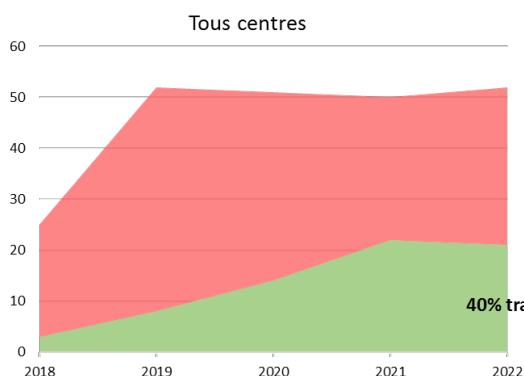
Centres qui dépistent systématiquement l'infection maternelle à CMV en 2022



Centres qui traitent l'infection maternelle à CMV en 2022



Traitement antiviral maternel des infections de début de grossesse (périconceptionnel à 1^{er} trimestre)



On voit ici clairement la différence de prise en charge du traitement des primo-infections maternelles entre les centres qui dépistent et les centres qui ne dépistent pas. Ces résultats préliminaires doivent être complétés mais démontrent l'impact favorable du dépistage organisé, pratiqué et préconisé depuis longtemps par le laboratoire de Necker : la possibilité d'une prise en charge rassurante car encadrée et maîtrisée grâce aux options thérapeutiques en développement. Nous avons donc décidé de mettre en place, au CHU de Limoges, ce dépistage systématique depuis janvier 2020 en bénéficiant de protocoles communs et présentons à ce jour le bilan de deux années de dépistage.

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

3.3.1 Résistance du CMV aux antiviraux

FAITS MARQUANTS :

Mise en route de la base de données interactives pour l'interprétation des génotypes de résistance et la déclaration des nouvelles mutations.

Nouvelle catégorisation des mutations

Recommandation de dosage des antiviraux pour adaptation de dose en cas de mutations de sensibilité diminuée ou de bas niveau de résistance, notamment pour ganciclovir et pour letermovir et maribavir, non disponible pour le foscarnet.

Définition de l'échantillon de souches testées et définitions utilisées pour exprimer la résistance

Les échantillons et les souches virales sont adressés au CNR soit directement, après accord téléphonique sur demande du clinicien ou du virologue, soit dans le cadre des cohortes, ou à la demande de l'ANSM, pour vérification du génotype de résistance avant délivrance de l'ATU pour Cytotect CP®, letermovir ou maribavir. En 2019 et 2020 aucune cohorte n'étant active les recherches de résistance relèvent des demandes spontanées ou de l'ANSM. En 2021-2022 les déclarations relèvent des laboratoires et de la cohorte NaViRe initiée par le CNR pour la surveillance des nouveaux antiviraux en greffe de cellules souches hématopoïétiques.

Critères de recherche de résistance aux antiviraux : CES CRITERES N'ONT PAS ETE MODIFIES EN 2022

Persistance d'une charge virale sanguine détectable après plus de trois semaines de traitement bien conduit et/ou aggravation clinique et/ou augmentation rapide de charge virale et/ou baisse de charge virale inférieure à 0,5 logs par semaine.

A noter les critères adoptés par le groupe résistance lors de la conférence de consensus internationale de 2017 (Kotton et al., Transplantation 2018) ajoutent la notion d'exposition dans les critères pour la recherche de résistance au ganciclovir : « Plus de six semaines d'exposition au ganciclovir et échec thérapeutique après plus de deux semaines de traitement à dose curative ». Ceci permet, en cas d'exposition préalable par prophylaxie, de réaliser la recherche de résistance une semaine plus tôt.

Table 2. Summary of the Definitions of Refractory Cytomegalovirus Infection and Disease and Antiviral Drug Resistance for Use in Clinical Trials

Term	Definition
Refractory CMV infection	CMV viremia that increases ^a after at least 2 wk of appropriately dosed antiviral therapy
Probable refractory CMV infection	Persistent viral load ^b after at least 2 wk of appropriately dosed antiviral therapy
Refractory CMV end-organ disease	Worsening in signs and symptoms or progression into end-organ disease after at least 2 wk of appropriately dosed antiviral therapy
Probable refractory CMV end-organ disease	Lack of improvement in signs and symptoms after at least 2 wk of appropriately dosed antiviral drugs
Antiviral drug resistance	Viral genetic alteration that decreases susceptibility to one or more antiviral drugs ^c

Abbreviation: CMV, cytomegalovirus.

^aMore than 1 log₁₀ increase in CMV DNA levels in blood or serum and determined by log₁₀ change from the peak viral load within the first week to the peak viral load at ≥2 weeks as measured in the same laboratory with the same assay.

^bCMV viral load at the same level or higher than the peak viral load within 1 week but <1 log₁₀ increase in CMV DNA titers done in the same laboratory and with the same assay.

^cKnown examples involve genes involved in antiviral drug anabolism (eg, UL97-mediated phosphorylation of ganciclovir), the antiviral drug target (eg, UL54, UL97, UL56/89/51), or compensation for antiviral inhibition of biological function (eg, UL27).

Resistant and Refractory CMV Infection • CID 2018:XX (XX XXXX) • 3

Depuis 2018 une publication réalisée par un groupe d'experts internationaux propose des critères simplifiés à utiliser dans tout essai clinique pour définir une infection/maladie à CMV réfractaire et résistante (Chemaly et al., CID 2018), justifiant une recherche de résistance par génotype de résistance. Ces critères raccourcissent le délai pour rechercher une résistance à 15 jours de traitement, quelle que soit l'exposition préalable. Ils sont donc à utiliser désormais.

Le risque est celui de faux négatifs par prélèvement trop précoce et justifie de répéter la recherche de résistance si la première est négative. La question se pose ici de la place du NGS.

Définition de la résistance génotypique : Présence d'une mutation dont le rôle dans la résistance a été démontré soit par transfert de marqueur soit par production d'un virus recombinant portant la mutation. Les mutations sont classées selon l'augmentation de la Concentration Inhibitrice 50%(CI50) par rapport à la souche de référence testée par l'antivirogramme selon les techniques de référence du CNR (inhibition de la formation de foyers ou inhibition de la production d'ADN viral (cf rapport 2010) ou de la publication.

Nous avons adapté à partir de la littérature et de nos données une **BASE DE DONNEES INTERACTIVE** actuellement en phase de production sur le site du CNR

Cnr- herpesvirus.fr/CMV/Expertise/base de données résistance.
Dernière mise à jour juin 2023.

Définition de la résistance phénotypique et poids des mutations : Une nouvelle catégorie de mutations de résistance : mutations de sensibilité diminuée correspondant à des augmentations de CI50 < 1,9 a été créée à la suite de la reclassification internationale proposée par S Chou en 2021. Les autres mutations de résistance sont classées en bas niveau de résistance et haut niveau de résistance selon l'augmentation de CI50 (< 3 bas niveau, possibilité d'augmenter la dose de ganciclovir après dosage plasmatique, idem pour le maribavir, à discuter pour le foscarnet; > 3 haut niveau de résistance changement de molécule antivirale conseillée.

Recommandations du CNR pour les laboratoires du réseau :

Génotype :

- Séquençage Sanger des gènes cibles UL97+UL54 +/- UL56-89-et UL51 dans leur totalité.
- Si le laboratoire ne réalise pas toutes ces séquences il peut en adresser une partie au laboratoire CNR.
- Nécessité d'informations cliniques sur le traitement reçu et d'une charge virale suffisante (>1000UI/mL)
- Sensibilité : 17-20%, résultats dans les 3-5 jours.
- Applicable à tout prélèvement de charge virale suffisante (associer sang et localisation si maladie à CMV)
- S'ils ne sont pas adressés au Laboratoire CNR, il est indispensable d'adresser les séquençages à des Laboratoires de référence participant à un contrôle annuel de qualité (du CNR ou du QCMD).
- Ces laboratoires s'appuient sur l'expertise du CNR (appel téléphonique ou base de données du CNR) pour l'interprétation des mutations et pour le conseil aux cliniciens en raison de la difficulté d'interprétation liée à certaines mutations
- Envoyer les nouvelles mutations au Laboratoire CNR pour expertise et phénotypage sur bacmides recombinants.
- **Déclarer les résistances aux antiviraux au Laboratoire CNR**
- **Déclaration possible sur le site de la base de données des nouvelles mutations avec demande de réalisation d'un phénotype sur virus recombinant**
- **Et toute anomalie constatée dans la base de données.**

Apport du NGS ?

- La sensibilité est élevée (2-5%) mais coûteuse et le risque d'émergence de mutants de faible fréquence reste controversé.
- Utilité de l'analyse rétrospective pour la cinétique de l'émergence précoce des mutants avec envoi au CNR des prélèvements
- Place dans le diagnostic précoce au cas par cas
- Nécessité de contrôles, de normalisation et de validation de la reproductibilité des résultats (cf projet du laboratoire 2023)

Surveillance des résistances du CMV aux antiviraux pour l'année 2022

En 2022 les laboratoires du réseau ont reçu 559 demandes de génotype de résistance pour 454 patients parmi lesquels 157 étaient porteurs d'une infection à CMV résistante.

Répartition des demandes :

2022	Nombre de patients	Nombre de recherche de résistance CMV	Nombre de patients Résistants	Nombre de Résistances	Nombre de patients Non Résistants	Mutations sur UL97	Nouvelles mutations sur UL97	Mutations sur UL54	Nouvelles mutations sur UL54	Mutations sur UL27	Nouvelles mutations sur UL27	Mutations sur UL56	Nouvelles mutations sur UL56	Mutations sur UL89	Nouvelles mutations sur UL89
LIMOGES	318	356	102	135	191	93	22	23	58	0	8	13	4	0	1
LA PITIE	73	102	34	49	54	31	42	13	17	0	0	5	3	0	1
SAINT LOUIS	36	62	8	10	30	9	0	2	0	0	0	0	0	0	0
NANTES	21	33	13	18	13	13	0	3	0	0	0	3	0	0	0
RENNES	6	6	0	0	6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Total	454	559	157	212	294	146	64	41	76	0	8	21	7	0	2

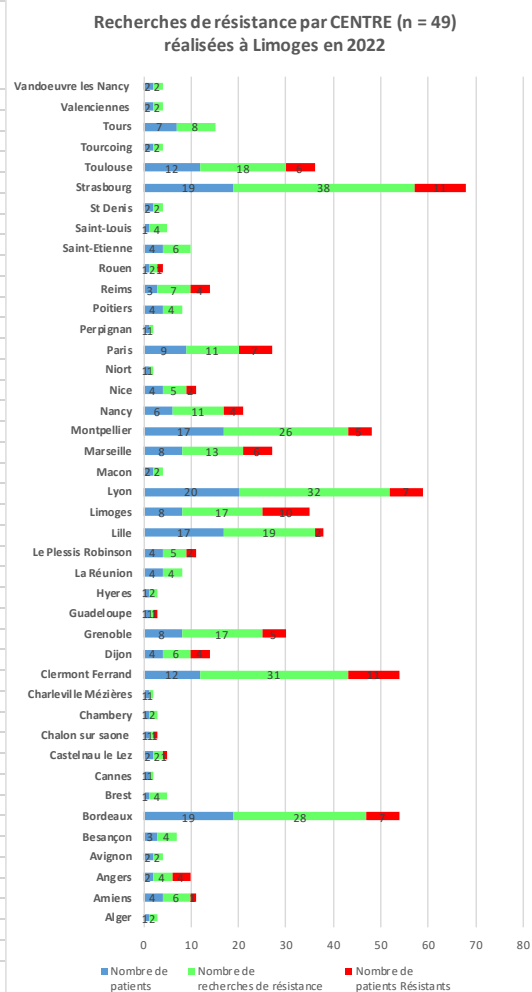
44 patients ont bénéficié d'un test quantiféron associé à leur recherche de résistance

Répartition des recherches par centre :

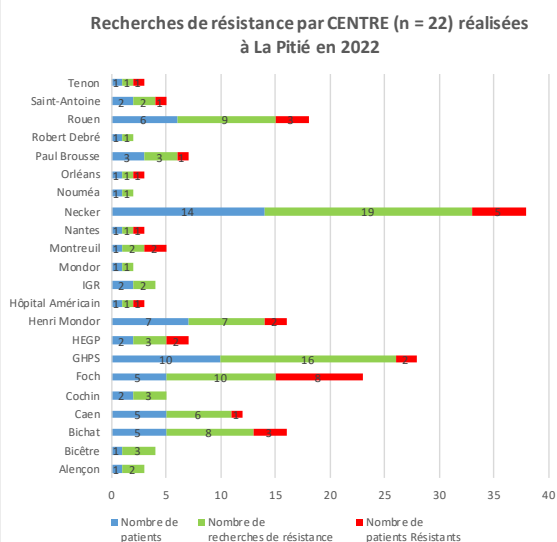
Les laboratoires participant au réseau coordonné par le CNR de Limoges n'ont pas changé en 2022 : Pitié-Salpêtrière, Saint Louis, Nantes, et Rennes, cependant les laboratoires ont progressivement augmenté le nombre de gènes séquencés, et nous pouvons considérer les données 2022 comme exhaustives.

A signaler : environ 10% (78) demandes ininterprétables du fait d'une charge virale trop faible pour l'amplification des gènes entiers. Un rappel des recommandations, incluant le remplissage des feuilles de demandes avec la charge virale CMV du prélèvement sera effectué.

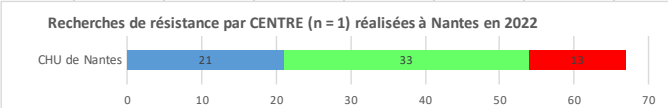
Centres de Limoges	Nombre de patients	Nombre de recherches de résistance	Nombre de patients Résistants	Nombre de Résistances	Nombre de patients Non Résistants
Alger	1	2			1
Amiens	4	6	1	1	4
Angers	2	4	4	4	
Avignon	2	2			2
Besançon	3	4			3
Bordeaux	19	28	7	7	17
Brest	1	4			4
Cannes	1	1			1
Castelnau le Lez	2	2	1	1	1
Chalon sur saone	1	1	1	1	
Chambery	1	2			1
Charleville Mézières	1	1			1
Clermont Ferrand	12	31	11	11	12
Dijon	4	6	4	4	1
Grenoble	8	17	5	5	7
Guadeloupe	1	1	1	1	
Hyerès	1	2			1
La Réunion	4	4			4
Le Plessis Robinson	4	5	2	2	3
Lille	17	19	2	2	13
Limoges	8	17	10	11	6
Lyon	20	32	7	7	18
Macon	2	2		1	2
Marseille	8	13	6	6	7
Montpellier	17	26	5	5	16
Nancy	6	11	4	4	5
Nice	4	5	2	2	2
Niort	1	1			1
Paris	9	11	7	7	3
Perpignan	1	1			1
Poitiers	4	4			4
Reims	3	7	4	4	3
Rouen	1	2	1	1	1
Saint-Etienne	4	6			4
Saint-Louis	1	4			1
St Denis	2	2			2
Strasbourg	19	38	11	12	18
Toulouse	12	18	6	6	9
Tourcoing	2	2			2
Tours	7	8			6
Valenciennes	2	2			2
Vandoeuvre les Nancy	2	2			2
Total général	224	356	102	105	191



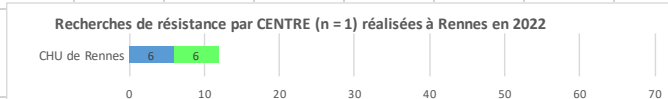
Centres de La Pitié	Nombre de patients	Nombre de recherches de résistance	Nombre de patients Résistants	Nombre de Résistances	Nombre de patients Non Résistants
Alençon	1	2		0	2
Bicêtre	1	3		0	3
Bichat	5	8	3	3	5
Caen	5	6	1	1	5
Cochin	2	3		0	3
Foch	5	10	8	13	2
GHPS	10	16	2	2	14
HEGP	2	3	2	5	1
Henri Mondor	7	7	2	2	5
Hôpital Américain	1	1	1	1	
IGR	2	2		0	2
Mondor	1	1		0	1
Montreuil	1	2	2	5	
Nantes	1	1	1	1	
Necker	14	19	5	7	14
Nouméa	1	1		0	1
Orléans	1	1	1	1	
Paul Brousse	3	3	1	2	2
Robert Debré	1	1		0	1
Rouen	6	9	3	4	6
Saint-Antoine	2	2	1	1	
Tenon	1	1	1	1	
Total	73	102	34	49	68



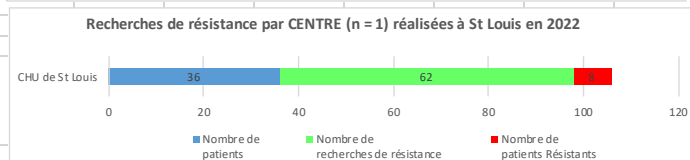
Centres de Nantes	Nombre de patients	Nombre de recherches de résistance	Nombre de patients Résistants	Nombre de Résistances	Nombre de patients Non Résistants
CHU de Nantes	21	33	13	18	20



Centres de Rennes	Nombre de patients	Nombre de recherches de résistance	Nombre de patients Résistants	Nombre de Résistances	Nombre de patients Non Résistants
CHU de Rennes	6	6	0	0	6

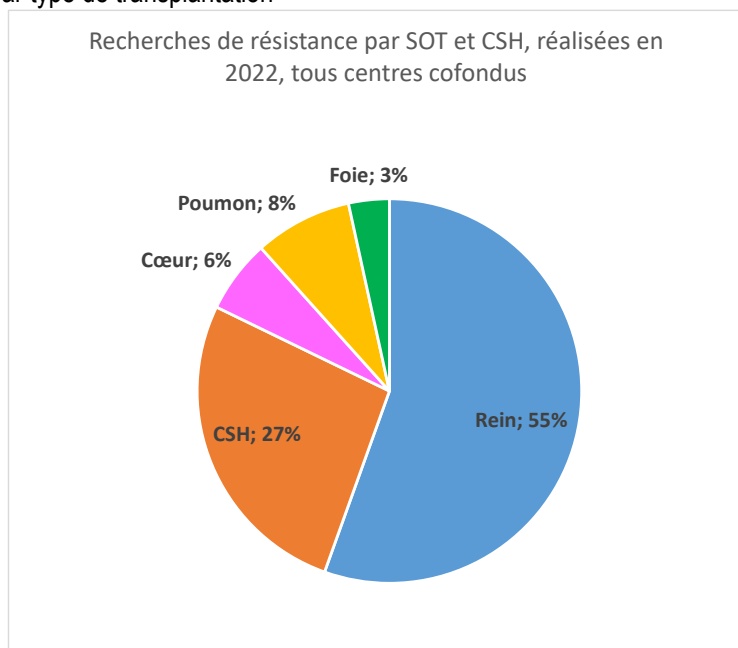


Centres de St Louis	Nombre de patients	Nombre de recherches de résistance	Nombre de patients Résistants	Nombre de Résistances	Nombre de patients Non Résistants
CHU de St Louis	36	62	8	10	30

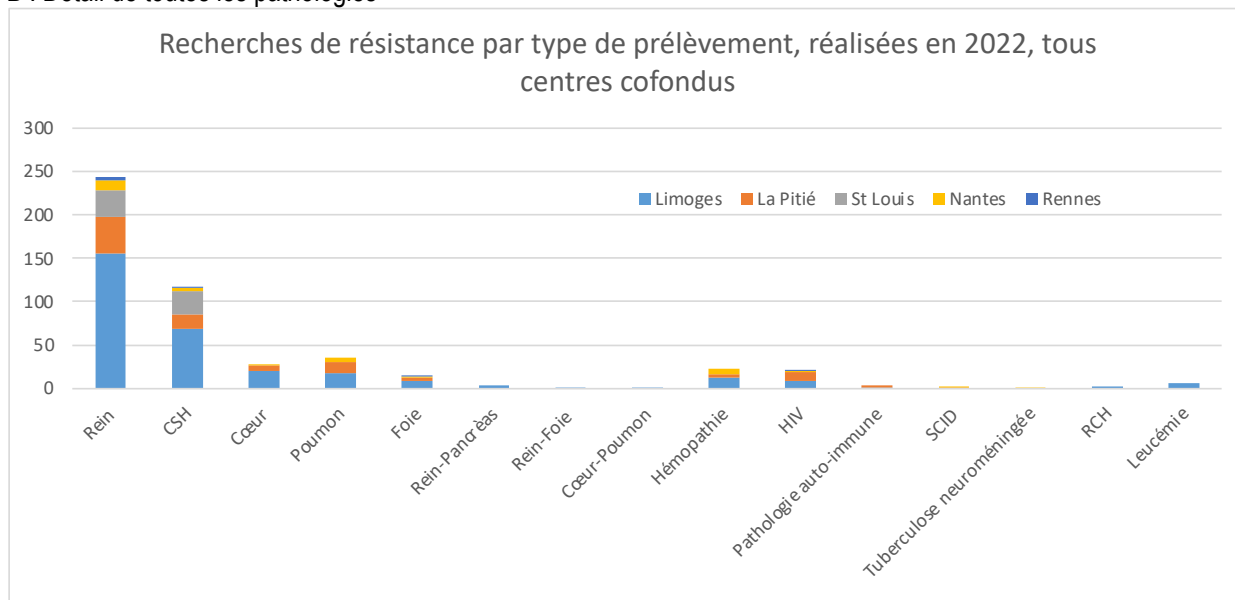


Recherches de résistances par type de pathologie sur l'ensemble des centres :

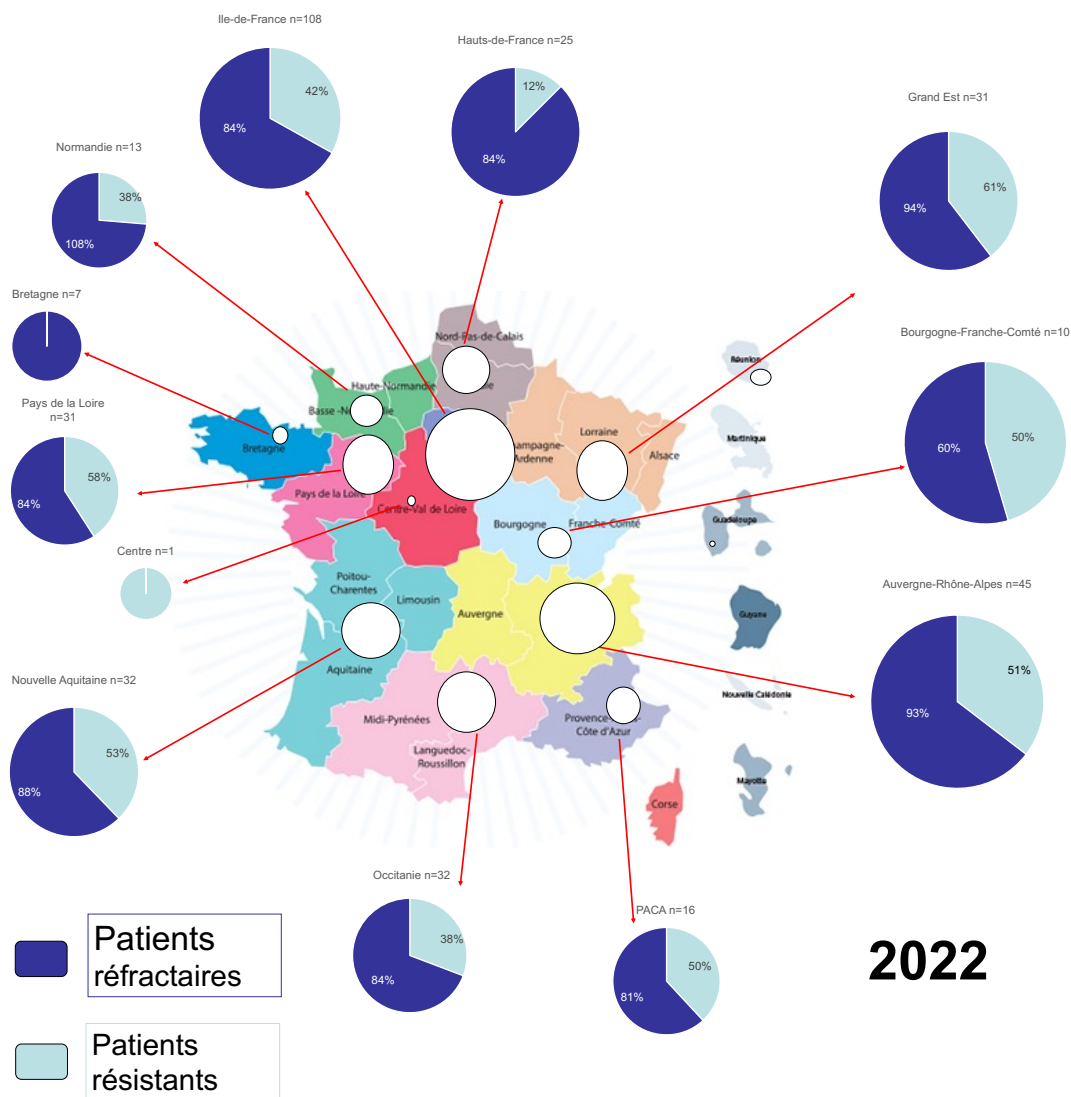
A : par type de transplantation



B : Détail de toutes les pathologies

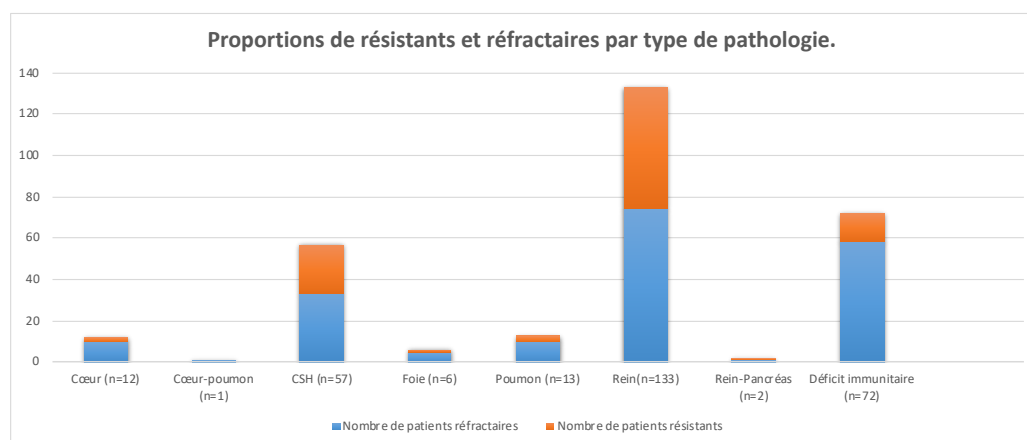


La proportion de patients résistants parmi les patients non répondeurs au traitement analysée sur l'ensemble du réseau en 2019 et 2020 est stable, voisine de 1/3 (34,8% sur 451 patients) versus 65,2% sur 451 patients qui sont réfractaires non résistants, avec des variations selon les régions qui reflètent probablement des disparités de prescription du génotype. Pas d'évolution notable par rapport à 2021 en 2022 cf carte de France ci-dessous.



Détail des proportions de résistants parmi les réfractaires par pathologie en 2022 :

Pas d'évolution notable par rapport à 2021.



