

**Rapport annuel  
d'activité**

**2014**

**Centre national de  
référence des virus  
influenzae**

**Saison  
2013-2014**



# Sommaire

<b>1 Missions et organisation du CNR</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Missions et objectifs</b>	<b>8</b>
1.1.1 Equipes	8
1.1.2 Locaux et équipements	8
1.1.3 Démarche qualité	8
<b>2 Activités d'expertise</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Évolutions des techniques</b>	<b>11</b>
2.1.1 Techniques de détection	11
2.1.2 Techniques de sérologie	11
2.1.3 Evaluation des Tests Rapide d'Orientation Diagnostique TROD	11
2.1.4 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	12
<b>2.2 Analyses virologiques au cours de la saison 2013-2014</b>	<b>13</b>
2.2.1 Collection et analyses virologiques d'échantillons cliniques	13
2.2.1.1 Analyses virologiques d'échantillons cliniques humains (surveillance saisonnière)	13
2.2.1.2 Analyses virologiques d'échantillons cliniques humains (virus émergents)	19
2.2.1.3 Collection de souches de virus influenza aviaire A(H5N1)	19
2.2.1.4 Collection de prélèvements provenant d'études ou de firmes	19
2.2.1.5 Collection de souches, antigènes de référence et immun-sérums	20
2.2.2 Sensibilité aux antiviraux	21
2.2.2.1 Tests génétiques	21
2.2.2.2 Test fluorimétrique (phénotypique)	22
2.2.3 Distribution de matériel biologique	24
<b>3 Activités de surveillance</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections</b>	<b>25</b>
3.1.1 Surveillance en Métropole	25
3.1.1.1 Réseaux	25
3.1.1.2 Les prélèvements	28
3.1.1.3 Données d'activité médicale et sanitaire	29
3.1.1.4 Surveillance virologique	30
3.1.1.5 Contribution à la surveillance microbiologique et épidémiologique des autres agents pathogènes responsables d'infections respiratoires aiguës	40
3.1.2 Surveillance en Région Antilles-Guyane	46
3.1.2.1 Réseau de partenaires	46
<b>3.2 Détection et investigation de cas groupés et de phénomènes anormaux</b>	<b>53</b>
<b>3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux</b>	<b>53</b>
<b>3.4 Contribution aux réseaux de surveillance européen et internationaux</b>	<b>54</b>
3.4.1 EISN/ECDC	54
3.4.2 FluNet/OMS	54
3.4.1 Contrôle de Qualité	54
<b>3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance</b>	<b>54</b>
<b>4 Alerte</b>	<b>55</b>
<b>5 Activités d'information, de formation et de conseil</b>	<b>55</b>
<b>5.1 Enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires</b>	<b>55</b>
5.1.1 Enseignements	55
5.1.2 Séminaires, conférences grand public et relations avec la presse	56
5.1.3 Formation, accueil de stagiaires	57

<b>5.2</b>	<b>Modalités de diffusion des données de la surveillance .....</b>	<b>57</b>
<b>5.3</b>	<b>Activités d'expertises auprès des instances de santé nationales et internationales .....</b>	<b>58</b>
5.3.1	Activités auprès des instances de santé nationales .....	58
5.3.1.1	<i>Ministère de la Santé et DGS</i> .....	58
5.3.1.2	<i>InVS</i> .....	58
5.3.1.3	<i>ANSM</i> .....	58
5.3.2	Activités auprès des instance de santé internationales .....	58
5.3.2.1	<i>EISN/ECDC</i> .....	58
5.3.2.2	<i>OMS</i> .....	58
5.3.3	Membre de réseaux et membre de conseil scientifique d'institutions extérieures .....	59
<b>6</b>	<b>TRAVAUX DE RECHERCHE et publications EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR ..</b>	<b>60</b>
<b>6.1</b>	<b>Activités de recherche en lien direct avec l'activité du CNR .....</b>	<b>60</b>
6.1.1	CNR-IPP .....	60
6.1.2	CNR-HCL .....	61
6.1.3	CNR-IPG .....	63
<b>6.2</b>	<b>Publications et communications en lien direct avec l'activité du CNR .....</b>	<b>64</b>
6.2.1	Publications nationales .....	64
6.2.2	Publications internationales .....	64
6.2.3	Communications nationales .....	67
6.2.4	Communications Internationales .....	67
6.2.5	Communications Nationales sur invitation .....	68
6.2.6	Communications Internationales sur invitation .....	69
6.2.7	Comité scientifique ou d'organisation de congrès ou colloques .....	69
<b>7</b>	<b>Coopération avec les laboratoires de santé animale .....</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>Programme d'activité pour les années 2014-2015 et 2015-2016 .....</b>	<b>70</b>

# Figures

Figure 1 : Suspicion MERS-CoV - Répartition de la provenance - Autres étiologies .....	19
Figure 2 : Représentation géographique du réseau des GROG .....	27
Figure 3 : IRA, Grippe Clinique (GC) et Grippe confirmée virologiquement (G+) .....	29
Figure 4 : IRA en Médecine Générale France 2013-14 .....	29
Figure 5 : IRA par tranches d'âge en France .....	30
Figure 6 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France .....	30
Figure 7 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France-Nord .....	31
Figure 8 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France-Sud.....	31
Figure 9 : Détection des virus grippaux en France .....	32
Figure 10 : Détection des virus grippaux en France-Nord .....	33
Figure 11 : Détection des virus grippaux en France-Sud.....	33
Figure 12 : Détection des virus grippaux en France .....	34
Figure 13 : Détection des virus grippaux en France-Nord .....	34
Figure 14 : Détection des virus grippaux en France-Sud.....	35
Figure 15 : Détection des virus grippaux en France .....	35
Figure 16 : Détection des virus grippaux en France-Nord .....	36
Figure 17 : Détection des virus grippaux en France-Sud.....	36
Figure 18 : Détection du VRS en France .....	40
Figure 19 : Détection du VRS en France-Nord .....	41
Figure 20 : Détection du VRS en France-Sud.....	41
Figure 21 : Détection des rhinovirus humains en France.....	42
Figure 22 : Détection des rhinovirus humains en France-Nord.....	42
Figure 23 : Détection des rhinovirus humains en France-Sud .....	43
Figure 24 : Détection des adénovirus en France .....	43
Figure 25 : Détection des virus parainfluenza en France.....	44
Figure 26 : Détection des métapneumovirus humains en France.....	44
Figure 27 : Estimation du nombre hebdomadaire de consultations pour syndrome grippal ..	47
Figure 28 : Estimation du nombre hebdomadaire de consultations pour syndrome grippal ..	47
Figure 29 : Détection des virus grippaux en région Antilles Guyane .....	48
Figure 30 : Détection des virus grippaux en Guyane .....	49
Figure 31 : Détection des virus grippaux aux Antilles .....	49
Figure 32 : Répartition des virus grippaux détectés en région Antilles-Guyane .....	50
Figure 33 : Répartition des virus grippaux détectés en Guyane .....	51
Figure 34 : Répartition des virus grippaux détectés aux Antilles (Martinique et Guadeloupe)...	51

# Tableaux

Tableau 1 : Bilan des prélèvements analysés par les CNR-IPP et HCL.....	17
Tableau 2 : Bilan des prélèvements analysés par le CNR-IPG .....	18
Tableau 3 : Sérums de furets post-infectieux et souches reçus par les CNR-IPP et -HCL ...	21
Tableau 4 : Résultats des tests phénotypiques de sensibilité à l'oseltamivir (CNR-IPP, -HCL) .....	23
Tableau 5 : Composition du Réseau des GROG par catégorie de vigie et par région .....	26
Tableau 6 : Liste des pathogènes .....	28
Tableau 7 : Distribution par âge des patients– Réseau GROG .....	38
Tableau 8 : Distribution par tranche d'âge et par type viral - Réseau GROG .....	39
Tableau 9 : Statut vaccinal - Distribution des virus grippaux détectés au CNR .....	39
Tableau 10 : Statut vaccinal - Distribution par tranche d'âge.....	39
Tableau 11 : Distribution par âge des patients – Région Antilles Guyane .....	52
Tableau 12 : Distribution par tranche d'âge et par type viral – Région Antilles Guyane .....	52

# Résumé analytique

En France métropolitaine, la saison de surveillance 2013-2014 a été marquée par une épidémie grippale de faible intensité avec un pic épidémique en semaine S07/2014. Les détections de virus grippaux dans les prélèvements communautaires du réseau des GROG sont restés très sporadiques jusqu'à début décembre et concernaient les 3 types ou sous-types de virus grippaux, B, A(H3N2) et A(H1N1)pdm09. Les détections de virus de sous-type A(H1N1)pdm09 et A(H3N2) ont ensuite augmenté de façon quasi concomitante, entraînant une vague épidémique saisonnière mixte liée à la co-circulation des deux sous-types de virus de A. Environ 34% des 2787 prélèvements GROG reçus aux laboratoires du CNR en métropole ont été rendus positifs pour un virus grippal de type A (moins de 1% pour un virus grippal de type B).

Pour la région Antilles Guyane, la saison de surveillance 2013-2014 a été perturbée par l'introduction du virus Chikungunya dans les Amériques avec les premières détections de ce virus à Saint Martin début décembre 2013 rapidement suivies par une extension aux autres îles des Antilles françaises puis à la Guyane. Le laboratoire de virologie de l'IPG qui, outre le laboratoire associé au CNR des virus influenzae, abrite le laboratoire associé au CNR pour les arbovirus, a dû faire face à une très forte surcharge de travail. La surveillance a surtout été perturbée en Martinique où avec le démarrage de l'épidémie de chikungunya dès janvier 2014, aucune donnée de circulation grippale n'a été publiée tandis qu'en dehors des prélèvements hospitaliers positifs pour un virus grippal de type A et adressés pour sous typage, seuls 5 prélèvements de surveillance sentinelle sont parvenus au CNR-IPG.

Le CNR-IPG a néanmoins reçu 676 prélèvements parmi lesquels 44% étaient positifs pour un virus grippal : comme en métropole une circulation avec codominance des virus A(H1N1)pdm09 et A(H3N2) a été observée, associée à seulement 10% de virus de type B. En Guadeloupe, l'épidémie a démarré en semaine 03 (S03/2014) pour se prolonger jusqu'en semaine 15 (S15-2014) avec un pic en semaine 09. En Guyane, l'épidémie toujours plus tardive (démarrage en semaine S08/2014) est restée d'ampleur modérée.

Sur le plan international, l'émergence du coronavirus MERS-CoV en Arabie Saoudite et du virus grippal H7N9 en Chine, mobilise toujours la communauté internationale pour prendre en charge tout voyageur présentant une symptomatologie respiratoire sévère à son retour. Le CNR a dû faire face et traiter dans les meilleurs délais un grand nombre de prélèvements pour des cas possibles pour l'infection par le MERS-CoV qui se sont avérées négatives et très souvent positives pour d'autres virus respiratoires tels que les virus grippaux de type A et B et les rhinovirus.

Suite au décès d'une femme âgée infectée par le nouveau virus aviaire A(H10N8) en Chine en novembre 2013, le CNR a développé les outils nécessaires pour détecter ce virus par RT-PCR en temps réel.

# 1 Missions et organisation du CNR

## 1.1 Missions et objectifs

Depuis le 30 décembre 2011, date de parution au Journal Officiel, le Centre National de Référence des virus influenzae chargé de la surveillance des épidémies associées aux virus respiratoires est composé du CNR coordonnateur hébergé par l'unité de génétique moléculaire des virus à ARN à l'Institut Pasteur à Paris (CNR-IP) et de deux laboratoires associés localisés aux Hospices Civils de Lyon (CNR-HCL) et à l'Institut Pasteur de Guyane à Cayenne (CNR-IPG).

Le rapport annuel 2013-2014 repose sur l'activité des trois laboratoires composant le CNR de la semaine S27/2013 à la semaine S26/2014 avec les données de surveillance de l'ensemble de la période.

La description détaillée est donnée en annexe 1.

### 1.1.1 Equipes

Une description détaillée des équipes et l'organigramme des 3 laboratoires du CNR sont donnés en annexe 2.

### 1.1.2 Locaux et équipements

Les plans des locaux et la liste des équipements disponibles sont donnés en annexes 3 et 4 pour chacun des 3 laboratoires du CNR.

### 1.1.3 Démarche qualité

#### ➤ **CNR-IPP**

Pour le CNR-IPP, comme pour les autres CNR de l'Institut Pasteur une démarche qualité a été initiée depuis 1996, suivant le référentiel GBEA et, depuis 2008, dans le cadre des inspections ANSM, conformément aux exigences des arrêtés du 30 juillet 2004, du 16 juillet 2007 et du 26 avril 2012 liés aux Micro-Organismes et Toxines (MOT).

Le Service Qualité, Environnement et Développement Durable (QE-DD) apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 des Laboratoires de Références et d'Expertise (CNR et CIBU) conformément à l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative aux activités de biologie médicale.

Une politique Qualité, Sécurité, Environnement pour l'Institut Pasteur a été formalisée, validée par la Direction Générale, communiquée à l'ensemble du personnel en 2008 et mise à jour en 2011.

Etat d'avancement de la mise en place d'un système de management de la qualité au CNR-IPP dans le cadre d'une demande d'accréditation auprès du COFRAC selon la norme NF EN ISO 15189 :

○ Bilan des actions réalisées en 2013-2014 :

- Groupe de Travail Technique pour les validations de méthode (biologie moléculaire et sérologie)
- Formations : WebCampus, Manuel Qualité LREMS et Kalilab
- Audits internes techniques ISO 15189 pour les sites concernés par l'audit ISO 15189 (CIBU, CNR Leptospirose, CNR coqueluche et autres bordetelloses, CNR Corynebactéries du complexe *Diphtheriae*, CNR Virus *Influenzae* et CNR Rage), Audits internes qualité et technique ISO 15189 : Mars 2014
- Revue de direction LREMS : 8 Avril 2014
- Finalisation des dossiers de validation de méthode (1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> vagues) : Juin 2014.
  
- Accréditation ISO 15189 du LREMS (CIBU, CNR Leptospirose, CNR coqueluche et autres bordetelloses, CNR Corynebactéries du complexe *Diphtheriae*, CNR Virus *Influenzae* et CNR Rage) par le COFRAC

○ Perspectives 2014 :

Audit de suivi ISO 15189 avec extension du périmètre (nouvelles techniques et nouveaux sites) : Novembre/décembre 2014

➤ **CNR-HCL**

Pour le CNR-HCL, comme pour les CNR-IPP et CNR-IPG une démarche qualité a été initiée suivant le référentiel GBEA puis dans le cadre des inspections ANSM et des exigences des arrêtés du 30 juillet 2004 et du 16 juillet 2007 liés aux Micro-Organismes et Toxines (MOT).

Les HCL ont fait le choix de constituer un laboratoire unique comprenant l'ensemble des disciplines de la biologie des HCL et les CNR (Bactériologie et Virologie) : le LBMMS ou Laboratoire de Biologie Médicale Multi Sites (LBMMS) au sens de l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 portant réforme de la biologie médicale. La politique Qualité pour les HCL a été formalisée, validée par la Direction Générale, communiquée à l'ensemble du personnel en juin 2013.

Depuis 2011, nous travaillons à la mise en place d'un système de management de la qualité dans le cadre d'une demande d'accréditation auprès du COFRAC selon la norme NF EN ISO 15189. Les premières disciplines du LBMMS ayant déposé leur dossier au COFRAC pour l'accréditation partielle ont été la biochimie, l'hématologie et l'immunologie (octobre 2013). Le LBMMS a repoussé le dépôt de dossier des CNR, dont celui de la grippe, en octobre 2015 pour les analyses de détection par biologie moléculaire. L'objectif reste une l'obtention de l'accréditation COFRAC en novembre 2016.

Le laboratoire s'est équipé du logiciel Kalilab pour la gestion documentaire, gestion du personnel et des équipements et bénéficiera en fin d'année du module de gestion des revues de direction.

Le CNR-HCL a été audité à plusieurs reprises par des sociétés industrielles pour lesquelles il est prestataire (2010-2012-2014). Le CNR-HCL sera audité en tant que site du LBMMS, par le COFRAC en avril 2016. En parallèle, nous participons au programme d'audits internes du LBMMS : 1<sup>er</sup> audit effectué en juin 2013 et prochain en octobre 2014.

➤ **CNR-IPG**

Conformément à l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative aux activités de biologie médicale, le CNR s'est engagé dans le processus d'accréditation au référentiel NF EN ISO 15189, avec pour objectif une accréditation partielle en 2014 et quasi complète avant le 1er novembre 2016. Le laboratoire bénéficie de l'accompagnement méthodologique et technique du service Hygiène, Sécurité, Qualité et Environnement de l'Institut Pasteur à Paris et d'un prestataire de service qui suit les avancées des laboratoires dans ce processus d'accréditation. Le premier audit Cofrac pour le laboratoire de Virologie de l'IPG a eu lieu en février 2014.

Conformément à l'article L 5139-1 du code de Santé Publique et à l'arrêté du code de la Santé Publique, en date du 26 avril 2012, fixant la liste des micro-organismes et toxines (MOT), le laboratoire associé dispose d'une autorisation de détention, d'acquisition et de mise en œuvre de l'ARN synthétique H5 par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM).

○ Bilan des actions réalisées en 2013-2014 :

- Dépôt de la demande d'accréditation au COFRAC
- Organisation en multi-site (4 LRE et LABM)
- Missions d'accompagnement sur site (service QEDD et prestataire)
- Audits qualité internes ISO 15189 (technique et organisation)
- Définition des besoins pour la gestion des équipements et des paramètres environnementaux critiques
  
- Audit initial d'accréditation ISO 15189 du Laboratoire associé au CNR des Arbovirus en février 2014

○ Perspectives 2014 :

- Audit de suivi ISO 15189 avec extension du périmètre (nouvelles techniques et nouveaux sites) : Novembre/décembre 2014

## **2 Activités d'expertise**

La description des techniques disponibles est présentée en annexe 5

### **2.1 Évolutions des techniques**

Les techniques de détection des virus saisonniers n'ont pas évolué depuis la saison dernière-

L'évolution génétique des virus de type A et de type B ne s'est pas traduite par des changements des régions cibles des qRT-PCR qui n'ont donc pas nécessité d'adaptation. Comme la saison précédente, les virus de sous-type A(H3) cultivent difficilement sur cellules MDCK et hémagglutinent faiblement les globules rouges de cobaye. Nous utilisons occasionnellement la RT-PCR et les tests ELISA pour détecter la présence de virus dans les cultures. La caractérisation antigénique de ces virus peut être réalisée par inhibition d'hémagglutination en présence d'un inhibiteur de l'activité neuraminidase, l'oseltamivir.

#### **2.1.1 Techniques de détection**

Développement de la technique de détection spécifique du virus A(H10N8). Le contrôle positif a également été développé et est produit par le CNR. Un protocole complet accompagné de son contrôle positif peut être distribué si besoin.

#### **2.1.2 Techniques de sérologie**

Afin de réaliser l'étude de séroprévalence du MERS-CoV chez des cas contacts des deux patients infectés français, qu'il s'agisse du personnel soignant ou de l'entourage des patients, le CNR s'est attaché à la mise en place de tests sérologiques. Ainsi, disposant d'isolats du MERS-CoV, le CNR a mis en place une technique de microneutralisation ainsi que la technique d'immunofluorescence pour la détection des anticorps spécifiques du MERS-CoV. Le développement d'une méthode plus facile à mettre en œuvre à haut débit et faisant appel à l'emploi de protéines recombinantes (N et fragment de S) est en cours avec l'aide de la plate-forme "protéines recombinantes" et des équipes de recherche de l'institut Pasteur.

#### **2.1.3 Evaluation des Tests Rapide d'Orientation Diagnostic TROD**

A la demande de la DGS, le CNR a réalisé une étude comparative des performances (sensibilité analytique et praticabilité) des tests d'orientation diagnostic de la grippe disponibles sur le marché français en 2014 (20 tests rapides et 2 dispositifs nécessitant un petit analyseur). Vingt-deux kits ont été envoyés au CNR des Virus Influenza France-Sud et ont été testés sur des dilutions de souches de virus influenza de sous-types différents. Un score traduisant la praticabilité des tests a également été établi sur différents critères pratiques.

Les résultats seront disponibles sur le site de la DGS.

#### **2.1.4 Techniques transférées vers d'autres laboratoires**

Les techniques du CNR de détection par qRT-PCR des virus grippaux sont accessibles sur le site de l'OMS :

[http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/molecular\\_diagnosis\\_influenza\\_virus\\_humans\\_update\\_201211.pdf](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/molecular_diagnosis_influenza_virus_humans_update_201211.pdf).

Elles peuvent être ainsi mises en place par les laboratoires hospitaliers qui le souhaitent, notamment pour le sous-typage des virus de type A et plus particulièrement des virus A(H3). En effet, depuis la pandémie de 2009, de nombreux laboratoires hospitaliers utilisent des techniques ou des kits commercialisés capables de détecter spécifiquement les virus A(H1N1)pdm09 mais pas les virus A(H3N2). Ceci peut se traduire par des biais dans les analyses épidémiologiques.

Le CNR produit ses propres contrôles positifs (ARN) pour chaque nouvelle méthode de détection mise en place, et plus particulièrement pour les virus émergents pour lesquels il est plus difficile d'obtenir rapidement la souche, La technologie de production d'ARN synthétique, si besoin à partir d'un gène synthétique, permet de disposer dans les meilleurs délais (environ 3 semaines), d'une technique complète de détection comprenant un contrôle stable facilement utilisable par les laboratoires.

Pour la validation de toute nouvelle technique, les laboratoires du CNR s'échangent des souches, contrôles positifs et sets d'amorces afin de tester la méthode sur différents plateaux techniques. Des protocoles sont ainsi optimisés sur plusieurs plateformes pour être utilisés par le plus grand nombre de laboratoires hospitaliers.

La liste des échanges est présentée dans l'annexe 7.

## **2.2 Analyses virologiques au cours de la saison 2013-2014**

### **2.2.1 Collection et analyses virologiques d'échantillons cliniques**

#### **2.2.1.1 Analyses virologiques d'échantillons cliniques humains (surveillance saisonnière)**

L'ensemble des laboratoires du CNR des virus influenzae a reçu 4286 prélèvements et détecté 1928 virus grippaux.

##### **➤ CNR-IPP et CNR-HCL**

En France métropolitaine, au sein des 3610 prélèvements reçus par les CNR-IPP et -HCL, 1631 (45,2 %) virus grippaux ont été détectés. Ces détections positives proviennent de la surveillance du réseau des GROG (n= 967 ; 59,3 %), des laboratoires des armées (n= 73 ; 4,5 %), des laboratoires hospitaliers (n= 570 ; 35 %), de l'étranger (n= 12 ; 0,7 %), des EHPAD (n=1 ; 0,06 %) et autres (n= 8 ; 0,44 %). Les virus grippaux se répartissent de la manière suivante : 1595 virus grippaux de type A, dont 860 (53,9 %) virus H1N1pdm09, 719 (45,1 %) virus H3N2, et 16 (1 %) virus non sous-typés), et 39 virus de type B dont 25 (64 %) virus B-Yamagata, 7 (18 %) virus B-Victoria et 7 (18 %) virus non sous-typés (Tableau 1).

##### **➤ CNR-IPG**

En région Antilles-Guyane, le CNR-IPG a reçu 676 prélèvements en provenance respectivement de Guyane (n= 499 ; 73.8%), de Martinique (n= 58 ; 8.6%) et de Guadeloupe, (n= 119 ; 17.6%). Ces prélèvements proviennent respectivement du réseau sentinelle (n= 257 ; 38%), de laboratoires hospitaliers (n=363 ; 53,7%) et de laboratoires privés dont le laboratoire d'analyses médicales de l'IP Guyane (n=56 ; 8.3%).

Au total, 297 virus grippaux ont été détectés, répartis de la façon suivante : 267 (89,9%) virus grippaux de type A parmi lesquels 125 (46,8%) virus H1N1pdm09 et 142 (53,2%) virus H3N2, et 30 (10,1%) virus de type B parmi lesquels 7 (23,3%) B appartenant au lignage Victoria, 22 (73,3%) virus B appartenant au lignage Yamagata, et 1 (3,3%) virus B non sous-typés (Tableau 2).

Nbre de plvts / souches	Plvts positifs (A ou B)	Provenance Surveillance Population	Virus type A						Virus type B							
			TOTAL A	non sous typés	H1N1 pdm09 PCR	isolt	H3N2 PCR	isolt	TOTAL B	non sous typés	B Victoria			B Yamagata		
											Total Vic	PCR	isolt	Total Yam	PCR	isolt
1455	603	Total GROG/Hôpitaux (FN)	588	9	343	192	236	109	16	2	2	2	0	12	12	6
2055	934	Total GROG/Hôpitaux (FS)	920	7	412	368	424	299	16	5				11	3	8
1122	366	GROG (FN)	358	2	205	127	151	81	9	0	2	2	0	7	7	5
1665	601	GROG (FS)	596	4	289	236	304	217	5	2				3		3
333	237	Lab. Hospitaliers (FN)	230	7	138	65	85	28	7	2	0	0	0	5	5	1
390	333	Lab. Hospitaliers (FS)	324	3	123	132	120	82	11	3				8	3	5
<b>Alsace</b>																
8	6	CH Strasbourg	6	1	0	0	5	0	0							
<b>Basse Normandie</b>																
81	69	CH Caen	69	1	41	34	27	13	0							
<b>Bourgogne</b>																
3	2	CH Dijon	0						2	0	0			2	2	0
1	1	CH de Sens	1	1	0		0		0							
<b>Bretagne</b>																
4	0	CHRU Brest	0						0							
30	29	CHU Rennes	29	0	25	7	4	1	0							
<b>Centre</b>																
9	7	CHRU Tours	7	0	3	0	4	0	0							
5	4	CH Orléans	4	0	4	2	0		0							
<b>Champagne Ardenne</b>																
1	0	CH Troyes	0						0							
<b>Franche Comté</b>																
2	2	CH Belfort	0						2	2						
<b>Haute Normandie</b>																
8	4	CH Rouen	4	1	3	0	0		0							
<b>Ile de France</b>																
18	14	CH Bichat	14	0	3	2	11	0	0							
4	2	CH Cochin	2	0	1	1	1	0	0							
9	5	HEGP	5	0	2	1	3	1	0							
3	0	CH Necker	0						0							
2	0	CH Pitié Salp.	0						0							
2	2	CH Robert Debré	2	0	2	2	0		0							
3	0	CH Tenon	0						0							
20	18	CH Trousseau	18	0	8	2	10	5	0							
6	1	CH Versailles	1	0	0		1	0	0							
3	1	CH Aulnay-sous-Bois	1	0	0		1	0	0							

Nb de plvts / souches	Plvts positifs (A ou B)	Provenance Surveillance Population	Virus type A						Virus type B							
			TOTAL A	non sous typés	H1N1 pdm09 PCR	isolt	H3N2 PCR	isolt	TOTAL B	non sous typés	B Victoria			B Yamagata		
											Total Vic	PCR	isolt	Total Yam	PCR	isolt
2	2	CH Bondy	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	18	CH Ambroise Paré	17	0	12	6	5	2	1	0	0	0	0	1	1	0
3	0	Garches	0						0							
5	5	Hôpital Foch	5	0	5	2	0	0	0							
3	0	Hôpital de Neuilly	0						0							
5	0	CH Avicenne	0						0							
2	0	CH Meaux	0						0							
1	1	CH Créteil	0						1	0	0	0	0	1	1	0
1	1	Saint-Denis	1	0	1	0	0	0	0							
6	5	CH Paul Brousse	4	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1
2	0	CHI Villeneuve St Georges	0						0							
1	0	CH Marne-la-Vallée	0						0							
<b>Lorraine</b>																
13	13	CHU Nancy	13	3	10	2	0	0	0							
<b>Nord Pas de Calais</b>																
2	2	CH Lille	2	0	0		2	1	0							
1	0	CH Douai	0						0							
<b>Pays de Loire</b>																
1	1	CH Nantes	1	0	0		1	0	0							
21	12	CH Angers	12	0	11	3	1	1	0							
2	2	CH Le Mans	2	0	0		2	0	0							
7	5	CH St-Nazaire	5	0	0		5	3	0							
3	2	Guérande	2	0	0		2	1	0							
<b>Picardie</b>																
5	0	CH Amiens	0						0							
1	1	CH Compiègne	1	0	1	1	0	0	0							
<b>Aquitaine</b>																
2	2	Bordeaux (FS)	2				2	2								
2	1	Villeneuve sur Lot	1		1											
<b>Auvergne</b>																
6	4	Aurillac	4		4	3										
29	15	Clermont-Ferrand*	15*	2*	10	6	3	2	2	2						
<b>Languedoc-Roussillon</b>																
1	1	Béziers	1		1											
<b>Limousin</b>																
35	33	Limoges	33			24		9								

Nbre de plvts / souches	Plvts positifs (A ou B)	Provenance Surveillance Population	Virus type A						Virus type B								
			TOTAL A	non sous typés	H1N1 pdm09 PCR	isolt	H3N2 PCR	isolt	TOTAL B	non sous typés	B Victoria			B Yamagata			
											Total Vic	PCR	isolt	Total Yam	PCR	isolt	
<b>Midi-Pyrénées</b>																	
28	23	Toulouse	<b>23</b>	1	15	5	7	2									
0	0	Valence	<b>0</b>						<b>0</b>								
<b>PACA</b>																	
29	20	Aix-en-Provence	<b>20</b>		2	1	18	5									
1	1	Avignon	<b>1</b>				1	1									
2	1	Brignoles	<b>1</b>				1										
1	1	Embrun	<b>1</b>				1	1									
2	2	Fréjus	<b>2</b>		2	1											
21	20	Marseille	<b>18</b>		1		17	4	<b>2</b>						2	2	
8	8	Toulon	<b>7</b>		4	2	3	2	<b>1</b>	1							
<b>Poitou-Charentes</b>																	
47	46	Poitiers (FS)	<b>45</b>			38		7	<b>1</b>						1		1
0	0	CH Chatellerault	<b>0</b>						<b>0</b>								
<b>Rhône-Alpes</b>																	
5	3	Chambéry	<b>3</b>		3												
1	0	Givors															
21	20	Grenoble	<b>20</b>		13	6	7	3									
71	71	Lyon	<b>67</b>		34	34	33	33	<b>4</b>						4		4
2	2	Montélimar	<b>2</b>				2	2									
1	1	Oyonnax	<b>1</b>		1												
75	58	St-Etienne	<b>57</b>		32	12	25	9	<b>1</b>						1	1	
<b>76</b>	<b>73</b>	<b>Armées</b>	<b>71</b>	<b>0</b>	<b>34</b>	<b>23</b>	<b>37</b>	<b>16</b>	<b>2</b>		<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
10	10	HIA Brest	<b>10</b>	0	2	0	8	1	<b>0</b>								
1	0	HIA Bégin	<b>0</b>						<b>0</b>								
2	1	HIA Percy	<b>1</b>	0	0		1	0	<b>0</b>								
56	56	HIA Toulon (FS)	<b>54</b>		28	19	26	13	<b>2</b>		1	1	1	1	1		1
7	6	Lyon-Bron (FS)	<b>6</b>		4	4	2	2									
<b>1</b>	<b>1</b>	<b>EHPAD (FN)</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>		<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>								
1	1	Dijon	<b>1</b>	0	0		1	0	<b>0</b>								
<b>4</b>	<b>4</b>	<b>Ecole épidémie (FS)</b>	<b>0</b>						<b>4</b>		<b>4</b>	<b>1</b>	<b>3</b>				
4	4	Mieussy (RA)	<b>0</b>						<b>4</b>		4	1	3				
<b>7</b>	<b>4</b>	<b>Europe (FS)</b>	<b>4</b>			<b>4</b>											
7	4	Genève	<b>4</b>			4			<b>0</b>								
<b>12</b>	<b>12</b>	<b>Total étranger</b>	<b>11</b>		<b>5</b>	<b>3</b>	<b>6</b>		<b>1</b>					<b>1</b>	<b>1</b>		
0	0	Antilles / Guyane	<b>0</b>						<b>0</b>								

Nbre de plvts / souches	Plvts positifs (A ou B)	Provenance Surveillance Population	Virus type A						Virus type B							
			TOTAL A	non sous typés	H1N1 pdm09		H3N2		TOTAL B	non sous typés	B Victoria			B Yamagata		
					PCR	isolt	PCR	isolt			Total Vic	PCR	isolt	Total Yam	PCR	isolt
12	12	La Réunion (FS)	11		5	3	6		1					1	1	
0	0	Martinique	0						0							
0	0	CIRE Océan Indien	0						0							
1469	615	TOTAL général (FN)	600	9	345	192	246	110	16	2	2	2	0	12	12	6
2141	1016	TOTAL général (FS)	995	7	449	398	458	314	23	5	5	2	4	13	4	9
3610	1631	TOTAL général	1595	16	796	590	716	427	39	7	7	4	4	25	16	15

Tableau 1 : Bilan des prélèvements analysés par les CNR-IPP et HCL

➤ **CNR-IPP : détection de 1 cas d'infection mixte :**

Virus grippaux A + B :

- 1x GROG / A(H3N2) + B Victoria

➤ **CNR-HCL : détection de 3 cas d'infections mixtes :**

Virus grippaux A + B :

- 2x RENAL / Clermont-Ferrand (virus non sous-typés)

Virus Grippaux A :

- 1x GROG / A(H1N1)pdm09 + A(H3N2)

Nbre de plvts / souches	Plvts positifs (A ou B)	Provenance Surveillance Population	Virus type A						Virus type B						
			TOTAL A	non sous typés	H1N1 pdm09 PCR	isolt	H3N2 PCR	isolt	TOTAL B	non sous typés	Total Vic	B Victoria PCR	isolt	Total Yam	B Yamagata PCR
499	151	<b>Guyane</b>	138	0	65	0	73	0	13	1	7	7	0	5	5
310	88	Hôpital / Centre de Santé	83		32		51		5	0	4	4		1	1
259	64	Hôp. Cayenne	60		27		33		4		4	4		0	0
2	0	CDS Papaïchton	0		0		0		0		0	0		0	0
49	24	CDS Iracoubo	23		5		18		1		0	0		1	1
56	17	Laboratoires privés	16		6		10		1	0	0	0		1	1
133	46	Surveillance sentinelle	39		27		12		7	1	3	3		3	3
58	52	<b>Martinique</b>	52	0	28	0	24	0	0	0	0	0	0	0	0
53	50	Hôp. Fort de France	50		26		24				0	0		0	0
5	2	Surveillance sentinelle	2		2		0				0	0		0	0
119	94	<b>Guadeloupe</b>	77	0	32	0	45	0	17	0	0	0	0	17	17
119	94	Surveillance sentinelle	77		32		45		17		0	0		17	17
257	142	Total sentinelle	118	0	61	0	57	0	24	1	3	3	0	20	20
419	155	Total Non Sentinelle	149	0	64	0	85	0	6	0	4	4	0	2	2
676	297	Total Général	267	0	125	0	142	0	30	1	7	7	0	22	22

Tableau 2 : Bilan des prélèvements analysés par le CNR-IPG

### 2.2.1.2 Analyses virologiques d'échantillons cliniques humains (virus émergents)

#### Le nouveau coronavirus, MERS-CoV

##### ➤ CNR-IPP et CNR-HCL

133 prélèvements ont été reçus pour suspicion d'infection par le nouveau coronavirus MERS-CoV provenant de 102 patients à leur retour de la péninsule arabique. Leur répartition selon le pays de provenance est la suivante :

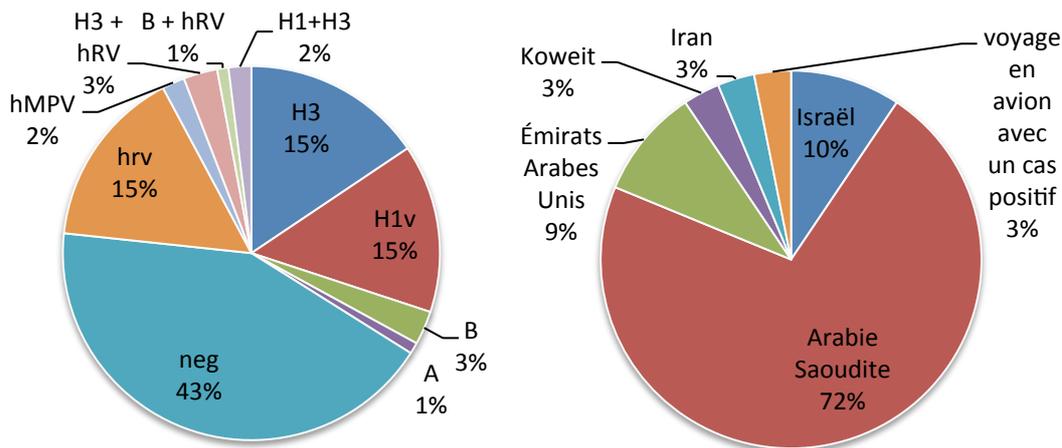


Figure 1 : Suspicion MERS-CoV - Répartition de la provenance - Autres étiologies

Parmi ces 102 cas suspects, la majorité (72%) provenaient d'Arabie Saoudite (voyage à la Mecque) et pour 58 patients (57 %) d'autres étiologies ont été détectées, parmi lesquelles majoritairement des virus grippaux A(H1N1)pdm09 (15 %), A(H3N2) (15 %), du rhinovirus (15 %), du métapneumovirus (2 %) et des co-infections.

#### Le nouveau virus de grippe aviaire A(H7N9)

Aucune suspicion A(H7N9) n'a été reçue au CNR-IPP cette saison, en revanche le CNR-HCL a reçu 8 suspicions de grippe aviaire H5N1 et H7N9.

### 2.2.1.3 Collection de souches de virus influenza aviaire A(H5N1)

Aucune souche virale virus A(H5N1) n'a été reçue par le CNR cette saison

### 2.2.1.4 Collection de prélèvements provenant d'études ou de firmes

##### ➤ CNR-IPP

- Étude en collaboration avec le CEA (Dr Roger Legrand) pour la mise en place d'un modèle d'infection par les virus influenza chez le macaque. D'octobre 2013 à juin 2014 on a été reçus: 847 prélèvements dont 716 prélèvements respiratoires (trachéal et nasal) et 131 prélèvements sanguins (sérum et sang total).

