

**Rapport annuel  
d'activité**

**2017**

**Centre National de  
Référence des virus  
influenzae/Centre National  
de Référence des virus des  
infections respiratoires  
(dont la grippe)**

**Saison  
2016-2017**



# Sommaire

<b>1</b>	<b>Missions et organisation du CNR</b>	<b>8</b>
1.1	Missions et objectifs	8
1.1.1	Equipes	8
1.1.2	Locaux et équipements	8
1.1.3	Démarche qualité	8
<b>2</b>	<b>Activités d'expertise</b>	<b>11</b>
2.1	Évolutions des techniques	11
2.1.1	Evaluation des Tests Rapides d'Orientation Diagnostic TROD	11
2.1.2	Techniques transférées vers d'autres laboratoires	11
2.2	Analyses virologiques au cours de la saison 2016-2017	12
2.2.1	Analyses virologiques d'échantillons cliniques humains, surveillance saisonnière	12
2.2.2	Analyse virologique d'échantillons cliniques humains, virus émergents	16
2.2.2.1	Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV)	16
2.2.2.2	Virus de grippe aviaire A(H7N9), A(H5N1)	17
2.2.3	Sensibilité aux antiviraux	18
2.2.3.1	Tests génétiques	19
2.2.3.2	Tests fluorimétriques (phénotypiques)	19
2.3	Collection – Etudes	20
2.3.1	Collection de souches de virus influenza aviaire	20
2.3.2	Collection de prélèvements provenant d'études ou de firmes	20
2.3.3	Collection de souches, antigènes de référence et immun-sérums	21
2.3.4	Distribution de matériel biologique	21
<b>3</b>	<b>Activités de surveillance</b>	<b>23</b>
3.1	Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	23
3.1.1	Surveillance en Métropole	23
3.1.1.1	Réseaux	23
3.1.1.2	Les prélèvements	27
3.1.1.3	Données d'activité médicale et sanitaire	28
3.1.1.4	Surveillance virologique	29
3.1.1.5	Contribution à la surveillance microbiologique et épidémiologique des autres agents pathogènes responsables d'infections respiratoires aiguës	41
3.1.1.6	Contribution à la surveillance nationale en interface avec SpF	49
3.1.2	Surveillance en Région Antilles-Guyane	50
3.1.2.1	Réseau de partenaires	50
3.2	Détection et investigation de cas groupés et de phénomènes anormaux	58
3.3	Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	58
3.4	Contribution aux réseaux de surveillance européen et internationaux	59
3.4.1	EISN/ECDC	59
3.4.2	FluNet/OMS	59
3.4.3	Contrôle de Qualité	59
3.5	Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	59
<b>4</b>	<b>Alerte</b>	<b>60</b>
<b>5</b>	<b>Activités d'information, de formation et de conseil</b>	<b>60</b>
5.1	Enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires	60
5.1.1	Enseignements	60
5.1.2	Séminaires, conférences grand public et relations avec la presse	61
5.1.3	Formation, accueil de stagiaires	62
5.2	Modalités de diffusion des données de la surveillance	62
5.3	Activités d'expertises auprès des instances de santé nationales et internationales	63

5.3.1	Activités auprès des instances de santé nationales.....	63
5.3.1.1	Ministère de la Santé, DGS, DGT.....	63
5.3.1.2	Santé Publique France .....	63
5.3.1.3	ANSES.....	63
5.3.1.4	COFRAC .....	63
5.3.1.5	Activités auprès des instances de santé nationales et régionales (DFA) .....	63
5.3.2	Activités auprès des instances de santé internationales .....	63
5.3.2.1	EISN/ECDC.....	63
5.3.2.2	OMS .....	64
5.3.3	Membre de réseaux et membre de conseil scientifique d'institutions extérieures .....	64
<b>6</b>	<b>Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR .....</b>	<b>65</b>
<b>6.1</b>	<b>Activités de recherche en lien direct avec l'activité du CNR .....</b>	<b>65</b>
6.1.1	CNR-IPP .....	65
6.1.2	CNR-HCL.....	67
<b>6.2</b>	<b>Publications et communications en lien direct avec l'activité du CNR.....</b>	<b>70</b>
6.2.1	Publications nationales.....	70
6.2.2	Publications internationaux .....	70
6.2.3	Communications nationales .....	73
6.2.4	Communications Internationales .....	74
6.2.5	Communications Nationales sur invitation.....	74
6.2.6	Communications Internationales sur invitation et présidence de sessions .....	75
6.2.7	Comité scientifique ou d'organisation de congrès ou colloques.....	76
<b>7</b>	<b>Coopération avec les laboratoires de santé animale .....</b>	<b>76</b>
<b>8</b>	<b>Programme d'activité pour les années 2017-18 et 2018-19 .....</b>	<b>77</b>

# Figures

Figure 1: Représentation géographique des médecins généralistes Sentinelles ayant participé à la surveillance virologique des syndromes grippaux saison 2016-2017, par région (Source <a href="http://www.sentiweb.fr">réseau Sentinelles, INSERM/UPMC, http://www.sentiweb.fr</a> ) .....	25
Figure 2 : Représentation géographique des pédiatres Sentinelles ayant participé à la surveillance virologique des syndromes grippaux saison 2016-2017, par région (Source <a href="http://www.sentiweb.fr">réseau Sentinelles, INSERM/UPMC, http://www.sentiweb.fr</a> ) .....	26
Figure 3 : Syndromes grippaux (GC) pour 100 000 habitants et pourcentage de virus grippaux détectés en médecine générale (Réseau Sentinelles) – période S40/2016-S20/2017 .....	28
Figure 4 : Syndrome grippaux (GC) pour 100 000 habitants par tranches d'âge en France .....	29
Figure 5 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France .....	30
Figure 6 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France-Nord .....	30
Figure 7 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France-Sud .....	31
Figure 8 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France .....	32
Figure 9 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Nord .....	32
Figure 10 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Sud .....	33
Figure 11 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France .....	33
Figure 12 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Nord .....	34
Figure 13 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Sud .....	34
Figure 14 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France .....	35
Figure 15 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Nord .....	35
Figure 16 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Sud .....	36
Figure 17 : Détection du VRS en France .....	41
Figure 18 : Détection du VRS en France-Nord .....	42
Figure 19 : Détection du VRS en France-Sud .....	42
Figure 20 : Détection du VRS en France nord. Répartition VRS A, VRS B et VRS non typés. ....	43
Figure 21: Détection des rhinovirus humains en France .....	44
Figure 22: Détection des rhinovirus humains en France-Nord .....	44
Figure 23: Détection des rhinovirus humains en France-Sud .....	45
Figure 24: Détection des adénovirus en France .....	46
Figure 25: Détection des virus parainfluenza en France .....	47
Figure 26: Détection des métapneumovirus humains en France .....	48
Figure 27: Estimation du nombre hebdomadaire de consultations pour syndrome grippal ...	51
Figure 28: Estimation du nombre hebdomadaire de consultations pour syndrome grippal ...	51
Figure 29 : Estimation du nombre hebdomadaire de consultations pour syndrome grippal ..	52
Figure 30: Détection des virus grippaux en région Antilles Guyane CNR-IPG / saison 2016-2017 .....	53
Figure 31 : Détection des virus grippaux et VRS en Guyane - CNR-IPG / saison 2016-2017 (semaines S40/2016 à S30/2017) .....	54
Figure 32 : Détection des virus grippaux aux Antilles (Martinique + Guadeloupe) .....	54
Figure 33 : Répartition des virus grippaux détectés en région Antilles-Guyane .....	55
Figure 34 : Répartition des virus grippaux détectés en Guyane .....	56
Figure 35 : Répartition des virus grippaux détectés aux Antilles (Martinique et Guadeloupe) CNR-IPG / saison 2016-2017 .....	57

# Tableaux

Tableau 1 : Bilan des prélèvements analysés par les CNR-IPP et -HCL .....	15
Tableau 2 : Bilan des prélèvements analysés par le CNR-IPG .....	16
Tableau 3 : Bilan des suspicions d'infections à MERS-CoV analysées par les CNR-IPP et -HCL .....	17
Tableau 4 : Bilan des suspicions de grippe aviaire analysées par le CNR-IPP et -HCL .....	18
Tableau 5 : Résultats des tests phénotypiques de sensibilité à l'oseltamivir (CNR-IPP, -HCL) .....	20
Tableau 6 : Sérums de furets post-infectieux et souches reçus par les CNR-IPP et -HCL .....	21
Tableau 7 : Composition des médecins généralistes et des pédiatres du Réseau Sentinelles par région ayant réalisé au moins un prélèvement et proportion par rapport aux généralistes et pédiatres en exercice dans la région - France, saison 2016-2017. (Source <a href="http://www.sentiweb.fr">réseau Sentinelles, INSERM/UPMC, http://www.sentiweb.fr</a> ) .....	24
Tableau 8 : Liste des pathogènes. ....	27
Tableau 9 : Distribution par âge des patients– Réseau Sentinelles .....	39
Tableau 10 : Distribution par tranche d'âge et par (sous)-type viral - Réseau Sentinelles.....	39
Tableau 11 : Statut vaccinal - Distribution des virus grippaux détectés au CNR .....	39
Tableau 12 : Statut vaccinal - Distribution par tranche d'âge .....	40
Tableau 13 : Répartition des VRS en fonction de l'âge. France nord .....	43
Tableau 14 : Répartition des métapneumovirus en fonction de l'âge. France nord .....	48
Tableau 15 : Distribution par âge des patients – Région Antilles Guyane .....	57
Tableau 16 : Bilan des cas groupés analysés par le CNR-IPP et –HCL .....	58

# Résumé analytique

En France métropolitaine, la saison de surveillance 2016-2017 a été marquée par une épidémie grippale précoce d'intensité modérée, avec un pic épidémique entre les semaines S51/2016 et S52/2016. Les détections de virus grippaux dans les prélèvements communautaires du réseau de médecins généralistes et pédiatres Sentinelles ont augmenté dès la semaine S45/2016 pour atteindre un pic en semaine S51/2016. L'épidémie s'est terminée en semaine S17/2017. L'épidémie a été quasi-exclusivement due aux virus A(H3N2), qui ont représenté 94% des virus circulants. Les détections de virus de grippe de sous-type A(H1N1)pdm09 et de type B sont restées sporadiques durant toute la saison. Environ 48% des 2978 prélèvements issus du réseau Sentinelles reçus aux laboratoires du CNR en métropole ont été trouvés positifs pour un virus grippal.

La particularité de cette année est que l'épidémie de grippe a été concomitante à celle du Virus Respiratoire Syncytial (VRS) pendant 12 semaines.

L'épidémie a été marquée par une sévérité importante, particulièrement chez les personnes âgées.

Pour la région Antilles Guyane, la saison 2016-2017 a été marquée par des épidémies grippales d'intensité modérée avec un démarrage inhabituellement précoce.

Dans les 3 DFA, le virus de sous-type A(H3N2) a très largement dominé.

Près de 60% de l'ensemble des prélèvements reçus au CNR-IPG ont été testés positifs pour un virus grippal.

# 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). Cette organisation a été reconduite pour le nouveau mandat (dans l'Arrêté du 7 mars 2017), avec la nomination des trois laboratoires comme CNR des virus des infections respiratoires (dont la grippe) avec des missions étendues. La nomination étant intervenue au milieu de la saison de surveillance de la grippe, l'activité du CNR a essentiellement suivi les missions du mandat 2012-2016.

Le rapport annuel 2016-2017 repose sur l'activité des trois laboratoires composant le CNR de la semaine S40/2016 à la semaine S20/2017 avec les données de surveillance de l'ensemble de la période pour le CNR-IP et le CNR-HCL. Le rapport annuel 2016-2017 repose sur l'activité du CNR IPG de la semaine S40/2016 à la semaine S39/2017 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 est donnée 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 (QEDD) apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 des Laboratoires de Références et d'Expertise multi-sites LREMS (CNR et CIBU) conformément à l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative aux activités de biologie médicale, ratifiée par la loi 2013-442 du 30 mai 2013 portant réforme de la 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 2016-2017 :

- Septembre 2016 : deux audits internes, technique et qualité ISO 15189
- Revue de direction du LREMS : 16 mai 2017
- Janvier 2017 : audit COFRAC de renouvellement et de suivi ISO 15189
- Février 2017 : accréditation de la technique de diagnostic rapide des virus A(H1N1)pdm09 et A(H3N2) qRT-PCR

○ Perspectives 2017 :

Audit interne qualité et technique ISO 15189 prévu en septembre et octobre 2017 et dépôt du dossier de validation de méthode de détection des VRS par qRT-PCR avec détermination du type A et B.

Conformément à l'article L 5139-1 du code de Santé Publique et à l'arrêté, en date du 6 novembre 2014 modifiant l'arrêté du 30 avril 2012, fixant la liste des micro-organismes et toxines (MOT), le CNR-IPP a déposé des dossiers techniques auprès de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) pour le renouvellement des autorisations de détention et de mise en œuvre concernant les Orthomyxovirus de type A, sous-type H5N1, H7N7 et H7N3 et pour le coronavirus du SRAS dans les nouveaux locaux du CNR ainsi qu'un dossier technique relatif au MERS-CoV qui a été rajouté à la liste des micro-organismes et toxines par l'arrêté du 6 novembre 2014. Ces dossiers sont en cours d'instruction par l'ANSM. Toutefois, le CNR-IPP est en capacité de réaliser la détection des cas possibles de grippe aviaire et de MERS-CoV (suite aux dispositions spécifiques validées par l'ANSM pour le diagnostic du MERS-CoV).

➤ **CNR-HCL**

Le CNR est associé à la démarche qualité du laboratoire de Virologie qui réunit depuis novembre 2015 les laboratoires du Groupements hospitaliers EST et NORD, au sein de l'Institut des Agents Infectieux à l'Hôpital de la Croix Rousse (GHN). L'équipe du CNR travaille donc à la mise en place d'un système uniformisé entre 3 disciplines Bactériologie Virologie Parasitologie avec des équipes qui arrivent progressivement au GHN. Cette démarche est aussi celle de l'ensemble des laboratoires des Hospices Civils de Lyon qui constituent le LBMMS ou Laboratoire de Biologie Médicale Multi Sites. En tant qu'établissements de santé public, le LBMMS, soumis à l'obligation de certification mise en œuvre par la Haute Autorité de Santé (HAS) est certifié par l'HAS depuis avril 2008 (Certification V2, 2ème procédure, V2007).

En 2006, une équipe QUALITE avait été mise en place au sein du laboratoire pour assurer l'application du GBEA (Guide de Bonnes Exécution des Analyses). Cette équipe a évolué et depuis 2010, le CNR travaille à la mise en place et à l'amélioration de la démarche qualité selon la norme NF EN ISO 15189. La gestion du Système Qualité est sous la responsabilité de Mr le Professeur Lina, *Chef de service*, de Maude Bouscambert, *Responsable Qualité De Discipline* et Martine Valette, *Responsable du CNR*. Au sein de l'équipe qualité du CNR, sont impliqués un correspondant *Qualité* (G Burfin) et *Métriologie* (R Fanget) et un correspondant *Hygiène et Sécurité* (C Socratous).

Notre système d'assurance qualité repose sur une gestion documentaire organisée avec le logiciel KALILAB et commune avec le laboratoire de Virologie.

Sous la responsabilité de la cellule qualité, l'équipe du CNR a mis en place une gestion documentaire complète, la formation et l'habilitation du personnel, le suivi des non-conformités et leur gestion, la validation de méthode et la mise en place de contrôles de

qualité interne. Le laboratoire continue à participer à de nombreux contrôles de qualité externe (eCDC, OMS). Le laboratoire et le CNR qui travaillent ensemble sur ces questions de qualité ont été inspectés ou audités à plusieurs reprises ces dernières années :

- 1/ inspections ANSM (13-15 mai 2008, 2-4 juin 2014 et 4-5 novembre puis 7-8 décembre 2015)
- 2/ audits qualité organisés par les sociétés producteurs de vaccins dont nous sommes sous-traitants (en 2007, 2010, 2012 et 2014)
- 3/ audits internes (4 et 20 avril 2016)

Les objectifs du CNR sont ceux du LBMMS à savoir, une demande d'accréditation partielle au plus tard le 30 avril 2017 pour les analyses de détection duplex des virus influenza A et B et de sous-typage H3 et N1 par RT-PCR en temps réel puis une demande d'extension de la portée d'accréditation sur les sous-typages H5 et H7 par RT-PCR en temps réel en avril 2018. La RT-PCR de détection des virus influenza A est la technique proposée en 2009 aux laboratoires hospitaliers français pour la réalisation du diagnostic des infections grippales lors de la pandémie A(H1N1)pdm09 (M.Bouscambert Duchamp *et al.*, 2010). Cette PCR est un outil évalué régulièrement par les différents contrôles de qualité externes.

Le laboratoire de Virologie a été audité par le COFRAC du 12 au 16 décembre 2016 pour des analyses de biologie moléculaire (charges virales plasmatiques VIH VHC et VHB). Laboratoire est désormais accrédité pour ces analyses. Du fait de l'intégration du CNR au LBBMS (Laboratoire unique), le prochain dossier de validation de méthodes concernant les actes de biologie moléculaire sera déposé en mars 2019. Toutefois, les différents moyens de maîtrise du pré-analytique, de la traçabilité et des processus analytiques sont déjà en place au CNR.

#### ➤ **CNR-IPG**

Le laboratoire de virologie qui héberge le CNR-IPG, est accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 et les règles d'application du COFRAC sous le numéro 8-3373 depuis Nov. 2014 pour la version 2007 et depuis Nov. 2015 pour la version 2012 de cette norme (sous-famille concernée : sérologie infectieuse). Le maintien de cette accréditation a été obtenu en août 2016 suite à la visite de suivi S2. Une demande d'extension du périmètre d'accréditation aux techniques de détection moléculaire est envisagée pour 2017.

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 2016-2017 :

- Avril et Juin 2016 : deux audits internes, qualité et technique
- Aout 2016 : audit Cofrac de suivi S2 (NF EN ISO 15189 v:2012)
- Revue de direction : 22 mars 2017
- Mai et Juin 2017 : deux audits internes, qualité et technique
- Aout 2017 : audit Cofrac de suivi S3 (NF EN ISO 15189 v:2012)

#### ○ Perspectives 2017 :

- Octobre 2017 : Dépôt du dossier de validation de méthode : détection et identification des virus Influenza de type A chez l'homme par RT-PCR.
- Fin 2017 : Préparation de demandes d'extension de la portée d'accréditation pour :
  - la détection et la détermination du lignage des Influenza B,
  - la détection des VRS (virus respiratoire syncytial) avec détermination du type A et B.

## 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 grippaux saisonniers n'ont pas évolué depuis la saison dernière mais pour des raisons pratiques les qRT-PCR H3 et N1 de sous-typage des virus de type A (H3N2) et A(H1N1)pdm09 ont été associées pour limiter le nombre de PCR, pour l'IPP.

L'évolution génétique des virus grippaux 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 durant la saison 2014-2015, les virus de sous-type A(H3N2), se cultivent très difficilement sur cellules MDCK et hémagglutinent encore plus faiblement les globules rouges de cobaye. Nous avons alors utilisé la RT-PCR pour l'IPP et la technique ELISA pour le CNR-HCL 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 Evaluation des Tests Rapides d'Orientation Diagnostic TROD

Suite à l'évaluation qui avait été réalisée en 2014 puis en 2016 des performances (analytiques et de praticabilité) des tests d'orientation diagnostic de la grippe le CNR-HCL a été contacté par un industriel afin de réaliser l'expertise de nouveaux tests.

Le CNR-HCL a évalué le test rapide avec analyseur FUJIDRI-CHEM Immuno AG RSV/ADV pour le VRS. Cette évaluation a été réalisée sur des souches cultivées sur cellules et une étude rétrospective a porté sur des échantillons de patients.

Ce complément d'évaluation a été réalisé, et a permis de mettre à jour des recommandations d'utilisation de ces TROD qui ont été postés sur le site du CNR, à la demande de Santé Publique France, et avec le soutien de la DGS (voir [https://www.pasteur.fr/sites/default/files/rubrique\\_pro\\_sante\\_publicue/les\\_cnr/trod-grippe-france-2017-21-09-2017.pdf](https://www.pasteur.fr/sites/default/files/rubrique_pro_sante_publicue/les_cnr/trod-grippe-france-2017-21-09-2017.pdf)).

#### 2.1.2 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/en/](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/molecular_diagnosis/en/)). 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 2016-2017**

### **2.2.1 Analyses virologiques d'échantillons cliniques humains, surveillance saisonnière**

Dans leur ensemble, les laboratoires du CNR des virus influenzae ont reçu un total de 5433 prélèvements et détecté 3211 virus grippaux.

#### **➤ CNR-IPP et CNR-HCL**

En France métropolitaine, au sein des 4135 prélèvements reçus par les CNR-IPP et -HCL, 2455 (59,4%) prélèvements ont été trouvés positifs pour un ou plusieurs virus grippaux (une co-infection). Ces détections positives proviennent essentiellement de la surveillance du réseau Sentinelles (n= 1434 ; 58,4%) et des laboratoires hospitaliers (n= 846 ; 34,5%). Le reste provient des laboratoires des armées (n=28 ; 1,1%), de l'étranger (n=94 ; 3,8%), du centre médical de l'aéroport de Roissy (n=27 ; 1,1%), du réseau international des Instituts Pasteur (n=20 ; <1%) et des EHPAD (n=6 ; <1%).

Les virus grippaux détectés se répartissent de la manière suivante : 2396 virus grippaux de type A avec 2313 A(H3N2) (94%), 61 virus A(H1N1)pdm09 (2,5%) et 22 virus de type A (0,9%) non sous-typés. Et 59 virus grippaux de type B avec 47 virus B-Victoria (1,9%), 9 virus B-Yamagata (0,6%) et 3 virus de type B (0,1%) pour lesquels le lignage n'a pas été déterminé (Tableau 1).

#### **➤ CNR-IPG**

En région Antilles-Guyane, le CNR-IPG a reçu 426 prélèvements en provenance respectivement de Guyane (n= 222 ; 52.1%), de Martinique (n= 126 ; 29.6%) et de Guadeloupe, (n= 78 ; 18.3%). Ces prélèvements proviennent respectivement des réseaux sentinelles (n= 182 ; 42.7%), de laboratoires hospitaliers (n=198 ; 50.9%) et de laboratoires privés (n=27 ; 6.3%).

Au total, 255 virus grippaux ont été détectés, répartis de la façon suivante : 249 (97.6%) virus grippaux de type A(H3N2) et 6 (2.4%) virus de type B parmi lesquels 4 B appartenant au lignage B-Victoria et 2 virus B appartenant au lignage B-Yamagata.

Le CNR-IPG a également reçu dans le cadre de la surveillance des VRS, 272 prélèvements parmi lesquels 40 VRS-A et 21 VRS-B ont été détectés.

Nbre de plvts/souches	Plvts positifs (A ou B)	Provenance Surveillance Population	Virus type A						Virus type B					
			Total A	Non sous-typés	H1N1pdm09		H3N2		Total B	Sans lignage	B Vic		B Yam	
					PCR	isolement	PCR	isolement			PCR	isolement	PCR	isolement
1602	744	Sentinelles FN	741	8	7	6	726	150	3	0	1	1	2	2
1237	621	Sentinelles FS	618	5	4	3	609	43	3	1	2	2	0	0
139	69	Sentinelles Corse FS	69	0	0	0	69	2	0					
389	354	Lab hospitaliers FN	350	2	10	4	338	75	4	0	0	0	4	2
566	492	Lab hospitaliers FS	468	7	11	6	450	84	24	2	21	7	1	1
1991	1098	Total Sent./Hop FN	1091	10	17	10	1064	225	7	0	1	1	6	4
1942	1182	Total Sent./Hop FS	1155	12	15	9	1128	129	27	3	23	9	1	1
		<b>Alsace</b>												
2	2	CH Colmar	2	0	0	0	2	0	0					
		<b>Basse Normandie</b>												
67	67	CH Caen	67	1	1	1	65	14	0					
3	3	CH Cotentin	3	0	0	0	3	0	0					
		<b>Bourgogne</b>												
115	105	CH Dijon	105	0	0	0	105	28	0					
		<b>Bretagne</b>												
12	11	CHU Rennes	11	1	0	0	10	2	0					
4	3	CH Quimper	3	0	0	0	3	0	0					
30	29	CHRU Brest	28	0	0	0	28	15	1	0	0	0	1	1
		<b>Centre</b>												
4	0	CH Orléans	0						0					
		<b>Franche Comte</b>												
2	2	CH Besançon	2	0	0	0	2	0	0					
		<b>Haute Normandie</b>												
2	0	CH Rouen	0						0					
		<b>Ile de France</b>												
1	1	CH Cochin	1	0	0	0	1	0	0					
7	7	CH Pitié Salp.	7	0	7	3	0	0	0					
6	3	Hop Necker	3	0	0	0	3	1	0					
5	5	CH Trousseau	5	0	0	0	5	1	0					
3	2	GH St Joseph	2	0	0	0	2	0	0					
1	0	Hop Robert Debré	0						0					
2	1	Hop St Louis	1	0	0	0	1	0	0					
1	1	CH Pontoise	1	0	0	0	1	0	0					
21	19	CH Ambroise Paré	19	0	0	0	19	1	0					

2	1	CH Colombes	1	0	0	0	1	0	0					
4	2	Hop Antoine Béclère	2	0	2	0	0	0	0					
2	1	Hôpital Foch	1	0	0	0	1	1	0					
3	3	CHU Avicenne	3	0	0	0	3	0	0					
13	13	CH Paul Brousse	13	0	0	0	13	3	0					
1	0	Hop St Antoine	0						0					
3	3	Hop Henri Mondor	3	0	0	0	3	0	0					
<b>Lorraine</b>														
1	1	CHU Epinal	1	0	0	0	1	0	0					
<b>Nord Pas de Calais</b>														
11	11	CH Calais	11	0	0	0	11	6	0					
<b>Pays de Loire</b>														
1	1	CH Cholet	1	0	0	0	1	1	0					
38	37	CH Angers	37	0	0	0	37	1	0					
<b>Picardie</b>														
15	14	CH Amiens	14	0	0	0	14	1	0					
3	2	CH Compiègne	2	0	0	0	2	0	0					
<b>Poitou-Charentes (FN)</b>														
3	3	CH La Rochelle	0					0	3	0	0	0	3	1
<b>PACA (FN)</b>														
1	1	CH Avignon	1	0	0	0	1	0	0					
<b>Aquitaine</b>														
1	1	Marmande	1	0	0		1	1	0					
3	0	Nerac	0						0					
22	18	Bordeaux	11	0	0		11	0	7	2	5	0	0	
8	7	Puymirol	7	1	0		6	1	0					
<b>Auvergne</b>														
57	55	Clermont-Ferrand	54	0	0	0	54	17	1	0	0		1	1
<b>Languedoc-Roussillon</b>														
2	0	Alès												
2	2	Montpellier	2	0	1	0	1	1	0					
1	1	Nîmes	1	0	0		1	0	0					
<b>Midi-Pyrénées</b>														
109	103	Toulouse	103	2	3	0	98	8	0					
<b>PACA</b>														
2	2	Avignon	2	0	0	0	2	0	0					
3	3	Aix-en-Provence	3	0	0		3	2	0					
4	4	Cannes	4	0	0		4	2	0					
1	1	Toulon	1	0	0	0	1	1	0					
<b>Poitou-Charentes</b>														
46	42	Poitiers	42	0	0		42	22	0					
<b>Rhône-Alpes</b>														
1	1	Annonay	1	0	0		1	1	0					
2	2	Biomnis	2	0	0		2	0	0					

11	11	Bourgoin-Jallieu	11	0	0		11	6	0					
2	0	Condrieu	0						0					
77	73	Grenoble	59	0	6	5	53	9	14	0	14	7	0	0
4	0	La Pacaudière	0						0					
37	17	Lyon	17	1	0		16	1	0					
2	2	Marinier	2	0	0		2	1	0					
150	142	St Etienne	140	3	1	1	136	10	2	0	2	0	0	0
4	0	St Galmier	0						0					
1	0	St Roman en Gal	0						0					
4	2	Rumilly	2	0	0		2		0					
10	3	Valence	3	0	0		3	1	0					
		Autres												
		<b>Armées</b>												
7	7	HIA Brest	7	0	0	0	7	2	0					
2	2	HIA Bégin	2	0	0	0	2	1	0					
2	0	HIA Percy	0						0					
19	19	HIA Lyon	19	0	2	1	17	10	0					
<b>8</b>	<b>6</b>	<b>EHPAD (FN)</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>0</b>					
<b>20</b>	<b>20</b>	<b>RIIP réseau international des Instituts Pasteur (FN)</b>	<b>19</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>9</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>44</b>	<b>27</b>	<b>Autres : aéroport Roissy (FN)</b>	<b>25</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>25</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
		<b>Total étranger</b>												
13	11	Antilles / Guyane (FN)	11	0	0	0	11	8	0					
52	51	La Réunion (FS)	35	0	15	1	20	20	16	0	16	2	0	0
35	32	Mayotte (FS)	26	0	2	1	24	13	6	0	6	1	0	0
<b>2087</b>	<b>1171</b>	<b>TOTAL général (FN)</b>	<b>1161</b>	<b>10</b>	<b>27</b>	<b>10</b>	<b>1124</b>	<b>244</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>4</b>
<b>2048</b>	<b>1284</b>	<b>TOTAL général (FS)</b>	<b>1235</b>	<b>12</b>	<b>34</b>	<b>12</b>	<b>1189</b>	<b>172</b>	<b>49</b>	<b>3</b>	<b>45</b>	<b>12</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>4135</b>	<b>2455</b>	<b>TOTAL GÉNÉRAL</b>	<b>2396</b>	<b>22</b>	<b>61</b>	<b>22</b>	<b>2313</b>	<b>416</b>	<b>59</b>	<b>3</b>	<b>47</b>	<b>13</b>	<b>9</b>	<b>5</b>

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

- **CNR-IPP : aucune détection d'infections grippales mixtes**
- **CNR-HCL : détection d'un cas d'infection mixte : A(H3N2) + B de lignage non déterminé**

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 Victor Total V
222	90	<b>Guyane</b>	87		0	87	3		1
134	52	<b>Hôpital / Centre de Santé</b>	49		0	49	3		1
133	51	Hôp. Cayenne	48		0	48	3		1
1	1	CDS Maripasoula	1		0	1	0		0
27	11	<b>Laboratoires privés</b>	11		0	11	0		0
61	27	<b>Surveillance sentinelle</b>	27		0	27	0		0
126	113	<b>Martinique</b>	110		0	110	3		3
83	83	<b>CHU Fort de France</b>	80		0	80	3		3
43	30	<b>Surveillance sentinelle</b>	30		0	30	0		0
78	52	<b>Guadeloupe</b>	52		0	52	0		0
0	0	<b>CHU Pointe à Pitre</b>	0		0	0	0		0
78	52	<b>Surveillance sentinelle</b>	52		0	52	0		0
182	109	<b>Total sentinelle</b>	109		0	109	0		0
244	146	<b>Total Non Sentinelle</b>	140		0	140	6		4
426	255	<b>Total Général</b>	249		0	249	6		4

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

## 2.2.2 Analyse virologique d'échantillons cliniques humains, virus émergents

### 2.2.2.1 Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV)

#### ➤ CNR-IPP et CNR-HCL

Le nombre de suspicion d'infection à MERS-Coronavirus était en diminution cette saison. Les cas suspects avaient principalement séjourné en Arabie Saoudite, notamment lors du pèlerinage à la Mecque, ou aux Emirats Arabes Unis. Aucune infection à MERS-Coronavirus n'a été détectée mais d'autres étiologies sont retrouvées dans la plupart des cas.

Nb patients	Nb plvts	Nb positifs	Provenance	Virus type A		Virus type B		Autres virus respiratoires	Pays visité
				Non typé	H3N2	Non typé	Yam		
			<b>Total hôpitaux (FN)</b>						
			<b>Poitou-Charentes</b>						
1	3	1	La Rochelle				1		Arabie Saoudite
			<b>Ile de France</b>						
1	1	1	HIA Begin		1				Emirats Arabes Unis
1	1	1	Cergy Pontoise		1			1 rhinovirus	Arabie Saoudite
			<b>Centre</b>						
2	4	2	Orléans					1 rhinovirus	Arabie Saoudite
			<b>Total hôpitaux (FS)</b>						
			<b>Bourgogne</b>						
2	4	2	Mâcon					2 rhinovirus	Arabie Saoudite
			<b>PACA</b>						
4	8	2	Marseille		1			2 picornavirus	
2	3	0	Nice						Arabie Saoudite
			<b>Rhône-Alpes</b>						
3	6	5	Annecy	2	2			3 picornavirus*	Arabie Saoudite
1	2	1	Chambéry					1 picornavirus	Arabie Saoudite
1	2	2	Grenoble		2			1 picornavirus – 1 parainfluenza $\alpha$	Arabie Saoudite
18	31	16	Lyon		7	1	1	5 picornavirus* – 1 VRS – 1 corona	Arabie Saoudite
3	5	2	St Etienne					2 picornavirus	Emirats Arabes Unis
5	9	5	<b>TOTAL général (FN)</b>		2		1	2	
34	61	30	<b>TOTAL général (FS)</b>	2	12	1	1	19	
<b>39</b>	<b>70</b>	<b>35</b>	<b>TOTAL GENERAL</b>	<b>2</b>	<b>14</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>21</b>	

\* : infection mixte : Virus grippal A ou A(H3N2) + Picornavirus

$\alpha$  : infection mixte : Virus grippal A(H3N2) + Picornavirus + Parainfluenza

Tableau 3 : Bilan des suspicions d'infections à MERS-CoV analysées par les CNR-IPP et -HCL

#### ➤ CNR IPG

Aucune suspicion pour MERS-CoV n'a été reçue au CNR-IPG

#### 2.2.2.2 Virus de grippe aviaire A(H7N9), A(H5N1)

Toutes les suspicions se sont révélées négatives pour la grippe aviaire. Comme pour les suspicions d'infection par le MERS-CoV, d'autres étiologies ont été retrouvées dans certains cas.

Nb patients	Nb plvts	Nb positifs	Provenance	Virus type A		Virus type B		Pays visité
				Non typé	H3N2	Non typé	Yam	
			<b>Total hôpitaux (FN)</b>					
			<b>Pays de Loire</b>					
1	1	0	Nantes					Chine
			<b>Total hôpitaux (FS)</b>					
			<b>Languedoc-Roussillon</b>					
1	1	1	Nîmes		1			Vietnam
			<b>Midi-Pyrénées</b>					
1	2	1	Toulouse		1			Thaïlande
			<b>Rhône-Alpes</b>					
1	3	0	Vienne					Chine
1	1	0	<b>TOTAL général (FN)</b>					
3	6	2	<b>TOTAL général (FS)</b>		2			
<b>4</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>TOTAL GENERAL</b>		<b>2</b>			

Tableau 4 : Bilan des suspicions de grippe aviaire analysées par le CNR-IPP et -HCL  
Aucune suspicion de grippe aviaire A(H5N1) ou A(H7N9) n'a été reçue au CNR-IPG.

### 2.2.3 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, ou sur la détection par RT-PCR en temps réel de la présence ou l'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 réalisé en fonction du contexte de la surveillance, Sentinelles ou hôpital, de la situation géographique et en fonction de la caractérisation antigénique des souches.

#### **Surveillance des cas d'excrétion grippale prolongée :**

Pour les patients hospitalisés sous traitement par INA, sont sélectionnés les prélèvements de patients présentant une excrétion virale prolongée (> 5 jours) ; les isolats correspondants lorsqu'ils sont obtenus sont testés par test fluorimétrique. Pour les isolats présentant une sensibilité diminuée aux INA le séquençage de la NA est réalisé. Pour les virus A(H1N1)pdm09 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. Cette technique de RT-PCR 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 permis l'isolement viral.

#### **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 au minimum est réalisé ainsi qu'un test fluorimétrique de sensibilité aux INA sur les virus isolés pour ces patients.

### 2.2.3.1 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=39 CNR-IPP) et A(H3N2) (n=459 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 séquençage du gène NA ou encore au moyen de RT-PCR temps réel différentielle avec des sondes spécifiques. Au total, 40 prélèvements, ont été analysés.

Par séquençage du gène NA, un seul virus A(H1N1)pdm09 présentant une mutation H275Y sur la neuraminidase associée à la résistance à l'oseltamivir, a été identifié chez un patient hospitalisé dans un service d'hématologie. La recherche de résistance par test phénotypique a confirmé la présence cette résistance.

##### ➤ ***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, R224K, R292K et N294S. Parmi les 459 prélèvements testés, dont 48 (CNR-IPP) provenaient de cas graves de grippe hospitalisés en réanimation, 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 E117V, R150K, D197E/N, I221L et R374K. Au total 8 prélèvements, ont été analysés, un provenait d'un cas grave. Par séquençage du gène NA, aucune mutation d'intérêt n'a été détectée.

### 2.2.3.2 Tests fluorimétriques (phénotypiques)

Ce test réalisé en présence de différentes concentrations d'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) dont la sensibilité aux INA a été testée (n = 106), un seul a présenté une réduction de sensibilité à l'oseltamivir (Tableau 5).