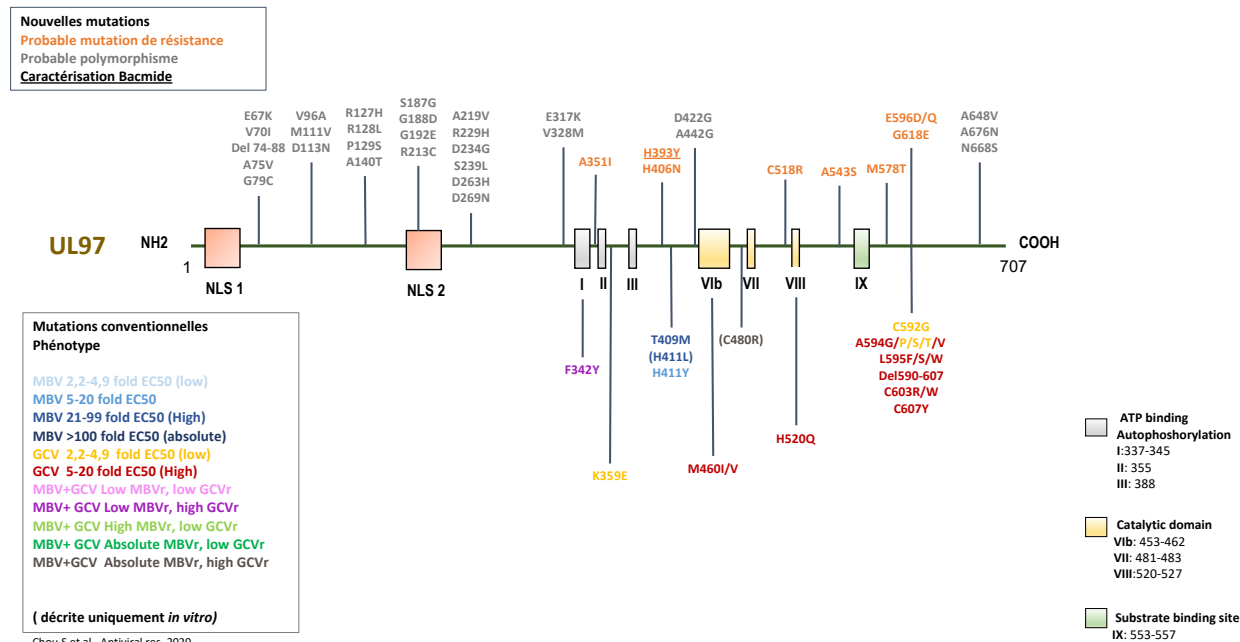
Distribution des mutations dans les différents gènes concernés sur la période 2022 :

UL97 : résistance ganciclovir et maribavir ; UL27 : résistance bas niveau maribavir :

UL54 : résistance ganciclovir cidofovir foscarnet

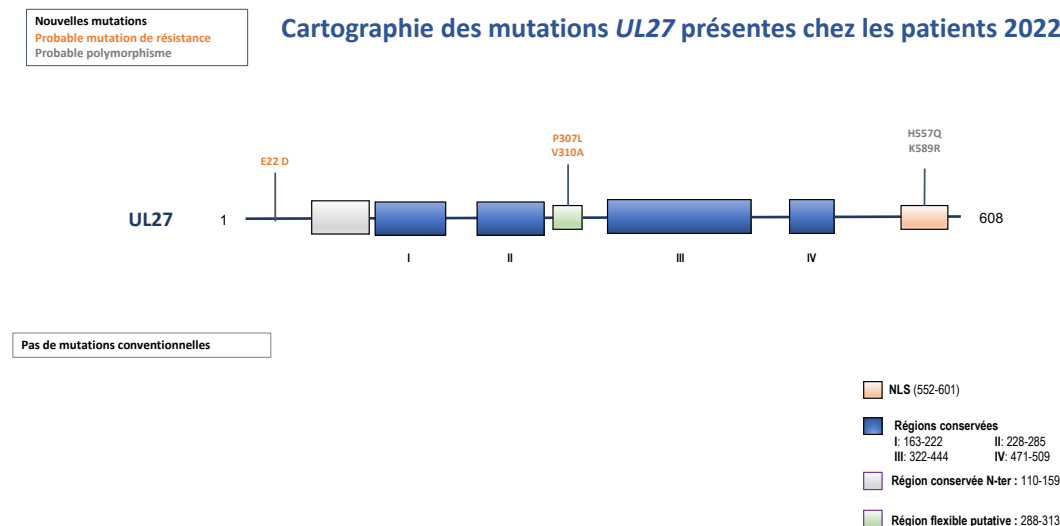
UL56, UL89, UL51 : résistance letermovir

Cartographie des mutations *UL97* présentes chez les patients 2022



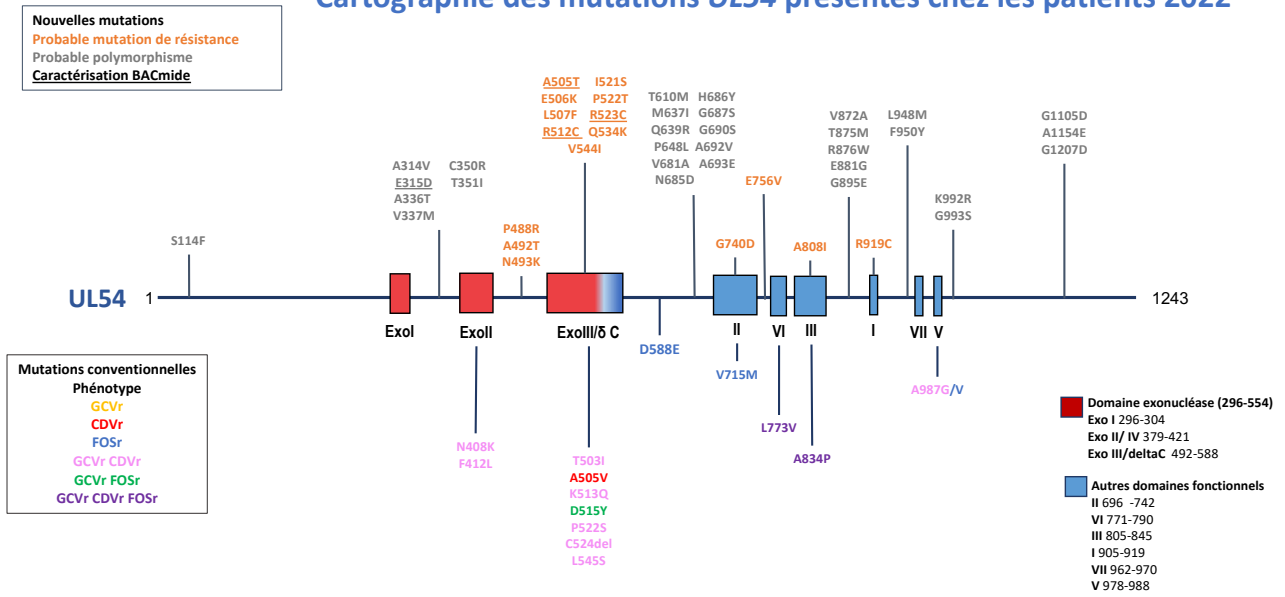
3

Cartographie des mutations *UL27* présentes chez les patients 2022



Hantz et al., 2009

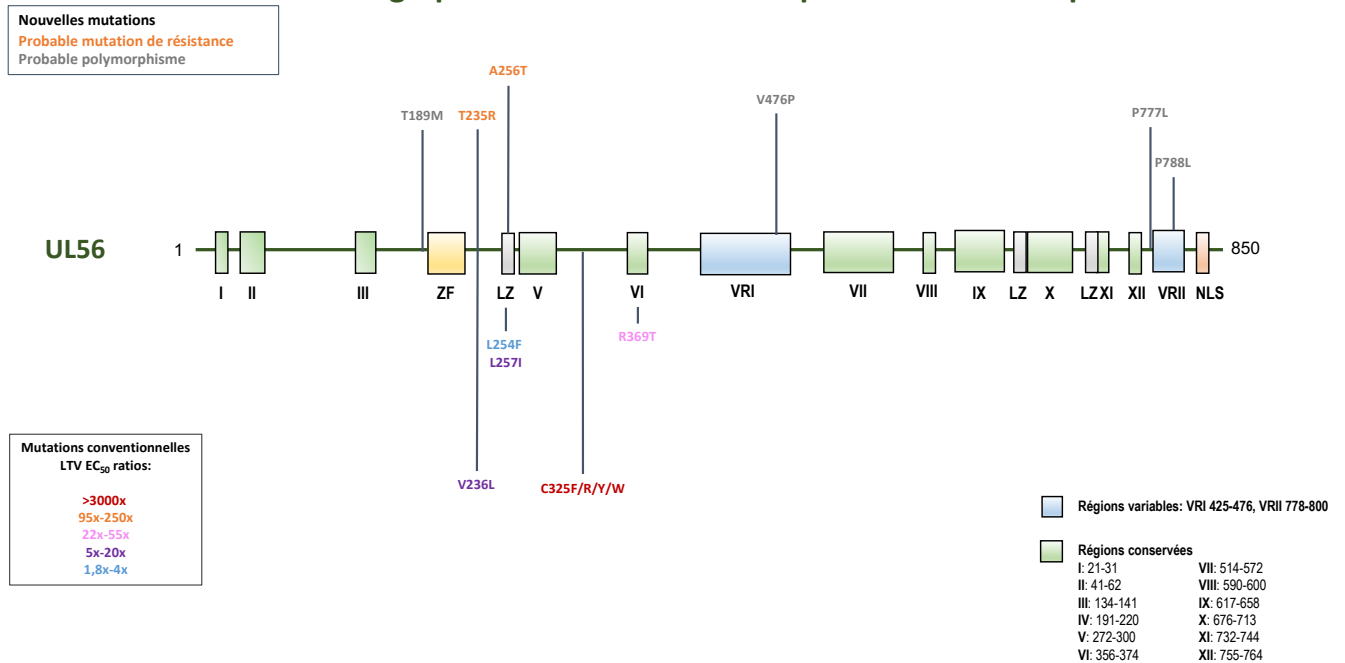
Cartographie des mutations *UL54* présentes chez les patients 2022



Chou.S et al., 2020

2

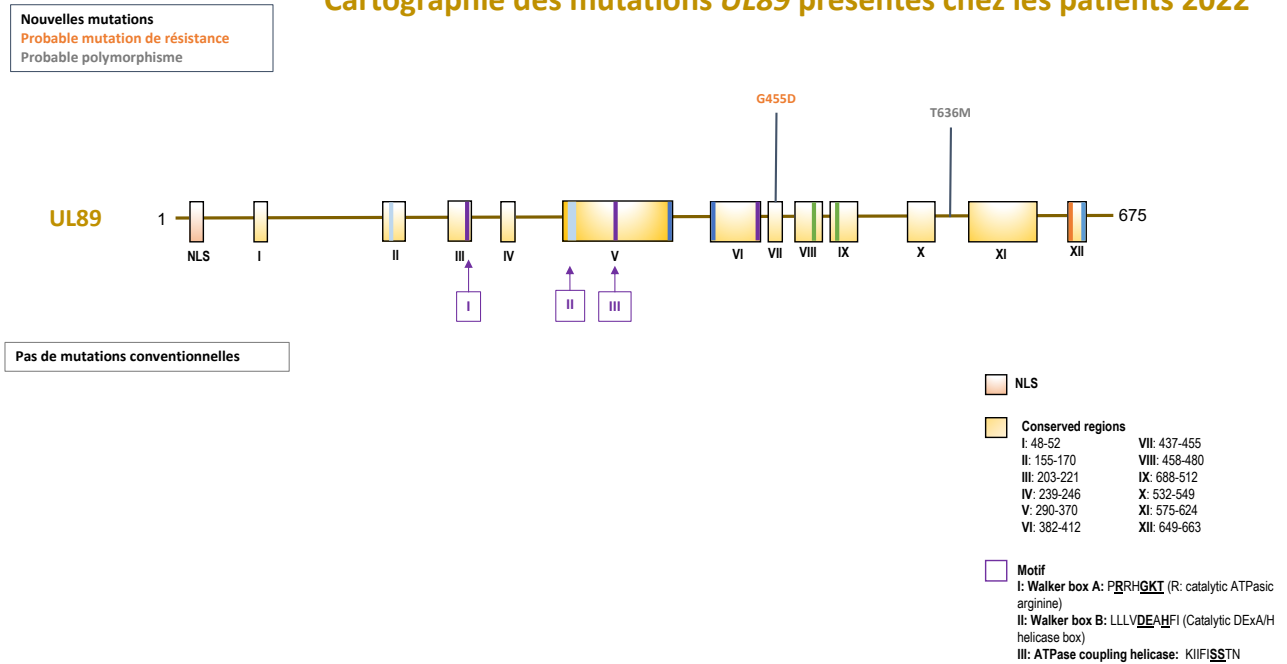
Cartographie des mutations *UL56* présentes chez les patients 2022



Champier et al., 2008; Chou.S et al., 2020

4

Cartographie des mutations *UL89* présentes chez les patients 2022

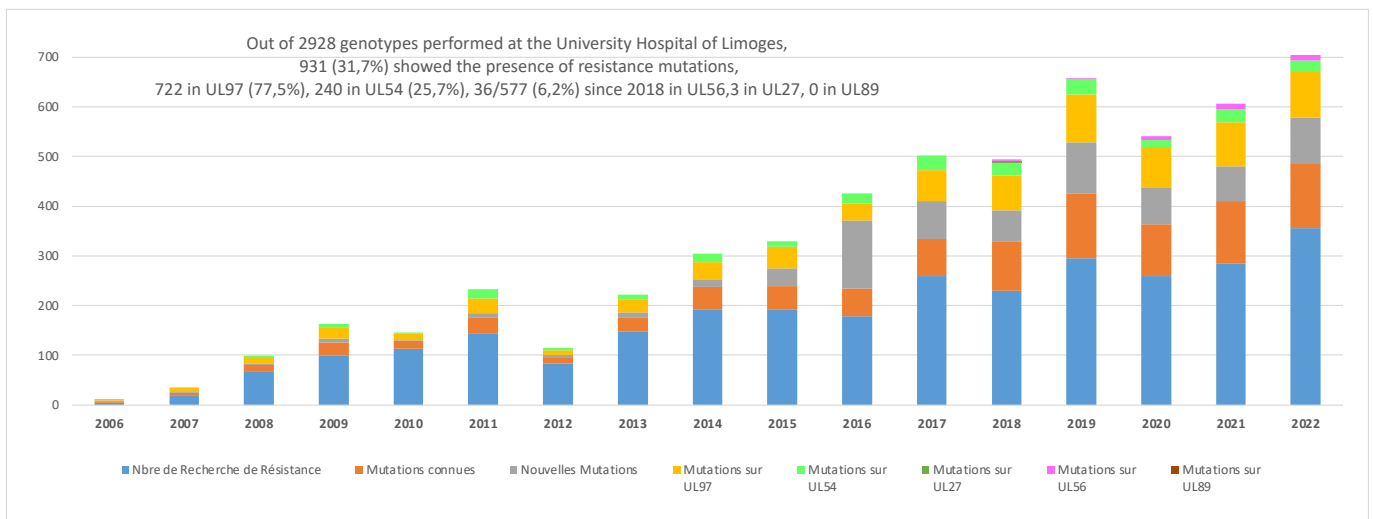


Champier et al., 2007

Pas de mutation connue ou nouvelle détectée en 2022 dans UL51.

Evolution des demandes et des résistances : Bilan des Résistances par année et par pathologie

Ce bilan sera présenté à l'ESOT en septembre 2023 avec les données cumulées du réseau à partir de 2017
 La surveillance des résistances est en place depuis 2006. Le nombre total de génotypes effectués est de 2 928 à Limoges depuis 2006.
 Evolution globale des demandes de génotype de résistance et des mutations recherchées depuis la création du CNR en 2006, données cumulées du site de Limoges



Résistance au letermovir

Le letermovir a désormais l'AMM en prophylaxie des infections à CMV post allogreffe de cellules souches chez les patients à haut risque CMV (CMV-séropositifs avant greffe). La prévalence et les facteurs de risque d'émergence de résistance sont importants à connaître car les résistances au letermovir sont le plus souvent des résistances « absolues » supprimant toute efficacité de la molécule.

Bilan des résistances en 2022 : voir carte

Résistance au maribavir

Le maribavir est un inhibiteur de la kinase UL97 du CMV, peu toxique et présentant d'exceptionnelles résistances croisées, uniquement avec le ganciclovir. Il a obtenu une AMM en traitement des infections à CMV réfractaires résistantes ou non aux inhibiteurs de polymérase ou au letermovir.

Bilan des résistances en 2022 : voir carte

Analyse des nouvelles mutations :

Les mutations nouvelles identifiées au laboratoire CNR ou déclarées par les autres laboratoires ont été analysées en utilisant la technologie des Bacmides HCMV recombinants. En 2022, 26 constructions de virus recombinants ont été réalisées : 20 mutations dans *UL54*, 2 mutations dans *UL97*, 3 mutations dans *UL56* et 1 mutation dans *UL51*. 14 de ces mutations sont caractérisées ou en cours de caractérisation phénotypique (voir tableau ci-dessous):

Gène (Région)	Description	Profil de résistance aux antiviraux	Impact mutation sur fitness souche
<i>UL54</i> (domaine ExoII)	A402V	Pas de résistance	Pas d'impact
<i>UL54</i>	G441S	Pas de résistance	Diminution
<i>UL54</i>	F460S	Pas de résistance	Pas d'impact
<i>UL54</i> (domaine ExoIII)	A505T	GCV-R CDF-R	Pas d'impact
<i>UL54</i> (domaine ExoIII)	R512C	Pas de résistance	Pas d'impact
<i>UL54</i> (domaine ExoIII)	R523C	Pas de résistance	Pas d'impact
<i>UL54</i> (domaine ExoIII)	T503A	GCV-R	Augmentation
<i>UL54</i> (domaine ExoIII)	V544A	GCV-R	Augmentation
<i>UL54</i>	A619T	Pas de résistance	Diminution
<i>UL54</i>	A692S	CDF-R	Diminution
<i>UL54</i> (domaine Palm2)	A972V	Pas de résistance	Pas d'impact
<i>UL97</i> (domaine de liaison au substrat)	C603F	GCV-R	Pas d'impact
<i>UL56</i>	S259V	LTV-R	Augmentation
<i>UL56</i>	S262C	Pas de résistance	Nd

Cinq mutations présentes sur le gène *UL54* (A543V, R512C, F460S, G441S et A928T) et deux mutations du gène *UL56* (F345L et P800L) ont fait l'objet d'une publication, suite à leur caractérisation en BACmides effectuée en 2021-2022 (Santos et al. 2022). Parmi ces mutations, A928T, présente dans le domaine Palm2 de *UL54*, amène une triple résistance GCV-CDF-FOS, tandis que A543V, présente dans le domaine exonucléase III, mène à un haut niveau de résistance au CDF.

3.3.2 Surveillance de la résistance des HSV-1 et HSV-2 aux antiviraux en 2022

En 2022, les centres de la Pitié-Salpêtrière, Saint-Louis, et Limoges ont reçu un total de 154 prélèvements biologiques provenant de 137 patients distincts pour effectuer une recherche de résistance génotypique des **HSV** aux antiviraux. Les données fournies par le centre de Lyon étant incomplètes, elles n'ont pas pu être incluses dans l'analyse. La répartition entre les 3 centres était la suivante :

	Pitié-Salpêtrière	Limoges	Saint-Louis	Total
Nombre de prélèvements biologiques	114	17	23	154
Nombre de patients	88	15	13	116

Les caractéristiques des patients pour lesquels une recherche de résistance génotypique des **HSV** aux antiviraux a été effectuée étaient les suivantes :

Effectifs	
Nombre de prélèvements biologiques ¹	154
Nombre de patients	116
Sexe	
Homme	61
Femme	55
Age	
Médiane (années) [intervalle]	52,5 [0 – 88]
Origine géographique	
Paris / Ile-de-France	52
Province	58
Outre-mer	4
Europe	2
Immunodépression	
Aucune	24
Greffe de CSH	36
Greffe d'organe solide	10
Infection par le HIV	22
Hémopathie	5
Pathologie auto-immune	2
Déficit immunitaire primitif	2
Autre (réanimation, nouveau-né)	3
Non renseigné	12
Prélèvements biologiques	
Prélèvements cutanéomuqueux ²	64
Prélèvements anogénitaux	44
Prélèvements de cornée / larmes	25
Sang	11
Liquides cérébrospinaux	2
Prélèvements respiratoires	8
Espèce de HSV	
HSV-1	95
HSV-2	59
Traitements antiviraux	
(V)ACV	113
(V)ACV + AMNV	1
(V)ACV + FCV	1
(V)ACV + FOS	7
(V)ACV + GCV	10
(V)ACV + IMQ	1
(V)ACV + PTV	1

(V)ACV + FOS + AMNV	3
(V)ACV + FOS + FCV	2
(V)ACV + FCV + GCV	1
FOS	4
CDV	2
FCV	1
AMNV	1
Aucun	2
Non renseigné	4

¹Pour certains patients, des prélèvements itératifs et/ou effectués dans différents sites anatomiques ont été analysés ; ²Hors prélèvement anogénital.

AMNV : aménamévir ; CSH : cellules souches hématopoïétiques ; CDV : cidofovir ; FCV : famciclovir ; FOS : foscarnet ; GCV : ganciclovir ; HIV : virus de l'immunodéficience humaine ; HSV : virus herpes simplex ; IMQ : imiquimod ; PTV : pritélir ; (V)ACV : (val)aciclovir.

En 2022, une résistance génotypique des HSV aux antiviraux a été identifiée dans 91 (59,1 %) prélèvements biologiques différents provenant de 69 (59,5 %) patients distincts.

Le bilan de la prévalence de la résistance des **HSV-1** et **HSV-2** aux antiviraux est le suivant :

	HSV	HSV-1	HSV-2
Nombre de patients	116	75	41
Sensibilité aux antiviraux	47 (40,5 %)	29 (38,7 %)	18 (44,0 %)
Résistance aux antiviraux	69 (59,5 %)	46 (61,3 %)	23 (56,0%)
- Résistance à l'ACV	64 (55,2 %)	43 (57,3 %)	21 (51,2 %)
- Résistance au FOS	1 (0,9 %)	0 (0,0 %)	1 (2,4 %)
- Résistance à l'ACV et au FOS	4 (3,4 %)	3 (4,0 %)	1 (2,4 %)

ACV : aciclovir ; FOS : foscarnet ; HSV : virus herpes simplex.

La prévalence globale de la résistance des HSV aux antiviraux en 2022 était de 59,5% : 61,3 % pour les HSV-1 et 56,0 % pour les HSV-2. La résistance des HSV à l'aciclovir était très majoritairement représentée (92,8 %), suivie de la résistance à croisée à l'aciclovir et au foscarnet (5,8 %) et de la résistance au foscarnet (1,4 %). La prévalence de la résistance des HSV aux antiviraux en 2022 (59,5%) était plus élevée qu'en 2021 (41%).

Les différentes mutations de résistance aux antiviraux identifiées dans les 91 prélèvements biologiques en 2022 étaient les suivantes :

Mutations de résistance aux antiviraux	Nombre (%)
Résistance à l'ACV	85
Codon stop dans la TK	40 (47,1 %)
Changement d'acide aminé dans la TK	24 (28,2 %)
Frameshift ¹ dans la TK	13 (15,3 %)
Changement d'acide aminé et frameshift dans la TK	4 (4,7 %)
Changement d'acide aminé dans l'ADN polymérase	2 (2,3 %)
Changement d'acide aminé dans la TK et dans l'ADN polymérase	1 (1,2 %)
Frameshift dans la TK et changement d'acide aminé dans l'ADN polymérase	1 (1,2%)
Résistance à l'ACV et au FOS	5
Changement d'acide aminé dans l'ADN polymérase	2 (40,0 %)
Changement d'acide aminé dans la TK et dans l'ADN polymérase	2 (40,0%)
Frameshift dans la TK et changement d'acide aminé dans l'ADN polymérase	1 (20,0 %)
Résistance au FOS	1
Changement d'acide aminé dans l'ADN polymérase	1 (100 %)

¹Décalage du cadre de lecture

Les mutations de résistance des **HSV** à l'aciclovir sont majoritairement des codons stop (47,1 %), suivis des changements d'acides aminés (28,2 %) et des frameshifts (15,3 %).

Aucune mutation de résistance au cidofovir n'a été détectée au cours de l'année 2022.

A la Pitié-Salpêtrière, nous avons effectué la recherche de la résistance du **HSV-2** au pritélvir et à l'aménamévir par séquençage des gènes UL5 et UL52 codant le complexe hélicase-primase sur 9 prélèvements biologiques provenant de 4 patients distincts qui ont reçu ces nouveaux traitements antiviraux en autorisation d'accès compassionnel pour le traitement de lésions génitales herpétiques à **HSV-2** récurrentes et résistantes à l'aciclovir pour 3 patients, et à l'aciclovir et au foscarnet pour 1 patient. Aucune mutation de résistance n'a été détectée. Au total, 17 nouvelles mutations non connues dans la TK et 35 nouvelles mutations non connues dans l'ADN polymérase des **HSV** ont été identifiées en 2022. A la Pitié-Salpêtrière, nous avons pu identifier le rôle de 11 d'entre elles par technique phénotypique (antivirogramme). Cette technique de 2^e intention effectuée après l'identification de mutations non connues par séquençage a été remise en place au laboratoire à la fin de 2022 (cette activité avait dû être interrompue pendant la période « COVID-19 »).

Enzyme virale	Changement d'acide aminé	Rôle
Thymidine kinase HSV-1	T86P	Résistance à l'ACV
	D162G	Résistance à l'ACV
	D164R	Résistance à l'ACV
	P173Q	Résistance à l'ACV
	R222L	Résistance à l'ACV
	F308V	Résistance à l'ACV
Thymidine kinase HSV-2	L282V	Polymorphisme naturel
ADN polymérase HSV-1	E545K	Résistance à l'ACV
	C926S	Polymorphisme naturel
	R1117C	Polymorphisme naturel
ADN polymérase HSV-2	A905T	Polymorphisme naturel

HSV : virus herpes simplex.

Surveillance de la résistance du VZV aux antiviraux en 2022

En 2022, les centres de la Pitié-Salpêtrière et de Limoges ont reçu un total de 20 prélèvements provenant de 14 patients distincts pour effectuer une recherche de résistance du **VZV** aux antiviraux. La répartition entre les 2 centres était la suivante :

	Pitié-Salpêtrière	Limoges	Total
Nombre de prélèvements biologiques	16	4	20
Nombre de patients	10	4	14

Les caractéristiques des patients pour lesquels une recherche de résistance génotypique du **VZV** aux antiviraux a été effectuée étaient les suivantes :

Effectifs	
Nombre de prélèvements biologiques ¹	20
Nombre de patients	14
Sexe	
Homme	8
Femme	6
Age	
Médiane (années) [intervalle]	52,7 [0,3 – 92]
Origine géographique	
Paris / Ile-de-France	1
Province	12
Outre-Mer	1
Immunodépression	
Aucune	6
Greffe d'organe solide	3
Greffe de CSH	2
Hémopathie	2
Nouveau-né prématuré	1

Prélèvements biologiques	
Prélèvement cutanéomuqueux ²	8
Humeurs oculaires	10
Prélèvements de cornée / larmes	1
Biopsies cutanées	1
Traitements antiviraux	
(V)ACV	18
(V)ACV + FOS	2

¹Pour certains patients, des prélèvements itératifs et/ou effectués dans différents sites anatomiques ont été analysés ;

CSH : cellules souches hématopoïétiques ; FOS : foscarnet ; (V)ACV : (val)aciclovir.

En 2022, une résistance génotypique du VZV aux antiviraux a été identifiée dans 2 (10,0 %) prélèvements biologiques différents provenant de 2 (14,3 %) patients distincts.

Le bilan de la prévalence de la résistance du **VZV** aux antiviraux est le suivant :

Résultat	VZV
Nombre de patients	14
Sensibilité aux antiviraux	12 (85,7 %)
Résistance aux antiviraux	2 (14,3 %)
Résistance à l'ACV	2 (14,3 %)

ACV : aciclovir ; FOS : foscarnet ; HSV : virus herpes simplex.

La prévalence globale de la résistance du VZV aux antiviraux en 2022 était de 14,3%. La résistance du VZV à l'aciclovir a été identifiée dans les 2 cas. La prévalence de la résistance du VZV aux antiviraux en 2022 était plus élevée qu'en 2021 (0%).

Les mutations de résistance du **VZV** à l'aciclovir identifiées dans les 2 prélèvements biologiques en 2022 étaient les suivantes :

Mutations de résistance aux antiviraux	Nombre (%)
Résistance à l'ACV	2
Changement d'acide aminé dans la TK	1 (50,0 %)
<i>Frameshift</i> ¹ dans la TK	1 (50,0 %)

¹Décalage du cadre de lecture

Les deux mutations de résistance du **VZV** à l'aciclovir étaient un changement d'acide aminé et un *frameshift* localisés dans la thymidine kinase (TK) virale. Aucune mutation de résistance au foscarnet n'a été détectée au cours de l'année 2022.

A la Pitié-Salpêtrière, aucune recherche de résistance du **VZV** à l'aménamévir par séquençage des ORF55 et ORF6 codant le complexe hélicase-primase n'a été effectuée.

Au total, 2 nouvelles mutations non connues dans la TK (R189K et C287Y) et 1 nouvelle mutation non connue dans l'ADN polymérase (E646K) du **VZV** ont été identifiées en 2022.