➤ **CNR-HCL**

- FLUVAC 03 : 404 échantillons
- NOVARTIS : 20 échantillons
  - A** : 1 H1N1pdm09 (A/Brisbane/10/2010) – 11 H3N2 (A/New York/39/2012 – A/Almaty/2958/2013 – A/Texas/50/2012 – A/Victoria/506/2013) – 3 H7N9 (A/Shanghai/2/2013)
  - B** : 3 Lignage Yamagata (B/Massachusetts/2/2012) 2 Lignage Victoria (B/Texas/2/2013)

Rq : les lots de semence A H7N9 ont été testés dans les conditions BSL3
- GSK : 3 échantillons
  - A** : 1 H1N1pdm09 (A/Christchurch/16/2010)
  - B** : 1 Lignage Yamagata (B/Massachusetts/2/2012) 1 Lignage Victoria (B/Texas/2/2013)

**2.2.1.5 Collection de souches, antigènes de référence et immun-sérums**

En tant que National Influenza Center (NIC) de l’OMS, les laboratoires du CNR sont destinataires chaque année, des sérums de mouton et des antigènes correspondants du kit de l’OMS dirigés contre les souches de référence entrant dans la composition vaccinale. Les CNR-IPP et -HCL ont reçu du CCOMS de Londres (Dr J. McCauley) la souche prototype pour le développement d’un vaccin pandémique A(H7N9): A/Anhui/1/2013.

Les CNR-IPP et -HCL ont reçu du CCOMS de Londres (Dr J. McCauley) des sérums de furet préparés vis-à-vis des souches de virus grippaux humains de référence. Les sérums sont conservés congelés à -20°C (Tableau 3). Pour mémoire, la formulation vaccinale n’a pas été modifiée par rapport à la saison précédente. Les laboratoires du CNR ont donc utilisé les souches prototypes précédemment reçues pour la caractérisation des isolats ou comme témoins positifs pour les tests de détection (type ELISA) et les tests de qRT-PCR, excepté pour le virus A/Athens/112/2012 qui a dû être redemandé.

	Souche virale	Immun-sérum
<b>A(H1N1)pdm09</b>		
A/St. Petersburg/100/2011	2012-13	2013-14
A/St. Petersburg/27/2011	2012-13	2013-14
A/Auckland/3/2009		2013-14
A/California/7/2009		2013-14
<b>A(H3N2)</b>		
A/Athens/112/2012	2013-14	2013-14
A/Texas/50/2012	2012-13	2013-14
A/Victoria/361/2011	2011-12	2012-13
<b>A(H7N9)</b>		
A/Anhui/1/2013	2013-14	
<b>B-Yamagata</b>		
B/Hong Kong/3577/2012	2012-13	2013-14
B/Massachusetts/02/2012		2013-14
B/Wisconsin/1/2010	2011-12	2012-13
<b>B-Victoria</b>		
B/Hong Kong/514/2009	2010-11	2013-14
B/Brisbane/60/2008	2009-10	2013-14

### *Tableau 3 : Sérums de furets post-infectieux et souches reçus par les CNR-IPP et -HCL*

En début de saison, les souches et sérums (furets) sélectionnés sont testés par inhibition de l'hémagglutination (IHA) en présence de globules rouges de cobaye. Les nouvelles souches et sérums reçus en cours d'année subissent les mêmes tests.

Une description détaillée des collections d'antigènes, souches et immun-sérums est donnée en annexe 6.

## **2.2.2 Sensibilité aux antiviraux**

Les virus A(H1N1)pdm09 et A(H3N2) sont naturellement résistants aux adamantanes et sensibles aux inhibiteurs de neuraminidase (INA). Les virus de type B ne sont pas ciblés par les adamantanes et sont naturellement sensibles aux INA. L'évaluation de la sensibilité aux antiviraux des souches circulantes récentes a été essentiellement basée tout au long de la saison sur leur caractérisation génétique par séquençage, pyroséquençage ou sur la détection par RT-PCR en temps réel de la présence ou absence de mutations connues pour conférer une diminution de la sensibilité. Un test fluorimétrique permet le dosage de l'activité enzymatique de la neuraminidase et permet ainsi d'apprécier par une méthode phénotypique les variations de sensibilité d'un virus grippal aux INA.

La surveillance et le dépistage de virus influenza potentiellement résistants aux inhibiteurs de la neuraminidase (INA) est réalisé pour une sélection de prélèvements recueillis chez des patients en communauté ou hospitalisés selon la stratégie suivante.

### **Surveillance globale :**

Un échantillonnage des virus grippaux isolés dans le cadre de la surveillance de la population générale, dans les armées ou de patients hospitalisés a été sélectionné en fonction du contexte de la surveillance, GROG ou hôpital, de la situation géographique et en fonction de la caractérisation antigénique des souches.

### **Surveillance rapprochée des cas d'excrétions grippale prolongée :**

Pour les patients hospitalisés, sont sélectionnés les prélèvements de patients présentant une excrétion virale prolongée (> 5 jours) ; les isolats correspondants lorsqu'ils sont obtenus sont testés en test fluorimétrique. Pour les isolats présentant une sensibilité diminuée aux INA le séquençage de la NA est réalisé. Pour les virus A(H1N1)pdm une RT-PCR temps réel différentielle (utilisant des sondes Taqman spécifiques) permet de détecter la mutation de résistance à l'oseltamivir H275Y dans la NA. Celle-ci est utilisée soit sur les isolats soit directement sur les prélèvements ce qui permet d'avoir une information même pour les prélèvements n'ayant pas cultivé.

### **Surveillance des cas graves hospitalisés en réanimation :**

Pour les cas graves hospitalisés en réanimation le séquençage des gènes de la HA et de la NA est réalisé ainsi qu'un test fluorimétrique de sensibilité aux INA sur les virus isolés pour ces patients.

#### **2.2.2.1 Tests génétiques**

##### **Résistances aux adamantanes**

Le séquençage du gène M pour les virus de type A permet de détecter la présence de mutations conférant une résistance aux adamantanes (L26F, V27A/D, A30T, S31N, G34E): tous les virus testés A(H1N1)pdm09 (n=31 CNR-IPP) et A(H3N2) (n=21 CNR-IPP) présentaient une asparagine en position 31 de la séquence de la protéine M2 associé à une résistance à l'amantadine/rimantadine.

## **Résistance aux inhibiteurs de la neuraminidase (INA)**

### **➤ A(H1N1)pdm09**

Au CNR-IPP, la recherche de la mutation H275Y connue pour conférer une résistance élevée à l'oseltamivir mais pas au zanamivir, a été réalisée sur un échantillonnage de prélèvements positifs pour le virus A(H1N1)pdm09 par pyroséquençage, séquençage du gène NA ou encore au moyen de RT-PCR temps réel différentielle avec des sondes spécifiques. 79 isolats et/ou prélèvements, tous hospitaliers ont ainsi été testés par RT-PCR temps réel, 43 provenaient de cas graves (généralement hospitalisés en réanimation).

La mutation 275Y a été détectée pour les prélèvements de 2 patients et une double population 275HY a été détectée chez un troisième patient. Ces 3 patients présentaient tous une immunodépression : d'une part liée à la prise d'immunosuppresseur en raison d'une greffe rénale ou d'un traitement pour leucémie et d'autre part liée à une prématurité.

L'isolement du virus n'a été possible que chez un des patients, en raison de la faible charge virale des prélèvements, et l'analyse phénotypique de la sensibilité aux INA par test fluorimétrique et détermination des IC<sub>50</sub> a confirmé la résistance à l'oseltamivir. Celle-ci a également été confirmée par l'existence de la mutation 275Y détectée par séquençage du gène NA.

Le pyroséquençage réalisé sur 2 des 3 prélèvements a confirmé la présence de la mutation H275Y.

Au CNR-IPG, 6 prélèvements positifs pour le virus A(H1N1)pdm09 ont également été testés par RT-PCR temps réel différentielle: aucune mutation 275Y n'a été détectée.

### **➤ A(H3N2) saisonniers**

Le séquençage du gène N2 permet de détecter la présence de mutations conférant une réduction de la sensibilité à l'oseltamivir E119V, R292K et N294S. Parmi les 54 prélèvements testés, aucune mutation n'a été détectée.

### **➤ Virus de type B**

Le séquençage du gène NA permet de détecter la présence de mutations conférant une réduction de la sensibilité à l'oseltamivir R150K, D197E/N, I221T et G407S. Aucune de ces mutations n'a été identifiée parmi les 16 virus de type B séquencés, 12 B-Yamagata, 2 B-Victoria et 2 non typés.

#### **2.2.2.2 Test fluorimétrique (phénotypique)**

Ce test réalisé en présence de différentes concentrations des antiviraux permet la mesure de l'IC<sub>50</sub> (en nM) qui correspond à la concentration d'antiviral capable d'inhiber 50% de l'activité neuraminidase.

Parmi les virus A(H1N1)pdm09, A(H3N2) et de type B (lignages B-Yamagata et B-Victoria) dont la sensibilité aux INA a été testée (n = 131), seuls 4 ont présenté une réduction de sensibilité à l'oseltamivir (Tableau 4).

	GROG/Hôpital		Autres	
	Sen	Res	Sen	Res
<b>IPP</b>				
A(H1N1)pdm09	19	1	1	0
A(H3N2)	21	0	0	0
B	3	0	0	0
tot	43	1	1	0
<b>HCL</b>				
A(H1N1)pdm09	35	3		
A(H3N2)	31	0		
B	22	0		
tot	88	3	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>131</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>0</b>

Tableau 4 : Résultats des tests phénotypiques de sensibilité à l'oseltamivir (CNR-IPP, -HCL)

Il s'agissait de :

- Un virus A(H1N1)pdm09 isolé d'une patiente de 3 ans traitée pour une leucémie, immunodéprimée, mise sous Tamiflu pendant 5 jours et toujours fébrile. L'analyse phénotypique du virus A/Paris/1823/2014 a révélé une sensibilité très réduite à l'oseltamivir ( $IC_{50}$  oseltamivir = 3000,62 nM) en cohérence avec la détection dans la NA de la substitution H275Y (détectée par la RT-PCR différentielle et confirmée par séquençage)
- Un virus A(H1N1)pdm09 isolé d'un prélèvement d'un patient immunodéprimé pour lequel un mélange de virus sauvage et de virus porteur de la substitution H275Y dans la NA a été détecté (3 jours après le 1<sup>er</sup> prélèvement reçu).
- Un enfant hospitalisé à Lyon pour Déficit Immunitaire Combiné Sévère (DICS) a présenté une excrétion prolongée de virus grippal A(H1N1)pdm09. Cet enfant a reçu un traitement par oseltamivir puis il a reçu du zanamivir IV et à nouveau de l'oseltamivir par voie orale. Sur 26 prélèvements reçus au total à ce jour, un mélange de virus sauvage et muté (substitution H275Y) a été détecté 9 fois coïncidant avec les différents traitements. L'analyse semi-quantitative effectuée a montré une majorité de virus sauvage avec un maximum de 29% de virus muté. Quatorze isolats ont été obtenus, dont 13 ont été testés en fluorimétrie et ils étaient tous sensibles à l'oseltamivir.
- Isolot d'un patient hospitalisé en réanimation à St Etienne ayant une excrétion prolongée de virus influenza A(H1N1)pdm09 malgré un traitement par oseltamivir. Un isolat A/StEtienne/553/2014 a été trouvé avec une  $IC_{50}$  pour l'oseltamivir à 62,5nM; l' $IC_{50}$  pour le zanamivir était de 2,08nM. La mutation responsable de la substitution H275Y n'a pas pu être détectée sur le P0 correspondant à cet isolat. Le séquençage de la NA a montré une mutation AAC → AGC responsable de la **substitution N295S** (et une substitution I288V) par rapport à la séquence de la souche de référence et des autres N1 séquencées pour des virus sensibles à l'oseltamivir de la même saison. La mutation N295S est connue pour conférer une résistance à l'oseltamivir. Le prélèvement du 18.02.2014 après 15 jours de traitement avec le Tamiflu n'a pas permis d'isoler le virus en culture et la RT-PCR différentielle H275Y réalisée sur ce prélèvement n'a pas non plus permis de détecter de mutation.

Aucune évaluation phénotypique de la sensibilité aux antiviraux n'est réalisée au CNR-IPG qui n'effectue pas l'isolement viral.

### **2.2.3 Distribution de matériel biologique**

Les laboratoires du CNR sélectionnent un échantillonnage de souches isolées (IPP, HCL) ou de prélèvements (IPG) d'intérêt (prélèvements ou souches de patients hospitalisés ou vaccinés) mais aussi prélèvements ou souches représentatifs de la circulation (différentes origines géographiques et différents types et sous-types viraux détectés) au cours de la saison de surveillance. Ceux-ci sont envoyés par les CNR-IPP et -HCL au CCOMS de Londres avant la réunion OMS de détermination de la nouvelle composition vaccinale en février et septembre. Les virus isolés à partir des prélèvements issus de la surveillance 2014 à la Réunion (CNR-HCL) ont aussi été envoyés à cette occasion.

Le CNR-IPG a effectué 1 envoi au CCOMS d'Atlanta (CDC) correspondant à l'envoi d'un total de 30 prélèvements positifs pour un virus influenza A ou B en avril 2014.

Le CNR-IPP effectue aussi la diffusion de contrôles synthétiques, de souches virales et de protocoles aux laboratoires qui en font la demande (Liste en annexe 7). Le CNR-HCL a envoyé des cellules MDCK à un laboratoire du réseau RENAL et du sérum de furet à un laboratoire d'analyse vétérinaire.

### 3 Activités de surveillance

En **Métropole**, la saison de surveillance 2013-2014 a été marquée par une épidémie grippale de faible intensité avec un pic épidémique en semaine S07/2014 et la circulation concomitante des deux virus de type A pendant la vague épidémique. Lors de cette saison les virus de type A ont été majoritaires (1595 ; 98%) avec une représentation équivalente de A(H1N1)pdm09 (796 ; 50%) et A(H3N2) (716 ; 45%) ; les virus de type A non typés ne représentaient que 5% (83). Seulement 39 (2%) virus de type B ont été détectés.

Pour la région Antilles-Guyane, l'introduction du virus Chikungunya dans la région détectée en décembre 2013, rapidement suivie par une circulation épidémique de ce virus dès le début d'année 2014 en Martinique a perturbé la surveillance virologique de la grippe : cette saison, le CNR-IPG a reçu de Martinique essentiellement des prélèvements hospitaliers détectés positifs pour un virus de type A en vue de leur sous-typage (53 sur 58). Néanmoins, comme en métropole, les virus de type A ont été largement majoritaires (89,9%) sur l'ensemble de la région Antilles-Guyane avec co-dominance des virus A(H1N1)pdm09 et virus A(H3N2), (46,8% et 53,2% respectivement). Parmi les virus de type B détectés (10,1%), 73,3% appartenaient au lignage Yamagata.

#### 3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

##### 3.1.1 Surveillance en Métropole

###### 3.1.1.1 Réseaux

En métropole, la surveillance de la grippe au cours des infections respiratoires aiguës repose sur différents réseaux : la surveillance dans la population générale via le réseau des GROG et dans les armées via le réseau SMOG, et chez les sujets hospitalisés via le réseau RENAL de laboratoires des Centres Hospitaliers. Les CNR-IPP et -HCL ont établi des relations privilégiées mais non exclusives avec les CHU, les laboratoires des armées et les coordinations régionales du réseau des GROG de la zone géographique correspondante.

###### ➤ **GROG**

Le réseau des médecins vigies présents dans 21 régions se compose de 377 médecins généralistes et 101 pédiatres.

**La France-Nord** comporte 13 régions : Ile de France, Basse Normandie, Centre , Bretagne, Haute-Normandie, Pays de Loire, Picardie, Champagne Ardenne, Bourgogne, Franche Comté, Lorraine, Nord-Pas-de-Calais et Alsace.

**La France-Sud** comporte 8 régions Aquitaine, Auvergne, Languedoc-Roussillon, Limousin, Midi-Pyrénées, Poitou-Charentes, Provence-Alpes-Côte d'Azur et Rhône-Alpes.

Néanmoins, pour des raisons politiques et financières, le réseau régional GROG Limousin a suspendu la surveillance au début de la saison 2010-2011. A la fin du mois de décembre 2013 et jusqu'au mois de mars 2014 quelques médecins ont repris la surveillance virologique et les échantillons cliniques ont été traités par le laboratoire de virologie du CHU de Limoges. Dans chaque région le réseau des GROG dispose d'une coordination régionale et la coordination nationale du réseau est assurée par Open Rome – Paris (Dr Anne Mosnier et Dr Jean-Marie Cohen). Ce réseau qui fonctionne habituellement d'octobre (semaine 40) à fin avril (semaine 15) peut au besoin poursuivre son activité ou être réactivé « hors saison ». Cela a été le cas en 2010 avec une réactivation anticipée en semaine 36 suite à l'observation en 2009 d'une hausse d'infections respiratoires aiguës dès le mois de septembre.

La surveillance épidémiologique repose notamment sur le relevé hebdomadaire de l'activité médicale, du nombre d'infections respiratoires aiguës (IRA), du nombre de gripes cliniques (ILI, mis en place depuis 2009-2010 dans le cadre du réseau unifié) et de bronchiolites observées ainsi que sur le nombre de certificats d'arrêt de travail courts prescrits.

La représentativité des médecins du réseau GROG est décrite dans le tableau 5 (Source Réseau des GROG) et leur répartition géographique est représentée Figure 2.

	Médecins généralistes (% de représentativité <sup>1</sup> )	Pédiatres (% de représentativité <sup>1</sup> )	SMOG Médecins militaires (Nombre d'unités)	Médecins d'urgence (Nombre d'associations SOS)
Alsace	15 (0,73)	14 (13,59)		2
Aquitaine	13 (0,33)	1 (0,78)	1	3
Auvergne	9 (0,68)	11 (34,38)	1	1
Basse-Normandie	17 (1,26)	3 (13,04)		2
Bourgogne	39 (2,75)		1	3
Bretagne	16 (0,48)	1 (1,09)	3	6
Centre	11 (0,51)	2 (2,53)	2	3
Corse	-	-	-	-
Champagne-Ardenne	9 (0,71)	3 (7,89)	1	3
Franche-Comté	12 (0,99)	1 (3,23)	1	1
Haute-Normandie	8 (0,48)	4 (8,51)	1	1
Ile de France	40 (0,38)	9 (1,12)	3	7
Languedoc-Roussillon	4 (0,12)		2	2
Limousin			1	1
Lorraine	20 (0,87)	5 (6,10)	3	1
Midi-Pyrénées	23 (0,69)	7 (4,73)	1	1
Nord-Pas-de-Calais	17 (0,40)	2 (2,27)	1	3
Pays de la Loire	18 (0,53)	2 (2,60)		2
Picardie	19 (1,13)			3
Poitou-Charentes	19 (1,03)	2 (5,71)	2	1
PACA	29 (0,45)	15 (4,90)	4	6
Rhône-Alpes	39 (0,62)	19 (7,36)	2	5
<b>FRANCE</b>	<b>377 (0,59)</b>	<b>101 (3,90)</b>	<b>30</b>	<b>54</b>

Démographie médicale, source : DREES estimation des médecins au 1<sup>er</sup> janvier 2012, publiée en février 2012

<sup>1</sup> Les pourcentages de représentativité sont établis par rapport au nombre de praticiens de la zone considérée

*Tableau 5 : Composition du Réseau des GROG par catégorie de vigie et par région France, saison 2013-2014 (du 16 septembre 2013 au 13 avril 2014). Source : Réseau des GROG*

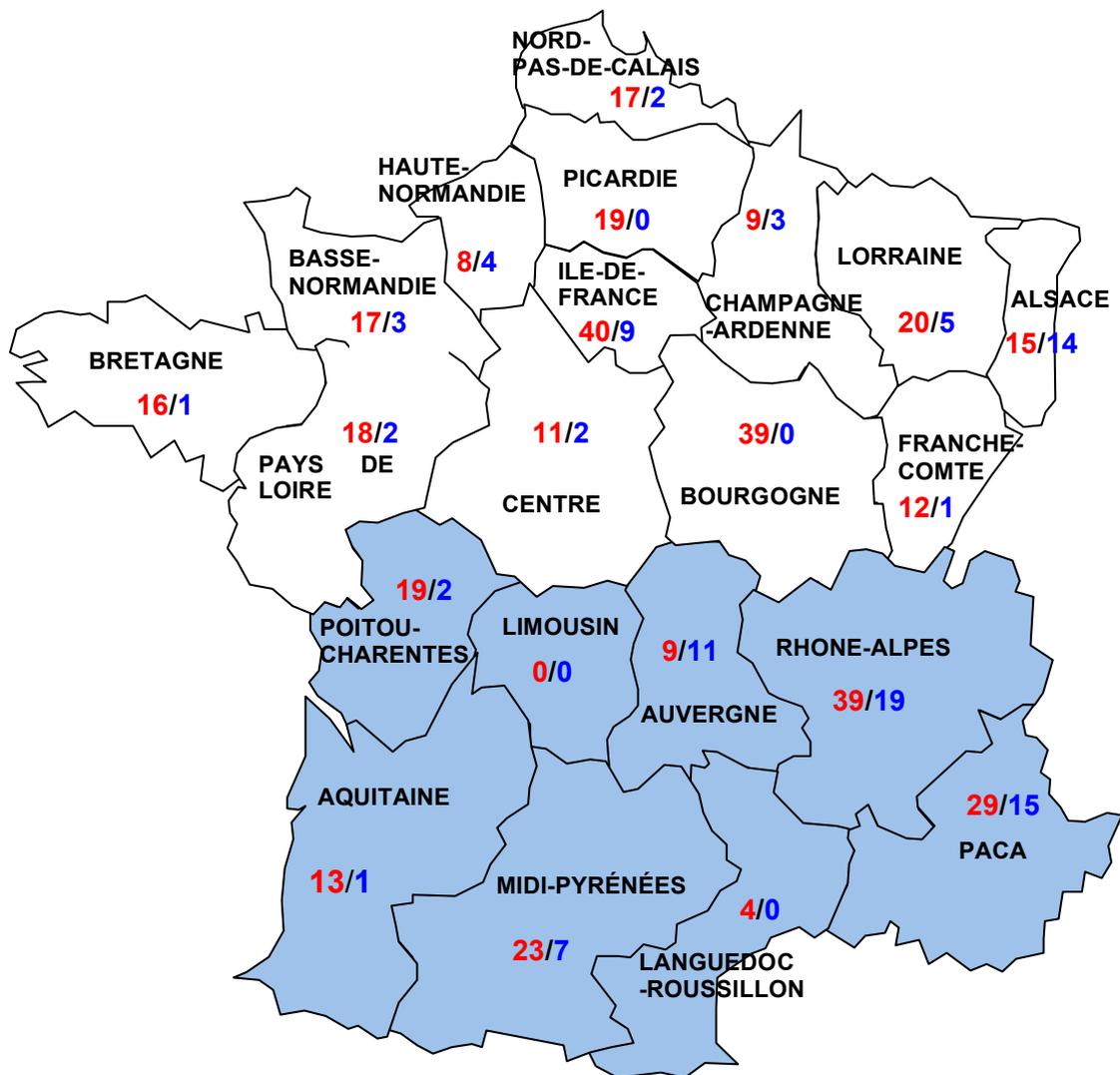


Figure 2 : Représentation géographique du réseau des GROG  
 X/Y : rouge, nombre de médecins généralistes ; bleu, nombre de pédiatres  
 Régions blanches : France-Nord / Régions bleues : France-Sud

➤ **Armées**

Le réseau de surveillance SMOG est représenté par Bordeaux, Lyon, Marseille, Toulon, Brest, Metz, et Paris.

➤ **RENAL**

Ce Réseau National des laboratoires hospitaliers comporte :

- en **France-Nord**, 29 CHU ou CHR qui fonctionnent toute l'année :

IDF (H. Necker, H. Trousseau, C.H.U. Kremlin Bicêtre, C.H.U. Avicenne, H. St Louis, H. Antoine Beclère, HIA Begin, H. St Jacques, H. Robert Debré, H. Robert Ballanger, H. St Vincent de Paul, H. Robert Ballanger, Groupe Hospitalier La Pitié Salpêtrière, H. Mignot), Rennes, Nantes, Strasbourg, Lille, Amiens, Reims, Dijon, Brest, Rouen, Tours, Nancy, Angers, Orléans et Caen.

Depuis 2008, pour la France Nord, le recueil hebdomadaire des données est réalisé tout au long de l'année grâce à la mise en place d'un site internet dédié à accès sécurisé.

- en **France-Sud**, 14 CHU ou CHR (Aix-en-Provence, Annecy, Bordeaux, Chambéry, Clermont-Ferrand, Grenoble, Limoges, Lyon, Marseille, Montpellier, Nice, Poitiers, St Etienne, Toulouse) qui fonctionnent toute l'année et fournissent leurs données de surveillance virologique et sérologique. La surveillance se fait de façon hebdomadaire jusqu'au mois d'avril puis à un rythme mensuel de mai à septembre.

Le réseau RENAL fournit ainsi des données virologiques et sérologiques pour les infections respiratoires vues à l'hôpital. Sont recueillis pour les virus grippaux ainsi que pour d'autres pathogènes respiratoires viraux ou bactériens, le nombre de tests réalisés et ceux trouvés positifs. La liste des pathogènes pour lesquels les données sont collectées est donnée dans le tableau 14.

	Région Nord	Région Sud
V. grippal A NT	X	X
V. grippal A/H3 saisonnier	X	X
V. grippal A/H1N1 pdm09	X	X
V. grippal B	X	X
Lignage B Yamagata/Victoria	X	X
Parainfluenza	X	X
VRS	X	X
ADV	X	X
HSV		X
CMV		X
Myc. Pneumoniae	X	X
Chlamydia	X	X
Rhinovirus humain	X	X
Entérovirus	X	X
HMPV	X	X
HBoV	X	
Coronavirus	X	
FQ	X	

*Tableau 6 : Liste des pathogènes*

*Données relatives à la détection et à la sérologie collectées dans le cadre du réseau RENAL.*

### **3.1.1.2 Les prélèvements**

Les laboratoires CNR-IPP et -HCL traitent les prélèvements qui leur sont adressés pour l'ensemble des régions respectives de France Nord et France Sud (Figure 2).

La méthode de prélèvement par écouvillonnage est décrite en annexe 8.

Dans le cadre du réseau des GROG, pendant la période de circulation épidémique un protocole de prélèvement développé en concertation avec l'InVS est appliqué. Une tranche d'âge spécifique est attribuée à chacun des médecins généralistes et pédiatres et ceux-ci prélèvent chaque semaine le premier patient (ou à défaut le patient suivant) de la semaine présentant un syndrome grippal. Ce «protocole de prélèvement permet en prenant en compte la patientèle de chacun des médecins vigies, et par extension de la population surveillée, de déterminer l'impact de la grippe dans la population en métropole.

### 3.1.1.3 Données d'activité médicale et sanitaire

Parmi la cinquantaine d'indicateurs recueillis par le réseau national des GROG, c'est l'analyse de l'évolution des infections respiratoires aiguës (IRA) qui est la plus pertinente, surtout quand elle peut être confrontée à l'évolution des cas de grippe confirmés au laboratoire, et ce à partir de la même source (Figure 3). Parallèlement, à la demande de l'InVS, depuis la saison 2011-2012, l'indicateur « grippe clinique » définie par une fièvre supérieure à 39°C d'apparition brutale, accompagnée de myalgies et de signes respiratoires est recueilli. Ces données sont mises en commun avec celles collectées par le réseau Sentinelles dans le cadre du réseau unique de surveillance de la grippe.

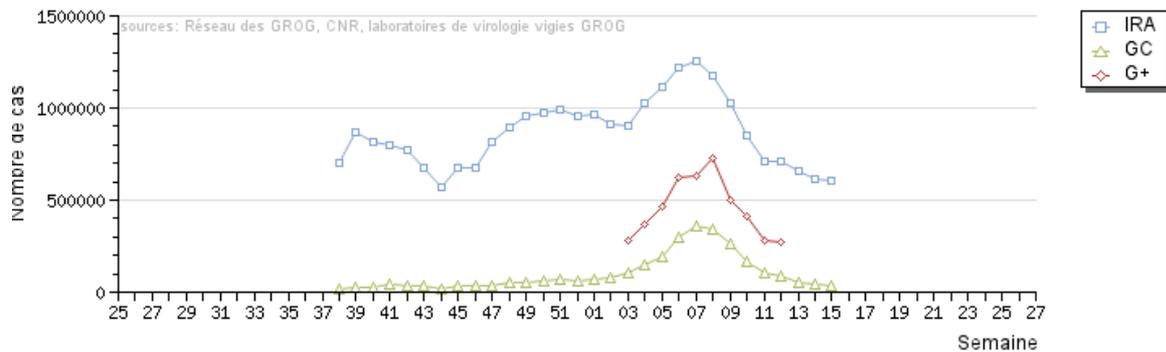


Figure 3 : IRA, Grippe Clinique (GC) et Grippe confirmée virologiquement (G+) Médecine générale et pédiatrie (Source GROG Réseau National)-Période 2013/25-2014/27

L'impact des IRA dans l'activité des médecins généralistes vigies est restée à des valeurs habituelles et modestes jusqu'à la mi-décembre. La part des IRA a ensuite progressé en deux vagues d'ampleur modérée : la première coïncidant avec l'intensification de la circulation du VRS entre les semaines 47/2013 et 03/2014 et la seconde, concomitante à l'intensification de la circulation grippale en France, entre les semaines 04/2014 et 09/2014 (Figure 3). Les valeurs observées sont toutefois toujours restées à des niveaux déjà observés au cours d'épidémies de grippe saisonnière antérieures (Figure 4).

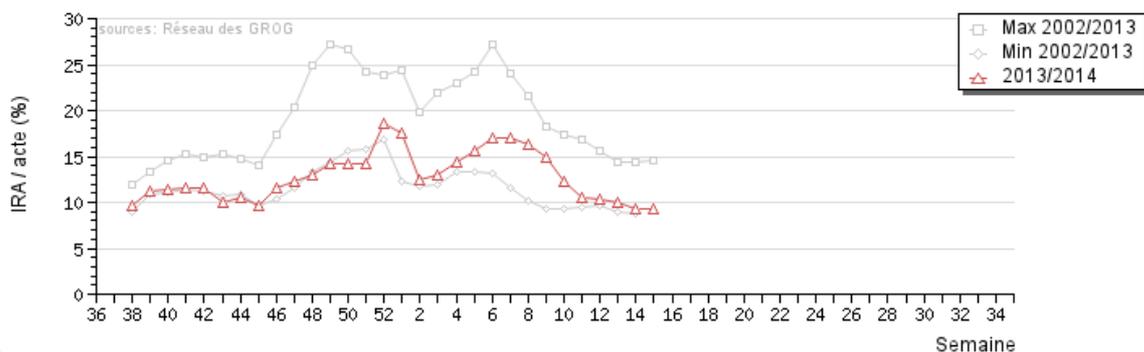


Figure 4 : IRA en Médecine Générale France 2013-14 Comparaison avec les maxima et minima enregistrés au cours des mêmes semaines depuis 2002 (Source GROG Réseau National)

Comme le montre la répartition par tranche d'âge des IRA (Figure 5), l'impact a été plus marqué chez les moins de 14 ans tandis qu'il restait faible chez les 15-64 ans et les personnes de 65 ans et plus. On note également pour la tranche d'âge des jeunes enfants de 0-4 ans, un taux d'IRA élevé au début de la saison (semaines 38/2013 à 43/2013), juste avant l'épidémie de VRS, vraisemblablement attribuable à la circulation de rhinovirus.

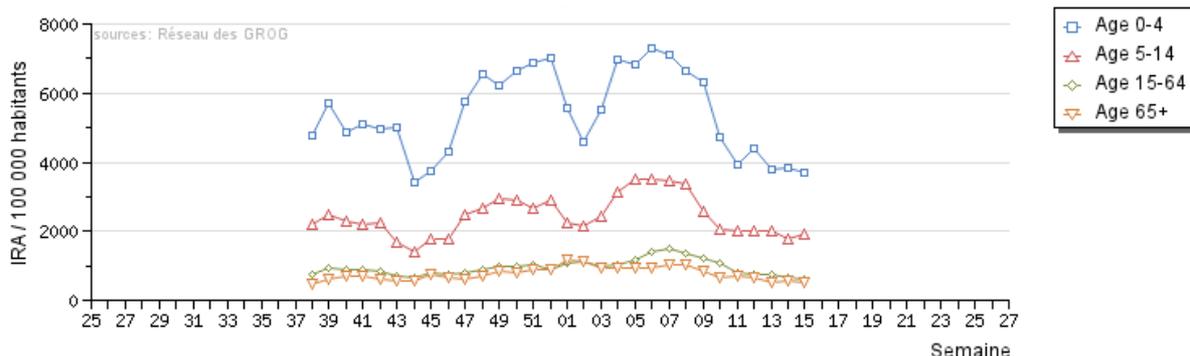


Figure 5 : IRA par tranches d'âge en France  
Médecine générale et pédiatrie – saison 2013-2014

### 3.1.1.4 Surveillance virologique

➤ **Chronologie et distribution géographique du nombre des isollements/détections de virus grippaux et de VRS en France métropolitaine**

Au plan virologique, la saison 2013-2014 présente, comme souvent, une dissociation de la circulation épidémique des VRS et des virus grippaux. Les VRS ont circulé de façon épidémique entre les semaines S43/2013 et S07/2014 alors que la circulation épidémique des virus grippaux a débuté en semaine S02/2014 pour se terminer semaine S14/2014. L'épidémie de VRS pour la France-Sud a débuté 4 semaines après la France-Nord. En revanche, comme la saison précédente, l'épidémie grippale a débuté quasiment au même moment, aux alentours de la semaine S02 /2014 (Figures 6 à 8).

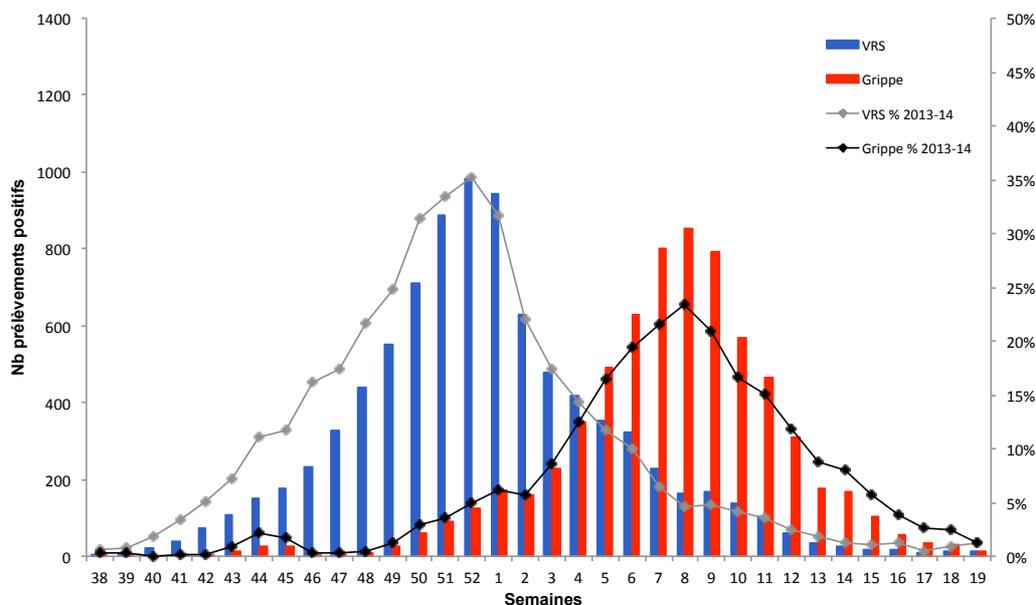


Figure 6 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France  
Réseaux GROG et RENAL / saison 2013-2014

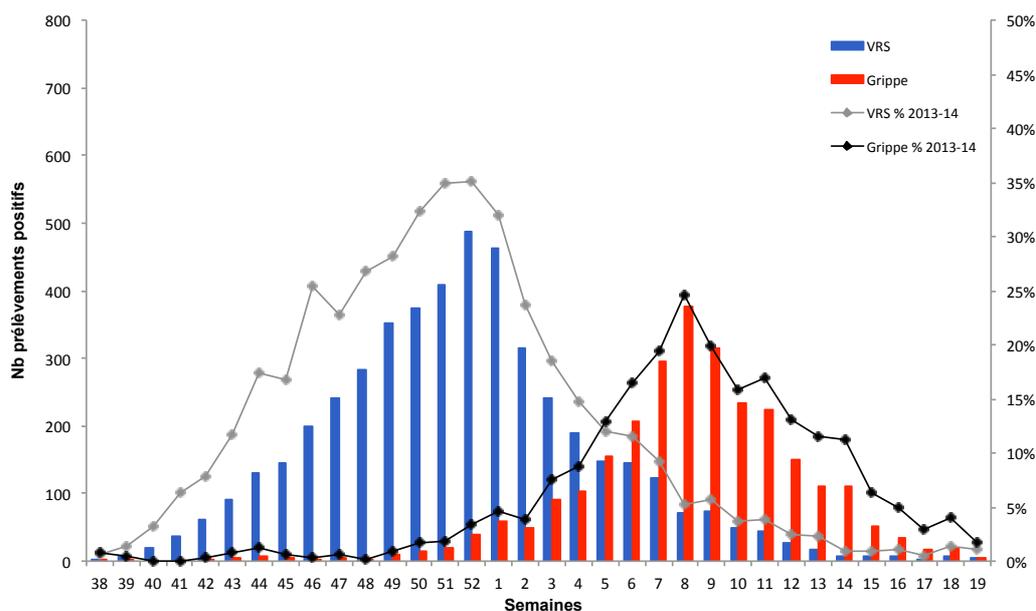


Figure 7 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France-Nord Réseaux GROG et RENAL / saison 2013-2014

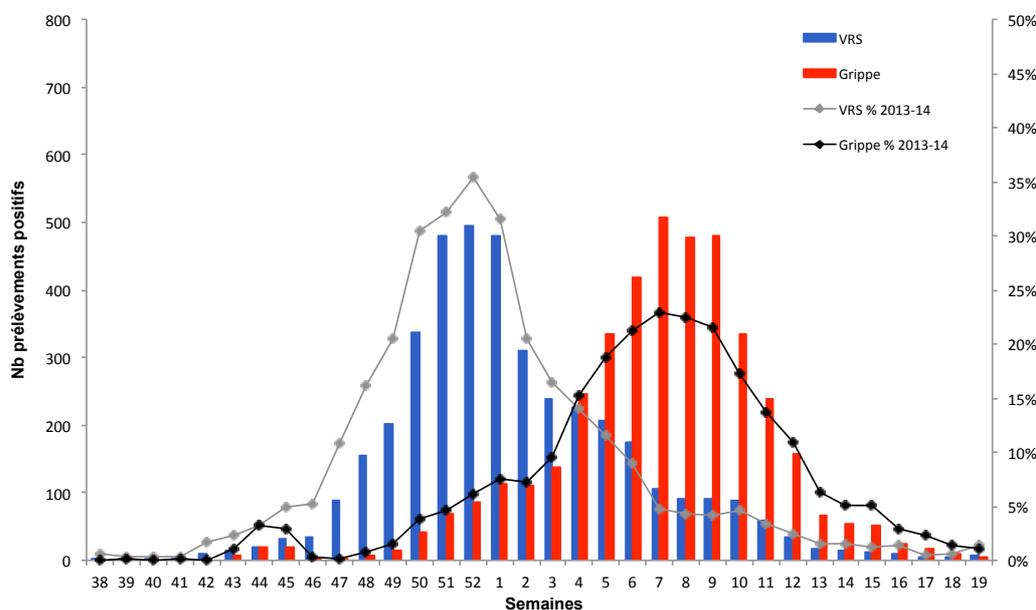


Figure 8 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France-Sud Réseaux GROG et RENAL / saison 2013-2014

Au cours de la saison de surveillance 2013-2014, les détections de virus grippaux dans les prélèvements GROG sont restées sporadiques jusqu'à début décembre et concernaient les 3 types viraux, A(H3N2), A(H1N1)pdm09 et B, sans virus dominant. Les détections de virus des deux sous-type A ont ensuite augmenté de façon quasi concomitante, entraînant une vague épidémique saisonnière à 2 virus. Parmi les prélèvements positifs, les virus grippaux A(H1N1)pdm09 et A(H3N2) ont représenté respectivement 53,2 % et 42,6 % des détections

(Figure 9 à 11). Le seuil épidémique tel que défini par le Réseau des GROG a été franchi pendant 6 semaines, de mi-janvier (S04/2014) à fin février (S09/2014), avec un pic début février (S07/2014). Le taux de prélèvements positifs pour la grippe a dépassé les 10 % de la mi-décembre à mi-avril, mais ne s'est renforcé (>30 %) qu'au début de l'année 2014. Au pic épidémique, plus d'un prélèvement GROG sur deux (55 %) était positif pour la grippe.

