

**Rapport annuel
d'activité**

2019

**Centre National de
Référence Virus des
infections respiratoires
(dont la grippe)**

**Saison
2018-2019**

Sommaire

1	Missions et organisation du CNR	11
1.1	Equipes	12
1.2	Locaux et équipements	14
1.3	Démarche qualité	14
2	Activités d'expertise	15
2.1	Évolutions des techniques	15
2.2	Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse	15
2.3	Techniques transférées vers d'autres laboratoires	15
2.4	Collections de matériel biologique et études	16
2.4.1	Collection de souches de virus influenza aviaire	16
2.4.2	Collection de prélèvements provenant d'études ou de firmes	16
2.4.3	Collection de souches, antigènes de référence et immun-sérums	17
2.4.4	Distribution de matériel biologique	18
2.5	Activités d'expertise au cours de la saison 2018-2019	19
2.5.1	Analyses virologiques d'échantillons cliniques humains, surveillance saisonnière des virus grippaux	19
2.5.2	Analyses virologiques d'échantillons cliniques humains, surveillance saisonnière des autres virus respiratoires	26
2.5.3	Analyse virologique d'échantillons cliniques humains, virus émergents	27
2.5.3.1	Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV)	27
2.5.3.2	Virus de grippe aviaire A(H7N9), A(H5N1)	27
2.5.4	Sensibilité aux antiviraux	28
2.6	Activités de séquençage	29
2.6.1	CNR-IPP	29
2.6.2	CNR-HCL	30
2.6.3	CNR-IPG	32
3	Activités de surveillance	33
3.1	Surveillance en Métropole	33
3.1.1	Description du réseau des partenaires	33
3.1.1.1	Les partenaires	33
3.1.1.2	Les prélèvements	36
3.1.1.3	Données d'activité médicale et sanitaire	37
3.1.2	Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections respiratoires virales	39
3.1.2.1	Chronologie et distribution géographique du nombre des isolements/détections de virus grippaux et de VRS en France métropolitaine	39
3.1.2.2	Caractérisation antigénique des virus grippaux	47
3.1.2.3	Caractérisation génétique des virus grippaux isolés en France	48
3.1.2.4	Distribution par âge des cas de grippe virologiquement confirmés (Réseau Sentinelles)	61
3.1.2.5	Cas de grippe confirmés virologiquement chez des personnes vaccinées	62
3.1.2.6	Contribution à la surveillance microbiologique et épidémiologique des autres agents pathogènes responsables d'infections respiratoires aiguës	63
3.1.3	Surveillance de la résistance aux antiviraux	72
3.1.3.1	Résistance génétique aux adamantanes	72
3.1.3.2	Résistance génétique aux inhibiteurs de la neuraminidase (INA)	72
3.1.3.3	Résistance génétique au Baloxavir	73
3.1.3.4	Analyse phénotypique de la sensibilité aux INA	73
3.1.3.5	Analyse phénotypique de la sensibilité au Baloxavir	74
3.2	Surveillance aux Antilles et en Guyane	75
3.2.1	Description du réseau de partenaires	75
3.2.1.1	Les partenaires	75
3.2.1.2	Les prélèvements	75

3.2.1.3	Données d'activité médicale et sanitaire	75
3.2.2	Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections respiratoires virales	77
3.2.2.1	Chronologie et distribution géographique du nombre des détections de virus grippaux et de VRS	77
3.2.2.2	Caractérisation génétique et antigénique des virus grippaux – Antilles et Guyane	80
3.2.2.3	Distribution par âge des cas de grippe virologiquement confirmés – Antilles et Guyane ..	80
3.2.2.4	Contribution à la surveillance microbiologique et épidémiologique des autres agents pathogènes responsables d'infections respiratoires aigües.....	81
3.2.3	Surveillance de la résistance aux antiviraux.....	83
3.3	Interface avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux.....	84
3.3.1	EISN/ECDC	84
3.3.2	FluNet/OMS.....	84
3.3.3	Contrôle de Qualité.....	84
3.4	Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance.....	85
4	Alerte	86
5	Activités de rétro-information, de formation et de conseil	87
5.1	Conseil et expertise aux professionnels de santé	87
5.1.1	Enseignements.....	87
5.1.2	Formation, accueil de stagiaires	88
5.1.3	Modalités de diffusion des données de la surveillance	88
5.2	Conseil et expertise aux autorités sanitaires	89
5.2.1	Activités auprès des instances de santé nationales.....	89
5.2.1.1	Ministère de la Santé, DGS, DGAL, DGT.....	89
5.2.1.2	Santé Publique France	89
5.2.1.3	ANSES	89
5.2.1.4	COFRAC.....	89
5.2.1.5	Instances de santé nationales et régionales (DFA).....	89
5.2.1.6	ANSM.....	89
5.2.2	Activités auprès des instances de santé internationales	90
5.2.2.1	EISN/ECDC.....	90
5.2.2.2	OMS.....	90
5.2.3	Membre de réseaux et membre de conseil scientifique d'institutions extérieures.....	90
5.3	Conseil et expertise pour d'autres cibles	91
6	Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	92
6.1	Activités de recherche en lien direct avec l'activité du CNR.....	92
6.1.1	CNR-IPP.....	92
6.1.2	CNR-HCL.....	94
6.2	Publications et communications en lien direct avec l'activité du CNR	97
6.2.1	Publications nationales	97
6.2.2	Publications internationales.....	98
6.2.3	Communications ¹ Internationales	101
6.2.4	Communications Nationales sur invitation et présidence de sessions	101
6.2.5	Communications Internationales sur invitation et présidence de sessions	102
6.2.6	Comité scientifique ou d'organisation de congrès ou colloques.....	102
7	Coopération avec les laboratoires de santé animale	103
8	Programme d'activité pour l'année 2019-2020.....	104

Figures

Figure 1 : Organigramme de l'unité de Génétique Moléculaire des Virus à ARN (CNR et groupe recherche virus respiratoires) – au 31 janvier 2019	12
Figure 2 : Organigramme du laboratoire de virologie de l'IAI	13
Figure 3 : Organigramme du laboratoire de virologie de l'IPG hébergeant le CNR virus des infections respiratoires (dont la grippe), laboratoire associé IP Guyane au 31/12/2018 (en rouge : CNR virus des infections respiratoires-IPG)	14
Figure 4: Représentation géographique des médecins généralistes Sentinelles ayant accepté de participer à la surveillance virologique des syndromes grippaux saison 2018-2019, par région (Source réseau Sentinelles, INSERM/UPMC, http://www.sentiweb.fr).....	34
Figure 5 : Représentation géographique des pédiatres Sentinelles ayant accepté de participer à la surveillance virologique des syndromes grippaux saison 2018-2019, par région (Source réseau Sentinelles, INSERM/UPMC, http://www.sentiweb.fr).....	35
Figure 6 : Syndromes grippaux (Grippe clinique) pour 100 000 habitants et pourcentage de virus grippaux détectés en médecine générale (Réseau Sentinelles) – période S40/2018-S20/2019.....	38
Figure 7 : Syndrome grippaux (Grippe clinique) pour 100 000 habitants par tranches d'âge en France.....	38
Figure 8 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France.....	40
Figure 9 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France-Nord.....	40
Figure 10 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France-Sud	41
Figure 11 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France.....	42
Figure 12 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France nord. Réseau Sentinelles / saison 2018-2019	42
Figure 13 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Sud	43
Figure 14 : surveillance des IRA, en médecine ambulatoire, chez les sujets âgés de plus de 65 ans en France. Détection de la grippe et des autres virus respiratoires.....	43
Figure 15 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France.....	44
Figure 16 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Nord.....	45
Figure 17 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Sud	45
Figure 18 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France.....	46
Figure 19 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Nord.....	46
Figure 20 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Sud	47
Figure 21 : Analyse phylogénétique du gène HA des virus A(H1N1)pdm09 – saison 2018-2019.....	50
Figure 22 : Analyse phylogénétique du gène NA des virus A(H1N1)pdm09 – saison 2018-2019.....	51
Figure 23 : virus A(H3N2), évolution des groupes génétiques en fonction du temps pour France nord (nombre)	52
Figure 24 : virus A(H3N2), évolution des groupes génétiques en fonction du temps pour France nord (%).....	53
Figure 25 : Analyse phylogénétique du gène HA des virus A(H3N2) – saison 2018-2019	54
Figure 26 : Analyse phylogénétique du gène NA des virus A(H3N2) – saison 2018-2019	55
Figure 27 : Analyse phylogénétique du gène HA des virus B-Yamagata – saison 2018-2019	57
Figure 28 : Analyse phylogénétique du gène NA des virus B-Yamagata – saison 2018-2019	58
Figure 29 : Analyse phylogénétique du gène HA des virus B Victoria – saison 2018-2019...59	59
Figure 30 : Analyse phylogénétique du gène NA des virus B Victoria – saison 2018-2019...60	60
Figure 31 : Détection du VRS en France	63
Figure 32 : Détection du VRS en France-Nord	64
Figure 33 : Détection du VRS en France-Sud.....	64
Figure 34 : Détection du VRS à l'hôpital en France. Répartition VRS A, VRS B et VRS non typés. Réseaux RENAL / saison 2018-2019.....	65

Figure 35 : Détection du VRS en médecine ambulatoire en France. Répartition VRS A, VRS B et VRS non typés. Réseaux Sentinelles / saison 2018-2019.....	66
Figure 36 : Détection des rhinovirus/enterovirus humains en France	67
Figure 37 : Détection des rhinovirus/enterovirus humains en France-Nord.....	68
Figure 38 : Détection des rhinovirus/enterovirus humains en France-Sud.....	68
Figure 39 : Détection des métapneumovirus humains en France	69
Figure 40 : Détection des adénovirus en France	70
Figure 41 : Détection des virus parainfluenza (PIV) en France.....	71
Figure 42 : Détection des coronavirus humains(hCoV) en France.....	71
Figure 43 : Caractérisation <i>in vitro</i> de la susceptibilité au baloxavir d'un virus de la saison 2017/2018.....	74
Figure 44 : Estimation du nombre hebdomadaire de consultations en médecine de ville pour syndromes grippaux et seuil saisonnier, Guadeloupe – décembre 2016 à avril 2019 (Source SpF Antilles).....	76
Figure 45 : Estimation du nombre hebdomadaire de consultations en médecine de ville pour syndromes grippaux et seuil saisonnier, Martinique – décembre 2016 à avril 2019 (Source SpF Antilles).....	76
Figure 46 : Nombre de consultations pour syndromes grippaux en médecine de ville et taux de positivité, Guyane – janvier 2017 à juillet 2019 (Source : SpF Guyane).....	77
Figure 47 : Détection des virus grippaux et VRS en Guyane - CNR-IPG / saison 2018-2019 (semaines S40/2018 à S29/2019)	78
Figure 48 : Répartition des virus grippaux détectés en Guyane - CNR-IPG / saison 2018-2019.....	78
Figure 49 : Détection des virus grippaux aux Antilles (Guadeloupe et Martinique)	79
Figure 50 : Répartition des virus grippaux détectés en Guadeloupe - CNR-IPG / saison 2018-2019.....	79
Figure 51 : Répartition des virus grippaux détectés en Martinique - CNR-IPG / saison 2018-2019.....	80
Figure 52 : Répartition VRS A et VRS B en Guyane - CNR-IPG / saison 2018-2019.....	82
Figure 53 : Détection des rhinovirus/enterovirus humains en Guyane - CNR-IPG / saison 2018-2019.....	83

Tableaux

Tableau 1 : Sérums de furets post-infectieux et souches reçus par les CNR-IPP et -HCL....	17
Tableau 2 : Bilan des prélèvements analysés par les CNR-IPP et -HCL	24
Tableau 3 : Bilan des prélèvements analysés par le CNR-IPG.....	25
Tableau 4 : Bilan des détections des autres virus respiratoires par les CNR-IPP et -HCL ...	26
Tableau 5 : Bilan des détections des VRS par le CNR-IPG	26
Tableau 6 : Bilan des suspicions d'infections à MERS-CoV analysées par les CNR-IPP et CNR-HCL. \$ HRV : rhinovirus/enterovirus.....	27
Tableau 7 : Bilan du nombre de séquences réalisées durant la saison 2018/2019.....	30
Tableau 8 : Bilan du nombre de séquences réalisées durant la saison 2018/2019.....	32
Tableau 9 : Répartition par région des médecins généralistes et pédiatres du Réseau Sentinelles ayant accepté de participer à la surveillance virologique et proportion par rapport aux généralistes et pédiatres en exercice dans la région - France, saison 2018-2019. (Source réseau Sentinelles, INSERM/UPMC, http://www.sentiweb.fr).....	34
Tableau 10 : Liste des pathogènes pour lesquels les données relatives à la détection et à la sérologie sont collectées dans le cadre du réseau RENAL.....	36
Tableau 11 : Distribution par âge des patients– Réseau Sentinelles	61
Tableau 12 : Distribution par tranche d'âge et par (sous)-type viral - Réseau Sentinelles.....	62
Tableau 13 : Statut vaccinal - Distribution des virus grippaux détectés au CNR.....	62

Rapport - CNR Virus des infections respiratoires (dont la grippe) - saison 2018-2019 6

Tableau 14 : Statut vaccinal - Distribution par tranche d'âge	62
Tableau 15 : Répartition des VRS en fonction de l'âge. France métropolitaine.....	66
Tableau 16 : Répartition des métapneumovirus en fonction de l'âge. France entière	69
Tableau 17 : Résultats des tests phénotypiques de sensibilité à l'oseltamivir (CNR-IPP, CNR-HCL).....	74
Tableau 18 : Distribution par âge des patients - Antilles et Guyane - Surveillance sentinelle / 2018-2019.....	81
Tableau 19 : Distribution par tranche d'âge et par (sous)-type viral - Antilles et Guyane - Surveillance sentinelle / 2018-2019.....	81
Tableau 20 : Répartition des VRS en fonction de l'âge en Guyane - CNR-IPG / saison 2018-2019.....	82
Tableau 21 : Bilan des cas groupés analysés par le CNR- HCL.....	86

Résumé analytique

En France métropolitaine, la saison de surveillance 2018-2019 a été marquée par une épidémie grippale intense mais de courte durée, avec circulation quasi-exclusive de virus de type A, les virus A(H3N2) étant devenus majoritaires au cours de l'épidémie aux dépens des virus A(H1N1)pdm09.

Les détections de virus grippaux ont augmenté dès la semaine S50/2018 pour atteindre un pic en semaine 06/2019. L'épidémie s'est terminée en semaine S10/2019 soit 10 semaines d'épidémie au sens virologique. Les détections de virus de type B sont restées sporadiques durant toute la saison.

Environ 48% des 2914 prélèvements issus du réseau Sentinelles reçus aux laboratoires du CNR en métropole ont été trouvés positifs pour un virus grippal.

L'épidémie a été marquée par une sévérité (impact important à l'hôpital) et une surmortalité importantes.

Parmi les autres virus respiratoires, les VRS ont débuté leur circulation en semaine S42/2018. L'épidémie, qui précède toujours celle de la grippe, s'est déroulée de la semaine S46/2018 à la semaine S03/2019.

Dans les TFA (Territoires Français d'Amérique), la saison 2018-2019 a été marquée par des épidémies grippales d'intensité modérée aux Antilles et par l'absence d'épidémie en Guyane. Une circulation virale continue a cependant été mise en évidence en Guyane, de la semaine S01/2019 à la semaine S29/2019. Aux Antilles, les périodes épidémiques se sont étendues de la semaine S03/2019 à la semaine S13/2019 pour la Guadeloupe et de la semaine S03/2019 à la semaine S15/2019 pour la Martinique.

Dans les 3 Territoires Français d'Amérique, une co-circulation de virus grippaux A(H3N2) et A(H1N1)pdm09 a été observée avec une prédominance de virus A(H3N2). La circulation de virus B Victoria a été mise en évidence uniquement en Guyane, en fin de saison, à partir de la semaine S17/2019.

Au total 54% de l'ensemble des prélèvements des réseaux Sentinelles reçus au CNR-IPG ont été testés positifs pour un virus grippal.

In France, the particular feature of the 2018-19 season's epidemic was its short duration but its intensity with almost exclusively type A viruses circulating. During the epidemic A(H3N2) viruses became majority at the expense of A(H1N1)pdm09 viruses.

Detection of influenza viruses increased from the week W50/2018 to reach a peak in week W06/2018. The epidemic ended on week W10/2019, the total duration of the epidemic was 10 weeks based on virological data. During the whole season, detections of type B viruses remained sporadic.

Approximately 48 % of the 2914 naso-pharyngeal samples from the Sentinelles network received by the laboratories of the National Reference Center in metropolitan France were found positive for an influenza virus.

The epidemic was marked by an important severity (significant impact at the hospital) and an abnormally high death rate.

Among the other respiratory viruses, the RSV circulation started in week W42/2018. The epidemic, which always precedes the influenza epidemic, took place from week W46/2018 to week W03/2019.

In the French overseas Territories of America (FTA), the 2018-2019 season was characterized by moderate influenza epidemics in the French West Indies and by the absence of an epidemic in French Guiana. However, continuous viral circulation was observed in French Guiana from weeks W01/2019 to W29/2019. Epidemic periods extended from weeks W03/2019 to W13/2019 in Guadeloupe and from weeks W03/2019 to W15/2019 in Martinique.

Co-circulation of A(H3N2) and A(H1N1)pdm09 viruses was observed in the 3 FTAs, with predominance of A(H3N2) viruses. The circulation of B Victoria viruses was demonstrated only in French Guiana, at the end of the season, from week S17/2019. Approximately 54% of the Sentinelles network samples received by the CNR-IPG tested positive for an influenza virus.

1 Missions et organisation du CNR

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 virus des infections respiratoires (dont la grippe) avec des missions étendues.

Le rapport annuel 2018-2019 repose sur l'activité des trois laboratoires composant le CNR de la semaine S40/2018 à la semaine S20/2019 avec les données de surveillance de l'ensemble de la période pour le CNR-IP et le CNR-HCL. Le rapport annuel 2018-2019 repose sur l'activité du CNR IPG de la semaine S40/2017 à la semaine S29/2019 avec les données de surveillance de l'ensemble de la période.

La description détaillée des missions du CNR est donnée en annexe 1.

1.1 Equipes

Une description détaillée des équipes des 3 laboratoires du CNR est donnée en annexe 1.

➤ **CNR IPP**

En plus du personnel dédié aux activités du pôle IPP du CNR, les personnels de l'unité de Génétique Moléculaire des Virus à ARN (GMVR) travaillant sur les virus des infections respiratoires contribuent aux activités de recherche et aux développements techniques en rapport avec les activités du CNR.

L'organigramme de l'unité est présenté Figure 1.

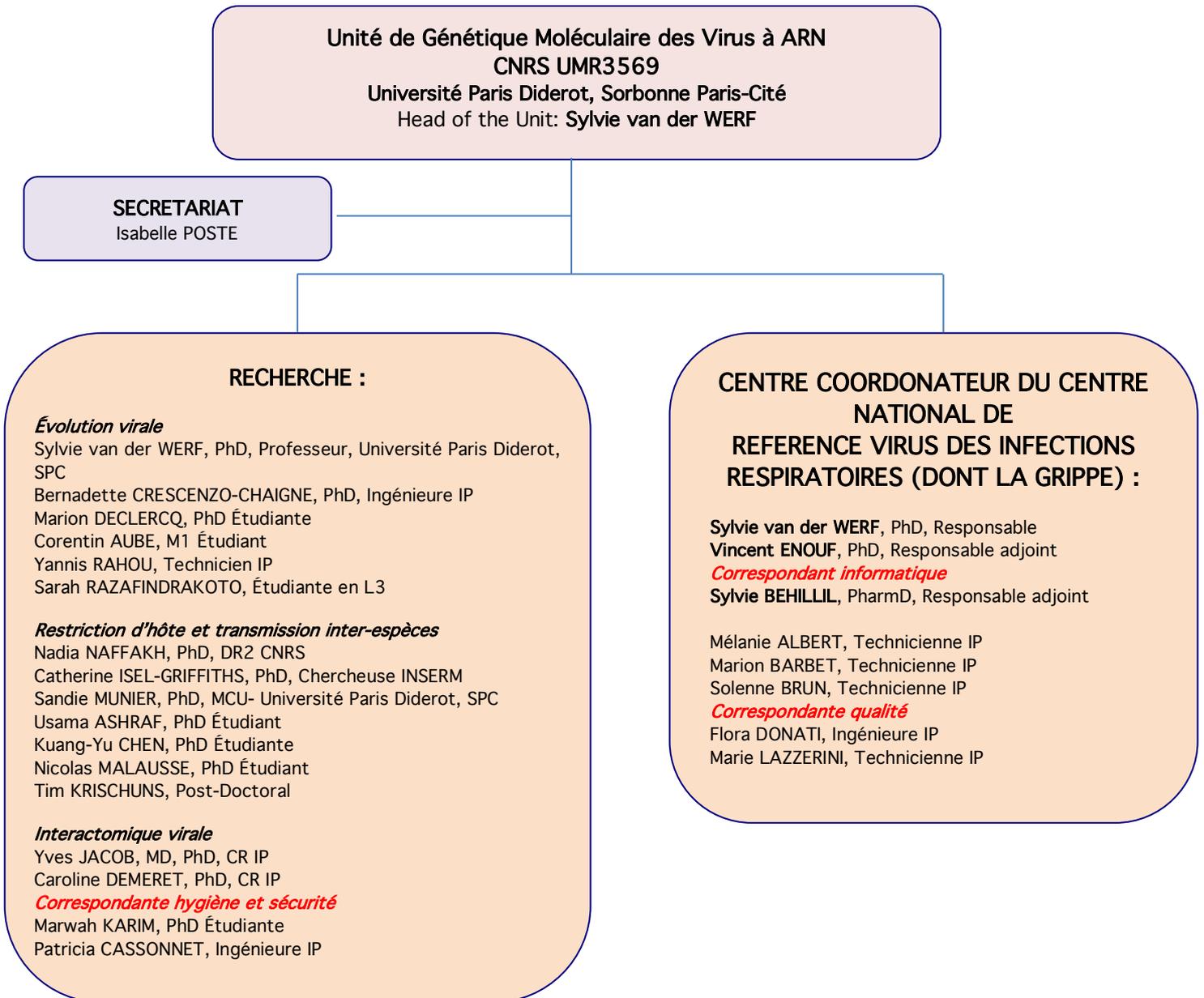


Figure 1 : Organigramme de l'unité de Génétique Moléculaire des Virus à ARN (CNR et groupe recherche virus respiratoires) – au 31 janvier 2019

➤ **CNR-HCL**

Le personnel du CNR participe à la surveillance des infections respiratoires, aux essais cliniques, aux travaux de recherche et enfin à l'évaluation de nouvelles techniques ou de nouveaux kits de détection (Tests syndromiques).



IAI – Virologie – Secteur spécialisé



CNR des Virus des Infections Respiratoires (dont la grippe)
UF 24840

Directeur : Pr Bruno LINA

Responsable adjoint : Dr Martine VALETTE

Cadre de santé : Héléna RUTSCHI

Biologistes

Dr Martine VALETTE
Réfèrent qualité
Correspondant informatique

Dr Maude BOUSCAMPERT
BIOLOGIE MOLECULAIRE
Pilote Qualité Virologie

Dr Jean Sébastien CASALEGNO
BIOLOGIE MOLECULAIRE / SEROLOGIE
Correspondant pré-analytique

Dr Vanessa ESCURET
BIOLOGIE MOLECULAIRE
RÉSISTANCE ANTIVIRAUX

Techniciens

Gwendolyne BURFIN
Correspondant Séquençage

Chanel DIENY-BARRET

Remi FANGET
Correspondant Métrologie

Nomin OMBOODOI-LAFAYE
Correspondant Qualité

Clio SOCRATOUS
Correspondant Hygiène et Sécurité

Secrétaire Médicale

Marie-Claire SERVAIS



1

Figure 2 : Organigramme du laboratoire de virologie de l'IAI

➤ CNR-IPG

L'organigramme du laboratoire de virologie de l'IPG est présenté Figure 3.