Il s'agissait d'un virus A(H1N1)pdm09 isolé d'une patiente hospitalisée en service d'hématologie dans lequel des cas groupés de grippe sont survenus de fin avril à mai 2017. L'analyse phénotypique a révélé une sensibilité très diminuée à l'oseltamivir (IC<sub>50</sub> oseltamivir = 273,5nM) en cohérence avec la présence de mutation H275Y (cf § 2.2.1)

	Sentinelles/Hôpital		Autres	
	Sen	Res	Sen	Res
<b>IPP</b>				
A(H1N1)pdm09	4	1	0	0
A(H3N2)	22	0	0	0
B	6	0	0	0
<b>tot</b>	<b>32</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>HCL</b>				
A(H1N1)pdm09	7	0	0	0
A(H3N2)	53	0	0	0
B	14	0	0	0
<b>tot</b>	<b>74</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>TOTAL</b>	<b>106</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Tableau 5 : Résultats des tests phénotypiques de sensibilité à l'oseltamivir (CNR-IPP, -HCL)

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

## 2.3 Collection – Etudes

### 2.3.1 Collection de souches de virus influenza aviaire

Les CNR-IPP et -HCL ont reçu en octobre 2016, de l'ANSES de Ploufragan, 2 souches de grippe aviaire hautement pathogène provenant de canards infectés dans le sud-ouest : H5N2 A/duck/France/150233b/2015 et H5N9 A/duck/France/150236b/2015

### 2.3.2 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. En septembre 2016 ont été reçus : 18 prélèvements sanguins (sérum).
- Étude avec Henri Mondor : sérologie par inhibition d'hémagglutination (IHA) réalisées sur des sérums de patients vaccinés, prélevés à différents temps par rapport à la vaccination, 35 prélèvements. Et sérologie IHA sur des surnageants de culture de lymphocytes B, 16 surnageants en octobre 2016 et 12 en juin 2017.
- Réception de surnageants de culture de virus grippaux en provenance de l'Institut Pasteur de Dakar, pour préparation des amplicons en vue du séquençage sur la plateforme de séquençage P2M. Dix prélèvements en octobre 2016 et 10 en mai 2017.

#### ➤ CNR-HCL

- **Protocole : AFP : : Etude de** l'incidence de la grippe asymptomatique chez le personnel soignant : Etude de cohorte prospective multicentrique L'objectif est d'estimer l'incidence de la grippe asymptomatique et symptomatique chez le personnel soignant en services de soins de court séjour. Les 5 centres cliniques participants (2 sur Lyon, St Etienne, Dijon et Grenoble) ont permis d'inclure 291 sujets volontaires. Le diagnostic virologique repose sur un prélèvement naso-pharyngé pour une recherche de virus grippal par RT-PCR et 2 prélèvements sanguins pour un suivi sérologique par IHA des sujets inclus.

- **Producteurs de Vaccins :**

**GSK : 9** échantillons

**A :** 5 (H1N1)pdm09 (A/Michigan/45/2015 X-275 x2, A/Singapore/GP1908/2015 IVR-180 x2, A/Slovenia/2903/2015 X-291)  
2 H3N2 (A/Norway/2178/2014, A/Victoria/503/2015 NYMC X-281)

**B :** 1 Lignée Yamagata ( B/Phuket/3073/2013)  
1 Lignée Victoria (B/Brisbane/60/2008)

### 2.3.3 Collection de souches, antigènes de référence et immun-sérums

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 6). Les CNR-IPP et -HCL ont reçu du CCOMS la nouvelle souche prototype A(H1N1)pdm09 du vaccin de l'hiver 2017-2018 A/Michigan/45/2015 et le sérum de furet homologue

	Souche virale	Immun-sérum
<b>A(H3N2)</b>		
A/Hong Kong/4801/2014		2016-17
<b>A(H1N1)pdm09</b>		
A/Michigan/45/2015	2016-17	2016-17

Tableau 6 : Sérums de furets post-infectieux et souches reçus par les CNR-IPP et -HCL (saison de réception)

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.

### 2.3.4 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 de 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 les réunions OMS de détermination de la nouvelle composition vaccinale en février et septembre.

Le CNR-IPP a effectué un envoi au CCOMS de Londres en janvier 2017, en début d'épidémie, de 20 prélèvements positifs pour un virus influenza (20 virus A(H3N2)). Un autre envoi a été effectué en juillet 2017 de 13 prélèvements positifs pour un virus influenza (3 virus A(H1N1)pdm09, 8 virus A(H3N2) et 2 virus de type B de lignage Yamagata).

Le CNR-HCL a effectué deux envois de virus grippaux au CCOMS de Londres. Le premier, après plusieurs semaines de circulation en janvier 2017, de 29 isolats en provenance de la surveillance communautaire et hospitalière, (21 virus A(H3N2) et 1 virus de type B lignage

Victoria ainsi que 7 isolats (1 A(H1N1)pdm09 et 6 A(H3N2)) en provenance de la surveillance communautaire de Mayotte en Février-Mars 2016. Un nouvel envoi a été effectué en Juin 2017 de 9 isolats sélectionnés dans la surveillance communautaire et hospitalière: 7 virus de type B lignage Victoria dont 1 en provenance de Mayotte (Février 2016) et 2 virus A(H3N2) isolés chez des patients ayant présenté une forme grave.

Le CNR-IPG a effectué 1 envoi au CNR-IPP, en octobre 2016, de 10 prélèvements A(H3N2) positifs. Un envoi au CCOMS d'Atlanta (CDC) a également été effectué en février 2017 de 23 prélèvements positifs pour un virus influenza (22 virus A(H3N2) et 1 virus de type B de lignage Victoria).

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, des souches (A(H1N1)pdm09 et B lignage Victoria à un laboratoire privé et une souche A H3N2 (produite sur œuf embryonné et sur cellules MDCK) à un laboratoire public en Bretagne.

Concernant le VRS les CNR-HCL et IPP ont procédé à des échanges de procédures (qRT-PCR et culture) et de virus afin de préparer la mise en place de la surveillance plus approfondie du VRS au cours de la saison prochaine.

## 3 Activités de surveillance

En **Métropole**, la saison de surveillance 2016-2017 a été marquée par une épidémie grippale précoce et d'intensité modérée avec un pic épidémique entre les semaines S51/2016 et S52/2016 et la circulation majoritaire de virus de grippe A(H3N2) pendant toute la période de l'épidémie. Lors de cette saison les virus de sous-type A(H1N1)pdm09 et de grippe B sont restés sporadiques.

Dans les DFA (Départements Français des Amériques) la saison 2016-2017 a été marquée par des épidémies grippales d'intensité modérée avec un démarrage inhabituellement précoce.

En Guyane, un premier pic épidémique a été atteint dès septembre 2016 (S38/2016) suivi d'un second pic en février 2017 (S05/2017).

Aux Antilles, l'épidémie 2016-2017 a duré respectivement 16 et 12 semaines : de la semaine S41/2016 à la semaine S05/2017 en Guadeloupe et de la semaine S03/2017 à la semaine S06/2017 en Martinique.

Dans les 3 DFA, le virus de sous-type A(H3N2) a très largement dominé avec seulement quelques virus de type B détectés notamment en fin de saison.

### 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 Sentinelles, 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 interrégionales du réseau Sentinelles de la zone géographique correspondante.

##### ➤ **Sentinelles**

Le réseau des médecins Sentinelles est présent dans 22 régions et comprend 366 médecins préleveurs : 267 médecins généralistes et 99 pédiatres. Parmi eux 338 (92,3%) ont réalisé au moins un prélèvement (tableau 7, figures 1 et 2).

**La France-Nord** comporte 13 régions (anciennes 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 9 régions (anciennes régions) : Aquitaine, Auvergne, Languedoc-Roussillon, Limousin, Midi-Pyrénées, Poitou-Charentes, Provence-Alpes-Côte d'Azur, Rhône-Alpes et Corse.

Particularité :

Pour la région Champagne Ardenne le CNR de la grippe effectue les analyses virologiques pour la détection et le typage des virus Influenza et le laboratoire de Virologie de Reims (Pr Laurent ANDREOLETTI) réalise les analyses bactério-virologiques des prélèvements pour la détection et le typage des virus et bactéries à tropisme respiratoire autres que les virus Influenza. Le rendu des résultats microbiologiques est transmis aux médecins préleveurs par courrier et/ou courriel, et les données épidémiomicrobiologiques sont envoyées à la Cire pour une publication dans le point épidémiologique hebdomadaire.

La surveillance épidémiologique repose notamment sur le relevé hebdomadaire de l'activité médicale, et du nombre de syndromes grippaux.

La représentativité des médecins préleveurs du réseau Sentinelles est décrite dans le tableau 7 (Source [réseau Sentinelles, INSERM/UPMC, http://www.sentiweb.fr/](http://www.sentiweb.fr/)) et leur répartition géographique est représentée figures 1 et 2.

Région	Médecins généralistes	Proportion de médecins préleveurs / généralistes %	Pédiatres	Proportion de pédiatres préleveurs / pédiatres %
Auvergne-Rhône-Alpes	42	0,6	19	5,8
Bourgogne-Franche-Comté	11	0,4	2	2,9
Bretagne	14	0,4	4	3,8
Centre-Val de Loire	16	0,7	2	2,6
Corse	19	6,3	1	6,7
Grand Est	30	0,6	12	5,1
Hauts-de-France	20	0,4	4	2,5
Ile-de-France	27	0,3	13	1,7
Normandie	9	0,3	6	7
Nouvelle-Aquitaine	15	0,2	7	3,9
Occitanie	20	0,3	9	3,5
Pays de la Loire	6	0,2	3	3,5
Provence-Alpes-Côte d'Azur	14	0,2	6	2,3
<b>FRANCE</b>	<b>243</b>	<b>0,4</b>	<b>95</b>	<b>3,3</b>

Tableau 7 : Composition des médecins généralistes et des pédiatres du Réseau Sentinelles par région ayant réalisé au moins un prélèvement et proportion par rapport aux généralistes et pédiatres en exercice dans la région - France, saison 2016-2017. (Source [réseau Sentinelles, INSERM/UPMC, http://www.sentiweb.fr/](http://www.sentiweb.fr/))

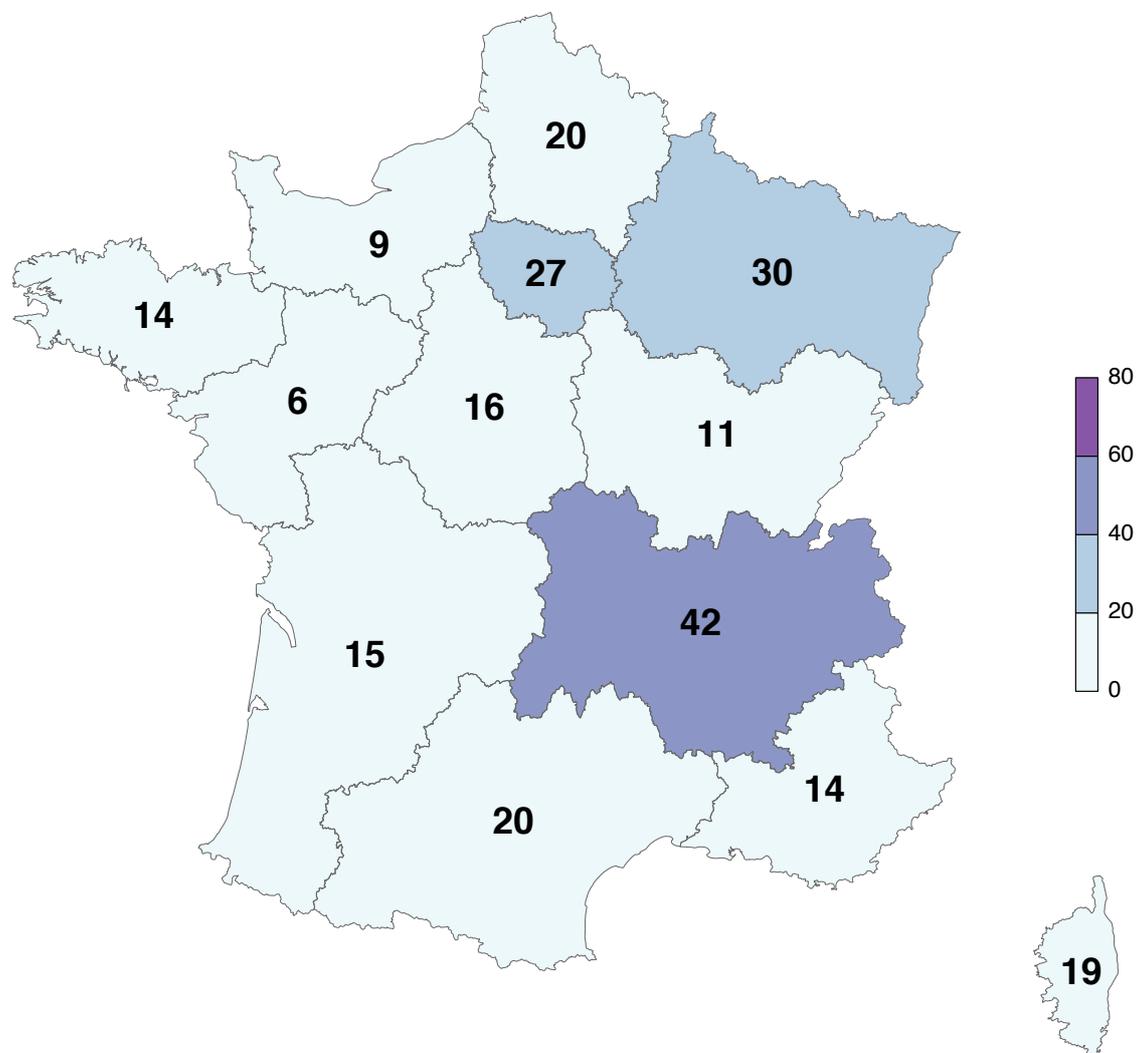


Figure 1: Représentation géographique des médecins généralistes Sentinelles ayant participé à la surveillance virologique des syndromes grippaux saison 2016-2017, par région (Source [réseau Sentinelles, INSERM/UPMC, http://www.sentiweb.fr](http://www.sentiweb.fr))

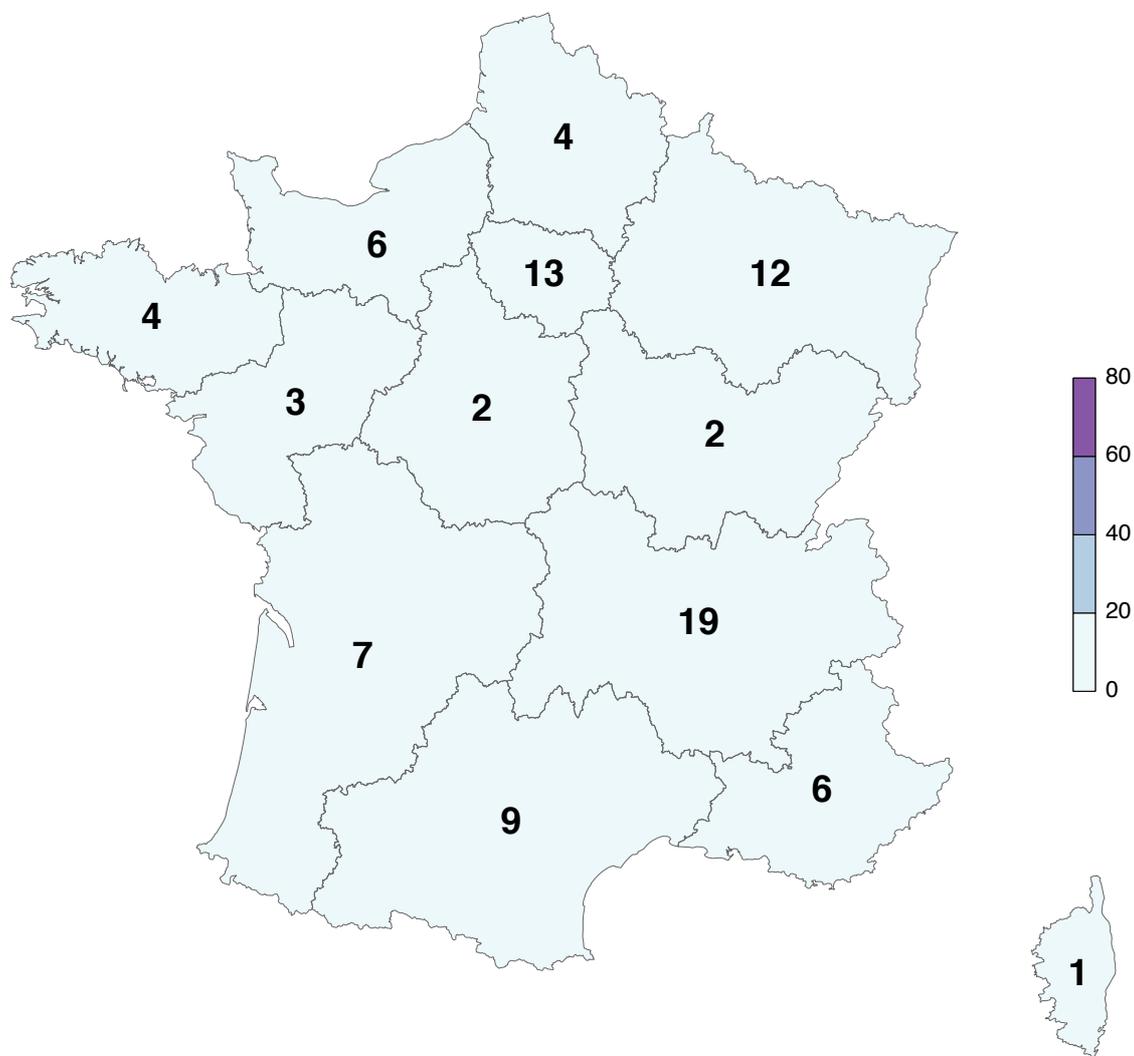


Figure 2 : Représentation géographique des pédiatres Sentinelles ayant participé à la surveillance virologique des syndromes grippaux saison 2016-2017, par région (Source réseau Sentinelles, INSERM/UPMC, <http://www.sentiweb.fr>)

### ➤ **RENAL**

Ce Réseau National des laboratoires hospitaliers comporte :

- en **France-Nord**, 25 CHU ou CHR :

IDF (A. Paré, Foch, Necker, P. Brousse, Trousseau, C.H.U. Kremlin Bicêtre, St Louis, Robert Debré, Cochin, GH La Pitié Salpêtrière, Mignot), Rennes, Nantes, Strasbourg, Lille, Amiens, Reims, Dijon, Brest, Rouen, Tours, Nancy, Angers, Orléans et Caen.

- en **France-Sud**, 15 CHU ou CHR :

Aix-en-Provence, Annecy, Bordeaux, Chambéry, Clermont-Ferrand, Grenoble, Limoges, Lyon, Marseille, Montpellier, Nice, Poitiers, St Etienne, Toulon et Toulouse. 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 tout au long de l'année de façon hebdomadaire 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 8.

	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	X
Coronavirus	X	X
FQ	X	X

*Tableau 8 : Liste des pathogènes.*

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

Les données du réseau RENAL sont intégrées dans la base de données **RENOG** qui permet via le web par accès sécurisé par identifiant et mot de passe :

- le recueil des résultats de détections de pathogènes respiratoires réalisées par les laboratoires hospitaliers (grippe, VRS, HMPV, rhino, etc....) du réseau RENAL
- l'agrégation des données de la surveillance communautaire (réseau GROG jusqu'en 2014) et du réseau RENAL

L'accès à la base de données RENOG pour l'enregistrement des résultats de détections et d'analyses sérologiques d'infections respiratoires est effectif depuis février 2008 pour les laboratoires hospitaliers de la moitié nord de la France. Pour la saison 2015-2016, le système a été modifié afin d'accueillir l'ensemble des données des laboratoires hospitaliers français. Aujourd'hui, environ 45 laboratoires hospitaliers participent bénévolement au réseau RENAL. Ils possèdent tous un accès sécurisé à leur page de recueil et ont la possibilité de visualiser des tableaux récapitulatifs, des analyses au cours de la saison.

Des passerelles existent entre les bases de données grippe (FN & FS) et RENOG afin d'agrèger les données Sentinelles et hospitalières, permettant ainsi de réaliser le fichier TESSy, envoyé chaque semaine à l'ECDC et à SpF.

Nous utilisons aussi ces données pour réaliser le **Bulletin National** qui est envoyé chaque semaine en période de surveillance aux laboratoires hospitaliers et aux agences de santé françaises ainsi qu'aux collaborateurs étrangers via l'ECDC.

### 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 3).

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

Dans le cadre de la surveillance communautaire du réseau Sentinelles, pour la saison 2016-2017, durant la période pré-épidémique, deux patients maximum pouvaient être prélevés par semaine par médecin participant, à savoir les 2 premiers patients de la semaine consultant pour un syndrome grippal selon la définition de cas du réseau Sentinelles utilisée pour la surveillance clinique des syndromes grippaux (cf ci-dessous), s'ils n'ont pas de lien entre eux

(même famille par exemple), quel que soit leur âge, et présentant des symptômes depuis moins de 48 heures. En période épidémique et jusqu'à la fin de la surveillance (Semaine 15), seul le premier patient présentant un syndrome grippal pouvait être prélevé. Il existe une exception pour les patients de plus de 65 ans (tranche d'âge peu représentée) pour lesquels 2 prélèvements étaient autorisés pendant toute la période de surveillance.

Ce protocole de prélèvement permet en prenant en compte la patientèle de chacun des médecins généralistes, 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

Le réseau Sentinelles est en charge de l'organisation de la surveillance clinique des cas de syndromes grippaux (SG) vus en consultation de soins en premiers recours (médecins généralistes et pédiatres) en France métropolitaine, couplée à une surveillance virologique. On peut ainsi détecter le début de l'épidémie grippale dans la communauté et suivre la dynamique de l'épidémie, estimer l'incidence nationale des cas de SG et de grippe vus en consultation de médecine générale et déterminer les caractéristiques cliniques des cas. La définition de cas utilisée est la suivante : **fièvre supérieure à 39°C, d'apparition brutale, accompagnée de myalgies et de signes respiratoires**. A partir de ce nombre de consultations pour syndromes grippaux, il est possible d'estimer la part attribuable aux virus de la grippe.

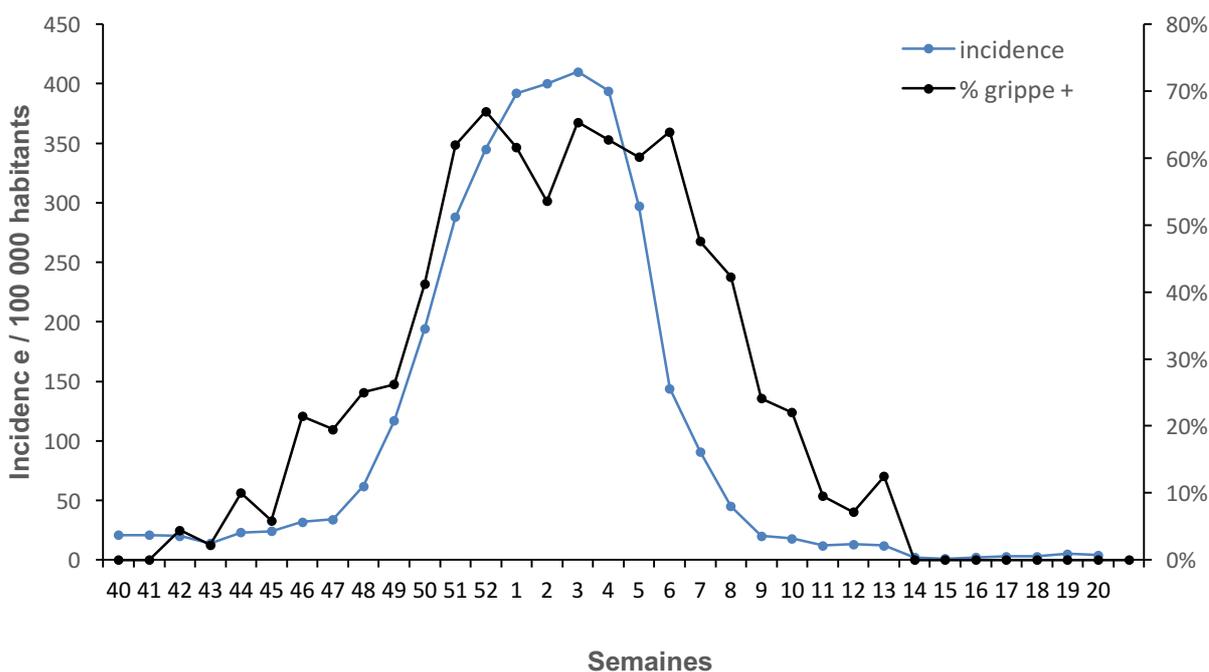


Figure 3 : Syndromes grippaux (GC) pour 100 000 habitants et pourcentage de virus grippaux détectés en médecine générale (Réseau Sentinelles) – période S40/2016-S20/2017

La période épidémique pour la saison 2016-2017, définie par le franchissement du seuil épidémique du réseau Sentinelles, s'est étendue entre les semaines 50/2016 (12 au 18 décembre 2016) et 05/2017 (30 janvier au 5 février 2017), soit pendant 8 semaines. L'épidémie a été de durée moyenne et relativement précoce.

Le pic d'activité a été observé en semaine 03/2017 (16 au 22 janvier 2017) avec un taux d'incidence de 410 consultations pour syndromes grippaux pour 100 000 habitants (Figure 3).

Les taux d'incidence cumulée de consultations pour syndromes grippaux ont été les plus élevés dans les classes d'âge 0-4 ans et 5-14 ans et les taux les plus faibles chez les personnes de plus de 65 ans, comme classiquement retrouvé dans les épidémies antérieures (Figure 4).

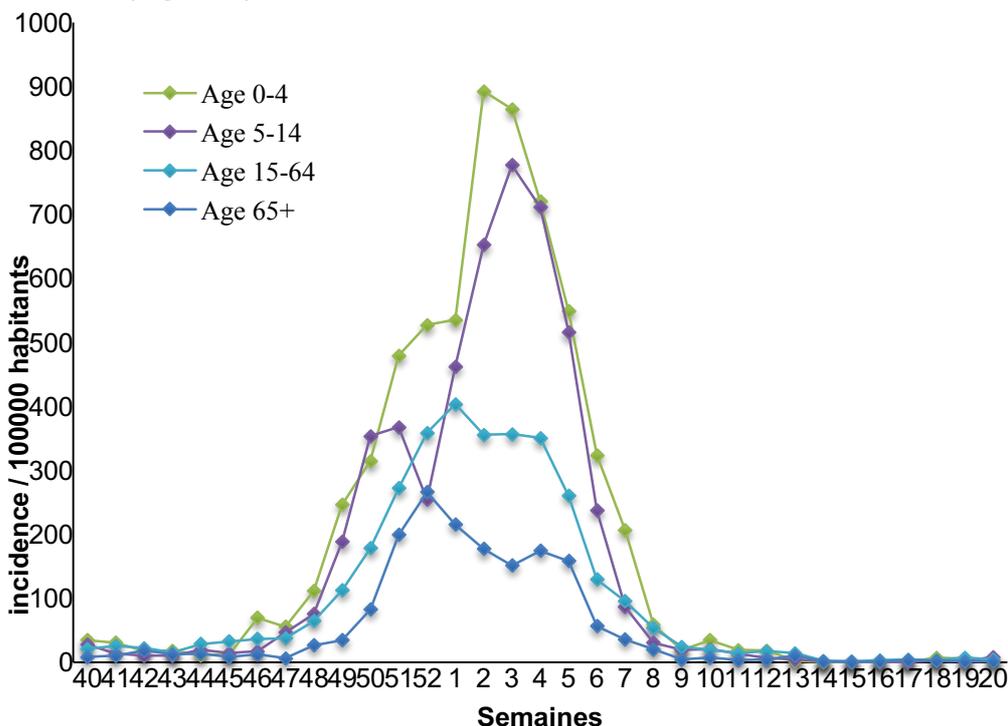


Figure 4 : Syndrome grippaux (GC) pour 100 000 habitants par tranches d'âge en France Médecine générale et pédiatres (réseau Sentinelles) – période 40/2016-20/2017

#### 3.1.1.4 Surveillance virologique

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

Au plan virologique, au cours de la saison 2016-2017, contrairement à ce qui était observé lors des saisons précédentes, il n'y a pas eu de dissociation de la circulation épidémique des VRS et des virus grippaux, VRS et virus grippaux ont circulé de façon concomitante pendant plusieurs semaines. Les VRS ont circulé de façon épidémique entre les semaines S43/2016 et S12/2017 et la circulation épidémique des virus grippaux a débuté en semaine S49/2016 pour se terminer semaine S09/2017. L'épidémie de VRS pour la France-Sud a débuté deux semaines après la France-Nord. Cette année, en comparaison avec la saison 2015-2016, le nombre de virus grippaux détectés a été beaucoup plus important que le nombre de VRS détectés. L'épidémie grippale a débuté précocement aux alentours de la semaine S49/2016. (Figures 5 à 7).

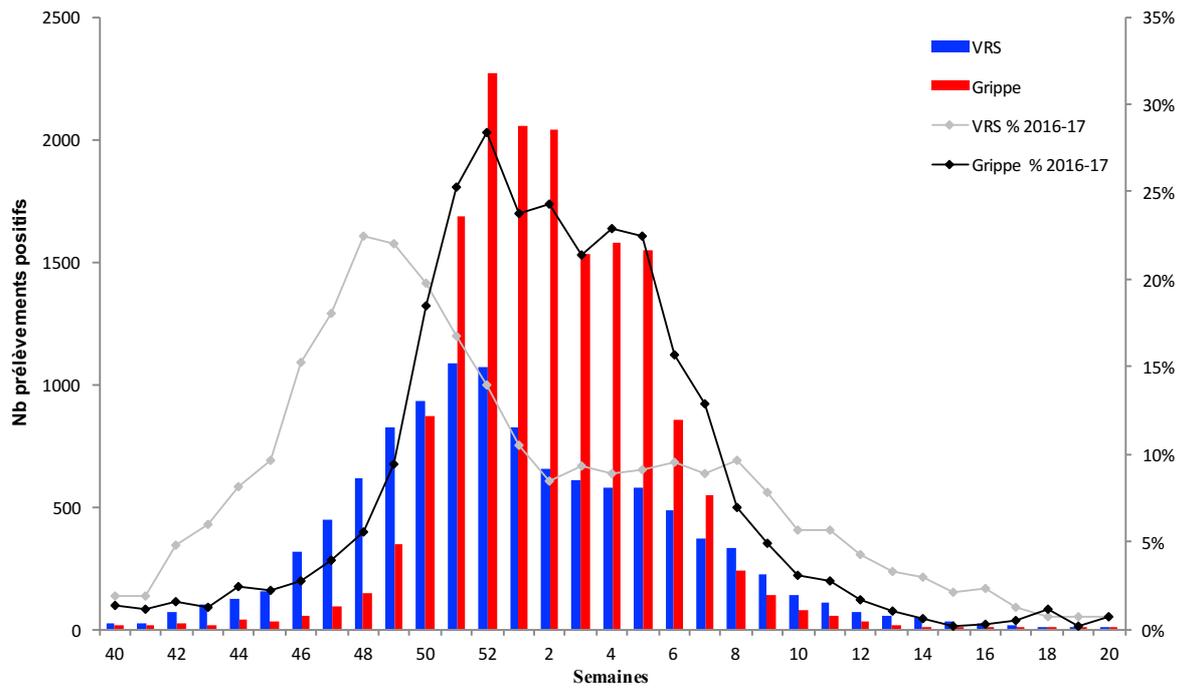


Figure 5 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2016-2017

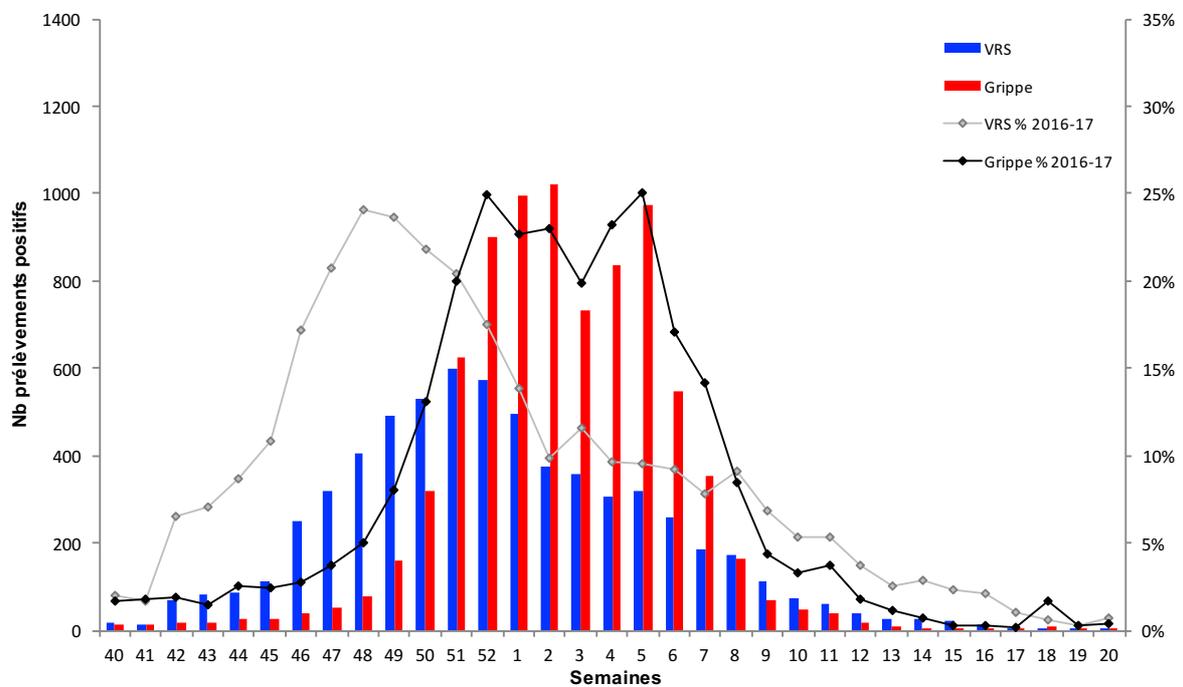


Figure 6 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France-Nord Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2016-2017

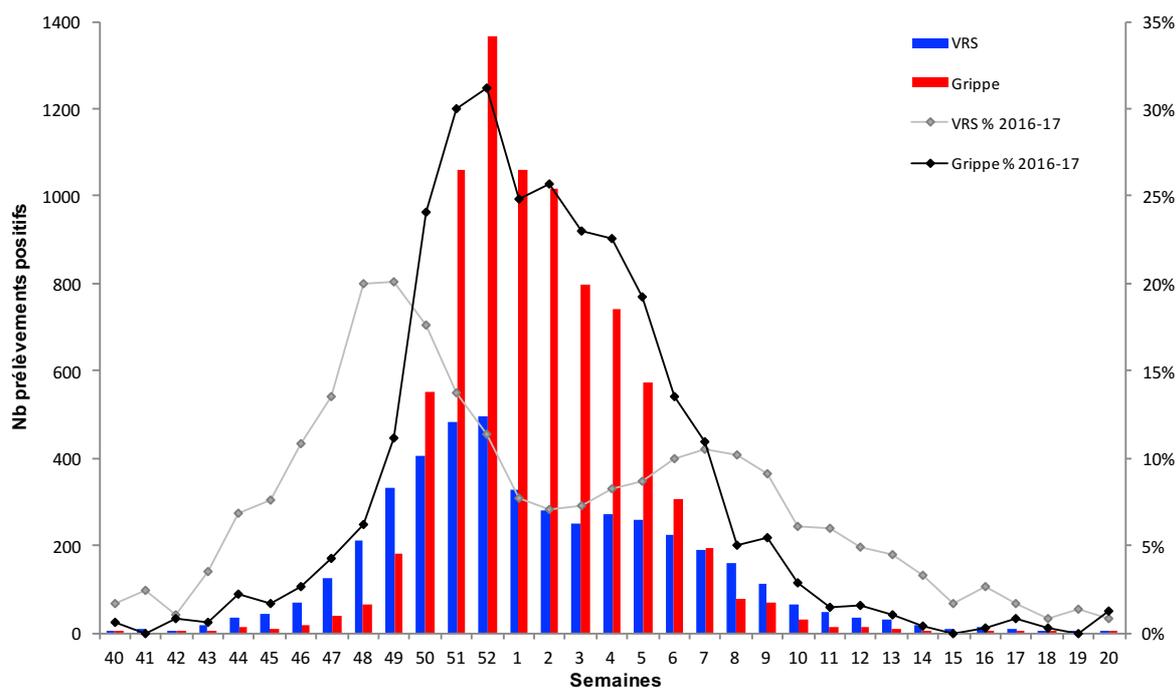


Figure 7 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France-Sud Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2016-2017

Au cours de la saison de surveillance 2016-2017, les détections de virus grippaux dans les prélèvements Sentinelles ont débutées en semaine S43/2016 et concernaient les virus grippaux de sous type A(H3N2), pour s'intensifier à partir de la semaine S48/2016 et atteindre un pic en semaine S51/2016. Les virus grippaux de sous-type A(H3N2) sont restés majoritaires durant toute l'épidémie. Les détections de virus grippaux de sous-type A(H1N1)pdm09 et de type B sont restées sporadiques tout au long de la saison.

En médecine ambulatoire, le seuil épidémique virologique correspondant à plus de 10% de prélèvements positifs pendant deux semaines consécutives avec un minimum de 10 prélèvements a été franchi pendant 13 semaines, de mi-novembre (S47/2016) à début mars (S09/2017), avec un pic fin décembre (S51/2016). Le taux de prélèvements positifs pour la grippe a dépassé les 10 % à partir de novembre, et a augmenté de façon significative (>30 %) à partir de décembre 2016. Au pic épidémique, plus d'un prélèvement du réseau Sentinelles sur deux (67 %) était positif pour la grippe.

A l'hôpital, les mêmes tendances sont retrouvées avec des taux de détection plus faibles que ceux observés dans le cadre du réseau Sentinelles, environ 28 % de détections de virus grippaux au pic épidémique. Seuls 10 % 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 sous-type A(H1N1)pdm09. Les virus A(H3N2) restent donc non sous-typés en grande majorité. Ce sous-typage ciblé des virus 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 13 à 15 ; réseaux Sentinelles et RENAL - Figures 16 à 18).

Les détections du VRS ont débuté significativement plus tôt en FN aux environs de la S42/2016. La vague épidémique a été comparable en FN et FS.