A l'échelle régionale, les virus grippaux ont été actifs au cours de la même période dans toutes les régions, mais l'impact de l'activité grippale a été un peu plus fort dans le Sud-Est de l'hexagone.

A l'hôpital, les mêmes tendances sont retrouvées avec des taux de détection plus faibles que ceux observés dans le cadre du réseau des GROG, environ 20 % de détections de virus grippaux au pic épidémique. Seuls 26 % des virus de type A sont sous-typés. En effet, la grande majorité des laboratoires hospitaliers utilise des techniques de détection capables d'identifier les virus de type A et B et de sous-typer uniquement les virus de type A(H1N1)pdm09. Les virus A(H3N2) restent donc non sous-typés en grande majorité. Ce sous-typage ciblé des virus de type A(H1N1)pdm09 dans de nombreux laboratoires hospitaliers, ne permet pas d'évaluer en temps réel l'évolution épidémiologique des virus de type A. (réseau RENAL - Figures 12 à 14 ; GROG et RENAL - Figures 15 à 17)

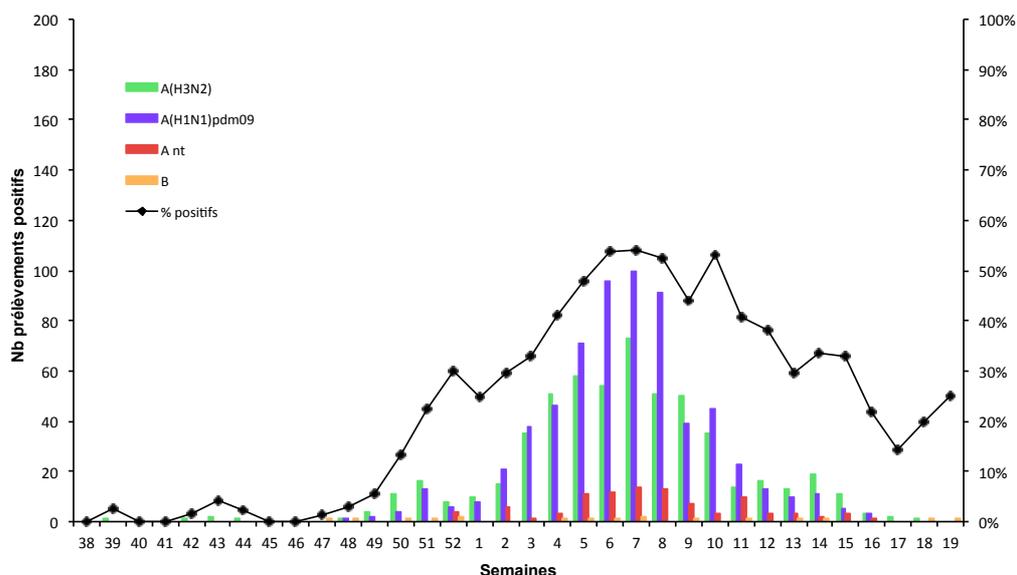


Figure 9 : Détection des virus grippaux en France Réseau des GROG / saison 2013-2014

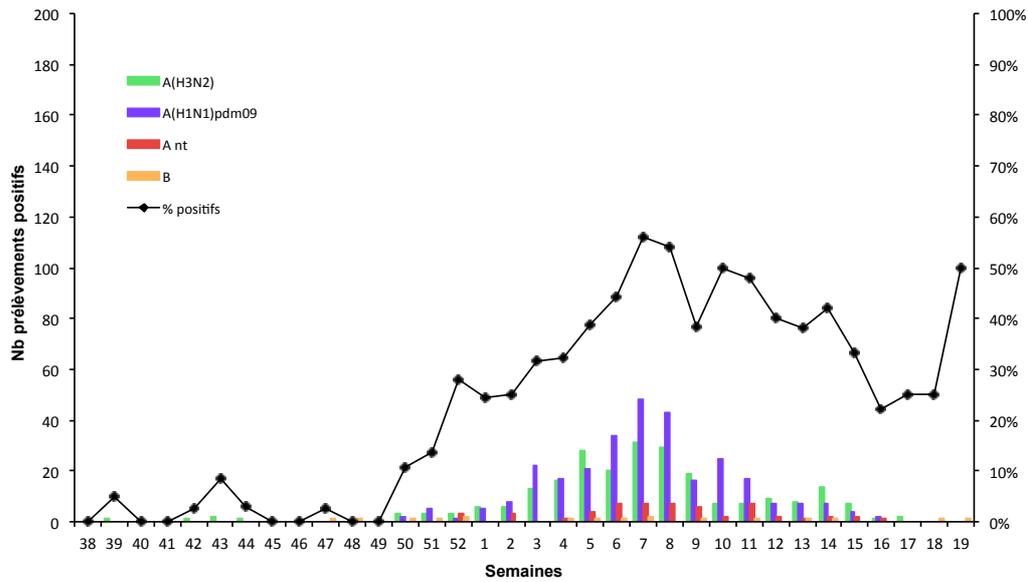


Figure 10 : Détection des virus grippaux en France-Nord  
Réseau des GROG / saison 2013-2014

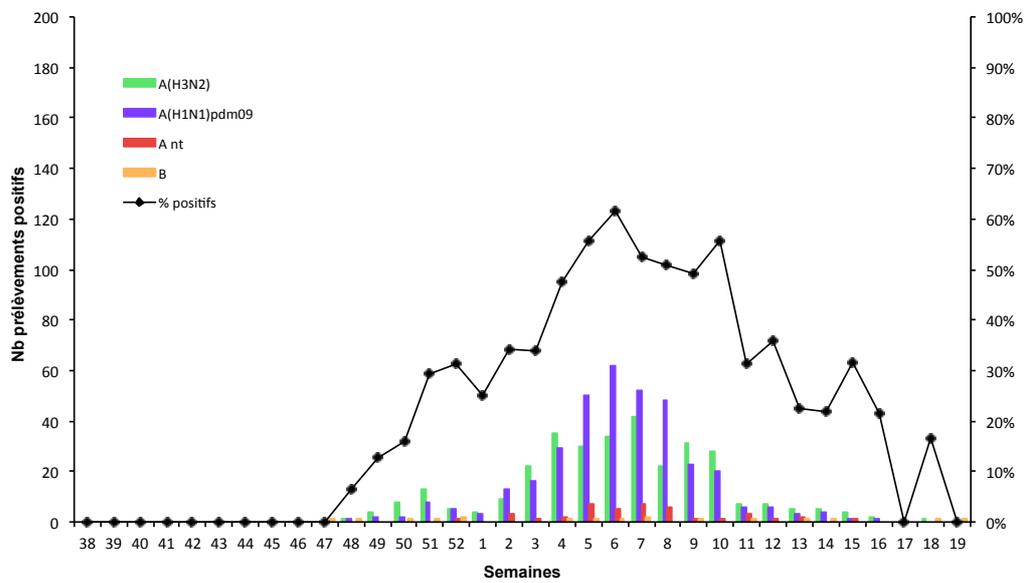


Figure 11 : Détection des virus grippaux en France-Sud  
Réseau des GROG / saison 2013-2014

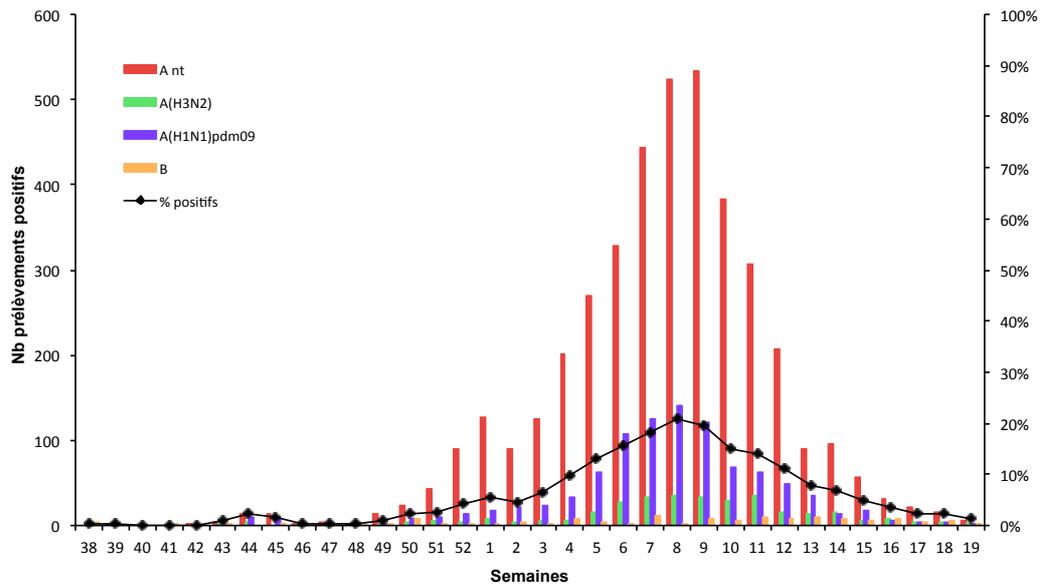


Figure 12 : Détection des virus grippaux en France Réseau RENAL / saison 2013-2014

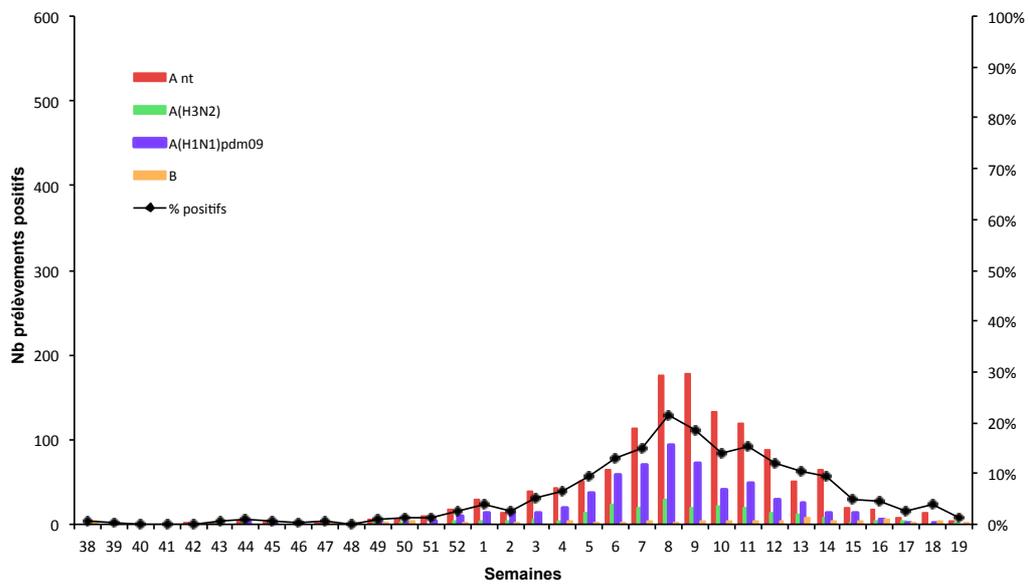


Figure 13 : Détection des virus grippaux en France-Nord Réseau RENAL / saison 2013-2014

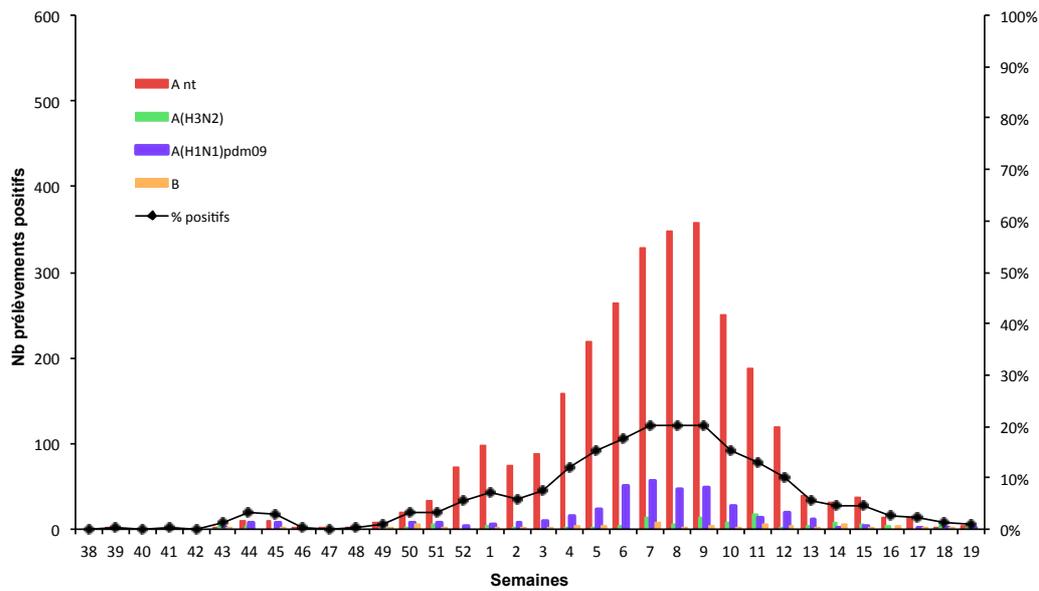


Figure 14 : Détection des virus grippaux en France-Sud Réseau RENAL / saison 2013-2014

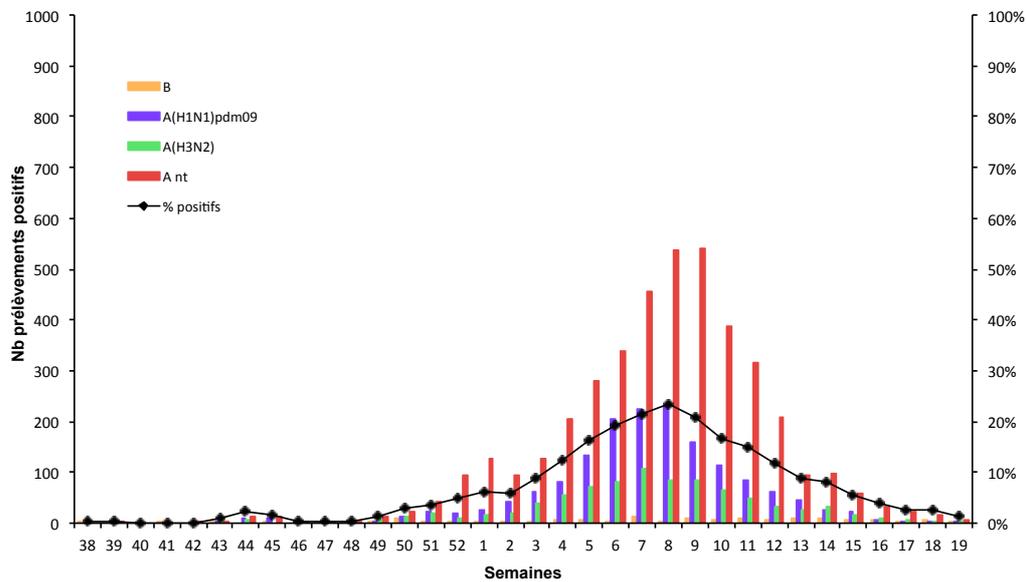


Figure 15 : Détection des virus grippaux en France Réseaux GROG et RENAL / saison 2013-2014

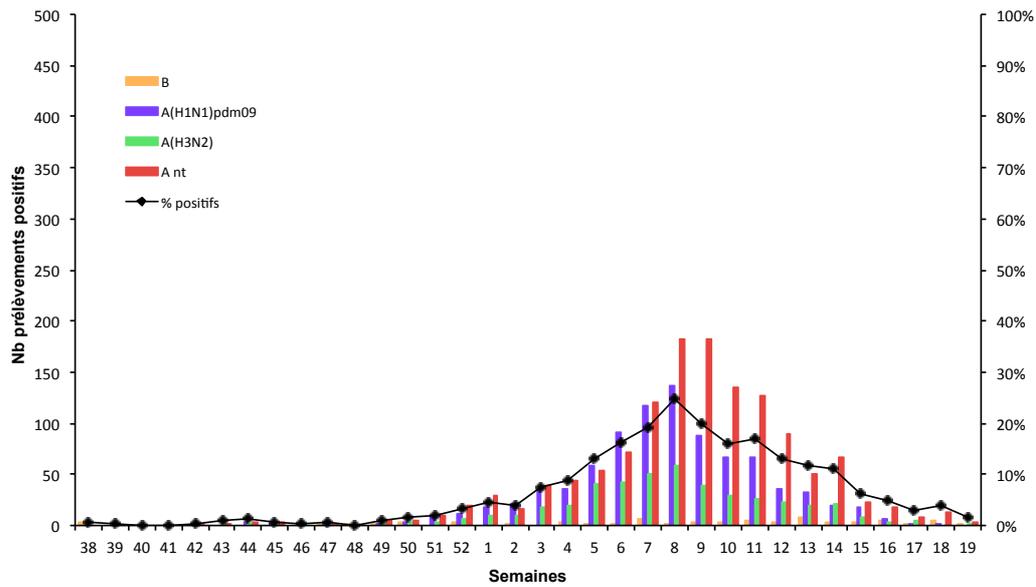


Figure 16 : Détection des virus grippaux en France-Nord  
Réseaux GROG et RENAL / saison 2013-2014

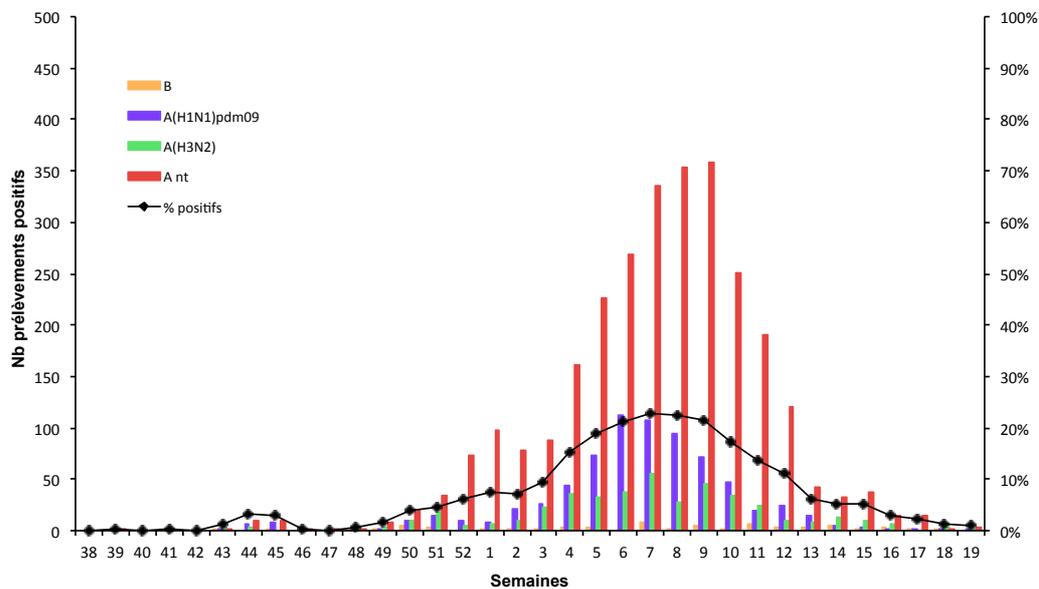


Figure 17 : Détection des virus grippaux en France-Sud  
Réseaux GROG et RENAL / saison 2013-2014

### ➤ **Caractérisation antigénique des virus grippaux**

L'identification des virus grippaux est réalisée sur les virus isolés en culture cellulaire (MDCK) par inhibition de l'hémagglutination (IHA) à l'aide de sérums de furet spécifiques, de sérums de mouton fournis dans le kit de l'OMS voire des sérums de lapin hyperimmuns préparés par le CNR.

Les CNR-IPP et -HCL ont analysé par IHA un total de (267 pour le Nord) virus grippaux parmi les virus isolés lors de la surveillance du GROG dans la population générale ou dans les armées ou de patients hospitalisés ou de personnes âgées vivant en collectivité. Ces souches sont issues de prélèvements des différentes régions de France.

Ainsi au total, 259 virus grippaux de type A dont 187 virus A(H1N1)pdm09, 72 virus A(H3N2) et 8 virus de type B (lignage B-Yamagata) ont été caractérisés.

#### **Virus A(H3N2)**

Au total, 72 isolats A(H3N2) ont été caractérisés par IHA, montrant qu'ils étaient en grande majorité apparentés à la souche vaccinale A/Texas/50/2012.

La caractérisation antigénique des virus A(H3N2) est rendue difficile par l'activité hémagglutinante de la NA qui interfère avec l'activité de la HA. La réalisation de l'IHA en présence d'oseltamivir qui inhibe l'activité de la NA permet de pallier cette difficulté mais résulte parfois en une réduction du titre hémagglutinant qui ne permet plus la caractérisation de ces virus par IHA.

#### **Virus A(H1N1)pdm09**

Au total, 418 isolats A(H1N1)pdm09 ont été caractérisés par IHA par les laboratoires du CNR. Ils restent antigéniquement proches des virus de la saison 2011-2012 et apparentés à la souche vaccinale A/California/7/2009.

#### **Virus B**

Parmi les isolats de virus de type B, 453 ont été caractérisés par IHA par les laboratoires du CNR. La majorité (80 %) appartenait au lignage B-Yamagata et était antigéniquement différent du virus vaccinal B/Wisconsin/1/2010 et proche du virus B/Estonia/55669/2011 pour le CNR-IPP et du virus B/Lyon/1087/2011 pour le CNR-HCL. On remarque que les souches isolées cette année sont toujours reconnues par le sérum dirigé contre le virus B/Florida/4/06.

L'ensemble des virus du lignage B-Victoria était antigéniquement apparenté à la souche B/Brisbane/60/08 mis à part quelques virus qui se sont avérés plus proches de la souche de référence B/Hong Kong/514/09.

### ➤ **Caractérisation génétique des virus grippaux isolés en France**

Le séquençage conventionnel des virus a été réalisé pour une sélection de virus représentative des virus ayant circulé en France au cours de la saison 2013-2014. Le pyroséquençage est aussi une technique utilisée au laboratoire pour séquencer rapidement de petites régions d'intérêt au niveau desquelles des mutations peuvent se traduire par des substitutions connues responsables d'une diminution de sensibilité aux antiviraux ou de nouveaux phénotypes.

Pour les CNR-IPP et -HCL, 139 virus ont été séquencés sur 2 à 4 segments :  
71 A(H1N1)2009 (gènes M n = 32; HA n = 71; NA n = 70) + 14 pyroséquençages  
57 A(H3N2) (gènes M n = 34; HA n = 57, NA n = 56) + 27 pyroséquençages  
11 B-Yam (gènes M n = 5; gènes BHA n = 11; BNA n = 11).

Les analyses phylogénétiques figurent en annexe 9.

Par ailleurs, des substitutions ont été spécifiquement recherchées en dehors des mutations associées à une diminution de sensibilité aux antiviraux.

Il s'agit notamment de la substitution D222G dans la HA des virus A(H1N1)pdm09. 21 échantillons provenant de patients hospitalisés ont été analysés au CNR-IPP:

Chez 2 patients admis en réanimation à Rennes en février 2014, les mutations D222N et D222G ont été détectées séparément par séquençage de la HA. Ces mutations sont connues pour être uniquement détectées chez des cas sévères.

### ➤ **Distribution par âge des cas de grippe virologiquement confirmés (GROG)**

Comme le montre le tableau 7, au cours de l'hiver 2013-14, ce sont les sujets de plus de 5 ans qui ont été les plus touchés avec un impact qui a tendance à augmenter avec l'âge, de 36,7 % pour la tranche d'âge 15-64 à 41,7 % chez les sujets de plus de 65 ans.

Dans la surveillance en médecine de ville les virus de type A(H1N1)pdm09 et A(H3N2) ont co-circulé de façon équivalente, respectivement 53,2 % et 42,6% sur l'ensemble du territoire. Les virus de type B ont circulé de façon sporadique (4,2%). Parmi les virus de type B, le lignage B-Yamagata a été détecté majoritairement.

Les virus A(H1N1)pdm09 ont prédominé chez les sujets de 15 à 64 ans (59,9 %) alors que les virus A(H3N2) ont prédominé dans les autres tranches d'âges, de 56,7 % chez les enfants de moins de 15 ans à 67,2 % chez les sujets de plus de 65 ans (Tableau 8).

### **France métropolitaine**

Age	Nb Prlvt	Nb Grippe +	% de + dans la tranche âge	% du groupe d'âge/total	% + /total +
0-4	1030	298	28,9	37,0	30,8
5-14	522	209	<b>40,0</b>	18,7	21,6
15-64	1096	402	<b>36,7</b>	39,3	41,6
>65	139	58	<b>41,7</b>	5,0	6,0
Total	2787	967		100	100

*Tableau 7 : Distribution par âge des patients– Réseau GROG  
Prélèvements réalisés dans le cadre du Réseau GROG et trouvés positifs pour la grippe en France / Saison 2013-2014*

Age	Nb Grippe +	Nb grippe A non sous-typé	(%)	Nb grippe A H1pdm09	(%)	Nb grippe A/H3	(%)	Nb grippe B	(%)	total
0-4	295	1	0,3	147	49,8	145	49,2	2	0,7	100
5-14	208			89	42,8	118	56,7	1	0,5	100
15-64	406	3	0,7	242	59,9	150	37,2	9	2,2	100
>65	58	1	1,7	16	27,6	39	67,2	2	3,4	100
Total	967	5	0,5	495	51,2	453	46,8	14	1,5	

Tableau 8 : Distribution par tranche d'âge et par type viral - Réseau GROG  
Prélèvements réalisés dans le cadre du Réseau GROG et trouvés positifs pour la grippe en France / Saison 2013-2014

### ➤ Cas de grippe confirmés virologiquement chez des personnes vaccinées

Lors de la saison 2013-2014, parmi les prélèvements de patients pour lesquels le statut vaccinal était connu (95,2 % des patients GROG), 6,1 % seulement provenaient de patients vaccinés (toujours inférieur aux 11,7 % de vaccinés parmi les patients prélevés de la saison 2008-2009 et très proche des 7,08 % de la saison 2012-2013) (Tableau 9). Le pourcentage de détection de grippe était de 31,5 % parmi les vaccinés et de 35,4 % chez les non vaccinés, valeurs peu fluctuantes d'une année sur l'autre.

#### France métropolitaine

Statut	Grippe +		Grippe -		Effectif	
	Nbre	(%)	Nbre	(%)	Nbre	(%)
Vaccinés	57	6,1	124	7,2	181	6,8
Non Vaccinés	877	93,9	1595	92,8	2472	93,2
Total	934		1719		2653	

Tableau 9 : Statut vaccinal - Distribution des virus grippaux détectés au CNR Réseau GROG / saison 2013-2014

Parmi les personnes prélevées dans le cadre du réseau GROG, le pourcentage de vaccinés est resté très faible dans les tranches d'âge inférieures à 65 ans (2,2 à 6,3 %). Pour les plus de 65 ans, qui correspondent traditionnellement à la tranche d'âge la mieux vaccinée, les prélèvements réalisés chez les vaccinés ont représenté 51,9 %, valeur en hausse par rapport à l'année dernière (saison 2012-2013 45,4 %) (Tableau 10).

Age (ans)	0-4	(%)	5-14	(%)	15-64	(%)	≥65	(%)
Vaccinés	35	3,5	11	2,2	65	6,3	70	51,9
Non Vaccinés	955	96,5	486	97,8	966	93,7	65	48,1
Total	990		497		1031		135	

Tableau 10 : Statut vaccinal - Distribution par tranche d'âge  
Nombre de prélèvements de patients testés au CNR - Réseau GROG / saison 2013-2014

### 3.1.1.5 Contribution à la surveillance microbiologique et épidémiologique des autres agents pathogènes responsables d'infections respiratoires aiguës

Les données concernant les autres pathogènes responsables d'infections respiratoires aiguës sont essentiellement recueillies par le biais du réseau RENAL et correspondent majoritairement aux détections/isolements réalisés en milieu hospitalier à l'exception du VRS et des rhinovirus qui sont également systématiquement recherchés dans les prélèvements provenant de la surveillance en médecine de ville du réseau des GROG.

#### ➤ VRS

Les circulations épidémiques du VRS et des virus grippaux ont été dissociées. Comme la saison dernière, le VRS a circulé de façon épidémique au cours des mois d'octobre à février/mars avec un retard d'environ 3 semaines pour la région sud (Figures 18 à 20). Sa circulation au cours de la saison a été légèrement moins intense que l'année dernière, avec un début d'épidémie moins brutal et un réel pic épidémique en semaine S52/2013.

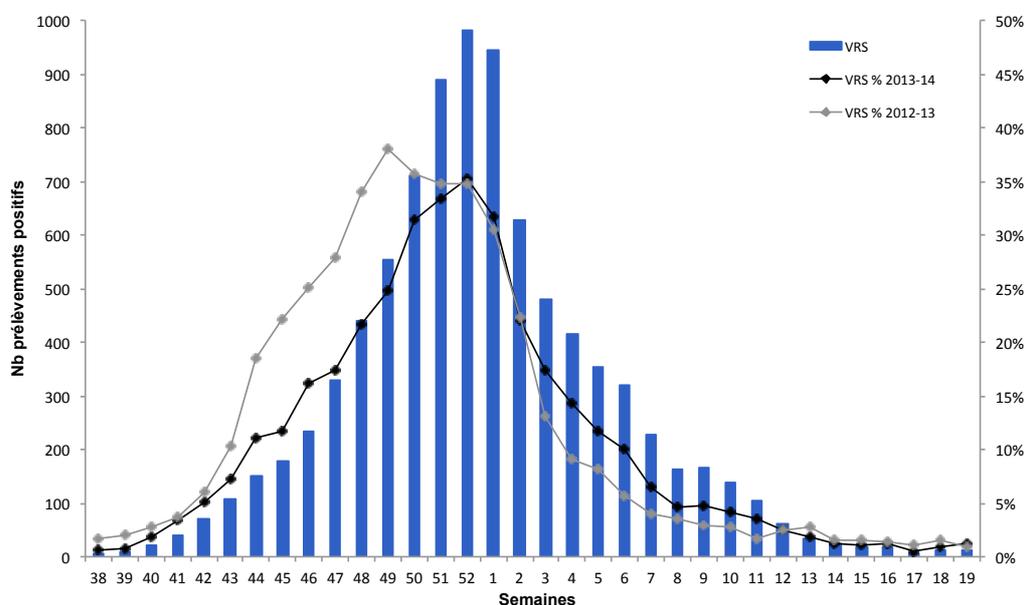


Figure 18 : Détection du VRS en France  
Réseaux GROG et RENAL / saison 2013-2014

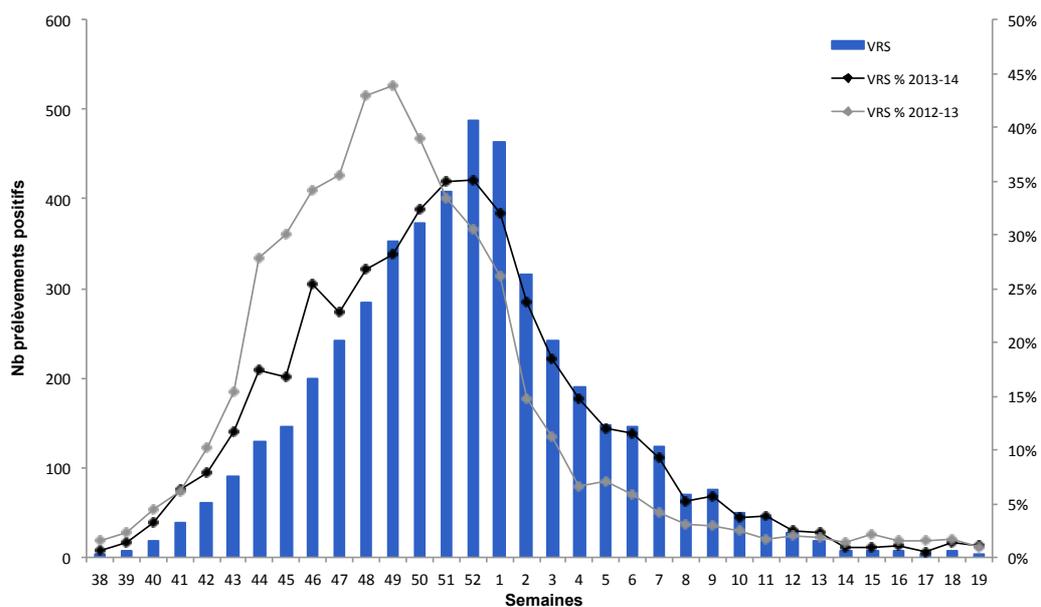


Figure 19 : Détection du VRS en France-Nord  
Réseaux GROG et RENAL / saison 2013-2014

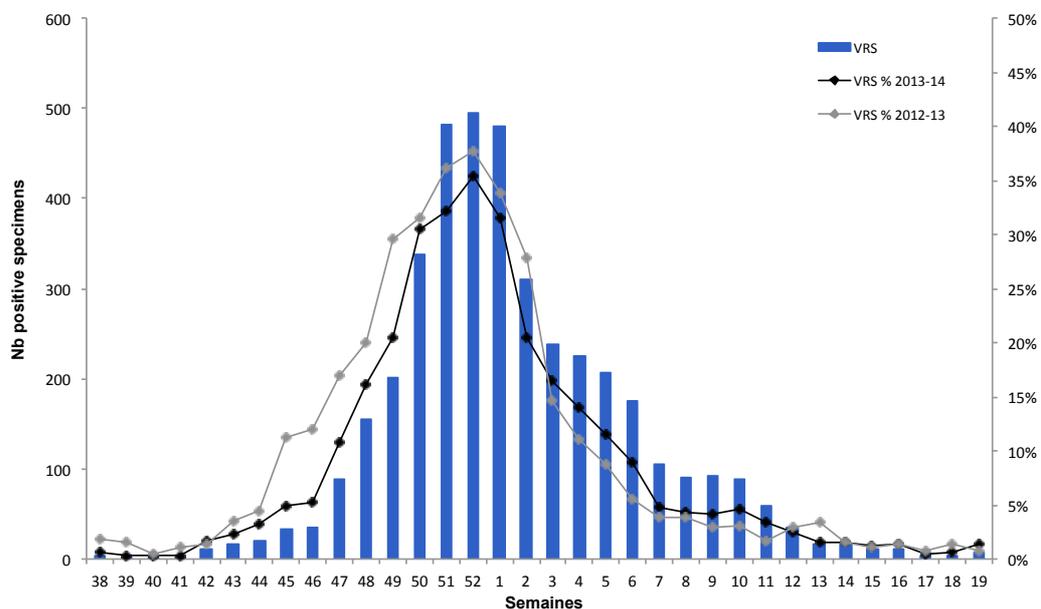


Figure 20 : Détection du VRS en France-Sud  
Réseaux GROG et RENAL / saison 2013-2014

➤ **Rhinovirus humains**

Les rhinovirus ont été détectés de façon quasiment continue tout au long de la saison 2013-2014. Leur circulation a diminué dans un premier temps lors de l'épidémie de VRS (S43/2013-S07/2014) et ils se sont maintenus à un taux faible tout au long de l'épidémie de grippe (S02/2014-S14/2014) (Figure 21 à 23).