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Laboratoire CNR coordonnateur Limoges :

- Mise en réseau international des informations sur les résistances via le workshop CMV tous les deux ans et les groupes internationaux de consensus en transplantation, l'EBMT et l'ESOT.
- S Alain est expert auprès du QCMD depuis 2011 : Poursuite de la contribution à l'analyse des résultats des contrôles de qualité internationaux (QCMD) sur les méthodes de charge virales CMV et les génotypes de résistance, permettant de générer des alertes en cas de défaut d'une ou plusieurs méthodes.
- Participation active aux congrès internationaux

Laboratoire CNR associé de la Pitié-Salpêtrière :

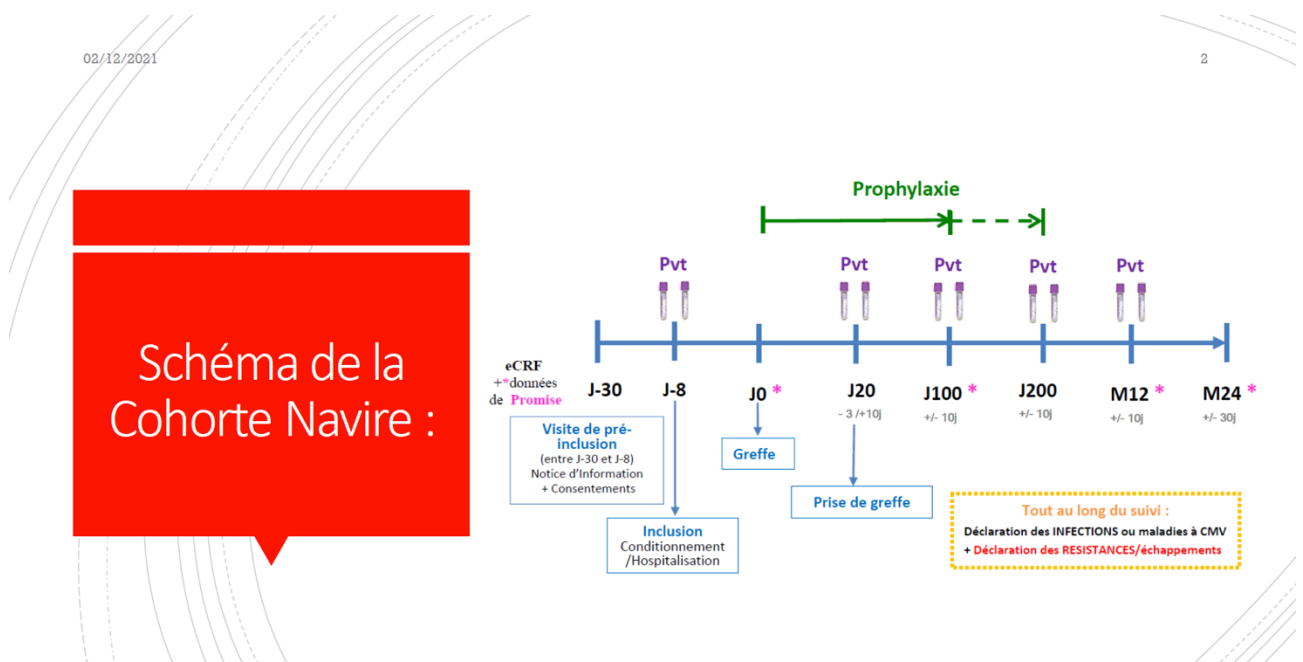
Le Dr David Boutolleau est expert auprès du QCMD pour la conception et l'analyse des résultats des contrôles de qualité pour la détection/quantification des génomes des HSV et du VZV et pour les tests génotypiques de résistance des HSV aux antiviraux.

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Laboratoire CNR coordonnateur Limoges :

Etudes de cohorte observationnelles (S Alain, investigateur principal)

- NAVIRE (en cours) **371 patients inclus à ce jour dans 14 centres** :
Dans la suite de l'AMM du letermovir en 2019 Une nouvelle cohorte a été mise en place pour surveiller l'efficacité des nouveaux antiviraux en vie réelle en particulier le letermovir, en parallèle des inhibiteurs de polymérase, situer l'apport des tests de charge virale Torquetenovirus de façon prospective. Et pour identifier les modalités d'utilisation des nouvelles molécules. Cette cohorte, en partenariat avec la SFGMTC est répertoriée dans Clinical trial (NCT04690933). Les premières inclusions ont eu lieu en juillet 2020. Premiers résultats présentés à l'EBMT en 2023.



- CIRCLE : Sous étude de Navire ; **premiers patients inclus en juin 2022. A ce jour 16 patients inclus.** Etude de la reconstitution immunologique détaillée (globale, innée, cellulaire et humorale adaptative) sous letermovir pendant et après traitement prophylactique, chez 50 receveurs d'allogreffe de cellules souches (Etude menée en commun avec la SFGMTC) premiers patients inclus en juin 2022.

- BioSupport : mise en place d'une collection biologique avec cohorte de patients receveurs d'organes rein, foie dans le cadre de la FHU SUPPORT Tours Poitiers Limoges (S Alain, Investigateur Principal) ouverte à partir de juillet 2020, 150 patients inclus sur 300 attendus (voir projet) Optimisation de la survie à long terme en transplantation d'organes : de la physiopathologie à la prise en charge optimisée des patients Cohorte multicentrique (Tours, Poitiers, Limoges), prospective, observationnelle, avec collection d'échantillons biologiques. Sur cette cohorte nous étudierons les facteurs viraux (CMV et TTV et transcriptomiques potentiellement associés à la réactivation des souches de CMV).
- Poursuite de l'analyse des cas d'ATU Maribavir depuis 2016
- Analyse rétrospective des cas de résistance au letermovir

Laboratoire CNR associé de la Pitié-Salpêtrière :

Le CNR Herpèsvirus de la Pitié-Salpêtrière, en collaboration avec le CNR ROR de Caen (Dr J. DINA), a créé un groupe de travail comprenant 12 laboratoires de virologie concernant la mesure de la synthèse intrathécale (SIT) et la synthèse intraoculaire (SIO) des anticorps antiviraux. La composition de ce groupe de travail est la suivante :

AP-HP PITIE-SALPETRIERE	David Boutolleau
AP-HP COCHIN	Anne-Sophie L'Honneur
AP-HP PAUL BROUSSE	Christelle Vauloup-Fellous
QUINZE-VINGTS	Alfred KOBAL
BORDEAUX	Sonia Burrel
CAEN	Julia Dina, Astrid Vabret
MONTPELLIER	Vincent Foulongne
RENNES	Vincent Thibault, Claire Grolhier
STRASBOURG	Aurélie Velay, Marie-Josée Wendling
LIMOGES	Sébastien Hantz
GRENOBLE	Raphaële Germi
MARSEILLE	Christine Zandotti, Laetitia Ninove

4. Alertes

Aucun évènement issu de la surveillance du CNR Herpesvirus effectuée en 2022 n'a conduit à une alerte de Santé Publique France ou de l'ANSM.

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

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Infection congénitale à CMV :

L'activité de conseil pour la prise en charge de l'infection congénitale à CMV est très active : les membres du CNR sont très sollicités pour :

- une aide à l'interprétation des sérologies CMV (au moins 2 nouveaux dossiers par jour).
- une aide à la prise en charge d'une primo-infection maternelle avérée ou d'une infection fœtale avérée (environ 4 nouveau cas par semaine à Necker)
- L'aide à la prise en charge des nouveaux-nés infectés

Les sollicitations viennent des collègues biologistes, obstétriciens et sages-femmes ou des patientes. Les conseils pour les collègues sont gérés par email ou téléphone. Concernant les patientes, nous les adressons au diagnostic prénatal pour des consultations en présentiel ou des téléconsultations auxquelles nous participons. Le centre de Necker a d'ailleurs mis en place une téléconsultation pour l'ensemble des CPDPN.

Nous recevons des appels téléphoniques quotidiens ou des e-mails de médecins, sages-femmes ou de patients (ayant trouvé nos coordonnées par internet) pour des conseils concernant l'interprétation de résultats de tests sérologiques pendant la grossesse ou dans le cadre des dons de gamètes. Il s'agit parfois de conseils pour entreprendre une grossesse après une primo-infection, de conseils sur la prise en charge de l'infection fœtale puis pédiatrique. Par ailleurs, nous conseillons aussi nos collègues biologistes sur les performances et interprétation des techniques (sérologie mais aussi PCR CMV sur salive...). Le Pr Sophie Alain, le Dr S Hantz assurent la permanence du conseil sur l'infection congénitale à CMV au laboratoire CNR, avec environ un appel ou contact par jour. A Necker, les Dr Leruez-Ville et Jacques Fourgeaud reçoivent environ 2 à 3 appels par jour. Nous recevons par ailleurs de nombreux tubes pour expertise sérologique et diagnostics prénatal et néonatal tant à Limoges qu'à Necker. Nous avons noté une augmentation des demandes concernant la prise en charge des infections congénitales et une augmentation très importante des conseils sur les choix thérapeutiques chez les enfants infectés. La mise en place du dépistage en janvier 2020 à Limoges a également considérablement augmenté les échanges avec les gynécologues obstétriciens publics ou privés en plus du staff hebdomadaire, et nous accompagnons les équipes dans cette démarche. 250 patientes avec une suspicion de primo-infection à CMV ont été prises en charge conjointement par le CPDPN et le CNR (en présentiel ou en téléconsultation) dans l'année 2022 à Necker.

Le CNR associé Necker organise un staff hebdomadaire pluridisciplinaire (virologue, obstétricien, pédiatre, sages-femmes, radiologues) pour discuter des dossiers d'infection congénitale à CMV. Ce staff en zoom est ouvert à l'ensemble des équipes du territoire national pour conseil sur la prise en charge.

Prise en charge et traitement des infections à CMV, résistance aux antiviraux et nouvelles molécules thérapeutiques anti-CMV

- Conseil auprès des Pr S Alain ou S Hantz qui assurent une permanence téléphonique et par mail pour conseiller les praticiens et les aider dans les choix thérapeutiques pour les patients difficiles à traiter ou des infections à CMV complexes notamment sous Belatacept, ou encore pour des infections à CMV hors transplantation, survenant sous biothérapies, conseil aux cliniciens pour les demandes d'ATU en cas de multirésistance chez les patients immunodéprimés, notamment sur la place respective des nouveaux antiviraux et des immunoglobulines et la surveillance de l'efficacité (plusieurs sollicitations quotidiennes de l'ensemble de France métropolitaine Suisse et DOM TOM)).
- Implication forte de S Alain dans le conseil pour les molécules en ATU, indication, dosages, suivi et associations et l'obtention des nouvelles molécules pour les patients avec échange avec l'ANSM et les industriels notamment Cytotect CP, maribavir, letermovir et dans le suivi des patients sous letermovir hors AMM. Sous forme de staffs, communications orales ou points téléphoniques ou par visio conférence avec les différents services de transplantation.

Autres infections à CMV

-Le laboratoire CNR est également fréquemment sollicité par les médecins internistes ou généralistes pour des suspicions de CMV ou des infections à CMV ou à EBV atypiques ou persistantes ou encore des formes inhabituelles de primo-infection (pic d'immunoglobuline monoclonale, thrombocytopénie, thrombose mésentérique, CMV sur MICI ou après biothérapie, uvéites de l'immunocompétent...) Nous accompagnons les cliniciens dans la prise en charge de ces patients.

Infections à HSV et VZV

- Les Drs David Boutolleau et Sonia Burrel reçoivent quotidiennement 5 à 10 appels téléphoniques ou courriels pour des questions concernant le diagnostic, la prise en charge thérapeutique ou la recherche de résistance aux antiviraux des infections par les HSV, le VZV, ou le CMV.
- Le Dr David Boutolleau participe à la RCP « Immunité et Infection », organisée tous les 15 jours sur le site de la Pitié-Salpêtrière, concernant la prise en charge des infections virales opportunistes chez les patients immunodéprimés, et à la RCP « Complications infectieuses des biothérapies en neurologie » organisée tous les mois sur le site de la Pitié-Salpêtrière,
- Le Pr S Alain et le Pr S Hantz reçoivent également régulièrement des appels pour des cas difficiles d'infection à HSV ou VZV ou des résistances. Ils les aiguillent vers les protocoles disponibles (participent à PrioH, pritélivilir Aicuris) ou les molécules en ATU. Ils font appel si nécessaire à leurs collègues du laboratoire associé.

Infections à autres Herpesvirus

- Globalement le laboratoire de Grenoble gère par année une 30aine de prestations de conseil sur l'EBV dont environ 5 à 10 sont envoyés par les coordonnateurs du CNR Herpesvirus, à Limoges. Les personnes qui nous contactent sont principalement des médecins cliniciens et des collègues biologistes. Concernant l'EBV, la prestation de conseil porte le plus souvent sur l'interprétation de résultats de tests sérologiques EBV ou sur la discussion autour de cas graves ou atypiques d'infection à EBV.
- Les conseils concernant les infections à HHV6 sont, si nécessaire, aiguillés vers Limoges ou la Pitié. Les demandes concernent le plus souvent des recherches d'ADN intégré ou des atteintes neurologiques.

RCP Nationales

- Le Pr S Alain le Dr Boutolleau et le Pr P Morand participent à une RCP nationale sur les encéphalites infectieuses au titre du CNR des Herpesvirus

Formations réalisées pour les professionnels

Laboratoire CNR coordonnateur Limoges :

- S Hantz : Webinars sur le site LabRoots : Place de la sérologie CMV dans le dépistage de l'infection congénitale à S CMV. Soutenu par Abbott Diagnostics (mai 2022)
- S Hantz: Symposium Roche à l'ECCL, Athènes (visio): Diagnostic tools for congenital CMV infection during pregnancy: systematic or targeted screening. Soutenu par Abbott Diagnostics (octobre 2022)
- S Alain « Retour d'expérience sur les cohortes en transplantation » Conférence à l'**Académie de Médecine** (sept 2022)
- S Alain et S Hantz : tournage d'un MOOC sur le CMV congénital organisé sous l'égide du CNR Necker (mise en production 2023)
- S Alain : Staff de la commission des antimicrobiens du CHU de Limoges « CMV, nouveaux antiviraux » Dec 2022
- S Alain : "Infections virales cutanéomuqueuses, diagnostic biologique, rôle du biologiste" BIOMED J , DPC , Issy les Moulineaux , Mai 2022
- S Alain : "CMV un virus résistant?" Groupe Transplantation et Infection , GTI, janvier 2022, visio conférence
- S Alain : « Charge virale TTV et greffe, quelles applications cliniques ? » Congrès Ouest Transplant Novembre 2022

- S Alain : "Apport du suivi immunologique pour le traitement des infections à CMV" Congrès MICROBES, SFM, Octobre 2022, Montpellier.
- S Alain: Paediatrics 2022 « epidemiology of CMV in day care centers". Paris,
- S Alain: ECCMID 2022 Visio conference "Use of whole blood for the detection of CMV in transplant patients" soutenu par Hologic (mai 2022)
- S Alain : SFGMTC Bordeaux: « Viremie CMV conduite à tenir » soutenu par MSD (Nov 2022)
- S Alain : SFT 2022 "Les nouvelles stratégies thérapeutiques » soutenu par Takeda (Dec 2022)
- S Alain : SFT « les cas complexes de CMV ayant reçu des HIVIG anti-CMV à travers le prisme des patients greffés rénaux » soutenu par Biotest (Dec 2022)

Laboratoire CNR associé Necker :

- WEBINAR REMIC'S: Infection congénitale à CMV. Organisé par la SFM, 20 Janvier 2022
- WEBINAR: Treatment of Congenital CMV infection. Soutenu par Roche Diagnostics. 15 avril 2022

Laboratoire CNR associé de la Pitié-Salpêtrière :

- Webinaire REMIC'S : Virus de la Varicelle et du Zona. Organisé par la SFM. 23 mars 2022

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

Le CNR participe au réseau ECCI (European Congenital CMV Initiative). Il s'agit d'un réseau d'experts travaillant sur l'infection congénitale à CMV et dont le but est d'accroître les connaissances du public et des professionnels de santé sur l'infection congénitale à CMV et de promouvoir la recherche sur cette thématique. Ce groupe est organisé en société hébergée par la European Society of Clinical Virology. Marianne Leruez-Ville fait partie du board en tant que trésorière. Le board se réunit une fois par mois. ECCI organise un meeting tous les 2 ans, le dernier meeting a été organisé en Grèce en octobre 2022. Des guidelines européennes pour la prise en charge de l'infection congénitale à CMV sont en cours de rédaction dans le cadre de ce groupe sous la coordination de Marianne Leruez-Ville.

Participation à un groupe « statut du CMV en AMP » Agence de BioMédecine 2022 (experts audités : Marianne Leruez-Ville, Sophie Alain, Sébastien Hantz)

Le CNR participe à la surveillance des nouveaux antiviraux disponibles en ATU (S Alain intervient en tant qu'expert auprès de l'ANSM pour les ATU), et à la validation des indications d'AMM des anti-CMV auprès de la HAS : S Hantz (Letermovir) et Sophie Alain (Foscarnet).

Participation au groupe de recommandations sur la prise en charge des infections à HSV et HPV au nom du CNS et de l'ANRS sous l'égide de la HAS depuis mars 2022 (expert S Hantz)

Participation (S Alain) en tant que représentante du CNR herpèsvirus au groupe de travail de microbiologie de la CHAB pour la CPAM.

Etudes commanditées par les autorités de santé : S Alain a été sollicitée pour travailler en collaboration avec le Dr T. Galperine, (CHU de Lille), sur le risque de transmission du CMV à partir des selles lors d'une transplantation fécale. La présence du CMV dans les selles de patients immunodéprimés présentant une infection active à CMV a été démontrée par PCR au laboratoire CNR. L'étude TransfeCMV a donc été mise en place pour étudier le pouvoir infectieux réel de ces virus et quantifier la charge virale fécale chez les donneurs de selles potentiels. Etude TransfeCMV (NCT02694484) 500 patients inclus. Etude prospective de séroprévalence et de la détection du CMV par PCR dans les selles des volontaires sains séropositifs remplissant les critères de don de selle après vérification de la sérologie CMV IgG et IgM. Etude mise en œuvre en collaboration avec le Dr T Galperine, infectiologue à Lille les CIC de Limoges et de Lille et la virologie de Lille) Après optimisation de la méthode de recueil des selles pour limiter la présence d'inhibiteurs, aucune PCR CMV n'a été identifiée comme positive dans les selles des volontaires séropositifs IgG ou IgM, ou en cours de primo infection. La culture CMV « sensible » par centrifugation de l'inoculum, n'a pas permis de montrer la présence de virus infectieux chez les volontaires porteurs d'IgM CMV. Rapport à l'ANSM en 2019. Présentation au congrès de la RICAI 2019 et **publication soumise dans Plos one en 2022 (accepté en avril 2023).**

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

Site internet développé et hébergé par le CNR de Limoges

- Adresse du site internet : www.unilim.fr/cnr-herpesvirus/
- Elargi en 2018 aux autres herpesvirus
- Mise à jour et diffusion des évaluations techniques et des recommandations du CNR sur le site du CNR
- Diffusion de la version publique du rapport annuel
- Lien avec d'autres sites sur le sujet notamment dans le cadre de l'infection congénitale à CMV
- Diaporamas des conférences et FMCs
- Base de données sur les mutations de résistance et les mutations de polymorphisme sur les gènes cibles des antiviraux

Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR / Rétro-information aux partenaires

- Newsletter annuelle pour le recensement des infections congénitales et pour la surveillance des infections néonatales à HSV, adressée à l'ensemble du réseau et consultable sur le site du CNR
- Nombreuses conférences invitées permettant la diffusion des données de surveillance de résistance (cf liste) et des recommandations du CNR

Communications / médias

- Réalisation d'un MOOC infection congénitale à CMV avec la participation de plusieurs membres du CNR (S Alain, J Fourgeaud, Y, T Guillemot, S Hantz, M Leruez-Ville). Les tournages ont eu lieu en 2022, le montage du MOOC est en cours.
- « Qu'est-ce que le syndrome de Ramsay-Hunt dont souffre Justin Bieber ? » (*Allô Docteurs.fr*, 13 juin 2022). D. Boutolleau D.
- « Satané bouton de fièvre ! » (*GIPHAR Magazine* #68, 2022) D. Boutolleau.

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

6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année 2022, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

Laboratoire CNR coordonnateur Limoges :

Résistance du CMV aux antiviraux et nouveaux antiviraux

Nous avons poursuivi les travaux de caractérisation des nouvelles mutations in silico et par phénotype sur virus recombinant ainsi que le développement des modèles in silico des différentes protéines-cible des antiviraux. (cf surveillance des nouvelles mutations paragraphe 3.3.1)

Cohortes ayant contribué à la surveillance pendant la mandature

OrPhaViC :

La cohorte Orphavic est clôturée depuis fin 2018 (voir rapport 2018). Les analyses complémentaires (dosages et NGS) sont terminées et l'analyse s'est poursuivie en 2022 pour déterminer :

- Le moment de la résistance en NGS
- Le rôle du sous dosage en ganciclovir et des modifications de traitement.
- L'analyse multivariée des facteurs de risque.

Rappel des principaux résultats de résistance (ici seuls les antipolymérase étaient disponibles : la prévalence des résistances n'a pas diminué avec l'avènement de la prophylaxie universelle par valganciclovir et la résistance aux inhibiteurs de polymérase en greffe de cellules souches avait été évaluée à 1,1% des patients ayant fait une infection à CMV traitée pendant la période.

	Chicago (Lurain, 2002)	French cohort 2006-2010			French cohort 2012-2016 Orphavic (NCT02067169)			Victor Study (Boivin, 2009)
		680 pts virémiques	Resistance	Non-réponse Sans Resistance	371 pts virémiques	Resistance	Non-réponse Sans Resistance	
Rein	2.2%	448	8.04 %	6.7%	162	7.4%	16.4%	3.7%
Foie	5.6%	42	7.14%	4.8%	7	14.3%	14.3%	4.3%
Coeur	5.3%	44	2.27%	13.6%	12	0	0	5%
Poumon	15.2%	18	27.8%	27.8%	3	0	0	17.6%
Total SOT	9.5%	552	8.1%	7.8%	184	7.1%	14.1%	4.7%
CSH	/	128	3.1%	10.9%	187	1.1%	20.9%	/
Global	/	680	7%	15.6%	371	4%	17.5%	/

NaViRe :

Dans la suite de l'AMM du letermovir en 2019, une nouvelle cohorte a été mise en place pour surveiller l'efficacité des nouveaux antiviraux en vie réelle en particulier le letermovir, en parallèle des inhibiteurs de polymérase, identifier les modalités d'utilisation des nouvelles molécules et situer l'apport des tests de charge virale Torquetenovirus de façon prospective. Cette cohorte, en partenariat avec la SFGMTC est répertoriée dans Clinical trial (NCT04690933). Les premières inclusions ont eu lieu en juillet 2020. Fin 2022, 371 patients inclus dans 14 centres.

BioSupport : mise en place d'une collection biologique avec cohorte de patients receveurs d'organes rein, foie dans le cadre de la FHU SUPPORT Tours Poitiers Limoges (S Alain, Investigateur Principal) ouverte à partir de juillet 2020, Fin 2022, près de 300 patients ont été inclus.

Caractérisation d'une nouvelle mutation de résistance au letermovir

Le letermovir est une molécule ciblant l'étape d'encapsidation de l'ADN viral. Son mécanisme d'action n'est pas totalement compris mais l'apparition de mutations de résistance est en faveur de l'implication des protéines pUL56, pUL89 et plus récemment de la protéine pUL51. La majeure partie des mutations de résistance sont localisées dans la protéine pUL56 et certaines d'entre elles sont retrouvées dans les souches cliniques. Suite à des expériences de sélection *in vitro* en présence de letermovir, des mutations de résistance ont émergé dans les gènes codant pUL89 et pUL51. A ce jour, une seule mutation a été décrite dans pUL51, il s'agit d'une substitution de la proline en position 91 en sérine. Par ailleurs, cette mutation n'a jamais été retrouvée dans des souches cliniques. Notre étude porte sur le suivi par séquençage de 16 patients traités par du letermovir en raison de leur non-réponse au traitement par anti-polymérase. La comparaison des substitutions du gène UL51 trouvées chez ces patients avec le polymorphisme naturel de ce gène (déterminé parallèlement par le séquençage de 56 souches naïves) nous a permis d'identifier 4 substitutions potentiellement impliquées dans la résistance au letermovir ; D12E, 17del, A95V et V113L. Des virus recombinants portant ces substitutions ont été construits pour la méthode des BAC (Bacterial Artificial Chromosome) pour évaluer leur implication sur la réplication virale et la résistance au letermovir. Après analyse phénotypique des virus recombinants, seule la substitution A95V confère une résistance au letermovir avec un EC50 de $29.246 \pm 0,788$ nM. La souche de ce patient porte également une mutation de résistance (L257I), déjà décrite, dans pUL56. Cette mutation confère un niveau de résistance intermédiaire au letermovir avec un EC50 d'environ 30 nM et semble altérer légèrement la croissance virale (Chou, 2017). Le virus recombinant portant ces deux mutations de résistance possède un EC50 de $271,39 \pm 41,05$ nM soit confère une résistance 127 fois plus importante par rapport à la souche sauvage. Récemment, le complexe terminase de l'HSV-1 a été résolu en CryoEM (Yang et al., 2020). Nous avons localisé les mutations de résistance de pUL56, pUL89 et pUL51 dans leurs homologues (pUL28, pUL15 et pUL33). Ces mutations de résistance sont situées dans une région spatiale restreinte. Il semblerait donc que le letermovir pourrait impacter cette région du complexe terminase.

Ainsi pour la première fois, nous avons émis l'hypothèse que le letermovir se fixe dans une poche catalytique similaire à celle existante dans le complexe terminase de l'HSV-1. Néanmoins, des différences d'acides aminés entre les séquences du CMV et de l'HSV-1 pourraient expliquer l'absence d'efficacité du letermovir vis-à-vis de l'HSV1.

Ce travail a fait l'objet d'une **communication orale en congrès international (Workshop CMV 2022)**, deux communications sous forme de poster (congrès internationaux) et d'un **article dans le journal Antiviral Research en 2022**.

Evaluation de marqueurs de risque d'infection à CMV

Quantic R+/TTV

Nous avons réalisé une charge virale TTV chez les patients greffés rénaux de l'étude Quantic R+ et montré qu'en association avec le Quantiféron CMV, ce marqueur pouvait aider à prédire la survenue d'une infection à CMV.

Ce travail a été présenté en poster au **CMV Workshop 2022 par Sarah Mafi, et soumis pour publication fin 2022**.

Infection congénitale à CMV

Nous avons cherché à caractériser le potentiel du Cytotect CP® (Biotest, Allemagne), immunoglobulines hyperimmune CMV, pour la prévention ou le traitement de l'infection congénitale à CMV dans notre modèle de placenta de premier trimestre, faisant suite à des résultats préliminaires réalisés *in vitro* au sein de notre unité de recherche. Ce travail nous a permis de montrer ex vivo sur des villosités placentaires de premier trimestre, que l'action de ces HIG était essentiellement de neutraliser les virions et de prévenir l'infection des tissus, avec peu d'effet sur la propagation intra tissulaire du virus.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans Microorganisms en 2022 ainsi que deux communications affichées lors de congrès internationaux à Rome en 2021 « CMV 2021 - 2nd CONGRESS ON CONGENITAL CMV » et lors du « 8th International Congenital CMV Conference & 18th International CMV Workshop » en 2022.

Cependant, l'efficacité dans notre modèle apparaissant limitée dans le temps nous avons voulu préciser la durée d'action des HIG. Nous avons donc complété ces travaux par une partie expérimentale évaluant l'efficacité du Cytotect avec et sans renouvellement de milieu à J7 pour la prévention de l'infection des villosités dans notre modèle placentaire. **Ces derniers travaux ont fait l'objet d'une communication orale lors de l'European Congenital Cytomegalovirus Initiative (ECCI), à Athènes en octobre 2022 et sont acceptés pour publication dans Antiviral Research.**

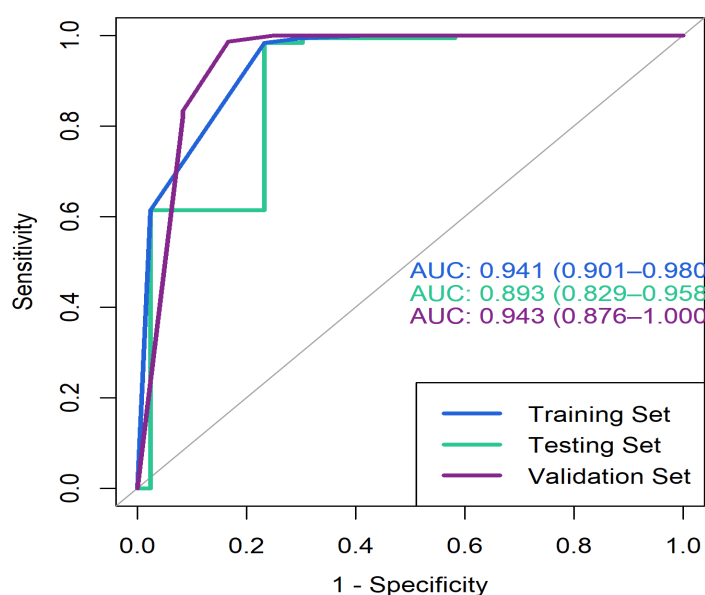
Laboratoire CNR associé Necker :

CYMEPEDIA (NCT01923636) (Investigateur principal : Dr Leruez-Ville)

L'objectif principal de l'étude est d'élaborer une classification pronostique précoce (en période néonatale) de la survenue de séquelles neuro-développementales et sensorielles à un an et à 2 ans chez des enfants infectés in utero par le CMV.

Les analyses statistiques ont été réalisées en 2022. Parmi une population de 227 enfants infectés suivis pendant au moins 2 ans, l'absence à la naissance de déficit auditif, de thrombocytopénie et d'anomalie à l'échographie transfontanillaire avait une spécificité de 98% et une aire sous la courbe de 0.89 pour prédire l'absence de toute séquelle à l'âge de 2 ans (Figure 1). Ces enfants ont un risque résiduel très faible de développer une atteinte auditive unilatérale. En fonction de ce modèle, un suivi personnalisé des enfants infectés pourrait être mis en œuvre.

Figure 1



Ces résultats ont été présentés au congrès de l'ECCI en octobre 2022 et ont été soumis pour publication à J Pediatrics en mai 2023.