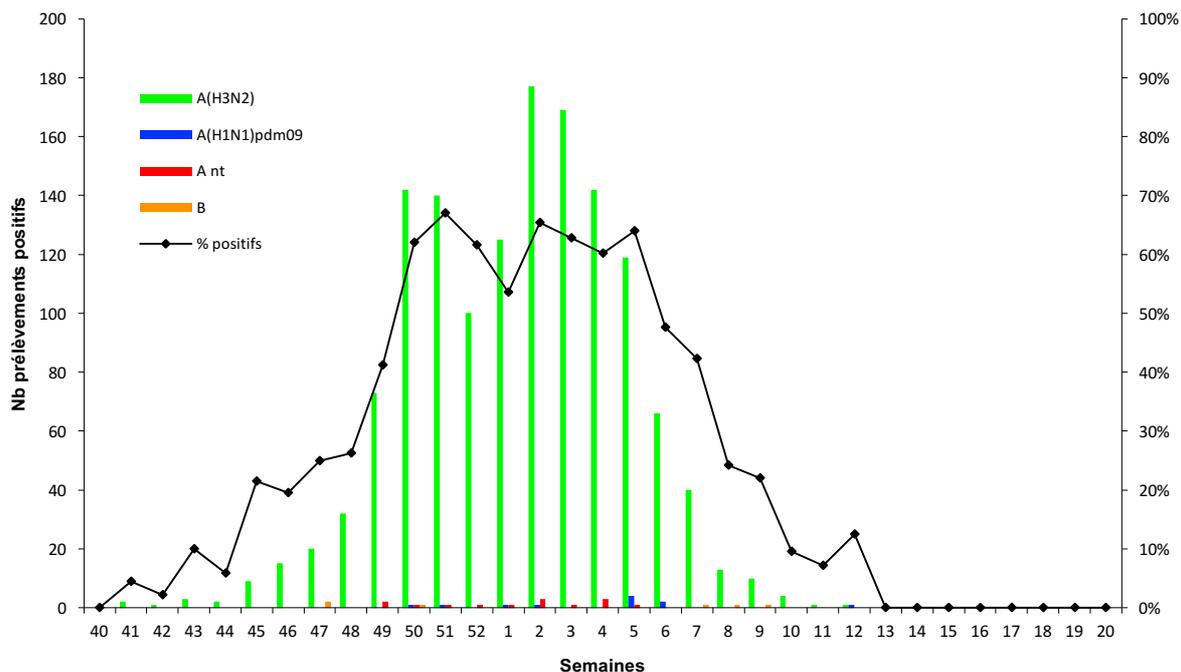


Figure 8 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France Réseau Sentinelles / saison 2016-2017

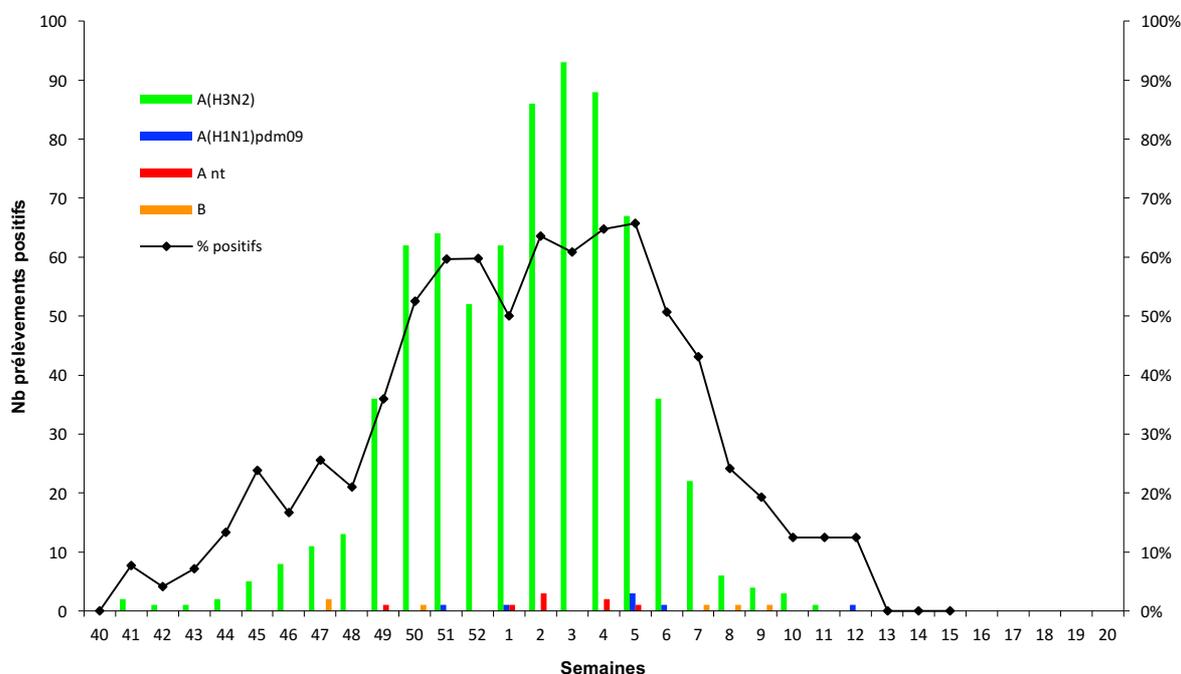


Figure 9 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Nord Réseau Sentinelles / saison 2016-2017

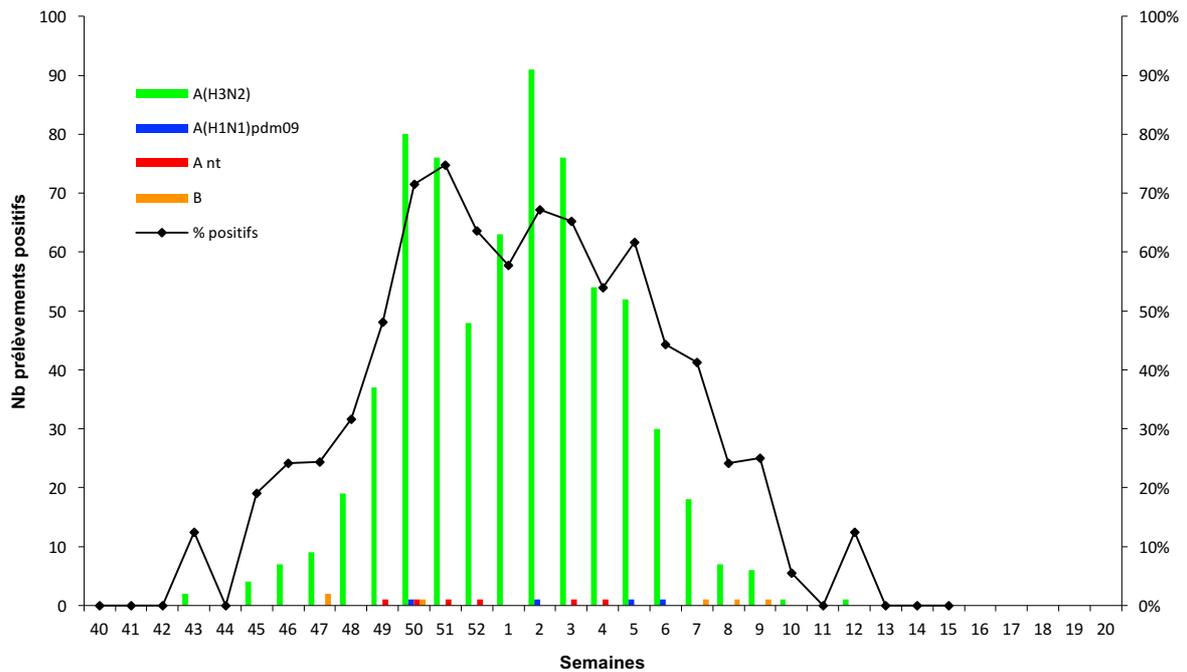


Figure 10 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Sud Réseau Sentinelles / saison 2016-2017

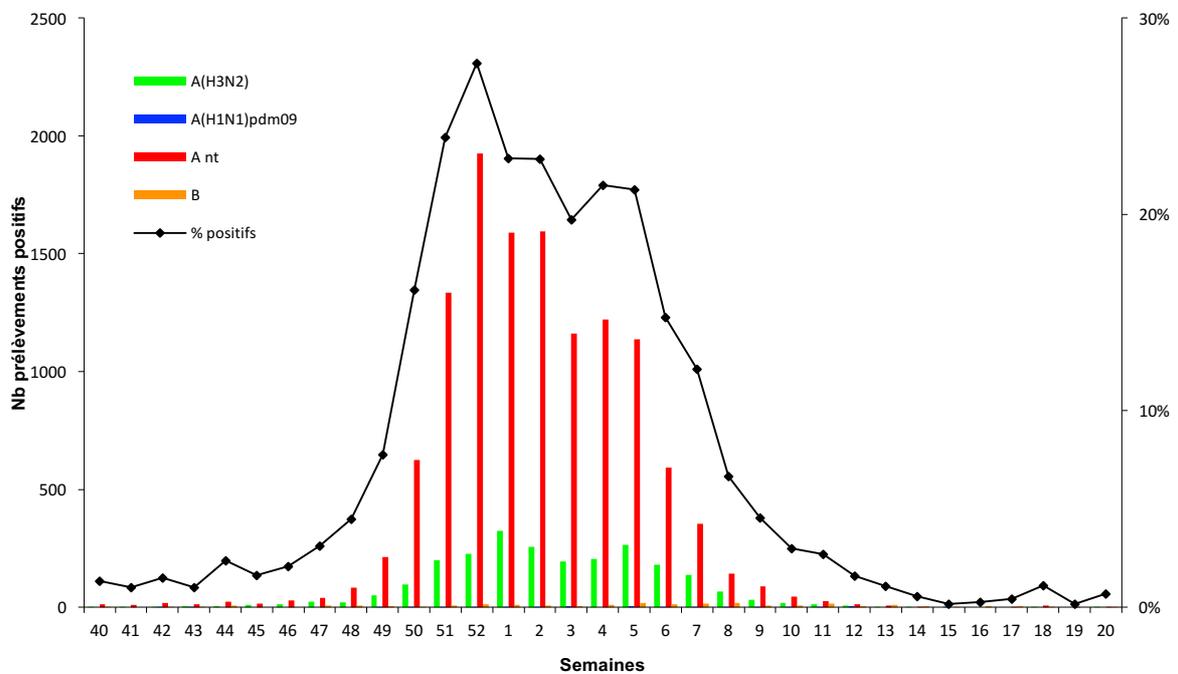


Figure 11 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France Réseau RENAL / saison 2016-2017

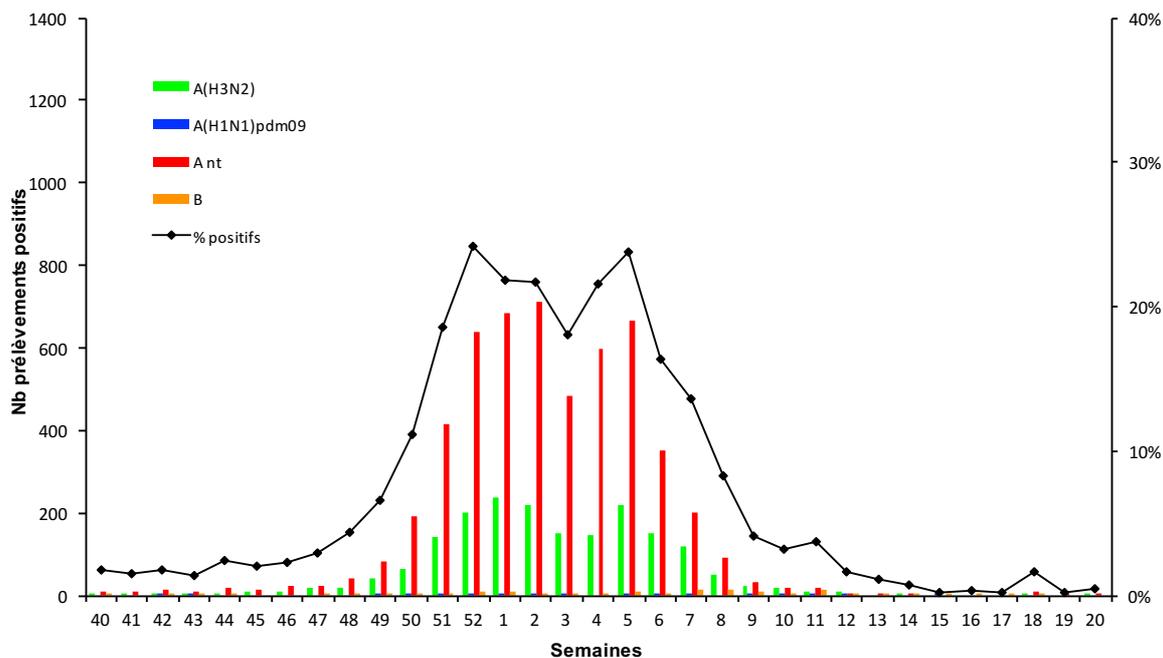


Figure 12 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Nord Réseau RENAL / saison 2016-2017

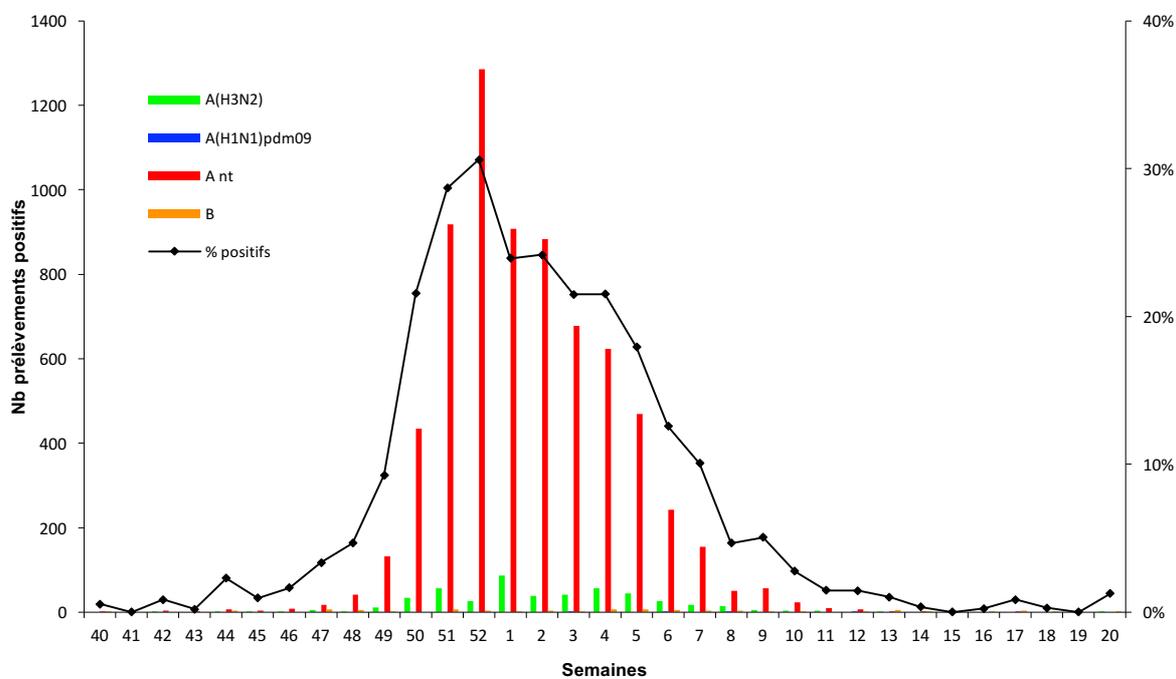


Figure 13 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Sud Réseau RENAL / saison 2016-2017

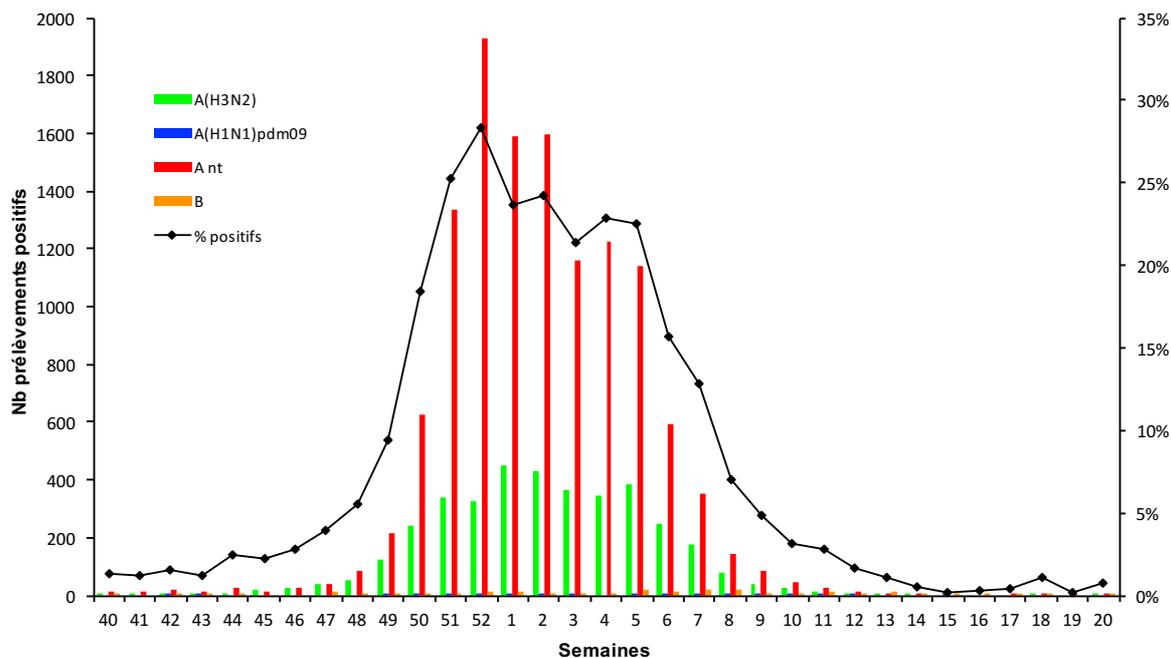


Figure 14 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2016-2017

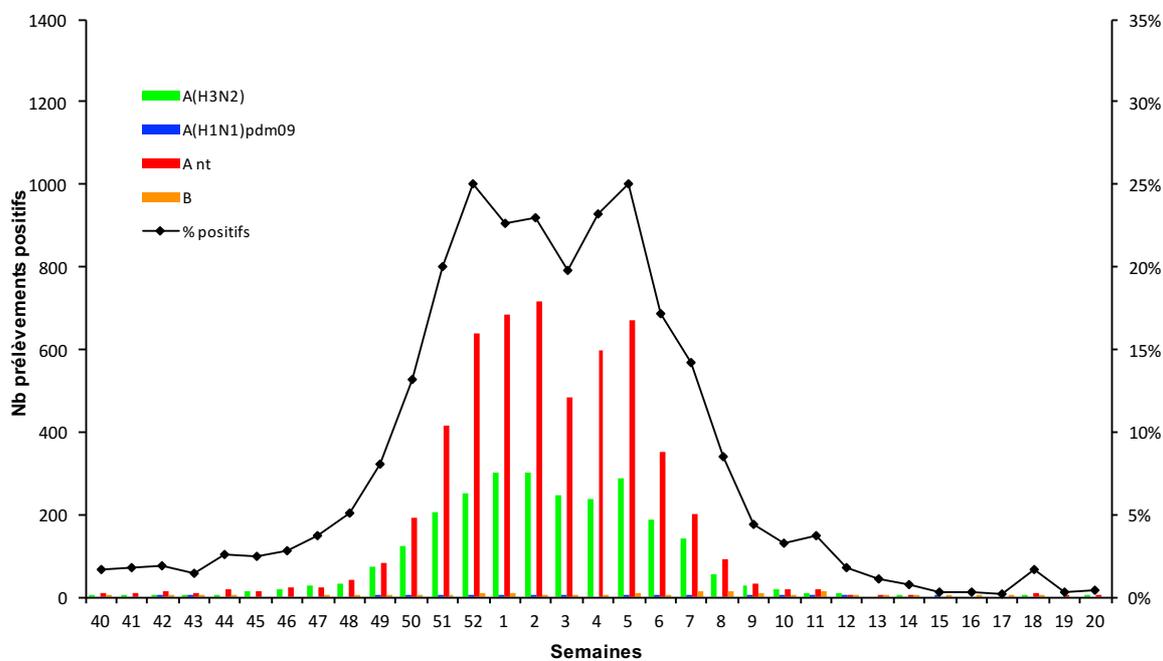


Figure 15 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Nord Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2016-2017

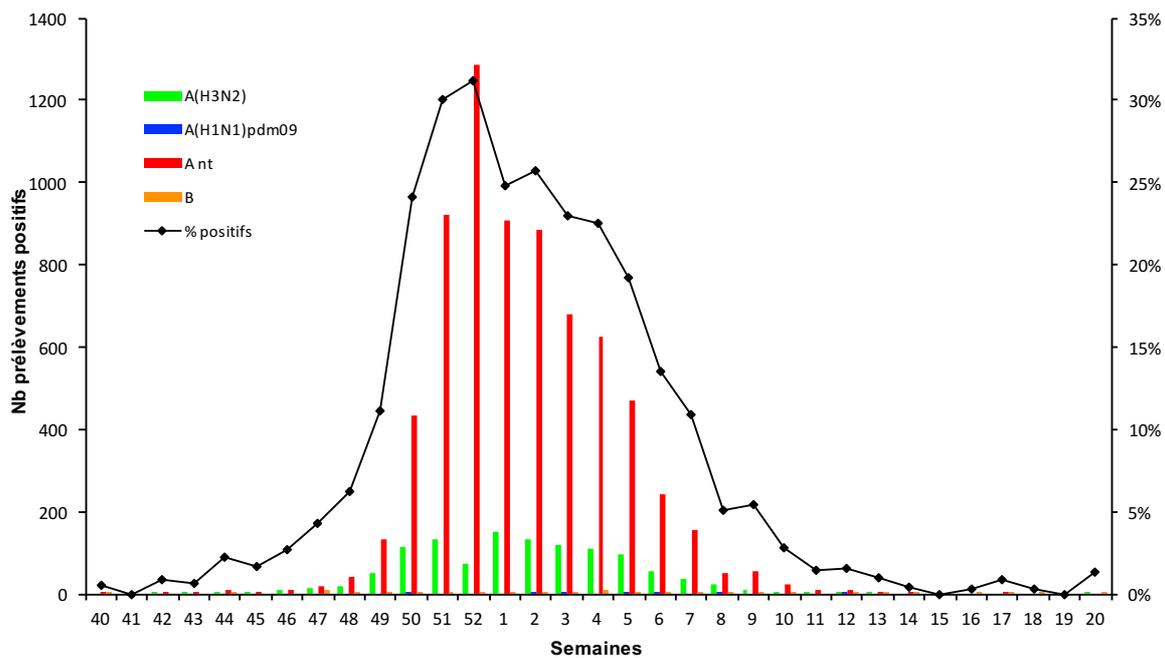


Figure 16 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Sud Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2016-2017

## ➤ **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 et de sérums de lapin hyperimmuns.

Les CNR-IPP et -HCL ont analysé par IHA un total de 286 virus grippaux parmi les virus isolés dans le cadre de la surveillance du réseau Sentinelles en population générale ou dans les armées ou isolées de prélèvements de patients hospitalisés ou de personnes âgées vivant en collectivité. Ces souches sont issues de prélèvements des différentes régions de France.

Ainsi au total, 261 virus grippaux de type A dont 19 virus A(H1N1)pdm09, 242 virus A(H3N2) et 25 virus de type B dont 17 de lignage B-Yamagata et 8 de lignage B-Victoria ont été caractérisés.

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

Au total, 19 isolats A(H1N1)pdm09 ont été caractérisés par IHA par les laboratoires du CNR. Les virus caractérisés ont varié cette saison et sont pour la majorité (95%) apparentés à la souche vaccinale du vaccin Hémisphère sud A/Michigan/45/2015. La composition vaccinale pour la saison 2017/2018 pour l'hémisphère nord a changé la valence A(H1N1)pdm09.

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

Cette saison, les virus A(H3N2) ont circulé majoritairement. 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. De plus cette saison les virus A(H3N2) avaient la propriété de ne pas agglutiner les globules rouges de cobaye, ce qui rendait la révélation de la culture délicate. Les virus (n=242) qui ont pu être caractérisés antigéniquement sont apparentés à la souche vaccinale A/Hong Kong/4801/2014, pour la moitié (n=123), certains sont plus proches de la souche vaccinale du vaccin de la saison dernière A/Switzerland/9715293/2013 (n=4) ou de la souche A/Hong Kong/5738/2014 (n=21) et certains présentent un profil d'inhibition faiblement réactif avec des titres faibles pour l'ensemble du panel de sérums testés (n=59).

Parmi les 1113 échantillons A(H3N2) inoculés, seuls 483 (43%) ont donné lieu à une multiplication virale, révélée par test d'hémagglutination. La réalisation de l'IHA en présence d'oseltamivir n'a été possible que pour 135 échantillons dont seulement 87 (17%) avaient un titre supérieur ou égal à 4.

### **Virus B**

Parmi les isolats de virus de type B, 25 ont été caractérisés par IHA par les laboratoires du CNR. Parmi les 17 virus du lignage B-Yamagata la majorité était analogue à la souche B/Phuket/3073/2013 (n=12) et les autres (n=5) étaient antigéniquement apparentés à la souche B/Massachusetts/02/2012. Tous les virus du lignage B-Victoria (n=8) étaient analogues à la souche vaccinale B/Brisbane/60/2008

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

Le séquençage haut débit du génome complet a été réalisé pour une sélection représentative des virus ayant circulé en France au cours de la saison 2016-2017. Le pyroséquençage est aussi une technique utilisable 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, 523 virus ont été séquencés sur 8 segments :

- 40 A(H1N1)pdm09
- 459 A(H3N2)
- 12 B-Yam
- 16 B-Vic

Les analyses phylogénétiques figurent en annexe 9.

Les virus A(H1N1)pdm09 appartiennent au clade 6B.1 caractérisé par les mutations S84N, S162N et I216T sur l'hémagglutinine (HA).

Tous les virus A(H3N2) analysés font partie du clade 3C.2a caractérisé par les mutations L3I, N128T, N145S, K160T, N225D et Q311H sur la HA. Un nouveau sous-clade a émergé cette saison, 3C.2a1, caractérisé par la mutation N171K sur la HA. La majorité (65%) des virus A(H3N2) analysés font partie de ce sous-clade.

Les virus de type B de lignage Yamagata analysés appartiennent toujours au clade 3.

Les virus de type B de lignage Victoria analysés appartiennent au groupe génétique 1A.

Ces données ont permis de contribuer à l'analyse de l'efficacité vaccinale par clade dans le cadre du projet iMove/iMove+.

Les séquences ont également été analysées afin d'identifier la présence de mutations associées à des phénotypes particuliers en prenant en compte également les mutations retrouvées pour les variants minoritaires (> 5 %) au sein de la population virale.

Comme indiqué plus haut (§2.2.3.1) seule la mutation H275Y associée à une forte diminution de la sensibilité à l'oseltamivir a été détectée pour un virus A(H1N1)pdm09 dans un cas.

En dehors des mutations associées à une diminution de sensibilité aux antiviraux, d'autres mutations ont été recherchées, notamment les substitutions du résidu D222 dans la HA des virus A(H1N1)pdm09 dont le polymorphisme peut être associé aux formes graves. Aucun virus porteur d'une mutation en position 222 sur l'hémagglutinine n'a été détecté.

Les virus A(H3N2) détectés parmi les cas sévères de grippe qui ont été séquencés (n = 106), n'ont pas révélé de mutation qui pourrait être liée aux formes graves.

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

Comme le montre le tableau 9, on remarque que la majorité des prélèvements ont été réalisés dans la tranche d'âge 15 à 64 ans (48,9%) alors que la classe d'âge des plus de 65 ans est peu représentée (7,4%). La classe d'âge 0 à 4 ans continue à être bien représentée cette année grâce à l'activité des pédiatres (26,3% contre 5,5% en 2014/2015).

Ce sont les sujets âgés de 5 à 14 ans qui ont été les plus touchés (62,2% de positivité pour la grippe) ainsi que les sujets de plus de 65 ans (61,5% de positivité).

## France métropolitaine

Age	Nb Prlvt	Nb Grippe +	% de + dans la tranche âge	% du groupe d'âge/ total	% + /total +
0-4	745	220	29,5	26,3	16,2
5-14	492	306	<b>62,2</b>	17,4	22,5
15-64	1385	704	50,8	<b>48,9</b>	51,8
≥65	208	128	<b>61,5</b>	7,4	9,5
Total	2830	1358		100	100

Tableau 9 : Distribution par âge des patients– Réseau Sentinelles  
Prélèvements réalisés dans le cadre du Réseau Sentinelles et trouvés positifs pour la grippe en France / Saison 2016-2017

D'après les données de la surveillance en médecine de ville les virus de grippe A(H3N2) ont circulé de façon quasi-exclusive dans toutes les classes d'âge.

Age	Nb Grippe +	Nb grippe A non sous-typé (%)	Nb grippe A H1pdm09 (%)	Nb grippe A/H3 (%)	Nb grippe B (%)	total
0-4	220	2 (0,9)	3 (1,4)	215 (97,7)	0 (0)	100
5-14	306	0 (0)	3 (1,0)	301 (98,4)	2 (0,6)	100
15-64	704	8 (1,1)	5 (0,7)	688 (97,7)	3 (0,4)	100
≥65	128	3 (2,3)	0 (0)	125 (97,6)	0 (0)	100
Total	1358	13 (0,9)	11 (0,8)	1329 (97,9)	5 (0,4)	100

Tableau 10 : Distribution par tranche d'âge et par (sous)-type viral - Réseau Sentinelles  
Prélèvements réalisés dans le cadre du Réseau Sentinelles et trouvés positifs pour la grippe en France / Saison 2016-2017

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

Lors de la saison 2016-2017, parmi les prélèvements de patients pour lesquels le statut vaccinal était connu (2808 sur 2830 pour France nord, soit 99,2 % des patients Sentinelles), 7,5% (212 sur 2808) seulement provenaient de patients vaccinés (supérieur au 4,5 % de patients vaccinés en 2015-2016, inférieur aux 8,6% de patients vaccinés en 2014-2015 et aux 11,7 % de vaccinés parmi les patients prélevés de la saison 2008-2009) (Tableau 11). Le pourcentage de détection de virus grippaux était de 50% parmi les vaccinés et de 48,1 % chez les non vaccinés, valeurs différentes des saisons précédentes (31,5 % parmi les vaccinés et 35,4 % chez les non vaccinés en 2013-14).

## France métropolitaine

Statut	Grippe +		Grippe -		Effectif	
	Nbre	(%)	Nbre	(%)	Nbre	(%)
Vaccinés	106	7,8	106	7,3	212	7,5
Non Vaccinés	1248	92,2	1348	92,7	2596	92,5
Total	1354		1454		2808	

Tableau 11 : Statut vaccinal - Distribution des virus grippaux détectés au CNR  
Réseau Sentinelles / saison 2016-2017

Parmi les personnes prélevées dans le cadre du réseau Sentinelles, le pourcentage de vaccinés est resté très faible dans les tranches d'âge inférieures à 65 ans (2,7 à 5,2%). 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 44,9%, valeur en baisse par rapport à la dernière saison (47,2% saison 2015-16) (Tableau 12).

Age (ans)	0-4	(%)	5-14	(%)	15-64	(%)	≥65	(%)
Vaccinés	23	3,1	13	2,7	72	5,2	84	44,9
Non Vaccinés	713	96,9	474	97,3	1306	94,8	103	55,1
<b>Total</b>	<b>736</b>		<b>487</b>		<b>1378</b>		<b>187</b>	

*Tableau 12 : Statut vaccinal - Distribution par tranche d'âge  
Nombre de prélèvements de patients testés au CNR - Réseau Sentinelles / saison 2016-2017*

**Remarque :** Les comparaisons avec les saisons précédentes sont à prendre avec beaucoup de prudence en raison du changement de la définition de cas suite au changement de réseau de surveillance communautaire depuis la saison 2014-15. De plus l'absence de pédiatres au cours de la saison 2014-15 est à considérer.

### 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, des rhino/enterovirus et des métapneumovirus (HMPV) qui sont également systématiquement recherchés dans les prélèvements provenant de la surveillance en médecine de ville du réseau Sentinelles.

#### ➤ VRS

Les circulations épidémiques du VRS et des virus grippaux n'ont pas été dissociées. Comme la saison dernière, le VRS a circulé de façon épidémique au cours des mois d'octobre à mars avec un retard d'environ une semaine pour la région sud (Figures 17 à 19). Sa circulation au cours de la saison a été moins intense que la saison dernière, dans les hôpitaux.

En population générale, bien que l'inclusion de pédiatres dans le réseau Sentinelles depuis la saison 2014-2015 permette de mieux évaluer l'incidence des VRS en médecine ambulatoire, celle-ci est vraisemblablement sous-estimée en raison de la définition de cas du réseau Sentinelles trop restrictive pour le VRS (fièvre supérieure à 39°C, myalgies et signes respiratoires).