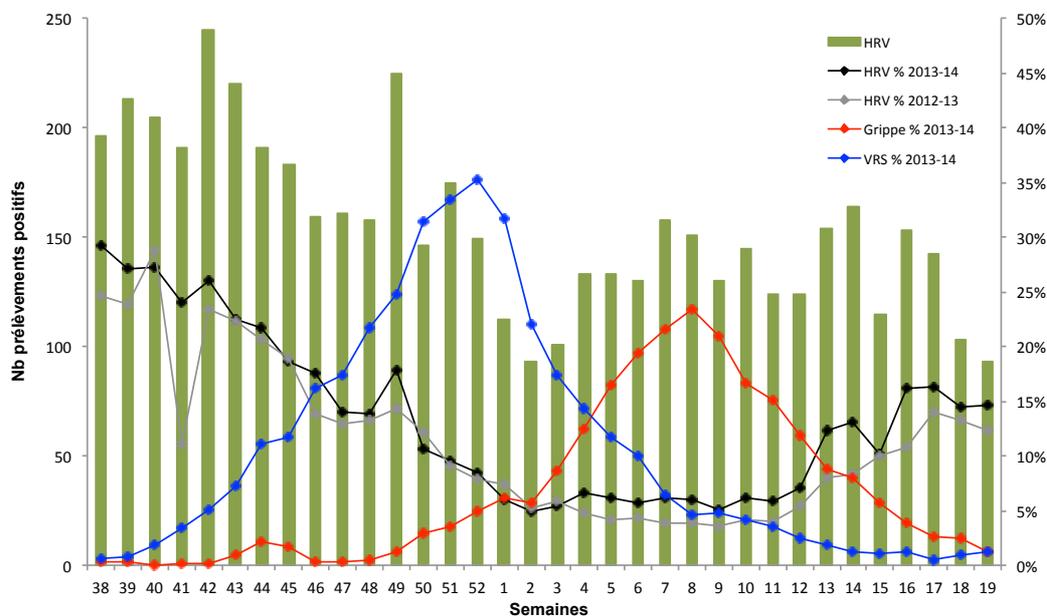


Figure 21 : Détection des rhinovirus humains en France Réseaux GROG et RENAL / saison 2013-2014

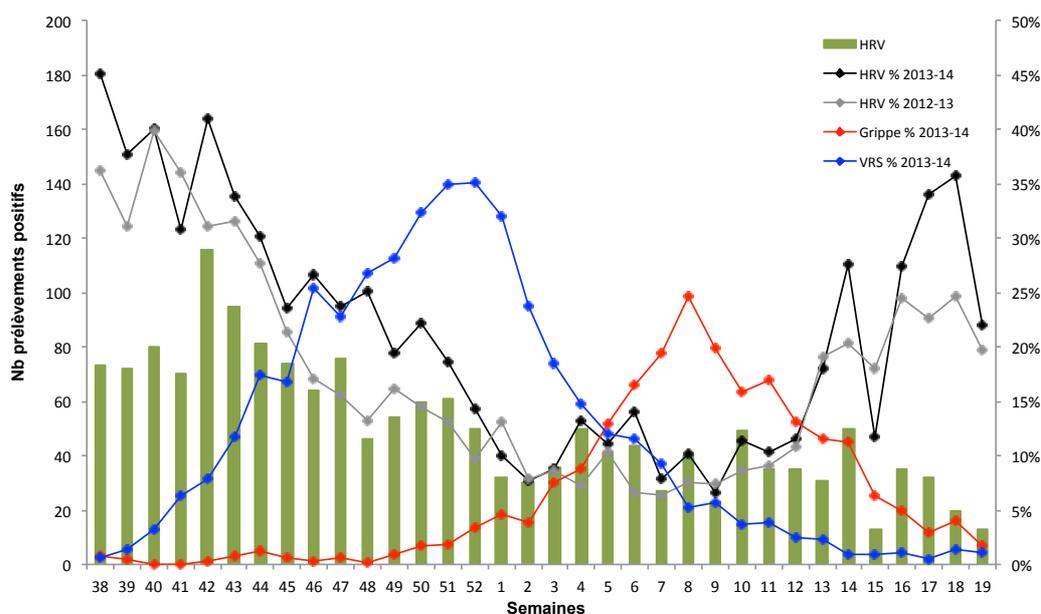


Figure 22 : Détection des rhinovirus humains en France-Nord Réseaux GROG et RENAL / saison 2013-2014

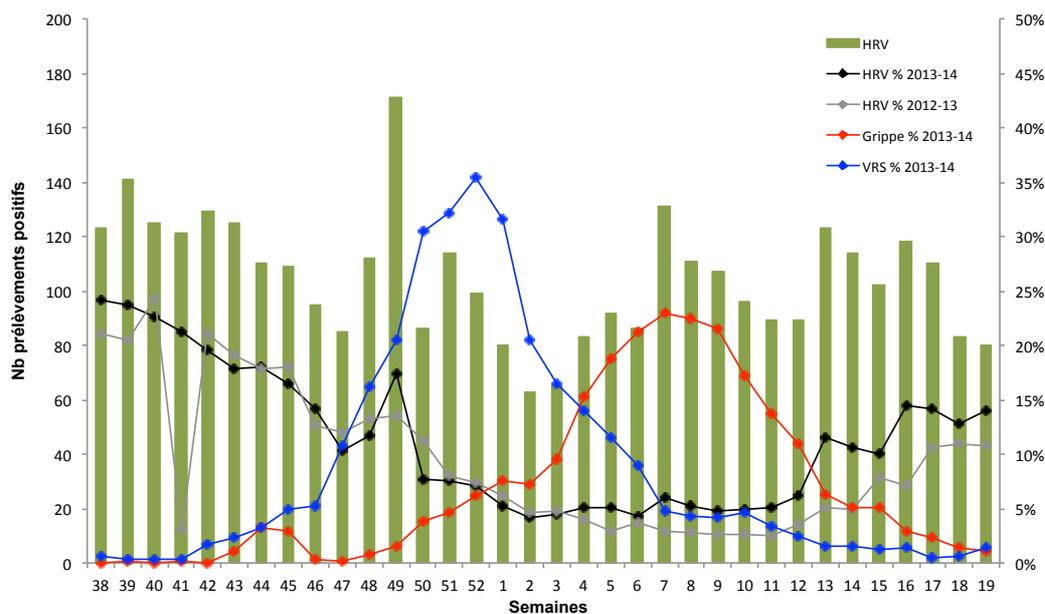


Figure 23 : Détection des rhinovirus humains en France-Sud Réseaux GROG et RENAL / saison 2013-2014

➤ **Adénovirus**

Les adénovirus ont été détectés/isolés de façon continue tout au long de la saison 2013-2014 avec une circulation globalement faible et un pourcentage de prélèvements positifs toujours inférieur à 3% (Figure 24).

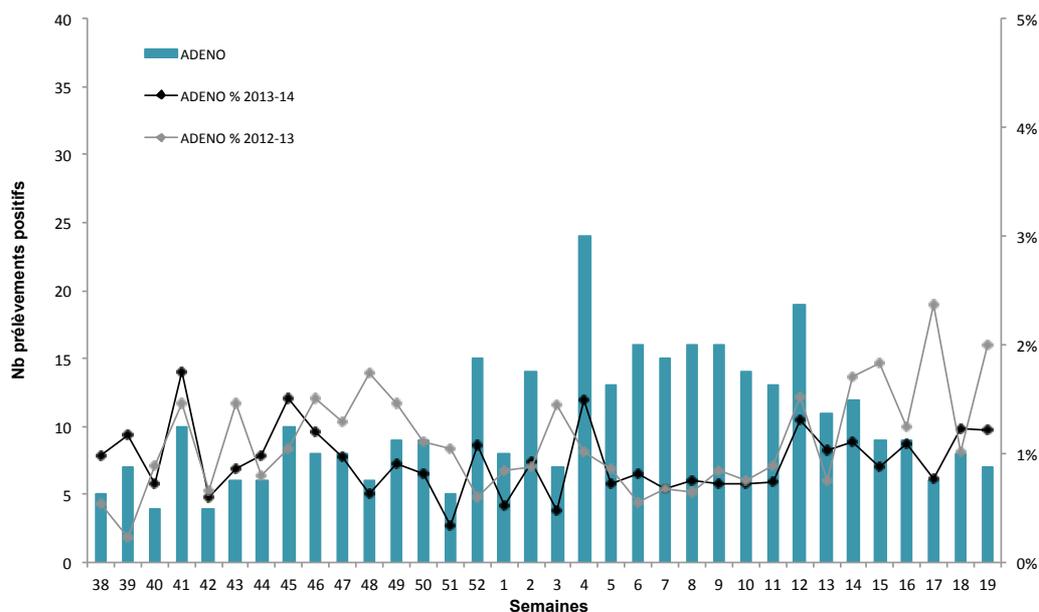


Figure 24 : Détection des adénovirus en France Réseaux GROG et RENAL / saison 2013-2014

➤ **Virus parainfluenza**

Les virus parainfluenza ont été détectés à un niveau faible tout au long de la saison 2013-2014 (Figure 25).

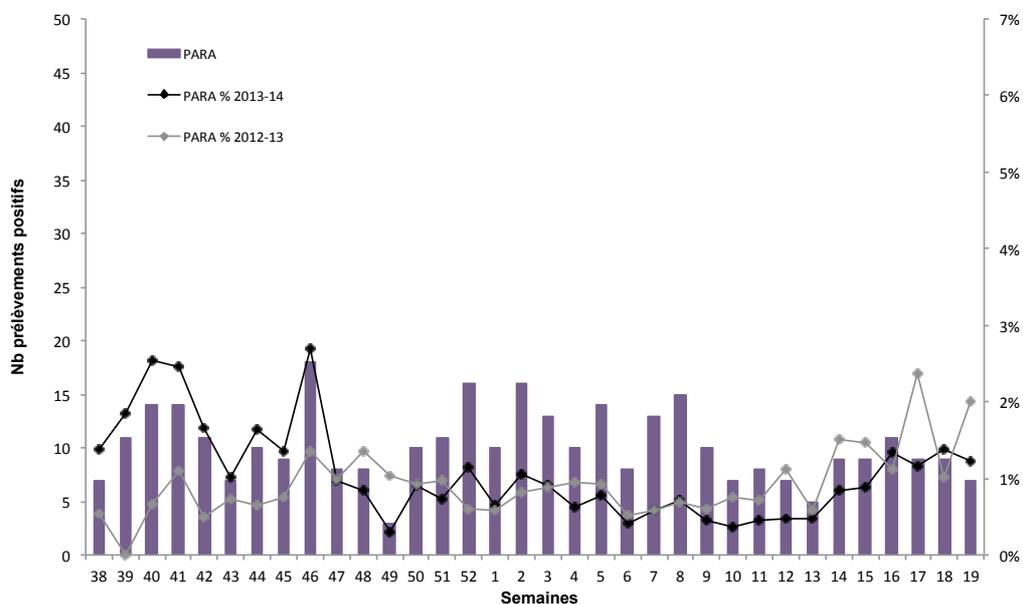


Figure 25 : Détection des virus parainfluenza en France Réseaux GROG et RENAL / saison 2013-2014

➤ **Métapneumovirus humains**

Comme la saison dernière, la circulation des métapneumovirus humains a augmenté de façon continue tout au long de l'hiver 2013-2014 avec des valeurs légèrement supérieures à celles de la saison 2012-2013 et cela jusqu'au printemps 2014 (Figure 26).

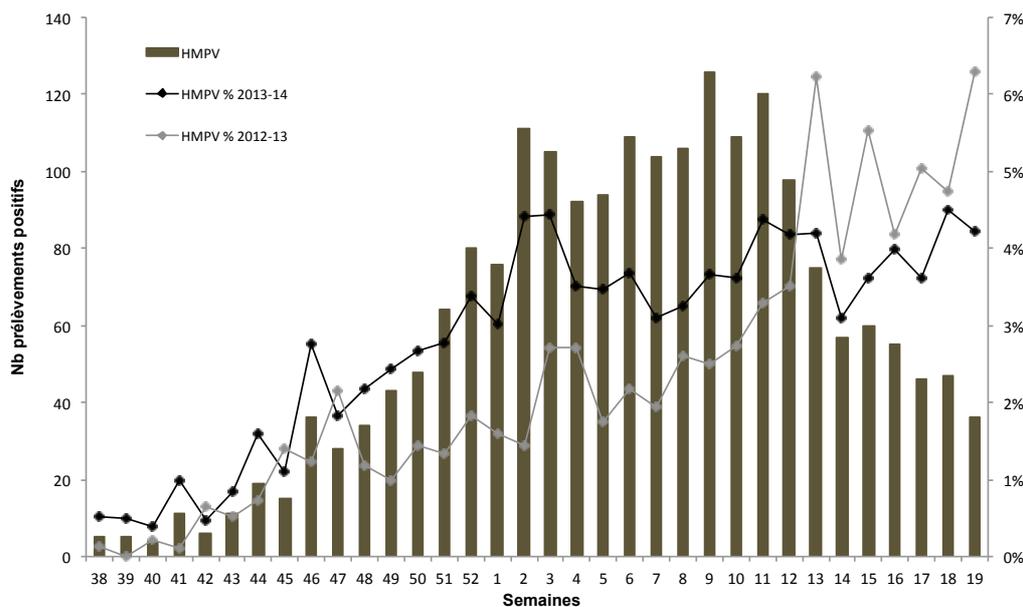


Figure 26 : Détection des métapneumovirus humains en France Réseaux GROG et RENAL / saison 2013-2014

➤ **Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS**

Pendant la période de surveillance active, les données de la surveillance virologique issue des réseaux GROG, SMOG et RENAL pour la région Nord et la région Sud sont compilées par le Centre coordinateur du CNR (CNR-IPP) et transmises de façon hebdomadaire à l'InVS. Ces données sont ainsi mises en commun avec les données de surveillance du réseau des GROG, du réseau Sentinelles et les données collectées par l'InVS (réseau OSCOUR, surveillance des cas graves, etc..). Ces données hebdomadaires sont analysées et font l'objet d'une évaluation des tendances lors d'une discussion téléphonique hebdomadaire dans la perspective de la rédaction du bulletin hebdomadaire de l'InVS et de la transmission des données au réseau européen EISN/ECDC (cf ci-dessous § 3.3).

## **3.1.2 Surveillance en Région Antilles-Guyane**

### **3.1.2.1 Réseau de partenaires**

La surveillance de la grippe et des infections respiratoires aiguës repose en grande partie sur une surveillance en population générale menée en partenariat avec les ARS concernées, la Cire Antilles-Guyane et les réseaux sentinelle Grippe de Guyane, Martinique et Guadeloupe. En Guyane, le réseau sentinelle est constitué de 24 médecins généralistes choisis dans les communes du littoral (seules accessibles par la route et où réside environ 80% de la population) : Cayenne, Rémire-Montjoly, Matoury, Kourou, Sinnamary, Mana et St Laurent du Maroni. En Guadeloupe et en Martinique, les réseaux de médecins sentinelles se composent chacun de 12 médecins généralistes. Si en Guyane, la surveillance des virus grippaux est continue toute l'année, aux Antilles cette dernière n'est activée que de décembre à avril.

Le protocole prévoit, pour chaque médecin, le prélèvement des deux premiers patients de la semaine, présentant un syndrome grippal défini par « une fièvre >39°C d'apparition brutale accompagnée de myalgies et de signes respiratoires » et évoluant depuis moins de 48H.

La surveillance de la grippe repose également sur une surveillance hospitalière en collaboration avec les laboratoires des hôpitaux et CHU de la région.

Enfin, des laboratoires d'analyses de biologie médicale (LABM) privés et notamment le LABM de l'Institut Pasteur de la Guyane participent aussi à cette surveillance.

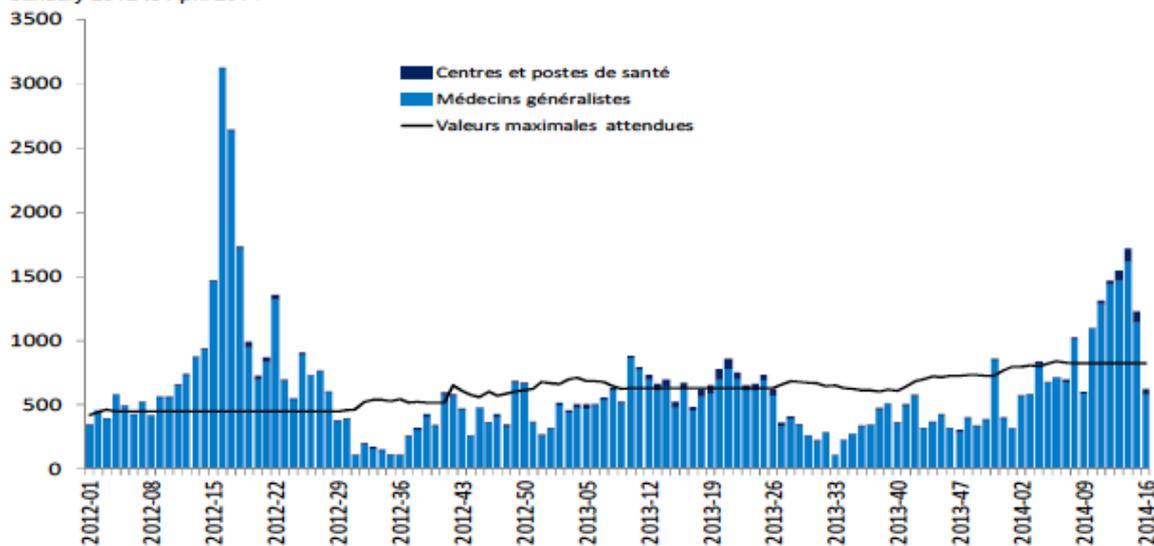
#### **➤ Résultats de la surveillance**

#### **Données d'activité sanitaire**

Sur la base des estimations du nombre hebdomadaire de patients ayant consulté un médecin généraliste pour syndrome grippal, l'épidémie de syndrome grippal en Guyane a démarré, comme les saisons précédentes, tardivement (S08/2014) et est restée d'ampleur modérée. En Guadeloupe, l'épidémie a démarré en semaine 03 (S03/2014) pour se prolonger jusqu'en semaine 15 (S15-2014) avec un pic en semaine 09 ; aucune forme sévère n'a été enregistrée. (cf Figures 27 et 28).

En Martinique, l'introduction du virus Chikungunya dans les Amériques fin 2013, associée à une situation préépidémique observée dès décembre 2013 puis à une situation épidémique dès janvier 2014 (S04-2014), a largement perturbé la surveillance de la grippe cette saison : aucune donnée n'a été publiée pour la Martinique et en dehors des prélèvements hospitaliers positifs en virus grippaux de type A adressés pour sous typage, seuls 5 prélèvements de surveillance sentinelle sont parvenus au CNR-IPG.

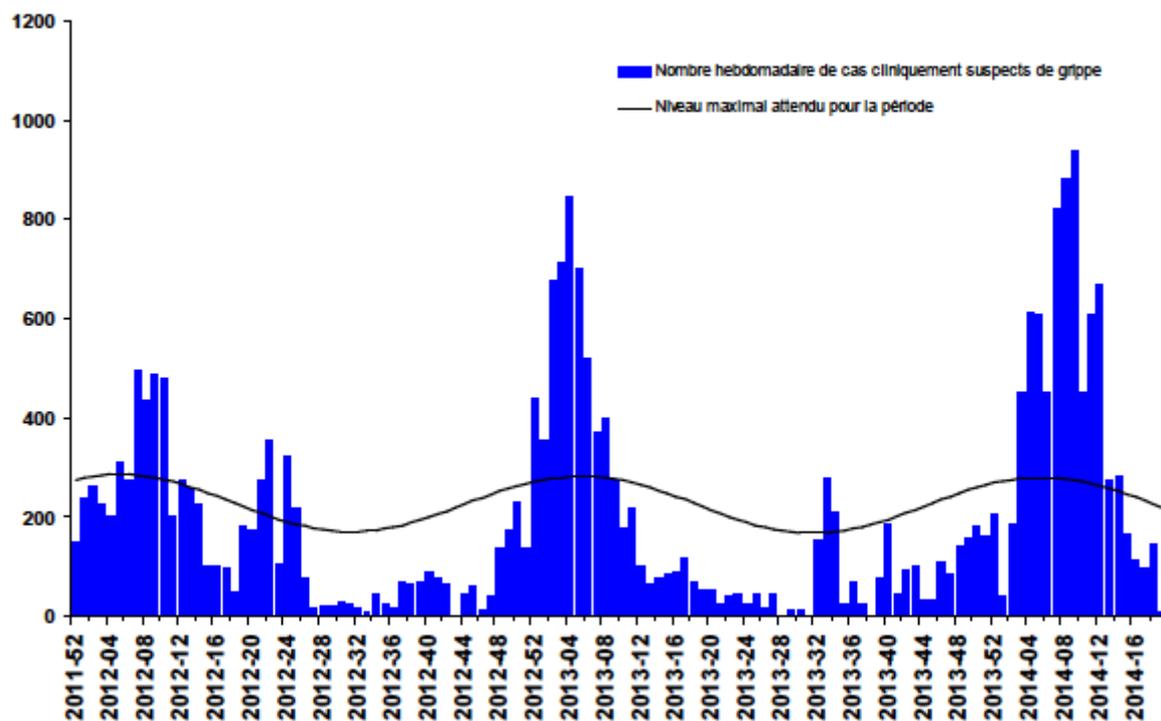
Nombre hebdomadaire de patients ayant présenté un syndrome grippal et ayant consulté un médecin généraliste\* ou ayant consulté dans les Centres délocalisés de soins et de prévention, Guyane, janvier 2012 à avril 2014 / Estimated weekly number of flu like illnesses diagnosed in GP clinics or health centres, French Guiana, January 2012 to April 2014



\*Le nombre de cas est une estimation pour l'ensemble de la population guyanaise du littoral du nombre de personnes ayant consulté un médecin généraliste pour un syndrome clinique évocateur de grippe. Cette estimation est réalisée à partir des données recueillies par le réseau des médecins sentinelles.

Figure 27 : Estimation du nombre hebdomadaire de consultations pour syndrome grippal Médecins généralistes de Guyane – janvier 2012 à avril 2014 (Source Cire Antilles Guyane)

Nombre\* hebdomadaire de patients ayant présenté un syndrome grippal et ayant consulté un médecin généraliste, Guadeloupe, décembre 2011 (semaine 2011- 52) à mai 2014 (semaine 2014-19) / Estimated weekly number of Influenza-like illnesses diagnosed in GP clinics, Guadeloupe, December 2011 to May 2014 (epi-



\*Le nombre de cas est une estimation pour l'ensemble de la population guadeloupéenne du nombre de personnes ayant consulté un médecin généraliste pour un syndrome clinique évocateur de grippe. Cette estimation est réalisée à partir des données recueillies par le réseau des médecins sentinelles.

Figure 28 : Estimation du nombre hebdomadaire de consultations pour syndrome grippal Médecins généralistes de Guadeloupe – décembre 2011 à mai 2014 (Source Cire Antilles Guyane)

### **Chronologie et distribution géographique du nombre de détections de virus grippaux pour la région Antilles Guyane**

Sur le plan virologique, pour les prélèvements reçus au CNR, la saison 2013-2014 a été marquée par une circulation moins prolongée que la saison précédente. (Figure 29).

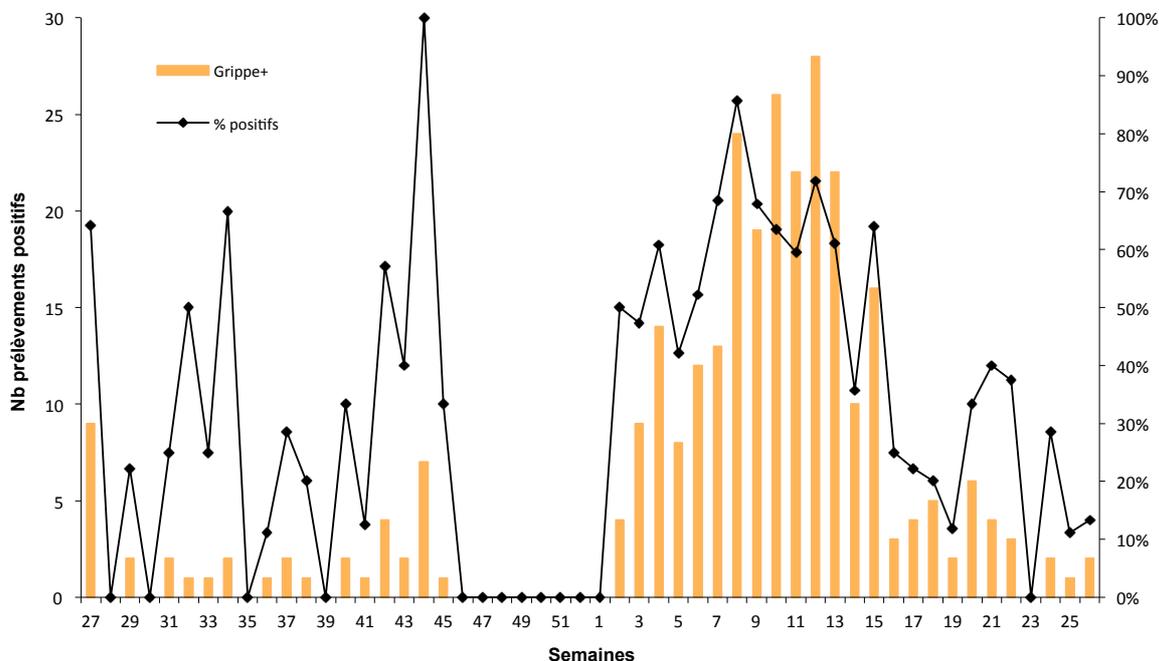


Figure 29 : Détection des virus grippaux en région Antilles Guyane CNR-IPG / saison 2013-2014

L'essentiel des prélèvements reçus au CNR-IPG provient de Guyane avec comme les années précédentes, une circulation épidémique plus tardive en Guyane qu'aux Antilles (Figures 30-31).

Après la mise en place de la qRT-PCR de détection des VRS A et B la saison dernière au CNR-IPG, les prélèvements de Guyane ont été systématiquement testés pour le VRS en parallèle de la grippe à partir de la semaine 40 de 2013. Cette surveillance sera poursuivie la saison prochaine pour tenter d'apprécier son éventuelle saisonnalité.

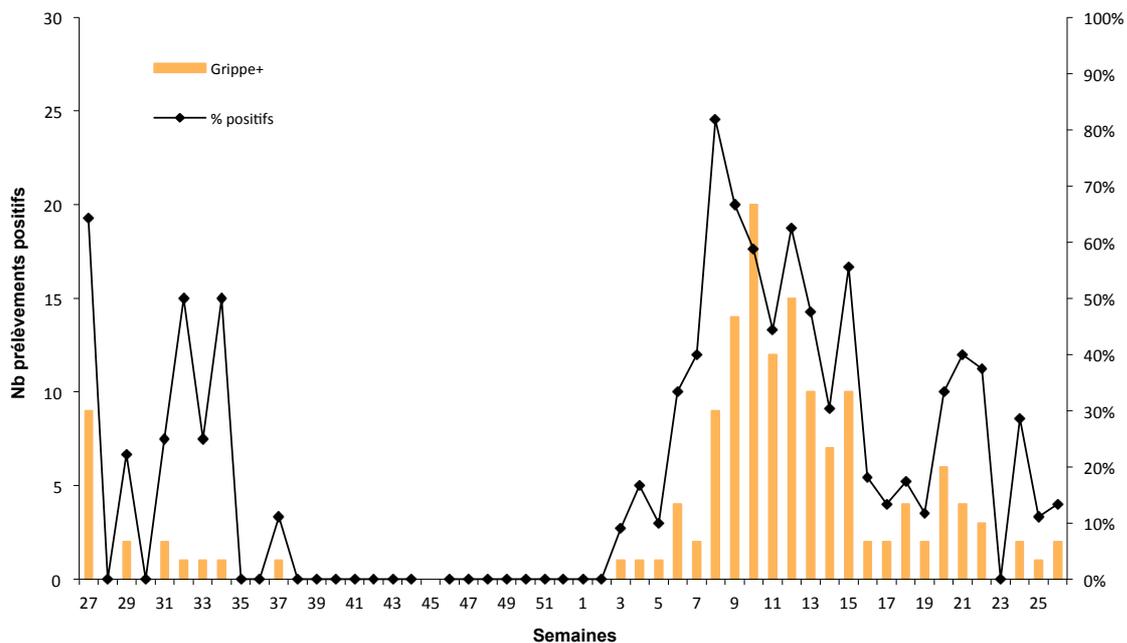


Figure 30 : Détection des virus grippaux en Guyane  
CNR-IPG / saison 2013-2014

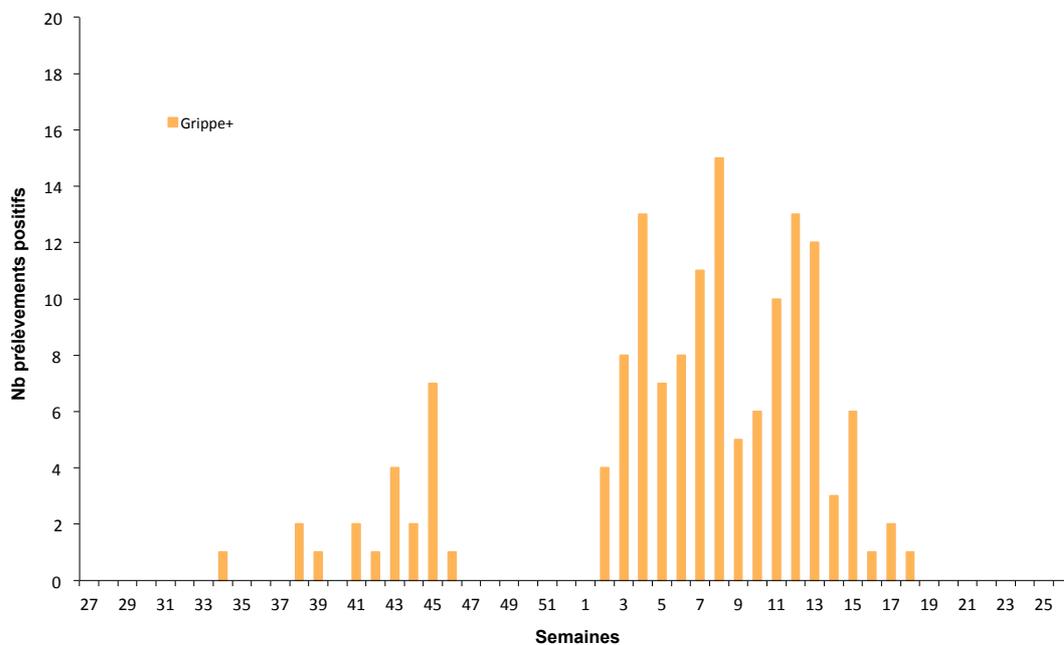


Figure 31 : Détection des virus grippaux aux Antilles  
CNR-IPG / saison 2013-2014

➤ **Analyse de la distribution des différents types d'agents caractérisés en fonction des critères pertinents (âge, sexe, géographie) et analyse des tendances**

Les épidémies de grippe pour la Guyane comme les Antilles ont été marquées par une co-circulation de virus grippaux (Tableau 2 et Figures 32 à 34):

- pour la Guyane, co-circulation virale avec une large prédominance de virus A (91,4 %) parmi lesquels 47,1 % A(H1N1)pdm09 et 52,9% A(H3N2), associés à 8,6% de virus B parmi lesquels 53,8 % de lignage B Victoria, 38,5 % de lignage B Yamagata et 7,7 % de B non sous typés
- pour la Guadeloupe, également co-circulation virale avec prédominance de virus A (65 %) (46,8 % A(H1N1)pdm09 ; 53,2 % A(H3N2)) associés à 18,1% de virus B tous de lignage Yamagata.
- pour la Martinique, seuls les virus A nous ont été envoyés pour sous typage : 53,8% correspondaient à des virus A(H1N1)pdm09 et 46,2% à des virus A(H3N2)

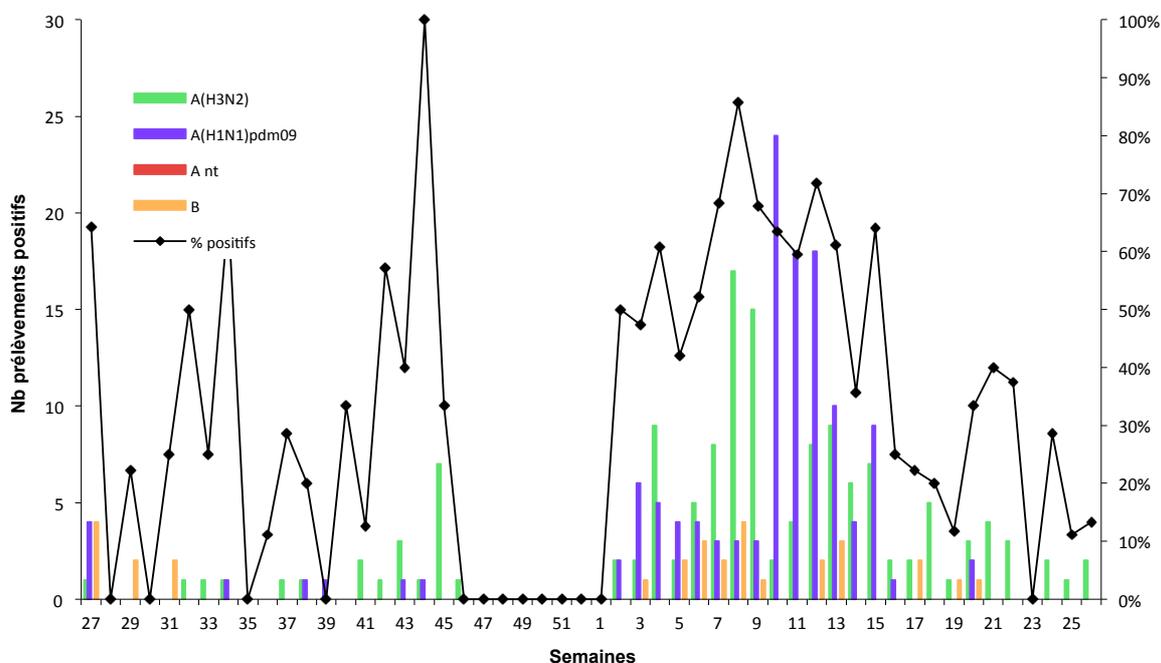


Figure 32 : Répartition des virus grippaux détectés en région Antilles-Guyane CNR-IPG / saison 2013-2014

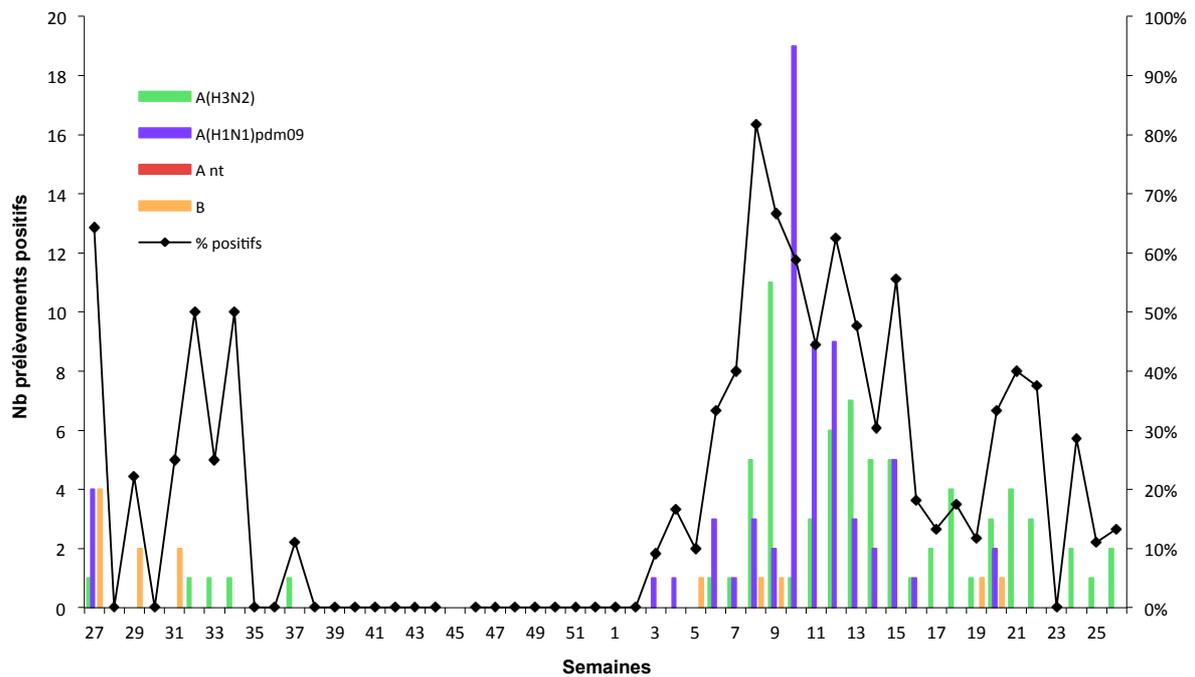


Figure 33 : Répartition des virus grippaux détectés en Guyane CNR-IPG / saison 2013-2014

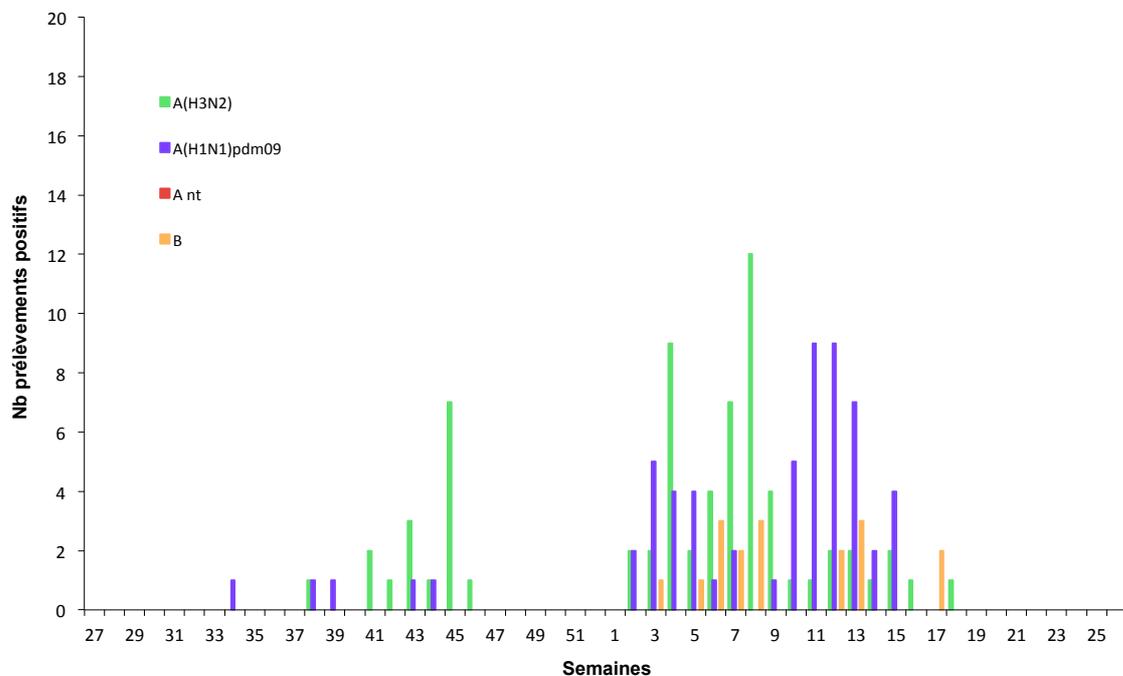


Figure 34 : Répartition des virus grippaux détectés aux Antilles (Martinique et Guadeloupe) CNR-IPG / saison 2013-2014

Dans le cadre de la surveillance sentinelle, l'analyse de la distribution par âge montre que ce sont les patients de 15 à 64 ans qui constituent la majorité des patients prélevés (69 %) tandis que le pourcentage de positivité pour grippe le plus élevé (64%) est observé pour les 5-14 ans. (Tableau 11).