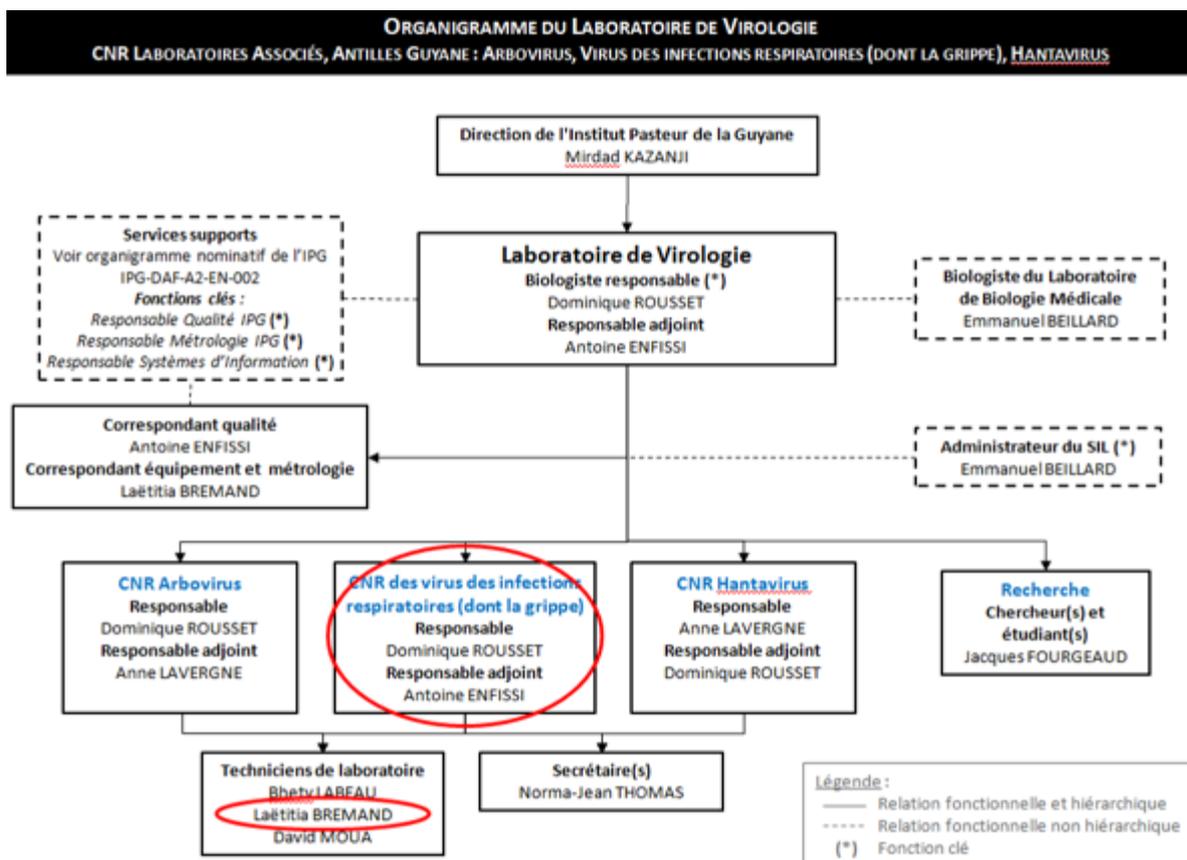


Figure 3 : Organigramme du laboratoire de virologie de l'IPG hébergeant le CNR virus des infections respiratoires (dont la grippe), laboratoire associé IP Guyane au 31/12/2018 (en rouge : CNR virus des infections respiratoires-IPG)

1.2 Locaux et équipements

Les plans des locaux et la liste des équipements disponibles sont donnés en annexe 1 pour chacun des 3 laboratoires du CNR.

1.3 Démarche qualité

Les trois laboratoires du CNR des virus des infections respiratoires (dont la grippe) ont poursuivi l'avancement de leur démarche qualité suivant le référentiel ISO 15189 en vue de l'accréditation de l'ensemble des techniques à échéance 2020.

Pour les détails voir annexe 1.

2 Activités d'expertise

Au cours de la saison 2018-2019, en termes d'activités d'expertise, le CNR a, comme chaque année, vérifié l'adéquation et fait évoluer des techniques de détection, d'identification et de caractérisation génétique et phénotypique des virus influenza au regard de leur constante évolution. Conformément à l'élargissement de ses missions pour les autres virus respiratoires, ce secteur d'activité a été renforcé, notamment pour le VRS. L'harmonisation et l'échange des procédures et des techniques reste une des priorités du CNR et un échange inter-laboratoires a été formalisé à nouveau entre le CNR-IPP et le CNR-HCL.

La description des techniques disponibles est présentée en annexe 2

2.1 Évolutions des techniques

L'évolution génétique des virus grippaux de sous-type A(H1N1)pdm09 s'est traduite par des changements de séquence des régions cibles des qRT-PCR. En effet nous nous sommes rendus compte que la PCR de détection ciblant le gène H1pdm09 (PCR non utilisée en routine), ne détectait plus les virus circulants, ce qui a conduit à adapter cette PCR. De la même manière, certains virus minoritaires n'étaient plus détectés par la PCR ciblant le gène N1pdm09. Une adaptation de la technique a également été réalisée.

Pour les virus grippaux de sous-type A(H3N2) et de type B nous n'avons pas observé de modifications de séquences au niveau des régions cibles.

La qRT-PCR de détection de la mutation de résistance aux antiviraux H275Y sur la NA des virus A(H1N1)pdm09 a été modifiée, les performances de la qRT-PCR obtenues n'étant plus aussi bonnes.

Cette saison, comme lors des dernières saisons, la majorité des virus de sous-type A(H3N2) se cultivent très difficilement sur cellules MDCK et hémagglutinent encore plus faiblement les globules rouges de cobaye. Toutefois, cette saison un groupe de virus A(H3N2) se distingue, qui se comporte différemment vis-à-vis de la culture, i.e. se cultivent facilement, rapidement et ne perdent pas leur titre HA en présence d'oseltamivir, nécessaire à la caractérisation antigénique. Ces virus appartiennent au groupe génétique 3C.3a. Pour les virus se cultivant difficilement, pour le CNR-IPP, nous avons utilisé un test de suivi de l'activité enzymatique de la neuraminidase (test Munana en point final) pour évaluer la présence du virus lors de la culture. Pour le CNR-HCL nous avons utilisé la technique ELISA pour détecter la présence du virus dans les cultures cellulaires. Cette technique n'est pas affectée par la modification des propriétés d'agglutination des virus. La caractérisation antigénique des virus A(H3N2) doit être réalisée par inhibition d'hémagglutination en présence d'un inhibiteur de l'activité neuraminidase, l'oseltamivir, du fait du potentiel d'hémagglutination de ces virus via leur neuraminidase.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

Aucune évaluation n'a été réalisée durant la saison 2018/2019.

2.3 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/). Elles peuvent être ainsi mises en place par les laboratoires qui le souhaitent, notamment pour le sous-typage des virus de type A et plus particulièrement des virus A(H3N2). 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.

2.4 Collections de matériel biologique et études

2.4.1 Collection de souches de virus influenza aviaire

Aucune souche de virus influenza aviaire n'a été reçue par le CNR cette saison.

2.4.2 Collection de prélèvements provenant d'études ou de firmes

➤ **CNR-IPP**

- Réception de prélèvements respiratoires pour lesquels un virus grippal ou un VRS a été détecté, en provenance du service de virologie de l'Institut Pasteur de Madagascar. Pour séquençage NGS. Réception de 60 échantillons en octobre 2018.
- Étude IRA en EHPAD : étude des cas groupés d'infections respiratoires aiguës en EHPAD, avec Santé publique France et Les groupe d'EHPAD Korian et DomusVi. Inclusion de 306 patients entre le 16/10/2018 et le 08/04/2019. Détection de 153 virus A(H3N2), 33 rhinovirus et 18 VRS,
- Réception d'échantillons vétérinaires : 31 ARN extraits à partir de prélèvements de bovins infectés par un virus influenza D et 5 prélèvements primaires de bovins infectés, pour séquençage NGS. Échantillons envoyés par Mariette Ducatez de l'INRA de Toulouse dans le cadre de l'ANR FluD.

➤ **CNR-HCL**

- **Producteurs de Vaccins :**

GSK : 17 échantillons

- A :** 2 (H1N1)pdm09, A/Brisbane/02/2018 & A/Brisbane/02/2018 IVR-190,
 14 H3N2 * A/Brisbane/1/2018 NYMC X-311 x2
 * A/Switzerland/8060/2017 NIB-112 x3
 * A/Wisconsin/4/2018 NYMC X-319
 * A/Bretagne/1565/2017 NYMC-317
 * A/Brisbane/1/2018 & A/Brisbane/1/2018 NYMC X-311 x2
 * A/Rhode Island/01/2018 IVR-188
 * A/Wisconsin/4/2018 NYMC X-319
 * A/Kansas/14/2017 & A/Kansas/14/2017 NYMC X-327
- B** 1 B-YAM B/Phuket/3073/2013

- Étude IRA en EHPAD : étude des cas groupés d'infections respiratoires aiguës en EHPAD, avec Santé publique France et Les groupe d'EHPAD Korian et DomusVi. Inclusion de 250 patients entre le 07/10/2018 et le 26/04/2019. Détection de 127 virus A(H3N2), 8 virus A(H1N1)pdm09 et un virus de type A non sous-typé, 22 rhinovirus et 18 VRS

2.4.3 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 1). Les CNR-IPP et -HCL ont reçu du CCOMS la nouvelle souche prototype A(H3N2) du vaccin de l'hémisphère sud 2017-2018 A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 et le sérum de furet homologue.

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 ou de globules rouge de poule pour les virus de type B. 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 1.

	Souche virale	Immun-sérum
A(H1N1)pdm09		
A/California/07/2009	2018-19	2018-19
A/Michigan/45/2015		2018-19
A/Brisbane/02/2018	2018-19	2018-19
A(H3N2)		
A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016	2018-19	2018-19
A/Hong Kong/5738/2014	2018-19	
A/Hong Kong/4801/2014		2018-19
A/Switzerland/9715293/2013	2018-19	
A/Switzerland/8060/2017	2018-19	2018-19
A/Kansas/14/2017	2018-19	2018-19
B Yamagata		
B/Wisconsin/01/2010		2018-19
B/Phuket/3073/2013	2018-19	2018-19
B/Massachusetts/02/2012		2018-19
B Victoria		
B/Brisbane/60/2008		
B/Hong Kong/514/2009		2018-19
B/Norway/2409/2017	2018-19	2018-19
B/Colorado/6/2017	2018-19	2018-19

Tableau 1 : Sérums de furets post-infectieux et souches reçus par les CNR-IPP et -HCL (saison de réception)

2.4.4 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 et par le CNR-IPG au CCOMS d'Atlanta.

Le CNR-IPP a effectué 3 envois au CCOMS de Londres : en décembre 2018, en début d'épidémie, envoi de 11 isolats (6 A(H1N1)pdm09, 5 A(H3N2)) et de 6 échantillons respiratoires primaires (1 A(H1N1)pdm09, 5 A(H3N2)) ; en janvier 2019, envoi de 16 isolats (10 A(H1N1)pdm09, 5 A(H3N2), 1 B-VIC) ; en juillet 2019 envoi de 22 isolats (7 A(H1N1)pdm09, 13 A(H3N2), 1 B-YAM, 1 B-VIC) et de 13 échantillons respiratoires primaires (3 A(H1N1)pdm09, 10 A(H3N2)).

Le CNR-HCL a effectué deux envois de virus grippaux au CCOMS de Londres. Le premier au début de la circulation en décembre 2018, de 25 isolats en provenance de la surveillance communautaire et hospitalière, (10 A(H1N1)pdm09, 9 A(H3N2), 1 B-YAM) ainsi que de 5 isolats A(H3N2) issus de la surveillance communautaire à La Réunion pour la période Août-Septembre 2018. Un nouvel envoi a été effectué en Janvier 2019 de 34 isolats sélectionnés issus dans la surveillance communautaire, en EHPAD et hospitalière dont des patients ayant présenté des formes graves (16 A(H1N1)pdm09, 16 A(H3N2), 2 B-YAM). Enfin un 3^{ème} envoi organisé en juillet 2019 de 13 isolats sur cellules de virus respiratoires non grippaux : Rhinovirus, Adénovirus, Parainfluenza virus et Coronavirus humains.

Le CNR-IPG a effectué un envoi au CCOMS d'Atlanta (CDC) en juin 2019 de 30 échantillons respiratoires issus des hôpitaux et de la surveillance sentinelle, des Antilles et de la Guyane (12 A(H1N1)pdm09, 12 A(H3N2), 5 B-VIC, 1 B-YAM). Parmi les échantillons sélectionnés, 10 sont issus des services de réanimation, 8 du CHU de Fort de France (4 A(H3N2), 4 A(H1N1)pdm09) et 2 du CHU de Ponte-à-Pitre (2 A(H1N1)pdm09). De plus le CNR-IPG a effectué 2 envois au CNR-IPP, en avril et mai 2019, de 26 prélèvements issus des Antilles et de la Guyane (Martinique n=15 ; Guadeloupe n=6 ; Guyane n=5) et correspondant à 16 virus A(H1N1)pdm09 et 10 virus A(H3N2). Des échantillons A(H1N1)pdm09 présentant un défaut de détection avec les techniques de typage ont été sélectionnés pour expertise et séquençage afin d'identifier la présence éventuelle de mutations sur les zones d'intérêt.

Suite à l'envoi de décembre 2017 du CNR-IPP au CCOMS, un virus A(H3N2) A/Bretagne/1565/2017, a été sélectionné comme candidat vaccin potentiel et a passé les différentes étapes de production de réassortants et d'évaluation. Des discussions concernant l'application du protocole de Nagoya ont eu lieu avec les ministères compétents, notamment le ministère de la Santé et l'échange a fait l'objet d'un accord de transfert de matériel biologique (Material Transfer Agreement - MTA) entre le CNR-IPP et le CCOMS à Londres. Le groupe génétique de ce virus ayant peu circulé durant la saison 2018/2019, ce virus n'a pas été retenu. Suite à l'envoi de décembre 2018 un autre virus A(H3N2) du groupe génétique 3C.3a a été sélectionné comme éventuel candidat vaccin et un MTA a été signé avec le CCOMS de Londres.

Pour le CNR-IPG, suite à l'envoi au CCOMS d'Atlanta (CDC) réalisé en janvier 2018, un MTA, a été établi entre l'Institut Pasteur (pour le CNR-IPG) et le CCOMS. Cet accord concerne un échantillon prélevé en S1/2018, B/Yamagata positif, provenant de Guyane. Le virus isolé à partir de cet échantillon pourra être utilisé dans la mise au point, la production et la distribution de vaccins antigrippaux saisonniers.

Les CNR-IPP et -HCL effectuent aussi la diffusion de contrôles synthétiques, de souches virales et de protocoles aux laboratoires qui en font la demande.

2.5 Activités d'expertise au cours de la saison 2018-2019

2.5.1 Analyses virologiques d'échantillons cliniques humains, surveillance saisonnière des virus grippaux

Dans leur ensemble, les laboratoires du CNR des virus des infections respiratoire (dont la grippe) ont reçu un total de 5225 prélèvements et détecté 3177 virus grippaux.

Le délai moyen de restitution des résultats aux médecins du réseau Sentinelles est de 24h.

Pour les hôpitaux, ce délai peut être plus long, jusqu'à 15 jours, en fonction des analyses demandées (recherche de résistance aux antiviraux, séquençage).

➤ CNR-IPP et CNR-HCL

En France métropolitaine, au sein des 4243 prélèvements reçus par les CNR-IPP et -HCL, 2561 (60,4%) prélèvements ont été trouvés positifs pour un ou plusieurs virus grippaux (12 co-infections). Ces détections positives proviennent essentiellement de la surveillance du réseau Sentinelles (n= 1385 ; 54,1%) et des laboratoires hospitaliers (n=1102 ; 43,0%). Le reste provient, de l'Outre-mer (n=44 ; 1,7%), des laboratoires des armées (n=17 ; 0,7%), des laboratoires de biologie médicale (n=5 ; 0,2%), des EHPAD (n=4 ; 0,2%) et du centre médical de l'aéroport de Roissy (n=4 ; 0,2%)

Parmi les 2561 échantillons positifs pour au moins un virus grippal, les 2573 virus grippaux détectés se répartissent de la manière suivante : 2539 virus grippaux de type A (99,1%), avec 872 virus A(H1N1)pdm09 (34,0%), 1638 A(H3N2) (64,0%), et 29 virus de type A (1,1%) non sous-typés ; et 34 virus grippaux de type B (1,3%) avec 13 virus B-Yamagata (0,5%) et 21 virus B-Victoria (0,8%) (tableau 2).

➤ CNR-IPG

Le nombre de prélèvements reçus au CNR-IPG pour la saison 2018-2019 est en augmentation par rapport à la saison précédente du fait d'une augmentation des prélèvements envoyés par les CHU de Pointe à Pitre, de Fort de France et de l'hôpital de Cayenne.

Pour les Antilles et la Guyane, le CNR-IPG a reçu 982 prélèvements en provenance respectivement de Guyane (n=520 ; 53,0%), de Martinique (n=277 ; 28,2%) et de Guadeloupe, (n=185 ; 18,8%). Ces prélèvements proviennent des réseaux de médecins sentinelles (n=311 ; 31,7%), de laboratoires hospitaliers (n=608 ; 61,9%) et de quelques laboratoires privés (n=63 ; 6,4%).

Au total, 616 virus grippaux ont été détectés, répartis de la façon suivante : 583 (94,6%) virus grippaux de type A, avec 402 virus A(H3N2) (65,3%), 177 virus A(H1N1)pdm09 (28,7%) et 4 virus grippaux de type A (0,6%) non sous-typés et 33 (5,4%) virus de type B parmi lesquels 32 (5,2%) virus B-Victoria et 1 (0,2%) B-Yamagata (Tableau 3).

Le délai moyen de restitution des résultats est de 2.6 jours ouvrables par rapport à la date de réception au laboratoire.

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
1436	702	Sentinelles FN	704	11	197	85	496	181	0	0	0	0	0	0
1362	629	Sentinelles FS	626	4	234	180	388	270	3	0	3	3	0	0
117	54	Sentinelles Corse	54	1	26	0	27	0	0	0	0	0	0	0
738	656	Lab hospitaliers FN	650	5	215	59	430	113	16	0	13	5	3	1
496	446	Lab hospitaliers FS	437	6	174	80	257	83	9	0	3	1	6	2
2174	1358	Total Sent./Hop FN	1354	16	412	144	926	294	16	0	13	5	3	1
1975	1129	Total Sent./Hop FS +Corse	1117	11	434	260	672	353	12	0	6	4	6	2
22	18	Alsace	18	0	6	2	12	2	0					
2	0	CH Hagueneau	0						0					
13	13	Hop civil Colmar	13	0	3	0	10	1	0					
2	1	Hop Mulhouse	1	0	0	0	1	1	0					
3	2	CH Wissembourg	2	0	1	0	1	0	0					
2	2	CH Strasbourg	2	0	2	2	0	0	0					
5	5	Basse normandie	5	0	4	2	1	1	0					
2	2	CHU Caen	2	0	2	2	0	0	0					
3	3	CH Lisieux	3	0	2	0	1	1	0					
		Bourgogne												
121	114	CH Dijon	116	0	32	10	84	30	1	0	1	1	0	0
60	58	Bretagne	54	1	10	2	43	13	4	0	2	0	2	1
3	3	CH quimper	3	1	0	0	2	0	0					
15	14	CHU Rennes	12	0	4	0	8	2	2	0	1	0	1	0
2	2	CH Lorient	2	0	0	0	2	0	0					
40	39	CHRU Brest	37	0	6	2	31	11	2	0	1	0	1	1
		Centre												
56	45	CHR Orléans	46	2	17	3	27	9	0					
19	19	Franche Comte	19	0	4	0	15	8	0					
18	18	Hop nord Franche comté	18	0	4	0	14	8	0	0	0	0	0	0
1	1	laboratoire de Belfort	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
36	29	Haute Normandie	30	0	6	0	24	8	0					

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
25	19	CHU Rouen	20	0	6	0	14	2	0					
7	7	CH Dieppe	7	0	0	0	7	3	0					
4	3	CHI Elbeuf	3	0	0	0	3	3	0					
177	156	Ile de France	147	1	55	18	91	22	11	0	10	4	1	0
28	26	CH Cochin	23	0	6	2	17	2	3	0	2	0	1	0
7	6	Hop St Louis	6	1	2	0	3	1	0					
20	17	CH Trousseau	18	0	14	3	4	0	0					
37	31	CH Ambroise Paré	26	0	9	3	17	4	6	0	6	3	0	0
10	10	HEGP	9	0	2	2	7	3	1	0	1	1	0	0
2	0	CH Gonesse	0						0					
13	13	CH Paul Brousse	12	0	6	3	6	2	1	0	1	0	0	0
11	9	CHU Henri Mondor	9	0	4	0	5	0	0					
2	0	CHI Créteil	0						0					
30	30	CH Versailles	30	0	5	4	25	8	0					
8	8	Hop Louis Mourier	8	0	6	1	2	1	0					
3	3	Hop St Joseph	3	0	0	0	3	2	0					
2	0	Hop Américain	0						0					
3	3	CH Montereau	3	0	1	0	2	0	0					
1	0	CH Rives de Seine	0						0					
3	0	CHI Meulan	0						0					
		Lorraine												
4	3	Hop Thionville	3	0	3	1	0	0	0					
54	50	Nord Pas de Calais	51	0	19	3	32	7	0					
18	17	CHU Lille	18	0	6	0	12	0	0					
1	1	CH Roubaix	1	0	1	1	0	0	0					
24	21	CH Dunkerque	21	0	6	0	15	7	0					
1	1	CH Arras	1	0	0	0	1	0	0					
7	7	CH Lens	7	0	3	1	4	0	0					
3	3	CH Béthune	3	0	3	1	0	0	0					
126	107	Pays de Loire	109	1	48	17	60	11	0					
33	29	CHU Nantes	31	0	12	5	19	4	0					
7	7	CH St-Nazaire	7	0	5	1	2	1	0					

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
10	9	CH Cholet	9	0	6	2	3	2	0					
4	0	CH Mans	0						0					
72	62	CH Angers	62	1	25	9	36	4	0					
48	45	Picardie	45	0	9	1	36	1	0					
47	44	CH Amiens	44	0	9	1	35	0	0					
1	1	CH Compiègne	1	0	0	0	1	1	0					
		Aquitaine (FN)												
1	1	CH Libourne	1	0	0	0	1	0	0					
		Midi Pyrénées (FN)												
5	4	CHIC Castres	4	0	0	0	4	1	0					
		Corse (FN)												
2	2	CH Bastia	2	0	2	0	0	0	0					
		Monaco (FN)												
2	0	CHPG	0	0	0	0	0	0	0					
17	11	Aquitaine	11	0	7	5	4	2	0					
3	0	Agen	0	0	0	0	0	0	0					
2	1	Bordeaux	1	0	1	0	0	0	0					
8	7	Libourne	7	0	4	4	3	1	0					
2	2	Pau	2	0	2	1	0	0	0					
2	1	Tulle	1	0	0	0	1	1	0					
44	44	Auvergne	43	0	21	12	22	12	1	0	0	0	1	1
1	1	Chamalières	1	0	0	0	1	0	0					
43	43	Clermont-Ferrand	42	0	21	12	21	12	1	0	0	0	1	1
24	24	Languedoc-Roussillon	23	0	10	9	13	7	1	0	0	0	1	0
15	15	Nîmes	14	0	2	1	12	6	1	0	0	0	1	0
9	9	Perpignan	9	0	8	8	1	1	0					
		Limousin												
20	19	Gueret	19	0	15	11	4	3	0					
		Midi-Pyrénées												
15	15	Rodez	15	1	7	2	7	3	0					
101	85	PACA	83	1	40	20	42	13	2				2	1

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
6	5	Aix-en-Provence	5	0	2	0	3	0	0					
8	8	Antibes	8	0	4	2	4	2	0					
14	12	Avignon	12	0	5	3	7	1	0					
12	10	Cannes	10	1	6	4	3	1	0					
5	5	Frejus	5	0	1	0	4	2	0					
16	16	Marseille	15	0	8	3	7	2	1	0	0		1	0
2	0	Monaco												
20	16	Nice	16	0	7	2	9	2	0					
18	13	Toulon	12	0	7	6	5	3	1	0	0		1	1
57	53	Poitou-Charentes	53	0	17	2	36	17	0					
18	16	La Rochelle	16	0	4	1	12	7	0					
39	37	Poitiers	37	0	13	1	24	10	0					
218	195	Rhône-Alpes	190	4	57	19	129	26	5		3	1	2	0
3	0	Annecy												
6	6	Bourg-en-Bresse	6	0	0	0	6	3	0					
5	4	Bourgoin-Jallieu	4	0	2	0	2	0	0					
18	14	Chambéry	12	1	3	2	8	0	2	0	0		2	0
94	92	Grenoble	92	2	16	3	74	10	0					
7	3	Lyon	3	0	3	0	0		0					
11	11	Roanne	11	0	5	4	6	2	0					
72	65	St Etienne	62	1	28	10	33	11	3	0	3	1	0	
2	0	Valence	0						0					
		Autres												
20	17	Armées	17	0	5	3	12	4	0	0	0	0	0	0
9	8	HIA Brest	8	0	2	2	6	3	0					
8	8	HIA Bégin	8	0	2	1	6	1	0					
3	1	CESPA Marseille (FN)	1	0	1	0	0	0	0					
0	0	EHPAD (FN)	0						0					
14	4	EHPAD (FS)	0						4	0	0	0	4	0
4	4	Libourne	0						4	0	0		4	0
1	0	St Galmier	0						0					

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
3	0	St Vallier	0						0					
6	0	Tournon	0						0					
9	4	Aéroport Roissy (FN)	4	0	2	1	2	1	0					
5	5	Laboratoires de biologie médicale (FN)	5	1	1	0	3	3	0					
26	25	IP Cayenne (FN)	25	1	14	3	10	7	0					
8	7	Papeete (FN)	5	0	4	1	1	0	2	0	2	0	0	0
12	12	La Réunion (FS)	12	0	0		12	10	0					
68	58	TOTAL autres (FN)	56	2	26	8	28	15	2	0	2	0	0	0
26	16	TOTAL autres (FS)	12	0	0	0	12	10	4	0	0	0	4	0
2242	1416	TOTAL général (FN)	1410	18	438	152	954	309	18	0	15	5	3	1
2001	1145	TOTAL général (FS)	1129	11	434	260	684	363	16	0	6	4	10	2
4243	2561	TOTAL GÉNÉRAL	2539	29	872	412	1638	672	34	0	21	9	13	3

Tableau 2 : Bilan des prélèvements analysés par les CNR-IPP et -HCL

➤ **CNR-IPP : détection de 12 cas d'infections grippales mixtes**

Virus grippaux A + B :

- 1 x A(H3N2) + B Victoria

Virus grippaux A :

- 11 x A(H1N1)pdm09 + A(H3N2)

➤ **CNR-HCL : aucune détection d'infections grippales mixtes**

Nbre de plvts / souches	Plvts positifs (A ou B)	Provenance Surveillance Population	Virus type A				Virus type B			
			TOTAL A	non sous typés	H1N1 pdm09	H3N2	TOTAL B	non sous typés	B Victoria	B Yamagata
520	207	Guyane	175	1	31	143	32	0	32	0
275	98	Hôpitaux / Centre de Santé	82	0	17	65	16	0	16	0
34	11	Centre Médical Inter-Armée	9	0	1	8	2	0	2	0
29	6	Laboratoires privés / Médecin de ville	6	0	0	6	0	0	0	0
182	92	Surveillance sentinelle	78	1	13	64	14	0	14	0
277	251	Martinique	250	0	74	176	1	0	0	1
226	226	CHU Fort de France	226	0	65	161	0	0	0	0
51	25	Surveillance sentinelle	24	0	9	15	1	0	0	1
185	158	Guadeloupe	158	3	72	83	0	0	0	0
107	106	CHU Pointe à Pitre	106	3	48	55	0	0	0	0
78	52	Surveillance sentinelle	52	0	24	28	0	0	0	0
311	169	Total Sentinelle	154	1	46	107	15	0	14	1
671	447	Total Non Sentinelle	429	3	131	295	18	0	18	0
982	616	Total Général	583	4	177	402	33	0	32	1

Tableau 3 : Bilan des prélèvements analysés par le CNR-IPG

➤ **CNR-IPG : Pas de détection de cas d'infections grippales mixtes**

2.5.2 Analyses virologiques d'échantillons cliniques humains, surveillance saisonnière des autres virus respiratoires

La recherche des autres virus respiratoires VRS, rhinovirus/enterovirus (HRV) et metapneumovirus (HMPV) est réalisée en première intention sur les échantillons provenant du réseau Sentinelles. Pour le CNR-HCL, pour les échantillons pour lesquels aucun virus n'a été détecté, la recherche des virus parainfluenza (PIV) et des coronavirus (hCoV) est réalisée. Le bilan des autres virus détectés est présenté Tableau 4, ainsi que les co-infections virus grippaux/autres virus respiratoires. Le laboratoire de Corte utilise, en première intention, un kit multiplex qui permet également la détection des adenovirus et des bocavirus.