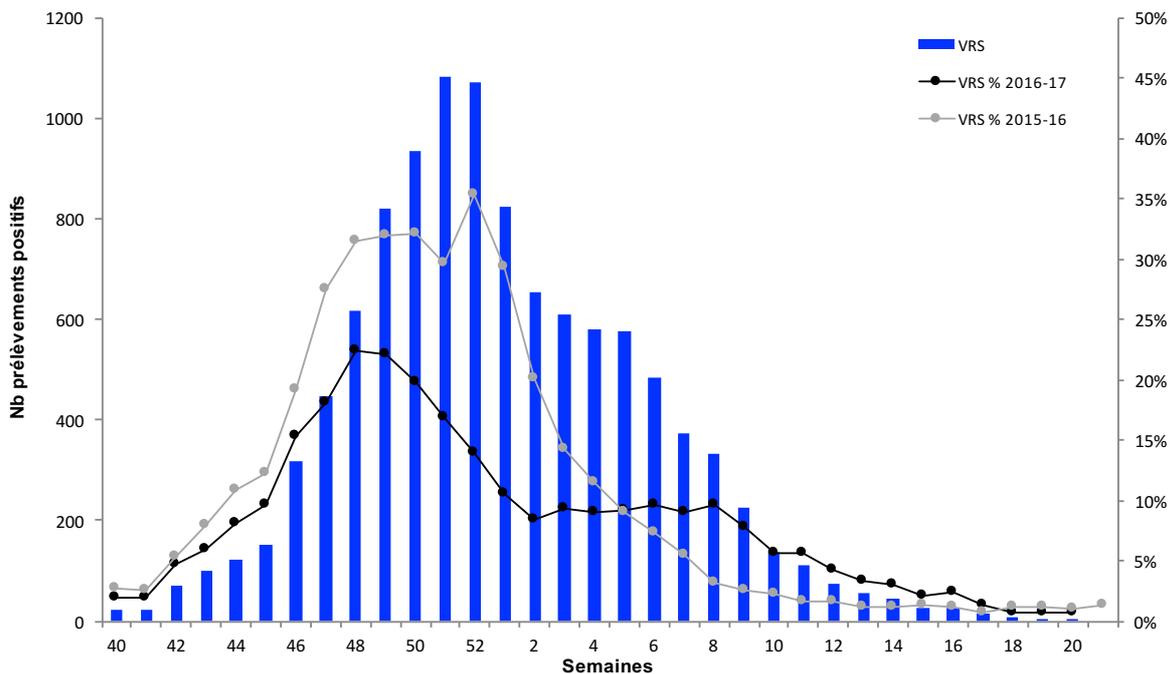


Figure 17 : Détection du VRS en France  
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2016-2017

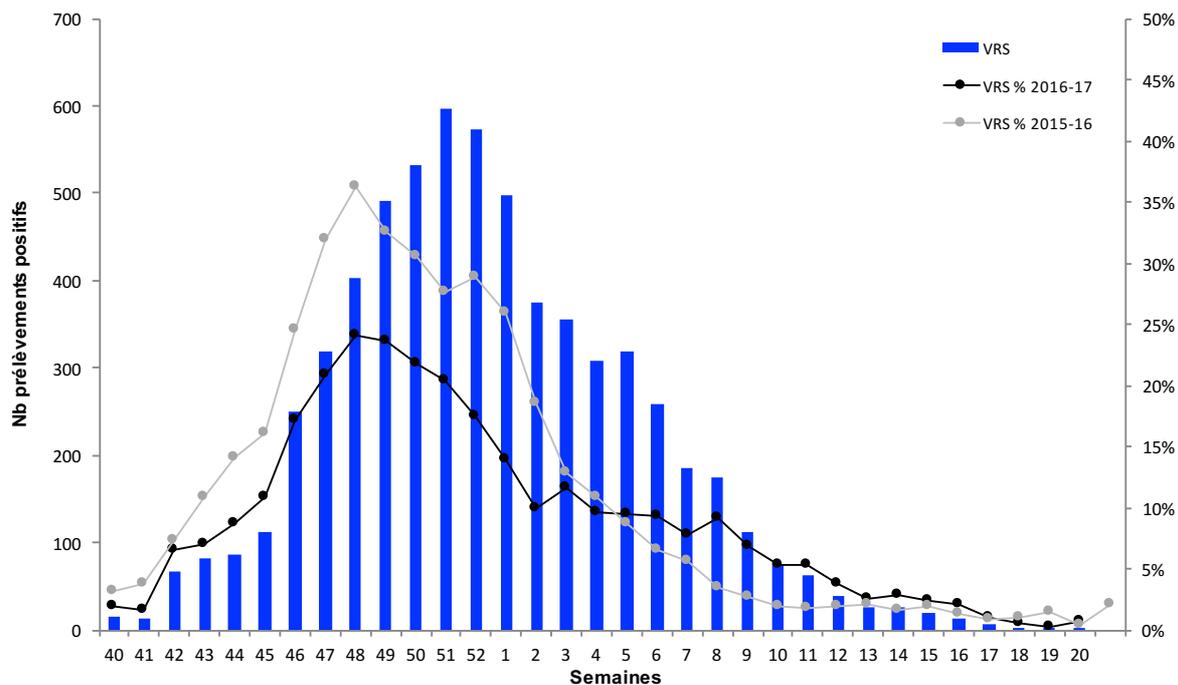


Figure 18: Détection du VRS en France-Nord  
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2016-2017

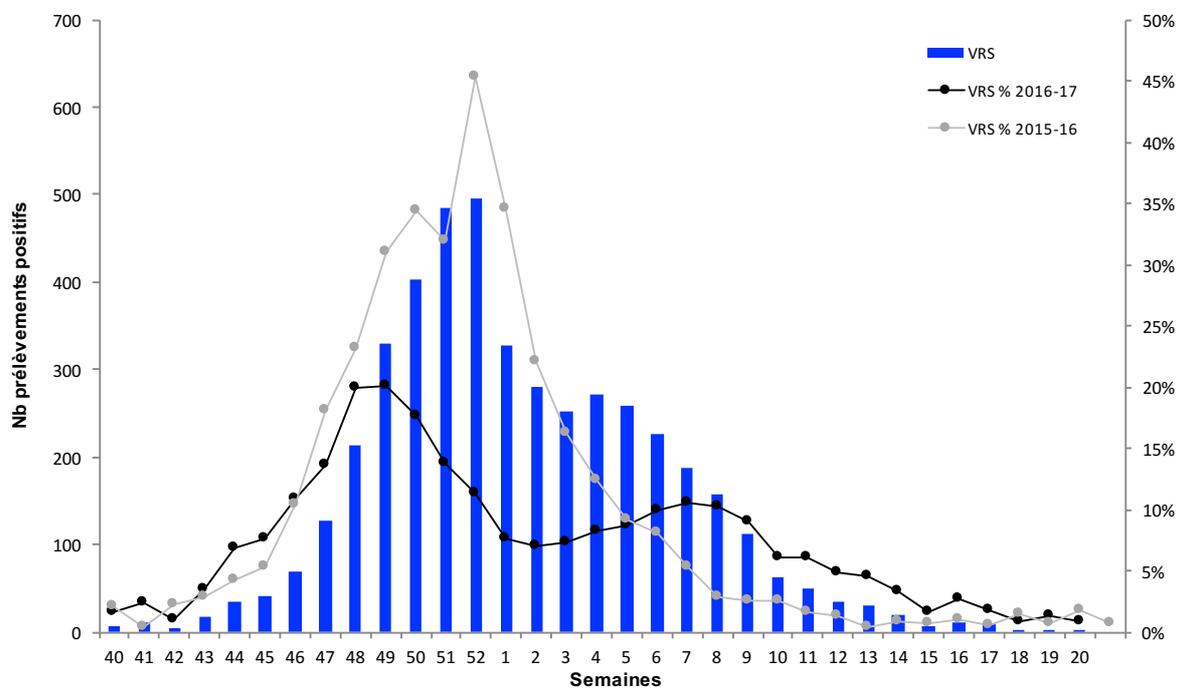


Figure 19: Détection du VRS en France-Sud  
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2016-2017

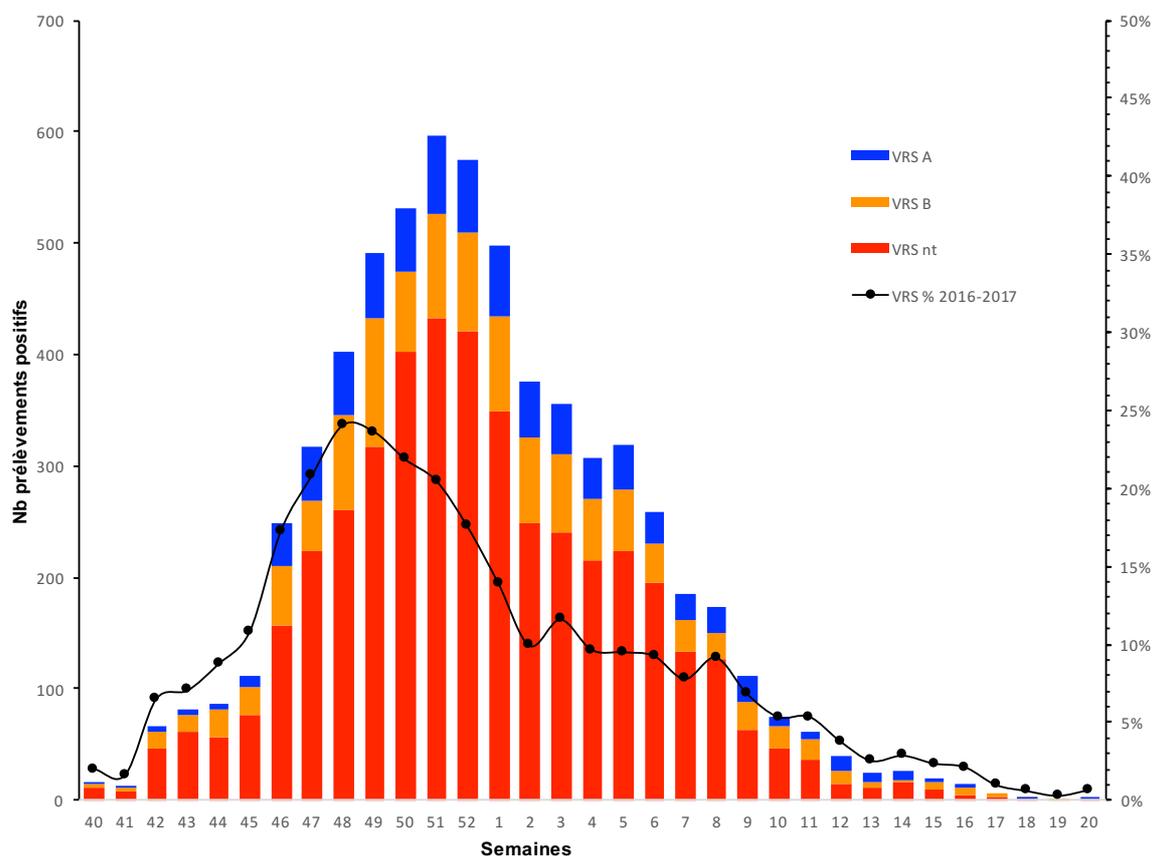


Figure 20 : Détection du VRS en France nord. Répartition VRS A, VRS B et VRS non typés. Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2016-2017

En population générale pour France nord, sur 1602 échantillons, 145 VRS ont été détectés, principalement parmi la classe d'âge 0-4 ans. La plupart des laboratoires hospitaliers n'effectuent pas la détermination de groupe : VRS A et VRS B, cependant pour ceux qui l'ont réalisée, on observe la même proportion de VRS A que de VRS B (figure 20).

Age	VRS A	VRS B	Nb VRS +	%
0-4	51	43	94	65
5-14	9	7	16	11
15-64	19	13	32	22
≥65	1	2	3	2
<b>Total</b>	<b>80</b>	<b>65</b>	<b>145</b>	<b>100</b>

Tableau 13 : Répartition des VRS en fonction de l'âge. France nord Réseau Sentinelles / saison 2016-2017

### ➤ Rhinovirus humains

Les rhinovirus ont été détectés de façon quasiment continue tout au long de la saison 2016-2017. Leur circulation a commencé à diminuer légèrement lors de l'épidémie de VRS (S43/2016-S12/2017) et ils se sont maintenus à un taux faible tout au long de l'épidémie de grippe (S49/2016-S9/2017) et leur circulation a de nouveau augmenté à partir de la semaine S10/2017 jusqu'à la semaine S15/2017 pour se maintenir à un niveau élevé (environ 25% de détections positives) les semaines suivantes (Figures 21 à 23).

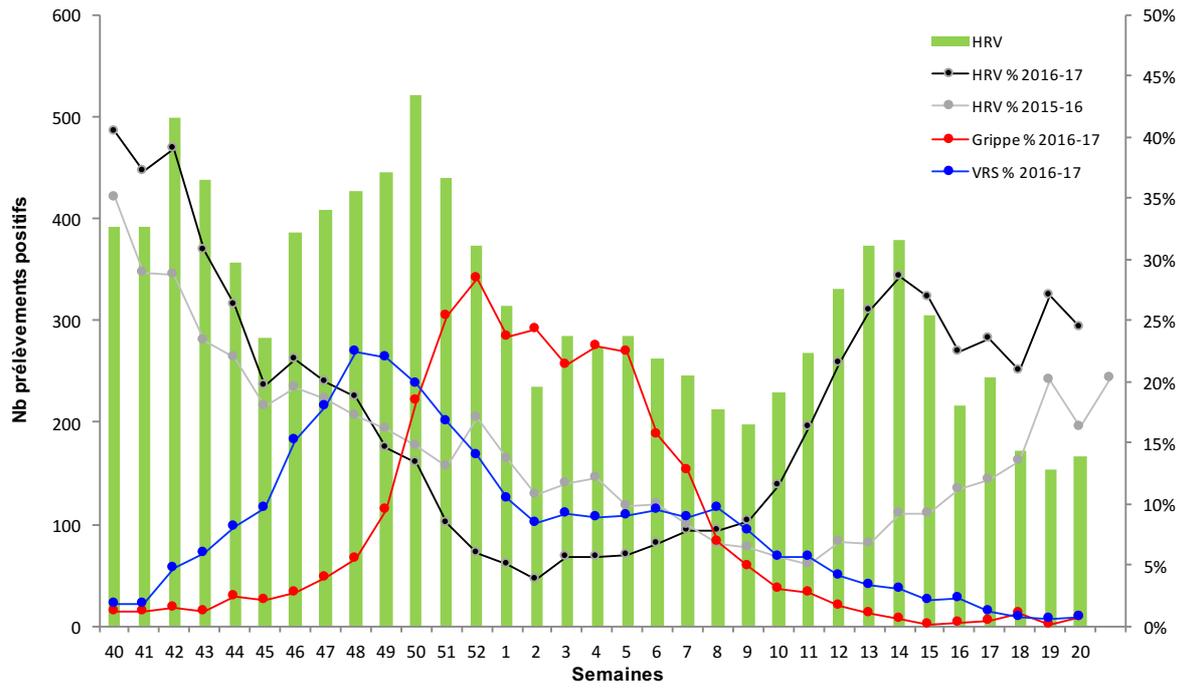


Figure 21: Détection des rhinovirus humains en France  
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2016-2017

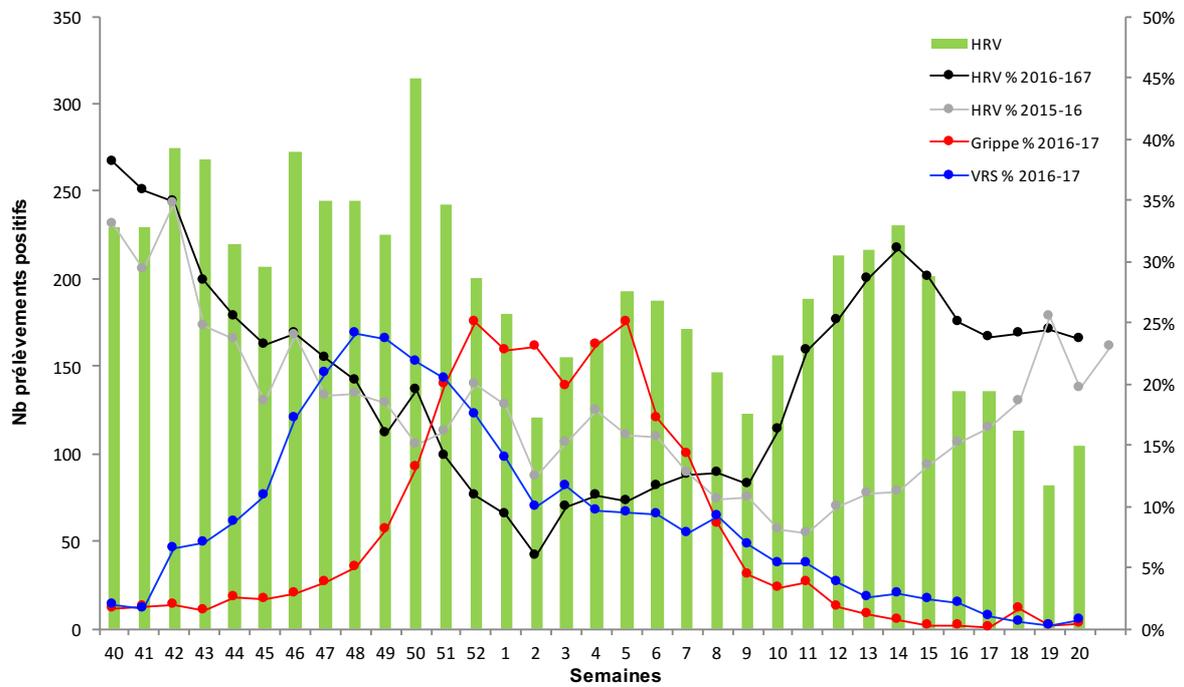


Figure 22: Détection des rhinovirus humains en France-Nord  
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2016-2017

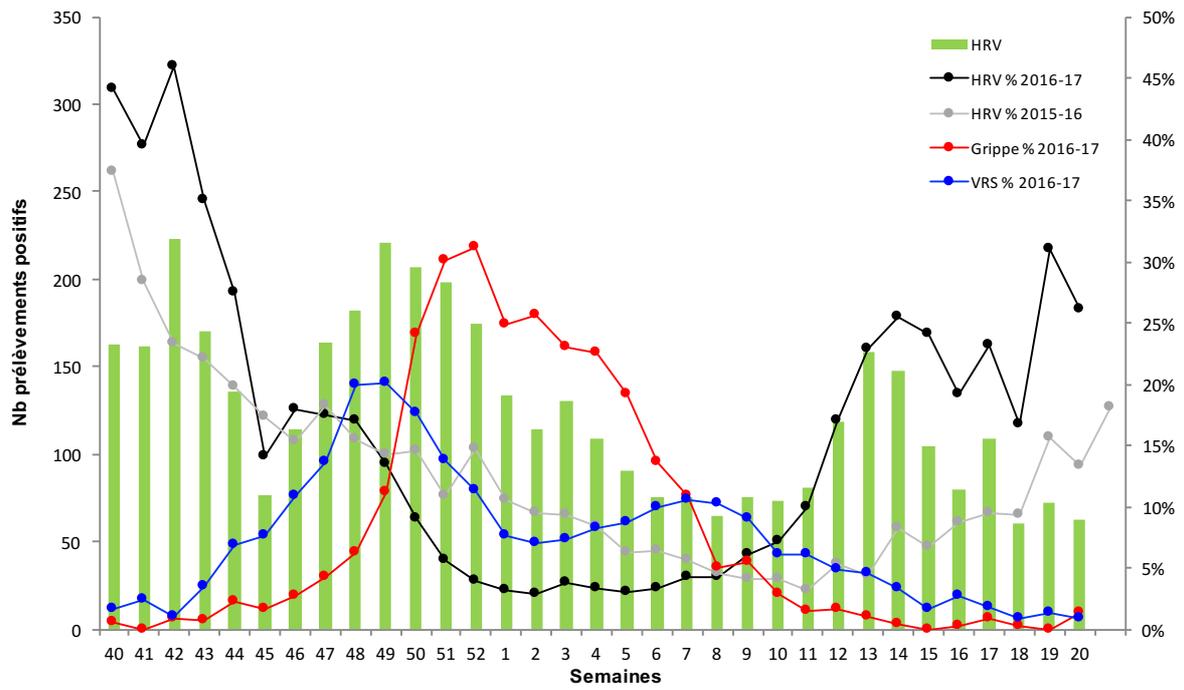


Figure 23: Détection des rhinovirus humains en France-Sud Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2016-2017

## ➤ Adénovirus

Les adénovirus ont été détectés/isolés de façon continue tout au long de la saison 2016-2017 avec une circulation globalement faible et un pourcentage de prélèvements positifs toujours inférieur à 5% (Figure 24).

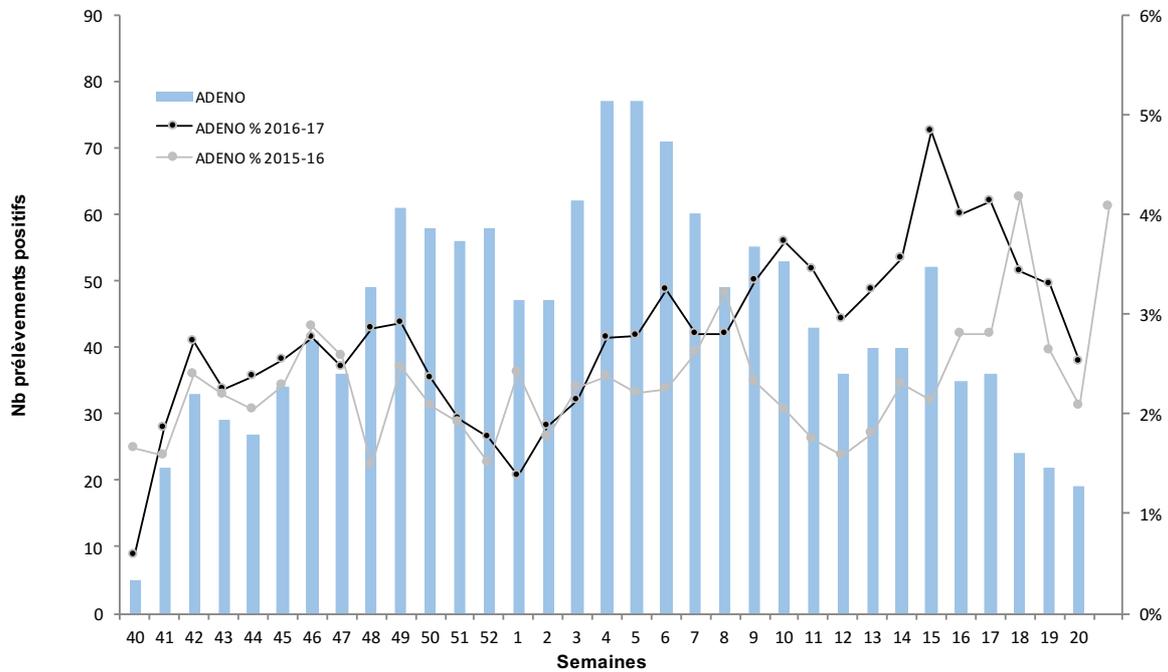


Figure 24: Détection des adénovirus en France Réseau RENAL / saison 2016-2017

➤ **Virus parainfluenza**

Les virus parainfluenza ont été détectés à un niveau faible tout au long de la saison 2016-2017, inférieur à 7% (Figure 25).

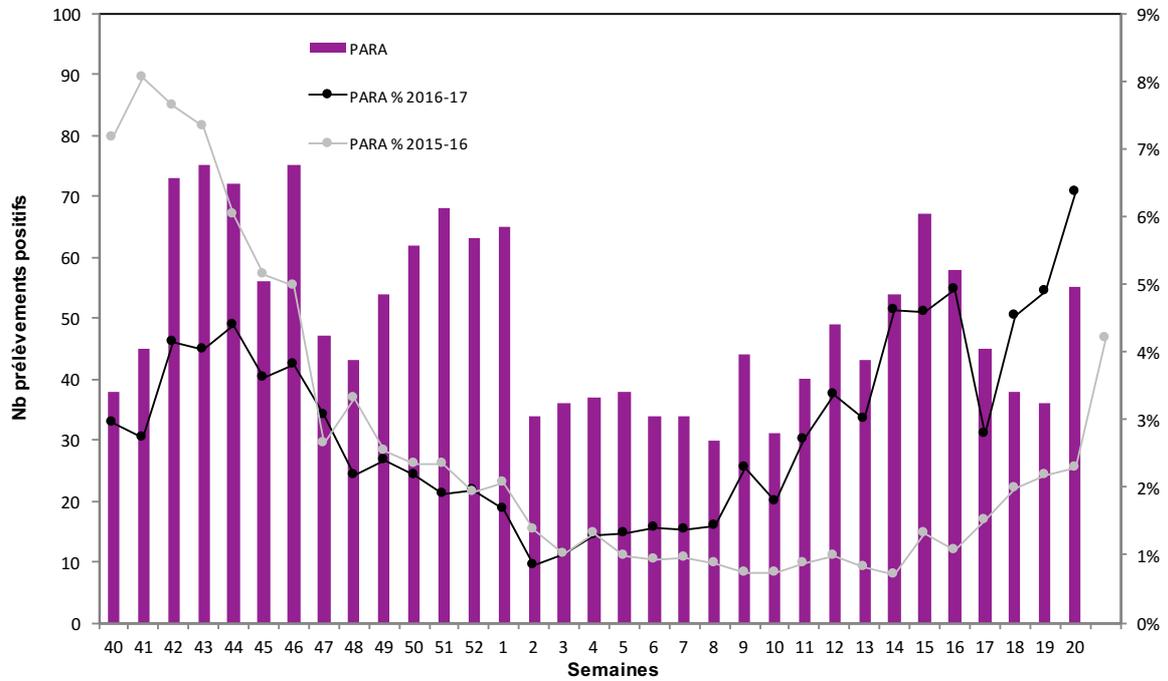


Figure 25: Détection des virus parainfluenza en France Réseaux RENAL / saison 2016-2017

➤ **Métapneumovirus humains**

Comme la saison dernière, la circulation des métapneumovirus humains a augmenté de façon continue tout au long de l'hiver 2016-2017 avec des pourcentages de détections positives faibles (<5%) comme pour la saison 2015-2016 (Figure 26).

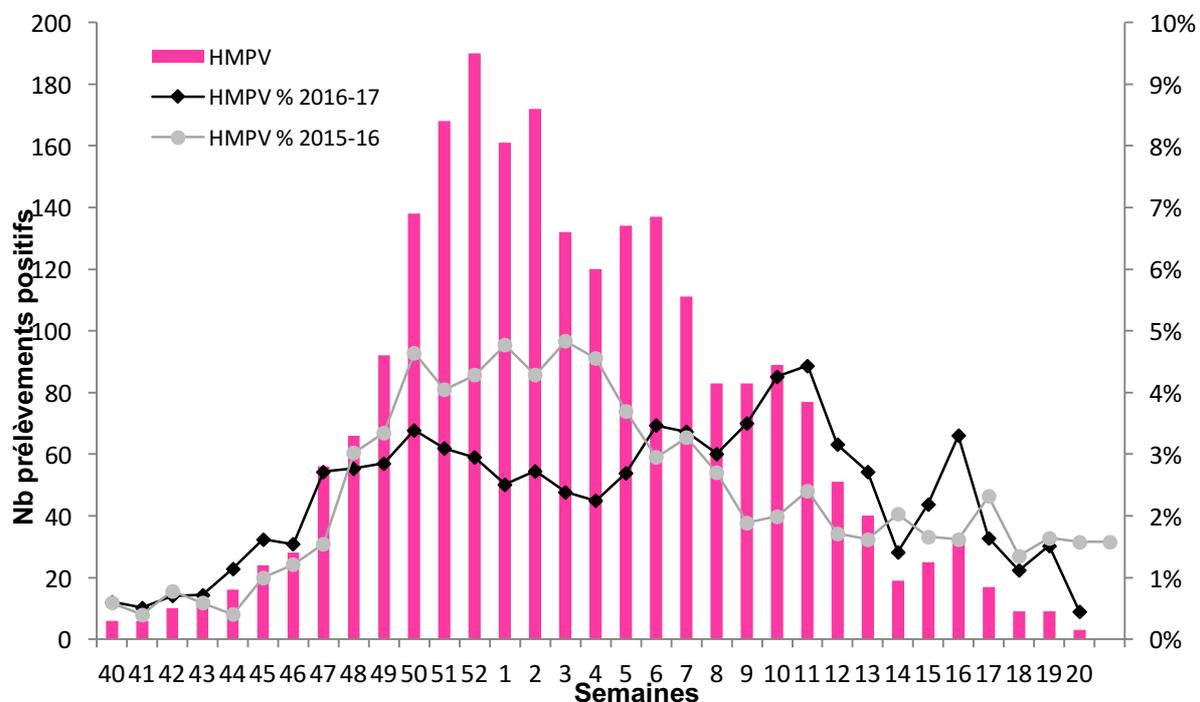


Figure 26: Détection des métapneumovirus humains en France Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2016-2017

Dans la population générale en France nord, les métapneumovirus ont représenté 5,5% (89 sur 1602 échantillons) des détections positives. Ils sont principalement retrouvés dans la classe d'âge 0-4 ans et 15-64 ans.

Age	hMPV	%
0-4	44	49
5-14	9	10
15-64	29	32
≥65	7	8
<b>Total</b>	<b>89</b>	<b>100</b>

Tableau 14 : Répartition des métapneumovirus en fonction de l'âge. France nord Réseau Sentinelles / saison 2016-2017

### **3.1.1.6 Contribution à la surveillance nationale en interface avec SpF**

Pendant la période de surveillance active, les données de la surveillance virologique issue des réseaux Sentinelles et RENAL pour la région Nord et la région Sud sont compilées par le Centre coordonnateur du CNR (CNR-IPP) et transmises de façon hebdomadaire à Santé Publique France. Ces données sont ainsi mises en commun avec les données de surveillance du réseau Sentinelles et les données collectées par SpF (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 SpF 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 Cires Antilles et Guyane et les réseaux sentinelle Grippe de Guyane, Martinique et Guadeloupe. En Guyane, le réseau sentinelle est constitué de 18 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, Macouria, 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 annuelle, 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 d'au moins un signe respiratoire » et évoluant depuis moins de 48H.

La surveillance de la grippe repose également sur une surveillance hospitalière en collaboration avec les laboratoires des hôpitaux de Guyane et des CHU des Antilles. Enfin, des laboratoires d'analyses de biologie médicale (LABM) privés, dont le LABM de l'Institut Pasteur de la Guyane ou encore des Centres Délocalisés de Prévention et de Soins (CDPS) participent à cette surveillance.

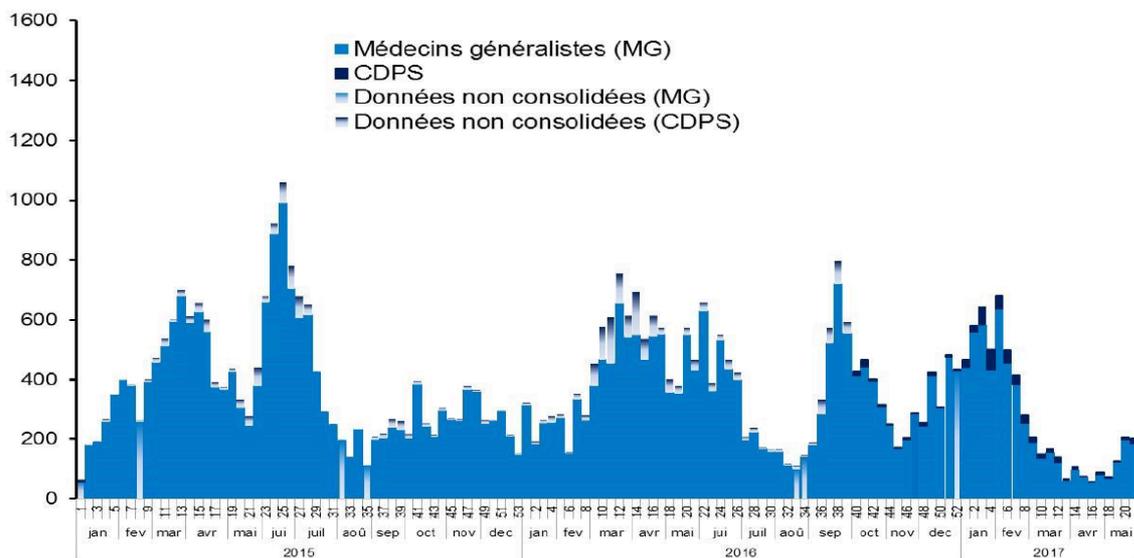
#### ➤ Résultats de la surveillance

#### ***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 s'est présentée sous la forme d'une épidémie bimodale qui a commencé beaucoup plus précocement qu'à l'accoutumée et a duré 23 semaines entre septembre 2016 (S37/2016) et février 2017 (S07/2017). Un premier pic épidémique a été atteint en septembre 2016 (S38/2016) avec 800 cas estimés et un second en février 2017 (S05/2017) avec 680 cas estimés. Un total de 10180 consultations pour ce syndrome a été estimé sur l'ensemble du territoire au cours de l'épidémie (source Cire Guyane). Elle est restée d'ampleur modérée, avec toutefois 4 cas sévères, tous liés à une infection par un virus de type A, parmi lesquels 3 ont été typés par le CNR IPG (H3N2). Aucun décès n'a été recensé.

Au décours de l'épidémie néanmoins, un décès, lié à une infection par un virus B lignage Yamagata, est à déplorer chez une patiente de 38 ans sans comorbidité avérée.

Aux Antilles, l'épidémie 2016-2017 a duré respectivement 16 et 12 semaines : de la semaine 41 (S41/2016) à la semaine 5 (S5/2107) en Guadeloupe et de la semaine 3 (S3/2016) à la semaine 6 (S6/2107) en Martinique. Les épidémies sont restées d'ampleur modérée dans ces deux départements, avec respectivement 8 et 3 cas graves hospitalisés en réanimation en Guadeloupe et en Martinique, majoritairement liés à des infections par des virus A(H3N2).



\* L'estimation du nombre de syndromes grippaux est la somme du nombre de consultations enregistrées pour ce motif par les Centres délocalisés de prévention et de soins (CDPS) et de l'estimation du nombre de personnes ayant consulté un médecin généraliste pour ce motif (l'estimation est réalisée à partir des données recueillies par le réseau des médecins sentinelles).

\*\* La surveillance dans les CDPS concerne les cas de syndrome grippal et de bronchiolite.

Figure 27: Estimation du nombre hebdomadaire de consultations pour syndrome grippal Médecins généralistes de Guyane ou CDPS – janvier 2015 à mai 2017 (Source Cire Guyane)

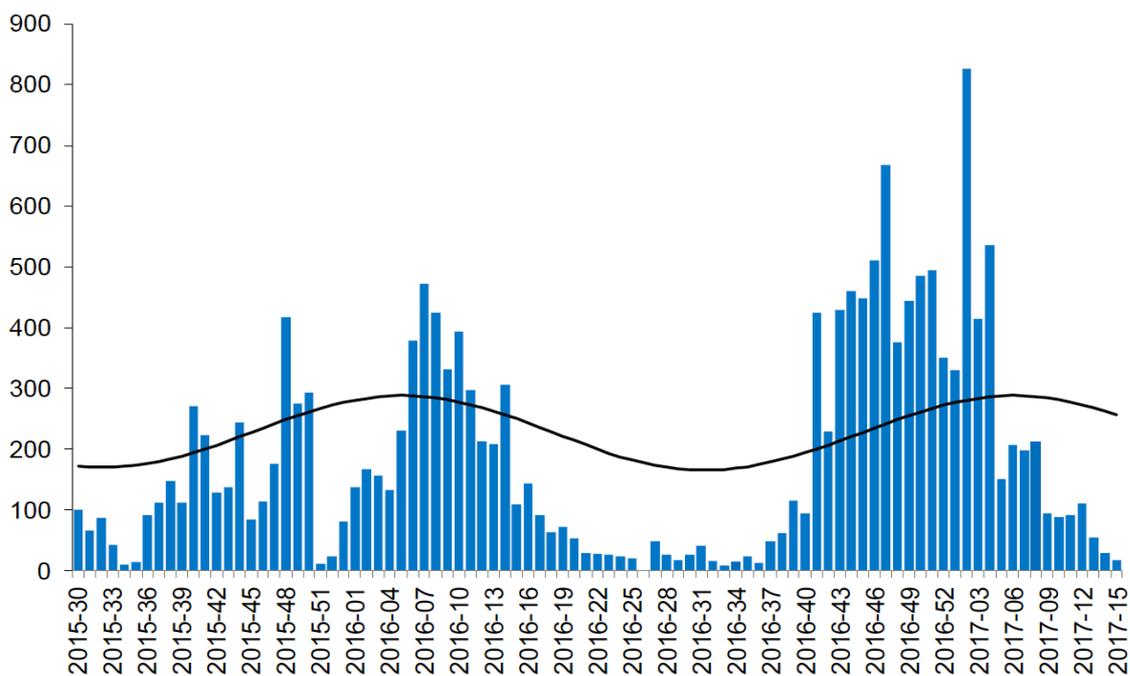


Figure 28: Estimation du nombre hebdomadaire de consultations pour syndrome grippal Médecins généralistes de Guadeloupe – juillet 2015 à avril 2017 (Source Cire Antilles)

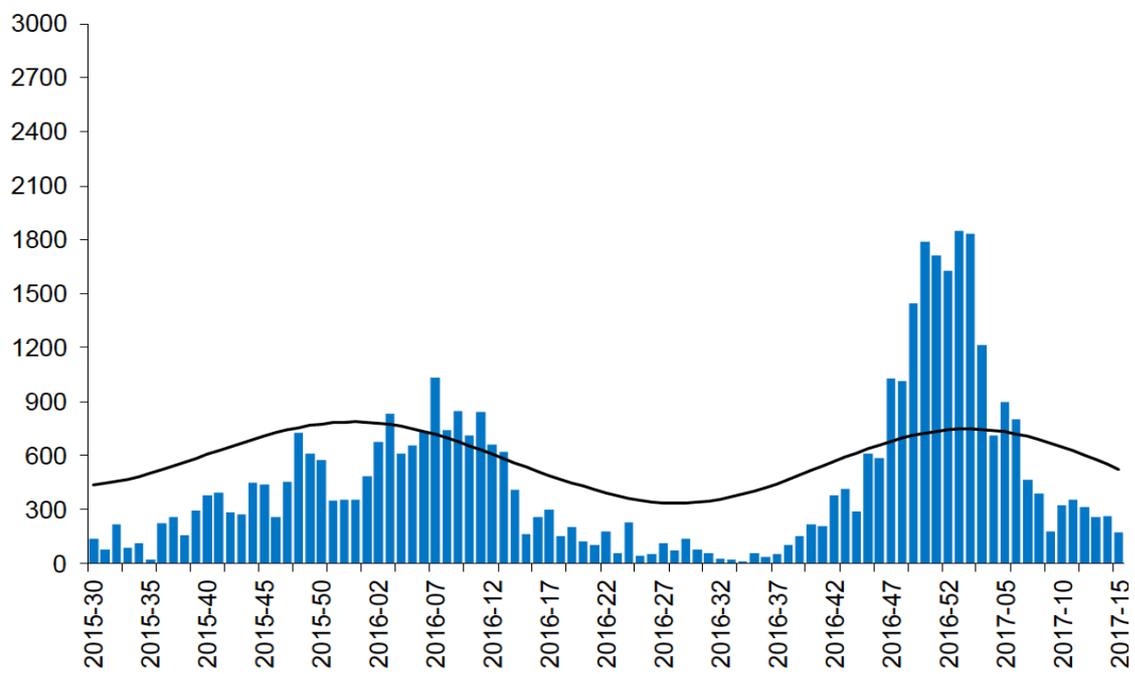


Figure 29 : Estimation du nombre hebdomadaire de consultations pour syndrome grippal Médecins généralistes de Martinique – juillet 2015 à avril 2017 (Source Cire Antilles)

## 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-IPG, la saison 2016-2017 a été marquée par une circulation virale inhabituelle : après une circulation pendant la saison 2015-2016 qui s'était prolongée sur l'ensemble du premier semestre 2016, une reprise de circulation épidémique a été observée, en Guyane, dès septembre 2016 et s'est poursuivie au cours du premier trimestre 2017 (Figures 30 à 32)

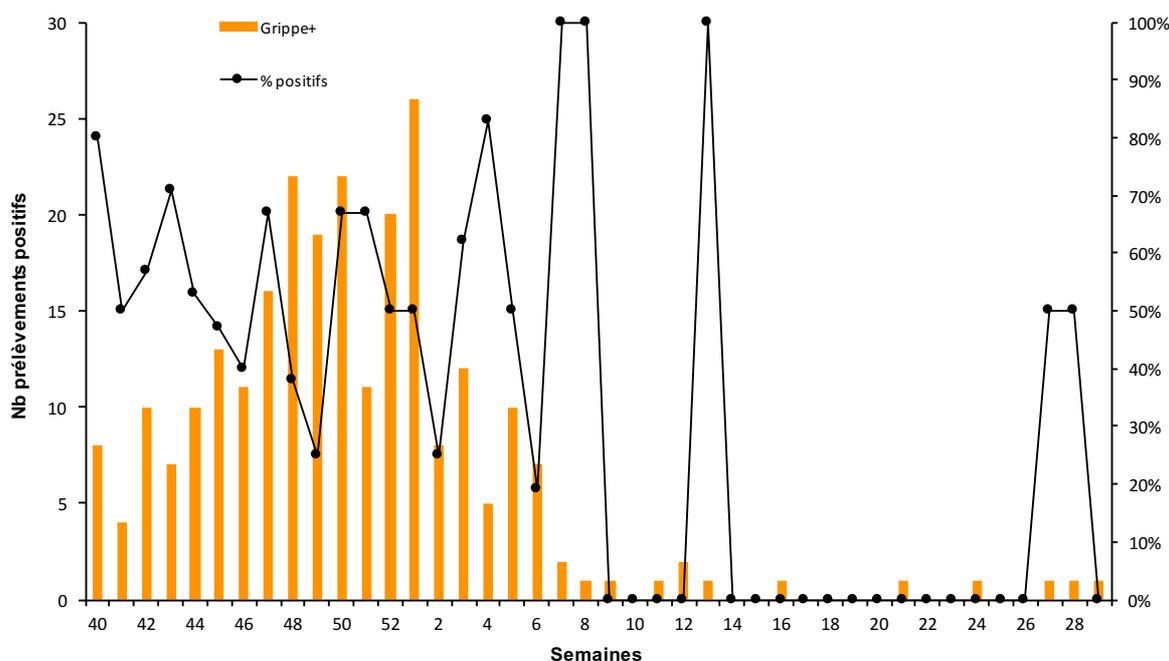


Figure 30: Détection des virus grippaux en région Antilles Guyane CNR-IPG / saison 2016-2017

Le nombre de prélèvements reçus au CNR-IPG en provenance de Guyane pour la saison 2016-2017 est en augmentation par rapport à la saison précédente notamment du fait d'une augmentation des prélèvements hospitaliers. L'augmentation des prélèvements hospitaliers d'origine pédiatrique est notamment à l'origine d'une hausse du nombre de détections de VRS et cela sur l'ensemble de la période.