Les virus A ont co-dominé dans toutes les classes d'âge. (Tableau 12).

Age	Nb prlv	Nb grippe+	% de + dans la tranche âge	% du groupe d'âge/total	% de + /total de +
0-4	15	6	40,0%	5,9%	4,3%
5-14	53	34	64,2%	20,9%	24,3%
15-64	177	96	54,2%	70,0%	68,6%
>65	8	4	50,0%	3,2%	2,9%
<b>Total</b>	<b>253</b>	<b>140</b>	<b>55,3%</b>	<b>100,0%</b>	<b>100,0%</b>

Tableau 11 : Distribution par âge des patients – Région Antilles Guyane  
Surveillance sentinelle / 2013-2014

Age	NB Grippe+	Nb grippe A/H1pdm09 (%)	Nb grippe A/H3 (%)	Nb grippe B (%)
0-4	6	3 50,00%	2 33,33%	1 16,67%
5-14	34	12 35,29%	14 41,18%	8 23,53%
15-64	96	44 45,83%	38 39,58%	14 14,58%
>65	4	2 50,00%	2 50,00%	0 0,00%
<b>Total</b>	<b>140</b>	<b>61 43,57%</b>	<b>56 40,00%</b>	<b>23 16,43%</b>

Tableau 12 : Distribution par tranche d'âge et par type viral – Région Antilles Guyane  
Surveillance sentinelle / 2013-2014

➤ **Contribution à la surveillance pour la région Antilles-Guyane en interface avec les ARS concernées et la Cire Antilles-Guyane**

Dans le cadre de la surveillance de la grippe saisonnière, les résultats biologiques sont adressés selon une périodicité hebdomadaire aux ARS et à la Cire Antilles-Guyane sous forme de fichier informatique, sécurisé et anonymisé. Un résultat nominatif est adressé au médecin préleveur. La Cire Antilles-Guyane pilote également un système de surveillance syndromique basé sur les syndromes respiratoires dans les DFA. Ces différents types de recueil de données épidémiologiques font régulièrement l'objet de "Points Epidémiologiques Périodiques", mensuels ou hebdomadaires en fonction du contexte épidémiologique. Ces bulletins de rétro-information sont édités par la Cire Antilles-Guyane en collaboration avec les différents partenaires impliqués. Ils sont disponibles sur le site Internet de l'InVS et permettent d'assurer une rétro-information auprès des différents professionnels de santé du département, des DFA, de l'InVS et de la DGS, tout en faisant le point sur la situation épidémiologique du moment.

## **3.2 Détection et investigation de cas groupés et de phénomènes anormaux**

### **Etude des cas groupés de l'Hôpital Bichat**

En février 2014, le Dr Houhou du laboratoire de Virologie de l'hôpital Bichat contacte le CNR pour expertiser plusieurs cas de grippe détectés en service de dermatologie chez des patients et du personnel soignant : 9 patients et 4 soignants. Sur les 12 prélèvements nasopharyngés reçus, 11 sont positifs pour un virus de type A(H3N2). Le séquençage de la HA et la NA est réalisé par méthode conventionnelle sur seulement 7 des prélèvements (faute de charge virale suffisante pour les 4 autres). La comparaison des séquences avec la souche de référence A/Victoria/361/2011(H3N2), indique que ces souches présentent des mutations nucléotidiques semblables, qui pour la plupart, sont silencieuses et ne se traduisent par aucune modification d'acides aminés. L'analyse phylogénétique de ces séquences permet de déterminer que ces souches appartiennent à la clade 3C2.2. Il est fort probable que les virus détectés proviennent d'un virus unique qui a ensuite diffusé mais pour le confirmer il faudrait envisager d'effectuer du séquençage de nouvelle génération à haut débit.

### **Maison de retraite de Guérande**

Fin mars 2014 nous recevons un appel d'un médecin d'une maison de retraite située sur la presqu'île de Guérande pour une épidémie de grippe touchant en quelques jours une quarantaine de pensionnaires et du personnel soignant, 5 unités sont concernées. Onze personnes sont prélevées, dont 2 médecins. Nous détectons du virus grippal de type A(H3N2) sur 8 des prélèvements, 4 seront séquencés. Seul le séquençage de la NA est exploitable et des mutations spécifiques de ces 4 souches au regard de la souche de référence permet à nouveau d'envisager l'introduction d'un virus unique dans le centre. Il faudrait également effectuer du séquençage de nouvelle génération à haut débit pour confirmer qu'il s'agit bien d'une épidémie nosocomiale due à une même souche virale.

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

L'étude de la sensibilité aux antiviraux des virus influenza est réalisée par les CNR-IPP et CNR-HCL pour une sélection représentative de chacun des types/sous-types/lignages de virus ainsi que plus spécifiquement, les virus isolés de cas traités par antiviraux et en échec thérapeutique, de cas contacts de sujets traités ou encore de cas graves.

La résistance génétique est définie sur la base de la présence de mutations connues pour conférer une réduction de la sensibilité à un antiviral donné.

La résistance (ou réduction de la sensibilité) phénotypique est déterminée en fonction des variations des  $IC_{50}$  par rapport aux valeurs d' $IC_{50}$  pour les virus de référence sauvages.

Les résultats sont présentés au § 2.2.2.

La tendance en matière de sensibilité aux antiviraux est restée stable au cours de la saison 2013-2014 par rapport à la saison précédente.

## **3.4 Contribution aux réseaux de surveillance européen et internationaux**

### **3.4.1 EISN/ECDC**

Les CNR-IPP et -HCL font partie du réseau européen EISN (European Influenza Surveillance Network) piloté par l'ECDC. Les données des CNR-IPP et -HCL, relatives aux virus grippaux détectés ou isolés sont compilées par le CNR-IPP et transmises à l'ECDC via l'enregistrement hebdomadaire sur la base de données TESSY. Les CNR-IPP et -HCL transmettent également des informations relatives aux caractéristiques antigéniques des virus grippaux pour contribuer au suivi de l'adéquation de la composition vaccinale au regard des virus circulants ainsi que des données génétiques et/ou phénotypiques relatives aux virus résistants aux antiviraux. Les CNR-IPP et -HCL participent également à la demande de l'ECDC à des réunions de travail spécifiques dont l'objectif est d'améliorer la surveillance. Les responsables font partie des groupes de travail « caractérisation virale », « antiviraux », « contrôle qualité » du ERLI-Net (European Reference Laboratory Network for Human Influenza) du réseau EISN/ECDC.

### **3.4.2 FluNet/OMS**

Les trois laboratoires du CNR sont reconnus comme "National Influenza Center" par le Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) du Global Influenza Program (GIP) de l'OMS.

Les données des CNR-IPP, -HCL et -IPG, sont transmises à l'OMS par voie internet de façon bi-mensuelle dans la base FLUNET<sup>1</sup> à accès sécurisé par mot de passe. Elles permettent de contribuer à la surveillance globale de la circulation des virus grippaux. Les responsables ont également contribué, à la demande de l'OMS, à différents groupes de travail sur divers aspects en lien avec les activités de surveillance.

#### **3.4.1 Contrôle de Qualité**

Comme tous les ans, les trois laboratoires du CNR ont participé au contrôle qualité externe "WHO External Quality Assessment Programme for the Detection of Influenza A Virus Type A by PCR" (EQAP) organisé par l'OMS depuis 2007. Au cours de la saison 2013-2014, nous avons reçu 1 seul panel en avril 2014 (EQAP panel 13). Ce contrôle de qualité moléculaire pour la détection et le sous-typage des virus de type A (H1pdm09, H3, H5, H7 et H9) et de type B par RT-PCR.

Ainsi, le panel reçu en avril 2014 (EQAP panel 13) comportait 10 échantillons d'ARN extraits correspondant à 4 virus influenza H5, 2 H1pdm09, 1 H3, 1 H7, 1 B et 1 échantillon négatif. Les CNR-IPP, -HCL et -IPG ont pu sous-typer correctement tous les virus.

Pour la 1<sup>ère</sup> fois nous avons reçu un contrôle de qualité pour la détection du nouveau coronavirus MERS-CoV en février 2014 : 1st External Quality Assurance for MERSCoV PCR diagnostic, composé de 13 échantillons. Cinq échantillons sur 7 contenant du MERS-CoV ont été détectés. Pour les 2 échantillons non détectés, on suspecte une mauvaise conservation de l'échantillon entraînant une diminution de la concentration.

## **3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance**

Aucune enquête ou étude ponctuelle concourant à la surveillance n'a été effectuée au cours de la saison 2013-2014.

---

<sup>1</sup> <http://www.who.int/csr/disease/influenza/influenzane트워크/flunet/en/>

## 4 Alerte

En cas de détection de phénomène anormal en métropole, les CNR-IPP et -HCL en collaboration avec la coordination nationale du réseau des GROG adressent une note de synthèse à l'InVS et la DGS. Pour la région Antilles-Guyane, le CNR-IPG alerte la CIRE et l'ARS.

Au cours de la saison grippale 2013-2014 aucune note d'alerte n'a été diffusée.

## 5 Activités d'information, de formation et de conseil

### 5.1 Enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires

#### 5.1.1 Enseignements

##### ➤ *Pr Sylvie van der WERF*

En tant que Professeur à l'Université Paris Diderot, Paris 7, Sylvie van der WERF a dispensé les enseignements suivants en 2013-2014:

#### **Université Paris Diderot, Paris 7**

*Infectiologie, Microbiologie, Virologie, Immunologie (IMVI) : L2*

Cours 4,5h : Caractéristiques et variabilités du monde viral; Infection Virale-Généralités ; Quelques exemples de réussites virales.

*Virologie : M1-IMVI – responsable de l'UE*

Cours 20 h : Virologie

*Immunopathologie/Relations hôte pathogènes : M1-IMVI*

Cours 2h : Statut immunitaire et réponse vaccinale – vaccins grippaux

*M2 IMVI- responsable du Master*

*UE Virologie Moléculaire et Médicale – responsable de l'UE*

Cours 4h30 : Virus Influenza humains ; Stratégies antivirales pour les virus des infections aiguës : ex des Orthomyxovirus ; Tables Ronde 2h : Barrière d'espèces et Zoonoses

*UE Virologie Fondamentale – responsable de l'UE*

Cours 3h : Les virus de l'Influenza ; Table Ronde 2h : demain les virus

*UE Séminaires bibliographiques : audition*

*UE « Aspects fondamentaux et économiques de la lutte contre les pathogènes*

Cours 2h : Stratégie de lutte contre les pathogènes viraux ; Table Ronde 2h : stratégies de lutte

*UE « Immunologie anti-virale »*

Cours 1h30 : pandémies à virus respiratoires et vaccins

*Formation Continue en Biotechnologie, Université Paris Diderot Paris 7*

*Les virus utilisés en vectorologie : vaccination et transfert génétique*

Cours 6h : vecteurs viraux : applications vaccinales

*Ecole Doctorale B3MI : responsabilité de la spécialité « virologie » (jusqu'en 2014)*

*Ecole Doctorale Gc2iD : co-directrice 2009-2014*

*Ecole Doctorale Bio-SPC: Directrice du département Infectiologie-Microbiologie (depuis 2014)*

## **ENS UIm**

*Module Immunologie-Virologie L3 –coresponsable pour la virologie avec le Pr Uriel Hazan*  
Cours 3h : Introduction à la virologie ; Origine du MERS-CoV et risque pandémique

## **AgroParisTech**

*Module UC4 -Introduction à l'Immunologie sur le thème de la vaccination*  
Cours 1h30 : Vaccination antigrippale

### ➤ **Pr Bruno LINA**

Responsable de l'enseignement de la Virologie en FGSM3 pour la faculté de Médecine Lyon Est (Organisation des cours, les enseignements pratiques, des enseignements dirigés) 80h/an

Enseignement « physiopathologie des maladies infectieuses » en FGSM2 pour Lyon Est (2h)

Enseignement en Master 2 : Ecologie microbienne : influenza virus (2h30), EPIRIS – epidemiologie de la grippe (2h)

Enseignement au Master 1 physiopathologie des maladies transmissibles : variabilité des virus influenza (4h)

Participation aux Diplômes Inter-Universitaire :

Pathologie infectieuse pédiatrique : grippe chez l'enfant (2h),

Transplantation : infections respiratoires (2h),

Chimiothérapie anti-infectieuse : vaccins et antiviraux (2h)

Vaccinologie : vaccin contre la grippe (1h)

### **5.1.2 Séminaires, conférences grand public et relations avec la presse**

#### ➤ **Pr Sylvie van der Werf**

Interviews pour la presse écrite et audiovisuelle

#### ➤ **Pr Bruno Lina**

Colloque Maladies & Risques Infectieux (re)-emergents, ministère de la Santé : Emergence de virus influenza aviaires à potentiel pandémique : exemple du virus H7N9, Paris le 22 Octobre 2013

Conférence grand public de la Mairie de Lyon dans le cadre de la journée des vaccinations: 1eres assises nationales du vaccin, Lyon le 7 novembre 2013

Conférence grand public Table ronde Biovision, How to deal with emerging and re-emerging infectious diseases, Lyon , le 24 mars 2014

Conférence Grand public : Université ouverte de Lyon, Etat des lieux sur le virus de la grippe, Lyon le 27 Mars 2014

Conférence grand public : Les conférences du Grand Lyon : la grippe, un virus imprévisible en constante réémergence, Lyon le 2 avril 2014

Interviews pour la presse écrite et audiovisuelle

Participation à l'émission « C dans l'air » le 11 avril 2014 (France 5)

Participation a l'émission « la tête au carré » le 16 octobre 2013 (France Inter)

➤ **Dr Vincent Enouf**

Intervention orale : les virus émergents, CHRD Pontoise, 2 décembre 2013

Conférence scientifique grand Public : grippe et autres virus respiratoires, Institut Pasteur, Paris 3 décembre 2013

Interviews pour la presse écrite et audiovisuelle

➤ **Dr Dominique Rousset**

Pan American Influenza and other Respiratory Viruses meeting: "Respiratory Disease Surveillance in the Americas"— Brasilia, Brazil sept 2013

### **5.1.3 Formation, accueil de stagiaires**

Dr Emmanuel NAKOUMÉ, médecin PhD : stage de formation pour la mise en place des techniques de détection des virus A(H7N9) et MERS-CoV. Traitement de résultats de qRT-PCR de détection de virus grippaux de type B sur des prélèvements respiratoires de patients de Bangui et sur papier buvard.

## **5.2 Modalités de diffusion des données de la surveillance**

Les résultats des analyses réalisées pour chacun des prélèvements et échantillons biologiques reçus sont communiqués par courrier au praticien ou au laboratoire qui a adressé le prélèvement au Centre.

Les données de la surveillance, collectées dans le cadre du réseau des GROG font l'objet d'un bulletin hebdomadaire préparé par la Coordination Nationale des GROG en lien avec les 2 laboratoires du CNR en métropole, CNR-IPP et CNR-HCL, pendant la période de surveillance active de la grippe, de la semaine 38 à 15. Chaque semaine, les laboratoires du CNR adressent à l'InVS les informations relatives aux types, sous-types, caractéristiques antigéniques et sensibilité aux antiviraux des virus grippaux circulants. Ces informations sont également reprises par le bulletin hebdomadaire d'information sur la grippe édité par l'InVS. Les laboratoires du CNR assurent la rédaction des données virologiques en concertation avec l'InVS pour ce bulletin.

Les données collectées dans le cadre du réseau RENAL font l'objet de bulletins d'information hebdomadaires pendant la période de surveillance active de la grippe (semaines 38 à 15) et mensuels tout au long de l'année, édités par le CNR. Pour la région Nord, le système de recueil de l'information par internet (logiciel Voozanoo "RENOG") sur un site sécurisé par mot de passe rendu opérationnel depuis la saison 2007-2008, permet aux correspondants du réseau RENAL d'intégrer et de consulter les données de la surveillance pour chacune des grandes régions à tout moment et propose également une analyse plus complète des données en temps réel. Le logiciel de recueil des données RENOG a évolué et pourra être aussi utilisé par les laboratoires hospitaliers de la Région Sud et par l'IPG. L'ensemble des données de surveillance récoltées par le CNR sera alors regroupé sur un site unique sécurisé.

## **5.3 Activités d'expertises auprès des instances de santé nationales et internationales**

### **5.3.1 Activités auprès des instances de santé nationales**

#### **5.3.1.1 Ministère de la Santé et DGS**

Membre du Groupe de travail « pandémie virale » de la Commission spécialisée Maladies transmissibles du Haut conseil de Santé Publique (S. van der Werf, B. Lina)

#### **5.3.1.2 InVS**

Membre du Comité de Pilotage « Réseau Unifié » (S. van der Werf, B. Lina)

Membre du Groupe de Travail « définition de cas » Réseau Unifié (S. van der Werf, B. Lina)

#### **5.3.1.3 ANSM**

Expertises pour le compte de l'ANSM (B. Lina, S. van der Werf)

### **5.3.2 Activités auprès des instances de santé internationales**

#### **5.3.2.1 EISN/ECDC**

- Membre du réseau européen de surveillance de la grippe EISN (S. van der Werf, B. Lina)
- Membre du groupe de travail "virus characterization" du réseau de laboratoires ERLI-Net (S. van der Werf)
- External Advisor du réseau EISN auprès de l'ECDC (B. Lina)
- Membre du groupe de travail "antiviraux" du réseau de laboratoires ERLI-Net (V. Enouf, B. Lina)
- Membre du groupe de travail "contrôle qualité" du réseau de laboratoires ERLI-Net (M. Valette)
- 3<sup>rd</sup> RAGIDA Meeting, Risk Assessment Guidelines for Diseases transmitted on Aircraft, Member of the "influenza group", Stockholm, 21-22 October 2013 (S. van der Werf)
- ERLI-Net (former CNRL) Virology Task Group Meeting - FLU 105, Stockholm 10-11 octobre 2013
- EuroFlu 4th annual joint WHO/ECDC influenza surveillance meeting, Vienne, Autriche, 11-13 juin 2014 (V. Enouf, S. Behillil, B. Lina) - participation
- Membre du EUPHEM advisory forum pour l'ECDC (B Lina)

#### **5.3.2.2 OMS**

- Directeur du Laboratoire de Référence de l'OMS pour le SRAS (S. van der Werf)
- Directeur du Laboratoire de Référence de l'OMS pour les virus H5 (S. van der Werf)
- Membre du Working Group on Molecular diagnostics; participation au WHO th PCR Working Group Meeting, 19-20 July 2014, Geneva, Switzerland (V. Enouf)
- Temporary advisor for the WHO DG's Consultation with member states (IGM for the
- 
- sharing of influenza viruses and benefits) (B. Lina)
- WHO GISRS and Influenza Surveillance Meeting, 6 September 2013, Cape-Town, South Africa (S. van der Werf) - participation
- (WHO)/GISRID/isirv-AVG Training Workshop 7 September 2013, Cape-Town, South Africa (S. van der Werf) - presentation
- Participation au groupe "Fight against respiratory viruses" (B. Lina)

### **5.3.3 Membre de réseaux et membre de conseil scientifique d'institutions extérieures**

#### **➤ Pr Sylvie van der WERF**

- Vice-Présidente du réseau des Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe (GROG)
- Membre du Conseil Scientifique du Groupe d'Etude et d'Information sur la Grippe (GEIG)
- Membre du European Scientific Working Group on Influenza (ESWI)
- Membre du réseau européen de surveillance de la grippe EISN
- Membre du groupe de travail "virus characterization" du réseau de laboratoires ERLI-Net (ECDC)
- Vice-chair working group 3 "pathogenesis" du consortium international ISARIC
- Membre du comité scientifique du antiviral group ISRV
- Editeur Associé pour la revue Eurosurveillance
- Coordinatrice du projet européen FP7-PREDEMICS

#### **➤ Pr Bruno LINA**

- Past President de L'European Society for Clinical Virology
- Membre de l'Advisory Board de l'European Society for Virology
- Président du Conseil Scientifique du Groupe d'Etude et d'Information sur la Grippe (GEIG)
- Membre de l'European Scientific Working Group on Influenza (ESWI)
- Membre du Scientific Advisory Board de BioVision
- Membre de l'Association du Réseau des Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe (GROG)
- Membre du réseau européen de surveillance de la grippe EISN
- Membre du groupe de travail "antiviral resistance" du réseau de laboratoires ERLI-Net (ECDC)
- Editeur associé de Journal of Clinical Virology
- Editeur associé de Influenza Treatment and Prevention
-

## 6 TRAVAUX DE RECHERCHE et publications EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR

### 6.1 Activités de recherche en lien direct avec l'activité du CNR

#### 6.1.1 CNR-IPP

Les thématiques de recherche menées actuellement au sein de l'unité de Génétique Moléculaire des Virus à ARN dirigée par Sylvie van der Werf en lien avec l'activité du CNR-IPP concernent les sujets suivants :

##### ➤ *Evolution génétique des virus grippaux*

Un premier volet de ces recherches a pour objectif de déterminer la l'ampleur des **variations génétiques** au sein des populations virales pour des virus influenza de différents types et sous-types et selon leur origine en utilisant les approches de séquençage de nouvelle génération (NGS) (collaboration M. Vignuzzi, Institut Pasteur, Paris). La diversité génétique est explorée pour des isolats viraux produits sur différents substrats ainsi que sur des prélèvements primaires issus de l'activité du CNR. Ces travaux ont d'ores et déjà permis de montrer à partir de prélèvements primaires issus de patients une diversité génétique significativement accrue chez les patients atteints de formes sévères d'infection virale par rapport aux formes plus bénignes. Ils ont également permis de révéler des différences de diversité génétique selon les sous-types viraux (Barbezange et al. en préparation). En lien avec ces observations nous cherchons à identifier les déterminants et facteurs de variations de la fidélité de la polymérase virale qui gouvernent la diversité des populations virales selon des approches de mutagenèse aléatoire (*Cyril Barbezange, Post-doctorant, Florian Andrieux, Doctorant*). Ces travaux s'inscrivent dans le cadre du projet européen FP7-PREDEMICS coordonné par Sylvie van der Werf et du Labex IBEID (coordinateurs P. Cossart et P. Sansonetti, IP, Paris).

Un deuxième volet concerne le deuxième mécanisme de variation génétique des virus grippaux, le **réassortiment**. En se fondant sur les travaux antérieurs relatifs aux déterminants de la spécificité de type, A versus C, localisés au sein des séquences non-codantes des segments d'ARN génomique, nous analysons la capacité de multiplication de virus grippaux de type A ou C dont l'un des segments est muni de séquences non-codantes hétérotypiques ou dérivées d'un autre segment. Ces travaux ont notamment permis de préciser les éléments des séquences non codantes conservées ou non conservées entre segments nécessaires à la multiplication virale et d'analyser leur impact sur la régulation de l'expression des gènes des segments concernés ainsi que sur l'emballage des segments génomiques dans les particules virales (Crescenzo et al., PLoS One 2013 ; PLoS One, *in press*). Ces données devraient permettre de mieux comprendre quels sont les éléments mis en jeu lors des événements de réassortiment entre souches virales. (*B. Crescenzo-Chaigne, IR, IP*).

##### ➤ *Immunité post-vaccinale*

Des études avec pour objectif d'évaluer la réponse immunitaire induite suite à l'infection ou la vaccination sont poursuivies. Il s'agit notamment d'évaluer l'impact de l'administration préalable de fibres sur la réponse vaccinale que la réactivité croisée de la réponse immunitaire post-infectieuse ou post-vaccinale - projet FP7-FIBEBIOTICS. (*coordinateur J.Mes*).

Par ailleurs, en collaboration avec R. Legrand (CEA, Fontenay aux Roses) nous contribuons à la mise en place d'un modèle d'infection chez le macaque dans le but d'analyser de nouvelles formulations ou stratégies vaccinales (*V. Enouf, CAT-IP ; S. Behillil, CAT-IP*).

➤ **Déterminants de restriction d'hôte et de transmission inter-espèces et identification de nouvelles cibles thérapeutiques**

Cette thématique menée depuis de nombreuses années au sein de l'unité a pour objectif de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les étapes de transmission inter-espèces et d'adaptation au nouvel hôte et tout particulièrement à l'homme. Ces études menées par le groupe de N. Naffakh au sein de l'unité se focalisent plus particulièrement sur les déterminants portés par les ribonucléoprotéines (RNP) des virus influenza A et l'identification des interacteurs cellulaires et leur rôle fonctionnel dans la multiplication et la restriction d'hôte en s'intéressant aux virus influenza aviaires versus humains ainsi qu'au virus H1N1pdm09 et ses précurseurs. Ces travaux qui ont d'ores et déjà permis d'identifier de nouveaux interacteurs des RNP se focalisent plus particulièrement sur les mécanismes du trafic nucléocytoplasmique des RNP virales. Des approches d'interactomique à haut débit développées par le groupe de Y. Jacob, telle que l'iPCA pour l'analyse des interactions dans le contexte des cellules, permet d'envisager l'étude différentielle des réseaux d'interaction des RNP à large échelle. Ces travaux devraient aussi permettre l'identification de nouvelles cibles pour le développement d'antiviraux. Ils s'inscrivent entre autres dans le cadre du projet européen FP7 FLUPHARM (Coordinateur S. Cusack, EMBL Grenoble) (N. Naffakh, DR2 CNRS ; S. Munier, MCU P7, G. Fournier, Post-Doctorant, C. Diot, étudiant M2, Y. Jacob, CR IP, C. Demeret, CR IP).

➤ **MERS-CoV**

Les recherches entreprises sur le MERS-CoV ont d'une part porté sur la description des sites et de la cinétique d'excrétion du virus au cours de l'infection chez les deux patients français, montrant la présence de virus préférentiellement dans les prélèvements respiratoires profonds et mettant en évidence la possibilité de retrouver le virus dans le sang et les urines. De plus, l'analyse des séquences du premier cas français a contribué à préciser le potentiel de transmission interhumaine de ce virus.

Par ailleurs, nous avons entrepris de développer des tests sérologiques à base de protéines recombinantes correspondant à tout ou partie de la protéine N et de la protéine S afin de décrire la cinétique de mise place de la réponse humorale en lien avec l'évolution clinique des patients (V. Enouf CAT IP, S. Behillil CA IP, Y Jacob CR IP ; coll. P. Despres, S. Petres, JC Manuguerra, Institut Pasteur).

## 6.1.2 CNR-HCL

Les travaux de recherche du CNR-HCL sont réalisés en partie en collaboration avec le laboratoire de recherche VIRPATH EA4610 UCBL-HCL. Les thèmes de recherche abordés au sein de cette Unité sont décrits sur le site internet de l'Unité ([www.virpath.com](http://www.virpath.com)).

Les projets comportent donc à la fois des projets de recherche fondamentale, des projets de recherche appliqués, et des projets de recherche transrationnelle. Différents axes sont développés en collaboration avec le CNR. Ces travaux de recherche sont très intégrés, avec de nombreuses passerelles entre les différents axes. Seuls les axes ayant permis des publications entre 2012 et début 2014 ou ayant été financés à la suite d'appel d'offres (ANR, PHRC) sont présentés.

➤ **Axe1 : Compréhension des mécanismes d'émergence et d'évolution des virus influenza.**

Les virus Influenza peuvent émerger du réservoir animal et s'adapter à l'homme. Cette introduction d'un nouveau virus suppose des mécanismes d'adaptation des virus aviaire à son nouvel hôte. Cette adaptation peut se faire soit par réassortiment génétique (échange de segments de gène), soit par l'accumulation de mutations sur les gènes impliqués dans la restriction d'hôte (en particulier Ha, Na, PB1, NS).

Le réassortiment génétique ne peut être compris que si les mécanismes d'assemblage des 8 segments du génome (vRNP) lors du packaging du virus sont compris. Cet assemblage est organisé, permettant in fine d'incorporer un représentant de chaque vRNP dans les particules virales bourgeonnantes. Après avoir décrit par cryotomographie l'organisation des 8 vRNP dans la particule virale, nous avons déterminé des réseaux d'interactions entre les différents segments de gènes, montrant des affinités fortes entre certains segments spécifiques (Fournier et al, NAR 2012, Gavazzi et al, PNAS 2013). Par ailleurs, la description des réseaux d'interactions des vRNP de virus de sous-types différents a montré que ces réseaux sont sous-types dépendants (Gavazzi et al, NAR 2013), ce qui pouvait être un facteur limitant au réassortiment génétique. En effet, nous avons aussi montré que l'absence d'interactions potentielles entre vRNP de virus différents rendait impossible un assemblage hétérologue dans une cellule co-infectée (Essere et al, PNAS 2013). En revanche, par mutagenèse dirigée, nous avons aussi montré que la substitution d'un nombre limité de nucléotides dans les régions impliquées dans l'assemblage du complexe macromoléculaire des vRNP pouvait lever ce frein à l'incorporation de segments d'origine différente dans un fond génétique d'un virus H3N2 (Essere et al, 2013, Isel et al, Vaccine 2013). Nos travaux sur l'assemblage vont continuer, afin de définir pour chaque segment les positions nucléotidiques impliquées dans l'assemblage des vRNP de PR8 et WSN.

Les mutations des virus influenza sont le reflet des quasi-espèces qui constituent l'inoculum infectieux. Au cours de l'infection, une quantité importante de virus est produite avec un taux de mutation élevé. Dès lors, la compréhension des facteurs de risque de développer une infection grave liée à des virus présentant des facteurs de risque identifiés ou suspectés repose sur la détermination précoce de la présence de ces facteurs dans la population des virus responsable des cas sévères. Pour cela, nous avons développé une approche de séquençage à haut débit sur les échantillons biologiques des patients présentant des formes graves, afin de pouvoir mieux prédire l'évolution de la maladie, et d'optimiser la prise en charge du patient. De même, l'identification des marqueurs prédictifs précoces de ces infections graves serait aussi utile pour améliorer la survie des patients atteints de formes de grippe sévère. En se basant sur des travaux préliminaires (Berri et al, Cell Mol Life Sci. 2014), et l'utilisation d'outils de NGS maîtrisés par le laboratoire (Josset et al, J Virol 2012, Josset et al, Plos One 2010), et grâce à un financement PHRC, nous allons conduire une étude prospective sur les marqueurs prédictifs précoces de l'évolution des formes de grippe sévères admises en réanimation.

➤ **Axe2 : Etude de la Balance HA-NA des virus influenza.**

Depuis de nombreuses années, le laboratoire décrit les interactions qui existent entre les deux glycoprotéines de surface en terme de virulence et de pathogénèse (Casalegno et al, Plos One 2014, Ferraris et al, Antivir Res, 2012, Richard et al Plos One 2012, Pourceau et al, Chembiochem. 2011), et le rôle de certaines mutations sur la résistance aux inhibiteurs de la neuraminidase (Ferraris et al, J Clin Virol 2008, Richard et al, AAC 2011, Casalegno et al, Antiviral Res. 2010, Escuret et al JID 2014). Nous souhaitons continuer ce travail, notamment en déterminant si les mutations décrites dans les sous-types de virus influenza humains peuvent être transposées aux sous-types aviaires ; pour cela, nous allons reconstruire par génétique inverse des virus aviaires comportant des neuraminidases dont les séquences auront été modifiées afin de tester les mutations 275 dans les NA du groupe 1 et les mutations 119 et 292 dans les NA des virus du groupe 2. Par ailleurs, nous allons préparer des systèmes de production de glycoprotéines fonctionnelle solubles afin de pouvoir mieux caractériser à la fois les affinités et les capacités catalytiques des HA et NA.

➤ **Axe3 : Approche transcriptomique in vitro et in vivo lors de l'infection virale : développement de nouveaux antiviraux et étude de la pathogénèse.**

En lien avec l'analyse des mécanismes de virulence et de pathogénèse décrits ci-dessus, nous avons développé une approche « Omique » pour l'étude de l'impact des virus influenza dans des systèmes *in vitro* et chez l'homme. Cette approche mise au point en 2010 (Josset et al, Plos One 2010) a montré que l'obtention de signatures transcriptomiques détaillées permettait d'identifier des voies cellulaires à cibler par des molécules antivirales. En effet, en perturbant l'état cellulaire favorable à l'infection, il est théoriquement possible de développer

des stratégies antivirales ciblant des protéines cellulaires qui auraient pour effet de bloquer la réplication virale et donc l'infection. A l'issue du travail initial, une première molécule a été identifiée et un essai clinique financé par un PHRC a été réalisé entre 2010 et 2014 (FLUMED). Les résultats sont en cours d'analyse. Par ailleurs, lors d'un autre essai (COMBINA), il a été possible de recueillir des échantillons de lavage nasal de personnes infectées par les virus H1N1 et H3N2, et réaliser chez ces patients des profils transcriptomiques lors de l'infection, et après guérison. Ces données, en cours d'exploitation, ouvrent de nouvelles perspectives en termes de molécules potentiellement antivirales qui pourraient être issues d'un repositionnement thérapeutique. Enfin, les profils ont aussi montré des voies d'activation de la voie P53 et en particulier de l'interaction entre NS1 et P53 et mdm2 qui pourraient aussi être des cibles antivirales (Terrier et al, FEBS Lett. 2013, Terrier et al, Virol J 2011).

➤ **Axe4 : Etude du rôle de co-infections virus bactéries.**

Lors de la surinfection bactérienne, les mécanismes de coopération entre les virus et les bactéries sont connus, mais parfois que de façon purement descriptive. En collaboration avec l'équipe du CNR des Staphylocoques (F Vandensech et G Lina), un programme sur les co-infections grippe-staphylocoque a été initié en 2011 à la suite d'une étude rétrospective (Casalegno et al, Med Mal Inf 2011, Lamand V, Clin Microbiol Infect. 2012). Dans un premier temps, il a été testé la possibilité d'une coopération entre les toxines PVL et les virus de la grippe. Le travail est encore en cours et les résultats préliminaires montrent que le virus potentialise l'effet délétère de la PVL sur les polynucléaires humains (Casalegno et al, RICAL 2013).

➤ **Axe5 : support du CNR aux enquêtes.**

Le CNR est aussi impliqué dans la réalisation de travaux sur l'estimation de l'efficacité vaccinale mesurée à posteriori (Amour et al, Vaccine 2012), ou en temps réel (Fluvac, étude en cours), et l'impact des couvertures vaccinales sur la prévention de la grippe dans les services hospitaliers (Benet et al, BMC Infect Dis. 2012). Il participe aussi à des enquêtes sur les gripes nosocomiales à l'hôpital, et conjointement avec l'équipe d'hygiène hospitalière, il a analysé la diffusion d'un virus influenza dans une unité de soins (Eibach et al, J Hosp infect 2014). En parallèle, un travail a été mené combinant le recueil des contacts entre individus par le biais de badges à haute fréquence portés par le personnel et les patients pendant 2 semaines dans une unité de gériatrie (Stele J, PLoS One. 2011). L'analyse des contacts et des cas observés va être réalisée, montrant le rôle important des infirmiers dans le risque de dissémination nosocomiale des virus influenza.

### 6.1.3 CNR-IPG

Projet de recherche du laboratoire de virologie de l'IPG prévu sur 3 ans de 2013 à 2016, et réalisé en collaboration avec le Centre hospitalier de Cayenne et la CIBU à l'IPP. Ce projet vise à étudier les syndromes cliniques sévères d'allure virale non étiquetés. Basé sur une démarche prospective, ce projet a pour objectif principal d'identifier des virus à potentiel émergent ou ré-émergent chez des patients présentant différents types de symptomatologie clinique (atteinte cérébrale de type encéphalite, atteintes pulmonaire, hépatorénale, hémorragique ou multiviscérale) en s'appuyant sur des techniques d'immunologie, de biologie cellulaire mais également de biologie moléculaire classique et de haut-débit.

## 6.2 Publications et communications en lien direct avec l'activité du CNR

### 6.2.1 Publications nationales

Mosnier A, Daviaud I, Vabret A, Valette M, Enouf V, Debost E, Cohen JM. Virus respiratoire syncytial : un impact non négligeable chez les seniors. *Med Mal Infect.* 2014 Jun;44(6 Suppl):51.

Casalegno JS, Bouscambert M, Lina B. Vaccin antigrippal en situation d'urgence. *Virologie*, 2014, 18 ; 151-169.

Lina B. Potentiel pandémique des virus influenza aviaires circulant actuellement et ayant des caractéristiques proches du virus de 1918. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 851-54.

Lina B. Gain de Fonction des virus influenza. *Biofutur*, 2013: 348: 51-51

Lina B. Pourquoi faut-il vacciner et se faire vacciner contre la grippe ? *La Revue du Praticien*, 2013, 63, 4-6

Equipes de surveillance de la grippe\*, Belchior E. Surveillance épidémiologique et virologique de la grippe en France métropolitaine, saison 2013-2014. *BEH* 2014; 28 : 460-465.