Les HRV (11,3%) sont les plus détectés, viennent ensuite les VRS (6,8% ; dont 52% VRS A, 43,9% VRS B, et 2% non typés), puis les HMPV (3,8%).

Pour le CNR-HCL sur 466 échantillons analysés, 38 PIV et 76 hCoV ont été détectés. Pour le laboratoire de Corte sur 150 échantillons analysés, 2 PIV et 8 hCoV ont été détectés.

Nb plvts	Origine	VRS				HRV	HMPV	Coinfection Grippe + VRS	Coinfection Grippe + HRV	Coinfection Grippe + HMPV
		Total	Non typés	VRS A	VRS B					
1436	Sentinelles France nord	110	0	58	52	158	53	10	19	3
1362	Sentinelles France sud	84	4	45	35	165	51	12	15	3
117	Sentinelles Corse	4				8	6	2	0	0
2915	Total	198	4	103	87	331	110	24	34	6

Tableau 4 : Bilan des détections des autres virus respiratoires par les CNR-IPP et -HCL

Pour le CNR-IPG la recherche des VRS est réalisée en première intention sur tous les prélèvements de Guyane. La recherche des rhinovirus/enterovirus (HRV) est réalisée dans un second temps sur tous les prélèvements de Guyane :

- sur 520 échantillons analysés, 47 VRS A et 30 VRS B ont été détectés.
- sur 492 échantillons analysés, 58 HRV ont été détectés.

Nbre de plvts / souches	Plvts positifs (VRS A ou B)	Provenance Surveillance Population	VRS A	VRS B
275	69	Total Hopitaux Guyane	43	26
239	59	Hôp. Cayenne / Centre de Santé	34	25
119	49	Pédiatrie Hôp. Cayenne	29	20
120	10	Autres services Hôp. Cayenne	5	5
34	10	Hôp. St Laurent du Maroni	9	1
7	1	Pédiatrie Hôp. St Laurent	1	0
27	9	Autres services Hôp. St Laurent	8	1
2	0	Hôp. Kourou	0	0
63	3	Médecin de ville / CMIA	1	2
182	5	Surveillance sentinelle	3	2
182	5	Total Sentinelle	3	2
338	72	Total Non Sentinelle	44	28
520	77	Total Général	47	30

Tableau 5 : Bilan des détections des VRS par le CNR-IPG

➤ **CNR-IPG : Détection de co-infections grippe/VRS**

1 cas : B Victoria + VRS A

Détection de co-infections grippe/HRV

5 cas : A(H3N2) + HRV

1 cas : B Victoria + HRV

Détection de co-infections VRS/HRV

5 cas : VRS A + HRV

2 cas : VRS B + HRV

2.5.3 Analyse virologique d'échantillons cliniques humains, virus émergents

2.5.3.1 Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV)

➤ **CNR-IPP et CNR-HCL**

Le nombre de suspicions d'infection à MERS-Coronavirus était encore en diminution cette saison.

Les cas suspects avaient exclusivement séjourné en Arabie Saoudite, notamment lors du pèlerinage à la Mecque. Aucune infection à MERS-CoV n'a été détectée mais d'autres étiologies ont été retrouvées dans la plupart des cas (Tableau 6). Les rhinovirus/enterovirus (HRV) sont les virus les plus souvent détectés chez ces patients au retour d'Arabie Saoudite présentant une infection respiratoire aigüe.

Nb patients	Nb plvts	Nb pos	Provenance	Influenza A			Influenza B		Autres virus Resp	Pays visité
				NT	H1N1	H3N2	Vic	Yam		
			Hôpital (FN)							
			Alsace							
1	2	1	Strasbourg		1				A. Saoudite	
			Hôpital (FS)							
			Bourgogne							
1	1	1	Mâcon		1				A. Saoudite	
			Rhône-Alpes							
1	2	1	Annecy		1				A. Saoudite	
24	53	23	Lyon		5	3		2	15 HRV, 4 AdV, 1 VRS B, 1 hPIV (nombreuses co-infect)	A. Saoudite, Émirats Arabes Unis
1	2	1	TOTAL général (FN)		1					
26	56	26	TOTAL général (FS)		7	3		2	15 EV/HRV	
27	58	27	TOTAL GENERAL		8	3		2	15 EV/HRV	

Tableau 6 : Bilan des suspicions d'infections à MERS-CoV analysées par les CNR-IPP et CNR-HCL. [§] HRV : rhinovirus/enterovirus

➤ **CNR IPG**

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

2.5.3.2 Virus de grippe aviaire A(H7N9), A(H5N1)

Trois suspicions de grippe aviaire ont été reçues par le CNR-IPP.

Il s'agissait :

- d'un patient présentant un syndrome de détresse respiratoire aiguë au retour du Myanmar et qui avait visité des marchés aux volailles.
- d'un couple présentant une infection respiratoire aiguë, au retour d'un voyage en Inde et au Népal.

Aucun virus respiratoire n'a été détecté.

Aucune suspicion de grippe aviaire A(H5N1) ou A(H7N9) n'a été reçue au CNR-HCL, ni au CNR-IPG.

2.5.4 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 des caractéristiques antigénique et génétique des souches.

Surveillance des cas d'excrétion grippale prolongée et des cas sévères:

Pour les patients hospitalisés sous traitement par INA, sont sélectionnés les prélèvements de patients présentant une excrétion virale prolongée (> 5 jours) mais également les demandes explicites de recherche de résistance aux antiviraux chez des patients pour lesquels il n'y a pas d'amélioration clinique malgré le traitement par oseltamivir. 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. Le séquençage NGS des virus est réalisé si la charge virale est suffisante. Les isolats correspondants lorsqu'ils sont obtenus sont testés par test fluorimétrique de sensibilité aux INA.

2.6 Activités de séquençage

2.6.1 CNR-IPP

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

OUI, l'Institut Pasteur est doté d'une plateforme dite Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M), qui 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 du séquençage à haut débit multi-pathogènes.

La technologie utilisée par cette plateforme de séquençage est la technologie Illumina (fabrication des librairies + séquenceurs). 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 pipeteurs et extracteurs permettent d'homogénéiser et de normaliser les ADN et amplicons avant d'entrer dans le pipeline de production.

L'ingénieure du CNR, Flora Donati a mis en place la technologie de séquençage minION d'Oxford Nanopore, dans le but de pouvoir séquencer rapidement des MOT (la plateforme P2M n'étant pas habilitée pour les MOT). Le minION est un séquenceur de poche utilisant la technologie des nanopores, il s'agit d'un séquenceur miniature qui permet le séquençage de fragments très longs.

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

Les CNR à l'Institut Pasteur ont la possibilité de faire appel à une expertise bio-informatique, en sollicitant les services supports en interne à l'Institut Pasteur. Ils ont actuellement accès aux bio-informaticiens du Centre de Bio-informatique, Bio-statistique et Biologie Intégrative (C3BI), qui qualifient et réalisent une analyse de premier niveau (contaminations, qualité, assemblage) sur les données sortantes. Ces bio-informaticiens peuvent également apporter leur aide aux CNR, pour le développement de méthodes de génotypage et d'autres pipelines d'analyses des séquences, y compris en cas d'épidémie. Malheureusement, la demande est très supérieure à l'offre (1,2 ETP dédié) et les CNR ne peuvent donc pas être aidés simultanément. Les CNR et les unités qui les hébergent doivent donc faire appel à des ingénieurs ou bio-informaticiens membres de leur équipe de recherche ou employés sur contrat dédié.

Utilisation de CLC Genomics Workbench pour l'analyse des séquences.

Dans le cadre de la mise en place du séquençage par la technologie minION, nous sommes en relation avec un informaticien du C3BI pour obtenir un système d'analyse des données spécifiques des virus respiratoires et notamment de la grippe, à l'aide de l'outil IRMA.

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

Le séquençage NGS est utilisé pour répondre à différentes questions de santé publique.

- Variabilité génétique des souches circulantes
- Détermination des pourcentages de variants pour une mutation connue
- Détection de nouveaux variants génétiques
- Détection de mutations responsables de diminution de sensibilité aux antiviraux
- Etc ...

Le séquençage NGS est réalisé préférentiellement sur les extractions d'acides nucléiques issues des prélèvements primaires. Les isolats issus de la culture virale sont utilisés dans un second temps si le séquençage n'a pas pu être réalisé sur le prélèvement primaire.

Des outils informatiques, bioinformatiques et statistiques sont utilisés pour analyser et modéliser les données NGS et les rendre lisibles sous forme d'arbres phylogénétiques, de tableaux de variants. Des routines automatiques ont également été développées afin d'analyser en temps réel les données NGS. Ainsi, rapidement, il est possible d'observer la présence de mutations déjà connues, responsables de résistance aux antiviraux par exemple.

Les données brutes NGS sont conservées par le CNR sur les serveurs de l'Institut Pasteur. Les séquences consensus obtenues après analyse sont enregistrées dans la base de données du CNR et déposées également dans la base de données internationale GISAID. Aujourd'hui très peu de bases de données internationales proposent le stockage des données brutes en format natif fastq.

Les critères de sélection des souches pour le séquençage sont différents selon qu'il s'agit de prélèvements Sentinelles ou hospitaliers (RENAL), mais dans tous les cas le séquençage n'est réalisable que si la charge virale est suffisante. Les prélèvements issus du réseau de médecin généralistes Sentinelles ne sont pas tous séquencés. La sélection tient compte en premier lieu de la non-opposition du patient à l'utilisation secondaire de son prélèvement et de ses données associées. Ensuite, en plus d'une sélection aléatoire pour chaque sous-type et lignage de virus pour le projet européen I-Move sur l'efficacité vaccinale selon les clades et sous-clades virales, sont sélectionnés pour chaque sous-type et lignage de virus des prélèvements permettant une représentativité de la circulation virale au cours de la saison en termes de distribution géographique et temporelle et de distribution par âge des patients. En outre, sont sélectionnés, les prélèvements de patients infectés et vaccinés de moins de 65 ans, des patients traités par antiviral ou dont l'entourage a été traité.

Les prélèvements envoyés par les laboratoires hospitaliers sont séquencés en priorité s'ils proviennent de cas sévères. Une sélection des prélèvements effectués en phase pré-épidémique et post-épidémique est également réalisée afin de détecter éventuellement un nouveau variant. Tous les cas particuliers font également partie de la sélection (grippe nosocomiale, encéphalite, tableau clinique particulier).

Le séquençage a été réalisé pour 481 virus grippaux provenant du réseau Sentinelles et du réseau RENAL selon la répartition suivante (Tableau 7).

Provenance	Sentinelles				RENAL et autres (Outre-Mer, EHPAD...)			
	H1N1	H3N2	B Yamagata	B Victoria	H1N1	H3N2	B Yamagata	B Victoria
Nb de séquences	70	173	0	0	82	152	1	3

Tableau 7 : Bilan du nombre de séquences réalisées durant la saison 2018/2019.

De plus le séquençage des VRS a également été encore optimisé cette année en améliorant l'analyse bio-informatique de ce virus dont le génome est différent de celui des virus grippaux.

Dans le cadre de la formation des stagiaires, un technicien du laboratoire de virologie de l'Institut Pasteur de Madagascar est venu se former au séquençage. Trente virus grippaux ont ainsi été séquencés, ainsi que 30 VRS.

Des VRS ont également été séquencés cette saison, 27 provenant de la surveillance Sentinelles et un de l'hôpital.

2.6.2 CNR-HCL

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

OUI, les HCL disposent de plusieurs plateformes de séquençage haut débit dont une est utilisée par le CNR-HCL pour le séquençage NGS (située sur le site Centre de biologie et Pathologie Est, Bron). Elle est partagée par les CNR des HCL (Virus des infections

respiratoires, Enterovirus et Paréchovirus, Légionelles, Staphylocoques) ainsi que les équipes de BioGenet (génétique humaine). L'utilisation partagée de cette plateforme permet l'optimisation de cette nouvelle technologie par les différentes équipes de diagnostic et de recherche des HCL dans le cadre du génotypage humain, viral et bactérien.

La technologie utilisée par cette plateforme de séquençage est la technologie Illumina. Les banques sont préparées avec le kit Nextera XT grâce à un robot pipeteur (Zephyr, Caliper) qui permet de standardiser la préparation et la normalisation des librairies. Le séquençage s'effectue majoritairement sur le séquenceur NextSeq 500, et ponctuellement le séquenceur MiSeq.

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

Le CNR-HCL bénéficie du logiciel NGS-WEB développé par le support bio-informatique du site (Service de Biostatistique et Bioinformatique, HCL) pour valider rapidement la qualité du run de séquençage. Un pipeline bioinformatique dédié pour l'analyse des séquences de virus générés par NGS a été développé grâce aux compétences internes du CNR en utilisant des logiciels open-source [Simon, *Viruses*, 2018].

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

Le séquençage NGS est utilisé pour répondre à différentes questions de santé publique :

- Variabilité génétique des souches circulantes des virus influenza et de VRS (en communautaire et à l'hôpital)
- Détermination de la prévalence de mutations décrites dans la littérature (notamment les mutations de résistance aux INA ou au baloxavir marboxil, variant antigéniques)
- Exploration de propriétés virales (diversité génomique, identification de nouvelles mutations)
 - o Détection de nouveaux variants génétiques (mutation de virulence)
 - o Détection de mutations de résistance, responsables de diminution de sensibilité aux antiviraux

Les analyses bioinformatiques réalisées sont les suivantes :

- Détermination des séquences consensus (génomome complet) et analyse phylogénétique
- Analyse des variants minoritaires intra-hôtes

Différentes analyses statistiques sont ensuite conduites en fin de saison pour associer la présence de variants majoritaires ou minoritaires aux données cliniques (dont la sévérité de l'infection et la vaccination).

Les critères de sélection des souches pour le séquençage sont différents selon qu'il s'agisse de prélèvements Sentinelles ou RENAL, mais dans tous les cas le séquençage n'est réalisable que si la charge virale est suffisante.

Les prélèvements issus du réseau de médecins pédiatres et généralistes Sentinelles ne sont pas tous séquencés. La sélection tient compte en premier lieu de la non-opposition du patient à l'utilisation secondaire de son prélèvement et de ses données associées. Ensuite en plus d'une sélection au hasard pour chaque sous-type et lignage, sont sélectionnés des patients infectés et vaccinés, des patients traités par antiviral ou dont l'entourage a été traité. La sélection comporte des échantillons de chaque région.

Les prélèvements envoyés par les laboratoires hospitaliers sont séquencés en priorité s'ils proviennent de cas sévères (hospitalisation en réanimation et/ou décès). Pour la surveillance dans les EHPAD, des représentants des épidémies dans les différentes régions sont séquencés.

Les cas de grippe survenant en phase pré-épidémique et post-épidémique sont également séquencés de manière prioritaire afin de détecter éventuellement un nouveau variant. Les virus grippaux issus de cas d'importation (suspensions MERS-CoV, retour de voyage) sont séquencés également. Enfin, les cas particuliers vont également faire partie de la sélection (grippe nosocomiale, encéphalite, excrétion prolongée, tableau clinique particulier).

D'autre part, nous avons développé le séquençage du VRS et pu obtenir la séquence génome complet d'une soixantaine de virus, sélectionnés aléatoirement au moment du pic épidémique. Leur analyse phylogénétique est en cours.

Les données brutes NGS sont conservées sur les serveurs des HCL (serveur de calcul et stockage des données) avec un accès restreint aux personnes utilisant la plateforme. Les séquences consensus sont aussi stockées sur les serveurs HCL et une sélection de séquences est déposée dans la base internationale GISAID.

Le séquençage a été réalisé pour 302 virus provenant du réseau Sentinelles et du réseau RENAL selon la répartition suivante (Tableau 8).

Provenance	Sentinelles				RENAL et autres (Outre-Mer, EHPAD...)			
	H1N1	H3N2	B Yamagata	B Victoria	H1N1	H3N2	B Yamagata	B Victoria
Nb de séquences	41	58	0	2	70	118	8	5

Tableau 8 : Bilan du nombre de séquences réalisées durant la saison 2018/2019.

2.6.3 CNR-IPG

Le CNR-IPG a un accès possible à la plateforme dite Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M) de l'Institut Pasteur. Parmi les échantillons envoyés au CNR-IPP en avril et mai 2019, 19 échantillons ont pu être séquencés : 13 A(H1N1)pdm09 et 6 A(H3N2). 12 échantillons provenaient de Martinique, 4 de Guyane et 3 de Guadeloupe. Les séquences correspondantes sont disponibles dans GISAID.

Dans le cadre de projets de recherche (FEDER EFAG), le CNR-IPG prévoit, en collaboration avec le laboratoire « Interaction virus-hôtes » de l'IPG spécialisé dans cette activité, la réalisation de séquençage génomique de type WGS et NGS pour l'exploration de fièvres d'étiologie indéterminée.

Enfin le laboratoire de virologie de l'IPG réalise régulièrement des activités de séquençage classique : en 2018-2019 ces activités ont essentiellement porté sur des prélèvements positifs pour un arbovirus. CLC Genomics Workbench 6 est utilisé pour l'analyse des séquences.

3 Activités de surveillance

En **Métropole**, la saison de surveillance 2018-2019 a été marquée par une épidémie grippale intense mais de courte durée, de la semaine S01/2019 à la semaine S10/2019. Le pic épidémique a été atteint en semaine S06/2019. La saison a été caractérisée par la circulation quasi-exclusive de virus de type A. Les virus A(H1N1)pdm09 et A(H3N2) ont co-circulé au début de l'épidémie et les virus A(H3N2) sont ensuite devenus majoritaires. Les virus de type B sont restés sporadiques durant toute la saison. Comme lors des saisons précédentes, l'épidémie de VRS, d'intensité moyenne, a précédé l'épidémie de grippe avec une co-circulation à parts environ égales des VRS A et B.

Dans les **Territoires Français d'Amérique (TFA)**, la saison 2018-2019 a été marquée par des épidémies grippales d'intensité modérée aux Antilles et par l'absence d'épidémie en Guyane. Une circulation virale continue a cependant été mise en évidence en Guyane, de la semaine S01/2019 à la semaine S29/2019. Aux Antilles, les périodes épidémiques se sont étendues de la semaine S03/2019 à la semaine S13/2019 pour la Guadeloupe et de la semaine S03/2019 à la semaine S15/2019 pour la Martinique.

Dans les 3 Territoires Français d'Amérique, une co-circulation de virus grippaux A(H3N2) et A(H1N1)pdm09 a été observée avec une prédominance de virus A(H3N2). Une circulation de virus B Victoria a été mise en évidence en Guyane, à partir de la semaine S17/

3.1 Surveillance en Métropole

3.1.1 Description du réseau des partenaires

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.

3.1.1.1 Les partenaires

➤ **Sentinelles**

Le réseau des médecins Sentinelles est présent dans 13 régions et comprend 332 médecins préleveurs : 268 médecins généralistes et 64 pédiatres. Parmi eux 312 (93,9%) ont réalisé au moins un prélèvement (tableau 8, figures 1 et 2).

La France-Nord comporte 8 régions : Ile de France, Normandie, Centre-Val de Loire, Bretagne, Pays de la Loire, Hauts-de-France, Grand Est et Bourgogne-Franche Comté.

La France-Sud comporte 5 régions : Auvergne-Rhône-Alpes, Corse, Nouvelle-Aquitaine, Occitanie et Provence-Alpes-Côte d'Azur.

La représentativité des médecins préleveurs du réseau Sentinelles est décrite dans le Tableau 9 (Source [réseau Sentinelles](http://www.sentiweb.fr/), INSERM/UPMC, <http://www.sentiweb.fr/>) et leur répartition géographique est représentée Figures 4 et 5.