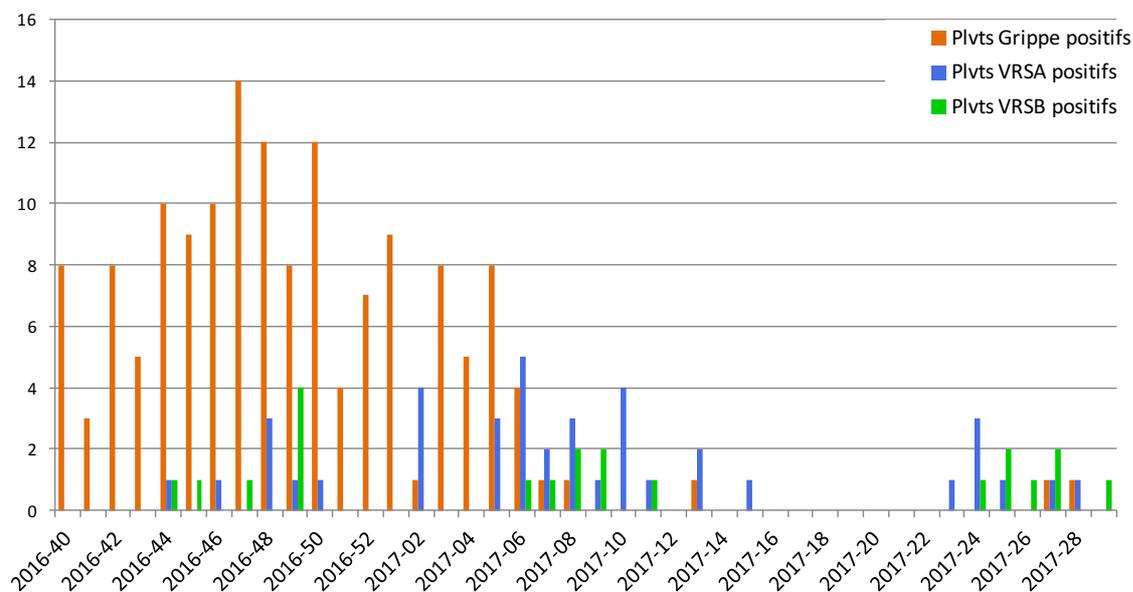


Figure 31 : Détection des virus grippaux et VRS en Guyane - CNR-IPG / saison 2016-2017 (semaines S40/2016 à S30/2017)

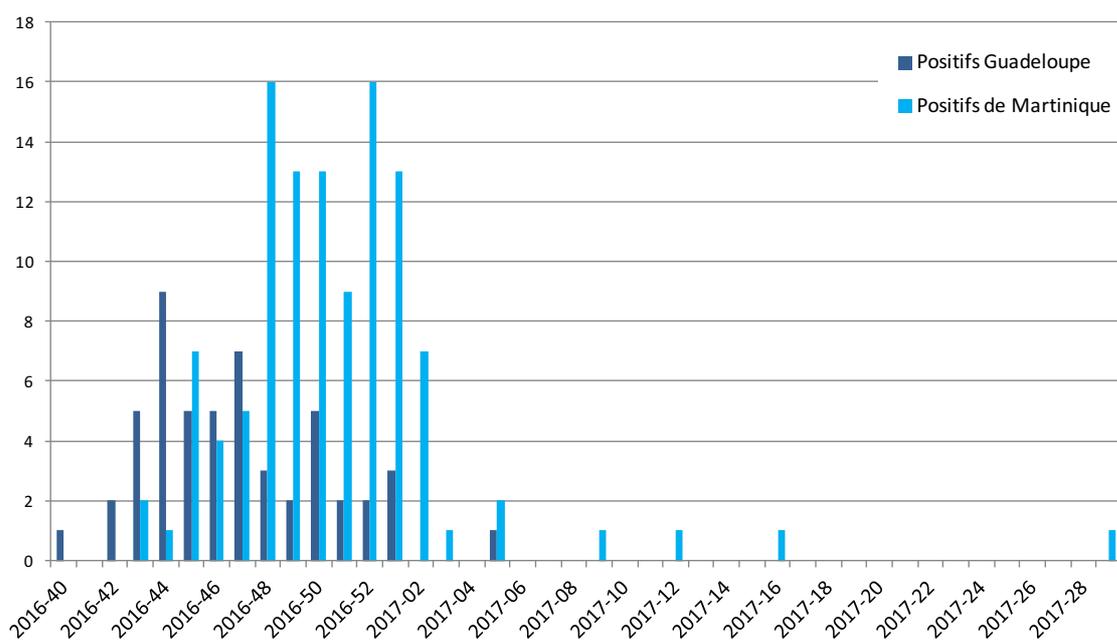


Figure 32 : Détection des virus grippaux aux Antilles (Martinique + Guadeloupe) CNR-IPG / saison 2016-2017 (semaines S40/2016 à S30/2017)

➤ **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 pour les Antilles ont été marquées par une circulation très majoritaire de virus grippaux A(H3N2) avec 96.7% en Guyane et 98.2% aux Antilles des virus détectés correspondant à des virus A(H3N2) (Figures 33 à 35). De rares virus B, de lignage B Victoria et B Yamagata ont également été détectés, notamment en fin de saison.

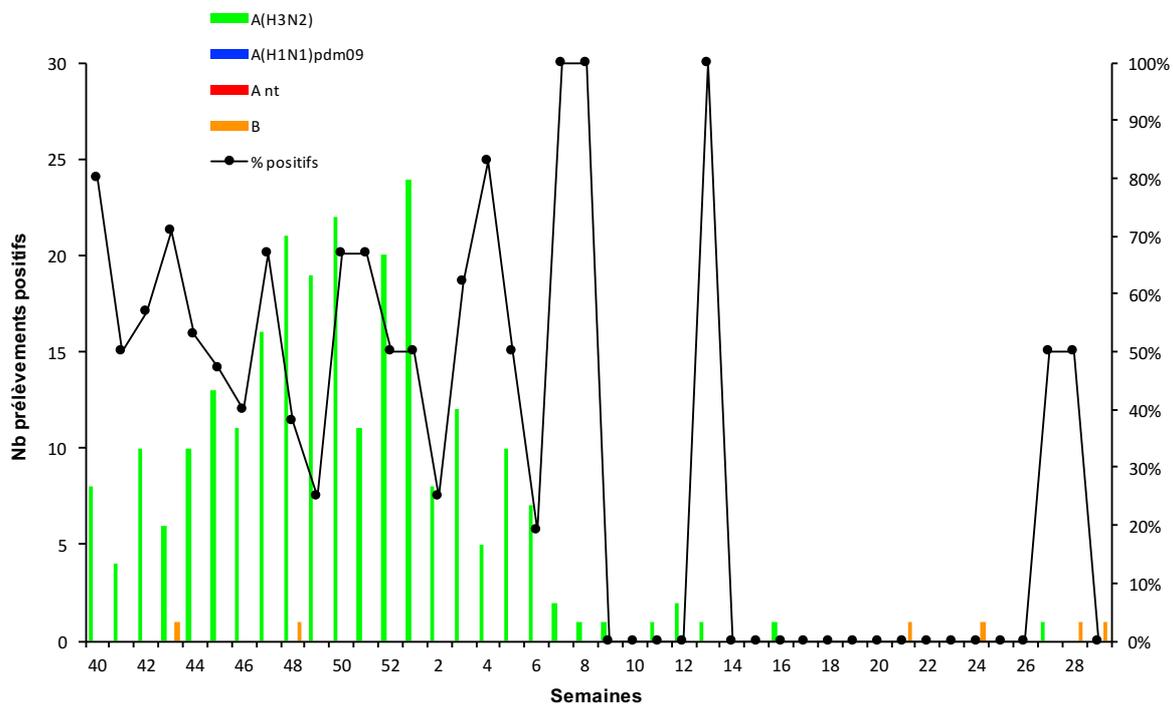


Figure 33 : Répartition des virus grippaux détectés en région Antilles-Guyane CNR-IPG / saison 2016-2017

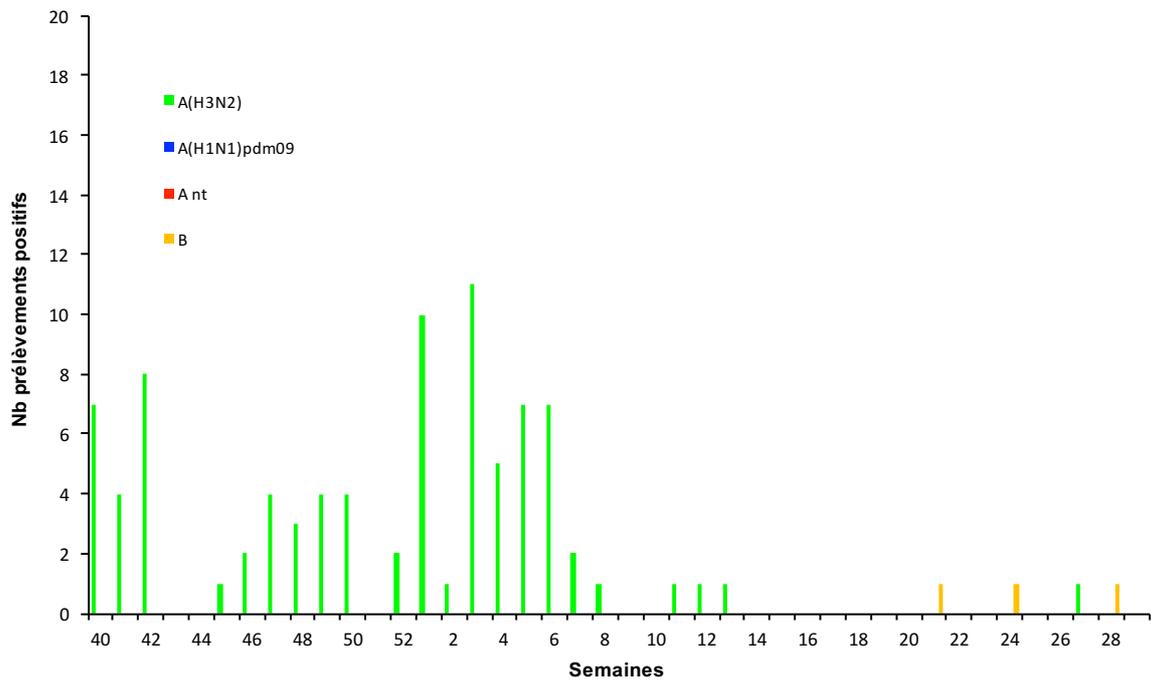


Figure 34: Répartition des virus grippaux détectés en Guyane  
CNR-IPG / saison 2016-2017

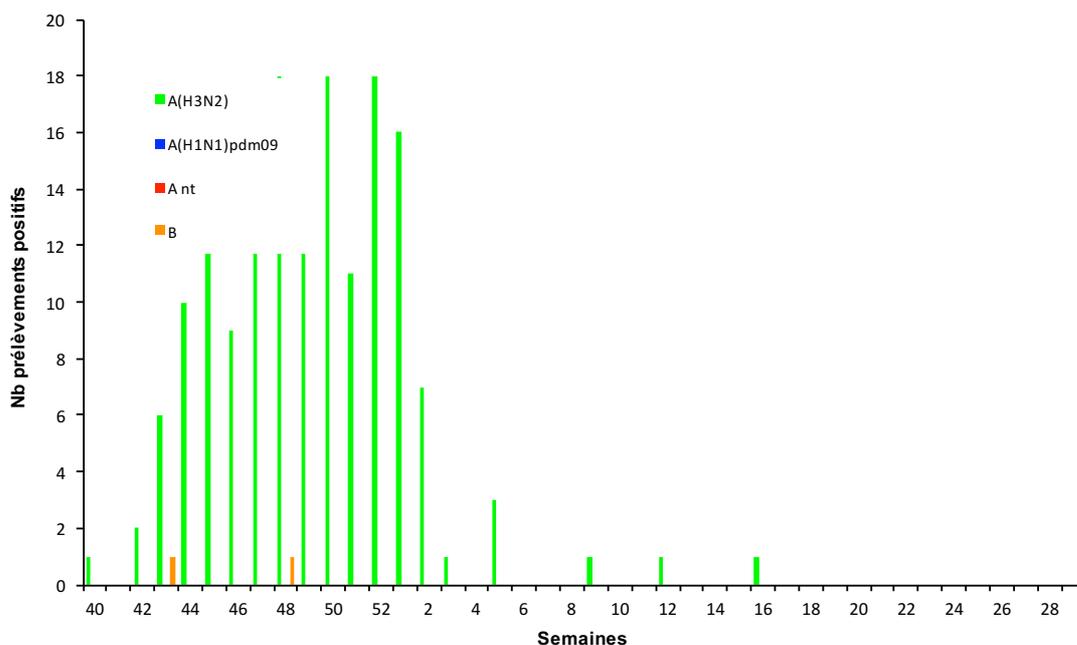


Figure 35 : Répartition des virus grippaux détectés aux Antilles (Martinique et Guadeloupe) CNR-IPG / saison 2016-2017

Parmi les 23 virus sélectionnés et envoyés au CDC en janvier 2017, (22 virus A(H3N2) et 1 virus B Victoria), 15 ont pu être caractérisés antigéniquement. Ils se sont avérés être majoritairement proches des souches présentes dans le vaccin hémisphère nord 2016-2017 : les virus A(H3N2) caractérisés (n=13) étaient tous proches de A/Hong Kong/4801/2014, et le virus B Victoria était proche de B/Brisbane/60/2008. Seul un A(H3N2) a été trouvé antigéniquement variant par rapport à la souche vaccinale A/Hong Kong/4801/2014.

Le séquençage de 22 de ces virus (21 A(H3N2) et 1 B Victoria) a été réalisé sur l'ensemble des segments et mis à disposition sur la base de séquences GISAID. Les virus A(H3N2) séquencés appartiennent majoritairement (95%) au sous groupe 3C.2a1.

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 comme les saisons précédentes la majorité des patients prélevés (64%) tandis que le pourcentage de positivité pour la grippe le plus élevé (72.2%) est observé pour les 5-14 ans (Tableau 15).

Age	Nb prlv	Nb grippe+	% de + dans la tranche âge	% du groupe d'âge/total	% de + /total de +
0-4	21	6	28,6%	8,4%	4,2%
5-14	36	26	<b>72,2%</b>	14,3%	18,2%
15-64	160	92	<b>57,5%</b>	63,7%	64,3%
≥65	34	19	<b>55,9%</b>	13,5%	13,3%
<b>Total</b>	<b>251</b>	<b>143</b>	<b>57,0%</b>	<b>100,0%</b>	<b>100,0%</b>

Tableau 15 : Distribution par âge des patients – Région Antilles Guyane Surveillance sentinelle / 2016-2017

Dans le cadre de la surveillance sentinelle, seuls des virus A(H3N2) ont été détectés. Les quelques virus de type B détectés l'ont tous été dans le cadre de la surveillance hospitalière.

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

Nb patients	Nb plvts positifs	Provenance	Contexte	Virus détectés
1	1	Bordeaux		A(H3N2)
3	2	Nerac	Août 2016 EHPAD	Adenovirus
8	7	Puymarol		6 A(H3N2), 1 A
4	4	La Pacaudière	Mai 2017, EHPAD	Coronavirus humains
28	11	Lyon		A(H3N2)
2	2	Marignier		A(H3N2)
4	3	St Galmier	Mai 2017, EHPAD	2 VRS, 1 coronavirus
1	1	St Romain en Gal	Juillet 2016, Ecole	picornavirus
5	3	Valence	Janvier 2017, EHPAD	1 rhinovirus, 2 hMPV
3	3	Alsace	Maison d'accueil spécialisée	A(H3N2)
5	3	Alsace	EHPAD	A(H3N2)
6	6	Paris	Service d'hématologie	A(H1N1)pdm09

Tableau 16 : Bilan des cas groupés analysés par le CNR-IPP et -HCL

Le CNR-IPG n'a pas été saisi cette saison pour l'investigation de cas groupés ou de phénomènes anormaux.

Le CNR-IPP et -HCL ont été sollicités pour l'investigation de cas d'infections respiratoires dans des EHPAD ou autres services hospitaliers.

#### **Maison d'accueil spécialisée – Alsace**

En décembre, dans un contexte d'épidémie, 3 échantillons reçus. Test rapide positif en grippe A confirmé par la détection de grippe A(H3N2).

#### **EHPAD –Alsace**

En janvier et février, 2 épisodes dans des EHPAD, 5 échantillons reçus, détection de 3 gripes A(H3N2).

#### **Service d'hématologie – Ile de France**

Transmission nosocomiale de grippe A(H1N1)pdm09 en mai, 6 patients infectés dont un médecin.

### 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, pour 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<sub>50</sub> par rapport aux valeurs d'IC<sub>50</sub> 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 2016-2017 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 dans 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.

L'OMS a accès aux données des CNR-IPP, -HCL et -IPG, par l'intermédiaire du fichier TESSy. 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.

### **3.4.3 Contrôle de Qualité**

#### Virus Influenza

Comme tous les ans, les laboratoires du CNR ont participé au contrôle qualité externe "WHO External Quality Assessment Programme for the Detection of Influenza Virus Type A by PCR" (EQAP) organisé par l'OMS depuis 2007. Au cours de la saison 2016-2017, nous avons reçu un panel en avril 2017 (EQAP panel 16) de 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. Ce panel comportait 10 échantillons d'ARN extraits correspondant à 4 virus influenza H5, un H1pdm09, un H3, un H7, 2 B et un échantillon négatif.

Les CNR-IPP et -HCL ont pu sous-typer correctement tous les virus.

Le CNR-IPG n'a pas pu participer cette saison 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. En effet, le CNR-IPG n'a pas pu obtenir les autorisations nécessaires pour l'importation de ce contrôle contenant des MOT (A(H5N1)).

#### Virus MERS-CoV

Les 3 laboratoires du CNR n'ont pas reçu durant la saison 2016/17 de contrôle de qualité pour la détection du MERS-CoV.

## **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 2015-2016.

## 4 Alerte

En cas de détection de phénomène anormal en métropole, les CNR-IPP et –HCL éventuellement en collaboration avec la coordination nationale du réseau Sentinelles adressent une note de synthèse à SpF et la DGS. Pour la région Antilles-Guyane, le CNR-IPG alerte les CIRE et ARS concernées.

Au cours de la saison grippale 2016-2017 une note de synthèse a été diffusée le 15 septembre 2016 pour signaler des premières détections de virus grippaux de type A(H3N2). De plus le CNR a régulièrement fourni à SpF tout au long de la saison des informations concernant les caractéristiques antigéniques des virus grippaux de sous-type A(H3N2) responsables de l'épidémie cette saison.

## 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 2016-2017:

#### Université Paris Diderot, Paris 7

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

Cours 8h : Caractéristiques et variabilité du monde viral; Infection virale-Généralités ; Quelques exemples de réussites virales.

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

Cours 22 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 ; Table Ronde 2h : Zoonoses et Emergences

*UE Virologie Fondamentale – responsable de l'UE*

Cours 2h : Les virus de l'Influenza ; Table Ronde 2h : Virus émergents et nouvelles stratégies antivirales

*UE Séminaires bibliographiques : audition*

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

Cours 3h : Introduction à la lutte contre les pathogènes ; Stratégie de lutte contre les pathogènes viraux

*UE « Immunologie anti-virale »*

Cours 1h30 : pandémies à virus respiratoires et vaccins

*M1-MBI Master Biologie Informatique - module Virologie et Génomique bactérienne*

Cours 6h : variabilité virale et conséquences de la variabilité virale

*Ecole Doctorale Bio-SPC: Directrice du département Infectiologie-Microbiologie*

## **ENS UIm**

*Module Immunologie-Virologie L3 –coresponsable pour la virologie avec le Pr Uriel Hazan*

Cours 3h : Génomes à ARN : comment les répliquer ? ; Virus à ARN : mécanismes de variabilité ; Virus respiratoires et risque pandémique : influenza, SARS-CoV, MERS-CoV

Séminaires 2h : audition

## **Faculté de pharmacie, Chatenay Malabry**

*M2 Microbiologie-UE stratégies vaccinales*

Cours 3h : Vaccins anti-grippaux

### ➤ **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 – épidémiologie 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 contre la grippe (2h)

Vaccinologie : vaccin contre la grippe (1h)

Médecine d'Urgence : Gestion des épidémies et pandémies

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

### ➤ **Pr Sylvie van der Werf**

- Conférence invitée : « Du poliovirus aux virus influenza ». Ecole de Février Ecole INSERM Liliane Bettencourt, Paris, 8 février, 2016

- Interviews pour la presse écrite et audiovisuelle

### ➤ **Pr Bruno Lina**

- Soirée Actualités en Infectiologie : les maladies émergentes, Hopital de la Croix-Rousse, Lyon octobre 2016

- Reach a better understanding of vaccine science. Table ronde Biovision, Lyon, Avril 2017

- La vaccination des soignants contre la grippe Entretiens de Bichat, Lyon, juin 2017

- Interviews pour la presse écrite et audiovisuelle

### ➤ **Dr Vincent Enouf**

- Interviews pour la presse écrite et audiovisuelle

### ➤ **Dr Sylvie Behillil**

- Interviews pour la presse écrite et radio.

### ➤ **Dr Martine Valette**

- Interviews pour la presse écrite et radio.

### 5.1.3 Formation, accueil de stagiaires

Au CNR-IPP, accueil d'une stagiaire dans le cadre du programme IFE (programme d'étude et stage de terrain), Miranda Harris (étudiante américaine en épidémiologie) pour une durée de 3 mois, à partir du 27 février 2016. Son projet : Surveillance de la grippe en France nord : particularités de la saison grippale 2016-2017.

Au CNR-HCL, accueil d'une étudiante Cambodgienne (Bonath KA, Thèse en co-tutelle) pour la mise en place d'un système de surveillance de la grippe au Cambodge (4 mois septembre 2016 - décembre 2016), et accueil d'un étudiant EUPHEM dans le cadre du training de l'ECDC (Rolf Kramer training EPIET-EUPHEM).

## 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 CNR.

Chaque semaine, les laboratoires du CNR en métropole adressent à SpF les informations relatives aux types, sous-types, lignage, 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 SpF. Les laboratoires du CNR assurent la rédaction des données virologiques en concertation avec SpF 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 40 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 Voozoo "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 a aussi été utilisé par les laboratoires hospitaliers de la Région Sud au cours de la surveillance 2015-2016 et par l'IPG. L'ensemble des données de surveillance récoltées par le CNR est regroupé sur un site unique sécurisé.

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

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

## **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, DGS, DGT**

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)

Membre du « Groupe Grippe » de la DGS (S. van der Werf, B. Lina)

Membre du Groupe de travail « révision du classement des agents pathogènes » de la DGT (S. van der Werf, B. Lina).

#### **5.3.1.2 Santé Publique France**

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

#### **5.3.1.3 ANSES**

Membre du Groupe d'Expertise Collective d'Urgence pour les virus H5 (S. van der Werf)

Président du Comité de Visite de l'évaluation des unités ANSES en virologie en 2016 (B. Lina)

#### **5.3.1.4 COFRAC**

Participation au groupe de travail COFRAC section santé humaine-NGS et accréditation (V. Enouf).

#### **5.3.1.5 Activités auprès des instances de santé nationales et régionales (DFA)**

Activités de conseil auprès des ARS Martinique, Guadeloupe, Guyane et Cire Antilles Guyane

Membre du Comité d'Expert des Maladies à Caractère Epidémique (CEMCE) Guyane (D. Rousset, suppléance A. Enfissi)

### **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)
- External Advisor du réseau EISN auprès de l'ECDC (B. Lina)
- Membre de l'ERLI-Net coordination committee pour l'ECDC, 2014-2016/2015 (B. Lina)
- Membre du RSV working group pour l'ECDC 2015-2017 (B. Lina)
- 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)
- Point focal pour l'Institut Pasteur pour le WHO Global Action Plan (GAP) (S. van der Werf -2015-2016)
- Membre du PIP Framework working group (S. van der Werf - depuis 2015).
- Membre du technical working group Stream 2 " Limiting the spread of seasonal epidemic, zoonotic and pandemic influenza » for Updating *WHO Public Health Research Agenda for Influenza* (S. van der Werf - 2016)
- Temporary advisor for the WHO DG's Consultation with member states (IGM for the sharing of influenza viruses and benefits) (B. Lina)
- 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*

- 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 consortium CONSISE for the harmonization of serological studies
  - Membre du consortium ISARIC
  - Membre du comité scientifique du antiviral group ISRV
  - *Membre de l'Association et membre du bureau du Réseau des Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe (GROG)*
  - Editeur Associé pour la revue Eurosurveillance
- Coordinatrice du projet européen FP7-PREDEMICS « Preparedness, Prediction and Prevention of Emerging Zoonotic Viruses with Pandemic Potential

#### ➤ *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 scientific committee du Global Influenza Initiative
- Membre du comité scientifique du Global Influenza Hospital surveillance Network
- Président du Comité Scientifique d'Immuniser-Lyon
- Editeur associé de Journal of Clinical Virology

#### ➤ *Vincent ENOUF*

Evaluation des capacités techniques des laboratoires de virologie du réseau international des Instituts Pasteur, dans le cadre du projet ASIDE, financé par le CDC Atlanta. Sénégal, Cameroun, Côte d'Ivoire.

## 6 Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité 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 rapport avec l'activité du CNR-IPP sont centrées sur l'évolution génétique des virus influenza et les mécanismes qui sous-tendent cette évolution en lien avec la capacité de changement d'espèce des virus influenza ainsi que sur le décryptage des interactions virus-hôte avec pour objectifs une meilleure compréhension de la spécificité d'hôte et de la pathogénèse virale ainsi que l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Ces travaux s'inscrivent notamment dans le cadre des projets européens FP7-PREDEMICS (coordinateur S. van der Werf), FP7-PREPARE (coordinateur H. Goossens, Antwerpen, Belgique), du Labex IBEID (coordinateurs P. Cossart et P. Sansonetti, IP, Paris), du projet ANR FLUD (coordinateur G. Meyer, INRA/ENVT, Toulouse), et du projet H2020 EVAg (coordinateur J-L Romette, Marseille).

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

Un premier volet de ces recherches a pour objectif de déterminer 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, IP, Paris). La diversité génétique est explorée pour des isolats viraux produits sur différents substrats cellulaires représentant les différents niveaux du tractus respiratoire ou provenant de différents hôtes à différentes températures 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*).

Nous cherchons également à déterminer dans quelle mesure l'évolution des variants minoritaires au cours de la circulation virale pourrait avoir une valeur prédictive des nouveaux variants antigéniques susceptibles d'émerger ce qui pourrait contribuer à une meilleure actualisation de la composition vaccinale (*A. Baidjoe, EUPHEM fellow*).

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. Pour ce faire nous utilisons des approches de mutagenèse aléatoire ou dirigée des gènes du complexe polymérase et de la nucléoprotéine (NP) requis pour la réplication du génome viral. L'impact des mutations sur la réplication, la capacité de multiplication virale, la sensibilité à différents mutagènes ainsi que la diversité de la population virale est ensuite analysé. Ces travaux ont permis d'identifier pour les virus influenza de sous-types A(H3N2) et A(H1N1)pdm09, des déterminants portés par la protéine PB1 qui diminuent ou augmentent l'activité polymérase, ainsi que des déterminants qui augmentent ou diminuent la sensibilité aux mutagènes. L'impact de ces déterminants sur la fidélité de la polymérase est à l'étude. L'identification de déterminants intrinsèques de la fidélité de la polymérase pour des virus de différents sous-types et espèce hôte d'origine, pourrait avoir une valeur prédictive de la capacité d'évolution et d'adaptation des virus influenza, plus particulièrement pertinente pour l'évaluation du risque associé aux virus influenza zoonotiques. (*F. Andrieux, Thèse de doctorat*)

Parallèlement, nous avons entrepris l'étude de l'interaction des protéines du complexe polymérase et de la NP issus de virus de différents sous-types et espèce hôte d'origine avec

une sélection de protéines cellulaires impliquées dans des activités exo(ribo)nucléases et de relecture/correction, ou appartenant aux réseaux exosomes de la cellule. Des facteurs cellulaires qui interagissent avec les protéines du complexe polymérase (parfois de façon différentielle selon l'origine des protéines virales) ont été identifiés en utilisant un essai de complémentation protéique (PCA). Pour une sélection de facteurs, nous avons entrepris la caractérisation des domaines d'interaction et l'étude de leurs implications fonctionnelles pour la réplication virale, la sensibilité aux mutagènes et la diversité des populations virales. L'identification et la caractérisation de partenaires cellulaires impliqués dans la modulation de la fidélité de la polymérase des virus influenza pourraient permettre, à long terme, d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques utilisables notamment en cas de nouvelle pandémie. (M. Declercq, Doctorante).

Un deuxième volet concerne le deuxième mécanisme de variation génétique des virus grippaux, le **réassortiment**. En se fondant sur les travaux antérieurs qui ont permis de préciser les éléments des séquences non codantes conservées ou non conservées entre segments nécessaires à la multiplication virale nous cherchons à mieux comprendre le rôle des séquences non-codantes non conservées dans le processus d'incorporation des segments viraux dans les particules virales. Des virus recombinants dans lesquels les séquences non codantes du segment NA ont été remplacées par celles de chacun des 7 autres segments ont été produits et se sont révélés atténués pour la multiplication virale du fait d'un défaut spécifique d'incorporation du segment NA modifié. L'analyse des mutations qui restaurent le phénotype de multiplication virale et l'incorporation du segment NA après passages successifs en culture nous renseigne sur de nouveaux déterminants qui gouvernent l'emballage des segments viraux (Crescenzo-Chaigne et al. Sci Rep 2017). La même approche est maintenant étendue aux autres segments viraux. 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).

➤ **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 (Fournier et al. PLoS Path 2014 ; Diot et al. Scientific Reports 2016).

Selon des approches similaires C. Demeret s'intéresse aux interactions différentielles des RNP avec le système ubiquitine protéasome (Collaboration S. Sanyal, IP Hong Kong, Chine) Des approches d'interactomique à très haut débit développées par le groupe de Y. Jacob, permettent aujourd'hui d'aborder l'étude différentielle des réseaux d'interaction des protéines virales à très large échelle (i.e. vis à vis de l'ensemble de l'ORFEOME humain) et de façon comparative pour les protéines virales issues de virus influenza de différents sous-types, espèce hôte d'origine et niveau de pathogénicité. L'application à d'autres virus respiratoires tels que le VRS ou le MERS-CoV est envisagée selon l'obtention de financements.

Ces travaux devraient permettre une meilleure compréhension des bases moléculaires de la pathogénèse virale et potentiellement conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

(N. Naffakh, DR2 CNRS ; S. Munier, MCU P7 ; Y. Jacob, CR IP, C. Demeret, CR IP ; P. Cassonnet, IR IP ; M. Dos Santos IE IP ; J. Zhang, Post-doctorante ; E. Biquand, Doctorante ; M. Karim, Doctorante).

### ➤ **Potentiel zoonotique des virus influenza D**

Un nouveau type de virus influenza (type D) a été récemment identifié chez les porcins et les bovins. Dans le cadre du projet ANR FLUD (coordinateur G. Meyer, INRA/ENVT, Toulouse) dont l'objectif est une meilleure caractérisation de ce virus et l'évaluation de son potentiel zoonotique, nous avons entrepris d'établir le profil de multiplication du virus sur différents types cellulaires, et nous évaluerons sa stabilité selon différentes conditions physicochimiques (température, pH, etc..). De plus, nous avons mis en place une qRT-PCR spécifique pour rechercher la présence éventuelle de ce virus chez les patients atteints d'IRA. Une étude sérologique pour apprécier la prévalence des anticorps contre ce virus dans différents segments de la population est également prévue (V. Enouf ; S. Behillil).

### ➤ **Recherche translationnelle ou appliquée en lien étroit avec le CNR**

Comme par le passé les données directement issues de l'activité du CNR ou directement en lien avec l'activité du CNR pourront donner lieu à des études dans les domaines suivants :

#### Epidémiologie

Notre expertise et les données de la surveillance sont régulièrement mises à profit pour contribuer à des études épidémiologiques. Ainsi par exemple, nous avons contribué à l'évaluation de la corrélation entre syndromes grippaux et infection invasive à pneumocoque (Domenech et al. Am J Epidemiol, in press)

En termes d'épidémiologie moléculaire, sur la base des séquences de génomes complets produits par NGS, des analyses phylogénétiques permettent d'analyser l'évolution spatio-temporelle des virus influenza (ou d'autres virus respiratoires) ainsi que la fréquence et la nature des réassortiments au sein de chacun des types ou sous-types/lignages de virus influenza en relation avec les données clinico-épidémiologiques et/ou phénotypiques des virus.

#### Evaluation de caractéristiques génétiques ou phénotypiques particulières

L'identification dans le cadre de la surveillance de mutations en lien avec des caractéristiques phénotypiques d'intérêt (variations de la spécificité pour le récepteur, de la sensibilité aux antiviraux, de la vitalité virale, etc ..) pourra faire l'objet d'analyses spécifiques faisant appel aux outils disponibles dans le cadre de la recherche (génétique inverse, test de transcription/réplication transitoire, interactomique, etc..) afin de comprendre les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les variations observées comme cela a été réalisé par le passé.

#### Immunité post-vaccinale et évaluation de nouveaux antiviraux

L'expertise du CNR-IPP et de l'unité est régulièrement mise à profit pour contribuer à des études sérologiques de l'immunité postvaccinale ou pour l'évaluation de nouveaux antiviraux. Ainsi le CNR-IPP a contribué à une étude montrant un déficit de l'immunité post vaccinale chez les patients atteints de BPCO ( Parpaleix et al. Journal of Allergy and Clinical Immunology 2017)

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; S. Behillil).

## **6.1.2 CNR-HCL**

Le programme de recherche de l'Unité VIRPATH se focalise sur la compréhension des mécanismes d'émergence et de ré-émergence, la pathogenèse et les relations hôte-pathogène lors de l'infection par les virus influenza. L'émergence de nouveaux virus résulte de modifications adaptatives à la fois du virus et de son hôte. Les objectifs principaux de l'Unité sont complémentaires de ceux en ligne directe avec les activités de CNR. Au total, la part strictement fondamentale vise à comprendre le rôle exact des extrémités 5' et 3'

terminales des segments de gène lors des processus d'emballage et de réassortiment, étudier les altérations du processus de biogenèse des ribosomes résultant du stress ribosomique au cours de l'infection virale ainsi que l'impact de ces modifications sur la réplication, la synthèse des protéines virales, et le détournement des fonctions cellulaires au profit du virus, et enfin l'étude des altérations de la réponse immunitaire, en lien avec l'activation ou d'inactivation des récepteurs cellulaires. Ces différents programmes de recherche sont brièvement décrits ci-dessous

➤ **Axe1 : Les vRNP des virus influenza: biosynthèse, assemblage et interactions durant l'emballage et/ou le réassortiment génétique.**

La détermination des interactions entre les composants des RNP et entre RNP durant l'emballage ainsi que la détermination des facteurs impliqués dans le réassortiment génétique sont liés à une meilleure connaissance de la biologie des RNP. Le génome des virus influenza consiste en 8 RNA simple brin de polarité négative organisés sous forme de RNP. Ces RNP comportent un ARN couvert de Nucléoprotéines (NP) et qui comportent aux deux extrémités complémentaires 5' et 3' un exemplaire de chacune des trois protéines du complexe polymérase (PA, PB1 et PB2). Récemment, il a été montré que la NP se lie à l'ARN via les résidus phosphate de l'axe ARN, permettant l'exposition des nucléotides à l'extérieur du couple ARN-NP. Les interactions entre les segments d'ARN restent non élucidées, même s'il a été démontré que, lors de l'emballage, il se met en place un réseau d'interaction entre RNP, sans que les mécanismes de cette interaction soient élucidés. Dans une première approche, nous avons réalisé des études de cryo-tomographie électronique qui ont permis de décrire l'organisation interne de la particule virale. Puis, un réseau d'interactions entre segments d'ARN a été établi *in vitro*, donnant, pour H3N2, la structure putative du réseau, identifiant de plus les régions des différents ARN impliquées dans les interactions inter-segments. Ces régions peuvent aussi être celles qui contrôlent le réassortiment génétique, par le biais des régions dites de « packaging ». Par une approche de co-infection *in vitro*, de constructions par génétique inverse et par hybridation *in situ*, nous souhaitons confirmer que les phénomènes de réassortiment génétique hétéro sous-typiques sont des événements peu fréquents, liés à des incapacités d'interaction entre segments venant de sous-types différents. En modifiant les régions dites de « packaging », essentiellement les régions 5' non codantes des segments de gène, nous souhaitons déterminer si ce réassortiment devient plus facile, notamment entre virus d'origine humaine et aviaire. Une ANR est en cours pour analyser le réseau d'interaction pour les virus A/PR8 (H1N1) qui sert à préparer les virus réassortants vaccinaux.

L'objectif ultime est de décoder les facteurs moléculaires contrôlant le réassortiment hétéro sous-typique afin de pouvoir déterminer quelles mutations peuvent favoriser un réassortiment génétique dans la nature, afin d'anticiper le risque d'émergence d'un nouveau virus pandémique (Projet RNAFLU).

➤ **Axe2 : Détournement de la biogenèse des ribosomes et de la machinerie transcriptionnelle lors de l'infection virale.**

La réplication des virus influenza se déroule dans le noyau de la cellule infectée. Au cours de l'infection, le noyau cellulaire subit un remodelage complexe de l'architecture du noyau et du nucléole. Il est possible d'observer un remodelage du nucléole qui est systématique, quel que soit le sous-type. Or, le nucléole est indispensable pour la biogenèse des ribosomes. Notre hypothèse est que, au cours de l'infection et notamment du fait du stress ribosomique, les modifications nucléolaires viro-induites entraînent la synthèse de ribosomes modifiés qui participent à la dys-régulation transcriptionnelle favorisant la synthèse des ARN viraux aux dépens des ARN cellulaires. Par une approche en spectrométrie de masse Silac et par des gels SDS page 2D il est possible d'analyser en détail le contenu protéique du complexe ribosomique et de déterminer les modifications de ces complexes au cours de l'infection (Projet RIBOFLU).