Protocole de TRAITEMENT PREVENTIF DE LA TRANSMISSION VERTICALE DU CMV PAR LE VALACICLOVIR

A la suite de la publication de l'étude randomisée démontrant l'efficacité du valaciclovir en traitement préventif de la transmission fœtale en cas de primo-infection au premier trimestre de la grossesse. Notre groupe et un autre ont publié les résultats de 2 études cas/témoins analysées par score de propension et confirmants cette efficacité. L'ensemble des données brutes de ces 3 études ont été mises en commun pour réaliser une méta-analyse qui conforte les résultats d'efficacité. A la fois pour les infections survenues au 1^{er} trimestre de la grossesse mais aussi pour celles survenues en période périconceptionnelle. Les OD du traitement par valaciclovir étaient de 0.34 (95% CI 0.18-0.61) pour la population totale, 0.30 (95% CI 0.17-0.54) pour les femmes ayant fait une primo-infection datée au 1^{er} trimestre et 0.30 (95% CI 0.14-0.61) pour les femmes ayant fait une primo-infection datée en période périconceptionnelle.

Ces résultats ont été présentés au Congénital CMV Workshop en avril 2023 et soumis à publication (Chatzakis C et al, 2023).

CYMEVAL III

La responsable scientifique de ce PHRC est le Dr Marianne Leruez-Ville. Il s'agit d'un essai randomisé, en double aveugle qui inclut des mères présentant un fœtus infecté après infection maternelle du premier trimestre. Dans le bras comparateur, les mères des fœtus infectés seront traitées par 8g/j de valaciclovir, dans l'autre bras elles seront traitées par 240 mg/jour de Letermovir. Le traitement sera instauré du diagnostic de l'infection fœtale jusqu'à la naissance ou l'interruption médicale de grossesse. L'objectif principal est d'obtenir une charge virale négative par PCR CMV dans le sang du cordon ou dans le sang néonatal. Le début des inclusions est prévu pour septembre 2023.

CYME-IMMUNE

L'investigateur coordonateur de cette étude est le Dr Marianne Leruez-Ville. L'objectif de l'étude CYME-IMMUNE est d'identifier des marqueurs maternels viro-immunologiques du risque de l'infection congénitale à CMV chez les femmes séropositives avant leur grossesse.

Le protocole prévoit d'inclure 3000 patientes sur 2 ans. Les inclusions ont commencé en octobre 2022 et en mai 2023 500 patientes séropositives avaient été incluses à 12 semaines d'aménorrhée. Des prélèvements de plasma, sang total, urines et cellules mononuclées ont été recueillis. 100 de ces patientes ont accouché en mai 2023, des prélèvements de sang et d'urine ont été recueillis ainsi que les prélèvements salivaires des nouveau-nés.

LUCY

Le ganciclovir et le valganciclovir, sont les médicaments de choix pour traiter les infections et les maladies à CMV chez les patients immunodéprimés. Cependant, la toxicité hématologique de ces antiviraux et le développement d'infections résistantes peuvent en limiter l'efficacité. Ainsi, il reste intéressant de tester de nouvelles stratégies anti-CMV ayant un meilleur index thérapeutique que le (val)ganciclovir en monothérapie, c'est-à-dire permettant un contrôle plus rapide de la répllication virale, une durée plus courte du traitement antiviral, un meilleur profil de sécurité et un risque plus faible de sélection de mutations de résistance aux médicaments.

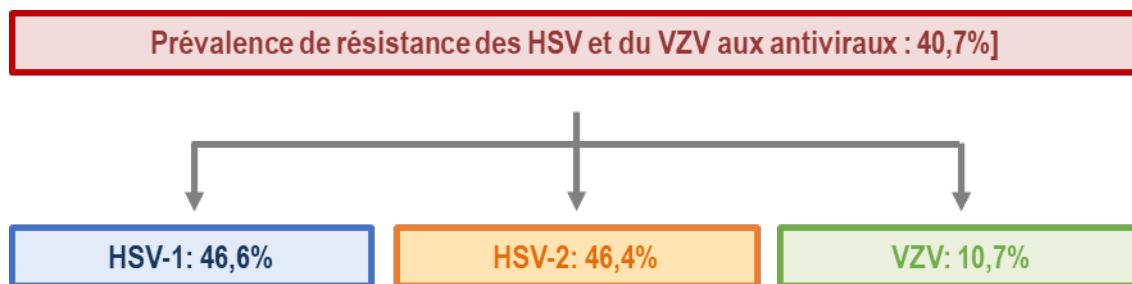
Le letermovir a récemment été mis sur le marché pour prévenir les infections à CMV chez les receveurs de greffes de cellules souches hématopoïétiques (HSCT). En culture cellulaire, le letermovir surpasse le ganciclovir de plus de 400 fois en ce qui concerne la CE50 et de plus de 2 000 fois en ce qui concerne la CE90. Son profil de sécurité chez l'homme ne soulève aucune inquiétude particulière. Dans cet essai nous souhaitons tester l'efficacité d'une bithérapie valganciclovir + letermovir chez des greffés d'organe répliquant le CMV.

L'investigateur coordonateur de cet essai clinique est le Pr Pierre France, le Dr Marianne Leruez-Ville est le responsable scientifique. L'objectif principal de l'essai LUCY est de démontrer que, par rapport au valganciclovir en monothérapie, l'association letermovir + valganciclovir administrée aux transplantés rénaux atteints d'une infection à CMV augmente la proportion de patients atteignant une réponse virologique à la semaine 3 (définie comme une diminution $\geq 2 \log_{10}$ de l'ADNémie CMV par rapport aux valeurs initiales ou une ADNémie CMV indétectable (< 200 UI/mL) à la semaine 3). Il s'agit d'un essai randomisé en double aveugle contre placebo avec un groupe de 40 patients recevant du valganciclovir + letermovir et un groupe de 40 patients témoins recevant valganciclovir+ placebo de letermovir. Le laboratoire CNR Necker est coordonnateur de l'essai et centralise les prélèvements et va réaliser les charges virales CMV et les géotypages de résistance en NGS (voir plus loin paragraphe sur le projet N+1 et N+2). Les premières inclusions sont prévues à l'automne 2023.

Laboratoire CNR associé de la Pitié-Salpêtrière :

■ Bilan de la résistance des HSV et du VZV aux antiviraux sur une période de 14 ans (2008-2021)

Sur la période 2008-2021, le CNR associé de la Pitié-Salpêtrière a effectué un test génotypique de résistance des HSV ou du VZV aux antiviraux sur 1157 prélèvements biologiques provenant de 756 patients distincts : 382 (50,5%) hommes, 374 (49,5%) femmes, âge médian 52 ans, 500 (66,1%) patients immunodéprimés. Les prélèvements biologiques étaient principalement des écouvillons anogénitaux (33,7%), cutanéomuqueux (32,8%) et cornéens (13,7%). Les patients étaient principalement traités par (val)aciclovir seul (66,9%) ou en association (20,0%). Les prévalences de la résistance aux antiviraux étaient les suivantes :



Une résistance à l'aciclovir seul a été identifiée chez 94% des patients. Le principal facteur de risque de survenue d'une résistance aux antiviraux était l'immunodépression ($P < 0,0001$), hormis chez les patients immunocompétents souffrant de kératite herpétique ou zostérienne récurrente ($P = NS$). Ces résultats ont été présentés dans des congrès nationaux et internationaux (Boutolleau D, congrès SFM Microbes, 2022 ; Boutolleau D, ESCV, 2023).

■ Surveillance de la résistance des HSV aux nouveaux antiviraux : pritélivir et aménamévir

Le pritélivir (PTV) et l'aménamévir (AMNV) sont 2 nouveaux antiviraux qui inhibent le complexe hélicase-primase (HP) des HSV. L'AMNV (AMENALIEF®) est disponible en accès compassionnel et le PTV est actuellement évalué dans l'essai clinique international de phase 3 PRIOH-1. Le CNR associé de la Pitié-Salpêtrière dispose depuis plusieurs années de la technique de séquençage des gènes codant le complexe HP (UL5/UL52) des HSV-1 et HSV-2 (Collot et al., *Antiviral Res*, 2016). Ainsi, nous pouvons surveiller l'émergence de la résistance des HSV au PTV ou à l'AMNV chez les patients qui reçoivent d'ores et déjà ces traitements. En 2023, nous avons effectué cette recherche chez 4 patients distincts souffrant de lésions génitales herpétiques à HSV-2 récurrentes et résistantes à l'aciclovir. Aucune mutation de résistance n'a été détectée (Serris et al., *J Antimicrob Chemother*, 2022).

■ Pneumopathie herpétique

Nous avons poursuivi nos études sur l'infection pulmonaire par le HSV-1 des patients intubés/ventilés en réanimation, en collaboration avec le Pr CE Luyt (Pitié-Salpêtrière). Les résultats du PHRC national PTH « Intérêt du traitement préemptif par ganciclovir ou par aciclovir chez les patients nécessitant une ventilation mécanique prolongée et ayant soit une réplique sanguine à cytomégalovirus soit une réplique oropharyngée à herpès simplex virus : Etude prospective, multicentrique, randomisée en double aveugle » (Investigateur principal : Pr L. Papazian) avaient montré que le traitement préemptif par aciclovir intraveineux ne permettait pas globalement d'améliorer l'évolution clinique des patients présentant une réactivation oropharyngée du HSV-1 (Luyt et al., *JAMA Intern Med*, 2019). Toutefois, nous avons clairement montré que ce traitement antiviral préemptif permettait bien de réduire significativement la charge virale HSV-1 dans le LBA ainsi que la survenue de bronchopneumopathies herpétiques chez ces patients (Troger et al., *Antivir Ther*, 2022). Néanmoins, chez les patients les moins gravement atteints (une seule défaillance d'organe au maximum), le traitement préemptif par aciclovir permettait d'améliorer l'évolution clinique des patients traités par aciclovir (par rapport aux patients recevant le placebo), mais la différence n'était pas significative. Au vu de ces résultats, un 2^e PHRC baptisé PTH2 va débuter fin 2023 (cf *infra*). Par ailleurs, nous avons étudié la réactivation du HSV-1 et du CMV chez les patients atteints d'un COVID grave et hospitalisés en réanimation. Nous avons montré que ces herpèsvirus se réactivaient fréquemment en cas de COVID grave et que cette fréquence était comparable à celle observée chez les patients atteints de grippe grave (Luyt et al., *Ann Intensive Care* 2022).

■ Synthèse intrathécale et intraoculaire (SIT/SIO) des anticorps antiviraux.

Le groupe de travail SIT/SOT constitué de 12 laboratoires a pour but d'harmoniser au niveau national les techniques de dosage des différents paramètres (IgG spécifiques, IgG totales, albumine), les méthodes de calcul de l'index anticorps et l'interprétation des résultats. Il s'agira par la suite de proposer des recommandations et un protocole au niveau national. Le groupe de travail s'est réuni deux fois (visioconférences).

■ Etude RetroAlpha 14-18 : étude des infections neuroméningées par les alphaherpèsvirus (HSV-1, HSV-2, VZV) en France au cours de la période 2014-2018

La 1^{re} partie de cette étude avait permis :

- (i) d'estimer les incidences des infections neuroméningées dues aux alphaherpèsvirus sur cette période : 3,7, 2,5 et 5,4 cas/million d'habitants/an pour HSV-1, HSV-2 et VZV, respectivement.

- (ii) de décrire les caractéristiques démographiques, cliniques, biologiques et thérapeutiques des 3125 patients adolescents et adultes avec un résultat de PCR positif dans le LCS : 1573 femmes (50,3%), 1552 hommes (49,7%), âge médian 57 ans (IQR : 35,9-73,2).
Les résultats ont été présentés au cours de congrès nationaux (RICAI, SFM) et internationaux (ECCMID)

En 2022, la 2^e partie de cette étude s'est poursuivie avec les analyses transcriptomiques et métatranscriptomiques d'environ 300 reliquats de prélèvements de LCS positifs en **HSV-1**, **HSV-2** ou **VZV**, prélevés dans le cadre du soin médical, en collaboration avec le Pr Christophe RODRIGUEZ (Hôpital Henri Mondor). Les premiers résultats de l'analyse ontologique montrent que ce sont les voies de l'immunité et de l'inflammation de l'hôte qui sont le plus impactées en réponse à l'infection du SNC par un alphaherpèsvirus, en particulier la voie de présentation de l'antigène. Toutefois, il semble y avoir des différences notables entre les pathologies virales : encéphalite *versus* méningite. Par ailleurs, les analyses métatranscriptomiques virales indiquent que l'expression globale des HSV-1 et du VZV dans les LCS des patients avec atteinte du SNC est plus importante que celle du HSV-2. Ces premiers résultats ont été présentés aux JN1 2023 (Grenoble) et à l'ESCV 2023 (Milan).

■ **Phylogénie des HSV**

Nous avons précédemment revisité, en collaboration avec S. Calvignac-Spencer et F. Leendertz (Institut Robert Koch, Berlin) la phylogénie des Simplexvirus : les souches humaines de HSV-2 actuelles réparties dans l'ensemble du monde (lignage mondial) résultent de plusieurs événements successifs de recombinaison entre, d'une part, les souches de HSV-2 ancestrales (lignage africain qui a pour origine l'herpèsvirus du chimpanzé ChHV), et, d'autre part, les souches humaines de HSV-1 (Burrell et al., *Mol Biol Evol*, 2017). L'étude de l'origine spatiotemporelle de ce virus de lignage africain s'est poursuivie en collaboration avec l'équipe de J. Wertheim (Université de Californie San Diego, EU) à l'aide de méthodes de datation moléculaire. La sortie d'Afrique de ce virus originel n'aurait eu lieu ni lors des premières migrations de l'Humanité à partir de la corne africaine, ni à l'époque du commerce d'esclaves à partir de l'Afrique de l'Ouest, mais plus récemment à partir de l'Afrique de l'Est (Havens et al., *Nat Comm*, 2022). Par ailleurs, l'analyse des profils transcriptomiques *in vitro* de ces 2 lignages de HSV-2 a permis de mettre en évidence la surexpression des protéines du complexe de réplication virale UL29 et UL30 par le HSV-2 de lignage mondial, ce qui pourrait en partie expliquer la large diffusion de ce virus par rapport à celui de lignage africain (Boizeau et al., *JFV*, 2022).

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

Publications internationales :

Avery RK, Alain S, Alexander BD, Blumberg EA, Chemaly RF, Cordonnier C, Duarte RF, Florescu DF, Kamar N, Kumar D, Maertens J, Marty FM, Papanicolaou GA, Silveira FP, Witzke O, Wu J, Sundberg AK, Fournier M; SOLSTICE Trial Investigators. Maribavir for Refractory Cytomegalovirus Infections With or Without Resistance Post-Transplant: Results From a Phase 3 Randomized Clinical Trial. *Clin Infect Dis*. 2022 Sep 10;75(4):690-701. doi: 10.1093/cid/ciab988. Erratum in: *Clin Infect Dis*. 2023 Feb 8;76(3):560. PMID: 34864943; PMCID: PMC9464078.

Santos Bravo M, Plault N, Sánchez-Palomino S, Rodríguez C, Navarro Gabriel M, Mosquera MM, Fernández Avilés F, Suarez-Lledó M, Rovira M, Bodro M, Moreno A, Linares L, Cofan F, Berengua C, Esteva C, Cordero E, Martín-Davila P, Aranzamendi M, Pérez Jiménez AB, Vidal E, Fernández Sabé N, Len O, Hantz S, Alain S, Marcos MÁ; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI) and the Group for the Study of Infection in Transplantation (GESITRA). Genotypic and Phenotypic Study of Antiviral Resistance Mutations in Refractory Cytomegalovirus Infection. *J Infect Dis*. 2022 Nov 1;226(9):1528-1536. doi:10.1093/infdis/jiac349. PMID: 35993155.

Kotton CN, Torre-Cisneros J; International CMV Symposium Faculty; Aguado JM, Alain S, Baldanti F, Baumann G, Boeken U, de la Calle M, Carbone J, Ciceri F, Comoli P, Couzi L, Danziger-Isakov L, Fernández-Ruiz M, Girmenia C, Grossi PA, Hirsch HH, Humar A, Kamar N, Kotton C, Ljungman P, Malagola M, Mira E, Mueller N, Sester M, Teng CJ, Torre-Cisneros J, Ussetti P, Westall G, Wolf D, Zamora M. Cytomegalovirus in the transplant setting: Where are we now and what happens next? A report from the International CMV Symposium 2021. *Transpl Infect Dis*. 2022 Dec;24(6):e13977. doi: 10.1111/tid.13977. Epub 2022 Nov 11. PMID: 36271650; PMCID: PMC10078482.

Cristescu CV, Alain S, Ruță SM. The Role of CMV Infection in Primary Lesions, Development and Clinical Expression of Atherosclerosis. *J Clin Med*. 2022 Jul 1;11(13):3832. doi: 10.3390/jcm11133832. PMID: 35807114; PMCID: PMC9267753.

Paccoud O, Alain S, Gozlan J, Jarboui S, Boutolleau D, Hantz S, Battipaglia G, Paviglianiti A, Duléry R, Malard F, Médiavilla C, Sestili S, Gaugler B, Meynard JL, Pacanowski J, Mohty M, Brissot E. Immune restoration therapy for multidrug-resistant CMV disease in an allogenic stem cell transplant recipient. *Curr Res Transl Med*. 2022 May;70(2):103329. doi: 10.1016/j.retram.2021.103329. Epub 2022 Jan 10. PMID: 35021130.

Santos Bravo M, Tilloy V, Plault N, Palomino SS, Mosquera MM, Navarro Gabriel M, Fernández Avilés F, Suárez Lledó M, Rovira M, Moreno A, Linares L, Bodro M, Hantz S, Alain S, Marcos MÁ. Assessment of UL56 Mutations before Letemovir Therapy in Refractory Cytomegalovirus Transplant Recipients. *Microbiol Spectr*. 2022 Apr 27;10(2):e0019122. doi: 10.1128/spectrum.00191-22. Epub 2022 Mar 28. PMID: 35343771; PMCID: PMC9045154.

Coste Mazeau P, Jacquet C, Muller C, Courant M, El Hamel C, Chianea T, Hantz S, Alain S. Potential of Anti-CMV Immunoglobulin Cytotect CP® In Vitro and Ex Vivo in a First Trimester Placenta Model. *Microorganisms*. 2022 Mar 23;10(4):694. doi: 10.3390/microorganisms10040694. PMID: 35456746; PMCID: PMC9030298.

Muller C, Tilloy V, Frobert E, Feghoul L, Garrigue I, Lepiller Q, Mirand A, Sidorov E, Hantz S, Alain S. First clinical description of letemovir resistance mutation in cytomegalovirus UL51 gene and potential impact on the terminase complex structure. *Antiviral Res*. 2022 Aug;204:105361. doi: 10.1016/j.antiviral.2022.105361. Epub 2022 Jun 9. PMID: 35690130.

Beauvais D, Robin C, Thiebaut A, Alain S, Coiteux V, Ducastelle-Lepretre S, Marçais A, Ceballos P, Xhaard A, Redjoul R, Nguyen S, Brissot E, Joris M, Turlure P, Rubio MT, Chevallier P, Bénard N, Liautard C, Yakoub-Agha I. Effective Letemovir Prophylaxis of CMV infection post allogeneic hematopoietic cell transplantation: Results from the French temporary authorization of use compassionate program. *J Clin Virol*. 2022 Mar;148:105106. doi: 10.1016/j.jcv.2022.105106. Epub 2022 Feb 15. PMID: 35182958.

Seror V, Leruez-Ville M, Özek A, Ville Y. Leaning towards Cytomegalovirus serological screening in pregnancy to prevent congenital infection: a cost-effectiveness perspective. *BJOG* 2022 Jan;129(2):301-312.

Bourgon N, Fitzgerald W, Aschard H, Magny JF, Guilleminot T, Stirnemann J, Romero R, Ville Y, Leonid Margolis, Leruez-Ville M. Cytokine profiling in amniotic fluid from congenital infection. *Viruses*, 2022

J Fourgeaud, C Boithias ; E Walter; E Kermorvant; S Couderc, S Parat, C Pol ; C Mousset ; L Bussi  res ; T Guilleminot ; Y Ville; L Nkam ; L Grimaldi ; M Parodi, M Leruez-Ville. Performance of targeted congenital cytomegalovirus screening in newborns failing universal hearing screening: a multicenter study. *Ped Infect Dis J* 2022.

Rousseau A, Burrel S, Gueudry J, Deback C, Haigh O, Bordereau S, Mouriaux F, Labalette P, Bazard MC, Gabison E, Bourcier T, Schweitzer C, Boutolleau D, Labetoulle M. Acyclovir-resistant HSV-1 keratitis: a concerning and emerging clinical challenge. *Am J Ophthalmol* 2022 ; 238 : 110-119.

Serris A, Pouvaret A, Loiseau C, Abid H, Burrel S, Fourgeaud J, Rouzaud C, Lanternier F, Boutolleau D, Frange P. Pritelivir for recurrent acyclovir-resistant herpes simplex virus 2 infections in immunocompromised patients. *J Antimicrob Chemother* 2022 ; 77 : 2303-2305

Khellaf L, Bouscarat F, Burrel S, Fidouh N, Hachon L, Bicaud M, Lariven S, Boutolleau D, Joly V, Ghosn J, Le Pluart D, Thy M. Novel mutations in antiviral multiresistant HSV-2 genital lesion: A case report. *J Med Virol* 2022 ; 94 : 6122-6126.

Havens JL, Calvignac-Spencer S, Merkel K, Burrel S, Boutolleau D, Wertheim JO. Phylogeographic analysis reveals an ancient East African origin of human herpes simplexvirus 2 dispersal out-of-Africa. *Nat Comm* 2022 ; 13 : 5477.

Luyt CE, Burrel S, Mokrani D, Pineton de Chambrun M, Luyt D, Chommeloux J, Guiraud V, Br  chet N, Schmidt M, H  kimian G, Combes A, Boutolleau D. Herpesviridae lung reactivation and infection in patients with severe COVID-19 or influenza virus pneumonia: a comparative study. *Ann Intensive Care* 2022 ; 12 : 87

Troger A, Burrel S, Pineton de Chambrun M, Schmidt M, Bréchet N, Bomme O, Hékimian G, Combes A, Boutolleau D, Luyt CE. Preemptive acyclovir to prevent HSV bronchopneumonitis in mechanically ventilated patients with HSV oropharyngeal reactivation: an ancillary study of the PTH trial. *Antivir Ther* 2022 ; 27 : 1-4.

Publications nationales

Leruez-Ville M, Ville Y. L'infection à cytomégalovirus chez la femme enceinte : état des lieux et nouveautés. *Revue du praticien*. 2023

Burrel S, Boutolleau D. Actualisation des connaissances sur les virus herpes simplex. *Revue de Biologie Médicale* 2022 ; 367 : 1-19.

Boutolleau D, Burrel S, Rozenberg F. Virus herpes simplex. In REMIC, 7^e édition, Société Française de Microbiologie (Ed) ; 2022 : 735-740.

Boutolleau D, Burrel S, Deback C. Virus varicelle-zona. In REMIC, 7^e édition, Société Française de Microbiologie (Ed) ; 2022 : 741-744.

Communications internationales

Mafi S, Garnier F, Hantz S, Alain S. QuantiFERON®-CMV assay and TTV viremia in prediction of cytomegalovirus reactivation in R+ kidney transplant recipients. 8th International Congenital CMV Conference & 18th International CMV Workshop, mars 2022

Coste Mazeau P, Ribot E, Alain S, Hantz S. Implementation of a systematic screening for CMV infection during pregnancy in a French level 3 maternity hospital. 8th International Congenital CMV Conference & 18th International CMV Workshop, mars 2022

Muller C, Tilloy V, Frobert E, Feghoul L, Garrigue I, Lepiller Q, Mirand A, Sidorov E, Hantz S, Alain S. First clinical description of letermovir resistance mutation in cytomegalovirus UL51 gene and potential impact on the terminase complex structure. 8th International Congenital CMV Conference & 18th International CMV Workshop, mars 2022

Ribot E, Coste-Mazeau P, Hantz S, Alain S. Congenital CMV infection in France: the burden of severe cases in the absence of systematic screening. Data from the French "congenital CMV declaration platform" of the national reference center for herpesviruses. ECCI, Athenes 2022

Muller C., Ligat G., Alain S., Hantz S. (avril 2022). pUL52: a new potential therapeutic target of human cytomegalovirus DNA-packaging. 32st European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (ECCMID). Lisbonne, Portugal. Poster N°P0052

Muller C, Tilloy V, Sidorov E, Feghoul L, Frobert E, Garrigue I, Lepiller Q, Mirand A, Feuillet-Soummer S, Dekeyser M, Hantz S, Alain S. (mars 2022). First description of letermovir resistance mutation in UL51 gene from a HSCT-patient and study of its impact on the terminase complex structure. 8th international Congenital CMV Conference & 18th International CMV workshop. Oral communication O.36.

S. Alain, M. Gomez-Mayeras, N Plaut, MC Mazeron, D. Boutolleau, S. Burrel, J. Le Goff, C. Bressolette, M. Lafarge, E Barouillet, F. Garnier-Geoffroy, S. Hantz. Surveillance of CMV resistance to antivirals in France 14 years survey and focus on new antivirals. 8th international Congenital CMV Conference & 18th International CMV workshop. Oral communication.

S Alain, Diana Florescu, Deepali Kumar, Jingyang Wu, Martha Fournier. Time to First Cytomegalovirus Viremia Clearance in Transplant Recipients With Refractory Cytomegalovirus Infection With or Without Resistance Receiving Maribavir Versus Investigator-Assigned Therapy: Subgroup Analyses of a Phase 3 Trial. 32st European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (ECCMID). Lisbonne, Portugal. Oral communication.

Prognostic value of neonatal clinical, radiological and biological markers for the development of neurosensory sequelae in children infected by cytomegalovirus (CMV) in utero (CYMEPEDIA). M Leruez-Ville. ECCI Athens 20-21 October 2022.

Expert system for the detection of cytomegalovirus primary infection in pregnancy using serological markers. A Grimal, A Boudir, J Fourgeaud, T Guillemot, A Dejean, S Arneton, S Martinez, Y Ville, M Leruez-Ville. ECCI Athens 20-21 October 2022.

Boutolleau D, Gricourt G, N'Debi Melissa, Demontant V, Rodriguez C, Burrel S. Comparaison of viral and host transcriptomic profiles in patients with genital infections caused by herpes simplex viruses 1 and 2. 32nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Lisbonne, Portugal. 23 - 26 avril 2022.

Boutolleau D, Burrel S. Surveillance of herpes simplex virus and varicella-zoster virus resistance to antivirals over a 14-year-old period. 24th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (ESCV). Manchester, Royaume-Uni. 7 - 10 septembre 2022.

Alain S, Gomez-Mayeras M, Boutolleau D, Burrel S, LeGoff J, Bressollette-Bodin C, Lafarge M, Garnier-Geoffroy F, Hantz S. CMV resistance to antiviral is still an unmet need: results from the French national surveillance 2008-2020. 32nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Lisbonne, Portugal. 23 - 26 avril 2022.

Sakhi S, Burrel S, Le M, Souchet L, Bomme O, Peytavin G, Uzunov M, Nguyen Quoc S, Boutolleau D. Cytomegalovirus breakthrough events and emergence of cytomegalovirus resistance in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients undergoing letermovir prophylaxis. 24th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (ESCV). Manchester, Royaume-Uni. 7 - 10 septembre 2022.

Communications nationales

Haboub M, Clot A, Fiammetti J, Devilleger C, Lefevre P, Alain S, Hantz S. Comparaison des trousse de détection des anticorps HSV-1 et HSV-2 Abbott® et DiaSorin®. Congrès SFM septembre 2022

Hantz S, Haboub M, Alain S. Evaluation d'un dosage automatisé des synthèses intrathécales anti-HSV et VZV. RICAI 2022

Boutolleau D, Bomme O, Pertrizeard O, Mousnier F, Charpiot M, Conan F, Hourcq I, Burrel S. Surveillance de la résistance des virus herpes simplex et du virus de la varicelle et du zona aux antiviraux en France. 23^{es} Journées Nationales d'Infectiologie (JNI). Bordeaux, France. 15 - 17 juin 2022.

Boutolleau D, Burrel S. Surveillance de la résistance des virus herpes simplex et du virus de la varicelle et du zona aux antiviraux sur une période de 14 ans. 17^e Congrès National de la Société Française de Microbiologie (SFM). Montpellier, France. 3 - 5 octobre 2022.

Boutolleau D, Gricourt G, N'Debi Melissa, Demontant V, Rodriguez C, Burrel S. Comparaison des profils transcriptomiques hôte/virus au cours des infections génitales par les virus herpes simplex 1 et 2. 24^{es} Journées Francophones de Virologie (JFV). Strasbourg, France. 10 - 11 avril 2022.

Boizeau L, Calvignac S, Rodriguez C, Boutolleau D, Burrel S. Comparaison des profils transcriptomiques du lignage africain et du lignage mondial du virus herpes simplex 2. 24^{es} Journées Francophones de Virologie (JFV). Strasbourg, France. 10 - 11 avril 2022.

Burrel S, Bomme O, Pertrizeard O, Mousnier F, Charpiot M, Conan F, Hourcq I, Boutolleau D. Evolution de la résistance des virus herpes simplex aux antiviraux entre 2008 et 2021 en France. 23^{es} Journées Nationales d'Infectiologie (JNI). Bordeaux, France. 15 - 17 juin 2022.

Boutolleau D, Bomme O, Pertrizeard O, Mousnier F, Charpiot M, Conan F, Hourcq I, Burrel S. Bilan de la surveillance de la résistance du virus de la varicelle et du zona aux antiviraux en France. 23^{es} Journées Nationales d'Infectiologie (JNI). Bordeaux, France. 15 - 17 juin 2022.