Région	Médecins généralistes	Proportion de médecins généralistes préleveurs / généralistes %	Pédiatres	Proportion de pédiatres préleveurs / pédiatres %
Auvergne-Rhône-Alpes	51	0,7	11	3,6
Bourgogne-Franche-Comté	13	0,5	2	2,2
Bretagne	15	0,5	3	2,8
Centre-Val de Loire	10	0,5	2	2,1
Corse	12	3,8	1	8,3
Grand Est	24	0,5	9	4,1
Hauts-de-France	22	0,4	2	1,3
Ile-de-France	33	0,4	12	1,6
Normandie	11	0,4	5	5,6
Nouvelle-Aquitaine	19	0,3	5	2,9
Occitanie	26	0,4	6	2,3
Pays de la Loire	12	0,3	2	2,1
Provence-Alpes-Côte d'Azur	20	0,4	4	1,4
FRANCE	268	0,8	64	3,1

Tableau 9 : Répartition par région des médecins généralistes et pédiatres du Réseau Sentinelles ayant accepté de participer à la surveillance virologique et proportion par rapport aux généralistes et pédiatres en exercice dans la région - France, saison 2018-2019. (Source [réseau Sentinelles, INSERM/UPMC, http://www.sentiweb.fr](http://www.sentiweb.fr))

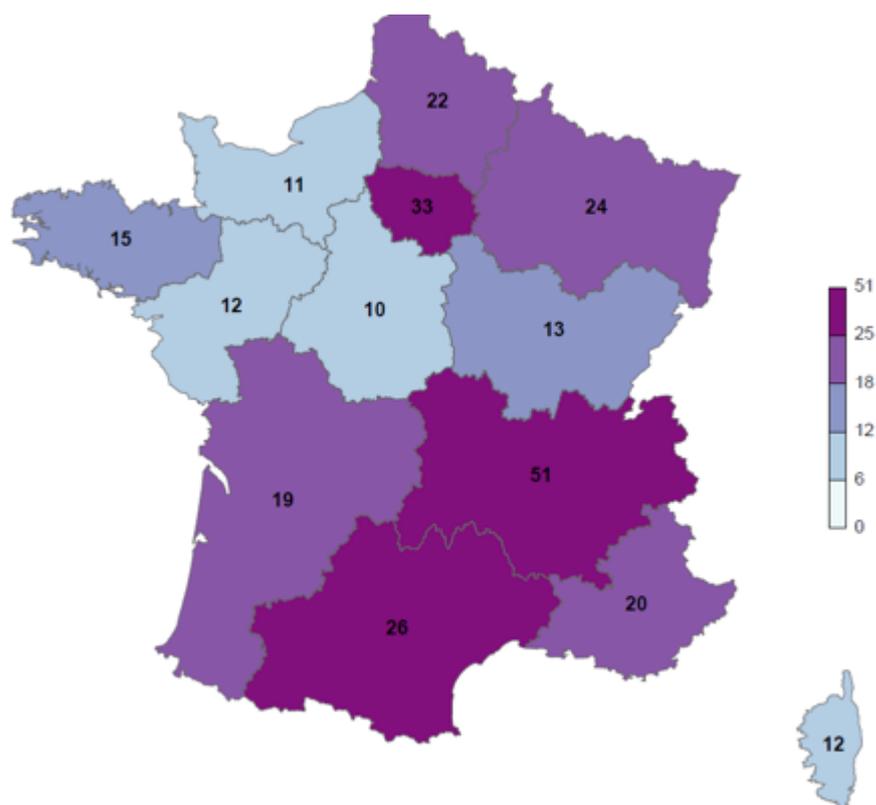


Figure 4 : Représentation géographique des médecins généralistes Sentinelles ayant accepté de participer à la surveillance virologique des syndromes grippaux saison 2018-2019, par région (Source [réseau Sentinelles, INSERM/UPMC, http://www.sentiweb.fr](http://www.sentiweb.fr))

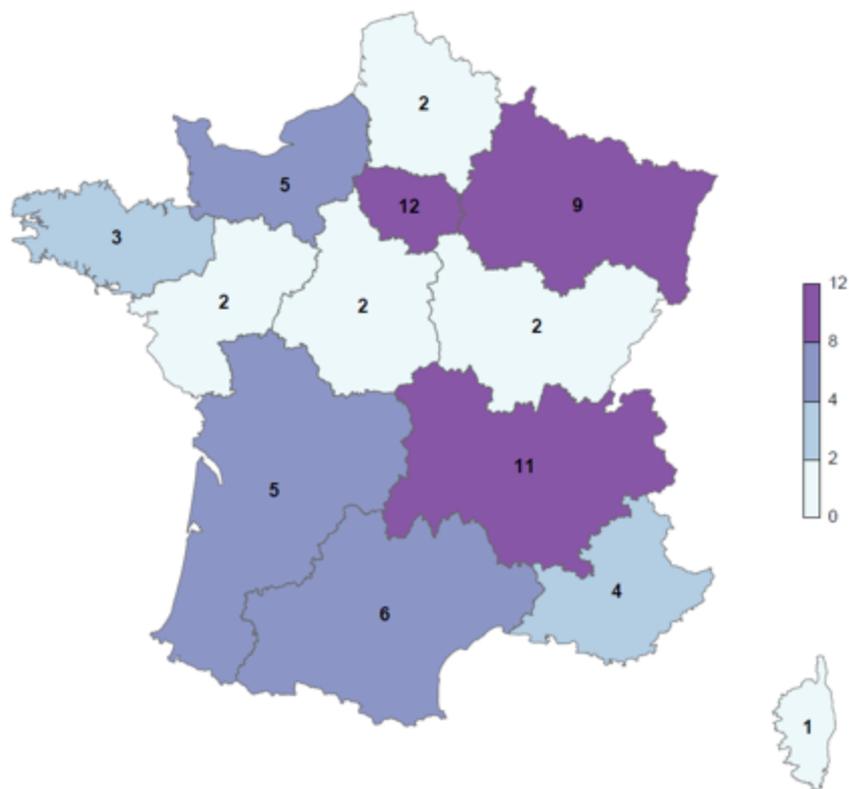


Figure 5 : Représentation géographique des pédiatres Sentinelles ayant accepté de participer à la surveillance virologique des syndromes grippaux saison 2018-2019, par région (Source réseau Sentinelles, INSERM/UPMC, <http://www.sentiweb.fr>)

➤ **RENAL**

Ce Réseau National des laboratoires hospitaliers comporte :

- en **France-Nord**, 24 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 nord et sud, Dijon, Brest, Rouen, Tours, Nancy, Elbeuf et Caen.

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

Aix-en-Provence, Annecy, Bordeaux, Chambéry, Clermont-Ferrand, Grenoble, Limoges, Lyon, Marseille, Montpellier, Nice, Nîmes, Poitiers, St Etienne et Toulouse.

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 détectés, soit par détection directe soit par sérologie, pour lesquels les données sont collectées est donnée dans le Tableau 10.

Pathogènes détectés	
Virus grippaux	A total A(H1N1)pdm09 A(H3N2) B C
VRS	A B Non typés
Metapneumovirus	A B Non typés
Picornavirus	Rhinovirus Enterovirus Non typés
Virus parainfluenza	1,2,3,4 Non typés
Coronavirus	229E, OC43, NL63, HKU1, SRAS Non typés
Bocavirus	
Adenovirus	
Herpesvirus	
Cytomegalovirus	
Bactéries	Chlamydiae, Mycoplasma, fièvre Q

Tableau 10 : Liste des pathogènes pour lesquels les données relatives à la détection et à la sérologie sont 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 puis réseau Sentinelles) 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 39 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** du CNR 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 (Figures 4 -5).

Dans le cadre de la surveillance communautaire du réseau Sentinelles, pour la saison 2018-2019, durant la période de surveillance un patient au maximum a été prélevé par semaine et par médecin participant. Il s'agit du premier patient de la semaine consultant pour un syndrome grippal (SG) selon la définition de cas du réseau Sentinelles utilisée pour la

surveillance clinique des syndromes grippaux (cf ci-dessous), quel que soit l'âge, présentant des symptômes depuis moins de 5 jours et ayant donné son accord pour participer à cette surveillance. En plus de cette surveillance des syndromes grippaux, le réseau Sentinelles a renouvelé cette saison la surveillance des infections respiratoires aiguës (IRA) chez les sujets de plus de 65 ans, (cf définition ci-dessous). Il s'agit du premier patient de la semaine consultant pour une IRA, ne répondant pas à la définition du SG, ayant 65 ans ou plus, présentant des symptômes depuis moins de 5 jours et ayant donné son accord pour participer à cette surveillance.

Définitions de cas :

Syndrome grippal : fièvre supérieure à 39°C, d'apparition brutale, accompagnée de myalgies et de signes respiratoires

Infection respiratoire aiguë : apparition brutale d'au moins l'un des quatre symptômes respiratoires suivants (toux, maux de gorge, dyspnée, rhinite) et le jugement d'un clinicien selon lequel la maladie est due à une infection.

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.

Dans le cadre de la surveillance hospitalière, tous types de prélèvements respiratoires sont réalisés : naso-pharyngés, expectorations, liquides broncho-alvéolaires ...

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. A partir de ce nombre de consultations pour syndromes grippaux, il est possible d'estimer la part attribuable aux virus de la grippe.

La période épidémique pour la saison 2018-2019, définie par le franchissement du seuil épidémique du réseau Sentinelles sur la base de la surveillance clinique des syndromes grippaux, s'est étendue entre les semaines S03/2019 et S08/2019 soit pendant 6 semaines. L'épidémie a été de courte durée.

Le pic d'activité a été observé en semaine S06/2019 avec un taux d'incidence de 599 consultations pour syndromes grippaux pour 100 000 habitants (Figure 6).

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 7).

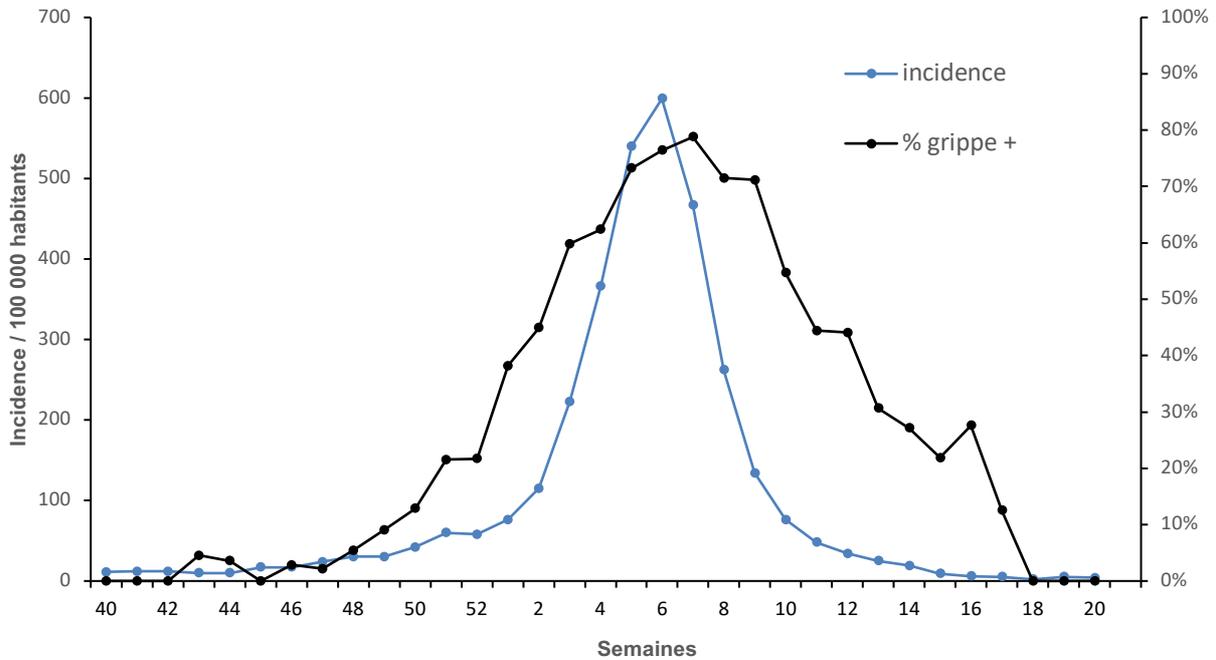


Figure 6 : Syndromes grippaux (Grippe clinique) pour 100 000 habitants et pourcentage de virus grippaux détectés en médecine générale (Réseau Sentinelles) – période S40/2018-S20/2019

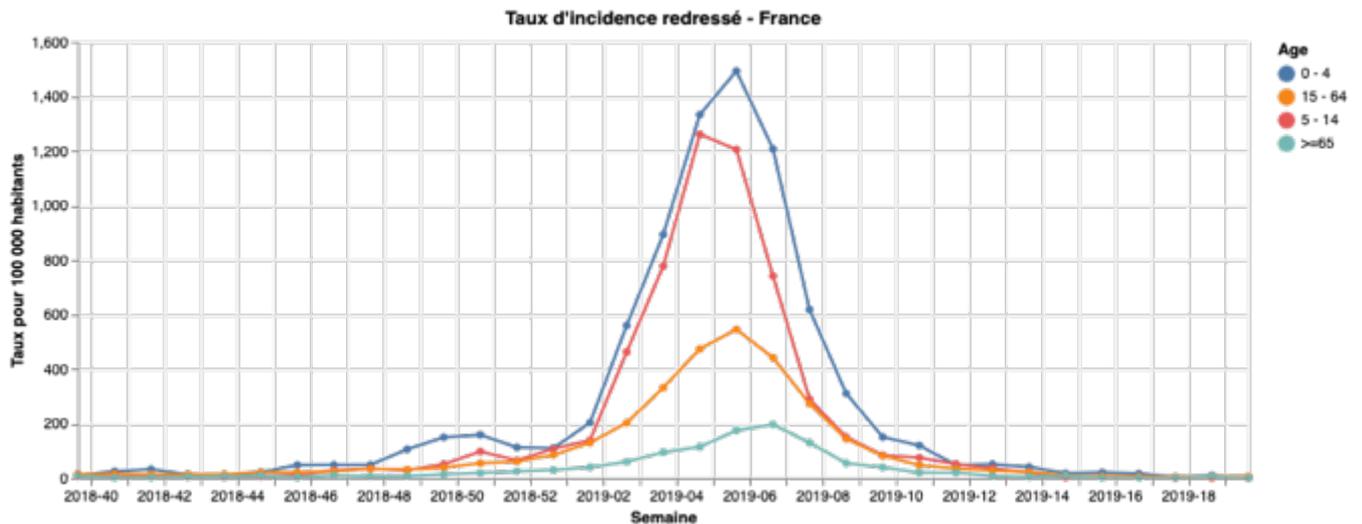


Figure 7 : Syndrome grippaux (Grippe clinique) pour 100 000 habitants par tranches d'âge en France
Médecine générale et pédiatres (réseau Sentinelles) – période 40/2018-20/2019. (Source réseau Sentinelles, INSERM/Sorbonne Université, <https://www.sentiweb.fr/>)

3.1.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections respiratoires virales

Rappel : Définition de la période épidémique grippale en fonction des acteurs de la surveillance

- Pour Santé publique France : la période épidémique est établie à partir de différentes sources (Réseau Sentinelles, SOS Médecins et OSCOUR) selon 3 méthodes statistiques différentes.
- Pour Sentinelles : elle est définie par la surveillance clinique des syndromes grippaux vus en consultation (taux d'incidence).
- Pour le CNR : elle est définie par des critères purement virologiques sur l'ensemble des données (médecine ambulatoire et hôpital). On parle de dépassement du seuil quand on détecte plus de 10% de virus, 2 semaines consécutives avec au moins 10 virus détectés.

Cette saison l'épidémie a duré 8 semaines selon Santé publique France, de S02/2019 à S09/2019.

De S03/209 à S08/2019 pour le réseau Sentinelles, soit 6 semaines d'épidémie.

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

Au plan virologique, au cours de la saison 2018-2019, la circulation épidémique des VRS a précédé de quelques semaines celle des virus grippaux. Les VRS ont circulé de façon épidémique entre les semaines S46/2018 et S03/2019 et atteint un pic en semaine S50/208. La circulation épidémique des virus grippaux a débuté en semaine S01/2019 pour se terminer semaine S10/2019 avec un pic en semaine S06/2019, soit 10 semaines d'épidémie. L'épidémie de VRS pour la France-Sud a débuté deux semaines après la France-Nord. Cette année, le nombre de virus grippaux détectés a été beaucoup plus important que le nombre de VRS détectés (Figures 8 à 10).

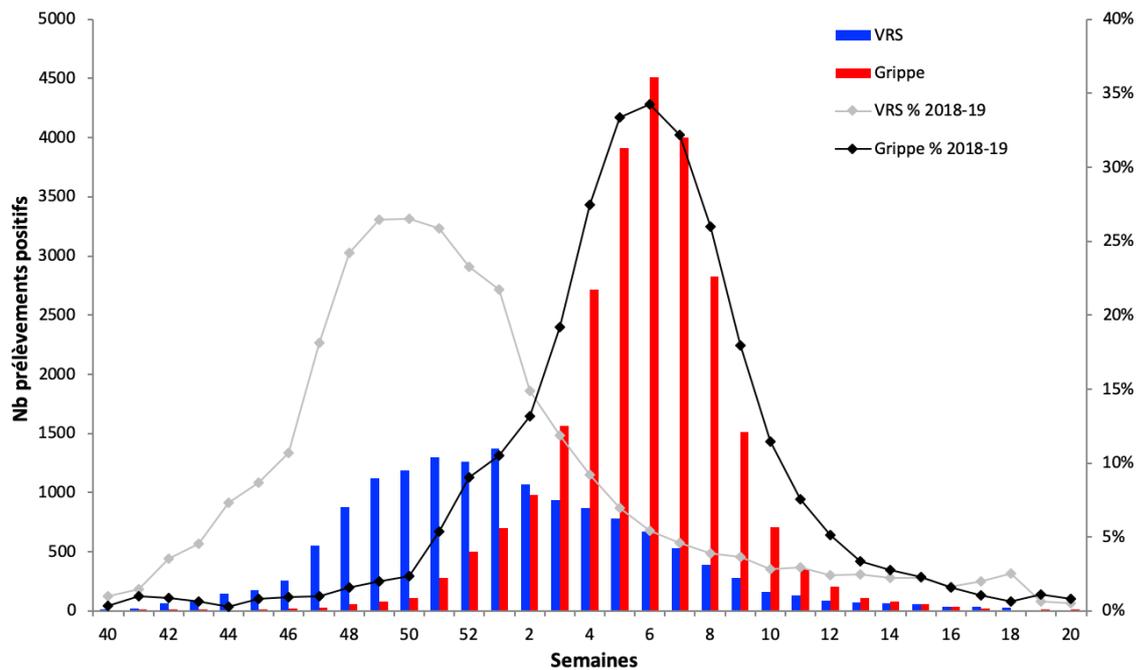


Figure 8 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2018-2019

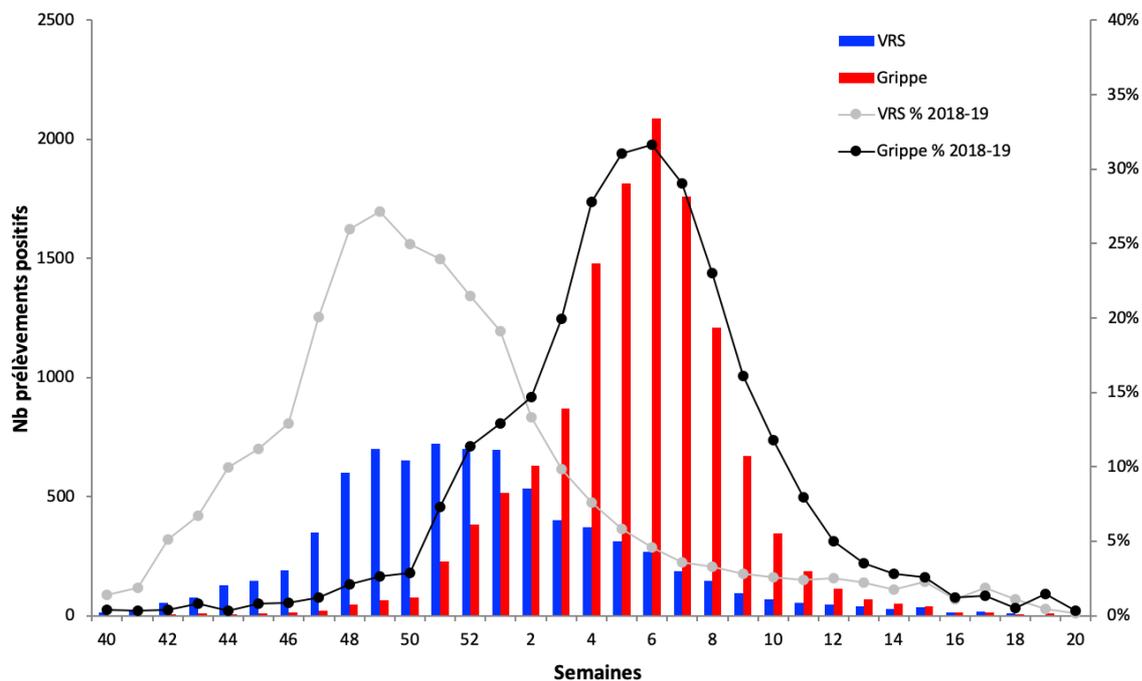


Figure 9 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France-Nord Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2018-2019

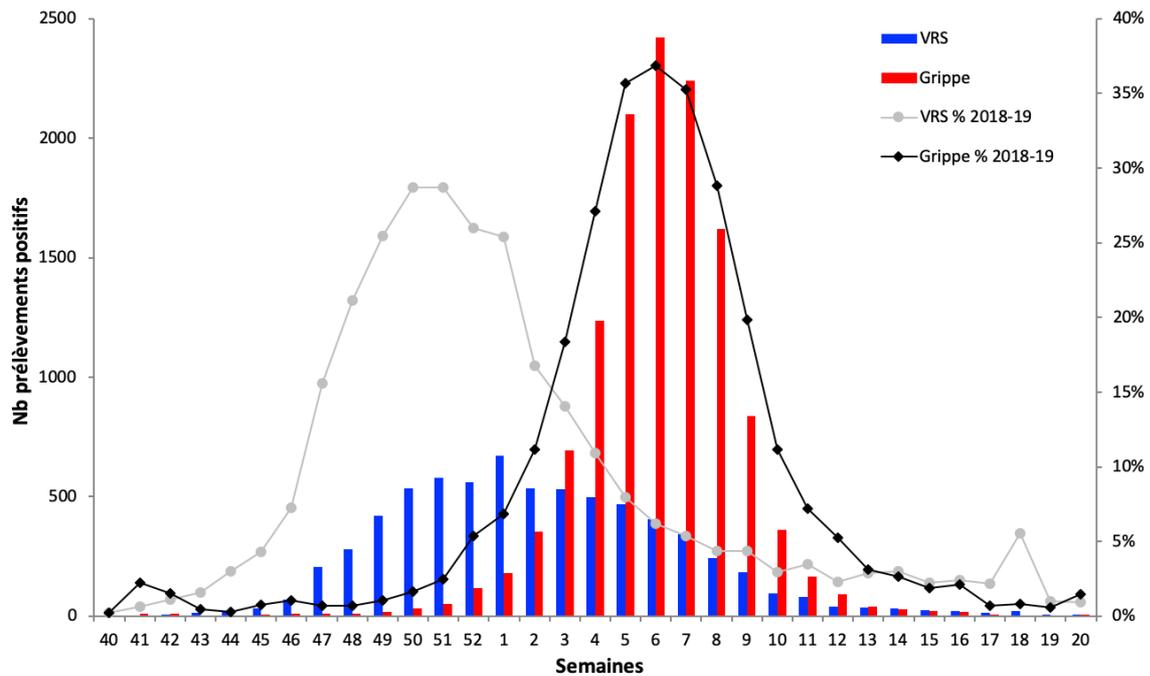


Figure 10 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France-Sud Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2018-2019

Au cours de la saison de surveillance 2018-2019, en médecine ambulatoire, les deux sous-types de virus grippaux de type A ont co-circulé de façon à peu près équivalente jusqu'en semaine S04/2019 et ensuite les virus A(H3N2) sont devenus majoritaires jusqu'à la fin de l'épidémie. Les détections de virus grippaux de type B sont restées sporadiques, voire inexistantes, tout au long de la saison.

Dans le cadre de la surveillance des syndromes grippaux (SG) cf définition page 36, les détections de virus grippaux ont débuté en semaine S49/2018 pour s'intensifier à partir de la semaine S50/2018.

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 16 semaines, de mi-décembre (S50/2018) à fin mars (S13/2019), avec un pic début février (S06/2019). Le taux de prélèvements positifs pour la grippe a dépassé les 10 % à partir de début décembre, et a augmenté de façon significative (>30 %) à partir de fin décembre 2018. Au pic épidémique, plus des trois-quarts des prélèvements du réseau Sentinelles (78,8%) était positif pour la grippe (Figures 11 à 13).