➤ **Axe3 : Pathogenèse des virus influenza: rôle des facteurs de l'hôte au cours de l'inflammation et des interactions hôte-virus impliquées dans les surinfections bactériennes.**

Au cours de l'infection virale, différents facteurs cellulaires peuvent, via la réponse inflammatoire, jouer un rôle délétère pour la cellule et l'organisme. Un des objectifs de recherche est de comprendre plus particulièrement le rôle du plasminogène dans cette réponse délétère, mais aussi de déterminer le rôle des Protéase Activated Receptors 1 dans la réponse cellulaire à l'infection et les sur-infections bactériennes, et enfin de comprendre le processus impliqué dans la pathogenèse lors d'infections associant le virus influenza et les bactéries sécrétrices de toxines comme le *Staphylococcus aureus*.

Lors de l'infection, une inflammation excessive participe à la pathogénicité. La cascade cytokinique est responsable d'un impact inflammatoire important qui, en association avec certains facteurs cellulaires, peuvent augmenter ou réduire l'impact de l'inflammation. Parmi ces facteurs, les protéases qui favorisent le clivage protéolytique de la HA favorisent l'infection.

Cette surinfection concerne parfois des bactéries sécrétrices de toxines comme notamment les *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pyogenes*. Les *S. Aureus* excréteurs de toxine Pantan-Valentine sont des souches dangereuses dont la fréquence augmente aux USA. Ces souches provoquent des pneumonies nécrosantes souvent fatales. Nous souhaitons étudier les interactions entre ces toxines et la déplétion des neutrophiles au cours de l'infection grippale, avec une étude spécifique chez des patients hospitalisés en Réanimation pour des formes graves (PHRC Antigrippe).

➤ **Axe4 : Projets de recherche translationnelle ou appliquée en lien étroits avec le CNR : études de la balance fonctionnelle HA/NA et résistance aux antiviraux, épidémiologie moléculaire des virus influenza.**

Epidémiologie moléculaire

Lors de la surveillance, un nombre important de souches est caractérisé. La détermination des séquences nucléotidiques des segments de gène HA et NA permet d'avoir une épidémiologie moléculaire précise de l'épidémie de grippe, notamment en identifiant à la fois les variants et les mutants d'intérêt.

Par l'épidémiologie moléculaire, il est aussi possible de détecter des virus d'intérêt portant des diversités génétiques portées soit par les substitutions observées sur les protéines de la HA et de la NA, soit des constellations de gènes (réassortants intra-soustypiques) pouvant être associées à une virulence accrue.

Antiviraux : marqueurs de résistance, nouveaux produits

Dans le cadre de la surveillance, un suivi étroit de la sensibilité au antiviraux est réalisé. En parallèle, des études descriptives sont réalisées à la fois sur la sensibilité des virus aux inhibiteurs de la Neuraminidase, les capacités enzymatiques des neuraminidases des virus détectés et les séquences de ces glyco-protéines.

Concomitamment, par génétique inverse, il est possible de construire des virus présentant certaines mutations dont le rôle reste à définir. En effet, certaines mutations dites de structure semblent provoquer une réduction des sensibilités, sans forcément induire une résistance (exemple : mutation 223, 119 pour les virus N2). Ces mutations de type « structure » peuvent, par addition, éventuellement conduire à l'émergence de virus présentant un fitness suffisant pour être transmis.

Par ailleurs, des stratégies antivirales innovantes, utilisant des combinaisons d'antiviraux disponibles, ou testant des nouvelles molécules antivirales (in vivo ou in vitro). A ce titre, des essais cliniques sont en cours ou seront réalisés dans un avenir proche (essais FLUMED et COMBINA, FLUNEXT).

Profils de résistance chez les virus non humains

Dans le cadre de la surveillance de l'émergence des virus influenza aviaire, les antiviraux permettent de contrôler les cas et de réduire la mortalité. Toutefois, des virus présentant des mutations reconnues comme étant associées à la résistance chez les virus circulant chez l'homme (N1 et N2) sont parfois retrouvées lors d'infection zoonotiques, sans qu'il soit possible de déterminer a priori si ces substitutions sont aussi responsables de résistance.

Un travail est en cours afin de tester chez des représentants de l'ensemble des neuraminidases retrouvées chez des virus aviaires si la connaissance des profils génétiques de résistance aux antiviraux pour les virus humains pouvait être inférée à l'ensemble des neuraminidases des virus aviaires, en combinant une approche de génétique inverse (mutagénèse dirigée) et de tests protéiques (production de protéines purifiées en baculovirus).

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

### 6.2.1 Publications nationales

Equipes de surveillance de la bronchiolite (2017) Surveillance de la bronchiolite en France, saison 2016-2017 *BEH*, soumis

Equipes de surveillance de la grippe\* Surveillance de la grippe en France, Saison 2016-2017, *BEH*, soumis

Equipes de surveillance virologique de la grippe\* Surveillance de la grippe en France Métropolitaine, Saison 2015-2016 *BEH*, 2016 ; 32-33 : 558-563.

Campèse C, Silué Y, Lina B, Bonmarin I, Chappert JL, van der Werf S, Lévy-Bruhl D *Middle East Respiratory Coronavirus* (MERS-CoV). Bilan des signalements en France d'octobre 2012 à décembre 2015. *BEH*, 2016 ; 32-33 : 572-578

Lina B Grippe, Encyclopédie Médico Chirurgicale, 2016 ; [4-1200] - Doi : 10.1016/S1634-6939(16)74412-7

Loubet P, Samih-Lenzi N, Galtier F, Vanhems P, Loulergue P, Duval X, Lesieur Z, Lina B, Carrat F, Launay O. RESPIR-08 - Facteurs associés à la gravité d'une grippe confirmée chez des adultes hospitalisés en France de 2012 à 2015 : une étude prospective multicentrique. *Med Mal Infect.* 2016;46(4 Suppl 1):98.

Poissy J, Terrier O, Lina B, Textoris J, Rosa-Calatrava M. La modulation de la signature transcriptomique de l'hôte infecté : une nouvelle stratégie thérapeutique dans les viroses graves ? Exemple de la grippe. *Réanimation*, 2016 ; 25:S53–S61

Le Briand N, Casalegno JS, Escuret V, Gaymard A, Lina B, Ottmann M, Frobert E. La balance HA-NA des virus influenza A(H1N1), *Virologie*, 2016, 20 (1):47-60.

Lina B. La sécurisation du laboratoire BSL3. *Les cahiers de la Fonction Publique*, 2016 ; 362 : 77.

Lina B. Vers un vaccin antigrippal universel ? *La revue du Praticien*, 2016 ; 66 : 1-3

### 6.2.2 Publications internationales

Domenech de Cellès M, Arduin H, Varon E, Souty C, Boëlle PY, Lévy-Bruhl D, van der Werf S, Soulyard J-C, Guillemot D, Watier L, Opatowski L (2017) Characterizing and Comparing the Seasonality of Influenza-Like Illnesses and Invasive Pneumococcal Diseases Using Seasonal Waveforms. *Am J Epidemiol*, *in press*

Auffray C, Sagner M, .....van der Werf S, .....Sanz F, Nobrega F (2017) Viva Europa, a Land of Excellence in Research and Innovation for Health and Wellbeing, *PROGREVMED* 2017; 2: e006

Vilcu AM, Souty C, Enouf V, Capai L, Turbelin C, Masse S, Behillil S, Valette M, Guerrisi C, Rossignol L, Blanchon T, Lina B, Hanslik T, Falchi A. (2017) [Estimation of seasonal influenza vaccine effectiveness using data collected in primary care in France: comparison of the test-negative design and the screening method.](#) *Clin Microbiol Infect.* 2017 Sep 9. pii: S1198-743X(17)30501-3

Souty C, Vilcu AM, Capai L, van der Werf S, Valette M, Blanchon T, Lina B, Behillil S, Hanslik T, Falchi A. (2017) [Early estimates of 2016/17 seasonal influenza vaccine effectiveness in primary care in France.](#) *J Clin Virol.* 2017 Oct;95:1-4.

Parpaleix A, Boyer L, Wiedemann A, Lacabaratz C, Margarit L, Enouf V, Le Corvoisier P, Lino A, Covali-Noroc A, Housset B, Chouaid C, Maitre B, Lévy Y, Lelièvre JD, Adnot S. (2017) [Impaired Humoral and Cellular Immune Responses to Influenza Vaccination in COPD Patient.](#) *J Allergy Clin Immunol.* 2017 Sep 7. pii: S0091-6749(17)31428-8.

Crescenzo-Chaigne B, Barbezange CV, Leandri S, Roquin C, Berthault C, van der Werf S (2017) Incorporation of the influenza A virus NA segment into virions does not require cognate non-coding sequences. *Sci Rep* 7:43462.

Langevin S, Pichon M, Smith E, Morrison J, Bent Z, Green R, Baker K, Solberg O, Gillet Y, Javouhey E, Lina B, Katze M, and Josset L. Early nasopharyngeal microbial signatures are associated with severe influenza in children: a retrospective pilot study *Journal of General Virology*, 2017.

Pichon M, Gaymard A, Josset L, Valette M, Millat G, Lina B, Escuret V. Characterization of oseltamivir-resistant influenza virus populations in immunosuppressed patients using digital-droplet PRC: Comparison with qPCR and next generation sequencing analysis. *Antiviral Research*, 145 (2017) 160-167.

Flicoteaux R, Protopopescu C, Tibi A, Blanchon T, Werf SV, Duval X, Mosnier A, Charlois-Ou C, Lina B, Leport C, Chevret S. Factors associated with non-persistence to oral and inhaled antiviral therapies for seasonal influenza: a secondary analysis of a double-blind, multicentre, randomised clinical trial. *BMJ Open.* 2017 Jul 10;7(7):e014546

Dubois J, Cavanagh MH, Terrier O, Hamelin MÈ, Lina B, Shi R, Rosa-Calatrava M, Boivin G. Mutations in the fusion protein heptad repeat domains of human metapneumovirus impact on the formation of syncytia. *J Gen Virol.* 2017 Jun;98(6):1174-1180.

Panthu B, Terrier O, Carron C, Traversier A, Corbin A, Balvay L, Lina B, Rosa-Calatrava M, Ohlmann T. The NS1 Protein from Influenza Virus Stimulates Translation Initiation by Enhancing Ribosome Recruitment to mRNAs. *J Mol Biol.* 2017 Apr 20. pii: S0022-2836(17)30182-1

Casalegno JS, Eibach D, Valette M, Enouf V, Daviaud I, Behillil S, Vabret A, Soulayr JC, Benchaib M, Cohen JM, van der Werf S, Mosnier A, Lina B. Performance of influenza case definitions for influenza community surveillance: based on the French influenza surveillance network GROG, 2009-2014. *Euro Surveill.* 2017 Apr 6;22(14)

Pichon M, Gaymard A, Lebaill-Carval K, Frobert E, Beaufile E, Chene G, Tommasino M, Lina B, Gaucherand P, Gautheret-Dejean A, Bonnafous P, Gheit T, Buenerd A, Lamblin G, Mekki Y. Vaginal Neoplasia Induced by an Unusual Papillomavirus Subtype in a Woman with Inherited Chromosomally Integrated Human Herpesvirus Type 6A. *Gynecol Obstet Invest.* 2017;82(3):307-310

Mosnier A, Daviaud I, Casalegno JS, Ruetsch M, Burugorri C, Nauleau E, Bui TT, Fleury H, Lina B, van der Werf S, Cohen JM (2017) Influenza B burden during seasonal influenza epidemics in France. *Med Mal Infect* 47(1):11-17

Mosnier A, Daviaud I, Caini S, Berche H, Mansuy JM, van der Werf S, Cohen JM, Lina B (2017) Does seasonal vaccination affect the clinical presentation of influenza among the elderly? A cross-sectional analysis in the outpatient setting in France, 2003-2014. *Vaccine* 35(16):2076-2083.

Harris KA, Freidl GS, Munoz OS, von Dobschuetz S, De Nardi M, Wieland B, Koopmans MPG, Stark KDC, van Reeth K, Dauphin G, Meijer A, de Bruin E, Capua I, Hill AA, Kosmider R, Banks J, Stevens K, van der Werf S, Enouf V, van der Meulen K, Brown IH, Alexander DJ, Breed AC, FLURISK consortium (2017) Epidemiological Risk Factors for Animal Influenza A Viruses Overcoming Species Barriers. *Ecohealth*. 14(2):342-360.

Briand FX, Schmitz A, Ogor K, Le Prioux A, Guillou-Cloarec C, Guillemoto C, Allee C, Le Bras MO, Hirchaud E, Quenault H, Touzain F, Cherbonnel-Pansart M, Lemaitre E, Courtillon C, Gares H, Daniel P, Fediaevsky A, Massin P, Blanchard Y, Eterradosi N, van der Werf S, Jestin V, Niqueux E (2017) Emerging highly pathogenic H5 avian influenza viruses in France during winter 2015/16: phylogenetic analyses and markers for zoonotic potential. *Euro Surveill* 22(9).

Nguyen Van JC, Camelena F, Dahoun M, Pilmis B, Mizrahi A, Lourtet J, Behillil S, Enouf V, Le Monnier A (2016) Prospective evaluation of the Alere i Influenza A&B nucleic acid amplification versus Xpert Flu/RSV. *Diagn Microbiol Infect Dis* 85(1):19-22.

Munoz O, De Nardi M, van der Meulen K, van Reeth K, Koopmans M, Harris K, von Dobschuetz S, Freidl G, Meijer A, Breed AC, Hill A, Kosmider R, Banks J, Stark KD, Wieland B, Stevens K, van der Werf S, Enouf V, Dauphin G, Dundon W, Cattoli G, Capua I (2016) Erratum to: Genetic Adaptation of Influenza A Viruses in Domestic Animals and Their Potential Role in Interspecies Transmission: A Literature Review. *Ecohealth* 13(1):199.

Diot C, Fournier G, Dos Santos M, Magnus J, Komarova A, van der Werf S, Munier S, Naffakh N (2016) Influenza A Virus Polymerase Recruits the RNA Helicase DDX19 to Promote the Nuclear Export of Viral mRNAs. *Sci Rep* 6:33763.

Tjon-Kon-Fat R, Meerhoff T, Nikisins S, Pires J, Pereyaslov D, Gross D, Brown C, WHO European Region Influenza Network. The potential risks and impact of the start of the 2015–2016 influenza season in the WHO European Region: a rapid risk assessment. *ISIRV* (2016) DOI:10.1111/irv.12381

Diot C, Fournier G, Dos Santos M, Magnus J, Komarova A, van der Werf S, Munier S, Naffakh N. [Influenza A Virus Polymerase Recruits the RNA Helicase DDX19 to Promote the Nuclear Export of Viral mRNAs](#). *Sci Rep*. 2016 Sep 22;6:33763. doi: 10.1038/srep33763

Loubet P, Lenzi N, Valette M, Foulongne V, Krivine A, Houhou N, Lagathu G, Rogez S, Alain S, Duval X, Galtier F, Postil D, Tattevin P, Vanhems P, Carrat F, Lina B, Launay O; FLUVAC Study Group..Clinical Characteristics and Outcome of Respiratory Syncytial Virus Infection among Adults Hospitalized with Influenza-like Illness in France. *Clin Microbiol Infect*. 2016 Nov 26. In pres

Brinza L, Djebali S, Tomkowiak M, Mafille J, Loiseau C, Jouve PE, de Bernard S, Buffat L, Lina B, Ottmann M, Rosa-Calatrava M, Schicklin S, Bonnefoy N, Lauvau G, Grau M, Wencker M, Arpin C, Walzer T, Leverrier Y, Marvel J. Immune signatures of protective spleen memory CD8 T cells. *Sci Rep*. 2016 Nov 24;6:37651

Kerviel A, Dash S, Moncorgé O, Panthu B, Prchal J, Décimo D, Ohlmann T, Lina B, Favard C, Decroly E, Ottmann M, Roingard P, Muriaux D. Involvement of an arginine triplet in M1 matrix Protein Interaction with membranes and in M1 recruitment into virus-like particles of the influenza A(H1N1)pdm09 virus. *Plos one*, 11(11):e0165421

Filleul L, Ranoaritiana DB, Balleydier E, Vandroux D, Ferlay C, Jaffar-Bandjee MC, Jaubert J, Roquebert B, Lina B, Valette M, Hubert B, Larrieu S, Brottet E. A major impact of the influenza seasonal epidemic on intensive care units, Réunion, April to August 2016. *Euro Surveill*. 2016 Nov 24;21(47). pii: 30405.

Gaymard A, Charles-Dufant A, Sabatier M, Cortay JC, Frobert E, Picard C, Casalegno JS, Rosa-Calatrava M, Ferraris O, Valette M, Ottmann M, Lina B, Escuret V. Impact on antiviral resistance of E119V, I222L and R292K substitutions in influenza A viruses bearing a group-2 neuraminidase (N3, N6, N7, N9). J Antimicrob Chemother. 2016 Nov;71(11):3036-3045

Gaymard A, Le Briand N, Frobert E, Lina B, Escuret V. Functional Balance between Neuraminidase and Hemagglutinin in influenza viruses. Clin Microbiol Infect. 2016 Dec;22(12):975-983

Terrier O, Carron C, De Chaasey B, Dubois J, Traversier A, Julien T, Proust A, Hacot S, Resskinoff D, Lotteau V, Lina B, Diaz JJ, Moules V, Rosa-Calatrava M, Nucleolin interacts with influenza A ribonucleoprotein complexes and contributes to their nuclear trafficking and efficient influenza viral replication. Sci Rep. 2016 Jul 4;6:29006.

Roussel M, Pontier D, Cohen JM, Lina B, Fouchet D. Quantifying the role of weather on seasonal influenza. BMC Public Health, 2016 May 26;16:441

Vanhems P, Baghdadi Y, Roche S, Bénet T, Régis C, Lina B, Robert O, Voirin N, Ecochard R, Amour S. Influenza vaccine effectiveness among healthcare workers in comparison to hospitalized patients: A 2004-2009 case-test, negative-control, prospective study. Hum Vaccin Immunother. 2016 Feb;12(2):485-90.

Munier E, Bénet T, Régis C, Lina B, Morfin F, Vanhems P. Hospitalisation in double-occupancy rooms and the risk of hospital-acquired influenza: a prospective cohort study. Clin Microbiol Infect. 2016 May;22(5):461.e7-9.

Loubet P, Samih-Lenzi N, Galtier F, Vanhems P, Loulergue P, Duval X, Jouneau S, Postil D, Rogez S, Valette M, Merle C, Régis C, Costa Y, Lesieur Z, Tattevin P, Lina B, Carrat F, Launay O; FLUVAC Study Group. Factors associated with poor outcomes among adults hospitalized for influenza in France: A three-year prospective multicenter study. J Clin Virol. 2016;79:68-73.

### **6.2.3 Communications nationales**

Houhamdi L, Kramer R, Gentil N, Lina B, Gerbier-Coloûban S, Forissier MF, Pasquet-Volckmann C. Impact d'une campagne de vaccination antigrrippale renforcée dans un CHU. Conférence sur invitation Présentation orale, 54èmes Journées Nationales de Formation – DPC, 21 & 22 septembre 2017, Besançon

Diot C, Guillaume Fournier, Mélanie Dos Santos, Julie Magnus, Anastasia Komarova, Sylvie van der Werf, Sandie Munier, Nadia Naffakh. Interaction des virus influenza A avec les ARN hélicases à boîte DExD : étude systématique et mise en évidence d'un rôle majeur de DDX19 dans l'export nucléaire des ARNm viraux. XVIIIèmes Journées Francophones de Virologie, Institut Pasteur, Paris, 23-24 mars 2016.

Declercq M., Blanc H, Vignuzzi M, van der Werf S, Barbezange C. Evaluation de la présence d'une activité de relecture / correction contrôlant de leur la fidélité de la polymérase des virus influenza de type A. XVIIIèmes Journées Francophone de Virologie. Institut Pasteur, Paris 23-24 mars 2016

Crescenzo-Chaigne B., Cyril Barbezange, Stéphane Léandri, Camille Roquin, Camille Berthault, Sylvie van der Werf. Les extrémités non codantes des segments grippaux sont-elles interchangeables ? Etude sur le segment NA. XVIIIèmes Journées Francophones de Virologie, Institut Pasteur, Paris, 23-24 mars 2016.

#### 6.2.4 Communications Internationales

van der Werf S, C. Barbezange, S. Léandri, C. Roquin, C. Berthault, B. Crescenzo-Chaigne. Incorporation of the influenza A virus NA segment does not require homologous non-coding sequences. Options IX for the Control of Influenza. Chicago, USA, 24-28 August 2016

van der Werf S, C. Barbezange, S. Léandri, C. Roquin, C. Berthault, B. Crescenzo-Chaigne. Incorporation of the influenza A virus NA segment does not require homologous non-coding sequences. 6th European Congress of Virology. Hamburg, Germany, 19-22 October 2016

Biquand E, Sabiha Jahan A, van der Werf S, Naffakh N, Jacob Y, Sanyal S, Demeret C (2016). Delineating the interplay between the PB2 protein of influenza A virus and the host Ubiquitin Proteasome System. *6th European Congress of Virology*, 19-22 October 2016, Hamburg, Germany.

Declercq M., Hervé Blanc, Marco Vignuzzi, Sylvie van der Werf, Cyril Barbezange. Is replication fidelity of influenza A viruses modulated by a proofreading activity? 6th European Congress of Virology. Hamburg, Germany, 19-22 October 2016

Houhamdi L, Kramer R, Gentil N, Gerbier-Coloûban S, Forissier MF, Pasquet-Volckmann C, Lina B. Effect of a reinforced seasonal influenza vaccination campaign of HCW on nosocomial outbreaks in the University Hospital of Lyon, France in 2016-17, Communication orale, 6th ESWI, Septembre 2017, Riga,

Lina B. Molecular diagnostic for the management of viral respiratory infections. Conférence sur invitation, Présentation Orale, Hologic Molecular Days, 29 juin 2017, Barcelone

#### 6.2.5 Communications Nationales sur invitation

van der Werf S. Diagnostic clinique de la grippe. Journées de Biologie Clinique, Institut Pasteur, Paris, 19 janvier 2016.

van der Werf S. Evolution of Influenza A viruses: search for determinants that modulate mutation rate and segment incorporation into virions. Lab seminars, Department of Virology, Institut Pasteur, Paris, 5 octobre 2016.

Enouf V. La saison grippale 2014/2015. XVIIIèmes Journées Francophones de Virologie, Institut Pasteur, Paris, 23-24 mars 2016.

Lina B. Vaccination anti grippale. Conférence sur invitation, Présentation orale, 15e journée du Groupe Transplantation et Infection, Vaccination du patient transplanté, 12 mai 2017, Paris

Righi N, Lina B, Saubace C, Benito Y, Tebbal S. Place de l'étiologie bactérienne dans les encéphalites et méningo-encéphalites. Conférence sur invitation, Présentation Orale, Les 1ères journées Médico-Chirurgicale Internationales de Batna, 25-27 mars 2017, Batna

Lina B. Les virus neurotropes ; Actualités. Conférence sur invitation, Présentation Orale, Les 1ères journées Médico-Chirurgicale Internationales de Batna, 25-27 mars 2017, Batna

Lina B. Diagnostic virologique des encéphalites et méningo-encéphalites. Conférence sur invitation, Présentation Orale, Les 1ères journées Médico-Chirurgicale Internationales de Batna, 25-27 mars 2017, Batna

Lina B. Evolution des techniques de la PCR. Conférence sur invitation, Présentation Orale, Les 1ères journées Médico-Chirurgicale Internationales de Batna, 25-27 mars 2017, Batna

Trabattoni E, Le V, Pilmis B, Pean de Ponfilly G, Caisso C, Couzigou C, Vidal B, Mizrahi A, Ganansia O, Le Monnier A, Lina B, Nguyen Van JC. Intérêt du test diagnostique de la grippe Alere I Flu A&B en biologie délocalisée au service des urgences. Invitation pour présentation orale, 36e RICAI, décembre 2016

Lina B. Intérêt de la PCR multiplex pour le diagnostic et la prise en charge des infections respiratoires. Invitation pour présentation orale, 36e RICAI, décembre 2016

Lina B. Bases Immunologiques de la Vaccination. Communication orale sur invitation, IXe Journée Internationale d'Infectiologie de Sertif, Setif, 29 mai 2016

Lina B. Actualités sur la vaccination antigrippale. Communication orale sur invitation, IXe Journée Internationale d'Infectiologie de Sertif, Setif, 29 mai 2016

### **6.2.6 Communications Internationales sur invitation et présidence de sessions**

van der Werf S Avian influenza overview - risk for person to person transmission and differences between Europe and China. *ECDC Annual influenza meeting*, Stockholm, Sweden 22 January, 2017.

Autran B, Garçon N, Boivin Guy, Fisher A, Guimezanzas A, Kobinger Gary, Lina B, Longuet C, Morgon P, Schwamborn K, Trust in vaccines. Invitation pour table ronde 12e Edition Biovision, 4-6 avril 2017, Lyon

Lina B Emerging influenza Viruses, Communication orale sur invitation, ISHEID, Marseille, 27 mai 2016

Lina B. Future Vaccine workshop. Table ronde sur invitation, BioVision, Lyon, 12-14 avril 2016

Lina B. Molecular diagnostic of respiratory viruses. Communication orale sur invitation, Symposium SEEGENE ECCMID, Amsterdam, 10 avril 2016

van der Werf S. Impact of influenza : insights from routine virological surveillance. ISIRV Meeting « Incidence, Severity, Impact of influenza », 21-22 January 2016, Institut Pasteur, Paris

van der Werf S. Outline of PREDEMICS. ECV satellite symposium « Emerging Zoonoses », 6th European Congress of Virology. Hamburg, Germany, 22 October 2016

Lina B, Heymann D, Neels P. Using and deploying vaccines in emergency situations. Invitation pour table ronde, Vaccinology conference, Veyrier du Lac, Novembre 2016

Lina B. Efficiency in population of influenza vaccination of seasonal 2013-2016 for FLU prevention of hospitalized adults : FLUVAC EV-03.3 – France. Conférence sur invitation, GIHSN Annual Meeting 2016, 17-18 octobre 2016, Barcelone

Lina B. Laboratory surveillance and virological characteristics of strains. Conférence sur invitation, GIHSN Annual Meeting 2016, 17-18 octobre 2016, Barcelone

Lina B. Invitation pour conférence : Multiplex detection of respiratory viruses, ECCMID, 10 avril 2016, Amsterdam

Lina B invitation pour conférence : Emerging influenza Viruses, ISHEID, 27 mai 2016, Marseille

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

- Rencontres sur la grippe, GEIG, Novembre 2016 (B. Lina, S. van der Werf)
- 6th ESWI Influenza Conference, Riga, Latvia - 10-13 September **2017**(S. van der Werf, member of scientific committee)
- Preparedness, Prediction and Prevention of Emerging Zoonotic Viruses: Challenges and Opportunities, Château de Montvillargenne, Gouvieux, France - 6-7 April 2017 (S. van der Werf, co-organizer)
- PREDEMICS Training Workshop "Integrated knowledge on Preparedness, Prediction and Prevention of Emerging Zoonotic Viruses with Pandemic Potential ». Institut Pasteur, Paris, France 19-22 September 2016 (S. van der Werf, co-organizer)
- ECV satellite symposium « Emerging Zoonoses », 6th European Congress of Virology. Hamburg, Germany, 22 October 2016 (S. van der Werf, co-organizer)
- IMMEX-XI, ESCMID-ESGEM 11th international Meeting on Microbial Epidemiological Markers navigation microbial genomes : insights from next generation, Estoril, Portugal, March 9-12 2016 (S. van der Werf, member of scientific committee).

## **7 Coopération avec les laboratoires de santé animale**

Le CNR-IPP a été en relation avec le laboratoire de référence pour la grippe aviaire dans le cadre de la survenue de l'épizootie liée aux virus hautement pathogènes H5N8 dans les élevages de volailles dans le Sud-Ouest de la France pour l'évaluation du risque zoonotique de ces virus. Les CNR-IPP et -HCL ont également été destinataires de souches de virus H5Nx et H5Ny issus de l'épizootie survenue dans le Sud-Ouest de la France en 2015/2016.

## 8 Programme d'activité pour les années 2017-18 et 2018-19

Le programme d'activité prendra en compte l'élargissement du périmètre du CNR aux autres virus respiratoires au-delà de la grippe, conformément aux missions définies dans le cadre du nouveau mandat débuté en avril 2017.

Les deux laboratoires CNR-IPP et CNR-HCL poursuivront leur contribution à la mise en place des protocoles de surveillance de la saison épidémique et de l'intersaison pour la grippe, le VRS et les autres virus respiratoires (HRV, HMPV) en lien avec SpF et les responsables du Réseau Sentinelles. La possibilité d'un renforcement de la surveillance des virus respiratoires dans les EPHAD sera également explorée en lien avec SpF.

Le CNR-IPG poursuivra sa contribution à la surveillance pour la région Antilles-Guyane en lien avec les CIRE Antilles et Guyane.

Au plan des techniques et stratégies d'analyses des prélèvements et souches virales, globalement, les activités pour les virus influenza 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. Pour ce qui concerne les autres virus respiratoires, l'accent sera mis en premier lieu sur la mise en place des techniques nécessaires à la caractérisation des VRS.

L'harmonisation des modalités de recueil des données notamment issues du réseau RENAL sera poursuivie, ainsi que les échanges de prélèvements, souches virales et protocoles pour les virus influenza ainsi que pour les autres virus respiratoires avec une priorité pour le VRS.

### ➤ **Détection virale**

L'harmonisation des techniques moléculaires déjà largement en place entre les trois laboratoires du CNR pour les virus influenza sera étendue à la détection des VRS A et B (CNR-HCL et -IPG) ainsi qu'à la détection des rhinovirus et du hMPV (CNR-IPG).

Le CNR poursuivra le développement autant que de besoin des qRT-PCR pour l'ensemble des sous-types de virus influenza zoonotiques susceptibles d'infecter l'homme (ex : H10N8, H6N1, H5N8 etc..). De plus, des q(RT)-PCR éventuellement multiplex seront développées pour les autres virus respiratoires (hCoV, hPIV,..). Nous n'écartons pas la possibilité d'utiliser des kits commerciaux. 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. Par ailleurs, le CNR réalisera l'évaluation des performances des principales troupes de (RT)-PCR multiplex disponibles sur le marché. Cette évaluation sera assortie d'une évaluation médico-économique dans le cadre du projet RIHN piloté par le CNR-HCL. Cette évaluation sera mise en place avec plusieurs CHU de métropole à compter de la saison hivernale de 2017-2018. Une fiche de recueil d'information est en cours d'élaboration. En parallèle, les techniques de détection rapide disponibles sur le marché ou en développement (TROD et Tests moléculaires rapides) tant pour les virus influenza que pour les VRS seront évalués en premier lieu par le CNR-HCL afin de vérifier la stabilité de leur performance. Une synthèse de ces évaluations sera diffusée via le site web du CNR, et leurs modalités d'utilisation communiquées conjointement avec Santé Publique France (gestion des cas en EHPAD par exemple). Ces évaluations pourront se faire à la demande de la DGS ou de SpF, conjointement avec l'ANSM si une analyse exhaustive des dispositifs commercialisés en France est demandée, puis communiquée par une publication en français (feuilles de Biologie par exemple).

### ➤ **Isolement viral, et identification**

L'isolement viral restera une priorité en vue de la caractérisation phénotypique (caractérisation antigénique et sensibilité aux antiviraux) des isolats et le cas échéant de leur caractérisation génétique complète. L'isolement viral des virus influenza sera réalisé comme par le passé.

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. Des stratégies alternatives (isolement en cellules SIAT ; détection de l'isolement par qRT-PCR ou ELISA, ...) seront mises en œuvre pour pallier ces difficultés et les solutions méthodologiques seront partagées entre les 3 laboratoires du CNR.

Parallèlement, l'isolement des VRS sera mis en œuvre aux CNR-HCL et -IPG, alors que le CNR-IPP s'attachera à établir des partenariats avec des laboratoires hospitaliers proches qui sont en capacité de réaliser cet isolement.

Pour l'isolement viral, on s'attache à disposer d'une sélection représentative en terme spatio-temporel et 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).

### ➤ **Caractérisation phénotypique des isolats**

La caractérisation antigénique des virus influenza sera réalisée comme par le passé par test d'inhibition d'hémagglutination (IHA) à l'aide de sérums de furet fournis par le CCOMS de Londres aux CNR-IPP et -HCL. Une attention particulière sera portée aux virus A(H3N2) pour lesquels la caractérisation antigénique par test d'IHA est difficile du fait de leur capacité d'attachement au récepteur via la neuraminidase. Des tests d'IHA en présence d'oseltamivir ou des tests de microneutralisation seront mis en œuvre autant que nécessaire pour pallier ces difficultés.

L'étude de la sensibilité aux antiviraux sera réalisée comme par le passé aux CNR-IPP et -HCL sur une sélection représentative d'isolats de virus grippaux circulants et plus particulièrement pour les virus isolés de patients en échec thérapeutique. L'étude de la sensibilité aux inhibiteurs de neuraminidase (oseltamivir, zanamivir) sera réalisée par test fluorimétrique. Des tests d'inhibition de la multiplication virale ou de réduction de plaque seront mis en œuvre si besoin pour évaluer la sensibilité à d'autres antiviraux (e.g. T705-Favipiravir) dont la cible est différente.

Pour le CNR-IPG, une sélection de prélèvements ou d'isolats continuera d'être adressée au CNR-IPP en vue de la caractérisation antigénique et des analyses de sensibilité aux antiviraux.

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

La caractérisation génétique des virus sera poursuivie en privilégiant le séquençage direct à partir des prélèvements. L'optimisation des méthodes de séquençage haut débit et de leur analyse en lien avec la plateforme P2M de l'Institut Pasteur et la plateforme de séquençage des HCL permettant le séquençage du génome complet (8 segments) des virus influenza quel que soit le type ou sous-type sera poursuivi. Le séquençage sera réalisé directement à partir de prélèvements dont la charge virale est suffisante pour une sélection aléatoire représentative en terme spatio-temporel des types, sous-types et lignages de virus influenza circulants. Une part de ces analyses de séquences permettront de contribuer aux études d'efficacité vaccinale selon le groupe génétique des virus dans le cadre du projet européen iMove/iMove+. Par ailleurs, on s'attachera à réaliser en priorité le séquençage des prélèvements de cas graves (détection de mutations de virulence), d'échec thérapeutique (détection de mutations de résistance aux antiviraux), ou d'échec vaccinal (détection de mutation d'échappement à la réponse immunitaire). Les optimisations méthodologiques auront pour objectif d'abaisser le seuil de charge virale à partir duquel un séquençage génome entier de qualité peut être obtenu directement à partir des prélèvements positifs

pour un virus grippal. On s'assurera également de la performance de la méthodologie quel que soit le sous-type et l'origine des virus influenza A afin d'être en capacité de l'appliquer en cas d'urgence d'un nouveau virus aviaire ou porcine au potentiel zoonotique. De plus, l'adaptation des méthodes d'analyse sera poursuivie pour une meilleure prise en compte de la diversité des populations virales, y compris des variants minoritaires, pour le suivi de l'évolution virale dans le cadre de la surveillance ou l'investigation de foyers épidémiques.

Par ailleurs, toujours en lien avec la plateforme P2M de l'Institut Pasteur et la plateforme de séquençage des HCL, le développement de méthodes de séquençage haut-débit sans a priori pour le séquençage des VRS ainsi que des autres virus respiratoires (rhinovirus, hMPV, hCoV, etc..) sera poursuivi ainsi que la mise en place d'algorithmes adaptés d'analyse des données. Les données et outils de génotypage des rhinovirus seront partagés avec le CNR des enterovirus (CNR coordonateur à Lyon) qui réalise déjà de nombreuses identifications par génotypage.

Compte tenu des délais nécessaires à l'obtention des analyses par séquençage haut débit, le CNR maintiendra, et si besoin renforcera, ses compétences pour des analyses génétiques ciblées. Ainsi, la qRT-PCR différentielle permettant la détection rapide de la mutation H275Y de résistance à l'oseltamivir reste disponible pour les 3 laboratoires du CNR. D'autres qRT-PCR différentielles seront développées si besoin en cas d'apparition de nouveaux polymorphismes ayant un impact sur le tropisme, la virulence ou la sensibilité aux antiviraux. Par ailleurs, le CNR-IPP maintiendra ses compétences pour 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 d'intérêt.

#### ➤ **Analyses sérologiques**

Les analyses sérologiques pour la grippe 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 par l'utilisation de virus recombinants exprimant un rapporteur fluorescent (CNR-IPP) ou par l'emploi de techniques d'agglutination de particules de latex porteuses de la HA et la NA (CNR-HCL).

Par ailleurs, pour le VRS, les 3 laboratoires du CNR se procureront ou échangeront les sérums et les virus de référence en vue d'une mise en place de méthodes sérologiques pour l'évaluation de la réponse vaccinale le moment venu.

#### ➤ **Activités de surveillance**

Dans le cadre de la collaboration avec le réseau Sentinelles, les laboratoires CNR-IPP et CNR-HCL poursuivront l'adaptation de leurs bases de données, systèmes d'extraction et circuits de communication de données. Comme pour les saisons précédentes, 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. En lien avec SFP, et les responsables du réseau Sentinelles, les CNR-IPP et -HCL s'impliqueront adapter les modalités du recueil de données et de prélèvements pour une meilleure surveillance des VRS (et d'autres virus respiratoires) avec une éventuelle mise en place d'une surveillance pendant l'intersaison selon les moyens disponibles, pour assurer une meilleure représentativité pour la tranche d'âge de plus de 65 ans dans la surveillance communautaire et également pour renforcer la surveillance dans les EPHAD.

Le CNR continuera à assurer, la collecte, et l'analyse de l'ensemble des données virologiques issues du réseau Sentinelles ainsi que (pour) leur transmission à l'ECDC et l'OMS.

Un effort particulier sera poursuivi en direction des laboratoires hospitaliers du réseau RENAL afin d'assurer la qualité du recueil des données virologiques, notamment afin de permettre leur inclusion dans les analyses régionales en temps réel. Comme précédemment, les 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 est moins sensible du fait de l'utilisation d'une définition de cas restrictive. Les efforts seront également poursuivis pour améliorer le recueil des données cliniques associées aux prélèvements ou souches en provenance des hôpitaux ainsi que pour les données de sous-typage des virus A(H3N2). Dans le cadre du renforcement de la surveillance des autres virus respiratoires, et en premier lieu du VRS, une enquête concernant les méthodologies employées pour la détection et éventuellement l'isolement viral sera réalisée auprès des laboratoires du réseau RENAL. Une réunion d'échange avec l'ensemble des laboratoires du réseau RENAL sera organisée suite à cette enquête. Par ailleurs, la possibilité de développer un sous-réseau plus spécifiquement en charge de l'isolement des VRS sera explorée.