Tamzali Y, Pourcher V, Varnous S, Coutance G, Rondeau E, Barrou B, Conti F, Gay F, Tourret J, Boutolleau D. Infection à CMV réfractaire ou résistante aux antiviraux en transplantation d'organe solide : une étude de cohorte rétrospective. 21^{es} Journées Nationales d'Infectiologie (JNI). Bordeaux, France. 15 - 17 juin 2022.

Conférences sur invitations

Laboratoire CNR coordonnateur Limoges :

Académie de Médecine, "Retour d'expérience sur les cohortes en transplantation" septembre 2022

"CMV un virus résistant?" Groupe Transplantation et Infection, GTI, janvier 2022

"Les cas complexes de CMV ayant reçu des HIVIG anti-CMV à travers le prisme des patients " Société Francophone de Transplantation SFT , Décembre 2022, Lyon

"résistance du CMV aux antiviraux, prise en charge", Société Francophone de Transplantation, SFT, Décembre 2022, Lyon

"Virémie CMV conduite à tenir" Société Francophone de Greffe de Moelle et Thérapie Cellulaire SFGMTC, Novembre 2022, Bordeaux

"Les boulettes, en virologie"40e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Paris, France. décembre 2022 (FMC)

Charge virale TTV et greffe, quelles applications cliniques ? Congrès Ouest Transplant Novembre 2022, Angoulême
"Apport du suivi immunologique pour le traitement des infections à CMV" Congrès MICROBES, SFM, Octobre 2022, Montpellier.

"Infections virales cutanéomuqueuses, diagnostic biologique, rôle du biologiste" BIOMED J , DPC , Issy les Moulineaux , Mai 2022 (FMC)

Laboratoire CNR associé Necker

Epidemiology of congenital CMV infection. M Leruez-Ville, ECCMID. Lisbonne 23-26 April 2022

PCR technique for fetal infections / fetal treatment. M Leruez-Ville. FETAL MEDICINE COURSE - STAGE 4 16, 17 August 2022. Phu San Hanoi Hospital

Interpretation of maternal serology. M Leruez-Ville. FETAL MEDICINE COURSE - STAGE 4 16, 17 August 2022. Phu San Hanoi Hospital.

La place du dépistage sérologique CMV systématique en France. M Leruez-Ville. Collège de Gynécologie Médicale du sud-est, Saint Jean Cap Ferrat, 10 septembre 2022

Antiviral treatment in pregnancy. M Leruez-Ville. ECCI, Athens, 20-21 October 2022

Laboratoire CNR associé de la Pitié-Salpêtrière :

Boutolleau D. Méningoencéphalites virales : tour d'horizon. BIOMED-J 2022. Issy-les Moulineaux, France. 19 mai 2022.

Boutolleau D. Infections respiratoires et HSV. 25^e Journée de Microbiologie Clinique du Collège de Bactériologie Virologie Hygiène des Hôpitaux (Col. BVH). Paris, France. 10 juin 2022

Formations dans d'autres Universités /hopitaux et services :

COMAI du CHU de Limoges, "CMV, nouveaux antiviraux", Décembre 2022, S Alain

Manuscrit soumis

Fourgeaud J, Magny JF, Couderc S, Garcia P, Maillotte AM, Benard M, Pinquier D, Minodier P, Astruc D, Patural H, Ugolin M, Parat S, Guillois B, Garenne A, Guilleminot T, Parodi M, Bussières L, Ville Y, Leruez-Ville M. soumis J Pediatric

Chatzakis C, Shahar-Nissan K, Faure-Bardon V, Picone O, Hadar E, Amir J, Egglof C, Vivanti A, Sotiriadis A, Leruez-Ville M, Ville Y. The effect of valacyclovir on secondary prevention of congenital cytomegalovirus infection following primary maternal infection acquired periconceptionally or in the first trimester of pregnancy. An individual patient data meta-analysis. Soumis AJOG

Chapitres d'ouvrages :

-IN REMIC Referentiel en microbiologie médicale (Société Française de Microbiologie) chap 75 Cytomegalovirus S Alain et C Vauloup-Fellous.

Logiciels :

-AspiCoV (Tilloy et al., Plos one 2022)

-Base de données Résistance du CMV aux antiviraux : [cnr-herpesvirus.fr/CMV/expertise/base de données résistance](http://cnr-herpesvirus.fr/CMV/expertise/base%20de%20donn es%20r sistance)

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

Non concernés

8. Programme d'activité pour les années suivantes

Laboratoire CNR coordonnateur Limoges :

Développement technologique envisagé

- Développement d'un test de sérologie discriminative sur puce pour distinguer les réinfections et les réactivations. A ce jour, la moitié des nouveaux nés infectés en France sont nés de mères séropositives avant la grossesse (cf cohortes du LA Necker) et il devient indispensable de pouvoir bénéficier d'un test performant pour établir ce diagnostic
- Développement avec le laboratoire de pharmacologie du CHU de Limoges du dosage du maribavir afin de pouvoir accompagner au mieux la mise en œuvre de ces nouveaux traitements chez les patients.
- Dans un contexte très favorable, où nous avons un accès facile et rapide à la plate forme de séquence du Laboratoire de Biologie du CHU de Limoges, nous souhaitons poursuivre le développement des méthodes de génotypage vers du NGS à débit rapide, en optimisant nos techniques de PCR, pour augmenter leur sensibilité en conservant une haute fiabilité. L'objectif est à terme de développer une plate-forme nationale référente de NGS pour le génotypage du CMV, grâce au plateau technique dont nous disposons (Next seq Mi Seq et Proton) pour diminuer sensiblement les coûts du séquençage (5 genes soit plus de 10kb à séquencer pour chaque prélèvement si l'on veut détecter toutes les mutations) optimiser les coûts en réactifs et donc pouvoir conserver une réponse en temps réel (3 à 5 jours) vers les cliniciens qui suivent ces patients fragiles. Nous pourrions également accompagner les autres centres et organiser des évaluations interlaboratoires. Sur cette plate-forme nous développerons également le génotypage HSV et VZV en NGS pour harmoniser nos pratiques avec nos collègues de la Pitié-Salpêtrière.
- Compléter l'offre d'évaluation immune des patients par l'adaptation au CNR du test ELISPOT CMV dont les performances en termes de prédiction d'infection à CMV sont plutôt meilleures en allogreffe de cellules souches. Cette technique est encore peu développée et de nombreux centres n'y ayant pas accès, nous la mettrons en place, le temps nécessaire pour aider les services à acquérir l'expertise et à la développer eux mêmes, comme nous le faisons pour le test Quantiféron CMV

Travaux de recherche envisagés

Le Laboratoire de Limoges poursuivra ses travaux de recherche in vitro ex vivo et in vivo sur les modèles d'infection congénitale à CMV, avec notamment, sur les mécanismes d'action des antiviraux et des anticorps dans le placenta et sur le fitness et la physiopathologie des souches d'infection congénitale responsables ou non de symptomatologie.

Projets sur la résistance du CMV aux antiviraux et les nouveaux antiviraux :

- Évaluation d'un **nouvel inhibiteur de l'ADN polymérase du CMV** administré sous forme de prodrogue et ayant montré une bonne efficacité et une faible toxicité dans les modèles placentaires d'histoculture du CNR. Sa barrière génétique et son mécanisme d'action précis seront évalués ainsi que son index thérapeutique en modèle in vivo. Ce travail est mené en collaboration avec l'équipe ICOA de l'IRCER à l'Université d'Orléans et a obtenu un **financement ANR en 2023**
- **Analyse fine du mécanisme d'action du letermovir et du maribavir** et notamment les conséquences d'une suspension thérapeutique ou d'une confrontation à une très forte charge virale L'efficacité de ces molécules a déjà été démontrée dans notre modèle, mais sa faible barrière génétique peut faire craindre une émergence rapide de résistance en présence d'une forte charge virale fœtale.
- Poursuite des travaux de caractérisation des nouvelles mutations in silico et par phénotype sur virus recombinant et le développement des modèles in silico des différentes protéines-cible des antiviraux.

Projets sur l'infection congénitale à CMV :

- Mise en œuvre de l'analyse transcriptomique à l'échelon cellulaire (single cell) dans nos modèles d'histoculture (voir projets de recherche)
- Poursuite de nos travaux sur l'épidémiologie moléculaire des cibles vacinales du CMV en population générale, en vue de l'arrivée prochaine et espérée d'un vaccin ARN. En particulier nous entreprendrons le séquençage des souches isolées de la saive des enfants de l'étude CrechMV, conservées dans cet objectif.

Projet sur la réactivation du CMV chez le greffé rénal

Nous participons au **projet européen** Horus coordonné par le Dr Hannah KAMINSKI qui commence en 2023 avec pour objectif de définir les facteurs conduisant à la réactivation du CMV dans le greffon rénal et d'analyser les facteurs virologiques associés aux infections persistantes à CMV par séquençage du génome entier, à adapter à de faibles charges virales.

Réseau de partenaires et collaborations à constituer ou renforcer

Surveillance de la résistance aux antiviraux

Le réseau doit donc évoluer dans sa forme et dans le recueil de données. Plusieurs laboratoires nous ont déjà sollicités. La base de données résistance est une base interrogative (recherche de mutations) et base déclarative pour signaler des mutations. Elle va évoluer pour intégrer des séquences au format Fasta ou au format NGS consensus. Ce format est celui utilisé pour verser les séquences dans la banque nationale pour le SARS-Cov 2 et permettra au laboratoire CNR de jouer son rôle de laboratoire centralisateur dans la surveillance des résistances.

Le projet Aspi CMV, faisant suite à AspiCov permet l'analyse en temps réel des séquences envoyées sur le site du CNR pour les laboratoires en exprimant le besoin, mais aussi leur intégration dans la GenBank mentionnant la propriété du laboratoire et leur indexation dans la base de séquences du CNR. Ceci augmente déjà la charge de travail du bioinformaticien du CNR et des biologistes.

Retour trimestriel vers les centres pour limiter la perte de données (ce qui augmente le travail des ARCs CNR).

Infection maternofoetale à CMV

L'augmentation attendue du dépistage CMV chez la femme enceinte mais aussi chez les nouveaux nés (cf HCERES 2018 implémentant le dépistage devant tout déficit auditif même unilatéral et conséquence de l'augmentation du dépistage maternel), bien qu'accompagnée par le CNR, justifiera très rapidement une évaluation, des pratiques mais aussi des résultats en nombre de cas et d'enfants ou de mères traitées, ainsi que le suivi des enfants traités en vie réelle. La base déclarative du CNR qui recueille les données de la mère et de l'enfant est donc un outil essentiel pour la surveillance de ces évolutions (voir bilan). L'objectif est d'atteindre une représentativité encore plus large en intégrant quelques grands centres qui ne nous déclarent pas encore leurs infections et en facilitant le recueil des consentements. Le réseau CMV congénital est en expansion, et devrait poursuivre l'intégration de nouveaux praticiens, augmenter la contribution de centres qui dépistent déjà, avec une aide à l'entrée des données dans la base par les ARCs du Laboratoire CNR. Pour ce faire une demande d'autorisation d'accès aux données patients par mise en place de conventions avec les CHU partenaires est envisagée.

La base de données CMV congénital est totalement protégée et anonymisée et peut donc être accessible pour les déclarations d'autres pays d'Europe.

Travaux d'évaluations de techniques envisagés

- ✓ Evaluation des plate-formes de séquençage MGI versus Illumina et Nanopore Minlon pour le génotypage CMV et le séquençage de longs fragments. (Sur Bacmides (sensibilité/spécificité) et sur échantillons (2023-2024) dans le cadre d'un marché national UniHA.
- ✓ Evaluation de l'automate ELITe BeGenius™ d'ELITech pour l'extraction et la quantification de l'ADN viral du CMV sur sang total et carte de Guthrie.

Laboratoire CNR associé Necker :

Développements technologique envisagés (Necker)

-Outils sérologiques

- Poursuite de l'expertise sur l'avidité des IgG Abbott commencée en 2022. L'objectif est de quantifier l'importance du problème identifié avec ce test (2 résultats d'avidité élevée dans des cas de primo-infection de moins de 60 jours). Les tests vont être réalisés de façon rétrospective sur un plus grand nombre de sérums issus de femmes enceintes ayant eu une primo-infection précisément datée. Par ailleurs, nous souhaitons utiliser ce test de façon prospective pendant un an en testant si le volume le permet tous les échantillons parvenant au laboratoire pour expertise sérologique.
- Poursuite de la validation prospective du système expert d'interprétation des sérologies : sur les résultats obtenus au laboratoire et sur les résultats obtenus dans un autre laboratoire expert qui utilise aussi le test d'avidité Vidas (Dr Vauloup-Fellous, Hôpital Paul Brousse).

-Développement d'une technique de séquençage à haut débit des gènes de résistance du CMV aux antiviraux

Nous avons commencé sous la responsabilité du Dr Jacques Fourgeaud en mai 2023, la mise au point d'une technique de génotypage du CMV grâce à un panel de sondes « à façon » (basé sur la souche de CMV Towne FJ616285.1) et à la technologie Ampliseq® d'Illumina qui permettra le séquençage complet des gènes UL 27 – UL 51 – UL 52 - UL 54 - UL 56 - UL 89 - UL 97 – UL 104 sur notre appareil MiniSeq (Illumina). Ce séquençage va nous permettre de réaliser le génotypage de résistance du CMV aux antiviraux (ganciclovir, foscarnet, maribavir et letermovir). Ce projet est conçu en collaboration avec le Dr David Boutolleau du CNR associé de la Pitié-Salpêtrière avec une comparaison des résultats obtenus par ce séquençage à haut débit à ceux du séquençage Sanger. Cette technique est d'abord développée et validée dans le cadre de deux PHRC en cours dans le laboratoire (Cymeval III et Lucy) pour être ensuite déployée de façon plus large comme outil à disposition du CNR.

Activité de conseil

-Coordination de l'écriture et de la publication de recommandations Européennes pour la prise en charge de l'infection congénitale à CMV sous l'égide de l'ECCI/ESCV (2023)

-Coordination d'un groupe d'experts français multidisciplinaires en vue de la rédaction de recommandations françaises sous l'égide de différentes sociétés savantes (2023-2024)

Activités de recherche

Poursuite des 3 protocoles de recherche en cours (voir paragraphe : activités de recherche en cours)

-Cymeval III

-Lucy

-Cyme-immune

Laboratoire CNR associé de la Pitié-Salpêtrière :

Activité de recherche

- PHRC PTH2 : Preemptive Treatment with acyclovir in intubated and mechanically ventilated patients with Herpes simplex virus oropharyngeal reactivation and one or less organ failure.

Le PHRC PTH avait montré que chez les patients intubés/ventilés depuis au moins 96h et présentant une réactivation oropharyngée du HSV-1, un traitement préemptif par aciclovir intraveineux semblait améliorer l'évolution clinique des patients les moins gravement atteints (une seule défaillance d'organe au maximum), mais sans différence significative par rapport aux patients recevant un placebo (Luyt et al., JAMA Intern Med, 2019). Un nouveau PHRC similaire à PTH (investigateur principal : Pr CE Luyt) va donc être mené uniquement chez ce type de patients. Comme pour le PHRC PTH, le critère principal d'évaluation sera le nombre de jours vivants sans ventilation mécanique à J60 après la randomisation (aciclovir/placebo). Un total de 246 patients seront inclus. Les prélèvements de gorge et les aspirations trachéales seront effectués à J3, 7, 10, 14, 17, 21 et 28 post-randomisation. L'ensemble des prélèvements respiratoires seront centralisés au niveau du CNR associé de la Pitié-Salpêtrière pour effectuer les PCR HSV-1 quantitatives. Les inclusions devraient commencer à la fin de l'année 2023

- Caractérisation du rôle des mutations non connues des HSV dans la survenue de la résistance aux antiviraux.

Le CNR associé de la Pitié-Sapêtrière dispose de 2 techniques pour caractériser le rôle de mutations non connues dans la thymidine kinase des HSV dans la survenue de résistance à l'aciclovir : étude de l'activité fonctionnelle in vitro de TK recombinante (Burrel et al., Antiviral Res 2012) et utilisation de virus recombinant en utilisant la technologie BAC (Robinet-Perrin et al., Antiviral Res 2019). Nous souhaitons désormais utiliser la technologie CRISPR/Cas9 dans ce domaine. Ce travail va être effectué dans l'année à venir en collaboration avec le Pr Sonia Burrel (désormais au CHU de Bordeaux).

Développements technologiques

Développement des tests génotypiques de résistance des herpèsvirus aux antiviraux sur la plateforme iSeq 100 (Illumina) pour le CMV (en collaboration avec les Dr Jacques Fourgeaud et M. Leruez-Ville du CNR associé de Necker), pour les HSV et pour le VZV.

Activité de conseil

Coordination de l'écriture de recommandations nationales pour la mesure de la synthèse intrathécale et intraoculaire (SIT/SIO) des anticorps antiviraux.

Activité de surveillance

Discussion avec SpF pour obtenir l'inscription de l'encéphalite herpétique sur la liste des maladies à déclaration obligatoire afin de faciliter le recensement national.

1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Les missions du CNR Herpesvirus sont orientées en priorité sur le Cytomégalo virus (CMV) et les alpha herpesvirus (HSV et VZV). La configuration proposée en 2016 ayant fait la preuve de son efficacité, nous avons choisi de la reconduire sans modification pour le nouveau mandat 2022-2027. Le CNR comporte donc trois laboratoires reconnus au niveau national et international pour leurs compétences dans ce domaine : un laboratoire CNR, au CHU de Limoges, laboratoire fondateur du CNR cytomégalo virus en 2006, en pointe sur l'épidémiologie des infections à CMV et leur prise en charge notamment chez les patients immunodéprimés et leader sur la résistance aux antiviraux, et deux laboratoires associés. Le laboratoire de virologie du CHU Necker, à Paris, qui fait partie du CNR depuis sa fondation, leader dans la prise en charge des infections congénitales à CMV assume les missions plus spécifiques à l'infection congénitale à CMV. Le laboratoire du CHU Pitié Salpêtrière, Paris, a rejoint le CNR en 2016 pour assurer les missions concernant HSV et VZV a mis en place pendant le mandat précédent un réseau de surveillance des résistances des HSV et VZV aux antiviraux et une surveillance des infections neuroméningées à HSV et VZV. Ces deux bases de données viennent compléter les surveillances historiquement mises en place par le laboratoire CNR concernant les infections congénitales à CMV en collaboration avec le laboratoire associé Necker, et les résistances aux anti-CMV depuis 2006, ainsi que la surveillance des infections néonatales à Herpes simplex depuis 2012, pour répondre à l'évolution des missions du CNR en 2012. Les missions de conseil concernant les infections graves aux autres herpesvirus (Varicelle, HHV6, EBV) sont assurées par les laboratoires du CNR avec l'aide du laboratoire référent national pour EBV au CHU de Grenoble.

La mission de coordination est assurée par le laboratoire de virologie du CHU de Limoges.

Pour des raisons d'organisation pratique territoriale et de charge de travail, les activités diagnostiques et de conseil resteront partagées entre les différents laboratoires. La liste des techniques disponibles dans les différents laboratoires est disponible sur le site du CNR et au chapitre « capacités techniques du laboratoire » du présent document.

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Laboratoire CNR coordonnateur Limoges :

Médecins biologistes :

Pr Sophie ALAIN : Directeur du CNR Herpesvirus (0,45 ETP pour le CNR ; financement : hôpital et université)

Pr Sébastien HANTZ : Directeur adjoint (0,2 ETP pour le CNR ; financement : hôpital et université)

Médecin Gynécologue Obstétricien :

Dr Perrine COSTE-MAZEAU : Hôpital Mère Enfant, CHU de Limoges (financement : hôpital)

Technicien :

1 ETP Technicien CDD financé sur la MIG CNR Maladies transmissibles : **Guyllaume FAURE** (janvier à mai) puis par **Fatoumata CONDET** (depuis mai 2022). Réception, enregistrement, analyses (génotypes de résistance CMV, HSV et VZV en Sanger, tests Quantiféron, avidités CMV, PCRs TTV, PCR CMV demandées par les laboratoires extérieurs au CNR, PCRs HSV sur échantillons extérieurs, recherche des HHV6 intégrés)

Ingénieurs :

- 1 ETP CDI financé sur les crédits MIG CNR : **Melissa GOMES-MAYERAS**
Recherches de résistance par NGS, tests sur carton de Guthrie. Réalisation des évaluations de techniques.
Développe les techniques NGS.

- 1 ETP CDI Ingénieur bioinformaticien : **Valentin TILLOY** depuis juillet 2016
En charge du développement des pipe-lines et de l'analyse des données de séquence et de la mise à disposition des séquences sur la GenBank. Mise en ligne et entretien de la base de données de résistance sur le nouveau site internet.
- 1,3 ETP Ingénieur de recherche clinique :
Françoise GARNIER (0,5 ETP CDI) financée par la MIG CNR depuis 2017. Surveillance des bases de données cliniques sur la résistance, enquêtes du CNR en greffe de cellules souches, et transplantation d'organe, cohorte NaViRe en cours d'inclusion.
Elodie RIBOT (0,8 ETP CDI) Surveillance des infections congénitales à CMV avec le laboratoire associé Necker, et des infections néonatales à HSV, gestion des bases de données nationales. Responsable du site internet pour les trois laboratoires.
- Pour assurer l'analyse des résultats issus des bases de données et des enquêtes concourant à la surveillance pour l'ensemble du CNR, nous demandons 0,2 ETP de biostatisticiens. La personne sera recrutée sur le pool du CHU.

Laboratoire CNR associé Necker :

Dr Marianne Leruez-Ville responsable laboratoire associé payée par l'Hôpital Necker, 30% activité dévolue au CNR,
Dr Jacques Fourgeaud, adjoint laboratoire associé payé par l'Hôpital Necker et l'Université Paris Cité, 25% d'activité dévolue au CNR,
Dr Hanène Abid : praticien contractuel : payée 50% par le CNR (MIG),
Mme Tiffany Guillemot : payée 100% CNR (MIG), 100% d'activité dévolue au CNR.

Laboratoire CNR associé de la Pitié-Salpêtrière :

Dr David Boutolleau (MCU-PH, service de virologie) : responsable du CNR associé de la Pitié-Salpêtrière (0,5 ETP ; financement : hôpital et université)
Dr Sonia Burrel (MCU-PH, service de virologie) : responsable-adjointe du CNR associé de la Pitié-Salpêtrière (0,5 ETP ; financement : hôpital et université)
Olivier Bomme : technicien de laboratoire du CNR associé de la Pitié-Salpêtrière (1,0 ETP ; financement : MIG CNR)
Techniciens AP-HP du laboratoire de virologie (2,0 ETP ; financement : hôpital)

1.3 Locaux et équipements

Laboratoire CNR coordonnateur Limoges :

Pas de changement au niveau des locaux.

Séquençage NGS :

En 2022 : achat d'un séquenceur moyen-Haut débit par le CHU de Limoges Next-Seq 1000, Illumina

Laboratoire CNR associé Necker :

Necker 2022 : pas de changement

Laboratoire CNR associé de la Pitié-Salpêtrière :

Pas de changement en 2022 pour la Pitié-Salpêtrière

1.4 Collections de matériel biologique

Laboratoire CNR coordonnateur Limoges :

Les collections du CNR sont progressivement intégrées Centre de Ressources Biologiques du CHU de Limoges CRBioLim certifié NF S96-900 (N°140787/1258F) pour pouvoir être cédées ou utilisées à des fins d'évaluation ou de collaboration. Les autres échantillons sont conservés dans la collection biologique du CNR au laboratoire (N°: DC 2008_604). Les échantillons cliniques et souches issues de l'activité du laboratoire sont progressivement intégrées aux collections du CNR puis au CRBioLim. La mise à disposition se fait via le CRBioLim par création d'une sous collection et cession (Responsable de collection S Alain et gestionnaire E Ribot).

Le laboratoire CNR est le seul laboratoire en France qui isole sur fibroblastes et sur cellules endothéliales et entretient des souches de cytomégalovirus provenant de tous types de prélèvements et de patients. Ces souches sont conservées dans la collection du CNR et pour un certain nombre d'entre elles, sont caractérisées pour leur génome entier ou leur génotype gB, gH, gN. Ces souches peuvent être mises à disposition de laboratoires de recherche via le CRBioLim.

Biothèque transférée progressivement vers la collection du CNR au sein du CRBioLim après vérification de non opposition :

- Souches d'HSV, de VZV isolées pour typage ou reçues pour phénotype de résistance antérieures à la création du CRBioLim, qui sont progressivement intégrées à la collection du CNR
- Près de 13000 échantillons de sang totaux de patients transplantés conservés à -80°C depuis 2013

Biothèque spécifique du CNR pouvant être utilisée à des fins d'expertise et conservées dans la collection du CNR au CRBioLim (souligné = en évolution en 2022)

- 6840 sangs totaux CMV positif ou négatifs aliquotés et mis en collection biologique pour les évaluations de trousse de PCR.
- 2040 plasma CMV et /ou EBV positif pour évaluation des trousse de PCR
- 1707 échantillons de sérum adressés pour primo-infection et dont les caractéristiques (IgG et IgM et avidité des IgG) sont connues. Ces sérums sont conservés à -20°C.
- 129 Echantillons de sérums de primo-infection ou de réactivation positifs pour la recherche d'IgM provenant de l'hôpital Charles Nicolle à Tunis reçus en 2009 caractérisés en 2010 pour les glycoprotéines d'enveloppe gB gH gN.
- 50 urines de nouveaux-nés positives pour la recherche de CMV par culture
- 1772 salives d'enfants en crèche (PHRC Crech MV) dont 663 positives en PCR CMV et 212 caractérisées pour leur génotype gB, gH et gN.
- 62 échantillons couplés de salive et de sérum prélevés sur volontaires sains, caractérisés pour la recherche du CMV salivaire et des anticorps sériques et salivaires issus du protocole ACMV.
- 1552 prélèvements spécifiques pour recherche de résistance de 2006 à 2016 caractérisés pour la séquence des gènes UL97 et UL54 dont 36 également caractérisés pour les glycoprotéines d'enveloppe gB, gH, gN.
- 2245 prélèvements spécifiques pour recherche de résistance de 2017 à 2022 caractérisés pour la séquence des gènes UL97 et UL54.
- 3618 prélèvements issus de l'Observatoire des résistances 2006-2010
- 6139 prélèvements issus des 402 patients inclus dans ORPhaViC
- 1785 prélèvements de plasma ou de sang total issus du protocole Quantic R+
- 1880 prélèvements issus des 371 patients inclus dans NAVIRE
- 98 prélèvements issus des 16 patients inclus dans CIRCLE
- 33 Liquides amniotiques CMV positifs issus de cas de CMV congénital déclarés dans la base
- 6 urines de nouveau-nés CMV positives issus de cas de CMV congénital déclarés dans la base

Détails des collections "épisode viral" et "souches" du CNR en CRBioLim:

Collection	Nombre de patients donneurs en 2022	Nombre de ressources primaires entrées en 2022	Nombre de tubes entrés en 2022	Nombre total de donneurs au 31/12/2022	Nombre total de ressources primaires au 31/12/2022	Nombre total d'échantillons au 31/12/2022	Cession: patients	Cession: ressources primaires	Cessions: échantillons
Sang total épisode viral	152	202	501	782	3070	6840	99	138	167
Souches CMV HSV	0	0	0	246	269	565	0	0	0
Plasma épisode viral	146	170	340	478	792	2040	107	125	253

Souchothèque : Cellules infectées conservées en azote liquide et répertoriées au CRBioLim :

- Souches de référence : AD169, Towne, Toledo, Davis et Merlin (ATCC), VHLE, TB40E (don de S Chavanas, Toulouse).
- Souches recombinantes HCMC Bacmids, marquées à la GFP, portant des mutations de résistance au ganciclovir, au cidofovir, ou au Foscarnet, au maribavir ou au letermovir ou des polymorphismes.

Un total de 302 isolats cliniques parmi lesquels :

- 72 souches à tropisme endothélial isolées d'urines de nouveau-né atteints d'infection congénitale à CMV provenant du CNR et de laboratoires extérieurs dont 10 caractérisées pour la séquence de leur génome entier par séquençage haut débit sur Ion Proton.
- 21 Souches à tropisme endothélial isolées de liquide amniotique ou de fœtus
- 72 souches à tropisme endothélial isolées essentiellement en 2008 de la salive d'enfants de moins de trois ans (protocole FreChMV)
- 17 souches de patients transplantés caractérisées pour leur phénotype de résistance au ganciclovir, cidofovir et foscarnet dont 6 pour leur sensibilité au maribavir

Parmi ces souches 41 sont caractérisées pour leur génotype gB, gH et gN (21 souches d'infection congénitale à CMV), 25 pour la séquence des gènes-cible des antiviraux (UL97, UL27, UL54, UL56, UL89, UL104) et le génotype gB

- Plus de 100 souches d'HSV1 et 2 et de VZV (souches de référence et isolats cliniques) disponibles pour essais antiviraux et pour tester des procédés de décontamination.