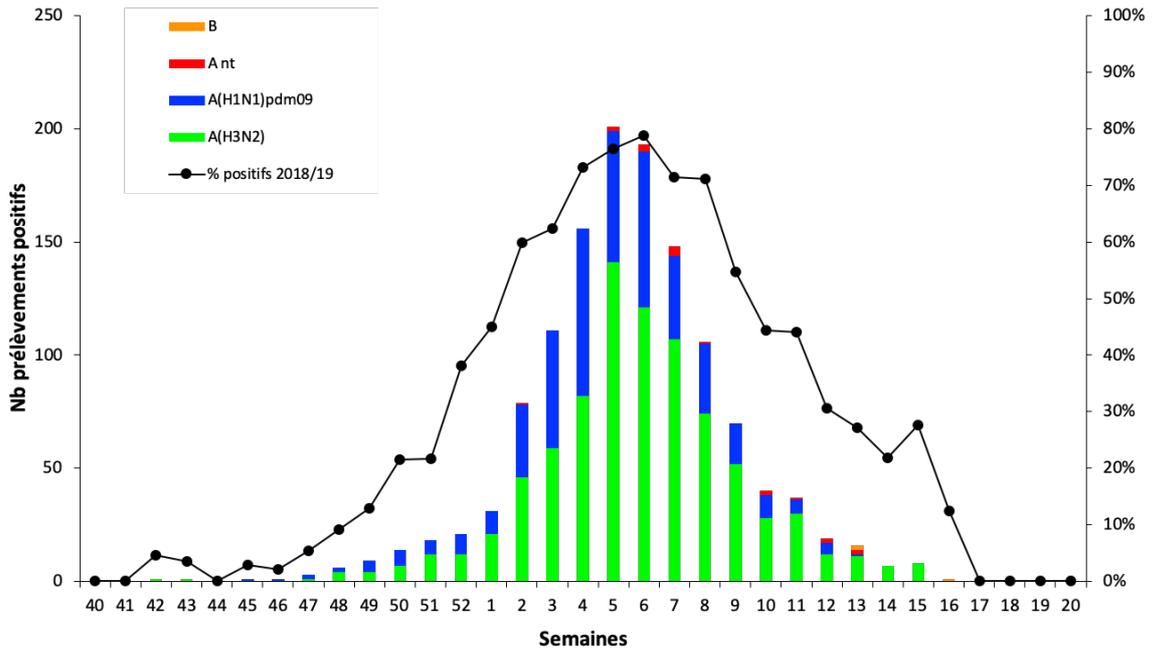


Figure 11 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France Réseau Sentinelles / saison 2018-2019

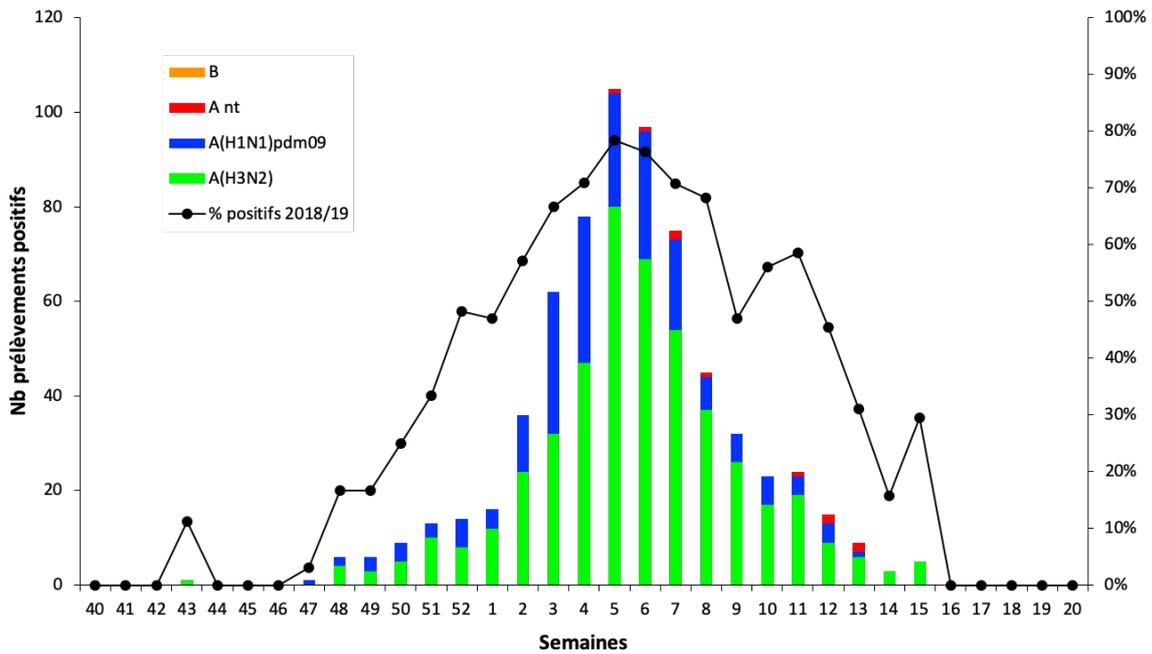


Figure 12 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France nord. Réseau Sentinelles / saison 2018-2019

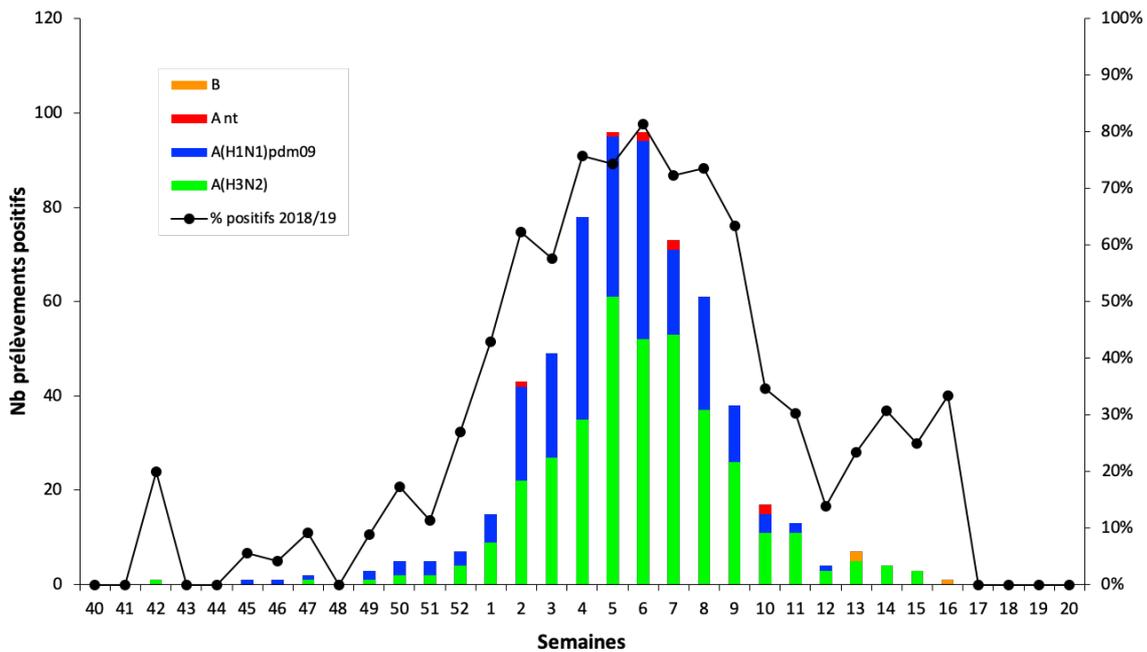


Figure 13 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Sud Réseau Sentinelles / saison 2018-2019

La surveillance des IRA, en médecine ambulatoire, chez les sujets âgés de plus de 65 ans est présentée Figure 14. Le nombre total d'IRA prélevé cette saison s'élève à 341. En début de surveillance les rhinovirus sont majoritaires, puis on détecte quelques VRS avant que la grippe ne prenne le relais en semaine S01/2019. Parmi les virus grippaux détectés, on observe 79% de virus A(H3N2).

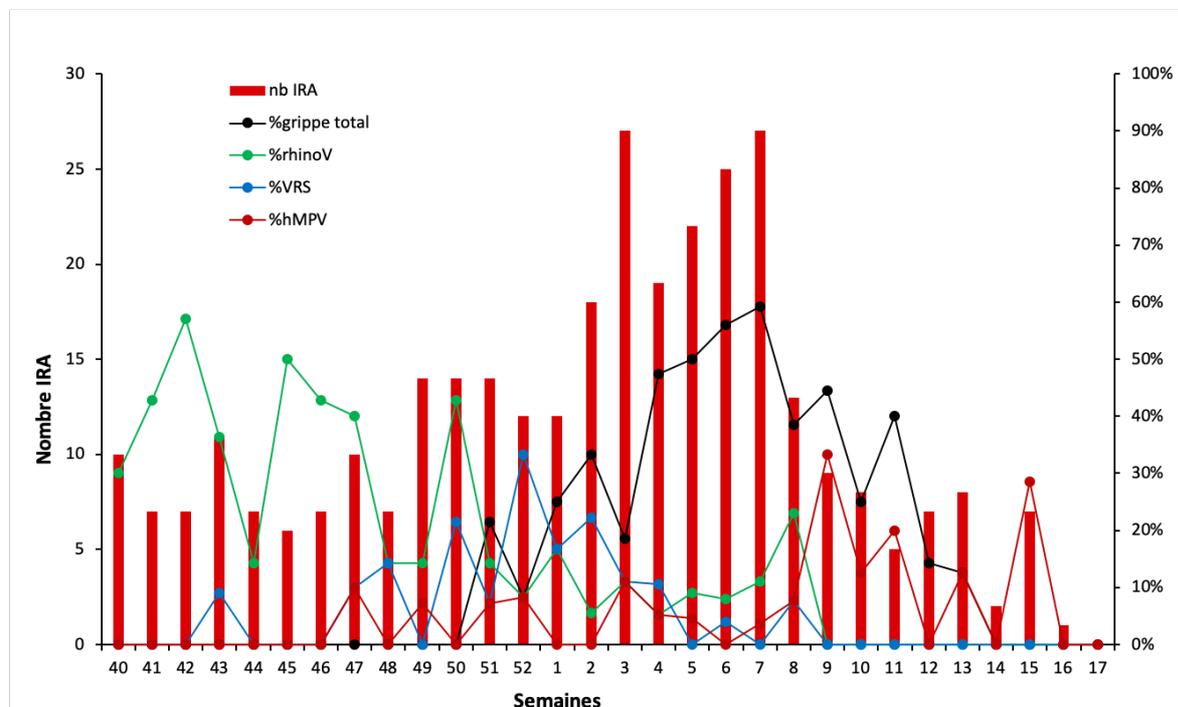


Figure 14 : surveillance des IRA, en médecine ambulatoire, chez les sujets âgés de plus de 65 ans en France. Détection de la grippe et des autres virus respiratoires

A l'hôpital, les mêmes tendances sont retrouvées avec des taux de détection plus faibles que ceux observés dans le cadre du réseau Sentinelles. Le pic épidémique a été observé, en

semaine S06/2019 avec 33,4% de détections de virus grippaux. Seule une partie des virus de type A sont sous-typés. En effet, la grande majorité des laboratoires hospitaliers utilise des kits commerciaux de détection capables d'identifier les virus de type A et B, mais le sous-typage des virus de type A n'est pas systématique. Ce manque d'information dans de nombreux laboratoires hospitaliers, ne permet pas d'évaluer en temps réel l'évolution épidémiologique en milieu hospitalier des virus de type A selon les sous-types (réseau RENAL - Figures 15 à 17 ; réseaux Sentinelles et RENAL - Figures 18 à 20).

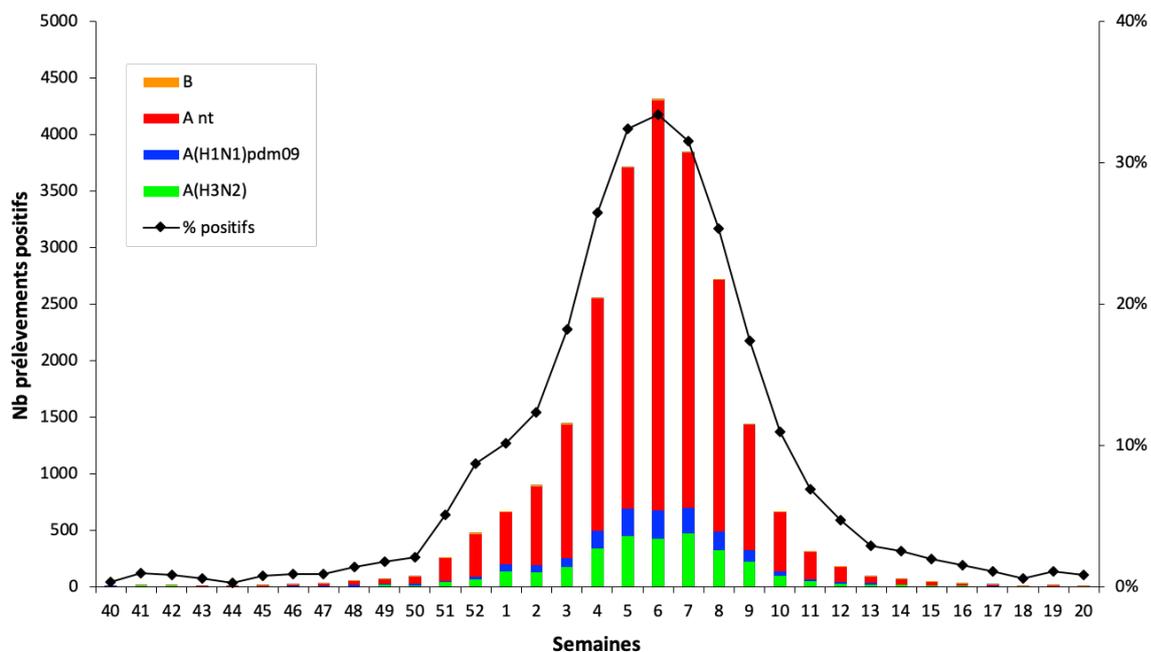


Figure 15 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France Réseau RENAL / saison 2018-2019

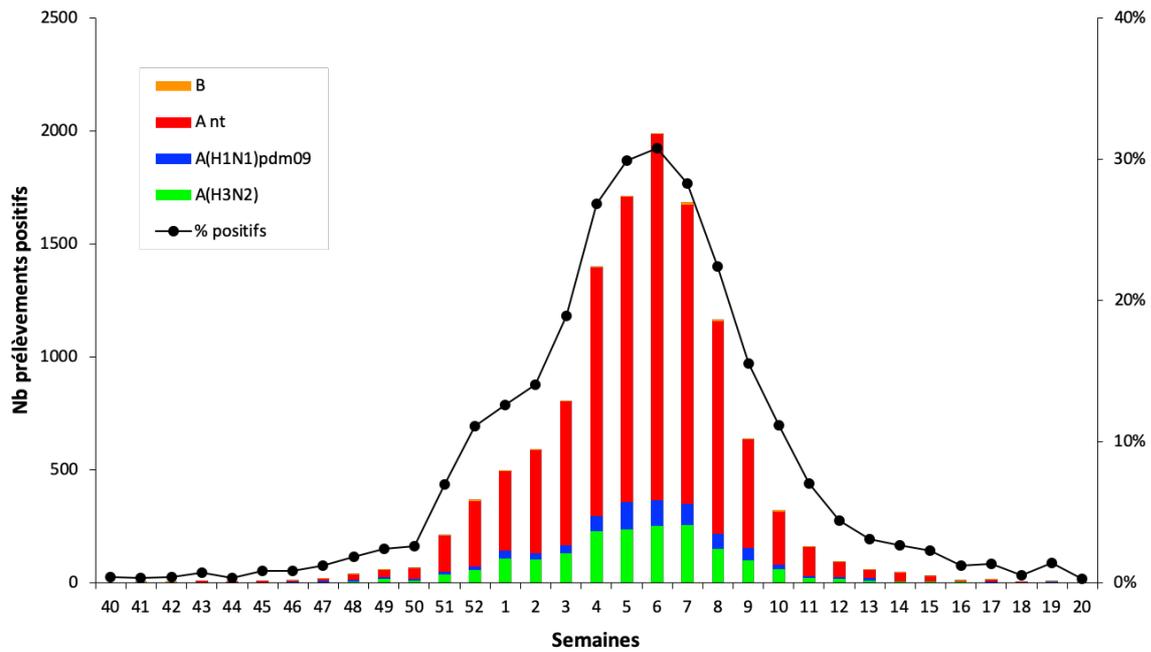


Figure 16 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Nord Réseau RENAL / saison 2018-2019

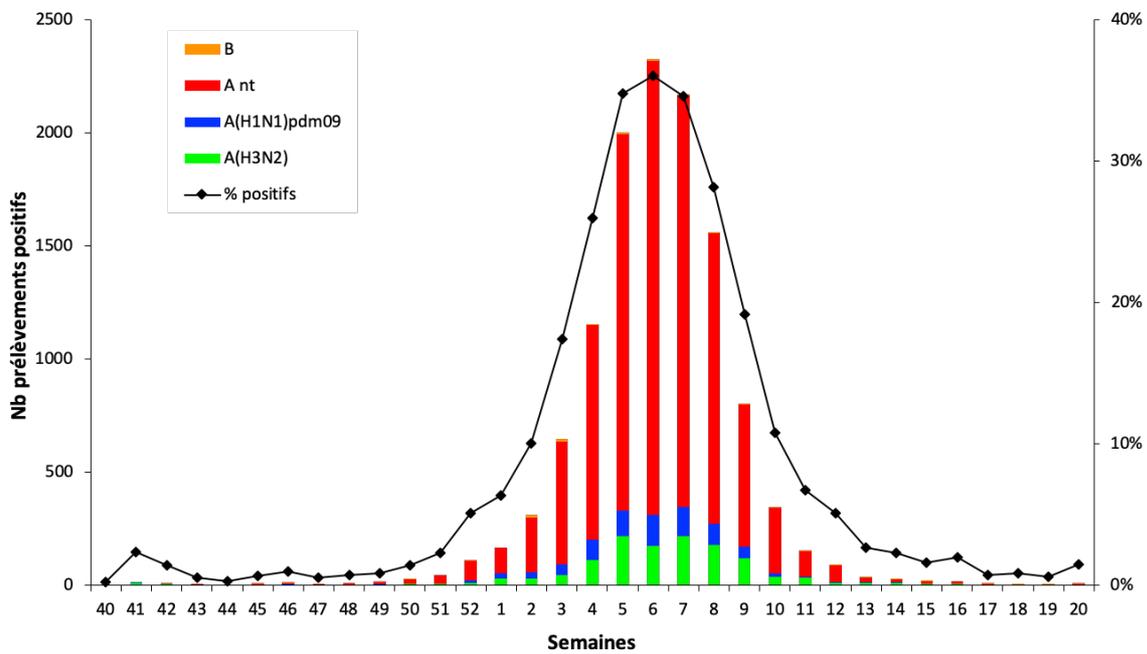


Figure 17 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Sud Réseau RENAL / saison 2018-2019

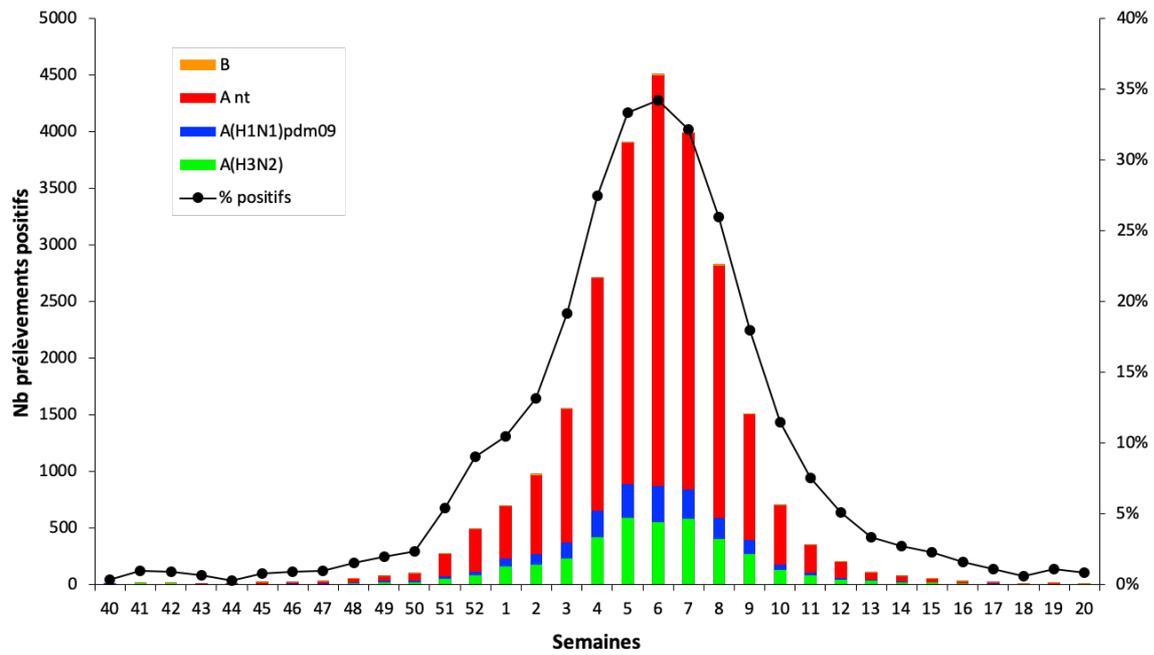


Figure 18 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2018-2019

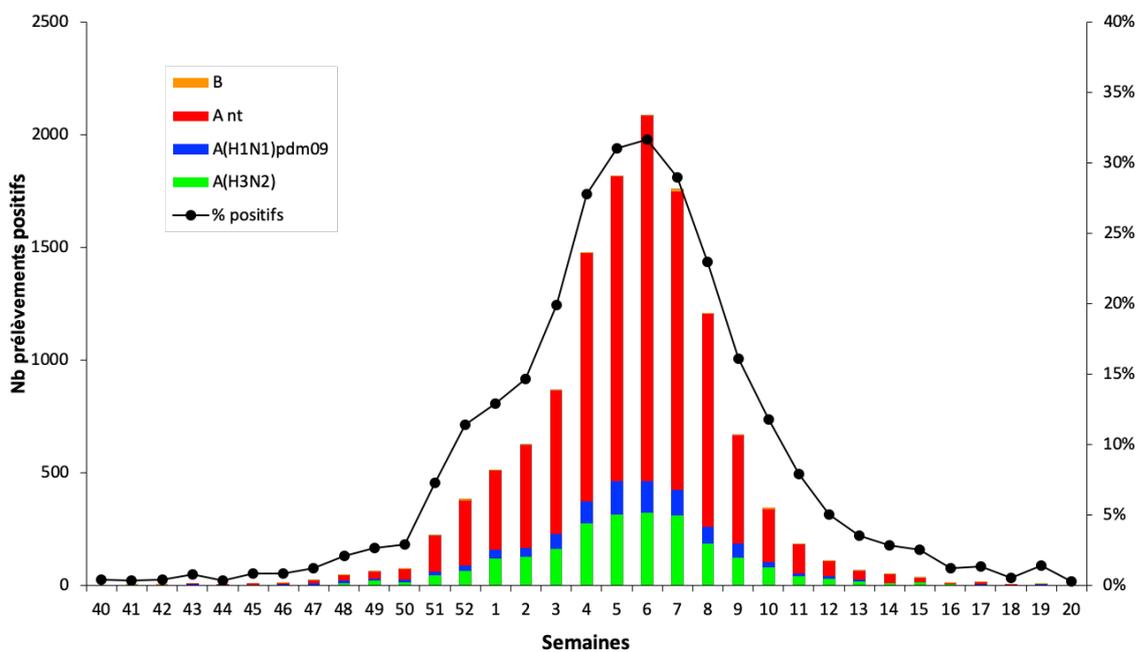


Figure 19 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Nord Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2018-2019

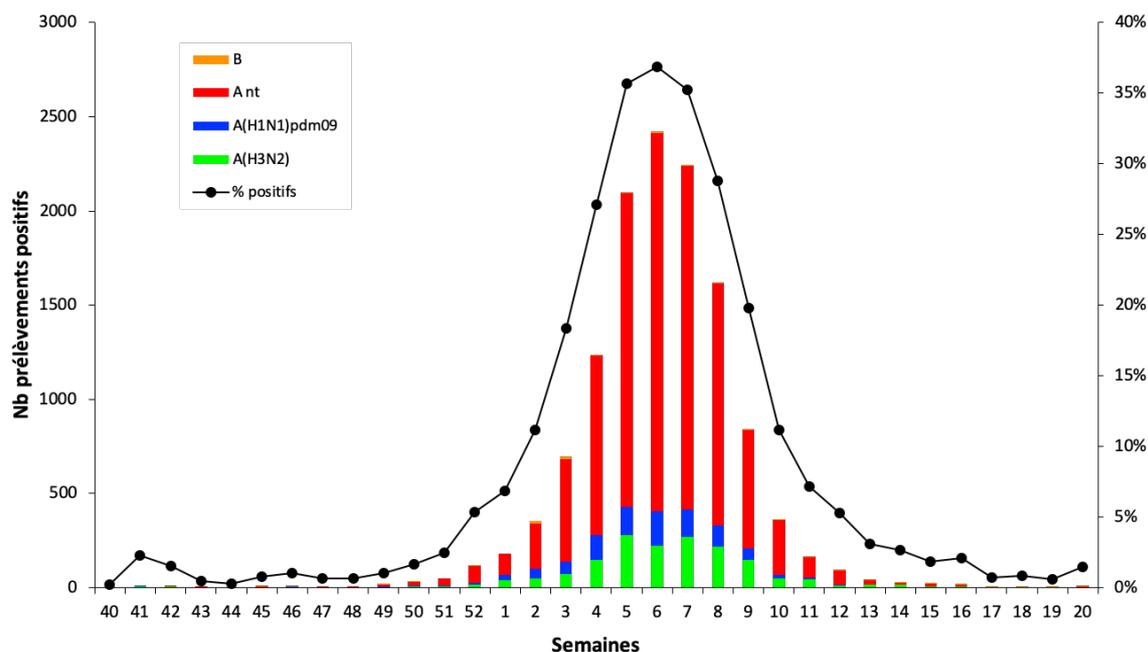


Figure 20 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Sud Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2018-2019

3.1.2.2 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 680 virus grippaux parmi les virus isolés dans le cadre de la surveillance du réseau Sentinelles en population générale ou dans les armées ou isolés 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, 663 virus grippaux de type A dont 299 virus A(H1N1)pdm09, 364 virus A(H3N2) et 17 virus de type B dont 8 de lignage B-Yamagata et 9 de lignage B-Victoria ont été caractérisés.

Virus A(H1N1)pdm09

Au total, 299 isolats A(H1N1)pdm09 ont été caractérisés par IHA par les laboratoires du CNR. La grande majorité (291/299, 97%) des virus analysés sont apparentés au plan antigénique à la souche vaccinale A/Michigan/45/2015.