Lina B, Riteau B. Antagonistes de PAR1 - Vers une nouvelle stratégie de lutte contre la grippe. *Med Sci (Paris)* 2013;29:107-9.

Payet C, Lutringer-Magnin D, Cassier P, Lina B, Argaud L, Allaouchiche B, et al. Description des cas confirmés de grippe A(H1N1)pdm09 admis en réanimation et identification des facteurs de gravité *Med Mal Infect* 2013;43:81-4.

Petit-Sinturel M, Najouillah F, Herrmann C, Enfissi A, Romagne MJ, De Saint Alary F, Boucaud S, Chappert JL, Ledrans M. Bilan de la saison grippale 2012-2013 aux Antilles : Guadeloupe, Martinique, St-Martin et St-Barthélemy. *Bulletin de Veille Sanitaire Antilles Guyane.* 2013;2:7-12.

### 6.2.2 Publications internationales

Freidl GS, Meijer A, de Bruin E, de Nardi M, Munoz O, Capua I, Breed AC, Harris K, Hill A, Kosmider R, Banks J, von Dobschuetz S, Stark K, Wieland B, Stevens K, van der Werf S, Enouf V, van der Meulen K, Van Reeth K, Dauphin G, Koopmans M; FLURISK Consortium. Influenza at the animal-human interface: a review of the literature for virological evidence of human infection with swine or avian influenza viruses other than A(H5N1). *Euro Surveill.* 2014 May 8;19(18). pii: 20793. Review.

Bonduelle O, Carrat F, Luyt CE, Leport C, Mosnier A, Benhabiles N, Krivine A, Rozenberg F, Yahia N, Samri A, Rousset D, van der Werf S, Autran B, Combadiere B. Characterization of pandemic influenza immune memory signature after vaccination or infection. *J Clin Invest.* 2014 Jul 1;124(7):3129-36. doi: 10.1172/JCI74565. Epub 2014 Jun 9

Guihot A, Luyt CE, Parrot A, Rousset D, Cavillon JM, Boutolleau D, Fitting C, Pajanirassa P, Mallet A, Fartoukh M, Agut H, Musset L, Zoorob R, Kirilovksy A, Combadière B, van der Werf S, Autran B, Carcelain G; FluBAL Study Group. Low titers of serum antibodies inhibiting hemagglutination predict fatal fulminant influenza A(H1N1) 2009 infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014 May 15;189(10):1240-9.

Cauchemez S, Fraser C, Van Kerkhove MD, Donnelly CA, Riley S, Rambaut A, Enouf V, van der Werf S, Ferguson NM. Middle East respiratory syndrome coronavirus: quantification of the extent of the epidemic, surveillance biases, and transmissibility. *Lancet Infect Dis*. 2014 Jan;14(1):50-6.

Voirin N, Payet C, Barrat A, Cattuto C, Pinton JF, Khanafer N, Régis C, Kim B, Comte B, Casalegno JS, Lina B, Vanhems P. Combining high-resolution contact data with virological data to investigate influenza transmission in a hospital geriatric unit. 2014, *Infection Control and Hospital Epidemiology*, in press 2014

Casalegno JS, Ferraris O, Escuret V, Bouscambert M, Bergeron C, Linès L, Excoffier T, Valette M, Frobert E, Pillet S, Pozzetto B, Lina B, Ottmann M. Functional balance between the hemagglutinin and neuraminidase of influenza A(H1N1)pdm09 HA D222 variants. *PLoS One*. 2014 Aug 13;9(8):e104009.

Berri F, Haffar G, Lê VB, Sadewasser A, Paki K, Lina B, Wolff T, Riteau B. Annexin V incorporated into influenza virus particles inhibits gamma interferon signaling and promotes viral replication. *J Virol*. 2014 Oct 1;88(19):11215-28.

Escuret V, Collins PJ, Casalegno JS, Vachieri SG, Cattle N, Ferraris O, Sabatier M, Frobert E, Caro V, Skehel JJ, Gamblin S, Valla F, Valette M, Ottmann M, McCauley JW, Daniels RS, Lina B.

A novel I221 L substitution in neuraminidase confers high level resistance to oseltamivir in influenza B viruses. *J Infect Dis*. 2014 Oct 15;210(8):1260-9

Terrier O, Carron C, Cartet G, Traversier A, Julien T, Valette M, Lina B, Moules V, Rosa-Calatrava M. Ultrastructural fingerprints of avian influenza A(H7N9)virus in infected human lung cells. *Virology* 456-457(2014)39-42.

Eibach D, Casalegno JS, Bouscambert M, Bénét T, Régis C, Comte B, Byeul-A K, Vanhems P, Lina B. Routes of transmission during a nosocomial influenza A(H3N2) outbreak among geriatric patients and health care workers. *Journal of Hospital Infection*, 2014, 86:188-93.

Régis C, Voirin N, Escuret V, Kim BA, Robert O, Lina B, Comte B, Vanhems P. Five years of hospital based surveillance of influenza-like illness and influenza in a short-stay geriatric unit. *BMC Res Notes*. 2014 21;7:99.

Berri F, Lê VB, Jandrot-Perrus M, Lina B, Riteau B. Switch from protective to adverse inflammation during influenza: viral determinants and hemostasis are caught as culprits. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Mar;71(5):885-98

Terrier O, Diederichs A, Dubois J, Cartet G, Lina B, Bourdon JC, Rosa-Calatrava M. Influenza NS1 interacts with p53 and alters its binding to p53-responsive genes, in a promoter-dependent manner. *FEBS Lett*, 2013 Sep 17, 587(18):2965-71

Essere B, Yver M, Gavazzi C, Terrier O, Isel C, Fournier E, Giroux F, Textoris J, Julien T, Socratous C, Rosa-Calatrava M, Lina B, Marquet R. Critical role of segment-specific packaging signals in genetic reassortment of influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013,110(40), E3840-E3848

Khoufache K, Berri F, Nacken W, Vogel AB, Delenne M, Camerer E, Coughlin SR, Carmeliet P, Lina B, Rimmelzwaan GF, Planz O, Ludwig O, Ludwig S, Riteau B. PAR1 contributes to influenza A virus pathogenicity in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 2013, 123(1), 206-214

Berri F, Rimmelzwaan GF, Hanss M, Albina E, Foucault-Grunenwald ML, Lê VB, Vogelzang-van Trierum SE, Gil P, Camerer E, Martinez D, Lina B, Lijnen R, Carmeliet P, Riteau B. Plasminogen controls inflammation and pathogenesis of influenza virus infections via fibrolysis. *Plos Pathogens*, 2013, 9(3), e1003229

Whitley JR, Boucher CAB, Lina B, Nguyen-Van-Tam J, Osterhaus A, Schutten M, Monto AS. Global assessment of resistance to neuraminidase inhibitors: 2008-2011 The influenza Resistance Information Study (IRIS). *Clinical Infectious Diseases*, 2013, 56(9), 1197-205

Valour F, Bénet T, Chidiac C, Study Group. Pandemic A(H1N1)2009 influenza vaccination in Lyon University Hospitals, France: perception and attitudes of hospital workers. *Vaccine*, 2013, 31(4), 592-595

Blanchon T, Mentré F, Charlois-Ou C, Dornic Q, Mosnier A, Bouscambert M, Carrat F, Duval X, Enouf V, Leport C; Bivir Study Group. Factors associated with clinical and virological response in patients treated with oseltamivir or zanamivir for influenza A during the 2008-2009 winter. *Clin Microbiol Infect*. 2013 Feb;19(2):196-203

Bonduelle O, Yahia N, Siberil S, Benhabiles N, Carrat F, Krivine A, Rozenberg F, Dimitrov J, Kaveri SV, Curjol A, Tindel M, Louet M, Desert F, Launay O, Loulergue P, Badre G, Katlama C, Bricaire F, Samri A, Rousset D, van der Werf S, Jauréguiberry S, Combadiere B. Longitudinal and integrative biomodeling of effector and memory immune compartments after inactivated influenza vaccination. *J Immunol*. 2013 Jul 15;191(2):623-31.

Crescenzo-Chaigne B, Barbezange C, van der Werf S. The Panhandle formed by influenza A and C virus NS non-coding regions determines NS segment expression. *PLoS One*. 2013 Nov 21;8(11):e81550.

Desdouits M, Munier S, Prevost MC, Jeannin P, Butler-Browne G, Ozden S, Gessain A, Van Der Werf S, Naffakh N, Ceccaldi PE. Productive infection of human skeletal muscle cells by pandemic and seasonal influenza A(H1N1) viruses. *PLoS One*. 2013 Nov 5;8(11):e79628.

Durier C, Desaint C, Lucht F, Girard PM, Lévy Y, May T, Michelet C, Rami A, Roman F, Delfraissy JF, Aboulker JP, Launay O; ANRS 151 study group and the REIVAC network. Long-term immunogenicity of two doses of 2009 A/H1N1v vaccine with and without AS03(A) adjuvant in HIV-1-infected adults. *AIDS*. 2013 Jan 2;27(1):87-93.

Gavazzi C, Isel C, Fournier E, Moules V, Cavalier A, Thomas D, et al. An in vitro network of intermolecular interactions between viral RNA segments of an avian H5N2 influenza A virus: comparison with a human H3N2 virus. *Nucleic Acids Res* 2013;41:1241-54.

Guery B, Poissy J, el Mansouf L, Séjourné C, Ettahar N, Lemaire X, Vuotto F, Goffard A, Behillil S, Enouf V, Caro V, Mailles A, Che D, Manuguerra JC, Mathieu D, Fontanet A, van der Werf S; MERS-CoV study group. Clinical features and viral diagnosis of two cases of infection with Middle East Respiratory Syndrome coronavirus: a report of nosocomial transmission. *Lancet*. 2013 Jun 29;381(9885):2265-72.

Guery B, van der Werf S. Coronavirus: need for a therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*. 2013 Sep;13(9):726-7.

Le Bayon JC, Lina B, Rosa-Calatrava M, Boivin G. Recent developments with live-attenuated recombinant paramyxovirus vaccines. *Rev Med Virol* 2013;23:15-34.

Le Bayon JC, Terrier O, Cartet G, Lina B, Rosa-Calatrava M. Characterization of a key residue for hyperfusogenic phenotype in human parainfluenza virus type 2 (hPIV-2) fusion glycoprotein. *Virus Genes* 2013.

Mahamat A., Dussart P., Bouix A., Carvalho L., Eltges F., Matheus S., Miller MA., Alonso WJ., Quénel P., Viboud C. Climatic drivers of the seasonal epidemic of influenza in French Guiana, 2006-2010. *J Infection*. 2013 ;1-7.

Mailles A, Blanckaert K, Chaud P, van der Werf S, Lina B, Caro V, Campese C, Guéry B, Prouvost H, Lemaire X, Paty MC, Haeghebaert S, Antoine D, Ettahar N, Noel H, Behillil S, Hendricx S, Manuguerra JC, Enouf V, La Ruche G, Semaille C, Coignard B, Lévy-Bruhl D, Weber F, Saura C, Che D; investigation team. First cases of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) infections in France, investigations and implications for the prevention of human-to-human transmission, France, May 2013. *Euro Surveill*. 2013 Jun 13;18(24).

Mailles A, Blanckaert K, Chaud P, van der Werf S, Lina B, Caro V, et al. First cases of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) infections in France, investigations and implications for the prevention of human-to-human transmission, France, May 2013. *Euro Surveill* 2013;18.

Mosnier E, Mahamat A, Carvalho L, Nacher M, Abboud P, Chappert JL, Rousset D, Djossou F. Concurrent influenza and shigellosis outbreak in a gold mining site, French Guiana, March 2013. *Am J Trop Med Hyg* . in press.

Opatowski L, Varon E, Dupont C, Temime L, van der Werf S, Gutmann L, Boëlle PY, Watier L, Guillemot D. Assessing pneumococcal meningitis association with viral respiratory infections and antibiotics: insights from statistical and mathematical models. *Proc Biol Sci*. 2013 Jun 19;280(1764):20130519.

Ploin D, Chidiac C, Carrat F, Cohen B, Javouhey E, Mayaud C, Descenclos JC, Lina B, Leport C, the Fluco study group. Complications and factors associated with severity of influenza in hospitalized children and adults during the pandemic wave of A(H1N1)pdm2009 infections-The Fluco French cohort. *J Clin Virol* 2013;58:114-9.

Pozo F, Lina B, Andrade HR, Enouf V, Kossovakis A, Broberg E, et al. Guidance for clinical and public health laboratories testing for influenza virus antiviral drug susceptibility in Europe. *J Clin Virol* 2013;57:5-12.

Simon M, Hernu R, Cour M, Casalegno JS, Lina B, Argaud L. Fatal influenza A(H1N1)pdm09 encephalopathy in immunocompetent man. *Emerg Infect Dis* 2013;19:1005-7.

Whitley RJ, Boucher CA, Lina B, Nguyen-Van-Tam JS, Osterhaus A, Schutten M, et al. Global assessment of resistance to neuraminidase inhibitors, 2008-2011: the Influenza Resistance Information Study (IRIS). *Clin Infect Dis* 2013;56:1197-205.

### **6.2.3 Communications nationales**

Mosnier A, van der Werf S, Lina B, Valette M, Enouf V, Debost E, Cohen JM. Saison grippale 2012-2013 : 3 virus pour une épidémie. Poster, 14es Journées Nationales d'Infectiologie (JNI), Clermont-Ferrand, 14 juin 2013

### **6.2.4 Communications Internationales**

C. Barbezange, H. Blanc, O. Isakov, V. Enouf, N. Shomron, S. van der Werf, M. Vignuzzi. Use of deep-sequencing to evaluate the intrinsic heterogeneity of human influenza A viruses directly in nasal swabs. Poster. Fifth ESWI Influenza Conference, 14 to 17 September 2014, Riga, Latvia

C. Barbezange, H. Blanc, O. Isakov, V. Enouf, N. Shomron, S. van der Werf, M. Vignuzzi. Use of deep-sequencing to evaluate the intrinsic heterogeneity of human influenza A viruses directly in nasal swabs. Poster. Options for the Control of Influenza VIII, 5-10 september 2013, Cape Town, South Africa

Picard C, Escuret V, de Saint Jean P, Casalegno JS, Lina B, Valette M. Comparative evaluation of bioNexia<sup>®</sup> influenza A+B to Quickvue<sup>®</sup> influenza A+B test for the detection of influenza in pediatric samples. Poster, 31<sup>st</sup> Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID), Milan (Italy), 28 mai-1er juin 2013

Eibach D, Bouscambert M, Casalegno JS, Gazeu, Escuret V, Frobert E, Gillet Y, Javouhey E, Lina B, Morfin F. Clinical characteristics and macrolide resistance of Mycoplasma pneumoniae infections, 2009-2012, France. Poster, 23e ECCMID, Berlin (Allemagne), 27-30 avril 2013

Tagajdid R, Casalegno JS, Eibach D, Lina B, Mrani S, Valette M, Mekki Y. Serological diagnosis for influenza: comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), complement fixation and haemagglutination inhibition essay. Poster, 23e ECCMID, Berlin (Allemagne), 27-30 avril 2013

Casalegno JS, Eibach D, Ottmann M, Lina B. 11 years of Pubmed trends for infectious microorganisms: influenza in the fast lane. Poster, 23e ECCMID, Berlin (Allemagne), 27-30 avril 2013

Boucher C, Dutkowslo R, Ives J, Klumpp K, Lina B, Monto A, Osterhaus A, Nguyen-Van-Tam J, Schutten M, Tong X, Whitley RJ. Symptom resolution is significantly faster in oseltamivir-treated than untreated patients in year 4 of the influenza resistance information study (IRIS). Communication orale, XVI International Symposium on Respiratory Viral Infections (ISRVI), Rotterdam (Pays Bas), 14-17 mars 2013

## **6.2.5 Communications Nationales sur invitation**

Lina B Coinfection pulmonaires grippe /bactéries, Communication orale sur invitation, Colloque Experts Praticiens Infectiologie, 6-7 février 2014, Paris

van der Werf S. Manipulating the influenza polymerase experience within the PREDEMICS project for the evaluation of dual use issues. Responsibility in infectious diseases research meeting, Institut Pasteur, Paris, 28 January 2014

van der Werf S. Pneumopathies fébriles et virus respiratoires. Bichat, Paris, 21 mars 2014

van der Werf S. Virus Emergents. GEIG – 26ème Rencontres sur la Grippe et sa Prévention 3 avril 2014, Paris

van der Werf S. Biologie de synthèse et Virus influenza Hautement Pathogènes Observatoire de la Biologie de Synthèse, 10 Mars 2014, CNAM, Paris

van der Werf S. Les nouveaux virus respiratoires en circulation dans le monde. XVIIème Journée Nationale du Réseau des GROG. Ministère de la Santé, Paris, 3 octobre, 2013

van der Werf S. Modifications de la Pathogénicité des Virus Grippaux et conditions de leur manipulation. Réunion du Comité Scientifique du Haut Conseil des Biotechnologies, 5 Mars 2013, Paris

Lina B, Duval X. Traitement antiviral au cours de la grippe : les enseignements de l'épidémie à H1N1v. Communication orale, 56<sup>e</sup> Journée de l'Hôpital Claude Bernard, Paris 18<sup>e</sup>, 14 novembre 2013

Lina B. Invitation Table Ronde, Assises Nationales du Vaccin, Paris, 7 novembre 2013

Lina B. Épidémiologie et aspects virologiques. Communication orale sur invitation, 14<sup>es</sup> Journées Nationales d'Infectiologie (JNI), Clermont-Ferrand, 14 juin 2013

Enouf V. Nouvelles souches de gripes aviaires et humaines: Données épidémiologiques et cliniques. Congrès SFM 2014, institut Pasteur, Paris, 30 Mars et 1<sup>er</sup> Avril 2014

### **6.2.6 Communications Internationales sur invitation**

Lina B. Correlates of protection, interpretation, challenge. Communication orale sur Invitation, Session VIII : How to best integrate laboratory results in I-MOVE vaccine effectiveness estimates?, IMOVE Annual Meeting, Veyrier du Lac, 1-3 juillet 2013

Lina B. Pandemic vaccines: priority groups and procurement, vaccine uptake and distribution, planning for the future. Communication orale sur Invitation, Fluquest Workshop, IES, Brussels, 3 mai 2013

Lina B. New trends in antiviral therapy of influenza infections. Communication orale sur Invitation, The 4<sup>th</sup> Christophe Mérieux Conference "Trends in Virology", Veyrier du Lac, 27-29 janvier 2013

van der Werf S. From SARS- to MERS-CoV How do they differ? IBEID 3<sup>rd</sup> Annual Meeting, 21 June 2013, Paris, France

van der Werf S. Les virus de la grippe : émergences réussie et ratée... *Emergence : le concept, la pathologie...et la prise de décisions*, RICAI 2013, Paris, 21-22 Novembre 2013, Paris, France

van der Werf S. Infection à MERS coronavirus, «Risques épidémiques et expertise microbiologique» RICAI 2013, Paris, 21-22 Novembre 2013, Paris, France

van der Werf S. Update on the French cases of MERS-CoV. Annual Meeting EMPERIE, 27-28 May 2014, Rotterdam, The Netherlands.

van der Werf S. From SARS- to MERS-CoV How do they differ? IBEID 3<sup>rd</sup> Annual Meeting, 21 June 2013, Paris, France

van der Werf S. Update on the French cases of MERS-CoV. Annual Meeting EMPERIE, 27-28 May 2014, Rotterdam, The Netherlands.

### **6.2.7 Comité scientifique ou d'organisation de congrès ou colloques**

- *Rencontres sur la grippe, GEIG, Avril 2014* (B. Lina, S. van der Werf,)
- *Journée Nationale des GROG* (S. van der Werf, B. Lina)
- *Options for the Control of Influenza VIII*, 5-10 september **2013**, Cape Town, South Africa (S. van der Werf)
- *Congrès ESV, septembre 2013, Meeting Organiser, membre du Scientific advisory board* (B. Lina)

## 7 Coopération avec les laboratoires de santé animale

En raison de l'absence de suspicions d'infection par les virus de grippe aviaire H7N9 et de la diminution du nombre de cas en Chine, aucune coopération n'a semblé nécessaire.

## 8 Programme d'activité pour les années 2014-2015 et 2015-2016

Suite à la cessation de l'activité du réseau des GROG et la mise en place du réseau unique placé sous la responsabilité de l'INSERM-UPMC pour la surveillance en métropole, les deux laboratoires CNR-IPP et CNR-HCL contribueront à la mise en place du nouveau protocole de surveillance en lien avec l'InVS et les responsables du Réseau Sentinelles.

Au plan des techniques et stratégies d'analyses des prélèvements et souches virales, globalement, les activités seront poursuivies comme précédemment en tenant compte des possibles évolutions virales et seront adaptées si besoin suite à l'apparition ou l'émergence d'un nouveau virus.

L'harmonisation des modalités de recueil des données notamment issues du réseau RENAL sera poursuivie, ainsi que les échanges de protocoles.

### ➤ Détection virale

L'harmonisation des techniques moléculaires est déjà largement en place entre les trois laboratoires du CNR.

Le CNR poursuivra le développement autant que de besoin des qRT-PCR pour l'ensemble des sous-type de virus influenza zoonotiques susceptibles d'infecter l'homme (ex : H10N8, H6N1, etc..). Comme par le passé, dans la mesure du possible, le CNR-IPP fournira les témoins nécessaires, notamment sous forme de transcrits synthétiques ou de plasmides et les laboratoires du CNR fourniront un appui technique aux laboratoires hospitaliers autant que de besoin.

### ➤ Isolement, et identification

L'isolement viral restera une priorité en vue de la caractérisation antigénique fine des isolats et de leur caractérisation génétique complète. Pour le CNR-IPP, dans l'attente de la disponibilité d'un LBS2, les prélèvements continueront d'être adressés au CNR-IPP en vue de l'isolement viral. Outre la réalisation de l'isolement pour une sélection représentative en termes spatio-temporels ainsi que le cas échéant en termes de type et sous-type viral, on privilégiera comme précédemment l'isolement à partir des prélèvements des formes graves notamment de patients sans facteurs de risque et sans complications bactériennes (recherche de déterminants de virulence); des cas d'échec de traitement (recherche de résistances aux antiviraux) ; des cas d'échec vaccinal (variants antigéniques).

Comme précédemment, une attention particulière sera portée aux virus A(H3N2) dont les évolutions récentes en termes d'affinité pour le récepteur ainsi que pour certains d'entre eux la capacité d'attachement au récepteur via leur neuraminidase et non pas seulement via leur hémagglutinine rendent difficile leur détection par test d'hémagglutination lors de l'isolement ainsi que leur caractérisation antigénique par test d'IHA. Des stratégies alternatives (isolement en cellules SIAT ; détection de l'isolement par qRT-PCR ou ELISA ; tests IHA en présence d'oseltamivir ; microneutralisation) seront mises en œuvre autant pour pallier ces difficultés.

### ➤ **Caractérisation génétique des virus influenza**

La caractérisation génétique des virus sera poursuivie en privilégiant le séquençage direct à partir des prélèvements. Comme précédemment, le séquençage portera en priorité sur les gènes HA (cible principale des anticorps neutralisants et porteur de déterminants de tropisme et de virulence), NA (cible des anticorps et cible des antiviraux inhibiteurs de la NA), M2 (cible des antiviraux amantadine et rimantadine), NS (déterminant de pathogénicité). Le séquençage de génomes complets ciblera plus particulièrement les isolats de cas graves.

Le CNR-IPP poursuivra la recherche de polymorphismes particuliers par pyroséquençage et de nouveaux tests de pyroséquençage seront développés pour la recherche de mutations de réduction de la sensibilité aux antiviraux pour les virus de type B et en cas d'apparition de nouveaux polymorphismes ayant un impact sur le tropisme, la virulence ou la sensibilité aux antiviraux. Parallèlement, selon les moyens disponibles, l'utilisation des nouvelles techniques de séquençage (NGS) pour l'analyse de la diversité des populations virales sera poursuivie afin d'évaluer son apport dans le suivi de l'évolution virale dans le cadre de la surveillance.

En termes d'étude de la sensibilité aux antiviraux, les tests seront étendus aux nouveaux antiviraux récemment mis sur le marché tels que peramivir (Japon, Corée du Sud) et lananamivir (Japon) dès que ceux-ci seront disponibles au CNR.

### ➤ **Analyses sérologiques**

Les analyses sérologiques seront maintenues pour le CNR-IPP et le CNR-HCL en appliquant les techniques d'inhibition d'hémagglutination et de microneutralisation comme par le passé. L'apport des techniques de mise en évidence des anticorps anti-neuraminidase sera étudié.

La possibilité de développement de méthodologies haut débit moins consommatrices de sérum continueront d'être explorées.

### ➤ **Activités de surveillance**

Comme indiqué plus haut dans le cadre de la mise en place du Réseau unique et selon le protocole qui sera défini, les laboratoires CNR-IPP et CNR-HCL adapteront leurs bases de données, systèmes d'extraction et circuits de communication de données. Afin de s'assurer d'un apport suffisant de prélèvements en temps réel indispensable pour le suivi en temps réel des évolutions génétiques et antigéniques des virus circulant et la détection précoce de nouveaux virus ou variants, les laboratoires CNR-IPP et CNR-HCL prendront en charge les prélèvements pour l'ensemble des régions en métropole à l'exception de la Corse.

Le CNR assurera par ailleurs, la collecte, et l'analyse de l'ensemble des données virologiques issues du réseau unique ainsi que leur transmission à l'ECDC et l'OMS.

Un effort particulier sera réalisé en direction des laboratoires hospitaliers du réseau RENAL afin de pallier une diminution attendue du nombre de prélèvements issus de la communauté. Les laboratoires CNR-IPP et -HCL veilleront tout particulièrement à se procurer les prélèvements ou souches virales détectées comme positives pour les virus grippaux avant et après la période de circulation épidémique, c'est à dire à un moment où la surveillance communautaire sera moins sensible que dans le cadre du réseau des GROG pour détecter les premiers et derniers virus circulant en métropole du fait de l'utilisation d'une définition de cas nettement plus restrictive que précédemment. Les efforts seront également poursuivis pour améliorer le recueil des données cliniques associées aux prélèvements ou souches en provenance des hôpitaux.

Par ailleurs, les outils informatiques de recueil de données microbiologiques et sérologiques auprès des correspondants du réseau RENAL par Internet (logiciel Voozoo développé par

Epiconcept) seront adaptées à la nouvelle configuration du système de surveillance. Un système de recueil unique pour l'ensemble des laboratoires participants sera mis en place et servira de base pour l'édition des différents bulletins ainsi que pour la transmission des données hebdomadaires à l'attention des autorités de santé nationales et internationales.

Parallèlement, en métropole, les CNR-IPP et -HCL continueront à s'investir en lien avec l'InVS et la DGS avec les différents acteurs impliqués dans la surveillance de la grippe pour l'optimisation du réseau unique et plus généralement du système de surveillance de la grippe et des autres virus respiratoires.

Pour la Guyane, le CNR IPG en lien avec la CIRE Antilles-Guyane s'impliquera dans la réactivation du système de surveillance de la grippe suite à la réorganisation du réseau de médecins sentinelles en Guyane en 2014.

➤ **Démarche Qualité**

Les trois laboratoires du CNR poursuivront leur mobilisation de façon concertée pour l'établissement du dossier de demande d'accréditation partielle selon le référentiel NF EN ISO 15189 ainsi que pour la mise en place des différents dossiers de validations des méthodes moléculaires et de réponses à apporter pour répondre à ce référentiel.

**Annexes**

**2014**

**Centre national de  
référence des virus  
influenzae**

**Saison  
2013-2014**



# Sommaire

<b>ANNEXE 1 : MISSIONS ET OBJECTIFS .....</b>	<b>5</b>
<b>ANNEXE 2 : EQUIPES ET ORGANIGRAMMES .....</b>	<b>7</b>
<b>ANNEXE 3 : PLANS DES LOCAUX .....</b>	<b>10</b>
<b>ANNEXE 4 : LISTE DES PRINCIPAUX EQUIPEMENTS .....</b>	<b>15</b>
<b>ANNEXE 5 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1 Techniques de détection .....</b>	<b>18</b>
1.1.1 Techniques de (RT-)PCR en temps réel (q(RT-)PCR).....	18
1.1.2 Autres techniques de détection.....	19
<b>1.2 Techniques d'isolement .....</b>	<b>20</b>
<b>1.3 Techniques d'identification.....</b>	<b>20</b>
<b>1.4 Caractérisation génétique des virus influenza .....</b>	<b>20</b>
1.4.1 Techniques de détection de polymorphismes génétiques .....	20
1.4.2 Techniques de séquençage.....	20
<b>1.5 Techniques sérologiques.....</b>	<b>20</b>
<b>1.6 Caractérisation phénotypique des virus grippaux.....</b>	<b>20</b>
<b>ANNEXE 6 : DESCRIPTION DES COLLECTIONS .....</b>	<b>22</b>
<b>ANNEXE 7 : LISTE DES LABORATOIRES .....</b>	<b>25</b>
<b>ANNEXE 8 : TECHNIQUES DIVERSES .....</b>	<b>28</b>
<b>ANNEXE 9 : ANALYSE PHYLOGENETIQUE DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES DES GENES HA ET NA DES VIRUS DE TYPE A ET B.....</b>	<b>29</b>



## **ANNEXE 1 : MISSIONS ET OBJECTIFS**

---

Dans le cadre de leur mission de santé publique, les trois laboratoires du CNR participent à la surveillance virologique de la circulation des virus grippaux et autres virus respiratoires responsables d'Infections Respiratoires Aigües (IRA) en France dans la population et en milieu hospitalier. Ils assurent également le suivi en termes d'ampleur et d'impact des épidémies de grippe saisonnière ou liées à d'autres virus respiratoires tels que le Virus Respiratoire Syncytial (VRS) ou les rhinovirus. La détection des premiers virus grippaux en métropole permet de donner l'alerte auprès des autorités de santé (InVS et DGS). Cela ne s'applique pas à la Guyane où existe une circulation annuelle de virus grippaux.

Les laboratoires du CNR ont également pour mission d'assurer l'identification et la caractérisation antigénique et génétique des virus grippaux responsables des épidémies annuelles afin notamment d'évaluer l'adéquation de la composition vaccinale avec les virus grippaux circulants ainsi que d'apprécier l'évolution de la résistance naturelle ou acquise post traitement aux antiviraux.

Par ailleurs, dans le contexte de risque pandémique lié à la survenue de cas d'infection zoonotique tels que l'infection par des virus grippaux aviaires A(H5N1), A(H7N9) ou porcins A(H3N2)v, les laboratoires du CNR effectuent l'analyse virologique des prélèvements en cas de suspicion de grippe zoonotique. Le cas échéant, en cas de diagnostic positif de virus de grippe zoonotique, ils ont en charge d'en réaliser l'isolement et de caractériser la souche virale en cause.

En pratique, l'activité de surveillance est répartie géographiquement sur le territoire. Elle est prise en charge en métropole par :

l'Unité de Génétique Moléculaire des Virus à ARN – Institut Pasteur – Paris (laboratoire coordonateur du CNR) pour la région Nord (CNR-IP);  
le Laboratoire de Virologie Est - HCL Lyon (laboratoire associé) en région Sud (CNR-HCL);  
le laboratoire de Virologie de l'Institut Pasteur de la Guyane (laboratoire associé) en région Antilles Guyane (CNR-IPG)

Le Centre national de référence des virus influenzae et ses laboratoires associés s'engagent à assurer les missions définies par l'arrêté du 29 novembre 2004 notifiant les modalités de désignation et les missions des CNR

### 1. Apporter une expertise microbiologique

Caractériser les souches de grippe isolées en Métropole et dans les DOM (*sous-typage, caractéristiques antigéniques, analyses génétiques*)

Développer et diffuser les techniques de diagnostic et d'identification des virus influenzae

Contribuer à l'identification et à la surveillance des souches résistantes aux antiviraux

Etudier l'adéquation de la composition du vaccin contre la grippe au regard des souches virales circulantes

Analyser et sélectionner les souches de grippe les plus pertinentes pour les envoyer vers les centres mondiaux de référence dans le cadre de la collaboration avec les centres de référence de l'OMS

Maintenir une expertise sur le coronavirus responsable du SRAS et les autres virus respiratoires

### 2. Contribuer à la surveillance épidémiologique en lien avec l'Institut de Veille Sanitaire

Contribuer à la surveillance virologique de la grippe (détection des virus circulants sur le territoire et évolution hebdomadaire du nombre et des caractéristiques des souches circulantes) en lien avec les structures concernées (réseaux de médecins, d'établissements hospitaliers) et en lien avec les CIRE concernées pour les DOM

Contribuer au réseau européen de surveillance en diffusant les données virologiques sur les virus grippaux recueillis en France

Mettre en place une surveillance virologique adaptée en cas de menace pandémique et développer les outils de diagnostic adaptés (PCR, tests sérologiques.)