Laboratoire CNR associé Necker :

Biothèque propre du laboratoire de Virologie de Necker pouvant être utilisée dans le laboratoire à des fins d'expertises :

Environ 3000 échantillons (0.5 à 2 ml) de sang total PCR CMV positive conservés à -80°C

Biothèque spécifique du CNR constituée de 2006 à 2022 :

- Souchothèque : cellules MRC5 infectées conservées à -80°C: **250 souches** (3 aliquots par souche) responsables d'infection materno-fœtale isolées de liquide amniotique ou d'urine de nouveau-nés.
- **2472 prélèvements de liquides amniotiques** testés en PCR CMV dont **360 positifs**. Ces prélèvements sont conservés à -80°C.
- **155 prélèvements de sang fœtal positifs** conservés à -80°C.
- **270 échantillons d'urine PCR CMV positive** conservés à -80°C
- **16512 échantillons salivaires** obtenus de nouveau-nés et caractérisés en PCR CMV dont **896 positifs en PCR CMV**. Ces prélèvements sont conservés à -80°C
- **1234 échantillons de sérum** obtenus chez des femmes enceintes en primo-infection et dont les caractéristiques (IgG et IgM et avidité des IgG) sont bien répertoriées. Ces sérums sont conservés à -20°C.
- **2204 échantillons de sang séché sur carton de Guthrie** caractérisés en PCR CMV : dont 1019 PCR CMV négative provenant de nouveau-nés non infectés et **212 PCR CMV positive** obtenus de nouveau-nés infectés par le CMV. Ces échantillons sont conservés à température ambiante. Par ailleurs, depuis 2021, nous stockons dans notre laboratoire tous les cartons de Guthrie prélevés en Ile de France les années N-2 et N-3 (**soit environ 360 000 cartons de Guthrie**). En effet, le Centre Régional de Diagnostic Néonatal d'Ile de France (CRDN) stocke

pendant 1 an tous les cartons et ensuite au lieu de les détruire, il nous les transfère pour stockage pendant encore 2 années consécutives. Cela nous permet de répondre aux demandes de diagnostic rétrospectif plus tardives faites pour des enfants âgés de 1 à 3 ans (soit environ 25% des demandes). Cet accord a été possible car le CRDN est localisé dans le même établissement que notre laboratoire. Pour les enfants nés dans les autres régions les cartons de Guthrie ne sont stockés qu'un an.

Laboratoire CNR associé de la Pitié-Salpêtrière :

Le CNR associé de la Pitié-Salpêtrière conserve dans une bibliothèque spécifique l'ensemble des prélèvements biologiques positifs en PCR HSV et en PCR VZV, ainsi que l'ensemble des prélèvements biologiques reçus au laboratoire pour effectuer une recherche de résistance des HSV, du VZV et du CMV aux antiviraux. Ces prélèvements sont conservés dans un congélateur -80°C uniquement dédié au CNR Herpèsvirus équipé d'une sonde de surveillance de la température 24h/24, 7j/7 (système Sirius) reliée à l'usine de l'hôpital. Pour l'année 2022, cela représente environ **2000 prélèvements de différentes natures (LCS, LBA, sangs totaux, prélèvements cutanéomuqueux, prélèvements génitaux, prélèvements oculaires...) positifs pour HSV ou VZV et environ 300 prélèvements biologiques pour recherche de résistance aux antiviraux.**

Le CNR associé de la Pitié-Salpêtrière conserve également l'ensemble des souches de HSV-1, HSV-2 et VZV isolées en culture cellulaire à partir des prélèvements biologiques positifs en PCR de diagnostic. Ces souches virales sont conservées dans un congélateur -80°C uniquement dédié au CNR Herpèsvirus équipé d'une sonde de surveillance de la température 24h/24, 7j/7 (système Sirius) reliée à l'usine de l'hôpital. Comme indiqué dans les rapports précédents, cette activité d'isolement des souches virales avait dû être momentanément suspendue du fait de la pandémie de COVID-19 et de la ré-organisation du laboratoire P2 du laboratoire de virologie pour le seul traitement des prélèvements biologiques suspectés d'être positifs pour le SARS-CoV-2. Cette activité a finalement pu être remise en place à la fin au cours du dernier trimestre 2022. Ainsi, le CNR associé de la Pitié-Salpêtrière a pu reprendre ses activités de culture cellulaire, d'isolement de souches virales, ainsi que la réalisation de tests phénotypiques de résistance des HSV aux antiviraux (antivirogramme) pour la caractérisation de mutations détectées par séquençage des gènes UL23 (thymidine kinase) ou UL30 (ADN polymérase) non décrites à ce jour et dont le rôle dans la résistance aux antiviraux est méconnu.

Dans le cadre de l'étude RetroAlpha 14-18, menée auprès de 49 laboratoires de virologie de France métropolitaine et d'Outre-mer (réseau French HSV VZV Study Group) sur les infections neuroméningées dues aux alphaherpèsvirus (HSV et VZV), une bibliothèque de près de **300 reliquats de prélèvements de LCS positifs en HSV-1, HSV-2 ou VZV**, prélevés dans le cadre du soin médical, a pu être constituée grâce à la contribution de certains laboratoires du réseau. Une étude transcriptomique et métatranscriptomique est actuellement conduite à partir de ces LCS en collaboration avec le Pr Christophe RODRIGUEZ (Hôpital Henri Mondor). Cette collection biologique a fait l'objet d'une déclaration de type CODECOH auprès du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (DC-2022-5365).

1.5 Démarche qualité du laboratoire

Laboratoire CNR coordonnateur Limoges :

Le Laboratoire de Biologie du CHU de Limoges est accrédité COFRAC à la norme 15189 depuis 2014. (N°8-2607 Rév 13). La mesure de la charge virale CMV par PCR quantitative sur sang total, la sérologie VIH sur Architect et la mesure de la charge virale VIH sur automate M2000 ont été accréditées en 2016. La portée a été étendue en 2019 à toutes les PCR herpès virus. En 2018 ont été accréditées les analyses quantitatives de charge virale du VIH, VHB, VHC et la détection des chlamydia et gonocoques par les techniques de TMA Hologic. La technique **Quantiféron CMV a été validée sur le Liaison XL (auparavant en microplaques) avec comme principal avantage un délai de rendu de résultat, et un coût réduit par l'utilisation de réactifs communs avec le kit QTF tuberculose (Poster présenté au CMV Workshop en 2022 et résultats publiés dans JCV 2023 - voir liste publications).** La dernière visite a eu lieu en 2021 avec accréditation des sérologies virales sur Liaison XL (et transfert de méthode de l'Architect sur Alinity)

et du Quantiféron™ CMV. Par ailleurs, la plate-forme de séquençage Sanger et NGS du CHU de Limoges, à laquelle participe le CNR est également accréditée Cofrac.

Les dossiers d'accréditation pour les PCR de séquence des différents gènes de résistance du CMV ont été initiés au second semestre 2022.

La sécurité informatique est assurée par l'utilisation du réseau sécurisé du CHU, avec une sauvegarde centralisée de toutes les données sur deux serveurs distants, et la mise à disposition d'un serveur de grand volume (NAS) pour sécuriser les données de génomique (NGS) de la plate forme diagnostique de séquençage. Toutes les analyses effectuées par le laboratoire CNR sont enregistrées et gérées dans le logiciel de laboratoire GLIMS du Laboratoire de Biologie du CHU.

Les collections du CNR (responsables Sophie Alain et Elodie Ribot) sont progressivement intégrées Centre de Ressources Biologiques du CHU de Limoges CRBioLim certifié NF S96-900 (N°140787/1258F) pour pouvoir être cédées ou utilisées à des fins d'évaluation ou de collaboration. Les échantillons en attente d'intégration sont conservés dans la collection biologique du CNR au laboratoire (N°: DC 2008_604) sécurisées avec alarme au sein du Laboratoire et gérées par le logiciel Glims et le logiciel sécurisé TDBioBank.

Laboratoire CNR associé Necker :

Le laboratoire de virologie de Necker est accrédité COFRAC sur tous les marqueurs sérologiques (dont la sérologie CMV : IgG, IgM et avidité des IgG) et les marqueurs de biologie moléculaire (PCR CMV, PCR HIV, PCR virus des hépatites, PCR multiplex). Le laboratoire a fait une demande d'accréditation (ouverture de la ligne MG06) au COFRAC en mars 2021 pour les techniques en NGS, un audit interne a eu lieu en mai 2022, l'audit COFRAC de surveillance et de validation de nouvelle ligne est prévu en novembre 2023.

Laboratoire CNR associé de la Pitié-Salpêtrière :

Le laboratoire de Virologie de la Pitié-Salpêtrière est engagé dans une démarche qualité.

De nombreux examens virologiques sont accrédités :

- Sérologies des herpèsvirus (HSV-1, HSV-2, VZV, CMV et EBV), HIV, HAV, HBV, HDV, HCV, rubéole
- Charge virale HIV plasmatique
- Le séquençage pour le diagnostic de la résistance du HIV aux antirétroviraux.

Participation à la conception et à la réalisation de programmes d'évaluation externe de la qualité

Le laboratoire de Virologie de la Pitié-Salpêtrière participe à différents programmes d'évaluation externe de la qualité (EEQ) :

- Sérologies herpèsvirus : contrôles du CTCB et de Biologie Prospective (France)
- Détection/quantification des génomes des herpèsvirus : contrôles du QCMD (Ecosse)
- Résistance génotypique du CMV et des HSV aux antiviraux : contrôles du QCMD (Ecosse)

2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

Liste des techniques disponibles pour le diagnostic et l'identification des agents pathogènes et la sensibilité aux anti-infectieux

CMV

	Laboratoire Coordonnateur	Laboratoire associé Necker	Laboratoire associé Pitié- Salpêtrière
Techniques sérologiques			
Détection des IgG	LIAISON® CMV IgG II (Dia Sorin) Alinity CMV IgG (ABBOTT) CMV IgG Vidas BioMérieux	CMV IgG Liaison XL (Dia Sorin) CMV IgG Vidas BioMérieux	LIAISON® CMV IgG II (Dia Sorin) Architect (ABBOTT)
Mesure de l'avidité des IgG	LIAISON® XL CMV IgG II Avidity (Dia Sorin) VIDAS® CMV IgG Avidity II (bioMérieux)	CMV IgG Avidity II Liaison XL Diasorin CMV IgG avidity II Vidas BioMérieux Recomline CMV IgG and CMV IgG Avidity (Diasorin)	VIDAS® CMV IgG avidity II (BIOMERIEUX)
Détection des IgM sériques	CMV IgM Liaison XL (Dia Sorin)	CMV IgM Liaison XL diasorin	LIAISON® CMV IgM II (Dia Sorin)
Applications	- Détermination du statut sérologique vis-à-vis du CMV - Diagnostic de primo-infection par CMV		
Tests immunologiques	Quantiféron CMV (Qiagen/Liaison DiaSorin) Mesure de la réponse immune CD8 spécifique du CMV		
Techniques de biologie moléculaire			
Mesure de la charge virale par PCR temps réel	- CMV-R gene (bioMérieux) - PCR CMV quantitative « maison » en place depuis 2005, utilisée comme deuxième technique en duplex avec PCR albumine (Wagner et al., 2011).	CMV R gene (bioMérieux) -PCR quantitative développée et validée dans le laboratoire depuis 2001 et utilisée en 2 ^{ème} technique si besoin ainsi que pour la PCR sur carton de Guthrie (Leruez-Ville M et al. J Clin Microbiol, 2003 ;	Artus® CMV QS-RGQ (QIAGEN)

	Matrice : sang total, plasma, sérum, LCR salive, urine, liquide amniotique, biopsie de trophoblaste, carton de Guthrie	Leruez-Ville et al. J Clin Microbiol, 2008) CMV Alinity M (Abbott) Matrice : sang total, plasma, sérum, salive, urine, liquide amniotique, biopsie de trophoblaste, carton de Guthrie	
Applications :	<ul style="list-style-type: none">-Diagnostic pré-natal de l'infection congénitale à CMV (sur échantillon de liquide amniotique ou sang fœtal)-Diagnostic néonatal de l'infection congénitale à CMV (sur échantillon de sang frais, d'urines ou de salive)-Diagnostic rétrospectif de l'infection congénitale à CMV sur échantillon de sang séché sur carte de Guthrie (Vauloup-Fellous, J Clin Microbiol, 2007 ; Leruez-Ville, CID, 2011).-Recherche et quantification du CMV par PCR dans le sang maternel avant amniocentèse- Suivi des charges virales chez les immunodéprimés		-Suivi des charges virales chez les immunodéprimés
Techniques de culture			
Applications	Isolement et identification des souches de CMV responsables d'infection congénitales à partir des urines du nouveau-né, ou du liquide amniotique		
	Isolement et identification des souches de CMV responsables d'infections chez les transplantés et antivirogramme		

HSV

Techniques	Laboratoire associé Pitié-Salpêtrière	Laboratoire coordonnateur Limoges
Détection semi-quantitative des IgG HSV-1 et HSV-2 Détection semi-quantitative des IgM HSV-1 et HSV-2 Détection semi-quantitative des IgG spécifiques HSV-1 Détection semi-quantitative des IgG spécifiques HSV-2	Liaison® XL HSV-1/2 IgG (DiaSorin) Liaison® XL HSV-1/2 IgM (DiaSorin) Liaison® XL HSV-1 IgG (DiaSorin) Liaison® XL HSV-2 IgG (DiaSorin)	Liaison® XL HSV-1 IgG (DiaSorin) Liaison® XL HSV-2 IgG (DiaSorin) Liaison® XL HSV-1/2 IgG (DiaSorin) Liaison® XL HSV-1/2 IgM (DiaSorin)
Applications	- Détermination du statut sérologique vis-à-vis des HSV-1 et HSV-2 - Diagnostic de primo-infection HSV-1/HSV-2 - Diagnostic d'infection récurrente HSV-1/ HSV-2 - Diagnostic sérologique de la primo-infection maternelle /néonatale HSV	

	- Détermination du statut sérologique vis-à-vis du VZV	
Diagnostic virologique direct : PCR, culture cellulaire		
Détection et quantification du génome des HSV-1 et HSV-2	Liaison®MDX Simplexa HSV-1/2 (DiaSorin) Liaison®MDX Simplexa VZV (DiaSorin) HSV1&2 VZV R-GENE® (BioMérieux) HSV1&2 VZV R-GENE® (BioMérieux) Technique maison (Burrel et al., J Virol methods, 2012)	Multiplex HSV 1-2 /VZV (Altona) FilmArray panel ME
Applications	<ul style="list-style-type: none">- Diagnostic rapide des infections à HSV sur liquide céphalo-rachidien, humeur aqueuse (HA) ou vitrée, prélèvements génitaux des femmes en salle de travail, prélèvements de nouveau-né- Diagnostic des infections actives à HSV-1 ou HSV-2- Quantification de la charge virale HSV dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire (LBA) : intérêt pour la prise en charge thérapeutiques des patients intubés-ventilés (Luyt et al., Am J Resp Crit Care Med, 2007)- Quantification de la charge virale HSV dans le LCR ou HA pour suivi thérapeutique	
Isolement des souches de HSV en culture cellulaire	Isolement des souches virales en culture de cellules Vero et fibroblastes embryonnaires humains (MRC-5) et cellules Vero Typage HSV-1/2 par immunofluorescence	Isolement des souches virales en culture de fibroblastes embryonnaires humains (MRC5) et cellules Vero Typage HSV-1/2 par immunofluorescence
Applications	<ul style="list-style-type: none">- Isolement des souches cliniques de HSV-1 et HSV-2 à partir de prélèvements biologiques positifs en PCR : prélèvements cutanéomuqueux, prélèvements génitaux, prélèvements respiratoires (LBA), liquides de ponction- Analyse phénotypique	

a : Burrel et al., J Virol Methods, 2012

VZV

Méthode Diagnostique	Laboratoire associé Pitié salpêtrière	Laboratoire Coordonnateur Limoges
Sérologique	LIAISON® VZV IgG (DIASORIN) LIAISON® VZV IgM (DIASORIN)	LIAISON® VZV IgG (DIASORIN) LIAISON® VZV IgM (DIASORIN)
PCR qualitative (PCR en temps réel)	Simplexa® VZV Direct Kit (DIASORIN)	Multiplex HSV1-2/VZV (Altona)
Charge virale (PCR en temps réel)	Quantification du VZV par une méthode maison ^a	
Culture cellulaire	Isolement des souches virales en culture de cellules Vero et MRC5 Antivirogramme (aciclovir et foscarnet) ^b	Isolement des souches virales en culture de cellules MRC5

Génotypes de résistance et marqueurs épidémiologiques permettant le typage des souches, l'identification de clusters et l'identification des souches transmises lors de cas groupés

Méthodes publiées : a : Alain et al, Vir Meth 2004 ; b : Hantz et al., JAC 2010 ; c : Hantz et al., Antiviral Ther. 2009 ; d,e : Champier et al., Antivir Ther. 2007, Champier et al., Antivir Ther. 2008 ; f : Boutolleau et al., Antiviral Res, 2009 ; Boutolleau et al., Antiviral res. 2011 ; g : Pilorgé et al., Antiviral Res. 2014 ; h : Grosjean et al. J clin Virol. 2014. ;

b : Burrell et al., Antimicrob Agents Chemother, 2010, c Collot et al., Antiviral Res, 2016

Ces différentes techniques diagnostiques sont évaluées par des contrôles externes de qualité dispensés par des organismes (QCMD, CTCB, ANSM) ou échangés entre laboratoires (EIL) au niveau national ou européen.

Méthodes de typage des souches

Laboratoire associé Pitié-Salpêtrière	Laboratoire coordonnateur Limoges
Séquençage de gènes : UL23 (TK) [HSV-1/2] UL30 (ADN polymérase) [HSV-1/2] UL5 (hélicase) [HSV-1/2] UL30 (primase) [HSV-1/2] UL42 (facteur de processivité) [HSV-1/2] ^d US4 (gG) [HSV-2] ^e US6 (gD) [HSV-2] ^e UL1 (gL) [HSV-2] ^e UL22 (gH) [HSV-2] ^e UL27 (gB) [HSV-2] ^e Séquençage du génome entier [HSV-1/2] ^f Polymorphisme des microsatellites du HSV-1 et du HSV-2 (analyse de longueur de fragments) ^g Identification du HSV-2 ancestral (HSV-2 variant : HSV-2v) ^e	Polymorphisme des gènes (Séquençage Sanger sur 3500xl Dx genetic analyzer (CEIVD)) : <ul style="list-style-type: none"> UL23 (TK) [HSV-1/2] UL30 (ADN polymérase) [HSV-1/2] Séquençage du génome entier sur isolat (NGS Ion Torrent technologie)

^dBurrel et al., Antiviral Res, 2012 ; ^eBurrel et al., J Virol, 2015 ; ^fBurrel et al., Mol Biol Evol, 2017 ; ^gDeback et al., J Clin Microbiol, 2009 ; Burrel et al., J Clin Microbiol, 2013 ; ^hBurrel et al., Mol Biol Evol, 2017

VZV

Méthode Diagnostique	Laboratoire associé Pitié salpêtrière	Laboratoire Coordonnateur Limoges
Résistance génotypique aux antiviraux	Séquençage des ORF28 et ORF36 ^b → ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer (APPLIED BIOSYSTEMS) → GridION (Oxford Nanopore Technologies)	Séquençage des ORF28 et ORF36 ^b Séquençage Sanger sur 3500xl Dx genetic analyzer (CEIVD)
	Séquençage des ORF55 et ORF6 pour la recherche de résistance à l'aménamévir et au pritélvir (nouveaux antiviraux inhibiteurs du complexe HP) ^d	
Marqueurs épidémiologiques (polymorphisme génétique)	Caractérisation des souches de VZV : souche vaccinale/sauvage - PCR en temps réel différentielle ciblée sur l'ORF62 - Identification de 3 SNPs dans les ORF62 et ORF38	Différenciation souches vaccinales souches sauvages : Séquence ORF 64 <ul style="list-style-type: none"> RFLP-typage Identification de souches : Séquence génome entier sur souche (Ion Proton)
	Génotypage des souches de VZV : identification des clades Identifications de SNPs dans les ORF1, ORF21, ORF22, ORF38, ORF50, ORF54 ^c	

^aBurrel et al., J Virol Methods, 2012, ^bPerrier et al., J Virol Methods, 2016, ^cd'après Quinlivan et al., J Clin Microbiol, 2012, ^dPacreau et al., Antiviral Res, 2021

Génotypage des autres Herpesvirus HHV6, EBV

Laboratoire associé Pitié-Salpêtrière (A Gautheret-Dejean)	Laboratoire coordonnateur Limoges
<ul style="list-style-type: none"> HHV-6 : Typage des variants A et B par PCR-séquence Identification des génomes intégrés 	<ul style="list-style-type: none"> HHV-6^a : Identification des génomes intégrés Recherche de résistance
Laboratoire Support EBV (P Morand, R Germi)	Laboratoire coordonnateur
EBV : Typage des variants par PCR-séquence	EBV : séquence de génome complet par capture ^b (Illumina)

^a Boutolleau et al. J clin Virol. 2006

^b Bayda N, Tilloy V et al. 2021

Autres techniques

Laboratoire CNR Limoges :

Transfert des techniques de recherche vers le CNR

Les moyens mis en œuvre par l'équipe de recherche (Bacmides recombinants, modèles d'infection, évaluation de fitness ou de cinétique virale) sont disponibles sous forme d'une plate-forme, C-Lim, dédiée à l'évaluation de nouvelles molécules anti-CMV ou de procédés antiviraux physiques ou chimiques et mise en place en 2017. Ils sont donc disponibles pour les activités du laboratoire CNR. Et ont également été mis à profit pour identifier ou expertiser des antiviraux et des procédés chimiques (solutions hydroalcooliques) ou physiques (ultra-violets/Led, chauffage, matériaux de surface à propriétés antivirales) dirigés contre le SARS-CoV2 ou l'Herpes simplex.

Laboratoire associé Necker :

Séquençage NGS :

Métatranscriptomique clinique pour le diagnostic des pathogènes rares (en routine)

Amplification du génome CMV entier (en cours de développement)

Génotypage des gènes cibles des anti-viraux (en cours de développement)

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

CMV et grossesse:

La prise en charge de l'infection congénitale à CMV est entrée dans une période charnière.

En effet, en 2020 les résultats d'une étude randomisée en double aveugle contre placebo a démontré l'efficacité d'un **traitement préventif par le valaciclovir pour diminuer de façon significative la transmission materno-foetale du CMV chez des femmes ayant eu une primo-infection au 1er trimestre de la grossesse.**

Les résultats de cette étude ont été confirmés par ceux d'une étude du CNR associé Necker qui retrouve la même **diminution de 70% du risque de transmission verticale en comparant un groupe de femmes traitées à un groupe historique de femmes non traitées.**

Cette avancée pourrait révolutionner la prise en charge de la primo-infection maternelle d'autant qu'il a été montré, notamment grâce aux études épidémiologiques du CNR associé Necker, qu'**en cas de primo-infection maternelle les risques de séquelles sont limités aux primo-infections survenues pendant le 1er trimestre**.

Ces connaissances diffusent dans la communauté médicale et incitent les obstétriciens et les sages-femmes à prescrire une sérologie CMV de façon systématique au 1er trimestre de la grossesse alors que les recommandations nationales émises par le HCSP en 2018, avant ces avancées scientifiques, sont de ne pas dépister cette infection. Nous sommes donc dans une situation intermédiaire où une partie des praticiens conscients d'une potentielle perte de chance pour leurs patientes pratiquent une sérologie CMV en dehors des recommandations nationales induisant une inégalité flagrante d'accès aux soins et des hésitations dans la prise charge en raison du manque d'expérience et de l'absence de protocoles nationaux sur lesquels s'appuyer.

En l'absence de ces guidelines nationales notamment concernant le traitement antiviral préventif de la transmission materno-foetale, le CNR avec son expérience unique reconnue nationalement et internationalement est un maillon essentiel pour le conseil aux praticiens.

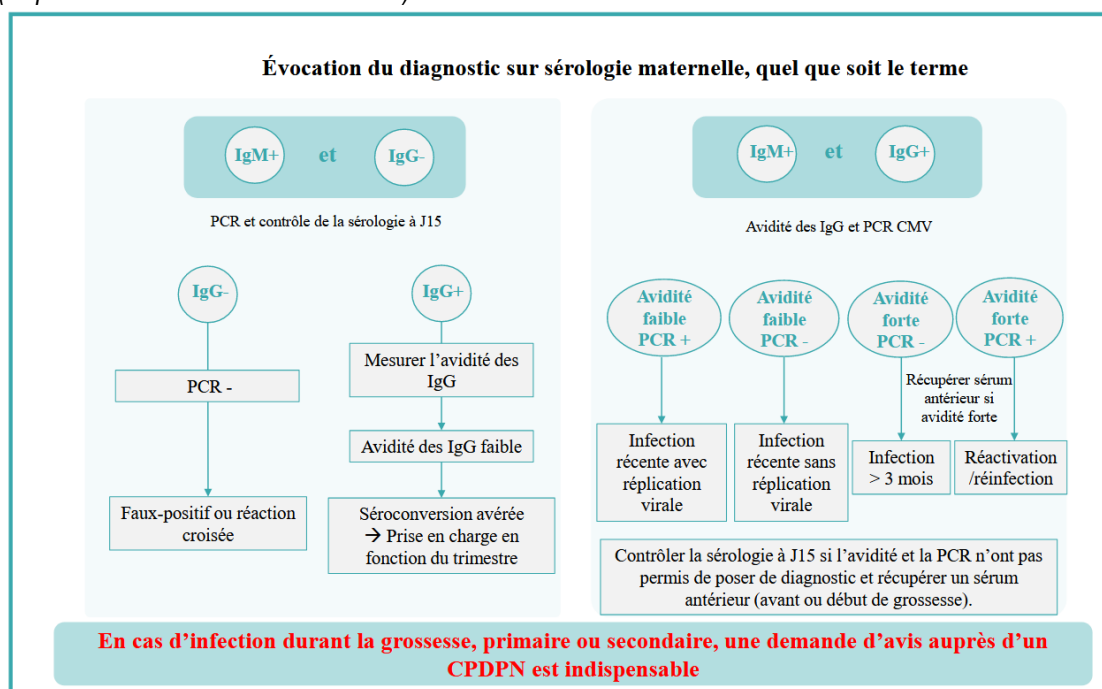
Dans ce sens, nous avons mis à disposition de nos collègues des protocoles de traitement et des logigrammes d'interprétation des sérologies et un protocole pour le diagnostic chez le nouveau-né par prélèvement de salive disponibles sur le site internet du CNR.

Ci-dessous :

Recommandations CMV / grossesse

Prélèvement salivaire nouveau-né

(disponible sur le site internet du CNR)



Signes échographique évocateurs de CMV quel que soit le terme

Réaliser une sérologie avec IgG / IgM et une amniocentèse



- Echographie mensuelle
- IRM cérébrale
- Virurie à la naissance



- Traitement par Valaciclovir jusqu'à l'accouchement (8g/j)
- Echographie tous les 15j jusqu'à l'accouchement
- IRM cérébrale fœtale vers 32SA
- Interruption médicale de grossesse à discuter selon la gravité des signes échographiques
- Virurie à la naissance

En présence d'IgG et de signes échographiques, effectuer une PCR sur le liquide amniotique, que des IgM soient présents ou non

Primoinfection CMV au 1^{er} trimestre
ou périconceptionnelle

Envisager un traitement par Valaciclovir 8g/j jusqu'à
l'amniocentèse

Amniocentèse

après 20 SA et 8 semaines après la date présumée
d'infection

PCR CMV -

dans le liquide amniotique

Risque d'infection fœtale <8%
0% de séquelles à long terme

IRM cérébrale fœtale
vers 32SA

Accouchement

Virurie à la naissance

PCR CMV +

dans le liquide amniotique

-Traitement par Valaciclovir possible jusqu'à l'accouchement (8g/j)
-Discussion sur ponction de sang fœtal pour numération plaquettaire et
charge virale CMV
-Echographie tous les 15j jusqu'à l'accouchement
-IRM cérébrale fœtale vers 32SA

A l'imagerie :
pas d'atteinte ou atteinte extra
cérébrale, ou cérébrale modérée

Signes cérébraux sévères

Discussion d'interruption
médicale de la grossesse

**Séroconversion (primo-infection) au 2^{ème} ou
3^{ème} trimestre (>15SA)**

- Echographie mensuelle
- IRM cérébrale à 32 SA
- Virurie à la naissance

**Séroconversion (primo-infection)
suspectée, avec datation impossible ou
infection secondaire**

- Echographie mensuelle
- Virurie à la naissance
- IRM cérébrale si signe échographique

**Pas d'interruption médicale de la grossesse
en l'absence de signes lors des échographies ou de l'IRM**

Prélèvement salivaire du nouveau-né en vue d'un PCR CMV



Ecouvillon floqué
avec milieu de transport
compatible avec biologie moléculaire

1. Faire le prélèvement à distance d'une tétée (1 heure après)
2. Ouvrir l'emballage stérile pour prendre l'écouvillon
3. Vérifier qu'il n'y pas de lait dans la bouche du nouveau-né et si besoin éliminer le lait avec une compresse stérile. Cette étape est importante car le lait maternel peut contenir du CMV et l'analyse serait alors faussée
4. Appliquer l'écouvillon dans la face interne de la joue du nouveau-né pendant environ 20 à 30 secondes jusqu'à ce qu'il soit imbibé de salive.
5. Insérer l'écouvillon à l'intérieur du tube et le casser pour fermer le tube
6. Mettre l'étiquette du nouveau-né sur le tube
7. Envoyer le prélèvement au CNR

Et nous avons mis en place depuis 2006 un recueil systématique et détaillé des cas d'infection congénitale à CMV dans une base de données nationale validée par la CNIL, accessible à tous les praticiens, sur demande, en cliquant sur : **recensement des cas d'infection congénitale à CMV**. Nous vous remercions de penser à déclarer tout nouveau cas.