Pour la région Antilles-Guyane, le CNR-IPG poursuivra l'analyse des échantillons biologiques issus des surveillances respectivement annuelle et saisonnière en Guyane et aux Antilles, réalisées par les médecins des réseaux sentinelles locaux.

La stratégie de surveillance a également été renforcée avec le laboratoire du centre hospitalier de Cayenne (CHC) qui transmet au CNR-IPG, l'ensemble des prélèvements détectés positifs pour les virus grippaux et pour les VRS. Dans le cadre de l'élargissement de la surveillance aux autres virus respiratoires, pour les patients hospitalisés présentant des signes cliniques graves (en pédiatrie et en réanimation), le laboratoire du CHC transmet au CNR-IPG tous les prélèvements que les résultats de recherche des virus grippaux et VRS soient positifs ou négatifs. Le CNR-IPG transmet en retour aux médecins du réseau sentinelle ainsi qu'au laboratoire du CHC, les résultats des analyses biologiques effectuées.

Par ailleurs, l'adaptation des outils informatiques de recueil de données microbiologiques et sérologiques auprès des correspondants du réseau RENAL par Internet (logiciel Voozoo développé par Epiconcept) sera poursuivie afin de prendre en compte les évolutions du système de surveillance. Le système de recueil unique RENOG pour l'ensemble des laboratoires participants continuera de servir 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 SpF et la DGS avec les différents acteurs impliqués dans la surveillance de la grippe pour l'optimisation du réseau de surveillance et plus généralement du système de surveillance de la grippe et des autres virus respiratoires.

Pour la Guyane, le CNR IPG en lien avec les CIRE Antilles et Guyane s'impliquera dans la réactivation des systèmes de surveillance de la grippe fin 2017.

### ➤ 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.

Suite aux inspections COFRAC, les CNR-IPP et -IPG, dans le cadre du LREMS et le CNR-HCL bénéficient d'ores et déjà d'une accréditation pour une partie des méthodes de détection.

➤ **Activités de conseil, formation, information**

Le CNR poursuivra ses actions de formation et d'information dans le domaine, par l'accueil de stagiaires nationaux ou internationaux, ainsi que par des communications nationales et internationales, la participation à des enseignements et les relations avec la presse.

Le CNR continuera comme par le passé à apporter à SpF et aux instances d'expertise publique (HCSP, DGS, Anses, etc...) son expertise dans le domaine de la prévention et du contrôle de la grippe, du coronavirus, du VRS et plus largement des virus à tropisme respiratoire responsables de syndromes grippaux saisonniers ou émergents. De manière générale le CNR s'efforcera comme par le passé à s'impliquer dans les groupes de travail et à répondre aux sollicitations des instances nationales (SpF, HCSP, DGS, ANSES, etc..), européennes (ECDC) et internationales (OMS) dans son champ d'expertise.



**Annexes**

**2017**

**Centre national de  
référence des virus  
influenzae/ Centre National  
de Référence des virus des  
infections respiratoires  
(dont la grippe)**

**Saison  
2016-2017**



# Sommaire

<b>ANNEXE 1 : MISSIONS ET OBJECTIFS .....</b>	<b>4</b>
<b>ANNEXE 2 : EQUIPES ET ORGANIGRAMMES.....</b>	<b>6</b>
<b>ANNEXE 3 : PLANS DES LOCAUX.....</b>	<b>9</b>
<b>ANNEXE 4 : LISTE DES PRINCIPAUX EQUIPEMENTS.....</b>	<b>13</b>
<b>ANNEXE 5 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR .....</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Techniques de détection .....</b>	<b>16</b>
1.1.1 Techniques de (RT)-PCR en temps réel (q(RT)-PCR) .....	16
1.1.2 Autres techniques de détection .....	18
<b>1.2 Techniques d'isolement .....</b>	<b>18</b>
<b>1.3 Techniques d'identification .....</b>	<b>18</b>
<b>1.4 Caractérisation génétique des virus influenza.....</b>	<b>18</b>
1.4.1 Techniques de détection de polymorphismes génétiques.....	18
1.4.2 Techniques de séquençage .....	18
<b>1.5 Techniques sérologiques .....</b>	<b>19</b>
<b>1.6 Caractérisation phénotypique des virus grippaux.....</b>	<b>19</b>
<b>Annexe 6 : PLATEFORME DE SEQUENCAGE HAUT DEBIT .....</b>	<b>20</b>
<b>ANNEXE 7 : DESCRIPTION DES COLLECTIONS.....</b>	<b>22</b>
<b>ANNEXE 8 : LISTE DES LABORATOIRES .....</b>	<b>25</b>
<b>ANNEXE 9 : TECHNIQUES DIVERSES .....</b>	<b>27</b>
<b>ANNEXE 10 : ANALYSE PHYLOGENETIQUE DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES DES GENES HA ET NA DES VIRUS DE TYPE A ET B .....</b>	<b>28</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 (SpF 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.

Suite à l'élargissement du périmètre du CNR lors de la redésignation en 2017, les activités de caractérisation virale seront étendues aux autres virus respiratoires avec une mise en place en priorité pour les VRS.

Les laboratoires du CNR effectuent également l'analyse virologique des prélèvements en cas de suspicion de virus respiratoire émergent tel que le MERS-CoV et, le cas échéant en cas de diagnostic positif, de réaliser l'isolement et de caractériser la souche virale.

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 des infections respiratoires (dont la grippe) et ses laboratoires associés s'engagent à assurer les missions définies par le décret n° 2016-806 du 16 juin 2016 relatif aux centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles et par l'arrêté du 16 juin 2016 fixant le cahier des charges des centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles.

Les missions du CNR définies comme suit pourront être élargies à d'autres virus respiratoires dont l'épidémiologie future, au niveau national ou international, le justifierait.

### **1. Expertise**

- en conservant et en développant la collection de souches de virus grippaux et de VRS ;
- en développant et en diffusant les techniques de diagnostic et d'identification des virus influenzae, VRS et des principaux autres virus respiratoires ;
- en caractérisant les souches de virus grippal et de VRS adressées au CNR ;
- en contribuant à l'identification et à la surveillance des souches de virus grippaux et le cas échéant de VRS résistantes aux antiviraux ;
- en maintenant les capacités de culture cellulaire sur différentes lignées ;
- en développant ou en validant des techniques de diagnostic multiplex et en évaluant leur intérêt dans la surveillance ;
- en diffusant, le cas échéant, les techniques de diagnostic multiplex au sein d'un réseau de laboratoires hospitaliers ;

- en étudiant l'adéquation de la composition du vaccin contre la grippe au regard des souches virales circulantes ;
- en analysant et en sélectionnant les souches de virus grippal les plus pertinentes pour les envoyer vers les centres mondiaux de référence de l'OMS ;
- en disposant d'un accès, en tant que de besoin, à un laboratoire de haute sécurité (BSL 3) ;
- en acquérant ou en maintenant une expertise sur le coronavirus (technique diagnostique, caractérisation du virus, etc.) et en développant cette expertise sur les autres virus respiratoires émergents, le cas échéant.

## **2. Conseil**

- en apportant à l'agence nationale de santé publique et aux instances d'expertise public (HCSP, DGS, Anses, etc.) son expertise dans le domaine de la prévention et du contrôle de la grippe, du coronavirus, du VRS et plus largement des virus à tropisme respiratoire responsables de syndromes grippaux ;
- en contribuant aux travaux de préparation à une pandémie de la Direction Générale de la Santé.

## **3. Contribution à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'agence nationale de santé publique**

- en contribuant à la surveillance virologique du virus grippal et du VRS (détection des premiers virus sur le territoire et évolution hebdomadaire du nombre et des caractéristiques des souches circulantes) en lien avec les structures concernées (réseaux de médecins et d'établissements hospitaliers) ;
- en animant un réseau de laboratoires hospitaliers capables de mettre en oeuvre les techniques de sous-typage des virus de la grippe ;
- en assurant la disponibilité de données de typage des virus responsables de cas graves ;
- en réalisant des analyses génomiques des virus responsables de cas graves ;
- en actualisant de façon pluri-hebdomadaire la base de données de la surveillance en médecine de ville avec les données virologiques concernant le virus grippal et le VRS ;
- en fournissant chaque semaine en amont des réunions hebdomadaires de surveillance de la grippe, un bilan virologique issu de la surveillance en ville et à l'hôpital et intégrant, le cas échéant, des informations sur les principaux autres virus respiratoires circulants ;
- en participant, durant la période de surveillance virologique de la grippe aux réunions hebdomadaires d'analyse de la situation ;
- en contribuant aux surveillances européennes et internationales en fournissant les données virologiques françaises sur les virus grippaux et le cas échéant le VRS, selon les procédures en vigueur ;
- en mettant en place une surveillance virologique adaptée en cas de menace pandémique grippale et en développant des outils de diagnostic adaptés (PCR, tests sérologiques...) ;
- en contribuant à la surveillance des souches grippales chez l'animal, en particulier aviaires et en collaborant avec des laboratoires experts dans le domaine de la surveillance des virus grippaux aviaires (LNR) ;
- en contribuant à la surveillance virologique du coronavirus, de la grippe aviaire ou autres émergences virales respiratoires (confirmation des cas possibles de coronavirus, de grippe aviaire ou d'autres émergences virales respiratoires, mise au point, validation et diffusion des techniques).

## **4. Contribution à l'alerte**

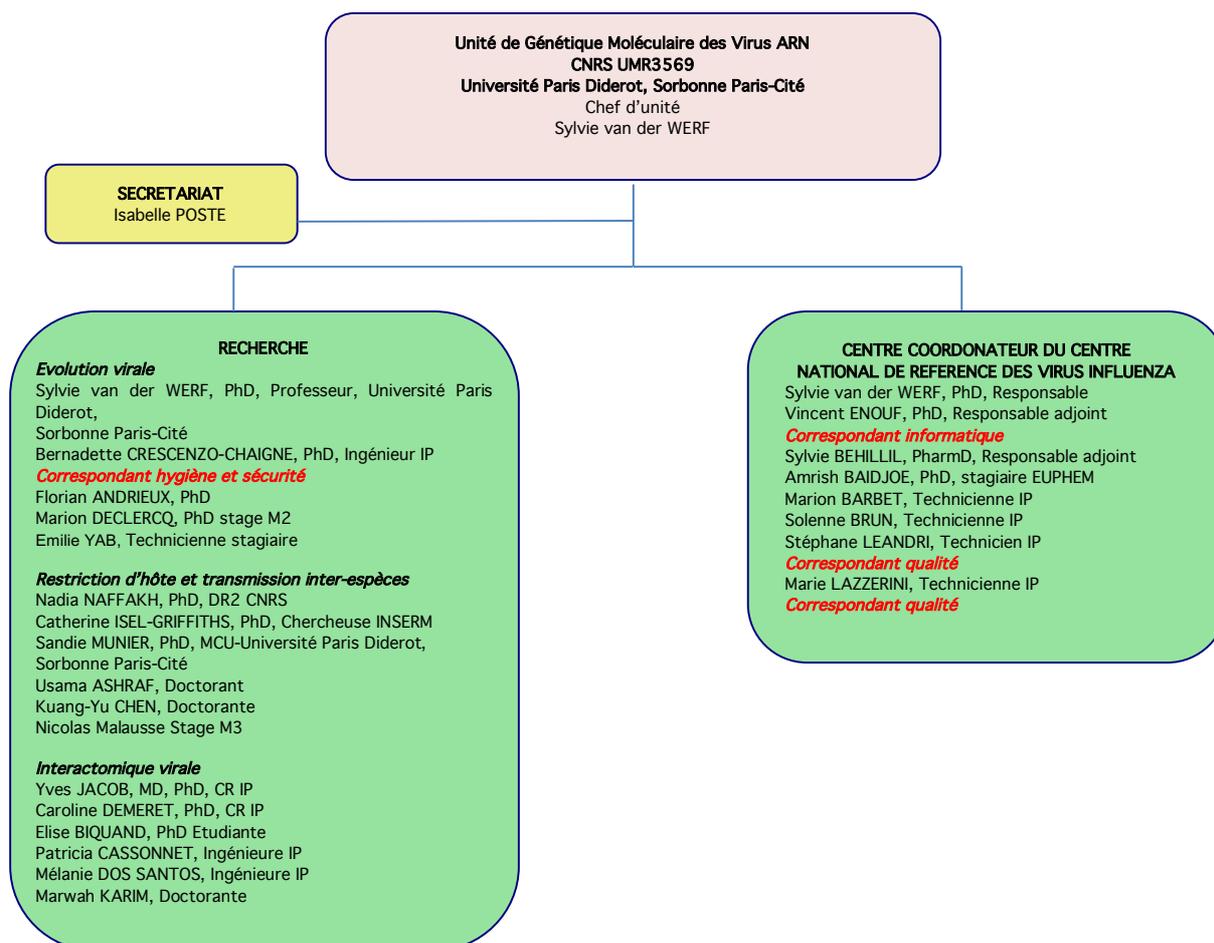
- en signalant à l'agence nationale de santé publique tout événement inhabituel (mutation, émergence d'une nouvelle souche, apparition de résistance aux antiviraux, formes cliniques inhabituelles, etc.) ;
- en répondant aux demandes d'informations complémentaires de l'agence nationale de santé publique concernant les caractéristiques virologiques des virus respiratoires circulant.

## 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	0,60
BEHILLIL	Sylvie	Responsable adjoint	Pharm	IP, Paris	0,75
BARBET	Marion	Technicien supérieur		IP, Paris	0,9
BRUN	Solenne	Technicien supérieur		IP, Paris	0,9
LAZZERINI	Marie	Technicien supérieur		IP, Paris	0,9
POSTE	Isabelle	Assistante		IP, Paris	0,5

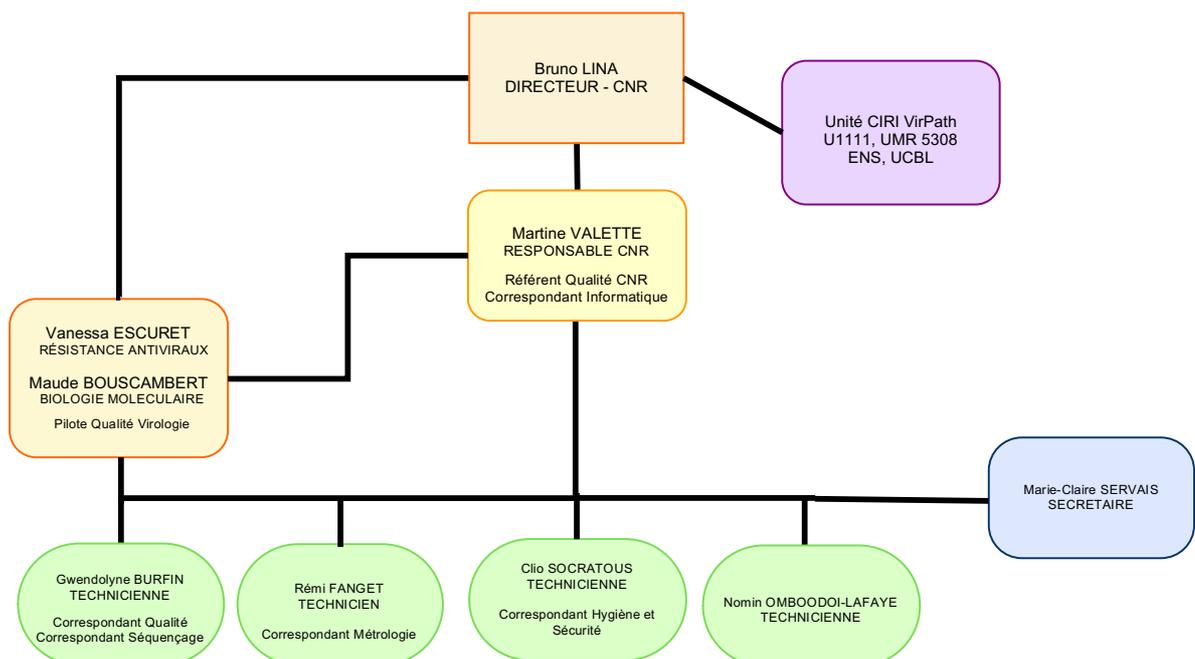
### Organigramme



➤ **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	0,8
BOUSCAMBERT	Maude	Praticien hospitalier	Pharm; PhD	HCL	0,15
ESCURET	Vanessa	MCU-PH	Pharm; PhD	HCL & UCBL	0,1
BURFIN	Gwendolyne	Technicien titulaire		HCL	0,9
FANGET	Rémi	Technicien titulaire		HCL	0,9
SOCRATOUS	Clio	Technicien contractuel		HCL & Contrat privé	1
OMBOODOI- LAFAYE	Nomin	Technicien contractuel/8 mois		HCL (contrat recherche)	1
SERVAIS	Marie-Claire	Secrétaire médicale		HCL	0,4

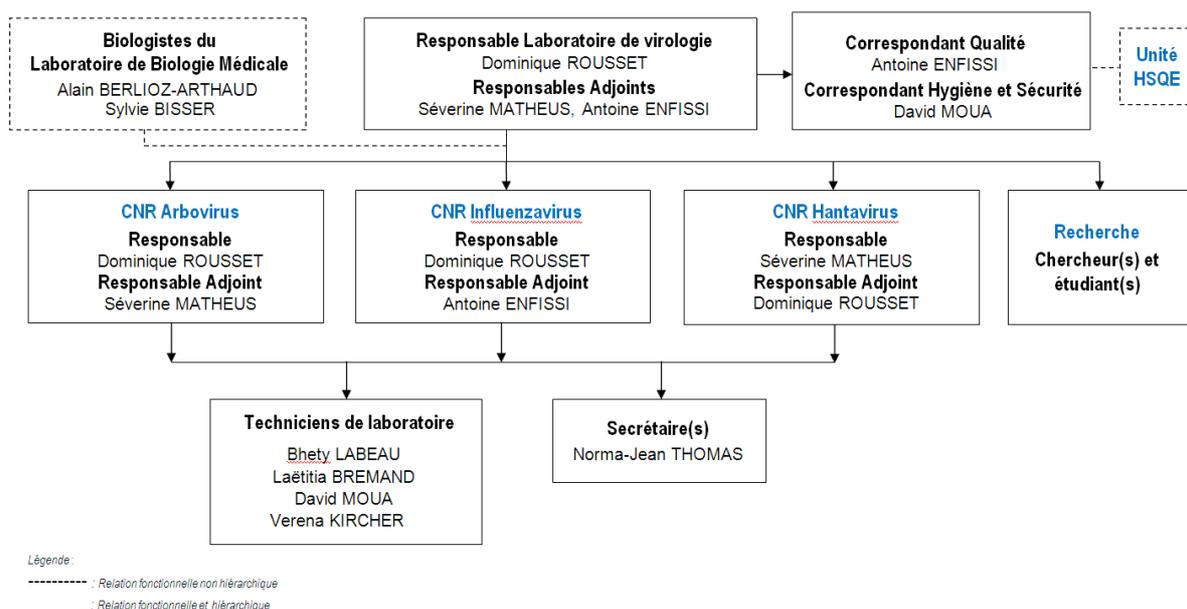
**Organigramme**



➤ **CNR-IPG**

Nom	Prénom	Fonction	Qualification	Organisme Payeur	ETP CNR Virus influenzae
ROUSSET	Dominique	Responsable	MD, PhD	IP, Paris	0,05
ENFISSI	Antoine	Responsable adjoint	PhD	IP, Guyane	0,9
BREMAND	Laetitia	Technicienne	BTS	IP, Guyane	0,5

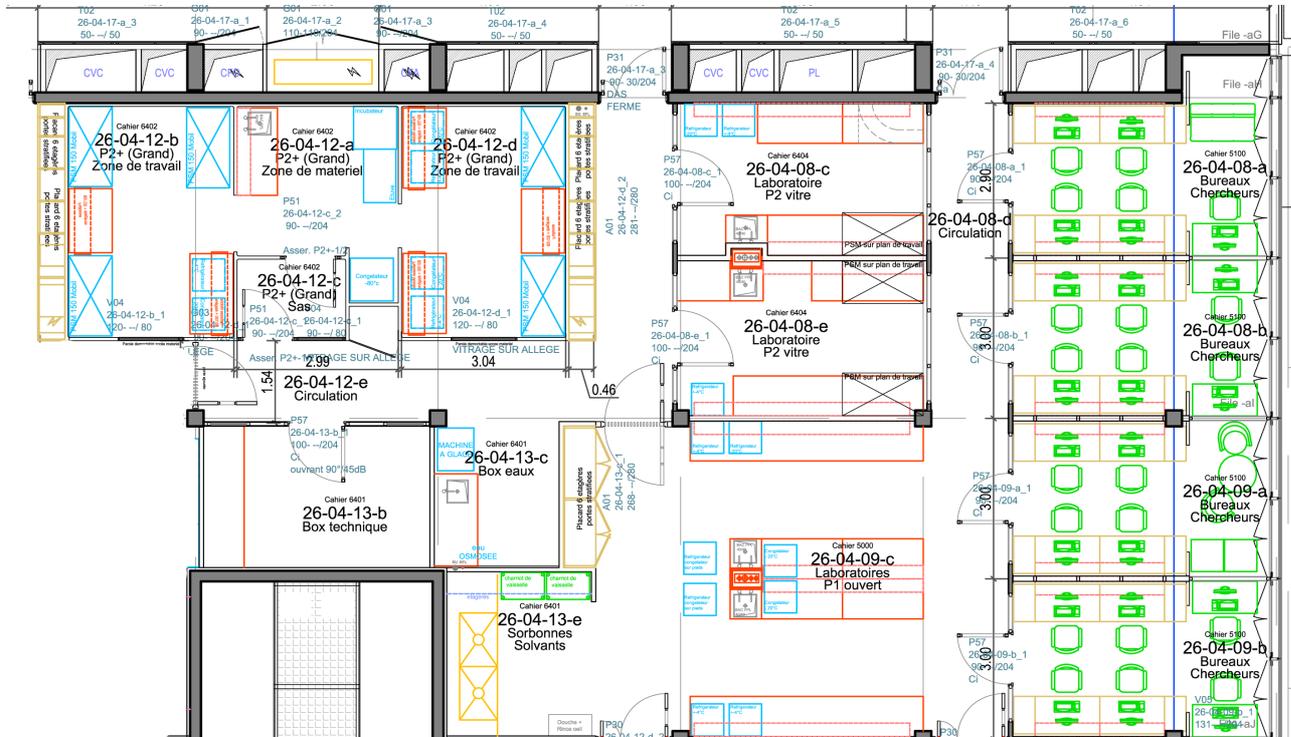
**Organigramme**



## ANNEXE 3 : PLANS DES LOCAUX

### ➤ CNR-IPP

#### Centre François Jacob / étage 4



Bureaux : 26-04-08a / 26-04-08b / 26-04-09a

LSB2+ : 26-04-12

Réception échantillons : 26-04-08c

Culture cellulaire : 26-04-08e

Biologie moléculaire : 26-04-09c

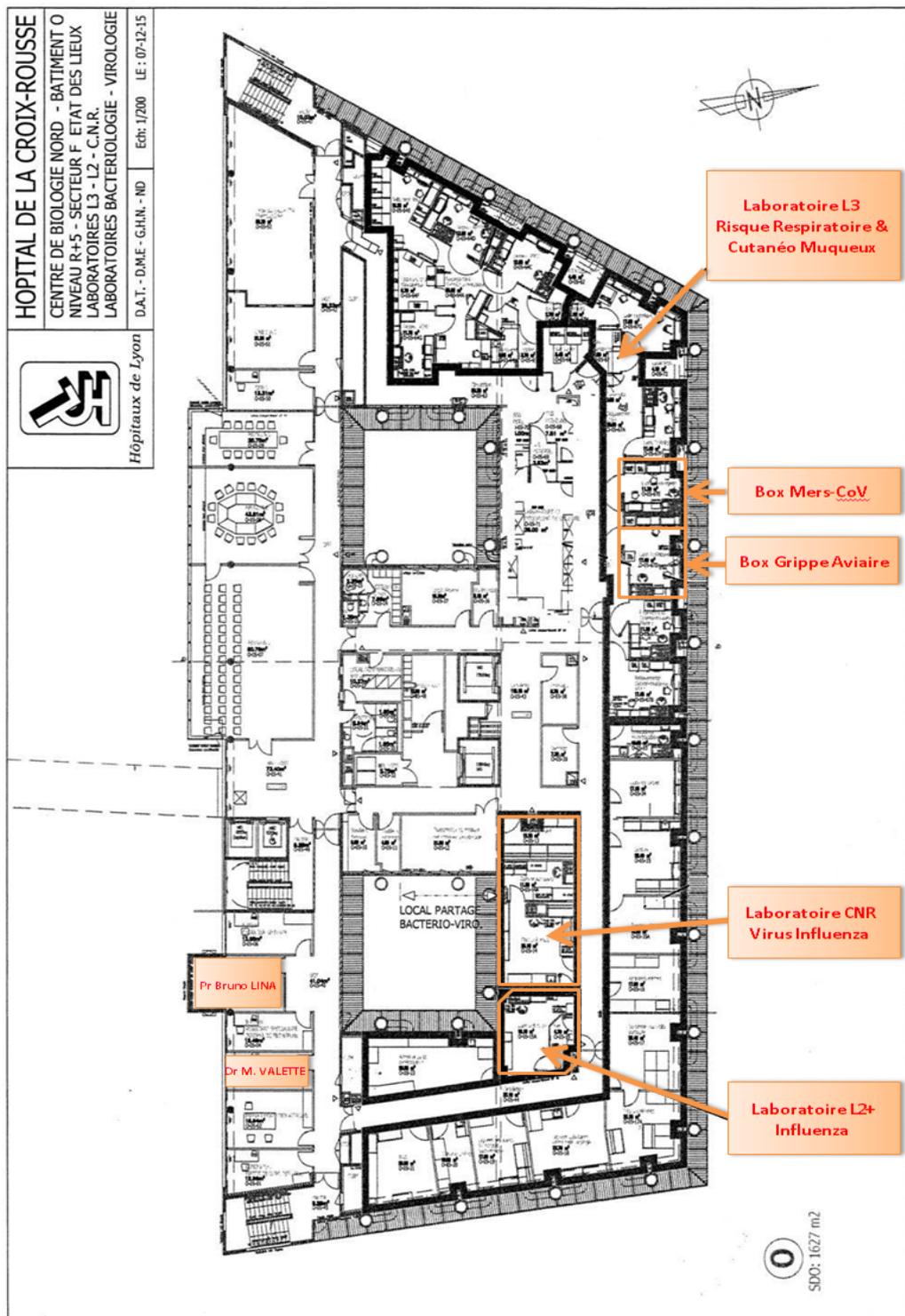
Stockage matériel : 26-04-13b

Un laboratoire type LSB2 (pièces 26-S2-10) est utilisé quasi 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**

**Pôle HCL : Plan des locaux du Centre de Biologie Nord – IAI – 5<sup>e</sup> étage**



## ➤ CNR-IPG

Le laboratoire de virologie dispose d'une surface de 310 m<sup>2</sup> (plan annexe 43).

Outre les bureaux du personnel, le laboratoire de virologie comprend :

- une salle (pièce 248) où sont réalisées la réception et l'aliquotage des échantillons (35 m<sup>2</sup>). Ce local est équipé d'un PSM, d'une centrifugeuse réfrigérée, d'un bain-marie, d'un incubateur, d'agitateurs magnétiques, d'un pH-mètre, d'une balance de précision, d'un congélateur -20°C, d'un laveur de plaques, d'un lecteur de plaques, d'un réfrigérateur, d'une machine à glace et d'une hotte chimique.
- un laboratoire LSB2 (pièces 247 et 246) dédié à l'entretien des cultures cellulaires, à l'isolement des virus de classe 2 (25 m<sup>2</sup>). Ce laboratoire est équipé de deux PSM, d'une centrifugeuse réfrigérée, de 3 incubateurs (28°C, 37°C et 37°C atmosphère 5% CO<sub>2</sub>) et d'un microscope inversé.
- un laboratoire LSB2 dédié aux activités de biologie moléculaire de 20 m<sup>2</sup> comprenant une pièce pour la préparation des mix réactionnels (pièce 244b) et une pièce pour l'extraction des ARN (pièce 244). Cet espace est équipé d'un PSM pour la préparation des mix, d'une centrifugeuse réfrigérée haute vitesse, de deux micro-centrifugeuses, de deux congélateurs -20°C, de deux réfrigérateurs, d'une hotte à UV utilisée pour le dépôt des ARN et d'un bloc chauffant.
- le nouveau laboratoire LSB3 de 70 m<sup>2</sup>. Il est équipé de 2 PSM, d'un congélateur -80°C, d'un incubateur à CO<sub>2</sub>, d'une centrifugeuse et d'un microscope.

Le laboratoire partage également avec l'ensemble des équipes de l'institut, une plateforme technique de biologie moléculaire. Le laboratoire y dispose de trois thermocycleurs (GeneAmp 9700 Applied Biosystems), de trois thermocycleurs de PCR en temps réel (Applied Biosystems ABI7300, StepOnePlus® et Roche LC480) et d'une hotte PCR située dans une pièce spécifique, dédiée à la préparation des PCR nichées. Plusieurs générateurs aect cuves d'électrophorèse horizontales ainsi qu'une station de capture d'image sont également mutualisés entre différents laboratoires de l'IPG.

Enfin, le laboratoire dispose de 3 congélateurs -20°C et de 5 congélateurs -80°C situés dans une salle climatisée.



Plan général du laboratoire de virologie

## ANNEXE 4 : LISTE DES PRINCIPAUX EQUIPEMENTS

### ➤ CNR-IPP

Qtité	Désignation	Utilisation
11	POSTE de SECURITE MICROBIOLOGIQUE	partagés
9	POMPE A VIDE	partagées
3	MICROCENTRIFUGEUSE	partagées
5	CENTRIFUGEUSE REFRIGEREE	partagées
6	RERIGERATEUR +4°C	partagées
5	RERIGERATEUR/CONGEL	
8	CONGELATEUR -20°C	partagés
7	CONGELATEUR -80°C	partagés
1	CONTAINER D'AZOTE LIQUIDE	
8	INCUBATEUR A CO2	partagés
1	LECTEUR DE MICROPLAQUES	partagés
1	LAVEUR DE MICROPLAQUES	partagés
1	PLAQUE CHAUFFANTE	
1	AGITATEUR MAGNETIQUE	
11	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
1	ACCÈS PLATEFORME P2M*	partagé
1	EXTRACTEUR AUTOMATIQUE (MDX QIAGEN)	Commun CIBU/CNR

\* La Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M) permet au CNR de disposer de personnels qualifiés et des dernières technologies dans les domaines du séquençage haut débit (NGS – Illumina/Ion Torrent) et de l'extraction d'acides nucléiques par automate (Roche Diagnostics).

➤ **CNR-HCL**

Qtité	Désignation	Utilisation
4	POSTE de SECURITE MICROBIOLOGIQUE	
2	POMPE A VIDE	
2	MICROCENTRIFUGEUSE	
1	CENTRIFUGEUSE	
2	RERIGERATEUR	
1	RERIGERATEUR/CONGEL	
6	CONGELATEUR -20°C	
4	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	
2	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 nord utilisés par le CNR des Virus Influenzae pôle 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
1	MICROSCOPE INVERSÉ	
1	COMPTEUR DE CELLULES	

**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
2	THERMOCYCLEURS ABI	1 en prêt pour étude MERS-CoV
2	THERMOCYCLEURS EPPENDORF	
1	CENTRIFUGEUSE DE PLAQUES PCR	
1	CENTRIFUGEUSE DE PAILLASSE	
2	VORTEX	

## Equipement Antivirogrammes

Qtité	Désignation	Utilisation
1	FLUORIMETRE	

### ➤ CNR-IPG

Qtité	Désignation			
4	PSM			
2	CENTRIFUGEUSE RÉFRIGÉRÉE			
1	CENTRIFUGEUSE RÉFRIGÉRÉE HAUTE VITESSE			
3	BAIN-MARIE			
4	INCUBATEURS			
2	INCUBATEURS A CO2			
2	MICROSCOPES			
2	MICROSCOPES INVERSÉS			
1	PH-MÈTRE			
1	BALANCE DE PRÉCISION			
3	CONGÉLATEUR -20°C			
5	CONGÉLATEUR -80°C			
1	LAVEUR DE PLAQUES			
1	LECTEUR DE PLAQUES			
1	MACHINE A GLACE			
1	HOTTE CHIMIQUE			
1	HOTTE BIOCAP			
3	THERMOCYCLEURS	GENEAMP	9700	APPLIED BIOSYSTEMS
	THERMOCYCLEURS TEMPS RÉEL :			
1	APPLIED BIOSYSTEMS ABI7300			
1	APPLIED BIOSYSTEMS STEPONEPLUS			
1	ROCHE LC480			

### 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. En complément, la détection des VRS, hMPV et HRV est réalisée en routine sur les prélèvements communautaires.

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 laboratoires du 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 aviaries des sous types suivants : H5 (2 formats ciblant des régions distinctes pour les clades 1, 2 et 3), H5 de H5N8, H7, H9, H10, N1av, N7, N9, N8(H10), N8(H5) 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 aviaries 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 aviaries 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 la région NTR5'(1) pour la détection des entérovirus D68 (CNR-IPP & – HCL)
- qRT-PCR ciblant le gène N pour la détection des VRS A (CNR-IPP & IPG)
- qRT-PCR ciblant le gène de la polymérase pour la détection des VRS B (CNR-IPP, HCL & 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 SARS-CoV, CNR-IPP
- qRT-PCR ciblant le gène N pour la détection du SARS-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 SARS-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 contrôles

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 / taille <500 pb)
- qRT-PCR ciblant le gène H10 du virus aviaire H10N8
- qRT-PCR ciblant le gène N8 du virus aviaire H10N8
- qRT-PCR ciblant le gène H5 du virus aviaire H5N8
- qRT-PCR ciblant le gène N8 du virus aviaire H5N8
- qRT-PCR ciblant le gène N9 du virus aviaire H7N9
- qRT-PCR ciblant le gène H7 du virus aviaire H7N9
- qRT-PCR ciblant le gène POL du SARS-CoV
- qRT-PCR ciblant le gène N du SARS-CoV
- qRT-PCR ciblant le gène UpE du MERS-CoV (transcrit non MOT)

- qRT-PCR ciblant le gène ORF1a du MERS-CoV (transcrit non MOT)
- 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 (CNR-IPP)
- isolement des virus influenza A, B, C sur œuf de poule embryonné voie amniotique ou allantoïque (CNR-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 (CNR-IPP, -HCL, -IPG)
- S31N gène M des H1N1pdm09 et H3N2 : pyroséquençage (CNR-IPP)
- I223R gène NA du H1N1pdm09: pyroséquençage (CNR-IPP)
- H275Y gène NA des H1N1 et H1N1pdm09 : pyroséquençage (CNR-IPP)
- D222G/E/N gène HA du H1N1pdm09 : pyroséquençage (CNR-IPP)
- E119V gène NA des H3N2: pyroséquençage (CNR-IPP)
- R292K gène NA des H3N2: pyroséquençage (CNR-IPP)
- N294S gène NA des H3N2: pyroséquençage (CNR-IPP)

### 1.4.2 Techniques de séquençage

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

En plus du séquençage conventionnel couramment utilisé jusqu'à maintenant, le CNR-IPP réalise aussi du séquençage haut débit (NGS) grâce à la Plateforme de Microbiologie Mutualisée P2M (IPP) (annexe 6). Cela permet de séquencer un grand nombre de virus à la fois et l'ensemble de leurs 8 segments et ainsi de suivre l'évolution des mutations d'intérêt comme celles responsables de variations de sensibilité aux antiviraux ou de virulence.

Le CNR-HCL a développé le séquençage haut débit (NGS). La stratégie adoptée au CNR-HCL est de sélectionner d'une part des échantillons de la surveillance représentatifs de l'épidémie (répartition géographique, début, pic & fin de l'épidémie) pour lesquels le séquençage porte essentiellement sur le gène de l'hémagglutinine. D'autre part, un autre

échantillonnage est réalisé pour les échantillons de patients hospitalisés (cas graves, réanimation), pour les excrétiens prolongés, pour des situations particulières (cas groupés EHPAD ..) le séquençage porte alors sur les 8 segments.

### **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 ou autres composés inhibiteurs

## **ANNEXE 6 : PLATEFORME DE SEQUENCAGE HAUT DEBIT**

---

### **➤ PLATEFORME DE MICROBIOLOGIE MUTUALISEE (P2M) - IPP**

La Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M) est ouverte à l'ensemble des CNR ainsi qu'aux laboratoires de référence dans le Réseau International des Instituts Pasteur et instituts associés. Dans un esprit de mutualisation technologique, P2M regroupe les demandes et permet ainsi l'utilisation en routine, jusqu'ici impossible, du séquençage à haut débit multi-pathogènes (NGS par les technologies **Illumina** et **Ion Torrent**).

Cette plateforme P2M est située dans le bâtiment Pasteur Bio-Top (au deuxième étage), où est regroupé l'ensemble des plateformes de séquençage NGS de l'Institut Pasteur (OMICS Center). Le regroupement de ces structures a permis de mutualiser les locaux et de favoriser les échanges afin d'optimiser les processus de production de séquences. L'Institut Pasteur fait également appel au savoir-faire de la société IntegraGen dans le domaine de l'organisation du séquençage NGS. Celle-ci apporte une organisation rigoureuse et adaptée qui permet de limiter les coûts, tout en assurant la rapidité et la régularité de production des séquences, nécessaires pour que cette méthode devienne la référence en termes de surveillance épidémiologique.