Contribuer à la surveillance microbiologique et épidémiologique des autres agents pathogènes responsables de syndromes grippaux en métropole et dans les DOM

Contribuer à la surveillance des souches grippales chez l'animal, en particulier aviaires et collaborer avec des laboratoires experts dans le domaine de la surveillance animale

Contribuer à la mise en place de la surveillance unifiée régionalisée de la grippe

### 3. Contribuer à l'alerte en signalant à l'Institut de Veille Sanitaire tout évènement inhabituel

Mutation, émergence d'une nouvelle souche, apparition de résistance aux antiviraux, formes cliniques inhabituelles

### 4. Expertise et conseil

Apporter son expertise aux autorités de santé dans le domaine de la prévention et du contrôle de la grippe

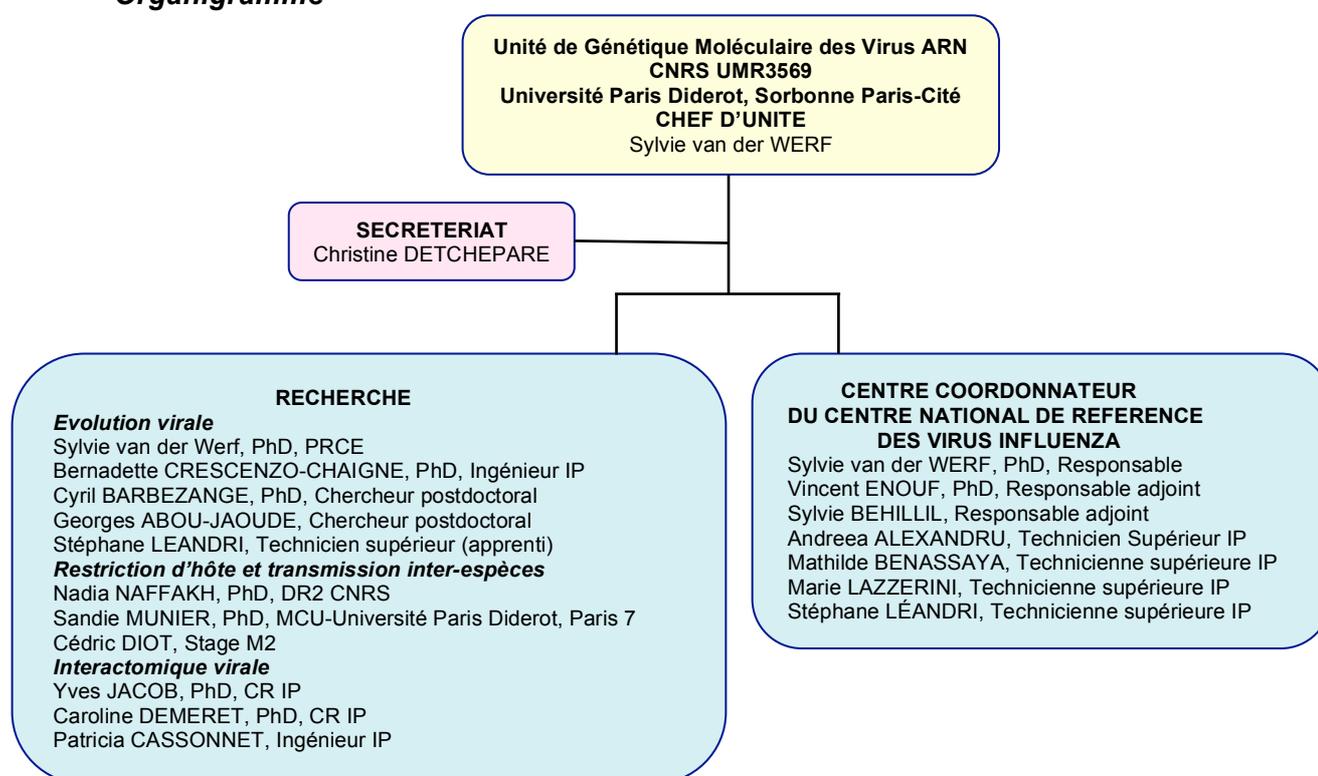
Contribuer aux travaux de préparation à une pandémie grippale de la Direction Générale de la Santé

## ANNEXE 2 : EQUIPES ET ORGANIGRAMMES

### ➤ CNR-IPP

Nom	Prénom	Fonction	Qualification	Organisme payeur	ETP CNR Virus Influenzae
van der WERF	Sylvie	Responsable	Professeur; PhD	IP, Paris	0,05
ENOUF	Vincent	Responsable adjoint	PhD	IP, Paris	0,75
BEHILLIL	Sylvie	Responsable adjoint	Pharm	IP, Paris	0,75
BENASSAYA	Mathilde	Technicien supérieur		IP, Paris	0,9
ALEXANDRU	Andreea	Technicien supérieur		IP, Paris	0,9
LÉANDRI	Stéphane	Technicien supérieur		IP, Paris	0,9
LAZZERINI	Marie	Technicien supérieur		IP, Paris	0,8
DETCHEPARE	Christine	Secrétaire de direction		IP, Paris	0,5

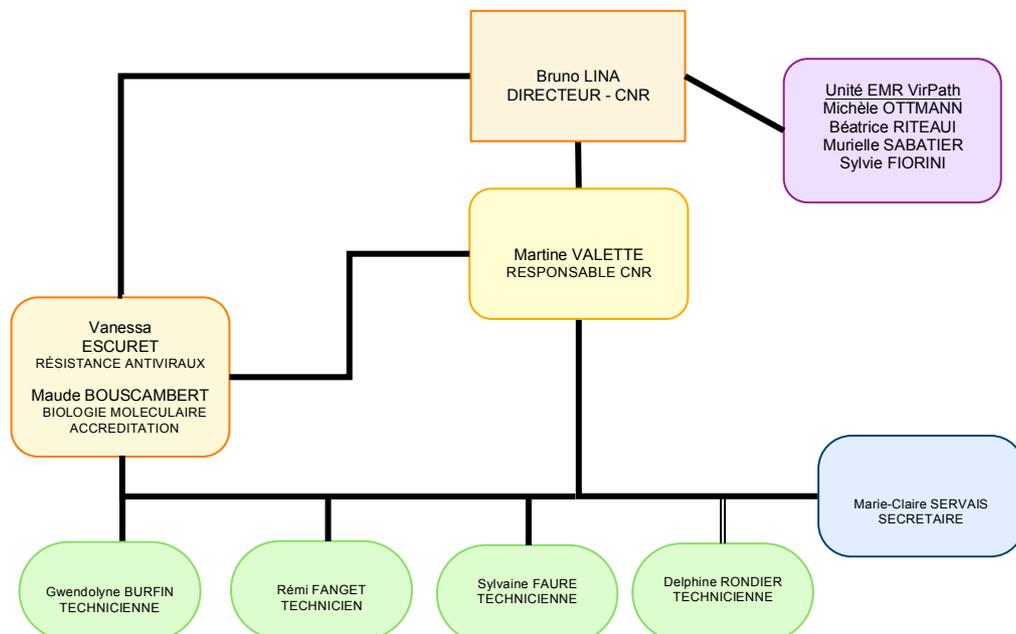
### Organigramme



➤ **CNR-HCL**

Nom	Prénom	Fonction	Qualification	Organisme payeur	ETP CNR Virus Influenzae
LINA	Bruno	Responsable PU-PH	Med; PhD	HCL & UCBL	0,25
VALETTE	Martine	Responsable adjoint Praticien attaché	Pharm; PhD	HCL	0,9
BOUSCAMPERT	Maude	Praticien attaché	Pharm; PhD	HCL	0,2
ESCURET	Vanessa	MCU-PH	Pharm; PhD	HCL & UCBL	0,2
BURFIN	Gwendolyne	Technicien titulaire		HCL	1
FANGET	Rémi	Technicien contractuel		HCL	0,9
FAURE	Sylviane	Technicien contractuel		HCL & Contrat privé	0,9
RONDIER	Delphine	Technicien contractuel /6 mois		HCL	1
SERVAIS	Marie-Claire	Secrétaire médicale		HCL	0,5

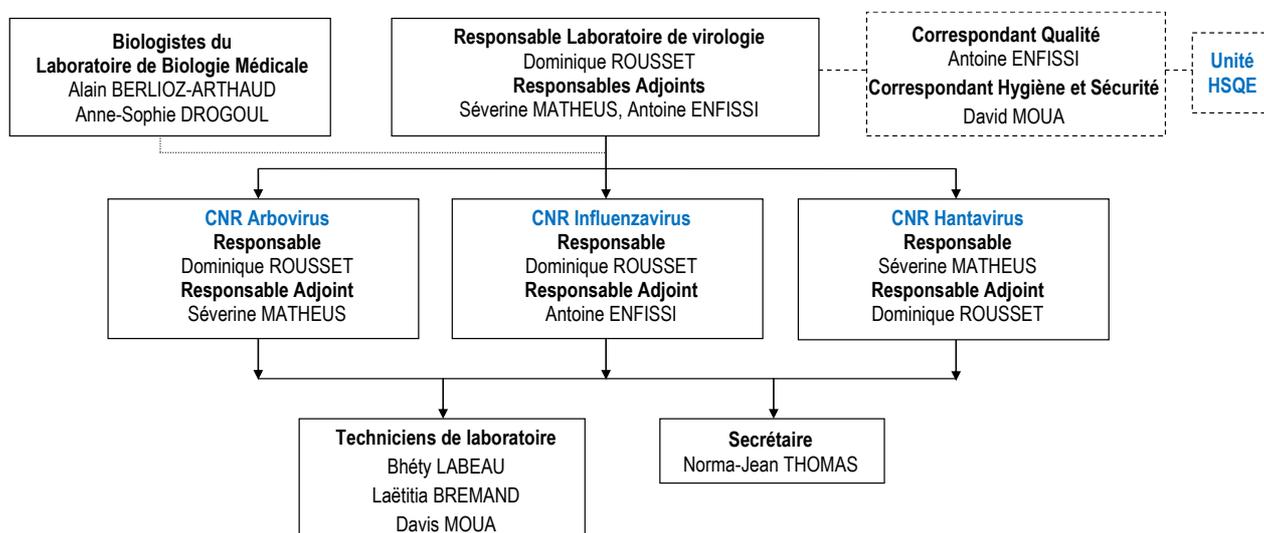
**Organigramme**



➤ **CNR-IPG**

Nom	Prénom	Fonction	Qualification	Organisme Payeur	ETP CNR Virus influenzae
ROUSSET	Dominique	Responsable	MD, PhD	IP, Paris	0,1
ENFISSI	Antoine	Responsable adjoint	PhD	IP, Guyane	0,9
BREMAND	Laetitia	Technicienne	BTS	IP, Guyane	0,5

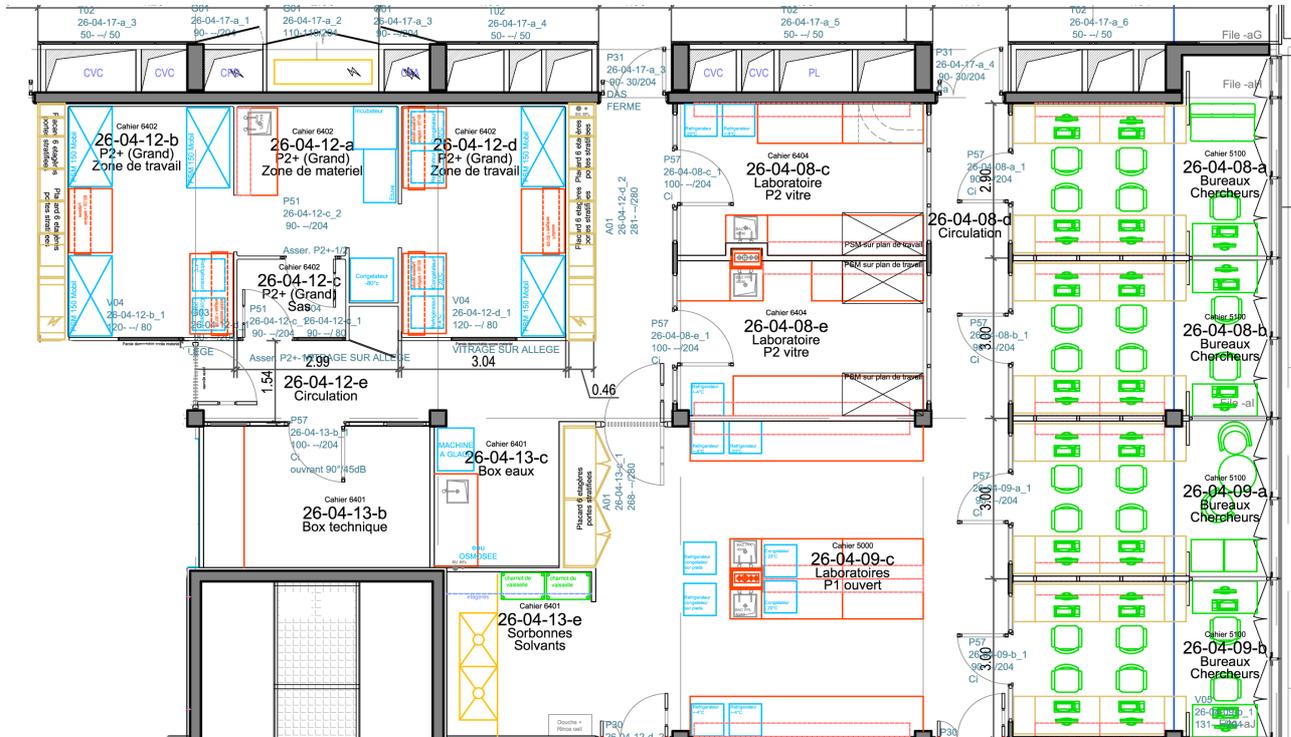
**Organigramme**



## ANNEXE 3 : PLANS DES LOCAUX

### ➤ CNR-IPP

#### Centre François Jacob / étage 4



Bureaux : 26-0408a / 26-0408b / 26-0409a

LSB2+ : 26-04-12

Réception échantillons : 26-04-08c

Culture cellulaire : 26-04-08e

Biologie moléculaire : 26-04-09c

Stockage matériel : 26-04-13b

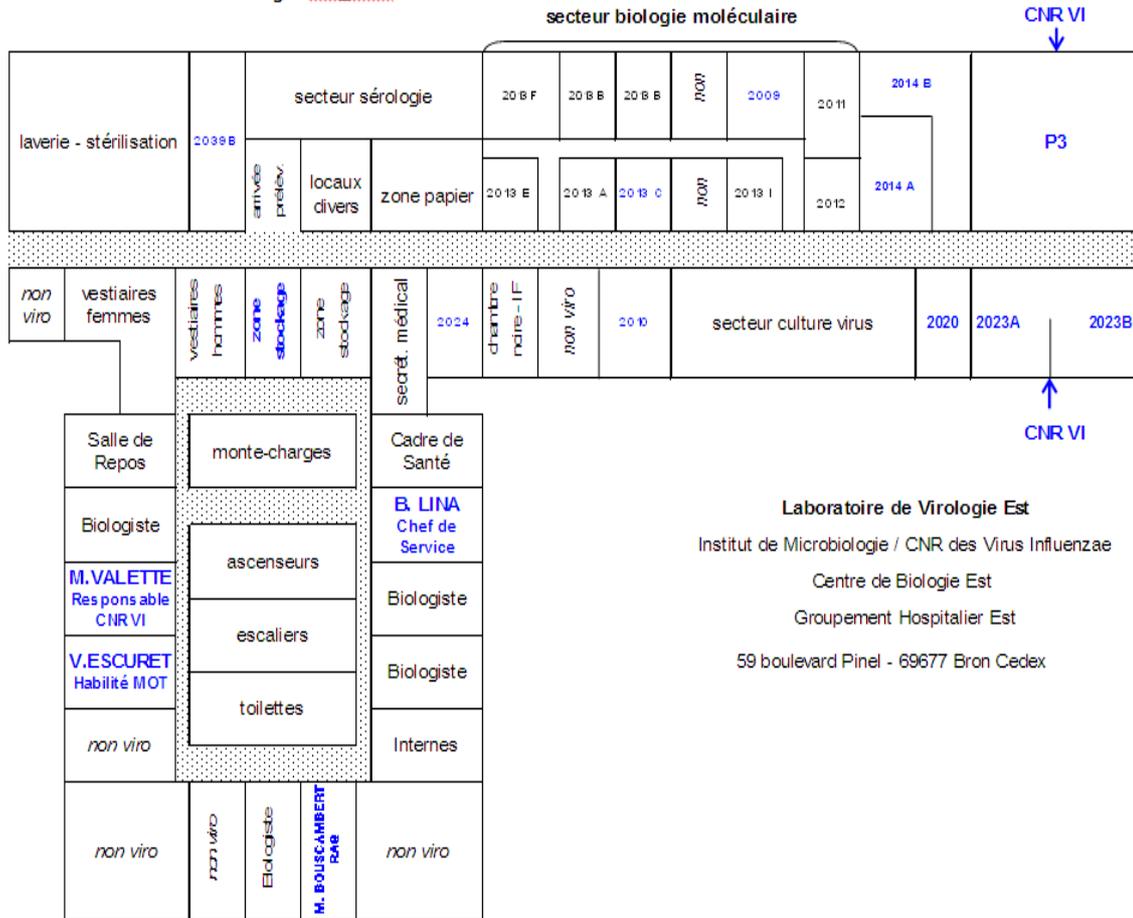
Un laboratoire type LSB2 (pièces 26-S2-10) est utilisé exclusivement par le CNR pour réaliser les mélanges réactionnels de PCR, les extractions d'acides nucléiques et l'ajout des contrôles positifs

Un Laboratoire type LSB3 est à disposition du CNR pour réaliser la mise en culture et l'analyse des virus hautement pathogènes ou émergents.

➤ **CNR-HCL**

 Hôpitaux de Lyon	CBE- VIROLOGIE Centre de Biologie et de Pathologie Est 59 boulevard Pinel 69677 Bron Cedex	CNRVI Plan Laboratoire	Ref : EV-HetS-DE-002-01 Version : 01 Applicable le : 28-05-2014 
---	---	------------------------	--

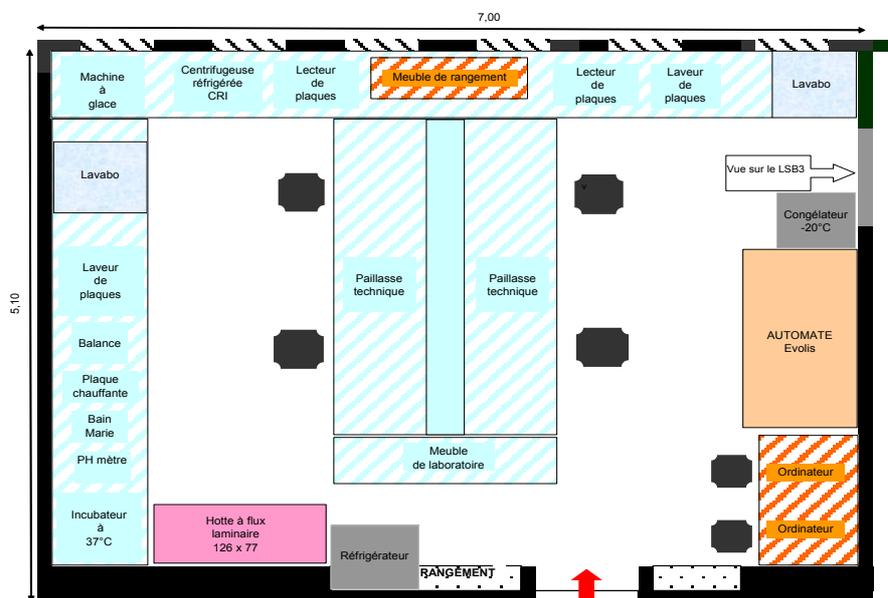
**Plan du Laboratoire de Virologie Est CNR VI**



➤ **CNR-IPG**

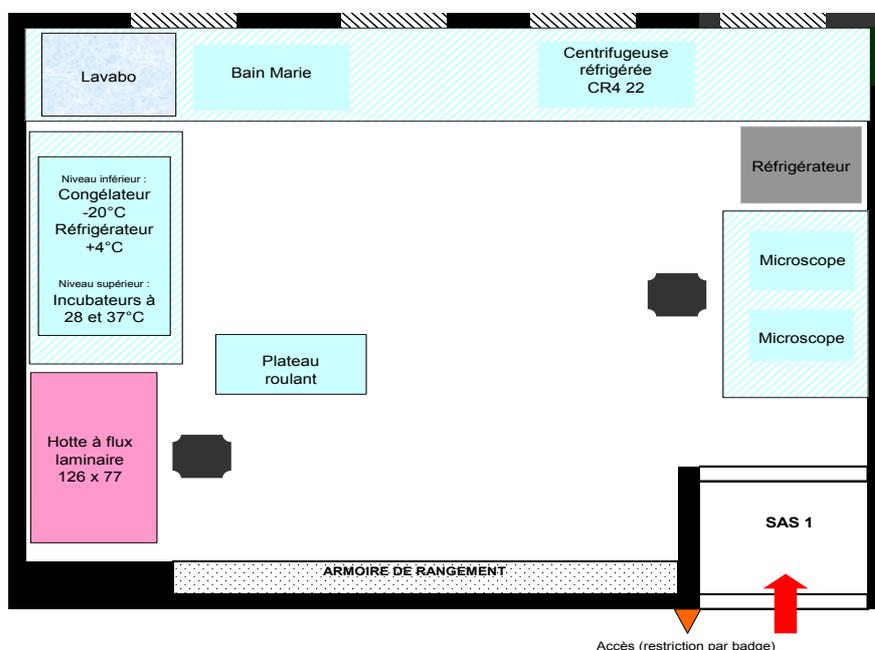
Le laboratoire bénéficie d'une superficie technique de 105 m<sup>2</sup> pour répondre aux besoins de ses activités. Il dispose de :

- Un laboratoire où sont réalisées les sérologies (34 m<sup>2</sup>).



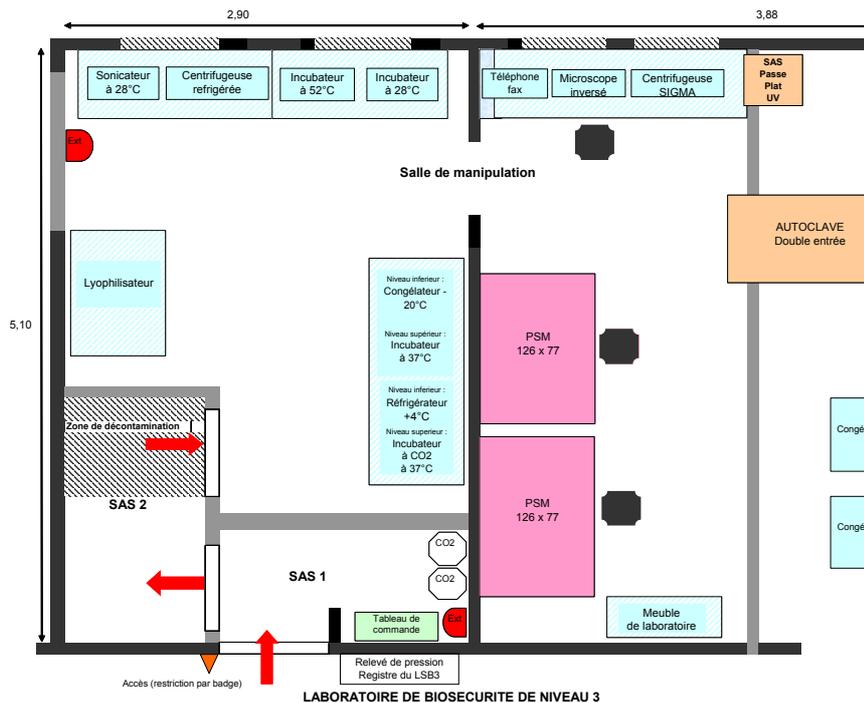
LABORATOIRE DE SEROLOGIE (Pièce 248)

- Un laboratoire de sécurité biologique de niveau 2 (LSB2) dédié à l'entretien des cultures cellulaires (18 m<sup>2</sup>).

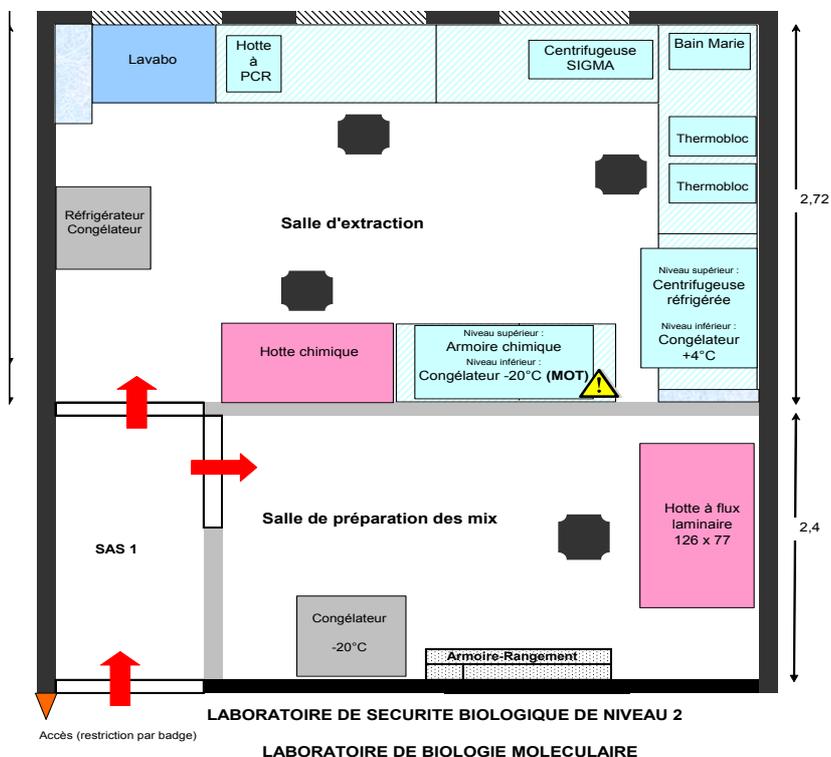


LABORATOIRE DE CULTURE CELLULAIRE (Pièce 205)

- Un laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 (LSB3) de 25 m<sup>2</sup>



- Un LSB2 dédié aux activités de biologie moléculaire de 18 m<sup>2</sup> comprenant une pièce pour l'extraction des ARN viraux et une pièce pour la préparation des mix.



Par ailleurs, d'autres pièces dédiées à la biologie moléculaire sont mutualisées avec d'autres laboratoires de l'IP Guyane, notamment :

- Une pièce mutualisée avec le laboratoire des interactions Virus-Hôte (LIVH) de l'IP Guyane pour réaliser les étapes d'amplification et post amplification, (PCR classique) avec thermocycleurs et migration des produits de PCR)
- Une pièce dédiée à la PCR en temps réel installée au sein d'une plate-forme technique commune à tous les laboratoires de l'IP Guyane.

## ANNEXE 4 : LISTE DES PRINCIPAUX EQUIPEMENTS

### ➤ CNR-IPP

Qtité	Désignation	Utilisation
8	POSTE de SECURITE MICROBIOLOGIQUE	partagés
4	POMPE A VIDE	partagées
5	MICROCENTRIFUGEUSE	partagées
2	CENTRIFUGEUSE REFRIGEREE	partagées
8	RERIGERATEUR +4°C	partagées
2	RERIGERATEUR/CONGEL	
8	CONGELATEUR -20°C	partagés
8	CONGELATEUR -80°C	partagés
1	CONTAINER D'AZOTE LIQUIDE	
7	INCUBATEUR A CO2	partagés
1	LECTEUR DE MICROPLAQUES	partagés
1	LAVEUR DE MICROPLAQUES	partagés
1	PLAQUE CHAUFFANTE	
1	AGITATEUR MAGNETIQUE	
4	AGITATEUR DE TUBES - VORTEX	partagés
2	MICROSCOPE INVERSES	partagés
1	BALANCE STANDARD	
6	BAIN-MARIE	partagés
2	THERMOCYCLEUR PCR CONVENTIONNELLE	partagés
2	LIGHT CYCLER 480 (plaque 96)	partagés
1	PYROSEQUENCEUR	Commun CIBU/CNR
2	CUVE ET GENERATEUR POUR ELECTROPHORESE	
1	SYSTEME DE DOCUMENTATION DE GEL	partagé
2	COUVEUSES RETOURNEMENT AUTO	partagées
1	LYOPHILISATEUR	partagé
2	AUTOCLAVE	
1	FLUORIMETRE	partagé
1	MICROSCOPE A FLUORESCENCE	partagé

### ➤ CNR-HCL

Qtité	Désignation	Utilisation
3	POSTE de SECURITE MICROBIOLOGIQUE	
2	POMPE A VIDE	
2	MICROCENTRIFUGEUSE	
3	CENTRIFUGEUSE	
1	RERIGERATEUR	
2	RERIGERATEUR/CONGEL	
5	CONGELATEUR -20°C	
3	CONGELATEUR -80°C	
1	INCUBATEUR TISSUS	
1	INCUBATEUR TISSUS et OPE	
1	INCUBATEUR A CO2	
2	ROULEURS de CELLULES	
1	AGITATEUR MAGNETIQUE	
1	AGITATEUR DE MICROPLAQUES Tridimensionnel	
3	AGITATEUR DE MICROPLAQUES	
1	LAVEUR DE MICROPLAQUES	
1	PLAQUE CHAUFFANTE	
6	AGITATEUR DE TUBES - VORTEX	
1	MICROSCOPE INVERSE	
1	BAIN-MARIE	
1	LECTEUR DE MICROPLAQUES	Commun labo Viro
1	LYOPHILISATEUR	Commun labo Viro

Liste des principaux équipements du laboratoire de Virologie Est utilisés par le laboratoire CNR-HCL

### ***Equipements Cultures***

Qtité	Désignation	Utilisation
1	POSTE de SECURITE MICROBIOLOGIQUE	Commun labo Viro
1	INCUBATEUR TISSUS	Commun labo Viro
1	INCUBATEUR A CO2	Commun labo Viro
1	RERIGERATEUR/CONGEL	Commun labo Viro

### ***Equipements Biologie Moleculaire***

Qtité	Désignation	Utilisation
1	EXTRACTEUR (EasyMag)	Commun labo Viro
1	POSTE de SECURITE MICROBIOLOGIQUE	Commun labo Viro
1	HOTTE	Commun labo Viro
1	MICROCENTRIFUGEUSE	Commun labo Viro
1	RERIGERATEUR/CONGEL	Commun labo Viro
1	RERIGERATEUR	Commun labo Viro
1	CONGELATEUR -20°C	Commun labo Viro
2	THERMOCYCLEURS	Commun labo Viro
1	EXTRACTEUR	Commun labo Viro

### ***Equipement Antivirogrammes***

Qtité	Désignation	Utilisation
1	FLUORIMETRE	

## ➤ CNR-IPG

- Le laboratoire de sérologie est équipé des équipements suivants : PSM2, centrifugeuse, bain-marie, incubateur, agitateurs magnétiques, pH-mètre, balance de précision, un congélateur -20°C, un réfrigérateur et une machine à glace, l'automate EVOLIS® (chaîne ELISA – Bio-Rad).
- Le LSB2 dédié à l'entretien des lignées cellulaires est équipé d'une hotte à flux laminaire, un microscope inversé, de deux incubateurs (28°C et 37°C), d'un congélateur -20°C, d'un réfrigérateur et d'une centrifugeuse.
- Le LSB3 est équipé de deux PSM2, d'une centrifugeuse réfrigérée, de 4 incubateurs (28°C, 37°C et 37°C atmosphère 5% CO<sub>2</sub>, 52°C), d'un microscope inversé, d'un plateau agitateur.
- Le laboratoire dispose par ailleurs de 2 congélateurs -20°C et de 4 congélateurs -80°C pour le stockage de la sérothèque et de la virothèque.
- Pour la biologie moléculaire, le laboratoire dispose de<sup>1</sup> :
  - Hotte à flux laminaire pour la préparation des mix réactionnels, hotte chimique pour l'extraction des ARN, centrifugeuse haute vitesse, microcentrifugeuses, 2 congélateurs -20°C, 2 réfrigérateurs, hotte PCR pour dépôt du cDNA, un bain-marie et 2 blocs chauffant à sec.
  - Trois thermocyclers (GeneAmp 9700 Applied Biosystems), deux automates de PCR en temps réel (Applied Biosystems 7300 et StepOnePlus®)
  - Une hotte PCR disposée dans une pièce séparée pour la préparation des PCR nichées.
  - Plusieurs générateurs et cuves d'électrophorèse horizontales/verticales, une hotte chimique, un transilluminateur relié à une caméra numérique, un agitateur pour culture cellulaire, une balance de précision, 2 minicentrifugeuses, un congélateur -20°C et un réfrigérateur.

---

<sup>1</sup> La plupart des équipements mentionnés sont mutualisés avec d'autres laboratoires de l'IPG.

### 1.1 Techniques de détection

Depuis la saison 2009-2010, la stratégie d'analyse prévoit en première intention la détection moléculaire des virus de grippe A et B dans les prélèvements primaires. Une technique de détection par RT-PCR en temps réel a été mise en place par le CNR-IPP afin de détecter de façon différentielle le virus d'origine porcine variant A(H3N2)v et le virus saisonnier A(H3N2).

Les techniques de **(RT-)PCR** en temps réel (q(RT-)PCR) ciblant différents gènes viraux permettent la détection des virus grippaux et d'autres virus respiratoires directement sur les prélèvements. Occasionnellement, des techniques de RT-PCR commercialisées (Kits Argène/Biomérieux) sont utilisées. Ces techniques sont complétées par l'utilisation de PCR ciblant des gènes de ménage pour s'assurer de l'absence d'inhibiteurs de PCR et évaluer la qualité des prélèvements.

Afin d'assurer la calibration et le contrôle de la sensibilité des q(RT-)PCR, le CNR-IPP produit des transcrits synthétiques ou des plasmides quantifiés correspondant aux séquences ciblées.

Des techniques de qRT-PCR différentielle ou de pyroséquençage permettant la détection de mutations de résistance aux antiviraux ou associées à des changements de tropisme sont également disponibles pour les virus influenza A.

En cas de besoin, les CNR disposent des techniques d'ELISA immunocapture, d'immunofluorescence indirecte et d'analyse par cytométrie en flux sur cellules infectées.

#### 1.1.1 Techniques de (RT-)PCR en temps réel (q(RT-)PCR)

##### ➤ Non commerciales

- qRT-PCR ciblant le gène M pour la détection des virus influenza de type A
- qRT-PCR ciblant les gènes HA ou NA pour la détection des virus influenza de type B
- qRT-PCR<sup>s</sup> ciblant le gène NS pour la détection des virus influenza de type C
- qRT-PCR ciblant les gènes de l'hémagglutinine (HA) ou de la neuraminidase (NA) pour le sous-typage des virus influenza A humains : H1, N1, H1pdm09, N1pdm09, H3, N2
- qRT-PCR multiplex ciblant les gènes HA des virus influenza B et permettant la distinction des lignages B-Yamagata et B-Victoria au CNR-IPP, -HCL et -IPG ([Watzinger et al., J Clin Microbiol. 2004 November; 42\(11\): 5189–5198](#))
- qRT-PCR ciblant les gènes HA ou NA de virus influenza aviaires des sous types suivants : H5 (2 formats ciblant des régions distinctes pour les clades 1, 2 et 3), H7, H9, H10, N1av, N7, N9 CNR-IPP; pour le gène HA des sous-types H2, H7 & H9 CNR-HCL ; H5, H7 & N9 CNR-IPG;
- qRT-PCR ciblant les gènes HA de virus influenza aviaires des sous types suivants : H5 (format CDC ciblant des régions distinctes pour les clades 1, 2 et 3)
- qRT-PCR ciblant la NP des virus porcins (format CDC)
- RT-PCR conventionnelle ciblant les gènes HA ou NA de virus influenza aviaires des sous types suivants : H1, H3, H4, H6, N2av, N3, N6, N8, H5 site de clivage et H7 site de clivage (CNR-IPP) ou H7, H9 et H5 site de clivage (CNR-HCL)
- qRT-PCR ciblant chacun des 8 segments des virus influenza A de référence (CNR-IPP)
- qRT-PCR ciblant le gène N pour la détection des VRS A et B (CNR-IPP & IPG)
- qRT-PCR ciblant le gène N pour la détection des hMPV (CNR-IPP)

- qRT-PCR ciblant la région 5' non-codante du génome pour la détection des rhinovirus
- qRT-PCR ciblant le gène POL (2 régions distinctes) pour la détection du SRAS-CoV, CNR-IPP
- qRT-PCR ciblant le gène N pour la détection du SRAS-CoV, CNR-IPP
- qRT-PCR ciblant le gène UpE pour la détection du MERS-CoV (Corman et Al. 2012)
- qRT-PCR ciblant le gène ORF1a pour la détection du MERS-CoV (Corman et Al. 2012)
- qRT-PCR ciblant le gène ORF1b pour la détection du MERS-CoV (Corman et Al. 2012)
- RT-PCR conventionnelle générique ciblant le gène POL pour la détection des coronavirus (CNR-IPP<sup>§</sup> & -HCL)
- qRT-PCR ciblant le gène POL pour la détection du SRAS-CoV (CNR-IPP<sup>§</sup>)
- RT-PCR conventionnelle pour la détection des agent bactériens dits « atypiques » *mycoplasma pneumoniae* et *chlamydia pneumoniae* (CNR-IPP<sup>§</sup>)
- qPCR ciblant le gène NP1 pour la détection des Bocavirus humains (CNR-IPP<sup>§</sup>)
- PCR conventionnelle pour la détection des adénovirus (CNR-IPP<sup>§</sup>)

\* qRT-PCR fonctionnant avec les mêmes conditions de cycles d'amplification.

§ (RT-)PCR pour lesquelles les protocoles sont disponibles mais qui ne sont pas utilisées actuellement.

#### ➤ PCR ciblant des gènes de ménage

- qRT-PCR ciblant la GAPDH (CNR-IPP, -HCL) ou la Rnase P (CNR-IPG)

#### ➤ Techniques de RT-PCR commerciales

Kits Argène/Biomérieux pour la détection des virus suivants : VRS (PCR Multiplex : virus grippaux A et B et VRS) ; hMPV et ADV (Kit Argene, PCR duplex) ; hBoV, *mycoplasma pneumoniae* et *chlamydia pneumoniae* (CNR-HCL).

### Transcrits synthétiques ou plasmides quantifiés contrôlés

Produits par le **CNR-IPP** pour les q(RT)-PCR suivantes :

- qRT-PCR ciblant le gène M pour la détection des virus influenza de type A
- qRT-PCR ciblant le gène NS pour la détection des virus influenza de type C
- qRT-PCR ciblant le gène N1
- qRT-PCR ciblant le gène H1pdm09
- qRT-PCR ciblant le gène H5 (clade 1)
- qRT-PCR ciblant le gène POL du SRAS-CoV
- qRT-PCR ciblant le gène N du SRAS-CoV
- qRT-PCR ciblant le gène UpE du MERS-CoV
- qRT-PCR ciblant le gène ORF1a du MERS-CoV
- qRT-PCR ciblant le gène ORF1b du MERS-CoV
- qPCR ciblant le gène NP1 des Bocavirus humains
- qRT-PCR ciblant la GAPDH

#### 1.1.2 Autres techniques de détection

- ELISA immunocapture pour virus influenza A et B
- ELISA immunocapture pour les virus parainfluenza
- immunofluorescence indirecte
- cytométrie en flux

## **1.2 Techniques d'isolement**

- isolement des virus influenza A et B en cellules MDCK ou MDCK-SIAT1
- isolement des virus influenza C en cellules SK (IPP)
- isolement des virus influenza A, B, C sur œuf de poule embryonné voie amniotique ou allantoïque (IPP, HCL)

## **1.3 Techniques d'identification**

- inhibition d'hémagglutination (IHA)
- microneutralisation

## **1.4 Caractérisation génétique des virus influenza**

### **1.4.1 Techniques de détection de polymorphismes génétiques**

- H275Y gène NA du H1N1pdm09: qRT-PCR différentielle (IPP, HCL, IPG)
- S31N gène M des H1N1pdm09 et H3N2 : pyroséquençage (IPP)
- I223R gène NA du H1N1pdm09: pyroséquençage (IPP)
- H275Y gène NA des H1N1 et H1N1pdm09 : pyroséquençage (IPP)
- D222G/E/N gène HA du H1N1pdm09 : pyroséquençage (IPP)
- E119V gène NA des H3N2: pyroséquençage (IPP)
- R292K gène NA des H3N2: pyroséquençage (IPP)
- N294S gène NA des H3N2: pyroséquençage (IPP)

### **1.4.2 Techniques de séquençage**

Séquençage des génomes complets pour les virus influenza A (H1N1, H1N1pdm09, H3N2, H5N1), B (lignage B-YAM et B-VIC),

## **1.5 Techniques sérologiques**

- IHA
- Immunofluorescence
- ELISA
- microneutralisation
- fixation du complément
- western-blot

## **1.6 Caractérisation phénotypique des virus grippaux**

- titrage par plages de lyse
- titrage en TCID50
- cinétique de multiplication virale
- tests de sensibilité aux antiviraux par :

- tests de fluorescence ou fluorimétrique (substrat MUNANA) pour la détermination de la sensibilité aux antineuraminidases.
- Tests de réduction de plage ou de réduction de titre HA pour la sensibilité aux adamantanes

## **ANNEXE 6 : DESCRIPTION DES COLLECTIONS**

---

### **Collections de Prélèvements et Souches virales**

Les 3 laboratoires du CNR disposent d'une collection de prélèvements biologiques humains positifs ou négatifs pour la grippe. Cette collection remonte à la saison grippale 1993-1994 représentant plus de 35.000 prélèvements (IPP), 18.000 prélèvements (HCL), environ 3300 prélèvements (IPG) et comprend les informations cliniques associées permettant des études rétrospectives si nécessaire.

Les 3 laboratoires du CNR détiennent et maintiennent une collection de souches de virus grippaux de référence d'origine nationale et internationale comprenant notamment les souches de la composition vaccinale des sous-types H1N1, H2N2, H3N2 et de type B dont les plus anciennes remontent à 1933. Une collection structurée de 72 souches virales remontant à l'année 1968 et associant les informations suivantes : titre viral en pfu/ml, caractérisation antigénique ; séquences des gènes HA, NA, M, etc... a été mise en place au pôle IPP avec l'aide de la CRBIP. Cet effort sera poursuivi dans la mesure des moyens disponibles. La création d'une base spécifique dédiée aux souches de référence est en cours pour le pôle HCL.

Les collections de souches de référence sont complétées par des collections d'isolats représentatifs des virus ayant circulé au cours de chacune des saisons de grippe. Chaque année, au pôle IPP, depuis 1997, les isolats viraux correspondant aux différents sous-types viraux H1N1, H1N2, H3N2, et de type B (lignages B-Yamagata et B-Victoria) ainsi qu'à des isolats viraux ayant des caractéristiques particulières (résistance aux antiviraux, mutations de virulence, etc..) ont été conservés et mis en collection. Les données cliniques associées ainsi que, pour une sélection de 20 à 50 isolats chaque saison, les séquences des gènes HA, NA, et éventuellement d'autres segments (M notamment) sont disponibles. Ainsi, le pôle IPP dispose d'une collection de plus de 23 000 isolats de virus grippaux humains.

Des collections de souches de virus grippaux de virus animaux sont également disponibles.