Il nous a paru essentiel de diffuser une information basée sur les preuves à destination des professionnels de santé mais aussi des usagers ; pour cela nous coordonnons la réalisation d'un MOOC impliquant toutes les équipes françaises spécialisées dans la prise en charge de cette infection. Nous sommes par ailleurs à la disposition de nos collègues par téléphone et par email pour donner ces conseils et participons à des consultations spécialisées et des téléconsultations. Nous sommes à la disposition des instances nationales pour partager notre expertise personnelle et bibliographique sur le sujet et aider à des prises de décisions notamment sur la pertinence ou non d'un dépistage systématique du CMV pendant la grossesse.

CMV : résistances aux antiviraux

Génotype :

- Séquençage Sanger des gènes cibles UL97+UL54 +/- UL56-89-51-27 dans leur totalité.
- Si le laboratoire ne réalise pas toutes ces séquences il peut en adresser une partie au laboratoire CNR.
- Nécessité d'informations cliniques sur le traitement reçu (voir modalités et formulaires d'envoi au CNR sur le site internet du CNR)
- Applicable à tout prélèvement de charge virale suffisante (>1000UI/mL); associer sang et localisation si maladie à CMV.
- S'ils ne sont pas adressés au Laboratoire CNR, il est indispensable d'adresser les séquençages à des laboratoires de référence participant à un contrôle annuel de qualité (du CNR ou du QCMD). Ces laboratoires s'appuient sur l'expertise du CNR (appel téléphonique ou base de données du CNR) pour l'interprétation des mutations et pour le conseil aux cliniciens en raison de la difficultés d'interprétation liées à certaines mutations.
- Envoyer les nouvelles mutations au Laboratoire CNR pour expertise et phénotypage sur bacmides recombinants (accès à la base de données des mutations de résistance via le site internet du CNR).
- Déclarer les résistances aux antiviraux au Laboratoire CNR.

Apport du NGS :

- La sensibilité est élevée (2-5%) mais coûteuse et le risque d'émergence de mutants de faible fréquence reste controversé.
- Utilité de l'analyse rétrospective pour la cinétique de l'émergence précoce des mutants avec envoi au CNR des prélèvements.
- Place dans le diagnostic précoce au cas par cas élargissement des indications à évaluer (cf protocole OrPhaVic).
- Nécessité de contrôles, de normalisation et de validation de la reproductibilité des résultats.

Mesure de la charge virale CMV:

- Recommandations pour l'usage du standard international OMS et le calcul du facteur de conversion (disponible sur le site internet du CNR) :

Recommandations pour l'usage du standard international OMS et le calcul du facteur de conversion (laboratoire CNR Limoges)

1° Validation de l'absence d'impact de la congélation après remise en suspension sur les résultats du WHO

Le standard est délivré sous forme lyophilisée, avec une valeur en copies/mL après remise en suspension en eau distillée stérile de $5 \cdot 10^6$ copies/mL.

La nécessité d'obtenir coefficient valable sur une gamme de valeurs de charges virales impose de tester plusieurs dilutions dans la matrice pour laquelle on veut déterminer le coefficient, de $5 \cdot 10^5$ à $5 \cdot 10^3$, toutes supérieures au seuil de sensibilité des techniques pour éviter les résultats inexploitable. Ces dilutions sont ensuite testées séparément six fois et la moyenne géométrique est calculée. Pour ce faire il est nécessaire de travailler sur plusieurs jours. Nous avons donc contrôlé la stabilité du standard en eau distillée après congélation-décongélation (ce qui n'avait pas été validé lors du calcul de la valeur absolue du standard).

Les résultats ci dessous autorisent une congélation et donc un travail sur trois jours consécutifs.

Dilutions	Who non congelé				WHO congelé			
valeur théorique	Essai 1	Essai 2	Essai 3		Essai 4	Essai 5	Essai 6	Essai 7
$5 \cdot 10^5$	1467790	1932750	2046890		1699070	1702920	2292260	1710850
$5 \cdot 10^4$	1637100	1614800	1845300		2152900	2085700	1882700	1380400
$5 \cdot 10^3$	pas d' IC	1930000	2439000		2803000	1766000	2127000	2191000
$5 \cdot 10^2$	60	267	120	Faibles dilutions laissées de côté	125	349	153	59
	moy	1864203,75	6,27049338	log moy	1982800	Moy	CV	0,187782
	ET	303332,04			372334,892	ET		
	CV	0,162714	GMT	1843403,97				
	essai validé		logGMT	6,26562052	log moy	6,29727691		
					GMT	1951684,74		
					logGMT	6,29040967		
	6,27 vs 6,29 : pas de différence significative (0,02 log)							

Reconstitution du WHO dans 1 mL d'eau distillée donnant une concentration de $5 \cdot 10^6$ cop/mL.
 Matrice de dilution : sang total.
 Extemporaneément: reconstitution du WHO + dilution + extraction le jour même
 Dilutions en sang total conservées à 4°C pendant 24h avant extraction.
 Dilutions conservées à -80°C pendant 8 jours avant extraction.
 résultats exprimés en copies/mL

Le faible impact du traitement préanalytique permet à chacun de travailler selon ses modalités :

Absence ou peu d'impact du traitement préanalytique : chacun peut conserver sa phase préanalytique												
E préanalytique	WHO non congelé						WHO congelé -80°C					
	extemporané	extemporané	extemporané	24h à 4°C	24h à 4°C	24h à 4°C	1 semaine à -80°C	1 semaine à -80°C	1 semaine à -80°C	extemporané	extemporané	extemporané
Code E préanalytique	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4
Moyenne géométrique des dilutions log copies/mL	6,05	6,30	6,26	5,90	6,00	6,33	6,22	6,19	6,13	6,12	6,13	6,18
GMT logs par prétraitement	6,21			6,01			6,18			6,13		
Moyenne géométrique des dilutions copies/mL	1,13E+06	2,00E+06	1,82E+06	7,98E+05	9,92E+05	2,14E+06	1,87E+06	1,55E+06	1,39E+06	1,31E+06	1,34E+06	1,44E+06

En conséquence le protocole et le calcul suivant sont recommandés :

Dilution	1	2	3	1	2	3	4			
Valeur théorique attendue en copies/mL	5.10 ⁵	5.10 ⁴	5.10 ³	calcul de la valeur du WHO pour chaque dilution				moyennes géométriques des valeurs pour chaque essai (gomme l'effet de gamme)	moyenne géométrique des essais donne la valeur du WHO dans cette matrice avec cette technique	coefficient de corrélation a=WHO/GMT
Résultat en copies essai 1				0	0	0		#NOMBRE!	#NOMBRE!	#NOMBRE!
Résultat en copies essai 2				0	0	0		#NOMBRE!		
Résultat en copies essai 3				0	0	0		#NOMBRE!	Valeur théorique du WHO	
Résultat en copies essai 4				0	0	0		#NOMBRE!	5000000,000	
Résultat en copies essai 5				0	0	0		#NOMBRE!		
Résultat en copies essai 6				0	0	0		#NOMBRE!		

Proposition de calcul du coefficient d'après les recommandations du NISBC	Valable pour un couple "Extraction-PCR"									
Utiliser la moyenne géométrique des dilutions, puis celle des moyennes par essai ce qui tient compte des variations liées à la concentration d'ADN, surtout importantes pour les PCRs maison.										
Les valeurs proches de 10E2 ont été éliminées car trop proches du seuil des différentes techniques	(Pour une technique très linéaire et avec un CV faible à 10E2 elles pourraient en théorie être réincorporées.)									
Pour la réalisation des essais il est possible mais non recommandé de congeler le WHO après remise en suspension en eau distillée, et avant dilution, dès lors que le délai de congélation est court et que la gamme se limite à des valeurs de charge virale moyennes ou élevées										
Avant de valider les résultats pour le calcul du coefficient il est nécessaire de vérifier que le coefficient de variation pour les valeurs de gamme utilisées est conforme au coefficient de variation attendu pour votre technique.										
Le calcul du sang est considéré comme valable pour la moelle et sera appliqué par défaut pour toute matrice riche en cellules (tissus) pour laquelle il n'est pas possible de faire des dilutions										
Pour les liquides amniotiques, le plasma ou le LCR il est recommandé de refaire les manipulations car le coefficient sera probablement différent.										

Ce protocole est disponible en ligne sur le site du CNR CMV. Il a été diffusé à tous les membres du groupe PCR CMV. L'ensemble des résultats sera colligé par le CNR pour analyse. Le prochain Panel de contrôle de qualité diffusé en septembre 2012 par le QCMD en collaboration avec le laboratoire CNR sera donc rendu en UI/mL

3. Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)

3.1 Permanence du CNR ¹

Laboratoire CNR coordonnateur Limoges :

Horaires : 8H30-18H du lundi au vendredi

Téléphone : 05 55 05 67 24

Emails : sophie.alain@chu-limoges.fr; sebastien.hantz@chu-limoges.fr; cnr-herpesvirus@chu-limoges.fr;

Laboratoire CNR associé Necker :

8H30-18H du lundi au vendredi : téléphone : 01 44 49 49 62 (de 9H à 16H) ou 01 44 49 49 07.

Emails : marianne.leruez@aphp.fr; jacques.fourgeaud@aphp.fr

Laboratoire CNR associé de la Pitié-Salpêtrière :

Horaires du CNR associé de la Pitié-Salpêtrière : 9h00-17h00 du lundi au vendredi

Téléphone : 01 42 17 72 89 / 01 42 17 74 01

Courriel : cnr-herpesvirus.virologie-psl@aphp.fr / david.boutolleau@aphp.fr

En cas d'urgence : Dr David BOUTOLLEAU (06 19 55 37 46)

3.2 Autorisations MOT ²

Non concernés

¹ Ces informations seront conservées exclusivement par Santé publique France aux seules fins de contacter un CNR en cas d'urgence ; elles ne seront pas rendues publiques.

² Micro-Organismes et Toxines de la liste prévue à l'article R. 5139-1 du code de la santé publique. La liste des MOT est actuellement fixée par l'arrêté du 30 avril 2012 modifié par les arrêtés du 6 novembre 2014 et par l'arrêté du 2 octobre 2015.

3.3 Autorisations d'exercer la biologie médicale

Les Pr Sophie Alain et Sébastien Hantz et le Dr Marianne Leruez sont tous inscrits au Conseil National de l'Ordre des Médecins.

Les Dr David Boutolleau, Sonia Burrel et Jacques Fourgeaud sont tous inscrits au Conseil National de l'Ordre des Pharmaciens.

L'ensemble des praticiens du CNR Herpesvirus sont titulaires du DES de Biologie Médicale.

3.4 Résultats de recherches non encore publiés ou sous embargo

Néant

3.5 Difficultés rencontrées par le CNR au cours de l'année N, y compris en termes de mise à disposition de la subvention versée par Santé publique France

Néant

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

Cf activités de recherche du CNR

3.7 Autres remarques à destination du comité des CNR

Laboratoire CNR coordonnateur Limoges :

Réseau de partenaires pour le recueil de déclarations et de souches pour les infections materno-fœtales en 2022

Grand-Est :

NANCY:

CPDPN :

MOREL Olivier (olivier.morel@chru-nancy.fr)
PERDRIOLLE-GALLET Estelle (e.perdriolle-galet@chru-nancy.fr)
LAMBERT (l.lambert@chru-nancy.fr)

VIROLOGIE:

BERGER Sibel (s.berger@chru-nancy.fr)
SCHVOERER Evelyne (e.schvoerer@chru-nancy.fr)
VENARD Véronique (v.venard@chru-nancy.fr)

OBSTETRIQUE :

MASIAS Charlotte (c.masias@chru-nancy.fr)
PERDRIOLLE-GALLET Estelle (e.perdriolle-galet@chru-nancy.fr)
PEDIATRIE NEONATOLOGIE :
HAMON Isabelle (i.hamon@chru-nancy.fr)

STRASBOURG :

CPDPN :

FAVRE Romain (romain.favre@chru-strasbourg.fr)

VIROLOGIE :

FAFI-KREMER Samira (samira.fafi-kremer@chru-strasbourg.fr)
KACK KACK Wallys (wallys.kack-kack@chru-strasbourg.fr)
SOLIS Morgane (morgane.solis@chru-strasbourg.fr)

PEDIATRIE NEONATOLOGIE :

ASTRUC Dominique (dominique.astruc@chru-strasbourg.fr)

OBSTETRIQUE :

WEINGERTNER Anne Sophie (anne-sophie.weingertner@chru-strasbourg.fr)

MULHOUSE :

OBSTETRIQUE :

HOMATTER Céline (celine.homatter@ghrmsa.fr)

REIMS :

CPDPN :

BORY Jean-Paul (jpbery@chu-reims.fr)

VIROLOGIE :

ANDREOLLETTI Laurent (landreolletti@chu-reims.fr)
BRODARD Véronique (vbrodard@chu-reims.fr)
PEDIATRIE NEONATOLOGIE :
BEDNAREK WEIRAUCH Nathalie (nbednarek@chu-reims.fr)

METZ :

VIROLOGIE :

GAILLAT Jacques
PEDIATRIE NEONATOLOGIE :
Mercy : PINAUD Patrick (p.pinaud@chr-metz-thionville.fr)
Bel air : FELDMANN Marc (m.feldmann@chr-metz-thionville.fr)
OBSTETRIQUE :
OLIERIC Marie-France (mf.olieric@chr-metz-thionville.fr)
WELTER Eric (e.welter@chr-metz-thionville.fr)
MOZA Anca (a.moza@chr-metz-thionville.fr)

BELFORT :

OBSTETRIQUE :

LEBEAUPIN René (rene.lebeauvin@hnfc.fr)

ROUEN :

CPDPN :

DIGUET Alain (alain.diguet@chu-rouen.fr)

VERSPYCK Eric (eric.verspyck@chu-rouen.fr)

VIROLOGIE :

BARON Adeline (adeline.baron@chu-rouen.fr)

GUEUDIN Marie (marie.gueudin@chu-rouen.fr)

MOUREZ Thomas (thomas.mourez@chu-rouen.fr)

PEDIATRIE NEONATOLOGIE :

PINQUIER Didier (didier.pinquier@chu-rouen.fr)

CAEN :

CPDPN :

DREYFUS Michel (dreyfus-m@chu-caen.fr)

BENOIST Guillaume (benoist-gu@chu-caen.fr)

VIROLOGIE :

GOUARIN Stéphanie (gouarin-s@chu-caen.fr)

PEDIATRIE NEONATOLOGIE :

TRENTESAUX Anne-Sophie (trentesaux-as@chu-caen.fr)

LECORPS Elodie (lecorps-e@chu-caen.fr)

Bourgogne-Franche-Comté :

DIJON :

CPDPN :

ROUSSEAU Thierry (thierry.rousseau@chu-dijon.fr)

SAGOT Paul (paul.sagot@chu-dijon.fr)

VIROLOGIE :

DE ROUGEMEONT Alexis (alexis.de-rougemont@chu-dijon.fr)

BOUR Jean-Baptiste

AUVRAY Christelle (christelle.auvray@chu-dijon.fr)

PEDIATRIE NEONATOLOGIE :

SEMAMA Denis (denis.semama@chu-dijon.fr)

BESANCON :

CPDPN :

MARTIN Alain (amartin@chu-besancon.fr)

VIROLOGIE :

HERBEIN Georges (gherbein@chu-besancon.fr)

LEPILLER Quentin (q1lepiller@chu-besancon.fr)

PEDIATRIE NEONATOLOGIE :

THIRIEZ Gerard (rea-infantile@chu-besancon.fr)

Schiby Adèle (aschiby@chu-besancon.fr)

OBSTETRIQUE

MOTTET Nicolas (ncmottet@gmail.com)

HENAULT Sophie (shenault@chu-besancon.fr)

Bretagne :

RENNES :

CPDPN :

LE BOUAR Gwenaëlle (Gwenaëlle.Le.Bouar@chu-rennes.fr)

ODENT Sylvie (sylvie.odent@chu-rennes.fr)

VIROLOGIE :

PRONIER Charlotte (Charlotte.PRONIER@chu-rennes.fr)

LAGATHU Gisèle (Gisele.LAGATHU@chu-rennes.fr)

THIBAUT Vincent (Vincent.THIBAUT@chu-rennes.fr)

PEDIATRIE NEONATOLOGIE :

SAURET Anne (anne.sauret@chu-rennes.fr)

LEVINNE Emmanuel (Emmanuelle.LEVINE@chu-rennes.fr)

NERRE Anne Laure (annelaure.nerre@hospigrandouest.fr)

Keller Blandine (Blandine.KELLER@chu-rennes.fr)

OBSTETRIQUE :

CABARET-DUFOUR Anne Sophie (Anne-sophie.CABARET.DUFOUR@chu-rennes.fr)

BODY-BECHOU Delphine (delphine.body-bechou@hospigrandouest.fr)

CONTIN Laurence (SF5106@chu-rennes.fr)

BREST :

CPDPN :

SALIOU Anne-Hélène (anne-helene.saliou@chu-brest.fr)

AUDEBERT Séverine (everine.audebert@chu-brest.fr)

De VRIES Philine (philine.devries@chu-brest.fr)

VIROLOGIE :

PAYAN Christopher (christopher.payan@chu-brest.fr)

PILORGE Léa (lea.pilorge@chu-brest.fr)
VALLET Sophie (sophie.vallet@chu-brest.fr)
PEDIATRIE NEONATOLOGIE :
GAGNEUR Arnaud (arnaud.gagneur@chu-brest.fr)

SAINT BRIEUC :

CPDPN :
GREBILLE Anne-Gaelle (anne-gaelle.grebille@ch-stbrieuc.fr)

Centre-Val-de-Loire :

TOURS :

CPDPN :
ARLICOT Carine (C.ARLICOT@chu-tours.fr)
PERROTIN Franck (franck.perrotin@med.univ-tours.fr)
VIROLOGIE :
BARIN Francis (francis.barin@univ-tours.fr)
BATY Gaëlle (g.baty@chu-tours.fr)
BOIREAU S (s.boireau@chu-tours.fr)
GAUDY-GRAFFIN Catherine (gaudy_c@med.univ-tours.fr)
MARLET Julien (j.marlet@chu-tours.fr)
PEDIATRIE NEONATOLOGIE :
SAILLANT Dominique (d.saillant@chu-tours.fr)

ORLEANS:

CPDPN:
ABIMELECH Martine (martine.abimelech@chr-orleans.fr)
VIROLOGIE:
GUIGON Aurélie (aurelie.guigon@chr-orleans.fr)
GUINARD Jérôme (jerome.guinard@chr-orleans.fr)
PEDIATRIE NEONATOLOGIE :
WERNER Evelyne (evelyne.werner@chr-orleans.fr)
KIRECHE Bérengère (berengere.kireche@chr-orleans.fr)

Occitanie :

MONTPELLIER :

CPDPN :
FLANDRIN Anaïa (a-flandrin@chu-montpellier.fr)
VIROLOGIE :
FOULONGNE Vincent (v-foulongne@chu-montpellier.fr)
SEGONDY Michel (m-segondy@chu-montpellier.fr)
PEDIATRIE NEONATOLOGIE :
CAMBONIE Gilles (g-cambonie@chu-montpellier.fr)
VIGUÉ Marie-Gabrielle (mg-vigue@chu-montpellier.fr)

NIMES :

CPDPN :
MARES Pierre (pierre.mares@chu-nimes.fr)
MOUSTY Eve (eve.mousty@chu-nimes.fr)
VIROLOGIE:
ALLARDET-SERVENT (Annick <annick.allardet.servent@chu-nimes.fr>)
CARLES Marie José (marie.josee.carles@chu-nimes.fr)
CHARACHON Sylvie (sylvie.charachon@chu-nimes.fr)
PEDIATRIE NEONATOLOGIE :
TRAN Tu Anh (tu.anh.tran@chu-nimes.fr)

TOULOUSE :

CPDPN :
VAYSSIERE Christophe (christophe.vayssiere@gmail.com)
VIROLOGIE :
MANSUY Jean Michel (mansuy.jm@chu-toulouse.fr)
MENGELLE Catherine (mengelle.c@chu-toulouse.fr)
IZOPET Jacques (izopet.j@chu-toulouse.fr)
PASQUIER Christophe (pasquier.c@chu-toulouse.fr)
PEDIATRIE NEONATOLOGIE :
GLORIEUX Isabelle (glorieux.i@chu-toulouse.fr)
BENARD Melinda (benard.melinda@chu-toulouse.fr)

Ile-de-France :

APHP :

CPDPN :
PICONE Olivier (olivier.picone@aphp.fr)
OURY Jean-François (jean-francois.oury@rdb.aphp.fr)

MULLER Françoise (francoise.muller@rdb.aphp.fr)
 VILLE Yves (yves.ville@aphp.fr)
 ROTH Philippe (philippe.roth@aphp.fr)
 DPN Necker Secrétariat: (dpn.necker@aphp.fr)
 TSATSARIS Vassilis (vassilis.tsatsaris@cch.aphp.fr)
 ANSELEM Olivia (olivia.anselem@cch.aphp.fr)
 JOUANNIC Jean-Marie (jean-marie.jouannic@trs.aphp.fr)
 BENIFLA Jean-Louis (jl.benifla@trs.aphp.fr)
 JACQUEMARD François (jacquemard@gmail.com)
 CARBILLON Lionel (lionel.carbillon@jvr.aphp.fr)
 BENACHI Alexandra (alexandra.benachi@abc.aphp.fr)
 SENAT Marie-Victoire (marie-victoire.senat@bct.aphp.fr)
 MAUNIER Sophie (sophie.maunier@bct.aphp.fr)
 MARQUE JUILLET Stéphanie (smarquejuillet@ch-versailles.fr)
 FRANCHINARD Loriane (loriane.franchinard@aphp.fr)
 DARRAS Anne-Marie (anne-marie.darras@aphp.fr)
 VIROLOGIE :
 LERUEZ Marianne (marianne.leruez@aphp.fr)
 BOUTOLLEAU David (david.boutolleau@aphp.fr)
 BURREL Sonia (sonia.burrel@psl.aphp.fr)
 HOUBOU Nadira (nadira.houhou@aphp.fr)
 VAULOUP-FELLOUS Christelle (christelle.vauloup@aphp.fr)
 ROZENBERG Flore (flore.rozenberg@cch.aphp.fr)
 BOUTHRY Elise (elise.bouthry@aphp.fr)
 PETIT Jean-Claude (jean-claude.petit@aphp.fr)
 FAIBIS Frédéric (ffaibis@ghef.fr)
 DUBOIS Claire
 BACHOUR Bassel (bassel.bachour@aphp.fr)
 SCHNEPF Nathalie (nathalie.schnepf@aphp.fr)
 PEDIATRIE NEONATOLOGIES :
 MOULIN Florence (florence.moulin@aphp.fr)
 GAJDOS Vincent (vincent.gajdos@aphp.fr)
 PAREZ Nathalie (nathalie.parez@aphp.fr)
 GRIMPREL Emmanuel (emmanuel.grimprel@aphp.fr)
 GAUDELUS Joël (joel.gaudelus@aphp.fr)
 LORROT Mathie (mathie.lorrot@aphp.fr)
 AUJARD Yannick (yannick.aujard@aphp.fr)
 DOMMERGUE Marie-Aliette (madommergues@wanadoo.fr)
 HAU Isabelle (isabelle.hau@chicreteil.fr)
 MILLONES GONZALES Marco (marco.millones-gonzales@aphp.fr)
 KIEFFER François (francois.kieffer@aphp.fr)
 ORL :
 TESSIER Natacha (natacha.teissier@aphp.fr)

Hauts-de-France :

AMIENS :

CPDPN :
 GONDRIY Jean (gondry.jean@chu-amiens.fr)
 VIROLOGIE :
 LESUEUR Claudine (Lesueur.Claudine@chu-amiens.fr)
 SEGARD Christine (segard.christine@chu-amiens.fr)
 ZAWADZKI Patricia (Zawadzki.Patricia@chu-amiens.fr)
 PEDIATRIE NEONATOLOGIE :
 LEKE LOKOMBE Marie Louise (marie-louise.leke-lokombe@chu-amiens.fr)

LILLE :

CPDPN :
 DEBARGE Véronique (veronique.debarge@chru-lille.fr)
 VAAST Pascal (pascal.vaast@chru-lille.fr)
 VIROLOGIE:
 DEWILDE Anny (anny.dewilde@chru-lille.fr)
 ENGELMANN Ilka (ilka.engelmann@chru-lille.fr)
 LAZREK Mouna (mouna.lazrek@chru-lille.fr)
 PEDIATRIE NEONATOLOGIE :
 TRUFFERT Patrick (patrick.truffert@chru-lille.fr)

LENS:

OBSTETRIQUE
 VALAT Anne Sylvie (asvalat@ch-lens.fr)
 DEMEYERE Mathilde (demyeremathilde@gmail.com)

Pays-de-la-Loire :

NANTES :

CPDPN :

WINER Norbert (norbert.winer@chu-nantes.fr)

VIROLOGIE :

BRESSOLLETTE Céline (celine.bressollette@chu-nantes.fr)

COSTE BUREL Marianne (marianne.coste@chu-nantes.fr)

IMBERT-MARCILLE Berthe Marie (berthe-marie.imbert@univ-nantes.fr)

PEDIATRIE NEONATOLOGIE :

FLAMANT Cyril (cyril.flamant@chu-nantes.fr)

GRASLEGUEN Christelle (christele.grasleguen@chu-nantes.fr)

OBSTETRIQUE :

LE VAILLANT Claudine (claudine.levallant@chu-nantes.fr)

LE MANS :

CPDPN :

JULIEN Emmanuel (ejulien@ch-lemans.fr)

OBSTETRIQUE :

CHEVE Marie-Thérèse (mcheve@ch-lemans.fr)

ANGERS :

CPDPN :

BIQUARD Florence (fbiquard@chu-angers.fr)

VIROLOGIE :

BOUTHRY Elise (elbouthry@chu-angers.fr)

DUCANCELLE Alexandra (AIDucancelle@chu-angers.fr)

LE GUILLOU-GUILLEMETTE Hélène (heleguillou@chu-angers.fr)

LUNEL-FABIANI Françoise (FrLunel-Fabiani@chu-angers.fr)

VEILLON Pascal (paveillon@chu-angers.fr)

PEDIATRIE NEONATOLOGIE :

LEBOUCHER Bertrand (beleboucher@chu-angers.fr)

Provence-Alpes-Côte d'Azur

MARSEILLE :

CPDPN :

GUIDICELLI Béatrice (Beatrice.GUIDICELLI@ap-hm.fr)

HAUMONTE Jean-Baptiste (jeanbaptiste.haumonte@ap-hm.fr)

PHILIP Nicole (nicole.philip@ap-hm.fr)

DERCOLE Claude (claudie.dercole@mail.ap-hm.fr)

VIROLOGIE :

GAZIN Céline (Celine.GAZIN@ap-hm.fr)

ZANDOTTI Christine (christine.zandotti@ap-hm.fr)

PEDIATRIE NEONATOLOGIES :

GIRE Catherine (Catherine.gire@ap-hm.fr)

BOUBRED Farid (farid.boubred@ap-hm.fr)

MINODIER Philippe (philippe.minodier@ap-hm.fr)

GARCIA Patricia (patricia.garcia@ap-hm.fr)

NICE :

CPDPN :

PAQUIS Véronique (veronique.paquis@unice.fr)

TRASTOUR Cynthia (trastour.c@chu-nice.fr)

VIROLOGIE :

CANNAVO Isabelle (cannavo.i@chu-nice.fr)

GIORDANENGO Valérie (giordanengo.v@chu-nice.fr)

PEDIATRIE NEONATOLOGIE :

HAAS Hervé (haas.h@pediatrie-chulenvai-nice.fr)

MARIOLI Sandrine (marioli.s@chu-nice.fr)

MAILLOTTE Anne-Marie (maillotte.am@chu-nice.fr)

Nouvelle-Aquitaine :

PAU :

VIROLOGIE :

VILLENEUVE Laurent (laurent.villeneuve@ch-pau.fr)

BOURROUILLOU Aude (aude.bourrouillou@ch-pau.fr)

BAYONNE :

VIROLOGIE :

LEYSSENE David (dleyssene@ch-cotabasque.fr)

OBSTETRIQUE:

LEVRIER Sophie (slevrier@ch-cotabasque.fr)

BORDEAUX :

CPDPN :

COATLEVEN Frédéric (frederic.coatleven@chu-bordeaux.fr)

ROQUAND-WAGNER Emilie (e.roquand-wagner@mospb.com)

OBSTETRIQUE :

COICAUD Mariannne (marianne.coicaud@chu-bordeaux.fr)

PARIS Anne (a.paris@mospb.com)

VINCIENNE Marie (marie.vincienne@chu-bordeaux.fr)

VIROLOGIE :

GARRIGUE Isabelle (isabelle.garrigue@chu-bordeaux.fr)