Virus A(H3N2)

Cette saison, les virus A(H3N2) ont été majoritaires. La caractérisation antigénique des virus A(H3N2) n'est possible que pour les virus qui ont conservé la capacité d'agglutiner les globules rouges de cobaye. De surcroît la caractérisation antigénique 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. Au cours de la saison nous avons vu apparaître, à partir de fin novembre pour France nord, un groupe de virus A(H3N2) qui se cultivent facilement et pour lesquels un titre HA élevé est obtenu et qui se maintient après ajout d'oseltamivir. Ces virus appartiennent à un nouveau groupe génétique : 3C.3a.

Pour le CNR-IPP les virus (n=185) qui ont pu être caractérisés antigéniquement sont tous variants par rapport à la souche vaccinale A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016. Certains virus (n=75) sont proches de la souche vaccinale du vaccin de la saison 2015/2016 A/Switzerland/9715293/2013 alors que d'autres (n=57) sont antigéniquement proches de la souche vaccinale A/Hong Kong/4801/2014 du vaccin de la saison 2017/2018.

Parmi les 433 échantillons positifs pour un virus A(H3N2) inoculés, 348 (80%) ont donné lieu à une multiplication virale, révélée par test d'hémagglutination (chiffre plus élevé que la saison dernière (54% en 2017/2018)). La réalisation de l'IHA en présence d'oseltamivir a été possible pour 185 (53%) virus.

Pour le CNR-HCL, parmi les 352 échantillons A(H3N2) inoculés sur cellules MDCK, 269 (76 %) isolats ont été détectés par ELISA dans les surnageants de culture.

Pour la surveillance 2018/19, 179 isolats (communautaires, hospitaliers ou en provenance de La Réunion) ont pu être caractérisés antigéniquement en l'absence d'oseltamivir. Comme pour la surveillance de l'hiver dernier un grand nombre de virus (n=73) montraient un profil d'inhibition faiblement réactif avec des titres faibles pour l'ensemble du panel de sérums testé. Les autres virus (n=80) étaient antigéniquement analogues soit à la souche A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 soit à la souche A/Switzerland/8060/2017. Enfin, nous avons testé 57 virus vis-à-vis du nouveau prototype vaccinal (A/Kansas/14/2017 - Hiver 2019/2020) et 46% (26) des isolats étaient antigéniquement apparentés à cette nouvelle souche.

Virus B

Parmi les virus de type B, 8 virus B-Yamagata ont pu être caractérisés par IHA et étaient analogue à la souche vaccinale B/Phuket/3073/2013. Parmi les virus de type B de lignage B-Victoria, seulement 9 virus ont pu être caractérisés par IHA. La majorité (7/9) était variante par rapport à la souche vaccinale B/Colorado/06/2017, 4 virus étaient analogues à la souche B/Norway/2409/2017 et 3 à la souche B/Brisbane/60/2008, mais on observe un profil d'inhibition faiblement réactif avec des titres faibles pour l'ensemble du panel de sérums testé.

3.1.2.3 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 2018-2019. 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.

Virus A(H1N1)pdm09

Au total 263 virus A(H1N1)pdm09 ont été séquencés, ils appartiennent tous au clade 6B.1 caractérisé par les mutations S84N, S162N et I216T sur l'hémagglutinine (HA). Parmi ce groupe les virus porteurs de la mutation S183P ont émergé cette saison et un nouveau sous-clade 6B.1A, défini également par les mutations S74R, S164T et I295V, est apparu. La souche A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09 retenue pour la composition vaccinale de la saison 2019/2020 appartient à ce nouveau sous-clade. Au sein de ce sous-clade différents

sous-groupes ont émergé caractérisés par des mutations spécifiques. Cette saison en France les virus appartenait majoritairement aux sous-groupes 6B.1A5 et 6B.1A7. Les analyses phylogénétiques des virus A(H1N1)pdm09 sont représentées Figures 21 à 22.

Vaccine viruses
Reference viruses

Collection Date
 Sep - Oct - Nov 2018
 Dec 2018
 Jan 2019
 Feb 2019
 Mar - Apr 2019

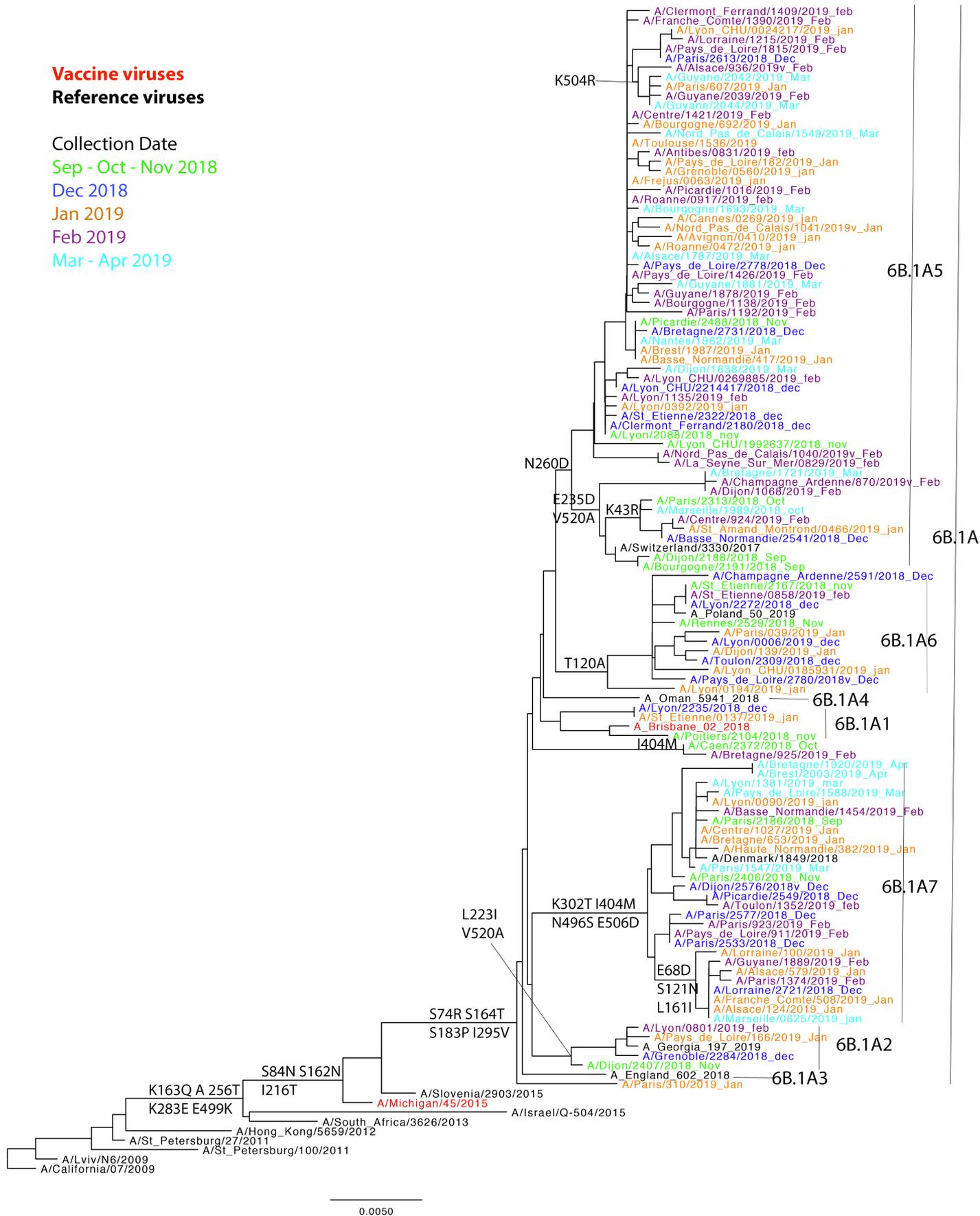


Figure 21 : Analyse phylogénétique du gène HA des virus A(H1N1)pdm09 – saison 2018-2019

Vaccine viruses
Reference viruses

Collection Date
 Sep - Oct - Nov 2018
 Dec 2018
 Jan 2019
 Feb 2019
 Mar - Apr 2019

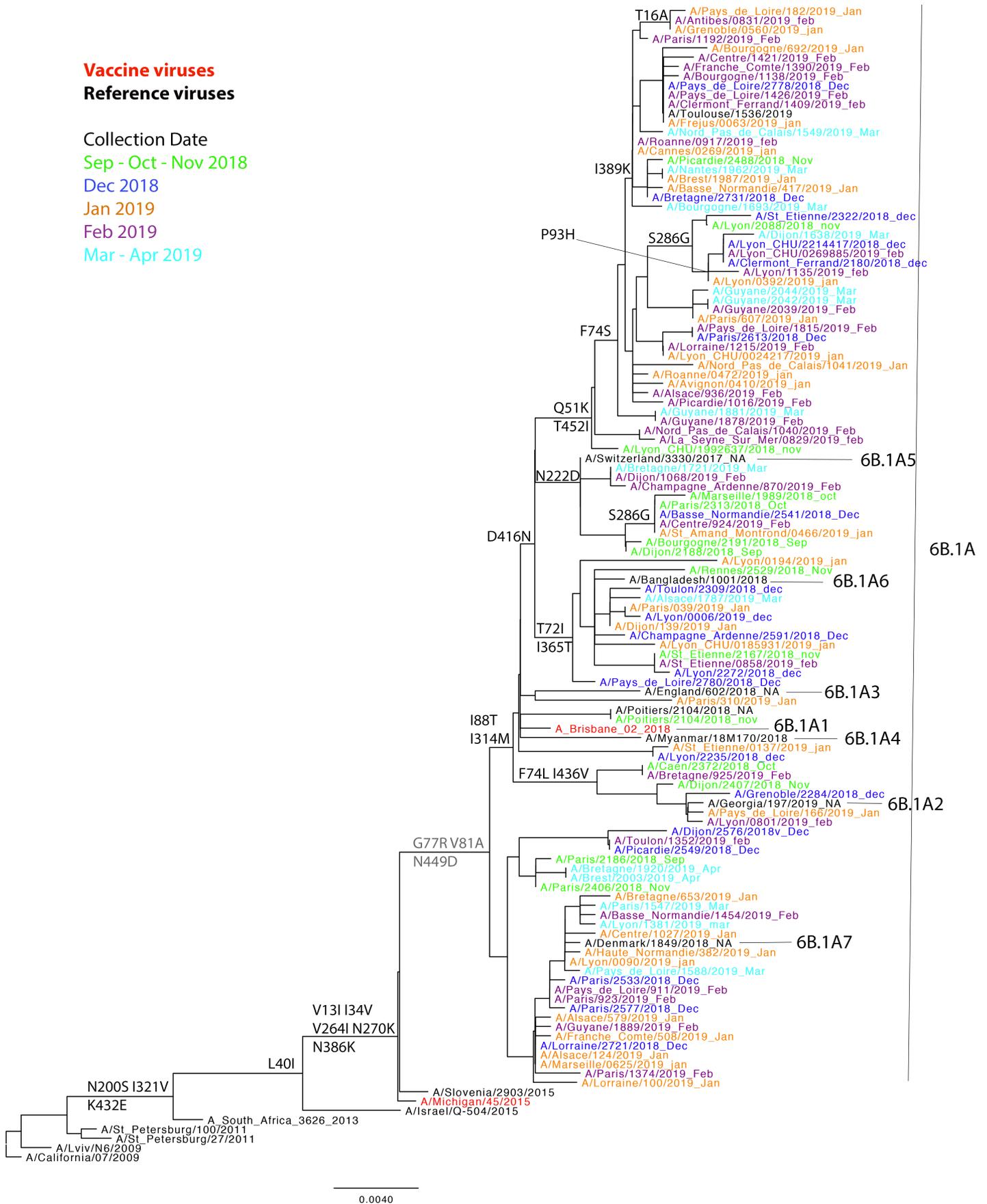


Figure 22 : Analyse phylogénétique du gène NA des virus A(H1N1)pdm09 – saison 2018-2019

Virus A(H3N2)

Un total de 501 virus A(H3N2) a été séquencé. La majorité des virus A(H3N2) analysés appartiennent au clade 3C.2a, au sous-clade 3C.2a1 et principalement au sous-groupe 3C.2a1b. À partir de novembre 2018, une proportion non négligeable de virus appartenant au clade 3C.3a est apparue, ce groupe génétique augmentant en proportion au cours de la saison, particulièrement pour le nord de la France. La représentation des proportions des différents groupes génétiques au cours du temps est présentée Figures 23 à 24 pour le nord de la France. Les virus appartenant aux sous-clades 3C.2a3 et 3C.2a2 ont peu circulé en France cette saison. Les analyses phylogénétiques des virus A(H3N2) sont représentées Figures 25 à 26.

Le clade 3C.2a est défini par les mutations suivantes : L3I, N128T, N144S, N145S, F159Y, K160T, P198S, N225D et Q311H. Le sous-clade 3C.2a1 par : N121K, N171K sur HA1 et I77V, G155E et G160E sur HA2. Et enfin le sous-clade 3C.2a1b par : K92R et H311Q sur HA1.

Le clade 3C.3a qui a émergé cette saison est caractérisé par les mutations suivantes sur la HA : S91N, T128A, A138S, R142G, F193S, K326R et D489N et est également caractérisé par des mutations spécifiques sur d'autres segments, comme V27I et Y52C sur la M2 et K626R sur PA.

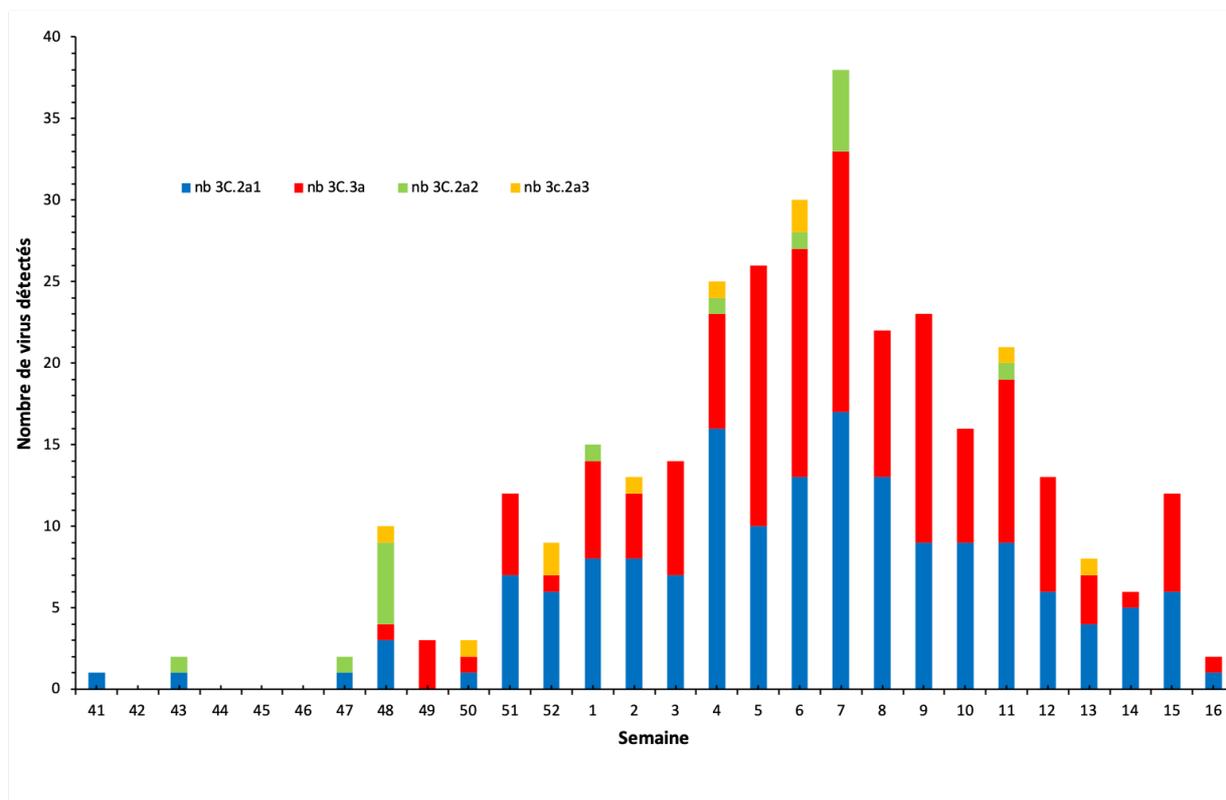


Figure 23 : virus A(H3N2), évolution des groupes génétiques en fonction du temps pour France nord (nombre)

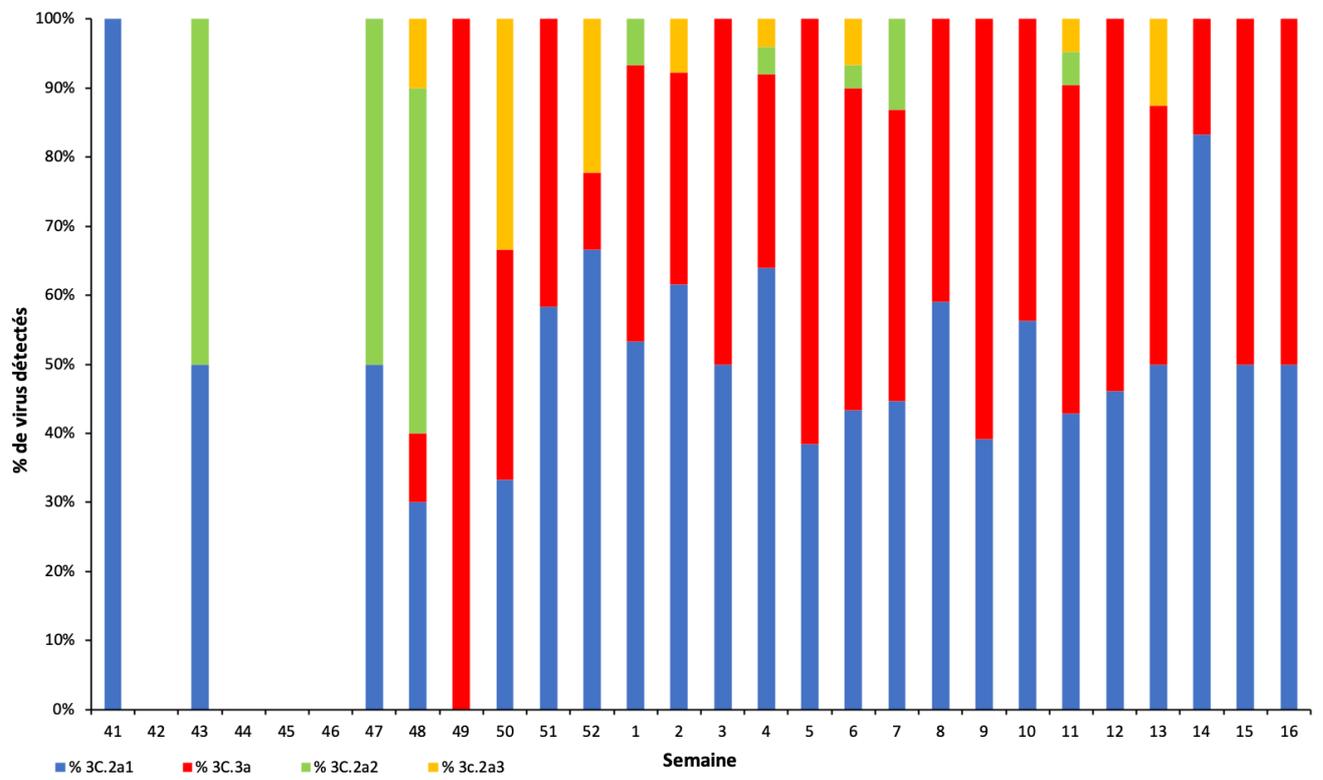


Figure 24 : virus A(H3N2), évolution des groupes génétiques en fonction du temps pour France nord (%)

Virus de type B

Les virus de type B ont très peu circulé cette saison.

Seulement 9 virus de lignage B-Yamagata ont été analysés, parmi lesquels 3 provenaient d'une épidémie en EHPAD à Libourne. Ils appartiennent tous au clade 3. Les analyses phylogénétiques des virus B Yamagata sont représentées Figures 27 à 28.

Les 11 virus de type B de lignage Victoria analysés appartiennent au groupe génétique 1A. La majorité de ces virus 82% (N=9) présentent la triple délétion Δ (126-164) sur la HA. Les analyses phylogénétiques des virus B Victoria sont représentées Figures 29 à 30.

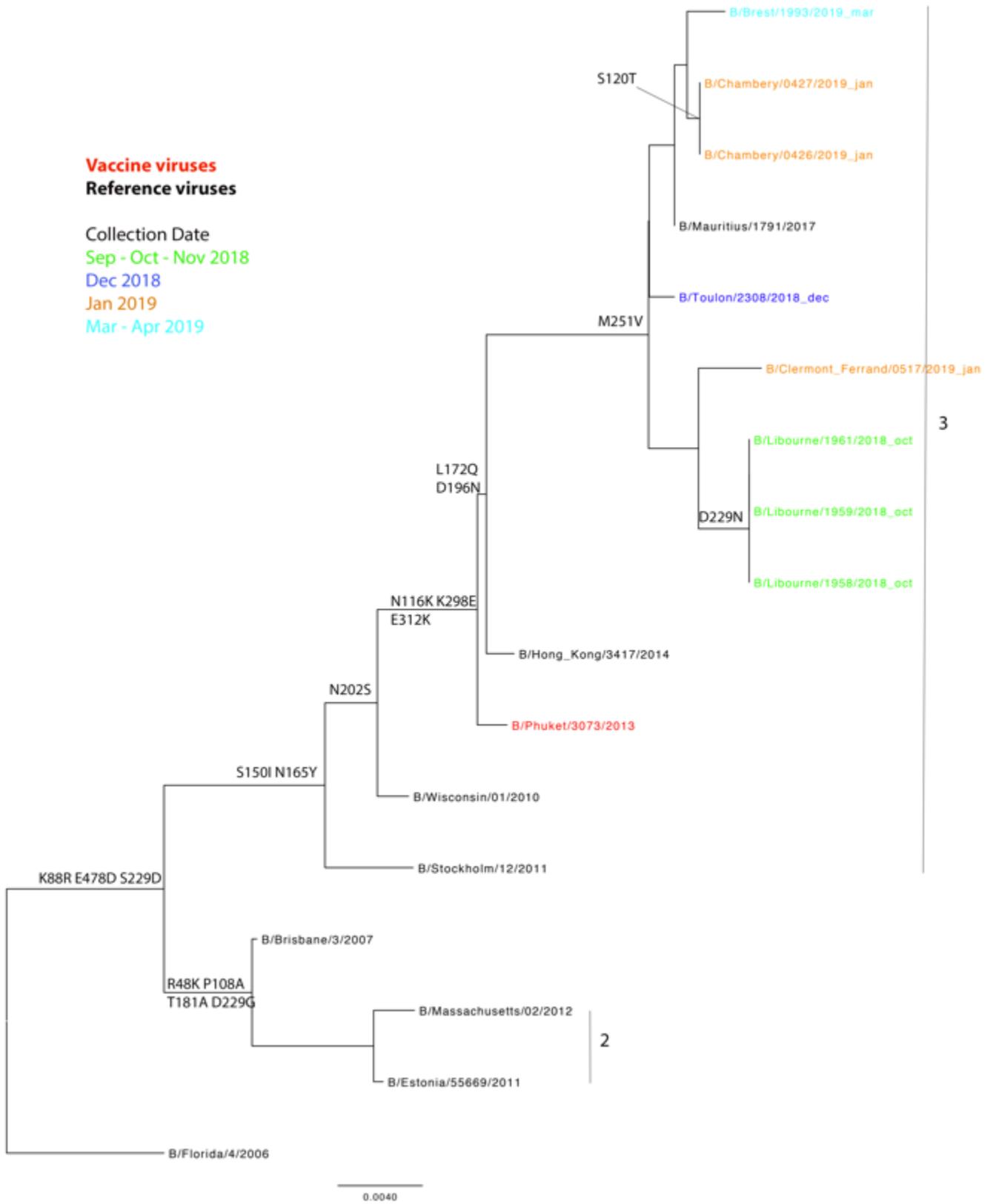


Figure 27 : Analyse phylogénétique du gène HA des virus B-Yamagata – saison 2018-2019