En plus du responsable de P2M (Vincent ENOUF) et d'une technicienne supérieure de laboratoire de l'Institut Pasteur, à temps plein, l'équipe de production est complétée par du personnel de la société IntegraGen (un chef de production et une technicienne, et si nécessaire, un technicien en cas d'absence ou d'urgence). Des bioinformaticiens missionnés par le Centre de Bioinformatique, Biostatistique et Biologie Intégrative (C3BI) de l'Institut Pasteur réalisent les tests de qualification en sortie de séquenceur et apportent également leur aide, si besoin, aux laboratoires, pour la mise en place de « pipelines » d'analyse des séquences. Actuellement, deux bio-informaticiens (1,5 ETP) apportent leurs compétences aux CNR, encadrés par Sylvain Brisse, qui a initié et coordonné les analyses bioinformatiques au sein de la plateforme.

Le séquençage est réalisé avec la technologie Illumina. Les banques sont préparées avec le kit Nextera XT et engagées sur le séquenceur NextSeq 500. Une série de matériels est également utilisée pour réaliser les contrôles de qualité tout au long du processus de fabrication de séquence. Des robots pipeteur et extracteur permettent d'homogénéiser et de normaliser les ADN et amplicons avant d'entrer dans le pipeline de production. Au plan pratique, les extractions d'acides nucléiques sont réalisées les mercredi et jeudi. Le protocole de fabrication de librairies est unique quel que soit le pathogène (bactéries, virus, champignons ou parasites) concerné. Ce choix permet d'optimiser les délais et, ainsi, d'intégrer cette technologie dans le panel des outils de surveillance microbiologique. Les librairies sont préparées tout au long de la semaine et deux runs de séquençage sont lancés chaque semaine. L'achat d'un nouveau séquenceur va apporter plus de flexibilité, le nouvel objectif étant fixé à 4 runs par semaine. Plusieurs équipements sont en « libre-service », par exemple un extracteur automatique (qui permet de réaliser l'extraction de grandes séries d'échantillons dans le cadre d'épidémie par exemple), ou le MALDI-TOF.

### **➤ PLATEFORME DE SEQUENCAGE A HAUT DEBIT - HCL**

La plateforme de Séquençage à Haut débit à visée diagnostic des Hospices Civils de Lyon (HCL) ouverte à tous les laboratoires des HCL, incluant les Centres Nationaux de référence est centralisé en un centre de biologie dédié, au sein de la plateforme BioGenet. Cette plateforme regroupe l'ensemble des innovations technologiques dans le domaine de la biologie moléculaire, de l'ensemble des HCL, avec en premier lieu les technologies de séquençage. Cette mutualisation logistique et financière permet l'utilisation en routine, au

prix de contrainte logistique (site géographique différent) de technologies de séquençage à visée microbiologique (technologie de pyroséquençage ABI 7500 comme de NGS Illumina NextSeq, MiSeq et Ion torrent PGM ou Proton).

Cette plateforme commune de biotechnologies, est située au 3e étage du Centre de Biologie et de Pathologie Est des HCL. La mutualisation des locaux par pôles d'activité a permis aux HCL de regrouper les laboratoires et CNR d'expertise proche (Biochimie/Biologie Moléculaire ; Hématologie/Immunologie et Institut des Agents Infectieux) tout en facilitant les échanges inter-équipes de différents domaines d'expertises. Cependant cette organisation génère une complexification des manipulations transdisciplinaire comme le séquençage de nouvelle génération,

En plus du responsable du séquençage pour le laboratoire (Dr Laurence Josset), d'un interne en cours de Thèse de Sciences (Maxime Pichon) et d'une technicienne du CNR (Gwendolyne Burfin), l'équipe de production est assistée par du personnel de la plateforme de séquençage en cas de nécessité technique ou logistique. Des bio informaticiens du Laboratoire de Bioinformatiques des HCL, coordonnées par le Dr Claire Bardel, apportent leur aide, si besoin, au laboratoire, pour la mise en place de « pipelines » d'analyse des séquences. Actuellement, à l'exception des 3 personnes réalisant la production des données, aucune ressource extérieure bioinformatique n'est disponible pour les analyses du CNR.

Dans le cadre de la routine et de l'activité de recherche du CNR le séquençage est réalisé de manière standardisée bien qu'en constante amélioration avec la technologie Illumina. La préparation des banques est réalisée de manière semi-automatisée avec le kit Nextera XT en vue d'un séquençage sur NextSeq 500. Une optimisation des processus (pré-) analytique au moyen de l'intégration de contrôles positifs plasmidiques permet de valider la qualité de la production des données de séquençage, en terme de séquence de consensus comme en terme de détection de variants minoritaires. L'utilisation d'extracteur automatisé (EasyMag®) et de robots pipeteur (Caliper Sciclone® Zephyr®) La standardisation de ce processus de production, commun à l'ensemble des laboratoires de l'Institut des Agents Infectieux, permet de répondre efficacement aux urgences analytiques, en répondant de manière adaptées aux contraintes logistiques. Ainsi un rythme d'un run toutes les 3 à 4 semaines en période épidémique a pu être réalisé au cours de la saison 2016-2017, permettant de répondre efficacement aux besoins de notre mission.

## **ANNEXE 7 : 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 (CNR-IPP), 18.000 prélèvements (CNR-HCL), environ 3300 prélèvements (CNR-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 CNR-IPP avec l'aide de la CRBIP. Une sélection de souches de virus grippaux parfaitement caractérisés est également proposée via l'infrastructure EVAg (CNR-IPP). 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 CNR- 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 CNR-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 CNR-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 (CNR-IPP et/ou -HCL). De par son statut de laboratoire de référence H5 de l'OMS, le CNR-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 (CNR-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 (CNR-IPP, CNR-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 (CNR-IPP, -HCL).

### **Collections de Sérums**

Les CNR-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 CNR-HCL et -IPP (sérums de lapin, certains sérums de furet) ou ont été obtenus auprès des CCOMS, notamment des CCOMS de Londres et d'Atlanta.

En tant que laboratoire de référence H5 du réseau de l'OMS, le CNR-IPP dispose également en quantité limitée de sérums de furet dirigés contre les principaux représentants des différents 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 équines sont également disponibles (CNR-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 (CNR-IPP et -HCL) et H5N1 (CNR-IPP) sont disponibles. Une collection limitée de sérums humains est également à disposition (CNR-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 (CNR-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 (CNR-IPP, -HCL). En cas de besoin, les souches ou les isolats peuvent être lyophilisés (CNR-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 laboratoires 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 (CNR-IPP, -IPG et -HCL) :

L'accès aux souches, aux prélèvements biologiques et données associées collectés dans le cadre de l'activité du CNR-IPP 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 (CNR-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 CNR-IPP, -IPG et -HCL 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 CNR-IPP, -IPG et -HCL n'assument aucune responsabilité quant à l'utilisation du matériel biologique par le partenaire.

## ANNEXE 8 : LISTE DES LABORATOIRES

---

### a) Réseau RENAL

#### Région Nord

Région	Responsable(s)
<b>Ile de France</b>	
Ambroise Pare	Dr E. GAULT
Avicenne	Dr P. DENY
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 AFONSO-ROQUE
Pitie Salpetrière	Pr H. AGUT
Robert Debré	Dr E. BINGEN
Saint-Louis	Pr F. SIMON
Cochin	Pr F. ROZENBERG
Trousseau-Saint Antoine-Tenon	Pr A. GARBARG-CHENON
Pontoise	Dr M. THIBAUT
Poissy	Dr V. SERAZIN
Foch	Dr FARFOUR
<b>Province</b>	
Strasbourg	Pr F. STOLL-KELLER
Dijon	Dr JB BOUR
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
Elbeuf	Dr G. GRISE

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 échanges avec des organismes extérieurs

### Exportations

#### ➤ CNR-IPP

Adresse	Interlocuteur	Désignation produit	Date
CHU Reims	Pr ANDREOLETTI	Prélèvements respiratoires	2016/2017
F Crick Institute Londres	Pr John McCAULEY	Virus grippaux saisonniers	09/01/2017
F Crick Institute Londres	Pr John McCAULEY	Virus grippaux saisonniers	04/07/2017
CIBU	C. BATEJAT	Primers H5N8	06/12/2016
INRA	F. LEFEVRE	Virus grippal A(H3N2)	16/11/2016
INRA	M. DUCATEZ	virus grippal de type C	29/11/2016
Paul BROUSSE	Dr DEBACK	Protocole PCR de détection	26/11/2015

#### ➤ CNR-HCL

Adresse	Interlocuteur	Désignation produit	Date
CHU Poitiers	Dr GIREAUDEAU	Cellules MDCK	19/09/2016
LBM BIO-ALPES	Dr KUNTZELMANN	Virus grippaux (A(H1N1)pdm09 – B)	26/10/2016
ANSES	Dr HERVE	Virus grippal (A H3N2 / OPE & MDCK)	19/06/2017
F Crick Institute Londres	Pr McCAULEY	Virus grippaux saisonniers	26/06/2017

### Méthode de prélèvement naso-pharyngé

Les médecins généralistes et pédiatres du réseau Sentinelles effectuent un écouvillonnage naso-pharyngé profond chez les deux premiers patients de la semaine présentant un syndrome grippal selon la définition suivante : fièvre supérieure à 39°C, d'apparition brutale, accompagnée de myalgies et de signes respiratoires (s'ils n'ont pas de lien entre eux, quel que soit leur âge et présentant les symptômes depuis moins de 48h).

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.

L'écouvillon est adressé au laboratoire par la poste dans un emballage sécurisé.

Ci-dessous le mode opératoire de l'écouvillonnage naso-pharyngé adressé au médecin

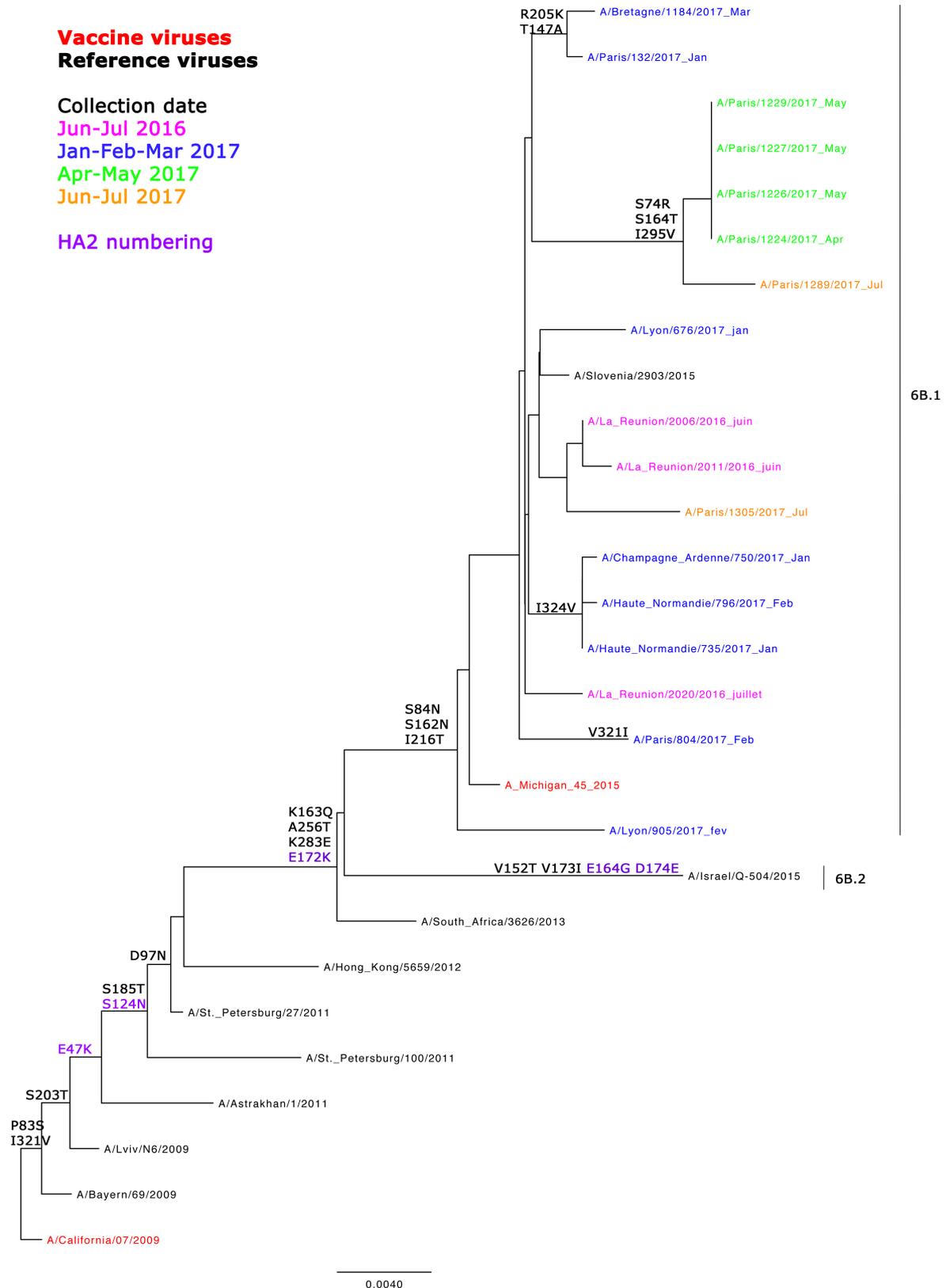
**Sentinelles**  
Réseau Sentinelles

### Mode opératoire de l'écouvillonnage naso-pharyngé

- 1 • Ouvrir le sachet contenant l'écouvillon
- 2 • Insérer le plus loin possible l'écouvillon dans la narine  
• Effectuer une rotation lente contre la paroi nasale afin de détacher des cellules (peut donner envie d'éternuer)
- 3 • Placer l'écouvillon dans le milieu de transport
- 4 • Casser la tige de l'écouvillon pour laisser le coton à demeure dans le liquide
- 5 • Fermer hermétiquement le tube en vissant le bouchon à fond et noter les trois premières lettres du nom et prénom du patient sur l'étiquette du tube
- 6 • Placer le tube dans l'absorbant, puis dans le sachet plastique de transport
- 7 • Placer le questionnaire dans la poche extérieure du sachet de transport
- 8 • Placer le tout dans l'enveloppe à bulles préaffranchie prévue à cet effet et envoyer le plus rapidement possible
- 9 • Ne pas oublier de déclarer le patient (Logiciel Jsentinel ou site Sentimed)

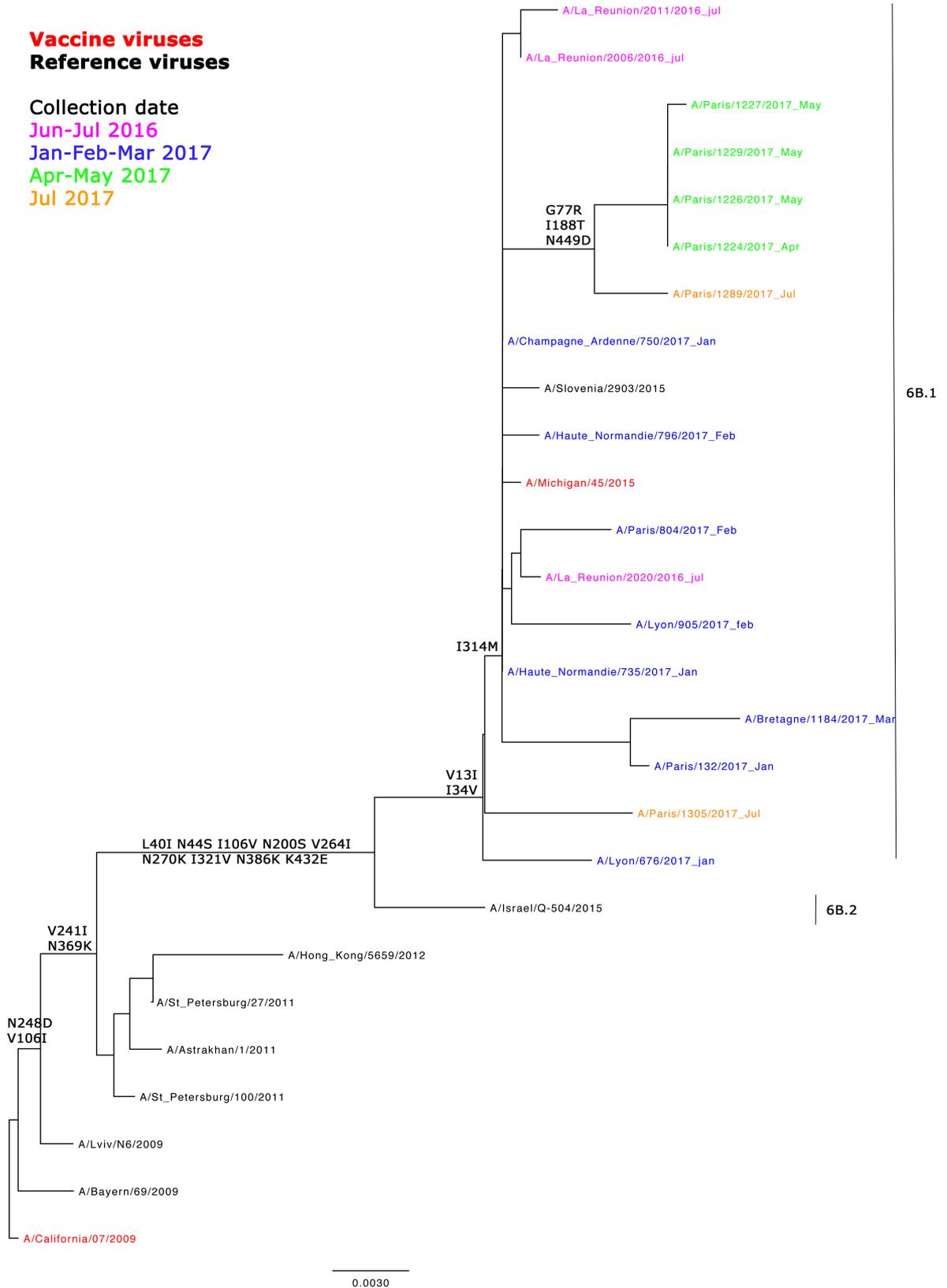


## ANNEXE 10 : ANALYSE PHYLOGENETIQUE DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES DES GENES HA ET NA DES VIRUS DE TYPE A ET B



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

Collection date  
 Jun-Jul 2016  
 Jan-Feb-Mar 2017  
 Apr-May 2017  
 Jul 2017



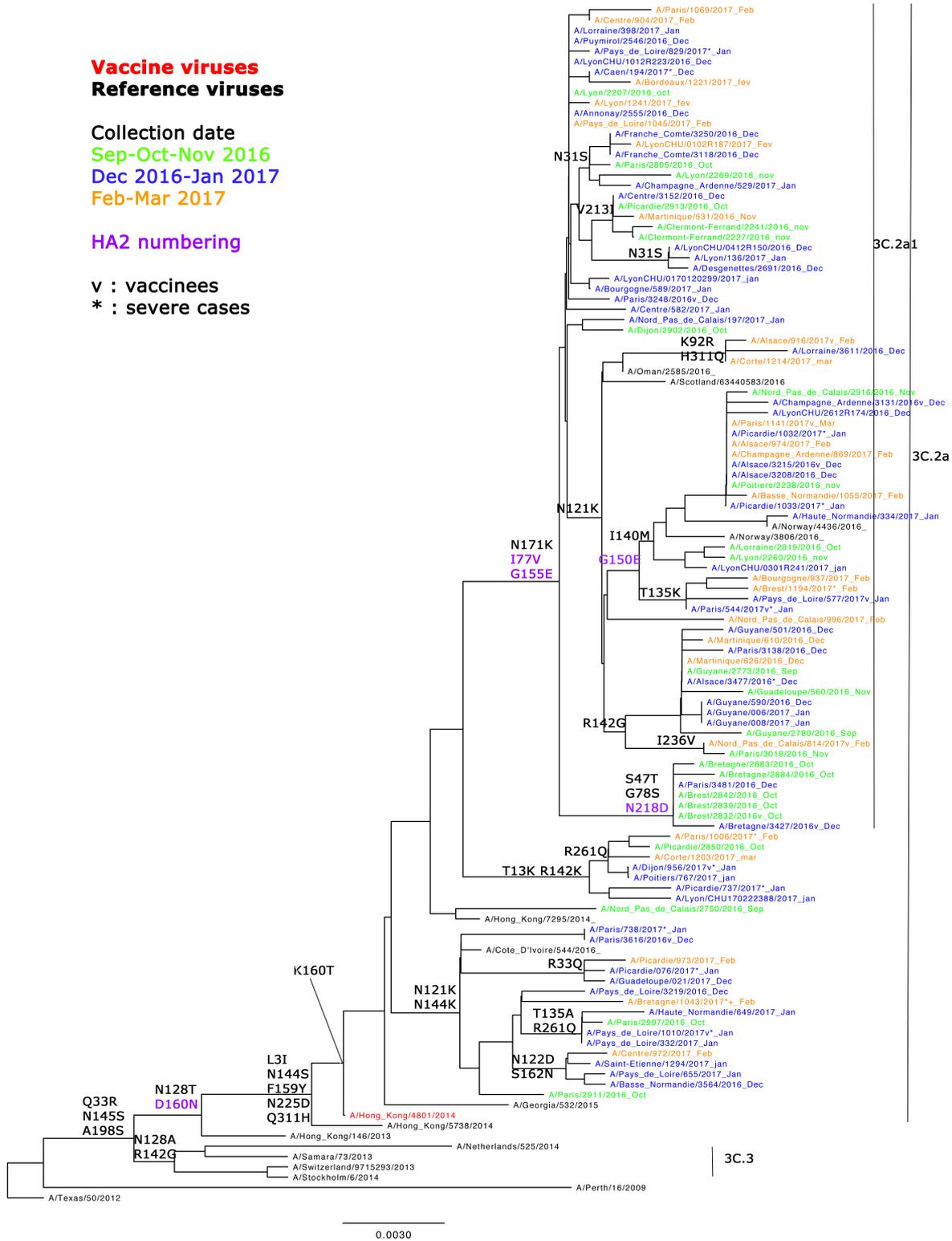
**Analyse phylogénétique du gène NA des virus A(H1N1)pdm09 / saison 2016-2017**

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

Collection date  
**Sep-Oct-Nov 2016**  
**Dec 2016-Jan 2017**  
**Feb-Mar 2017**

HA2 numbering

v : vaccinees  
 \* : severe cases

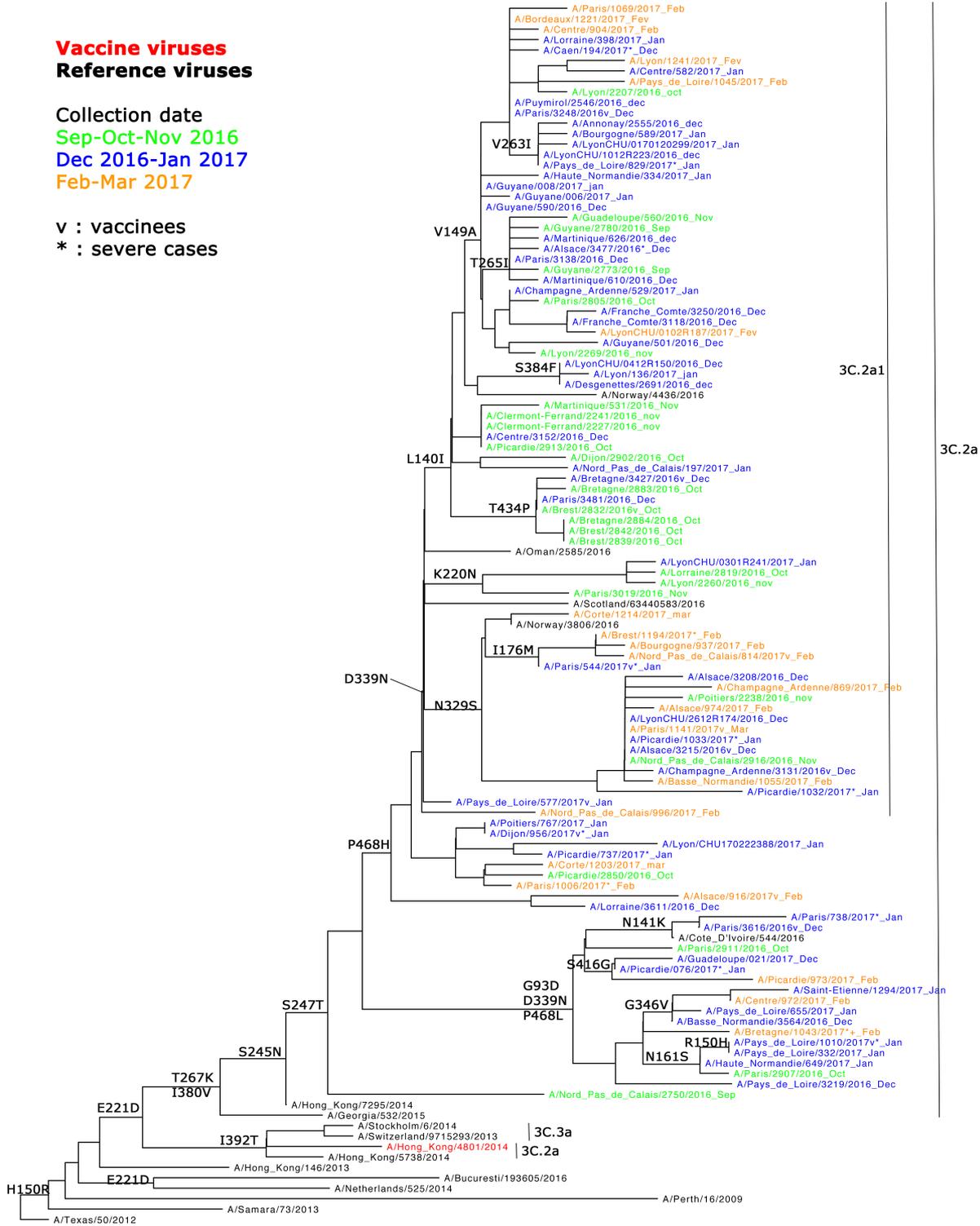


**Analyse phylogénétique du gène HA des virus A(H3N2) / saison 2016-2017**

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

Collection date  
Sep-Oct-Nov 2016  
Dec 2016-Jan 2017  
Feb-Mar 2017

v : vaccinees  
 \* : severe cases



**Analyse phylogénétique du gène NA des virus A(H3N2) / saison 2016-2017**

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

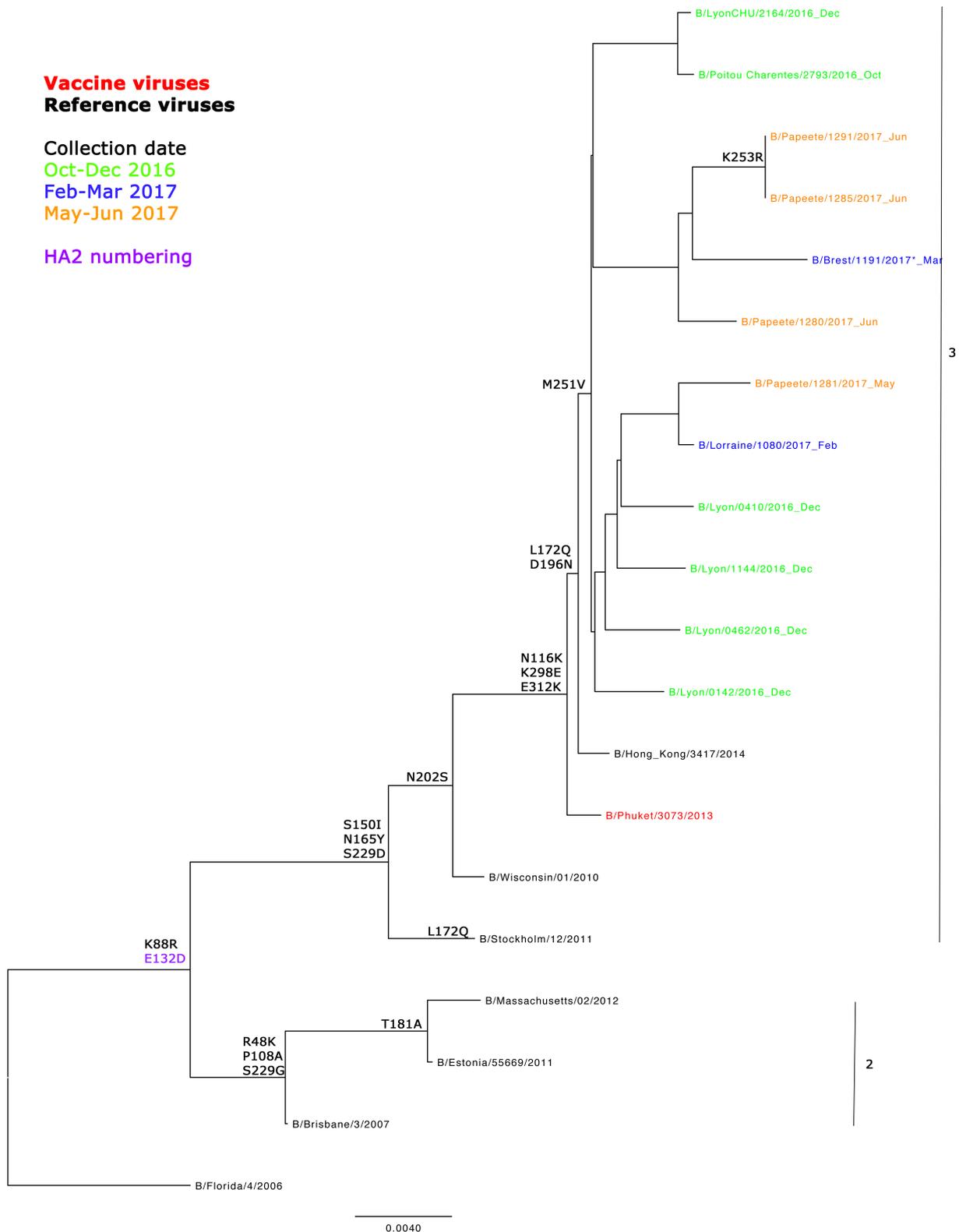
Collection date

Oct-Dec 2016

Feb-Mar 2017

May-Jun 2017

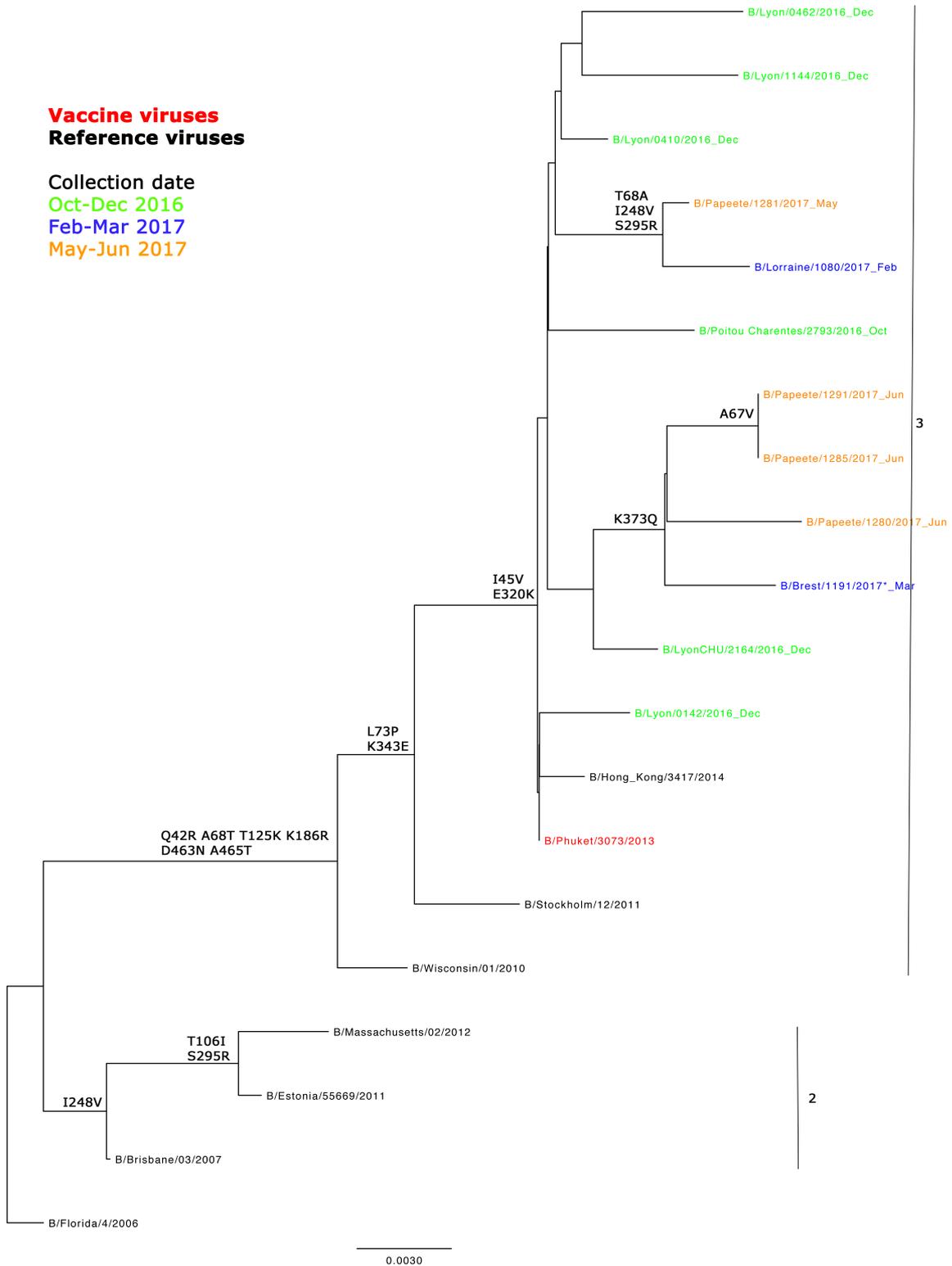
HA2 numbering



**Analyse phylogénétique du gène HA des virus B Yamagata / saison 2016-2017**

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

Collection date  
 Oct-Dec 2016  
 Feb-Mar 2017  
 May-Jun 2017



**Analyse phylogénétique du gène NA des virus B Yamagata / saison 2016-2017**

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

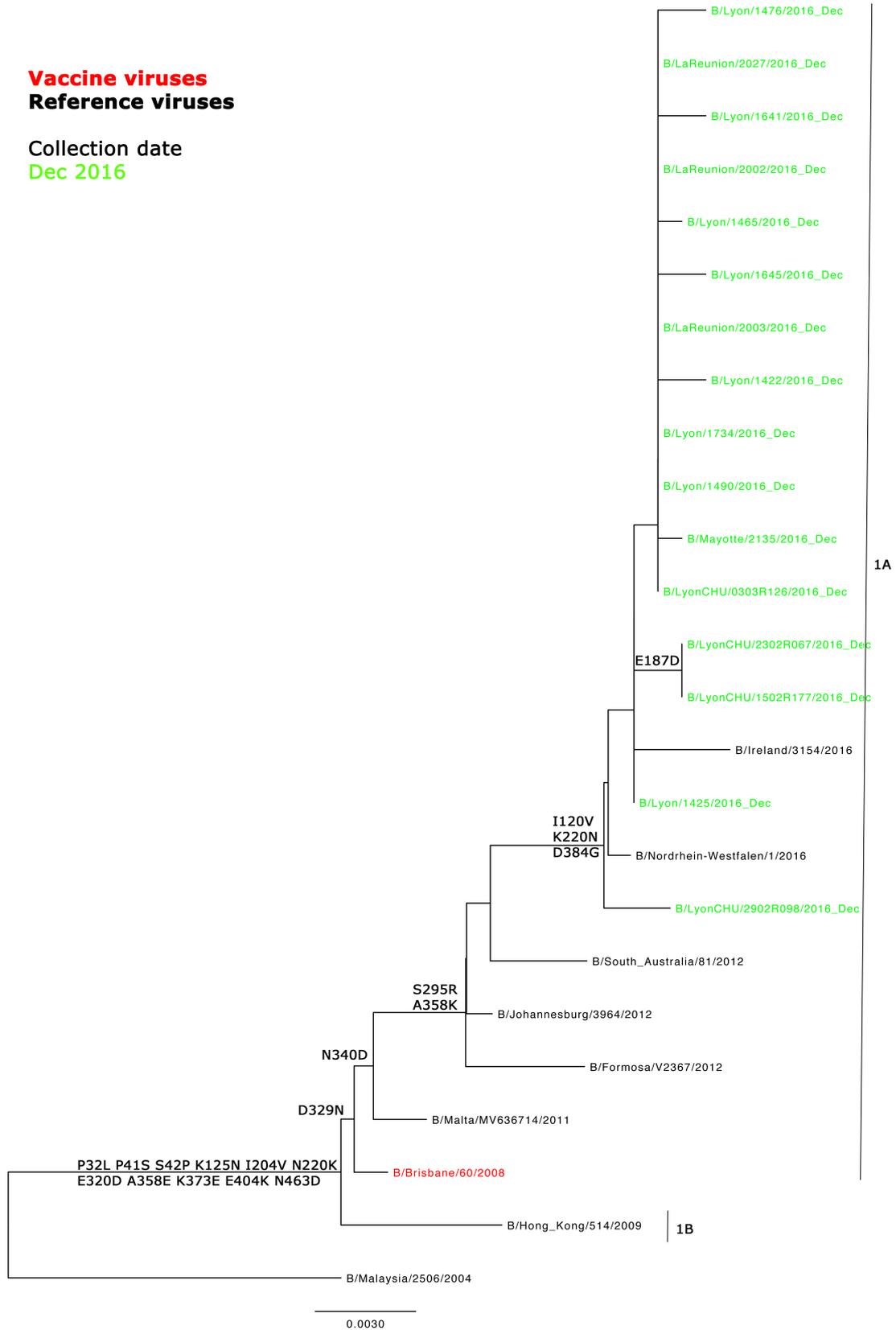
Collection date  
Dec 2016



**Analyse phylogénétique du gène HA des virus B Victoria / saison 2016-2017**

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

Collection date  
 Dec 2016



**Analyse phylogénétique du gène NA des virus B Victoria / saison 2016-2017**