LAFON Marie Edit (marie-edith.lafon@u-bordeaux.fr)

TRIMOULET Pascale (pascale.trimoulet@chu-bordeaux.fr)

PEDIATRIE NEONATOLOGIE:

Dr LOOT Maya (maya.loot@chu-bordeaux.fr)

BRISAUD Olivier (olivier.brissaud@chu-bordeaux.fr)

BERTRAND Clotilde (c.bertrand@mospb.com)

POITIERS:

CPDPN:

GOUA Valérie (v.goua@chu-poitiers.fr)

DUGUE MARECHAUD Martine (marechaud-dan@chu-poitiers.fr)

VIROLOGIE :

AGIUS Gérard (g.agius@chu-poitiers.fr)

BEBY-DEFAUX Agnès (agnes.bebey-defaux@chu-poitiers.fr)

BOURGOIN Anne (a.bourgoin@chu-poitiers.fr)

GIRAudeau Gèneviève (g.giraudeau@chu-poitiers.fr)

LEVEQUE Nicolas (Nicolas.LEVEQUE@chu-poitiers.fr)

PEDIATRIE NEONATOLOGIE :

PARIZEL Aude (aude.parizel@chu-poitiers.fr)

NIORT :

PEDIATRIE NEONATOLOGIE :

CAMARD Odile (antoine.bedu@chu-limoges.fr)

LIMOGES :

CPDPN :

COSTE MAZEAU Perrine (perrine.costemazeau@chu-limoges.fr)

FIORENZA Maryse (maryse.fiorenza@chu-limoges.fr)

VIROLOGIE :

ALAIN Sophie (sophie.alain@chu-limoges.fr)

HANTZ Sébastien (sebastien.hantz@chu-limoges.fr)

PEDIATRIE NEONATOLOGIE :

BEDU Antoine (antoine.bedu@chu-limoges.fr)

ORL :

LERAT Justine (justine.lerat@chu-limoges.fr)

LIBOURNE :

PEDIATRIE NEONATOLOGIE :

NELSON Jean-René

LYON :

CPDPN :

MASSARDIER Jérôme (jerome.massardier@chu-lyon.fr)
ATTIA Jocelyne (jocelyne.attia@chu-lyon.fr)
RUDIGOZ René (rene.rudigoz@chu-lyon.fr)
HUISSOUD Cyril (cyril.huissoud@chu-lyon.fr)
CHAMPION RASKIN Fabienne (fabienne.raskin@chu-lyon.fr)
GAUCHERAND Pascal (pascal.gaucherand@chu-lyon.fr)
DELAYER Delphine (delphine.delayer@chu-lyon.fr)

VIROLOGIE :

DOMENACH Vinca (vinca.domenach-icard@chu-lyon.fr)
ESCURET Vanessa (vanessa.escuret@chu-lyon.fr)
BILLAUD Genevieve (genevieve.billaud@chu-lyon.fr)
FROBERT Emilie (emilie.frobert@chu-lyon.fr)
MEKKI Yahia (yahia.mekki@chu-lyon.fr)
MILON Marie Paule (marie-paule.milon@chu-lyon.fr)
MORFIN-SHERPA Florence (florence.morfin-sherpa@chu-lyon.fr)
FICHEZ Axel (axel.fichez@chu-lyon.fr)

SOARES Anaïs (AnaïsSoares@eurofins-biomnis.com)

PEDIATRIE NEONATOLOGIE :

HME : CLARIS Olivier (olivier.claris@chu-lyon.fr)
Croix rouge : PICAUD Jean-Charles (jean-charles.picaud@chu-lyon.fr)
LABAUNE Jean-Marc (jean-marc.labaune@chu-lyon.fr)
JAMBON Gaëlle (gjambon@ch-stjoseph-stluc-lyon.fr)
BUTIN Marine (marine.butin@chu-lyon.fr)
OBSTETRIQUE :
ATTIA Jocelyne (jocelyne.attia@chu-lyon.fr)
CAILLOT-VAUDOYER Sandrine (sandrine.caillot-vaudoyer@chu-lyon.fr)
RASKIN Fabienne (fabienne.raskin@chu-lyon.fr)
THONNON Cyrielle (cyrielle.thonnon@chu-lyon.fr)
QUEIROS DA SILVA Catherine (catherine.queiros-da-silva@chu-lyon.fr)

CLERMONT-FERRAND :

CPDPN :

LAURICHESSE Hélène (helaurichesse@chu-clermontferrand.fr)
LEMERY Didier (dlemery@chu-clermontferrand.fr)

VIROLOGIE :

ARCHIMBAUD Christine (carchimbaud@chu-clermontferrand.fr)
BREBION Amélie (abrebion@chu-clermontferrand.fr)
HENQUELL Cécile (chenquell@chu-clermontferrand.fr)
MIRAND Audrey (amirand@chu-clermontferrand.fr)
REGAGNON Christelle (cregagnon@chu-clermontferrand.fr)
PEDIATRIE NEONATOLOGIE :
LABBE André (alabbe@chu-clermontferrand.fr)
POIRIER-CARTRON Véronique (vpoirier@chu-clermontferrand.fr)
OBSTETRIQUE :
GALLOT Denis (dgallot@chu-clermontferrand.fr)
CAHIERC Romain (rcahierc@chu-clermontferrand.fr)

GRENOBLE :

CPDPN :

JOUK Pierre-Simon (PSJouk@chu-grenoble.fr)

VIROLOGIE :

GERMI Raphaële (rgermi@chu-grenoble.fr)
LUPO Julien (JLupo@chu-grenoble.fr)
MORAND Patrice (pmorand@chu-grenoble.fr)
PEDIATRIE NEONATOLOGIE :
DEBILLON Thierry (tdebillon@chu-grenoble.fr)
EPIARD Chloé (cepiard@chu-grenoble.fr)
OBSTETRIQUE :
EQUY Véronique (vequy@chu-grenoble.fr)
ORL :
TROUSSIER Joëlle (jtroussier@chu-grenoble.fr)

SAINT ETIENNE :

CPDPN:

PRIEUR Fabienne (fabienne.prieur@chu-st-etienne.fr)
VIROLOGIE :
PILLET Sylvie (sylvie.pillet@chu-st-etienne.fr)

POZZETTO Bruno (bruno.pozzetto@chu-st-etienne.fr)
BOURLET Thomas (thomas.bourlet@chu-st-etienne.fr)
PEDIATRIE NEONATOLOGIE:
PATURAL Hugues (hugues.paturl@chu-st-etienne.fr)

AVIGNON :

VIROLOGIE:
PESENTI Delphine (pesenti.delphine@ch-avignon.fr)
PEDIATRIE NEONATOLOGIE :
MASSON Philippe (pmasson@ch-avignon.fr)

SAINT FLOUR :

OBSTETRIQUE :
VLADIMIROV Vladimir (vladimirov@ch-stflour.fr)

LABORATOIRE BIOMNIS :

VIROLOGIE :
JACOMO Véronique (veronique.jacomo@biomnis.com)

DOM-TOM :

MARTINIQUE :

CPDPN :
GUENERET Michèle (michele.gueneret@chu-fortdefrance.fr)
SCHAUB Bruno (bruno.schaub@chu-fortdefrance.fr)
OBSTETRIQUE :
JOLIVET Eugénie (eugenie.jolivet@chu-fortdefrance.fr)
VIROLOGIE :
CESAIRE Raymond (raymond.cesaire@chu-fortdefrance.fr)
NAJIOULLAH Fatiha (Fatiha.NAJIOULLAH@chu-martinique.fr)
PEDIATRIE NEONATOLOGIE :
KETTERER-MARTINON Sophie (sophie.ketterer-martinon@chu-martinique.fr)

GUADELOUPE :

CPDPN :
JANKY Eustase (eustase.janky@chu-guadeloupe.fr)
VIROLOGIE :
HERMANN Cécile (cecile.hermann@chu-guadeloupe.fr)
PEDIATRIE NEONATOLOGIE :
Basse-Terre : SIBILLE Gérard (gerard.sibille@ch-labasseterre.fr)

LA REUNION :

CPDPN :
KAUFFMANN Edouard (edouard.kauffmann@chu-reunion.fr)
LAFFITTE Annick (annick.laffitte@chu-reunion.fr)
DORAY Bérénice (berenice.doray@chu-reunion.fr)
VIROLOGIE :
ROQUEBERT Bénédicte (benedicte.roquebert@chu-reunion.fr)
PEDIATRIE NEONATOLOGIE :
IACOBELLI Silvia (silvia.iacobelli@chu-reunion.fr)
BOUMAHNI Brahim (brahim.boumahni@chu-reunion.fr)

NOUVELLE CALEDONIE :

CPDPN :
sec.gynecoc@cht.nc
VIROLOGIE :
GOURINAT Ann-Claire (Ann-claire.gourinat@cht.nc)
PEDIATRIE :
CASTELLA Clément (clement.castella@cht.nc)
RAMAHOLIMIHASO Harisoa (harisoa.ramaholimihaso@cht.nc)
[BOSSELUT Florence \(florence.bosselut@cht.nc\)](mailto:florence.bosselut@cht.nc)
OBSTETRIQUE :
BOUISSOU Emilie (emilie.bouissou@cht.nc)
[PETITPAS Charlene \(charlene.petitpas@cht.nc\)](mailto:charlene.petitpas@cht.nc)

ORL :

GREZARD Véronique (veronique.grezard@cht.nc)

POLYNESIE FRANCAISE :

VIROLOGIE :

LASTERE Stéphane (stephane.lastere@cht.pf)

MAYOTTE :

PEDIATRIE :

KARIMOVA Saodat (s.karimova@chmayotte.fr)

Nouveaux au réseau en 2022

Réseau de partenaires pour la déclaration en ligne des cas d'infection congénitale à CMV (plateforme de déclaration en ligne Voozanoo) au 31/12/2022

date création accès VOOZANOO	Commune	Spécialité	Nom	Prénom
22/11/2016	PARIS 19E ARRONDISSEMENT	Autre spécialité	Teissier	Natacha
09/12/2016	MARSEILLE	Biologie	Zandotti	Christine
19/12/2016	BORDEAUX	Biologie	Garrigue	Isabelle
10/02/2017	PARIS 12E ARRONDISSEMENT	Pédiatrie	Fétiveau	Benoit
13/02/2017	FORT-DE-FRANCE	Obstétrique	Jolivet	Eugénie
13/02/2017	MONTPELLIER	Biologie	Foulongne	Vincent
13/02/2017	NICE	Obstétrique	Trastour	Cynthia
13/02/2017	NIMES	Obstétrique	Mousty	Eve
13/02/2017	SAINT-ETIENNE	Biologie	Pillet	Sylvie
17/02/2017	AVIGNON	Biologie	Pesenti	Delphine
17/02/2017	METZ	Obstétrique	Oliéric	Marie-France
17/02/2017	METZ	Obstétrique	Welter	Eric
17/02/2017	METZ	Obstétrique	Moza	Anca
09/03/2017	GRENOBLE	Biologie	Lupo	Julien
21/03/2017	LYON 7E ARRONDISSEMENT	Biologie	Jacomo	Véronique
23/03/2017	BREST	Obstétrique	Saliou	Anne-Hélène
23/03/2017	CAEN	Obstétrique	BENOIST	Guillaume
23/03/2017	NIMES	Biologie	Carles	Marie-Josée
23/03/2017	PARIS 13E ARRONDISSEMENT	Biologie	BOUTOLLEAU	David
23/03/2017	POITIERS	Obstétrique	VEQUEAU-GOUA	Valérie
27/03/2017	AMIENS	Biologie	Ségard	Christine
27/03/2017	LILLE	Biologie	Dewilde	Anny
27/03/2017	TOURS	Biologie	Gaudy-Graffin	Catherine
30/03/2017	RENNES	Obstétrique	Le Bouar	Gwenaëlle
12/05/2017	LIMOGES	Obstétrique	COSTE-MAZEAU	Perrine
12/05/2017	NANTES	Biologie	BRESSOLLETTE	Céline
09/06/2017	CLERMONT-FERRAND	Biologie	Regagnon	Christel
09/06/2017	CLERMONT-FERRAND	Obstétrique	LAURICHESSE	Hélène

09/06/2017	NANTES	Biologie	Banaszkiewicz	Nathalie
16/06/2017	PARIS 15E ARRONDISSEMENT	Biologie	Leruez	Marianne
10/07/2017	COLOMBES	Obstétrique	PICONE	Olivier
10/07/2017	VILLEJUIF	Biologie	VAULOUP-FELLOUS	Christelle
17/08/2017	POITIERS	Biologie	Beby-Defaux	Agnès
18/08/2017	AUTRES	Biologie	Vestergaard	Hanne Thang
21/09/2017	NICE	Biologie	CANNAVO	Isabelle
02/10/2017	TOURS	Obstétrique	Perrotin	Franck
03/10/2017	CLERMONT-FERRAND	Obstétrique	GALLOT	Denis
03/10/2017	LATRONCHE	Obstétrique	Equy	Véronique
05/10/2017	LATRONCHE	Autre spécialité	Troussier	Joelle
12/10/2017	LATRONCHE	Pédiatrie	Epiard	Chloé
12/10/2017	MONTPELLIER	Pédiatrie	VIGUE	Marie Gabrielle
18/01/2018	LILLE	Biologie	LAZREK	Mouna
29/01/2018	BESANCON	Biologie	Lepiller	Quentin
29/01/2018	NANCY	Biologie	VENARD	Véronique
29/01/2018	PARIS 18E ARRONDISSEMENT	Biologie	Houhou	Nadira
30/01/2018	BORDEAUX	Biologie	LAFON	Marie-Edith
02/02/2018	NOUMEA	Biologie	Gourinat	Ann-Claire
05/02/2018	NANTES	Biologie	COSTE-BUREL	Marianne
06/02/2018	CAEN	Biologie	GOUARIN	Stéphanie
06/02/2018	NANTES	Obstétrique	LE VAILLANT	Claudine
13/02/2018	RENNES	Biologie	LAGATHU	Gisèle
19/02/2018	STRASBOURG	Biologie	SOLIS	Morgane
26/02/2018	LYON 4E ARRONDISSEMENT	Obstétrique	HUISSOUD	Cyril
02/03/2018	NANCY	Obstétrique	MASIAS	Charlotte
12/03/2018	MANS	Obstétrique	CHEVE	Marie-Thérèse
13/03/2018	NICE	Pédiatrie	Marioli	Sandrine
06/04/2018	SAINT-OUEN	Biologie	VERDURME	Laura
16/04/2018	TOULOUSE	Biologie	Pasquier	Christophe
27/04/2018	PARIS 13E ARRONDISSEMENT	Pédiatrie	MILLONES GONZALES	Marco
19/06/2018	FORT-DE-FRANCE	Biologie	NAJIOULLAH	Fatiha

19/06/2018	FORT-DE-FRANCE	Pédiatrie	KETTERER-MARTINON	Sophie
23/07/2018	CLAMART	Obstétrique	BENACHI	Alexandra
07/08/2018	BESANCON	Obstétrique	MOTTET	Nicolas
16/08/2018	LIMOGES	Autre spécialité	LERAT	Justine
07/09/2018	POITIERS	Biologie	Lév ^Â que	Nicolas
15/11/2018	MARSEILLE 15E ARRONDISSEMENT	Pédiatrie	Minodier	Philippe
15/11/2018	SAINT-FLOUR	Obstétrique	VLADIMIROV	Vladimir
18/12/2018	BORDEAUX	Pédiatrie	BRISAUD	Olivier
12/02/2019	BELFORT	Obstétrique	Lebeaupin	René
25/02/2019	DIJON	Biologie	AUVRAY	Chrsitelle
25/02/2019	ORLEANS	Pédiatrie	KIRECHE	Bérengère
25/02/2019	SAINT-PIERRE	Pédiatrie	BOUMAHNI	Brahim
28/02/2019	NANCY	Obstétrique	PERDRIOLLE-GALET	Estelle
04/03/2019	DIJON	Obstétrique	ROUSSEAU	Thierry
05/03/2019	ORLEANS	Biologie	GUINARD	Jér ^Â me
07/03/2019	TALENCE	Pédiatrie	Bertrand	Clotilde
14/03/2019	VERSAILLES	Biologie	Marque Juillet	Stéphanie
15/03/2019	LENS	Obstétrique	VALAT	Anne Sylvie
18/03/2019	NOUMEA	Pédiatrie	CASTELLA	Clément
19/03/2019	TOURS	Biologie	MARLET	Julien
25/03/2019	BORDEAUX	Obstétrique	COICAUD	Marianne
29/04/2019	ROUEN	Biologie	BARON	Adeline
03/06/2019	NICE	Pédiatrie	MAILLOTTE	Anne-Marie
24/06/2019	BESANCON	Biologie	MOTTET	Nicolas
24/06/2019	BESANCON	Obstétrique	HENAUT	Sophie
28/06/2019	LYON 4E ARRONDISSEMENT	Pédiatrie	PICAUD	Jean-Charles
14/08/2019	BREST	Biologie	PILOGE	Léa
14/08/2019	MARSEILLE 5E ARRONDISSEMENT	Pédiatrie	GARCIA	Patricia
10/12/2019	BAYONNE	Obstétrique	LEVRIER	Sophie
10/12/2019	LENS	Obstétrique	DEMEYERE	Mathilde
12/12/2019	REIMS	Biologie	ANDREOLETTI	Laurent
13/01/2020	PARIS 12E ARRONDISSEMENT	Obstétrique	FRANCHINARD	Loriane

13/01/2020	PARIS 12E ARRONDISSEMENT	Obstétrique	DARRAS	Anne-Marie
13/01/2020	TOULOUSE	Pédiatrie	BENARD	Melinda
14/01/2020	LYON 1ER ARRONDISSEMENT	Biologie	DELAYER	Delphine
16/01/2020	LYON 4E ARRONDISSEMENT	Pédiatrie	LABAUNE	Jean-Marc
16/01/2020	LYON 4E ARRONDISSEMENT	Obstétrique	FICHEZ	Axel
22/01/2020	PARIS 12E ARRONDISSEMENT	Pédiatrie	KIEFFER	François
24/02/2020	MEAUX	Biologie	FAIBIS	Frederic
24/02/2020	PARIS 5E ARRONDISSEMENT	Biologie	BACHOUR	Bassel
25/01/2021	CAEN	Pédiatrie	LECORPS	Elodie
25/01/2021	LYON	Obstétrique	ATTIA	Jocelyne
25/01/2021	LYON	Obstétrique	CAILLOT-VAUDOYER	Sandrine
25/01/2021	LYON	Obstétrique	RASKIN	Fabienne
25/01/2021	LYON	Obstétrique	THONNON	Cyrielle
25/01/2021	LYON	Obstétrique	QUEIROS-DA-SILVA	Catherine
29/01/2021	RENNES	Obstétrique	CONTIN	Laurence
02/02/2021	LYON	Pédiatrie	BUTIN	Marine
15/02/2021	SAINT-ETIENNE	Biologie	BOURLET	Thomas
22/02/2021	STRASBOURG	Obstétrique	WEINGERTNER	Anne Sophie
23/02/2021	CLERMONT-FERRAND	Obstétrique	CAHIERC	Romain
02/03/2021	PARIS 10E ARRONDISSEMENT	Biologie	Schnepf	Nathalie
03/03/2021	BORDEAUX	Obstétrique	VINCIENNE	Marie
03/03/2021	ROUEN	Pédiatrie	PINQUIER	Didier
04/03/2021	TALENCE	Obstétrique	PARIS	Anne
09/03/2021	NOUMEA	Obstétrique	BOUISSOU	Emilie
09/03/2021	MAMOUDZOU	Pédiatrie	KARIMOVA	Saodat
09/03/2021	STRASBOURG	Pédiatrie	ASTRUC	Dominique
10/03/2021	RENNES	Obstétrique	CABARET-DUFOUR	Anne-Sophie
10/03/2021	RENNES	Obstétrique	BODY-BECHO	Delphine
10/03/2021	RENNES	Pédiatrie	KELLER	Blandine
11/03/2021	NOUMEA	Pédiatrie	RAMAHOLIMIHASO	Harisoa
11/03/2021	LYON 4E ARRONDISSEMENT	Biologie	FROBERT	Emilie
11/03/2021	RENNES	Pédiatrie	NERRE	Anne-Laure

16/03/2021	RENNES	Pédiatrie	LEVINE	Emmanuelle
23/03/2021	BESANCON	Pédiatrie	Schiby	Adèle
25/03/2021	FORT-DE-FRANCE	Obstétrique	GUENERET-BRU	Michele
09/04/2021	CLERMONT-FERRAND	Pédiatrie	Poirier-Cartron	Veronique
13/04/2021	LYON 7E ARRONDISSEMENT	Pédiatrie	JAMBON	Gaëlle
28/04/2021	MULHOUSE	Obstétrique	HOMATTER	Céline
05/05/2021	NIORT	Pédiatrie	CAMARD	Odile
24/03/2022	NOUMEA	Pédiatrie	BOSSELUT	Florence
24/03/2022	NOUMEA	Autre spécialité	GREZARD	Veronique
24/03/2022	NOUMEA	Obstétrique	PETITPAS	Charlene
22/08/2022	LYON	Biologie	Soares	Anais
22/12/2022	PAPEETE	Biologie	LASTERE	Stéphane

Expert system for the detection of cytomegalovirus primary infection in pregnancy using serological markers

Anaïs Grimal¹, Attila Boudir¹, Jacques Fourgeaud^{2,3}, Tiffany Guillemot^{2,3}, Anne Dejean⁴, Sophie Arneton⁴, Sylvie Martinez⁴, Yves Ville^{2,4}, Marianne Lereux Ville^{2,3}

1. Simones, Bordeaux, France
2. EA 73-28 FETUS, Imagine Institute Université Paris Cité, Paris France

3. AP-HP, Necker Enfants Malades Hospital, Virology department, Reference Laboratory for CMV infections, Paris, France

3. AP-HP, Necker Enfants Malades Hospital, Maternity, Paris, France

OUTLINE

Rapid diagnosis of the congenital CMV infection can be made by experts with the right serological and contextual variables [1]. Sometimes doctors do not have quick access to an expert for analysis of patient samples. We have built a tool to make the simplest and most frequent analyses available to clinicians that need it.

Our objective was to **automate and standardize the diagnosis of primary CMV infection** during pregnancy based on biomarkers, and produce an accessible decision-support tool to provide clinicians quicker access to expert diagnosis.

**Quicker & easier
100% match with
cCMV expert
diagnosis.**

METHODS

DESIGNING THE SYSTEM

An expert system was designed based on **rules using data from the literature, biomarkers** (IgG and IgM anti-CMV antibodies, IgG avidity, viral load in blood and urine), and **contextual data** (maternal age, pregnancy start date, date of sample collection) to diagnose **primary CMV infections in pregnant women** [2].

The diagnostic tool provides **9 conclusions**, to either date the primary CMV infection, ask for more tests to be made, or inability to conclude. All the conclusions are explicitly justified.

VALIDATION & TESTS

We **retrospectively assessed this system on a panel of pregnant women** who had different serological patterns: anti-CMV IgM without IgG, IgG without IgM, IgG with IgM (low, moderate or high avidity).

We compared the system conclusions with those of the experts of the national reference laboratory (NRL), and iterated on the system until we reached 100% match with expert conclusions.

RESULTS

We assessed the expert system on the serologies of 100 pregnant women aged from 18 to 40 years old, including 50 in the first trimester and 50 in the second or 3 third trimester of pregnancy.

Expert system conclusions accurately represent NRL expert conclusions {100% match}, regardless of the serological profile and the trimester of pregnancy. **The system is publicly available for testing as an online form (cmv.simones.group).**

Conclusion example
High anti-CMV IgG avidity at 2 weeks of amenorrhea.
Result making it possible to **exclude the occurrence of a primary infection** during pregnancy.

CONCLUSION

The expert system provides prompt and accurate conclusions for the diagnosis of primary CMV infection during pregnancy. This could **help clinicians quickly identify patients who need treatment to prevent congenital CMV infection**, and **empower practitioners to provide more systematic testing**. For inconclusive biomarkers (moderate avidity), we are working on deep learning models to assist in determining the probability of infection.

[1] Van Zuylen WJ, Hamilton ST, Nzing Z, Hall B, Shand A, Rawlinson WD. Congenital cytomegalovirus infection: Clinical presentation, epidemiology, diagnosis and prevention. *Obstet Med*. 2014 Dec;7(4):340-6. doi:10.1177/1753495X14552718. Epub 2014 Sep 25. PMID: 27524442; PMCID: PMC4834990.
[2] Lereux-Ville M, Foulon L, Pass R, Ville Y. Cytomegalovirus infection during pregnancy: state of the science. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Volume 223, Issue 3, 2020. Pages 330-348. ISSN 0002-9378. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.02.016>.

Machine Learning assisted detection of primary cytomegalovirus infection using serological and molecular markers

Anaïs Grimal¹, Attila Boudir¹, Jacques Fourgeaud^{2,3}, Tiffany Guillemot^{2,3}, Anne Dejean⁴, Sophie Arneton⁴, Sylvie Martinez⁴, Yves Ville^{2,4}, Marianne Leruez Ville^{2,3}

1. Simones, Bordeaux, France
2. EA 73-28 FETUS, Imagine Institute Université Paris Cité, Paris France

3. AP-HP, Necker Enfants Malades Hospital, Virology department, Reference Laboratory for CMV infections, Paris, France

3. AP-HP, Necker Enfants Malades Hospital, Maternity, Paris, France

OUTLINE

The diagnosis of congenital cytomegalovirus (cCMV) infection remains complex, and machine learning can support it through its ability to learn from patterns to make better predictions [1].

As an exploratory work, we want to **evaluate the ability of machine learning (ML) to diagnose primary CMV infection** in pregnant women using annotated data.

To this end, we trained and compared **12 machine learning models** to detect primary CMV infections, mainly in first trimester pregnancies, where there is the greatest risk for fetal development [2].

Can we use AI to support cCMV diagnosis?

Yes, with **92.8% accuracy**.

METHODS

DATA

The **dataset** of 308 patients made available was first sorted and balanced between infected patients and non infected patients. The final dataset contains serology from 168 patients (4 periconceptional, 129 first trimester, and 35 second and third trimester) including 84 primary CMV infections.

The **variables** used in the prediction include biomarkers (IgG and IgM anti-CMV antibodies, IgG avidity, viral load in blood and urine), and contextual data (maternal age, weeks of gestation at sampling date).

MODEL TRAINING

We chose a 5-fold nested cross-validation technique to tune and select models classifying CMV and non-CMV infected pregnancies. In the cross validation the F1 score was considered to select the best hyperparameters and to compare models.

We have compared 12 ML algorithms (4 ensemble models, 2 linear models, naive bayes method, nearest neighbors algorithm, support vector machine, tree based model, discriminant analysis, neural network).

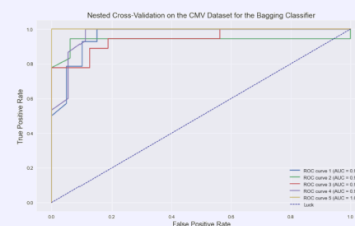
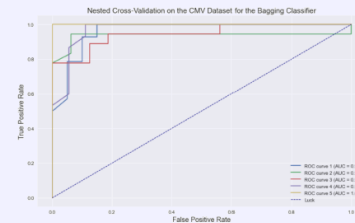
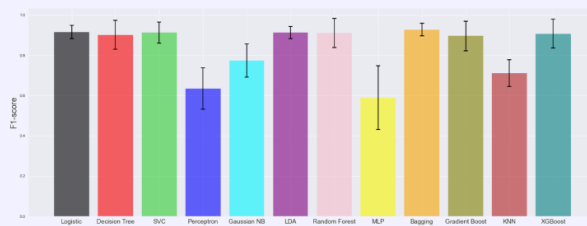
RESULTS

The **accuracy, precision, recall, and area under the ROC Curve (ROC AUC)** scores were compared among models.

→ The **Bagging Classifier achieved the highest average F1-score of 92.8%** (CI 86.7% - 100.0%).

→ The second best performing model was **logistic regression** with an average F1 score of 91.6% (CI 88.9% - 97.3%).

→ In contrast, Perceptron, K-Nearest Neighbors and Multi Linear Perceptron models had relatively low F1 scores.



CONCLUSION

These preliminary findings contribute to the framework aiming to develop **ML-based models as diagnostic tools** for primary CMV infection during pregnancy. Studying the feasibility of machine learning in the first trimester is the first step towards ML for more complex cases.

Indeed, while clear-cut serology variables can indicate primary CMV infection, experts can diverge on diagnosis for inconclusive biomarkers, and ML could support the identification of the importance given to the measured biomarkers.

[1] Machine Learning for Healthcare: On the Verge of a Major Shift in Healthcare Epidemiology, Clinical Infectious Diseases, J. Wiens & E. S. Shenoy, Volume 66, Issue 1, 2018, Pages 148–153, <https://doi.org/10.1093/cid/cix291>
[2] Chatzakis C, Ville Y, Malaydimas G, Dinas K, Zavanos A, Solitaki A. Timing of primary maternal cytomegalovirus infection and rates of vertical transmission and fetal consequences. Am J Obstet Gynecol. 2020 Dec;223(6):870–883.e11. doi:10.1016/j.ajog.2020.05.038. Epub 2020 May 24. PMID: 32460972