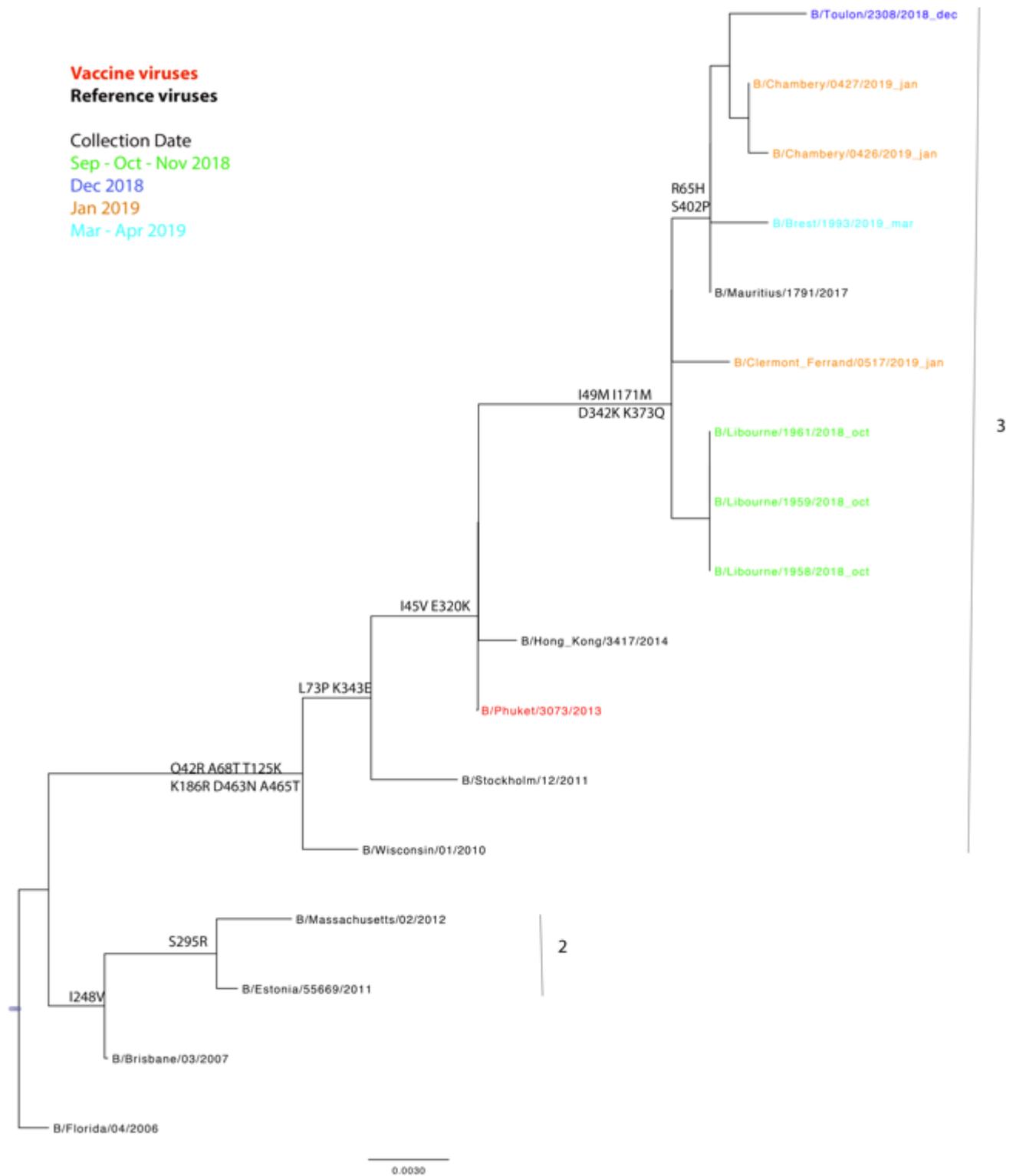


Figure 28 : Analyse phylogénétique du gène NA des virus B-Yamagata – saison 2018-2019

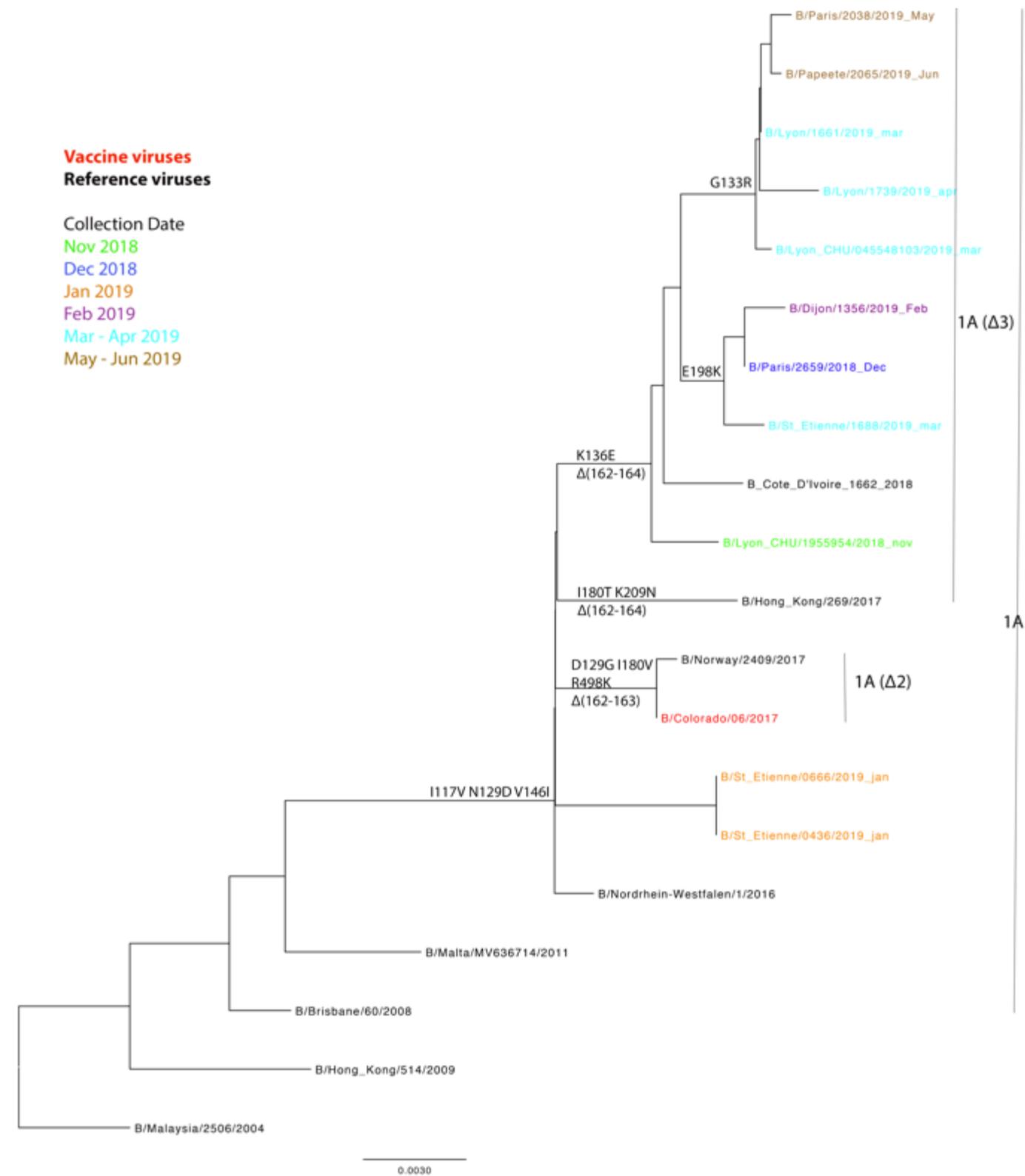


Figure 29 : Analyse phylogénétique du gène HA des virus B Victoria – saison 2018-2019

Vaccine viruses
Reference viruses

Collection Date

Nov 2018

Dec 2018

Jan 2019

Feb 2019

Mar - Apr 2019

May - Jun 2019

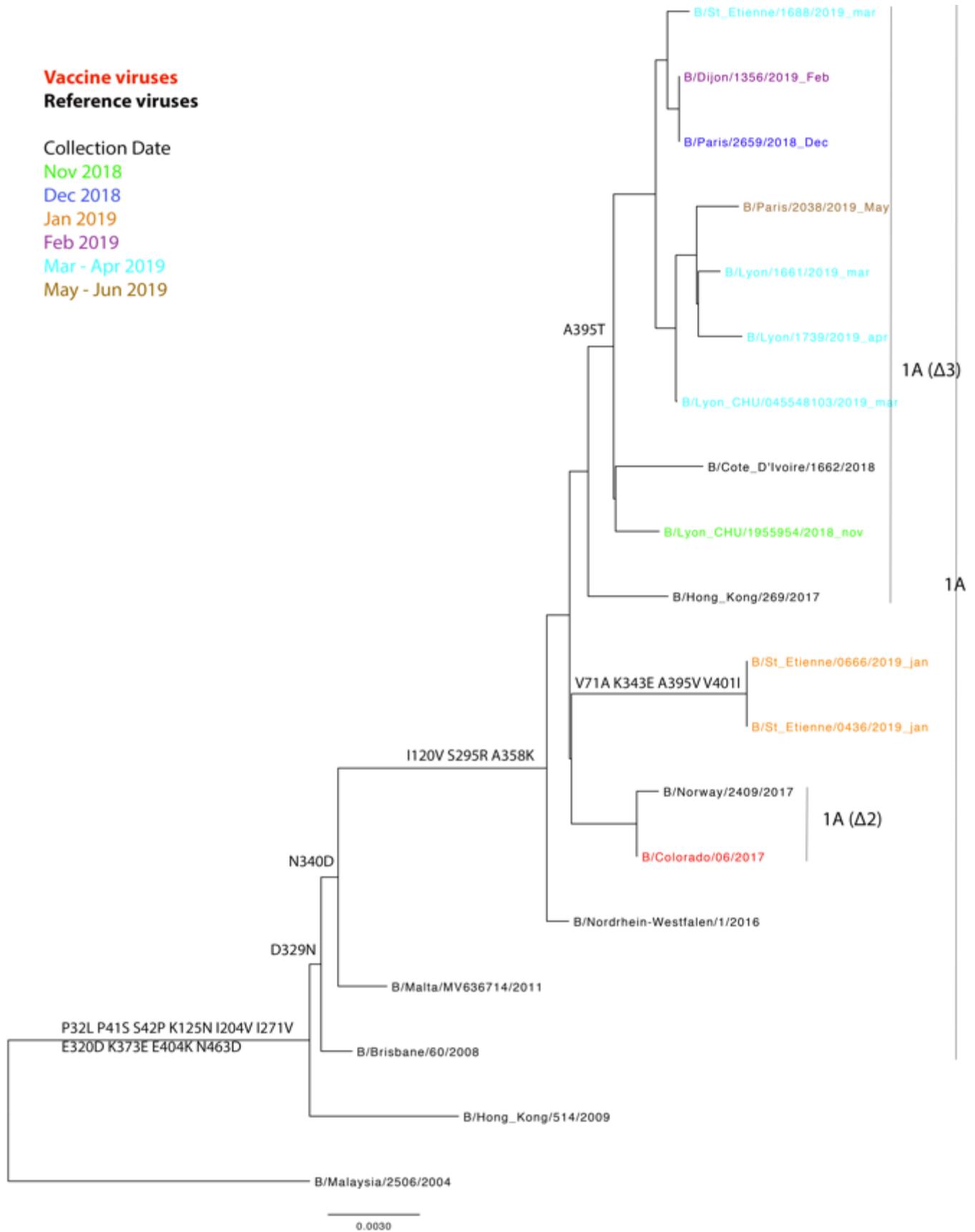


Figure 30 : Analyse phylogénétique du gène NA des virus B Victoria – saison 2018-2019

Ces données ont permis de contribuer à l'analyse de l'efficacité vaccinale par clade et sous-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 (§3.1.3).

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, 6 virus porteurs d'une mutation en position 222 sur l'hémagglutinine ont été détectés chez 6 patients différents, avec une fréquence variable allant de 2% à 98% pour les mutations D222G et D222N (un seul de ces virus n'était pas associé à une forme sévère de grippe).

Parmi les cas sévères de grippe détectés pour le CNR-IPP, 41 gripes A(H1N1)pdm09 et 74 gripes A(H3N2) ont été séquencées. Pour les virus A(H3N2), aucune mutation qui pourrait être liée aux formes graves n'a été détectée.

3.1.2.4 Distribution par âge des cas de grippe virologiquement confirmés (Réseau Sentinelles)

Comme le montre le tableau 11, on remarque que la majorité des prélèvements ont été réalisés dans la tranche d'âge 15 à 64 ans (48,8%) alors que les classes d'âge allant de 5 à 14 ans et de plus de 65 ans sont peu représentées (15% et 16,4%). La classe d'âge 0 à 4 ans continue à être bien représentée cette année grâce à l'activité des pédiatres (19,8% contre 5,5% en 2014/2015). Ce sont les sujets âgés de 5 à 14 ans qui ont été les plus touchés (62,4% de positivité pour la grippe) ainsi que les sujets de 15 à 64 ans (52,1% de positivité) (Tableau 11).

France métropolitaine

Age	Nb Privt	Nb Grippe +	% de + dans la tranche âge	% du groupe d'âge/total	% + /total +
0-4	552	205	37,1	19,8	15,4
5-14	420	262	62,4	15,0	19,7
15-64	1364	710	52,1	48,8	53,4
≥65	457	152	33,3	16,4	11,4
Total	2793	1329	47,6	100	100

Tableau 11 : Distribution par âge des patients– Réseau Sentinelles
Prélèvements réalisés dans le cadre du Réseau Sentinelles et trouvés positifs pour la grippe en France / Saison 2018-2019

D'après les données de la surveillance en médecine de ville les virus de type A ont été largement majoritaires et en particulier les virus A(H3N2). Les virus de grippe A(H1N1)pdm09 touchant particulièrement la classe d'âge des 15-64 ans (39,2%) et des moins de 5 ans (36,1%) alors que les virus de grippe A(H3N2), ont touché préférentiellement la classe d'âge des 5-14 ans (80,9%) et des plus de 65 ans (78,3%). Seuls 3 virus de type B ont été détectés, tous de lignage B-Victoria (Tableau 12).

Age	Nb Grippe +	Nb grippe A non sous-typé	(%)	Nb grippe A H1pdm09	(%)	Nb grippe A/H3	(%)	Nb grippe B	(%)	total
0-4	205	0	0	74	36,1	131	63,9	0	0	100
5-14	262	2	0,8	48	18,3	212	80,9	0	0	100
15-64	710	11	1,5	278	39,2	418	58,9	3	0,4	100
≥65	152	3	2,0	30	19,7	119	78,3	0	0	100
Total	1329	16	1,2	430	32,4	880	66,2	3	0,2	100

Tableau 12 : 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 2018-2019

3.1.2.5 Cas de grippe confirmés virologiquement chez des personnes vaccinées

Lors de la saison 2018-2019, parmi les prélèvements de patients pour lesquels le statut vaccinal était connu (2760 sur 2793, soit 98,8 % des patients Sentinelles prélevés), 15,3% (423 sur 2760) provenaient de patients vaccinés (nettement supérieur aux 11,7% de patients vaccinés en 2017-2018, et aux 7,5% de patients vaccinés en 2016-2017) (Tableau 13). Le pourcentage de détection de virus grippaux était de 38,5% parmi les vaccinés et de 49,2 % chez les non vaccinés. Bien que la proportion de patients vaccinés soit faible, la détection des virus grippaux est moins importante chez les patients vaccinés que chez les non vaccinés (Tableau 13).

France métropolitaine

Statut	Grippe +		Grippe -		Effectif	
	Nbre	(%)	Nbre	(%)	Nbre	(%)
Vaccinés	163	12,4	260	17,9	423	15,3
Non Vaccinés	1150	87,6	1187	82,1	2337	84,7
Total	1313		1447		2760	

Tableau 13 : Statut vaccinal - Distribution des virus grippaux détectés au CNR
Réseau Sentinelles / saison 2018-2019

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 (4,6 à 9,3%) mais supérieur aux années précédentes. 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 56,1%, valeur en hausse par rapport aux dernières saisons (51% en 2017/2018, 44,9% en 2016/2017). (Tableau 14).

Age (ans)	0-4	(%)	5-14	(%)	15-64	(%)	≥65	(%)
Vaccinés	25	4,6	20	4,8	125	9,3	253	56,1
Non Vaccinés	522	95,4	395	95,2	1222	90,7	198	43,9
Total	547		415		1347		451	

Tableau 14 : Statut vaccinal - Distribution par tranche d'âge
Nombre de prélèvements de patients testés au CNR - Réseau Sentinelles / saison 2018-2019

Remarque : Pour les comparaisons avec les saisons précédentes il convient de prendre en compte le changement de définition de cas suite au changement de réseau de surveillance communautaire depuis la saison 2014-15 ainsi que l'absence de pédiatres au cours de la

saison 2014-15. Toute comparaison avec les saisons antérieures à 2014-15 ou 2015-16 est à prendre avec beaucoup de prudence.

3.1.2.6 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 rhinovirus/enterovirus (HRV) et des métapneumovirus (HMPV) qui sont également systématiquement recherchés dans les prélèvements provenant de la surveillance en médecine de ville du réseau Sentinelles. Depuis deux ans maintenant une surveillance des infections respiratoires aiguës chez le sujet de plus de 65 ans a été mise en place par le réseau Sentinelles. Une analyse de ces données est présentée à la fin de ce chapitre.

➤ 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 deux semaines pour la région sud (Figures 31 à 33). Sa circulation au cours de la saison a été un peu plus intense et un peu retardé par rapport à 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).

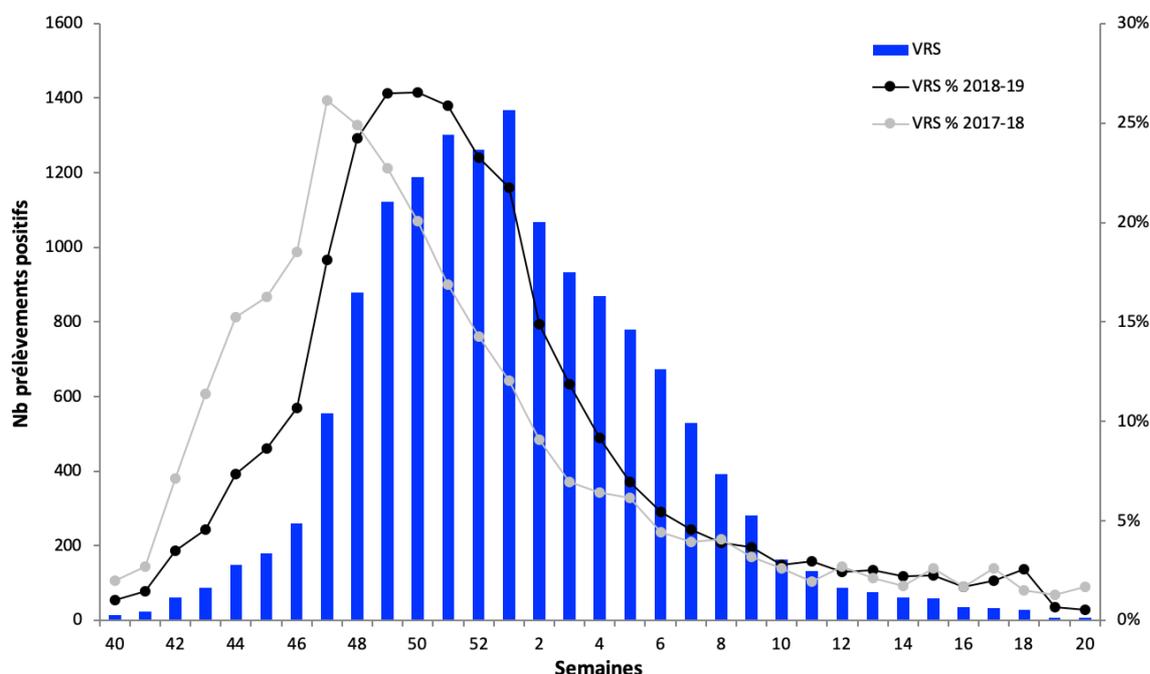


Figure 31 : Détection du VRS en France Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2018-2019

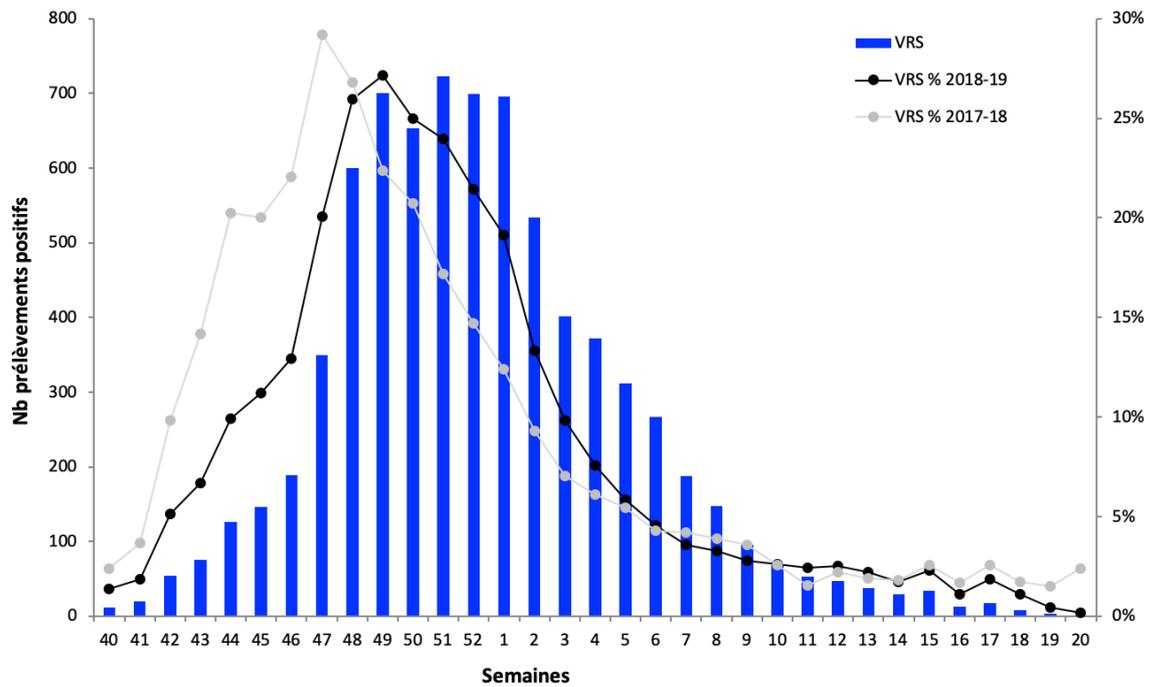


Figure 32 : Détection du VRS en France-Nord Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2018-2019

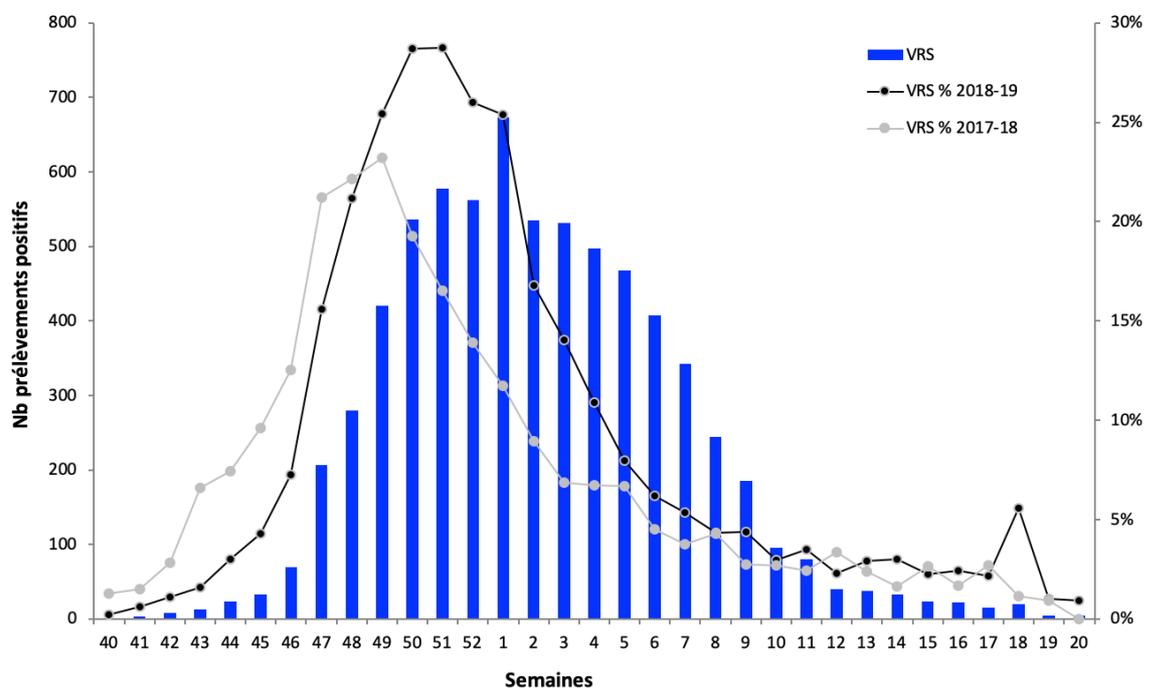


Figure 33 : Détection du VRS en France-Sud Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2018-2019

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 une proportion légèrement plus importante de VRS B que de VRS A cette saison (Figure 34). En revanche dans la population générale la proportion de VRS A est à l'inverse légèrement plus importante (Figure 35).