Il s'agit de souches de référence de virus influenza A aviaires correspondant aux principaux sous-types circulant chez les oiseaux H1, H2, H3, H4, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 ; N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 et notamment de souches de virus hautement pathogènes H5N1 représentatives des différentes clades et sous-clades (IPP et/ou HCL). De par son statut de laboratoire de référence H5 de l'OMS, le pôle IPP dispose en outre d'isolats et de prélèvements humains ou aviaires positifs pour les virus H5N1, notamment en provenance du Cambodge.

Suite à leur émergence, le CNR possède aussi le nouveau coronavirus MERS-CoV et le virus grippal A(H7N9).

Une collection d'isolats primaires et de prélèvements positifs de virus influenza aviaires associés aux données de collecte (date, lieu et espèce) est également disponible (IPP).

Des virus porcins des différents sous-types (H1N1, H1N2 et H3N2) et correspondant aux lignages Nord-Américain et Eurasiatique ainsi que des isolats de virus porcins français sont également disponibles (IPP, HCL).

Des virus de référence équins de sous-type H7N7 (qui n'est plus en circulation) et H3N8 ainsi que des isolats de virus équins français font également partie de la collection (IPP, HCL).

### **Collections de Sérums**

En tant que NIC, les 3 pôles du CNR sont destinataires chaque année des sérums de mouton et des antigènes correspondants du kit de l'OMS dirigés contre les souches de référence entrant dans la composition vaccinale. Le reliquat de la plupart de ces sérums est ainsi disponible.

En outre, les pôles HCL et IPP disposent de collections de sérums de lapin et/ou de furet dirigés contre la plupart des souches vaccinales de référence ainsi que vis-à-vis d'autres isolats variants dont certains isolats français. Ces sérums ont été soit produits localement ou à façon au fil des années par les laboratoires des pôles HCL et IPP (sérums de lapin, certains sérums de furet) ou ont été obtenus auprès des CCOMS, notamment de Londres et d'Atlanta.

En tant que laboratoire de référence H5 du réseau de l'OMS, le pôle IPP dispose également en quantité limitée de sérums de furet dirigés contre les principaux représentants des différentes clades de virus H5N1 aimablement fournis par le CCOMS d'Atlanta.

Des sérums de lapin ou de furet dirigés contre certaines souches de référence porcines ou équine sont également disponibles (HCL, IPP).

Pour les enquêtes sérologiques chez l'homme, les sérums de référence du NIBSC pour la standardisation des analyses de mesure des anticorps anti H1N1pdm09 (IPP et HCL) et H5N1 (IPP) sont disponibles. Une collection limitée de sérums humains est également à disposition (IPP, HCL).

### **Conditions de stockage**

Les collections de prélèvements, d'isolats et de souches virales sont conservées à -80°C dans des congélateurs localisés dans des pièces à accès sécurisé par badge. Ces congélateurs possèdent tous un système de sondes de mesure de température reliées à un dispositif d'enregistrement continu et à une centrale d'alarme (IPP, HCL, IPG). Chaque congélateur est associé à une liste de personnes avec leurs coordonnées à prévenir au cas où la température dépasserait -65°C (IPP, HCL). En cas de besoin, les souches ou les isolats peuvent être lyophilisés (HCL).

#### Conditions de mise à disposition des collections

Les 3 laboratoires du CNR des virus influenzae mettent à disposition leurs collections autant que de besoin et dans la limite des disponibilités dans le cadre strict des activités de surveillance. Ils fournissent également les souches de référence nécessaires à l'activité de surveillance aux laboratoires correspondants qui en font la demande pour les activités de surveillance.

En tant que NIC et dans le cadre du réseau Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) du Global Influenza Program (GIP) de l'OMS, comme stipulé par le cahier des charges, les 3 pôles du CNR mettent à disposition des CCOMS, les prélèvements ou virus d'intérêt et représentatifs de la circulation virale qu'ils ont analysés et ou isolés, ainsi que leurs données associées pour contribuer à la surveillance mondiale et la définition de la composition vaccinale.

Pour tout transfert de prélèvements ou de souches et de données associées, ils se conforment aux dispositions régissant l'accès et le partage des souches tel que stipulé notamment par la réglementation internationale, les dispositions nationales applicables à ces activités le cas échéant, les recommandations faites par l'OMS à ses Etats membres sur ce sujet (dispositions su PIP framework notamment), et au travers d'un cadre contractuel si nécessaire. Dans tous les cas, le transfert des prélèvements et isolats ou souches virales se fait dans la limite de leur disponibilité.

Pour les activités qui ne sont pas strictement liées aux activités de surveillance, et notamment pour les activités de recherche, les dispositions suivantes sont appliquées par les 3 laboratoires du CNR (IPP, IPG et HCL) :

L'accès aux souches, aux prélèvements biologiques et données associées collectés dans le cadre de l'activité du pôle IPP du CNR est conditionné par la mise en place de documents contractuels spécifiques. Ainsi, est exigé pour le transfert du matériel biologique et des

données associées, la mise en place a minima d'un accord de transfert de matériel biologique (Material Transfer Agreement -MTA) ou d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties. Suivant la nature industrielle ou académique du partenaire, ces accords donneront lieu ou pas à une contrepartie financière.

Ces accords ont notamment pour objet d'assurer le transfert de la détention physique du matériel au partenaire. L'unité de recherche reconnue CNR, de par la valorisation de son savoir-faire et de son expertise sur le matériel biologique concerné, reste détenteur des prélèvements biologiques et données associées ou propriétaire des droits existants sur les souches et données associées y afférant.

Différents points essentiels sont appréhendés dans ces accords :

- le partenaire s'engage à n'utiliser les souches, les prélèvements biologiques et données associées que dans le cadre d'un programme de recherche défini spécifiquement.
- les résultats issus du programme de recherche devront systématiquement être communiqués par le partenaire au CNR ; le CNR sera également associé ou remercié dans les publications et/ou communications.
- le tiers partenaire s'engage à ne pas transférer les souches, les prélèvements biologiques et les données associées à des tiers et à retourner ou détruire le matériel biologique à la fin du programme de recherche.

En termes de valorisation, l'Institut Pasteur (IPP et IPG) et les Hospices Civils de Lyon s'assurent dans certaines circonstances de la copropriété des résultats issus des travaux effectués sur le matériel biologique et veillent à ce que la valorisation du savoir-faire et de l'expertise des pôles IPP, IPG et HCL du CNR ayant conservé, traité, trié et analysé le matériel biologique soit garantie au titre de l'accord.

Lorsque le matériel biologique et les données associées sont mis à disposition dans le cadre d'une collaboration scientifique par laquelle les partenaires s'associent de manière plus conséquente à la réalisation du programme de recherche, la valorisation des travaux menés conjointement devra tenir compte des apports respectifs de chacun des partenaires.

Les accords excluent toute garantie relative (i) à la nature appropriée des souches, des prélèvements biologiques et données associées pour une utilisation spécifique et (ii) à la qualité non-infectieuse du matériel biologique. L'interdiction de l'utilisation du matériel biologique sur l'homme et sur les animaux, le cas échéant, est également stipulée dans l'accord. Enfin, les pôles IPP, IPG et HCL du CNR n'assument aucune responsabilité quant à l'utilisation du matériel biologique par le partenaire.

## ANNEXE 7 : LISTE DES LABORATOIRES

---

### a) Réseau RENAL et Grippe A

#### Région Nord

Région	Responsable(s)
<b>Ile de France</b>	
Ambroise Pare	Dr E. GAULT
Avicenne	Dr P. DENIS
Béclère	Pr JC NICOLAS
Bichat	Pr F. BRUN-VEZINET
Bicêtre	Pr P. NORDMANN
Henri Mondor	Pr C.J. SOUSSY
Versailles	Dr M. HARZIC
Necker	Dr M. LERUEZ-VILLE
Paul Brousse	Pr ALFONSO-ROQUE
Pitié Salpêtrière	Pr H. AGUT
Robert Debré	Dr E. BINGEN
Saint-Louis	Pr F. SIMON
Saint-Vincent de Paul	Pr F. ROZENBERG
Trousseau	Pr A. GARBARG-CHENON
Pontoise	Dr M. THIBAUT
Poissy	Dr V. SERAZIN
<b>Province</b>	
Strasbourg	Pr F. STOLL-KELLER
Dijon	Pr Pierre POTHIER
Reims	Pr L. ANDREOLETTI
Nancy	Pr V. VENARD
Besançon	Pr G. HERBEIN
Lille	Pr D. HOBER
Amiens	Pr G. DUVERLIE et Pr F. EB
Caen	Pr Astrid VABRET
Brest	Pr MC LEGRAND-QUILLIEN
Rennes	Pr R. COLIMON
Orléans	Dr M. MACE
Tours	Dr C. GAUDY-GRAFFIN
Rouen	Pr JC PLANTIER
Angers	Dr H. LE GUILLOU-GUILLEMETTE
Nantes	Dr M. COSTE-BUREL

Hôpitaux Militaires : HIA Begin – Dr A. MERENS, HIA Legouest – Dr Y. ROBERT, HIA Clermont Tonnerre – Dr P. LE GUEN.

## Région Sud

Région	Responsable(s)
Aix-en-Provence	Dr Evelyne LAGIER
Annecy	Dr Bruno CHANZY
Bordeaux	Pr Herve FLEURY
Chambéry	Dr Didier RAFFENOT
Clermont-Ferrand	Pr Hélène .PEIGUE-LAFEUILLE
Grenoble	Pr Jean-Marie SEIGNEURIN
Limoges	Pr François DENIS
Lyon	Pr Bruno LINA, Pr Patrice André
Marseille	Pr Didier RAOULT
Montpellier	Pr Van DE PERRE
Nice	Pr Valérie GIORDANENGO
Poitiers	Pr Gérard AGIUS
Saint-Etienne	Pr Bruno POZZETTO
Toulouse	Pr Jacques IZOPET

Hôpitaux Militaires : Bordeaux – Lyon - Marseille – Toulon

## b) Liste des laboratoires habilités – cas MERS-CoV

Région	Hôpital	Responsable(s)
Alsace	CHRU Strasbourg	Pr F. STOLL-KELLER
Auvergne	CHU Clermont-Ferrand	Dr M. CHAMBON
Franche-Comté	CHU Besançon	Pr G. HERBEIN
Limousin	CHU Limoges	Pr F. DENIS
Haute-Normandie	CHU Rouen	Pr JC PLANTIER
Poitou Charente	CHU Poitiers	Pr G. AGIUS
Aquitaine	CHU Bordeaux	Pr H. FLEURY
Champagne-Ardenne	CHU Reims	Pr L. ANDREOLETTI
Pays de Loire	CHU Nantes	Dr M. COSTE-BUREL
Rhône-Alpes	CHU Grenoble	Pr JM SEIGNEURIN
Bourgogne	CHU Dijon	Pr P. POTHIER
Lorraine	CHU Nancy	Pr V. VENARD
	HIA Legouest/Metz	Dr JM PUYHARDY
Guyane	IP Guyane	Dr D. ROUSSET
Basse-Normandie	CHU Caen	Dr A. VABRET
Ile-de-France	Pitié Salpêtrière	Pr H. AGUT
	Bichat	Pr F. BRUN-VEZINET
	Necker	Dr M. LERUEZ-VILLE
	Paul Brousse	Pr ALFONSO-ROQUE
	HIA Begin	Pr MERENS
Océan Indien	CHU Réunion	Dr JAFFARD-BANDJEE
Nord-Pas-de-Calais	CHRU Lille	Pr D. HOBER
Bretagne	CHU Rennes	Pr R. COLIMON
	CHU Brest	Pr MC LEGRAND-QUILLIEN
Centre	CHRU Tours	Dr C. GAUDY-GRAFFIN
	CHR Orléans	Dr M. MACE
Midi-Pyrénées	Hôpital Purpan/Toulouse	Pr Jacques IZOPET
PACA	La Timone/Marseille	Pr Didier RAOULT
Languedoc-Roussillon	CHU Nîmes	Dr ALLARDET-SERVENT
	Hôpital St-Eloi-Montpellier	Dr SEGONDY
	Perpignan	Dr S. GABA
Mayotte	CH Mamoudzou	Dr L. COLLET

### **c) Liste des échanges avec des organismes extérieurs**

#### **Exportations**

<b>Adresse</b>	<b>Interlocuteur</b>	<b>Désignation produit</b>	<b>Date</b>
CHU Poitiers	Dr GIRAUDEAU	Cellules MDCK	18/09/2013
ANSES Ploufragan	Dr MASSIN	Souches grippales saisonnières	26/09/2013
Espagne	Dr CASAS	ARN synthétiques MERS-CoV	05/11/2013
CHU Bordeaux	Dr FLEURY	ARN synthétiques MERS-CoV	05/11/2013
NIH Bethesda	Dr VOGEL	Souche de MERS-CoV	12/11/2013
CHU Pitié Salpêtrière	Dr BOUTOLLEAU	ARN synthétiques MERS-CoV	17/12/2013
LABOCEA	Dr TRECHEREL	Sérum de Furet	13/01/2014
CHU Clermont-Ferrand	Dr MIRAND	Souche virus grippal / type B	31/01/2014
CNR Grippe Sud / LYON	Dr BOUSCAMBERT	Souche virus grippal / type A	10/02/2014
VIRNEXT	Dr ROSA-CALATRAVA	Souche de MERS-CoV	10/06/2014
VIRNEXT	Dr ROSA-CALATRAVA	Cellules Vero E6	10/06/2014
Hop. Paul Brousse	Dr DEBACK	ARN synthétiques MERS-CoV	25/06/2014

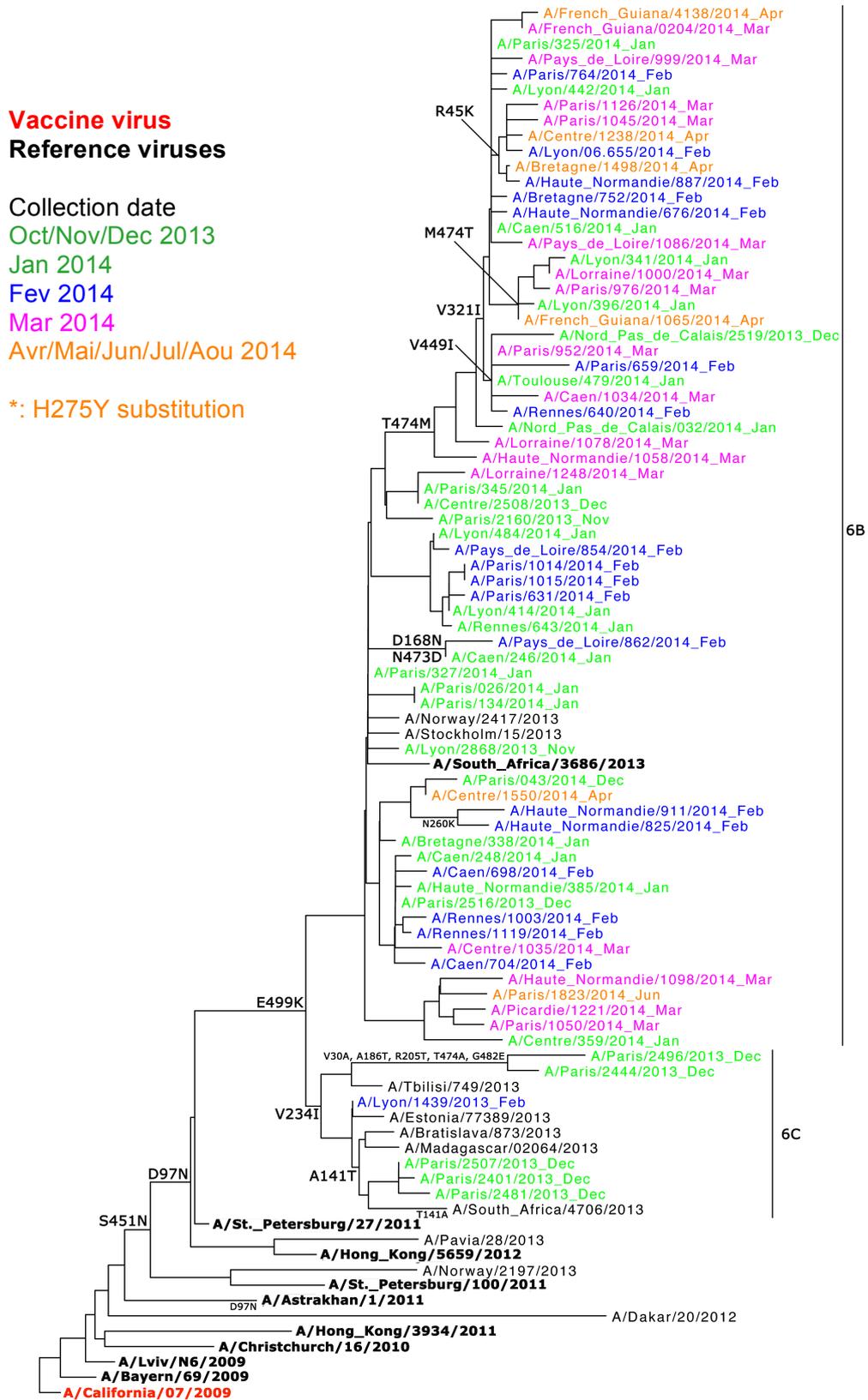
### ***Méthode de prélèvement naso-pharyngé***

Les médecins généralistes et pédiatres effectuent un écouvillonnage nasal profond chez tout sujet, suspecté de grippe, présentant les symptômes suivants : fièvre > 38,5 °C, début soudain, un symptôme respiratoire et un symptôme général depuis moins de 48 heures.

L'écouvillon est introduit dans un tube contenant du milieu de transport pour virus. Chaque prélèvement est accompagné d'une fiche clinique qui comporte des renseignements concernant le patient : identification, âge, sexe, signes cliniques, statut vaccinal, traitement ainsi que les coordonnées du médecin préleveur. La fiche clinique ainsi qu'un diaporama d'utilisation du kit de prélèvement sont disponibles sur le site <http://www.cnrvi-sud.fr>.

L'écouvillon est adressé au laboratoire par la poste dans un emballage sécurisé.  
Pour les pédiatres qui le souhaitent nous disposons d'écouvillons pédiatriques.

**ANNEXE 9 : ANALYSE PHYLOGENETIQUE DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES DES GENES HA ET NA DES VIRUS DE TYPE A ET B**



**Analyse phylogénétique du gène HA des virus A(H1N1)pdm09 / saison 2013-2014**

**Vaccine virus**  
**Reference viruses**

Collection date  
Oct/Nov/Dec 2013

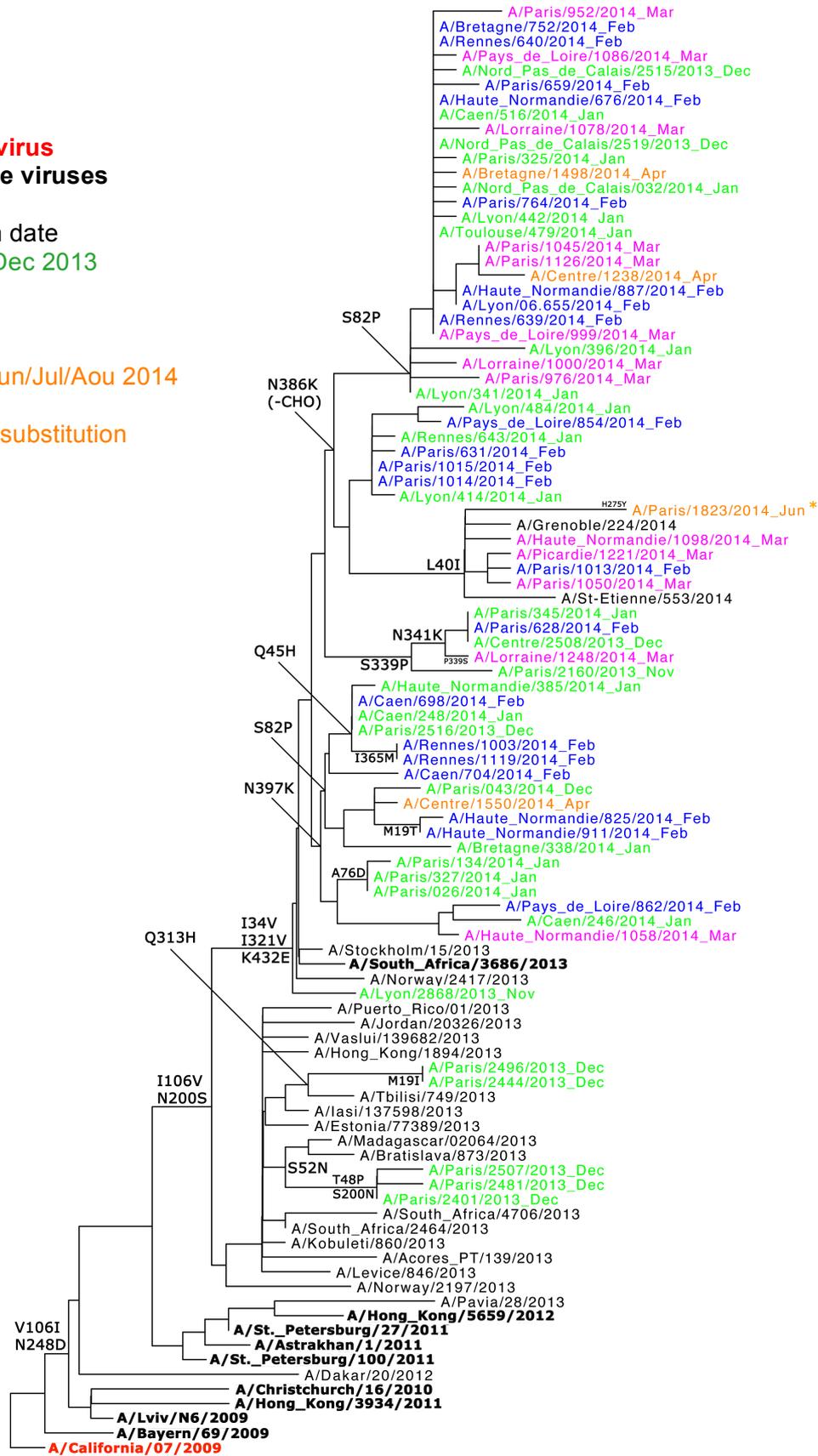
Jan 2014

Fev 2014

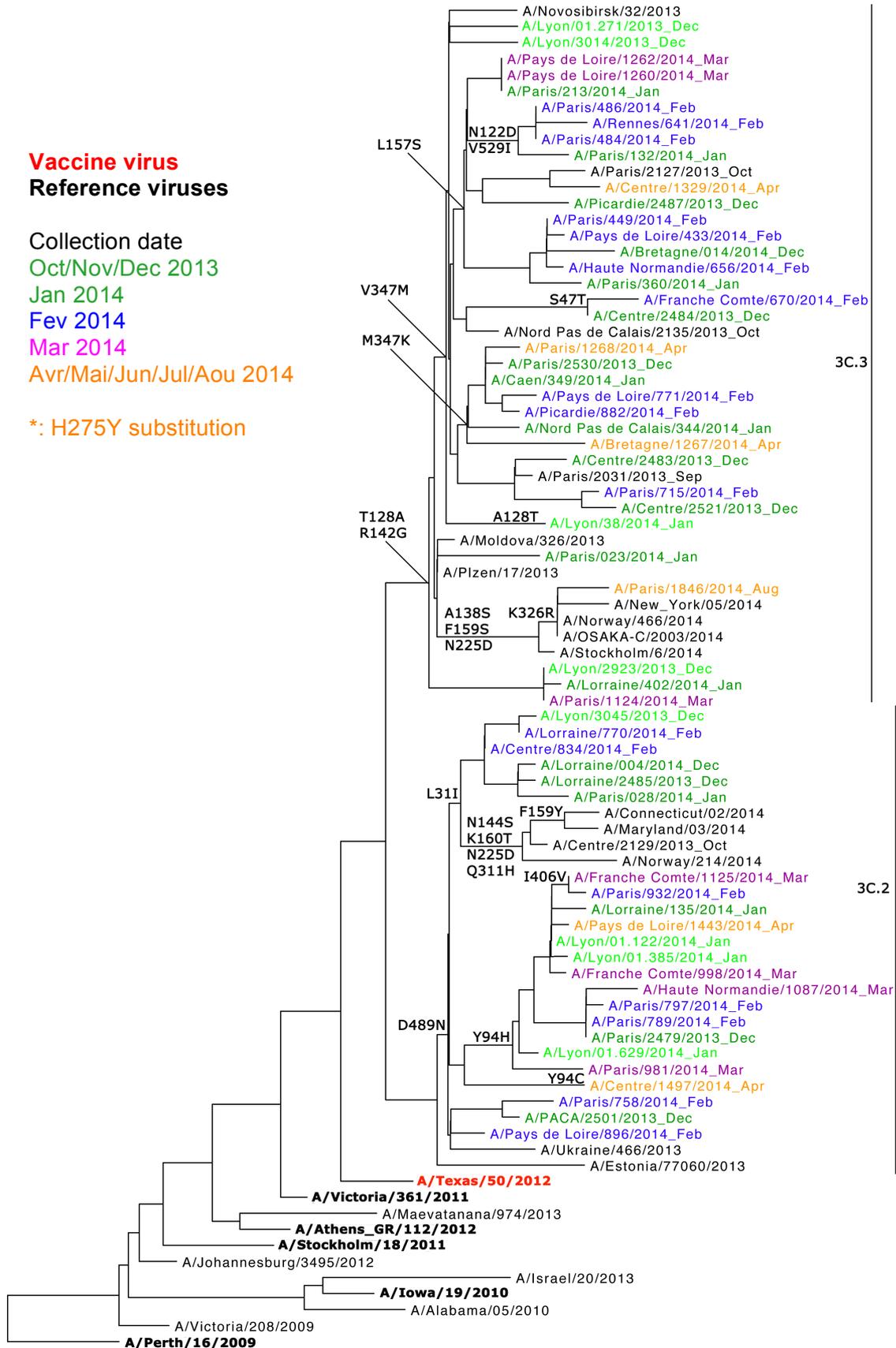
Mar 2014

Avr/Mai/Jun/Jul/Aou 2014

\*: H275Y substitution



**Analyse phylogénétique du gène NA des virus A(H1N1)pdm09 / saison 2013-2014**

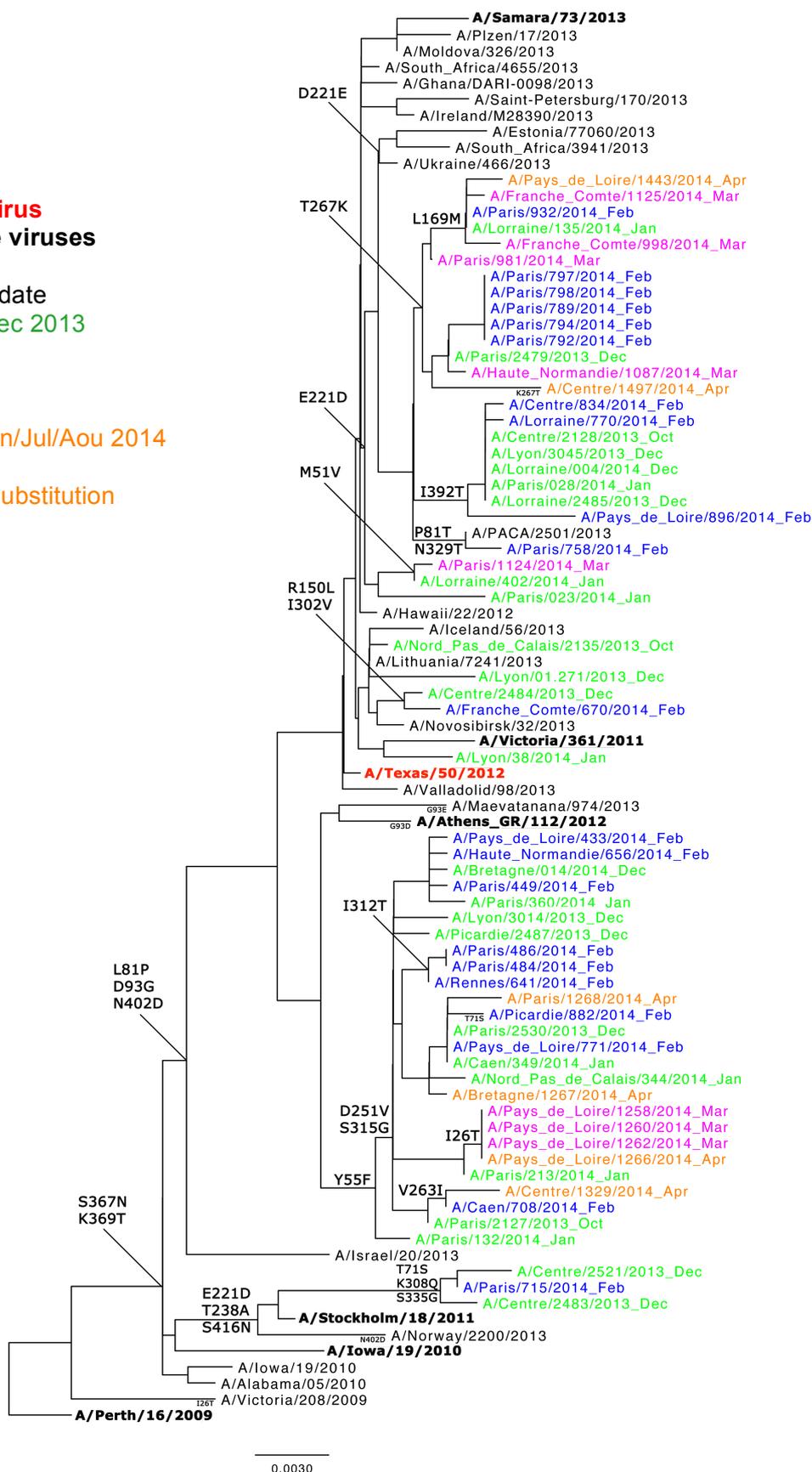


Analyse phylogénétique du gène HA des virus A(H3N2) / saison 2013-2014

**Vaccine virus**  
**Reference viruses**

Collection date  
 Oct/Nov/Dec 2013  
 Jan 2014  
 Fev 2014  
 Mar 2014  
 Avr/Mai/Jun/Jul/Aou 2014

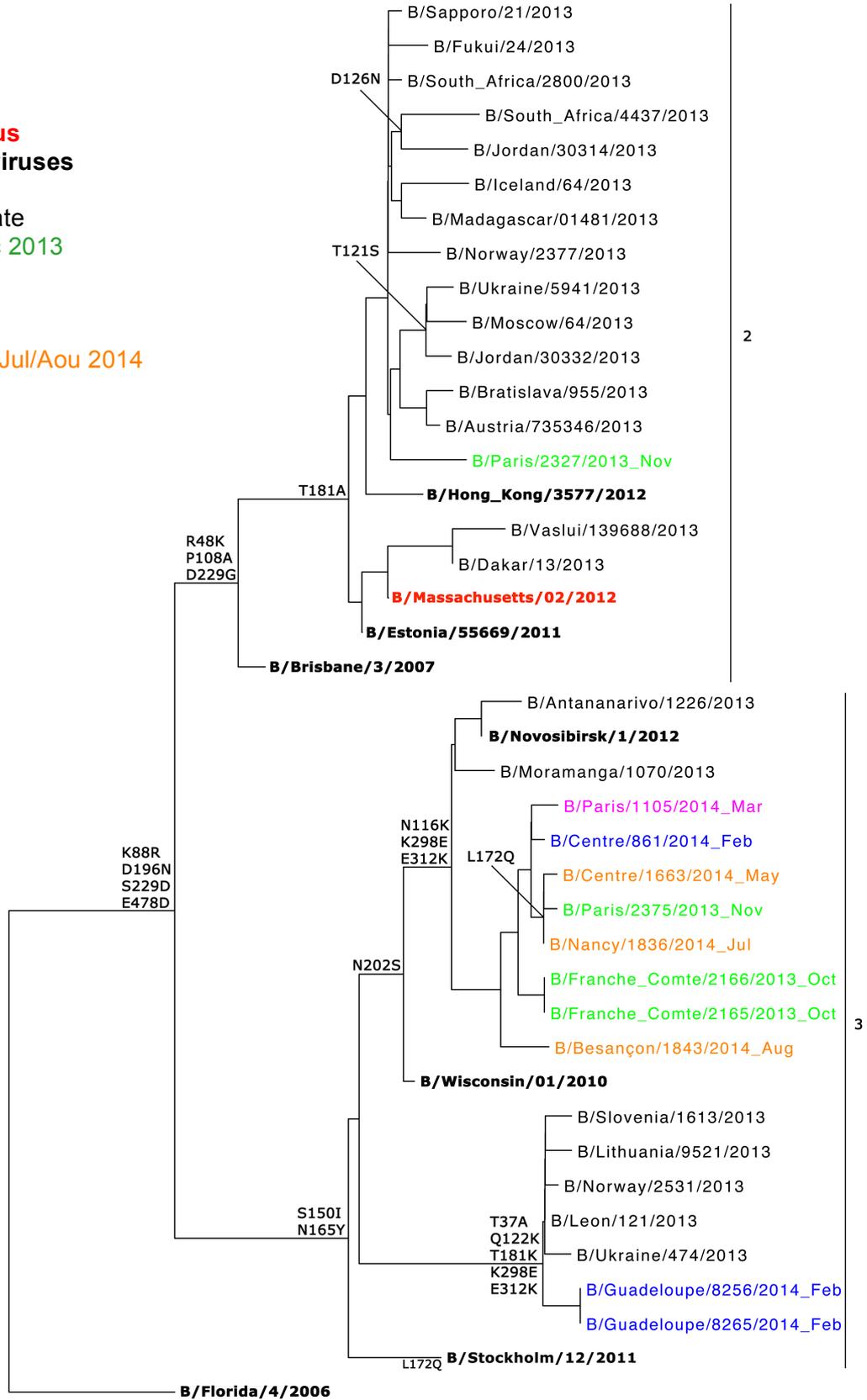
\*: H275Y substitution



Analyse phylogénétique du gène NA des virus A(H3N2) / saison 2013-2014

**Vaccine virus**  
**Reference viruses**

Collection date  
 Oct/Nov/Dec 2013  
 Jan 2014  
 Feb 2014  
 Mar 2014  
 Avr/Mai/Jun/Jul/Aou 2014

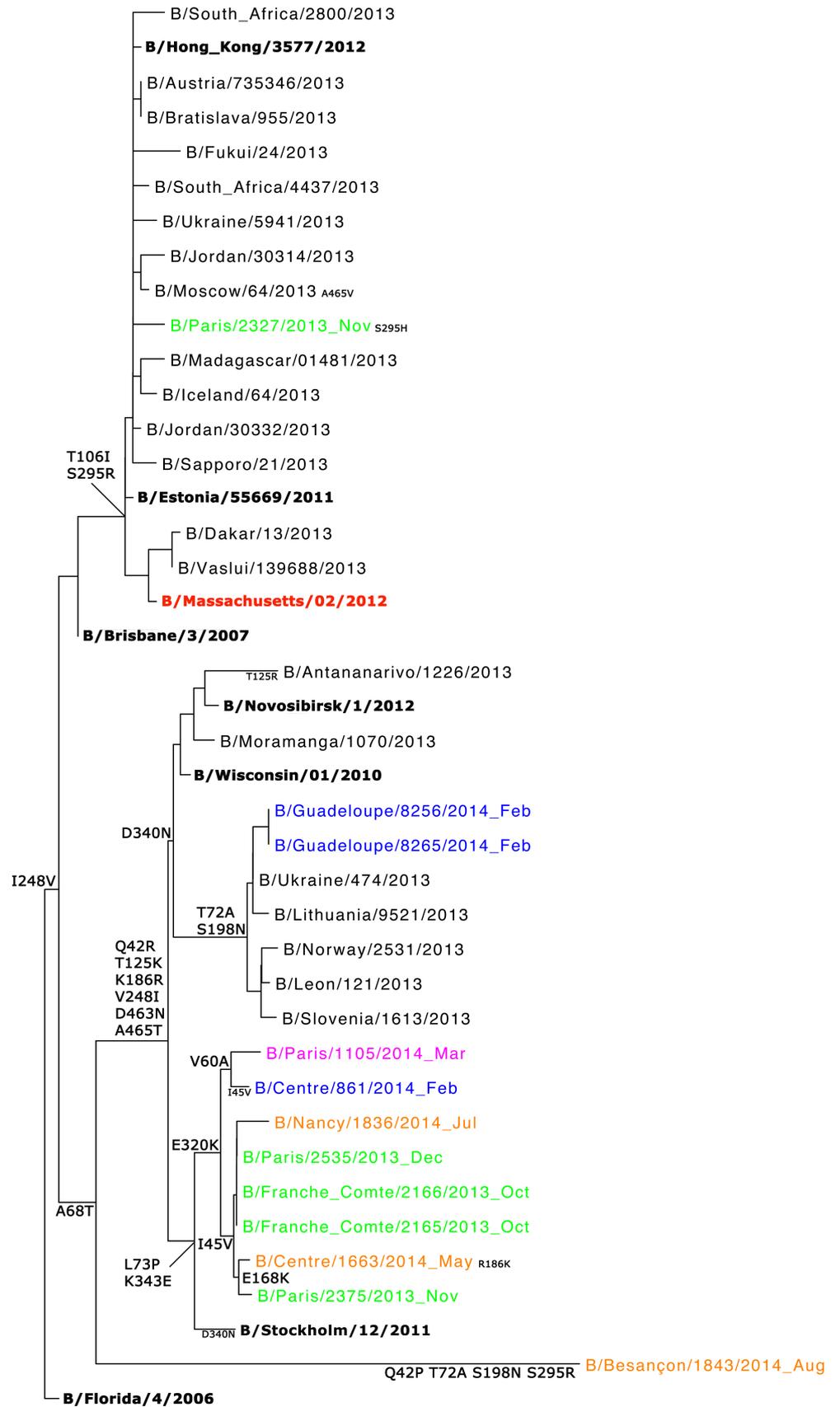


0.0030

**Analyse phylogénétique du gène HA des virus B-Yamagata / saison 2013-2014**

**Vaccine virus**  
**Reference viruses**

Collection date  
 Oct/Nov/Dec 2013  
 Jan 2014  
 Fev 2014  
 Mar 2014  
 Avr/Mai/Jun/Jul/Aou 2014



**Analyse phylogénétique du gène NA des virus B-Yamagata / saison 2013-2014**