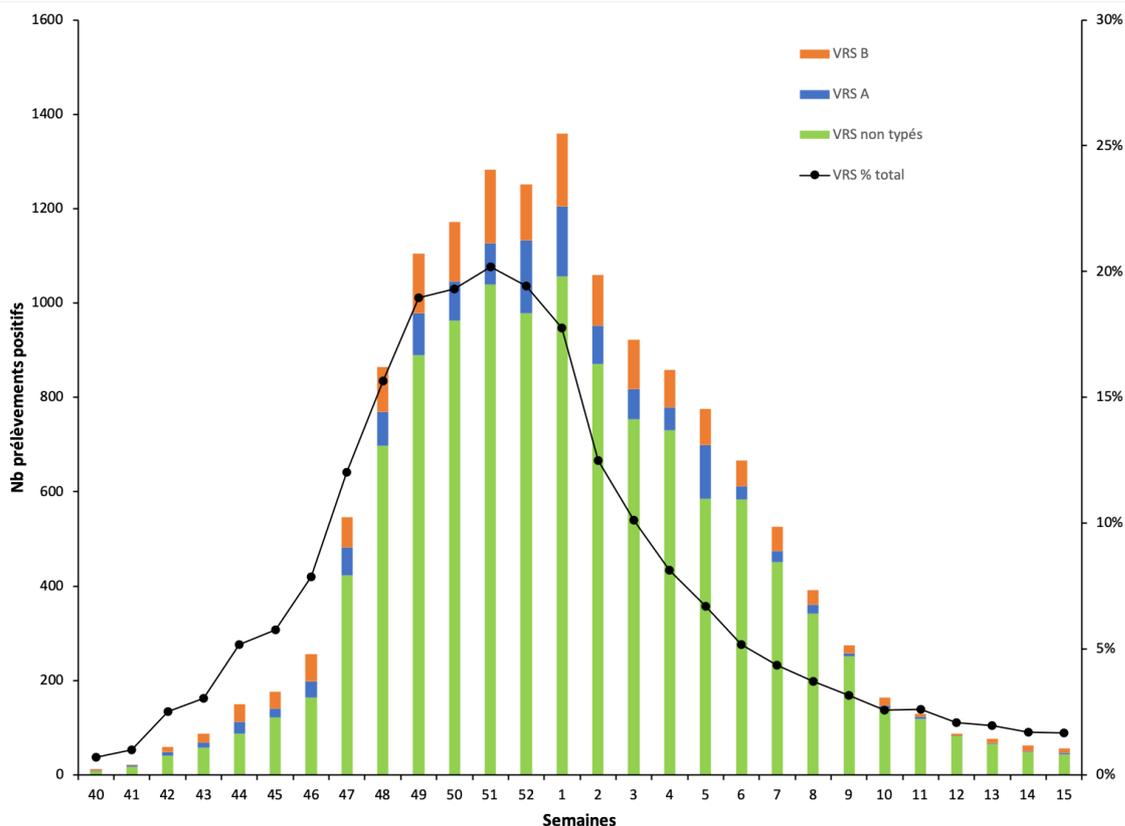


Figure 34 : Détection du VRS à l'hôpital en France. Répartition VRS A, VRS B et VRS non typés. Réseaux RENAL / saison 2018-2019

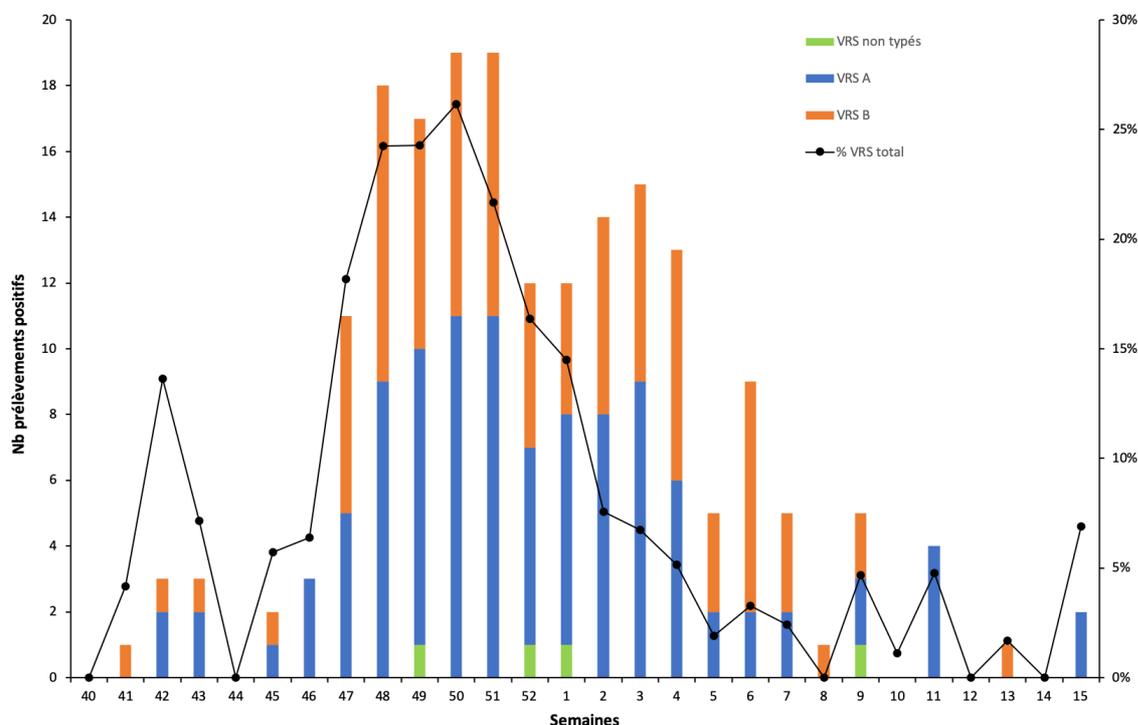


Figure 35 : Détection du VRS en médecine ambulatoire en France. Répartition VRS A, VRS B et VRS non typés. Réseaux Sentinelles / saison 2018-2019

En population générale pour la France métropolitaine, sur 2461 échantillons prélevés lors d'un syndrome grippal (SG), 173 VRS ont été détectés principalement parmi la classe d'âge 0-4 ans (62,7%). Nous n'avons pas accès à la classe d'âge pour les données RENAL. (Tableau 15).

Age	VRS A	VRS B	VRS NT	Nb VRS +	%
0-4	66	39	5	110	63,6
5-14	5	7	0	12	6,9
15-64	15	23	3	41	23,7
≥65	6	4	0	10	5,8
Total	92	73	8	173	100

Tableau 15 : Répartition des VRS en fonction de l'âge. France métropolitaine Réseau Sentinelles - SG / saison 2018-2019

➤ **Rhinovirus/enterovirus humains**

Les rhinovirus/enterovirus ont été détectés de façon quasiment continue tout au long de la saison 2018-2019. Leur circulation a commencé à diminuer légèrement lors de l'épidémie de VRS (S48/2018-S04/2019) et ils se sont maintenus à un taux faible tout au long de l'épidémie de grippe (S01/2019-S10/2019). Leur circulation a de nouveau augmenté à partir de la semaine S11/2019 pour se maintenir à un niveau élevé (> 15% de détections positives) les semaines suivantes (Figures 36 à 38).

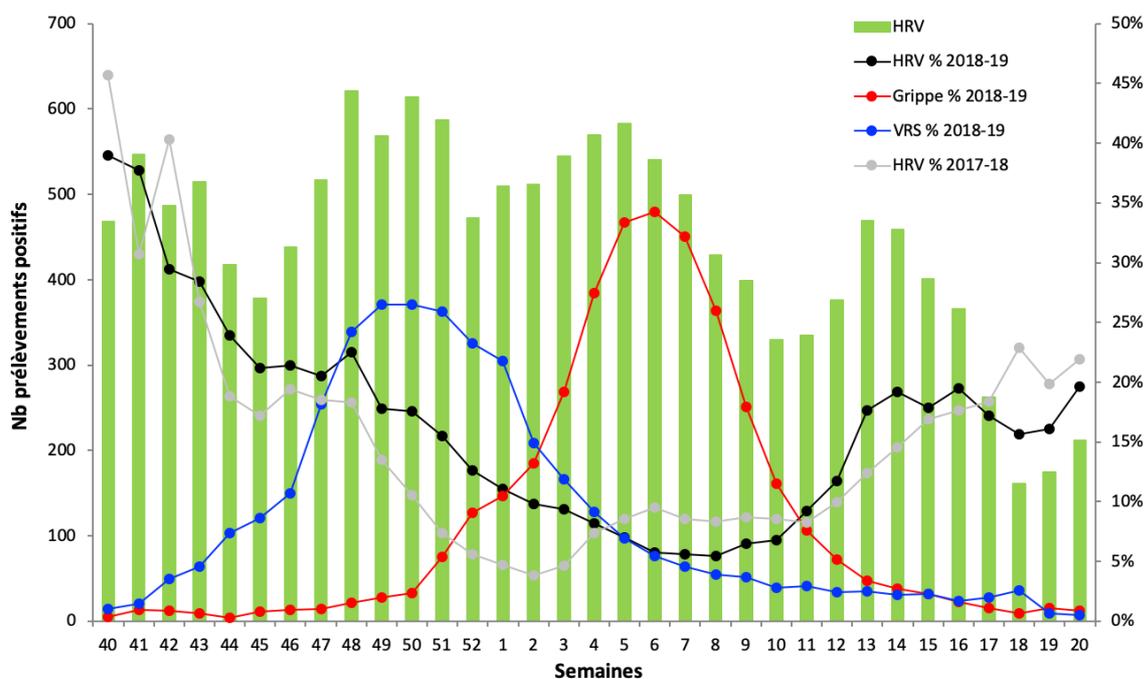


Figure 36 : Détection des rhinovirus/enterovirus humains en France Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2018-2019

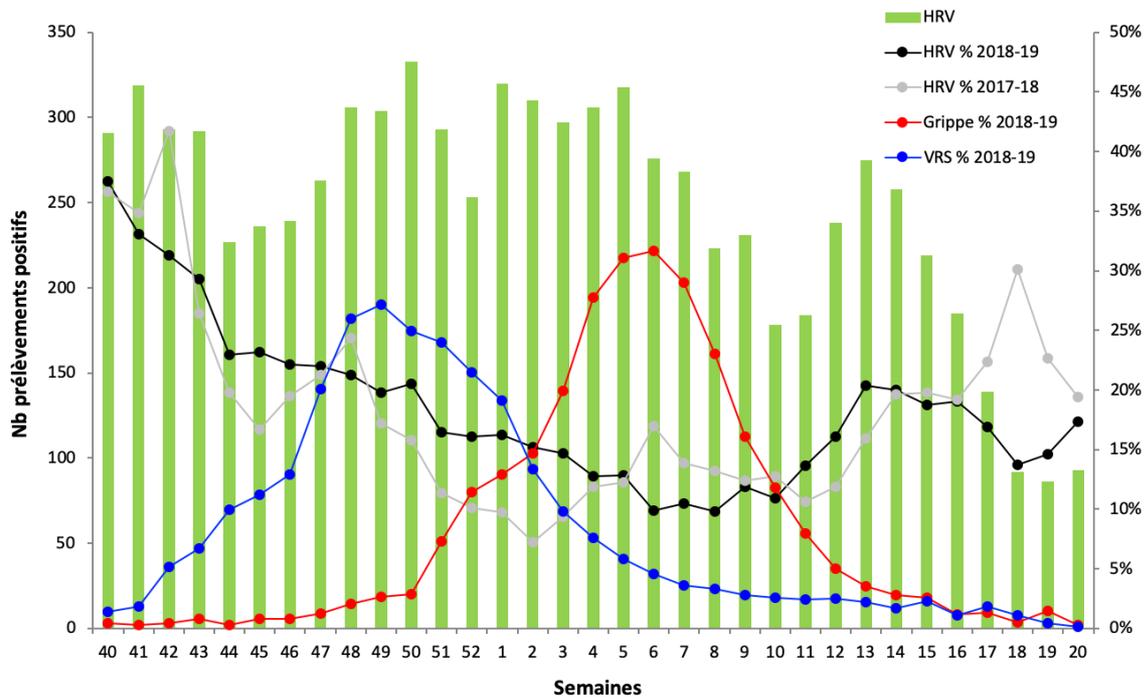


Figure 37 : Détection des rhinovirus/enterovirus humains en France-Nord Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2018-2019

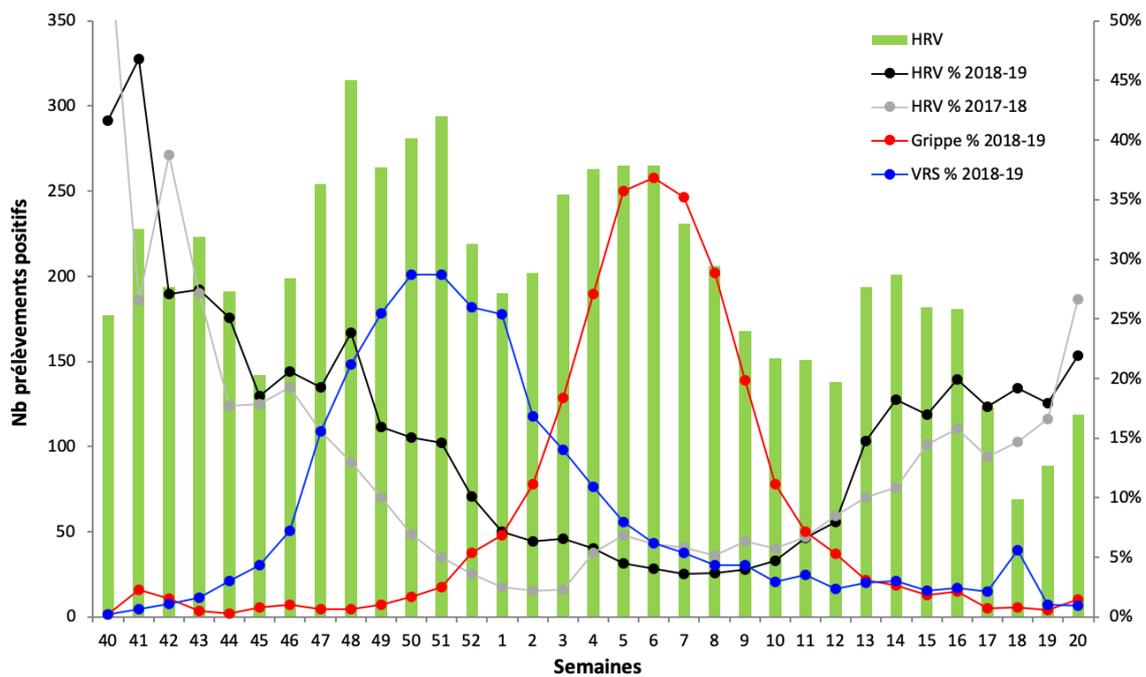


Figure 38 : Détection des rhinovirus/enterovirus humains en France-Sud Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2018-2019

➤ **Métapneumovirus humains**

Comme la saison dernière, la circulation des métapneumovirus humains est restée stable tout au long de la saison 2018-2019 avec des pourcentages de détections positives faibles (< ou égale 5%), excepté en fin de saison de surveillance (Figure 39).

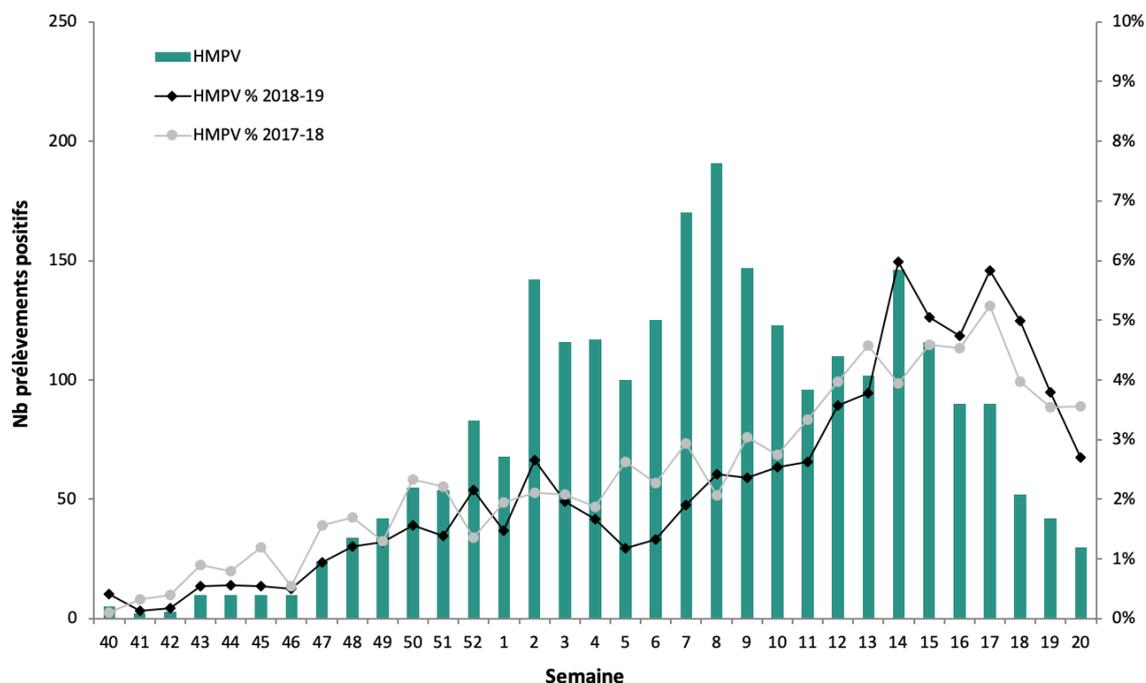


Figure 39 : Détection des métapneumovirus humains en France Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2018-2019

Dans la population générale en France métropolitaine, les métapneumovirus ont représenté 3,8% (110 sur 2915 échantillons) des détections positives. Parmi les cas de SG en médecine de ville (Réseau Sentinelles) (n=2554), 91 (3,6%) métapneumovirus ont été détectés, principalement retrouvés dans la classe d'âge 0-4 ans et 15-64 ans (Tableau 16).

Age	SG	
	hMPV	%
0-4	40	43,9
5-14	20	21,9
15-64	29	31,9
≥65	2	2,2
Total	91	100

Tableau 16 : Répartition des métapneumovirus en fonction de l'âge. France entière Réseau Sentinelles / saison 2018-2019

➤ Adénovirus

Les adénovirus ont été détectés/isolés de façon continue tout au long de la saison 2018-2019 avec une circulation globalement faible et un pourcentage de prélèvements positifs toujours inférieur à 5% (Figure 40).

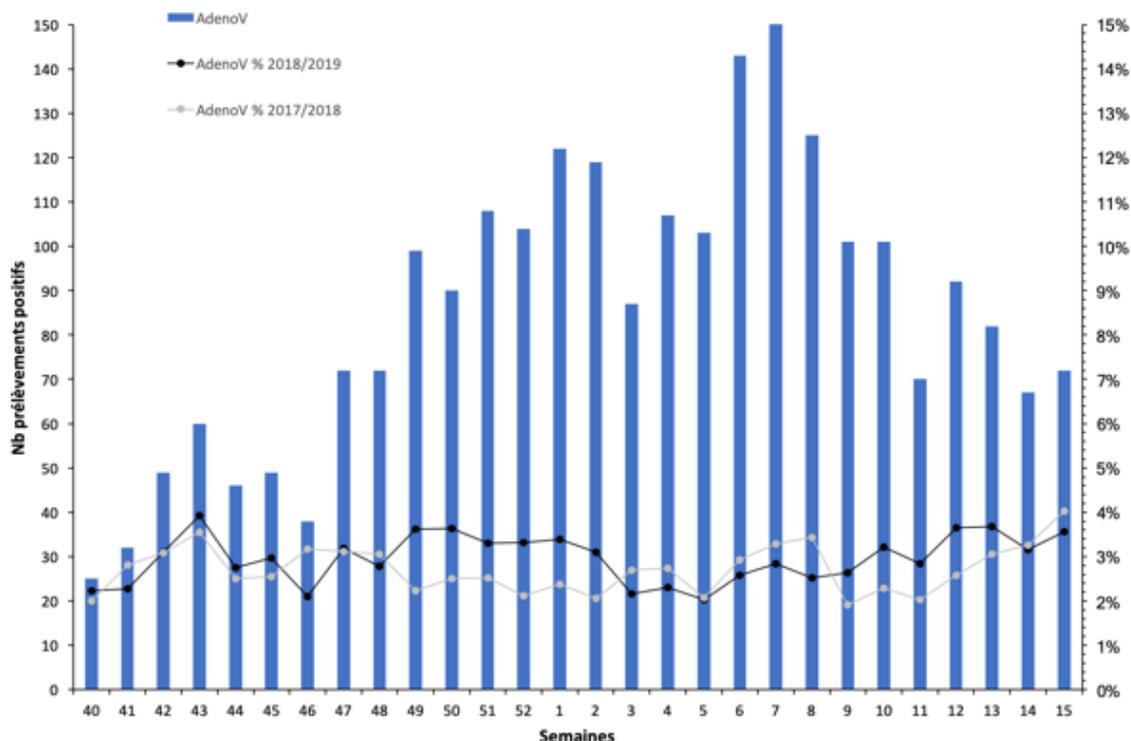


Figure 40 : Détection des adénovirus en France Réseau RENAL / saison 2018-2019

➤ Virus parainfluenza

L'ensemble des virus parainfluenza, typés (1, 2, 3 ou 4) et non-typés a été détecté à un niveau faible, mais supérieur aux autres virus respiratoires tout au long de la saison 2018-2019. Parmi les HPIV typés, les HPIV 3, 4 ont été le plus fréquemment détectés, avec une prédominance du HPIV 3 en fin de saison (Figure 41).

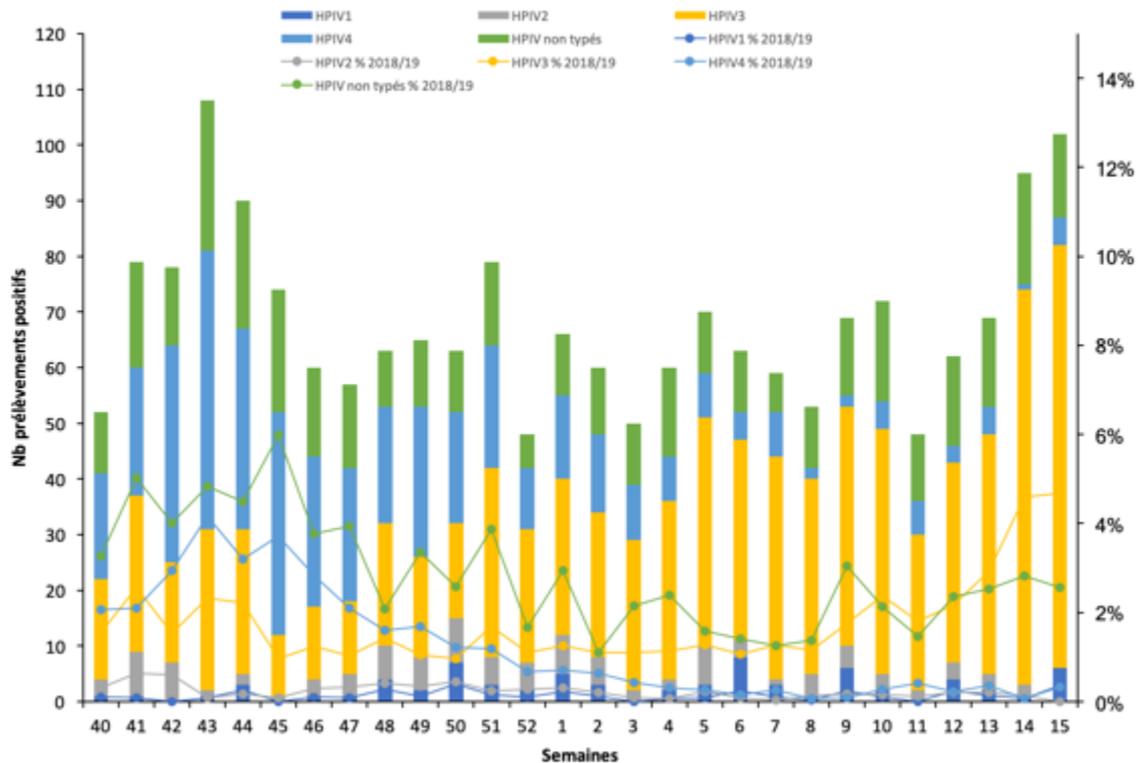


Figure 41 : Détection des virus parainfluenza (PIV) en France Réseaux RENAL / saison 2018-2019

➤ **Coronavirus humains**

Les coronavirus humains ont circulé à bas bruit tout au long de la saison, leur taux de détection n'a jamais dépassé 2,5% (figure 42).

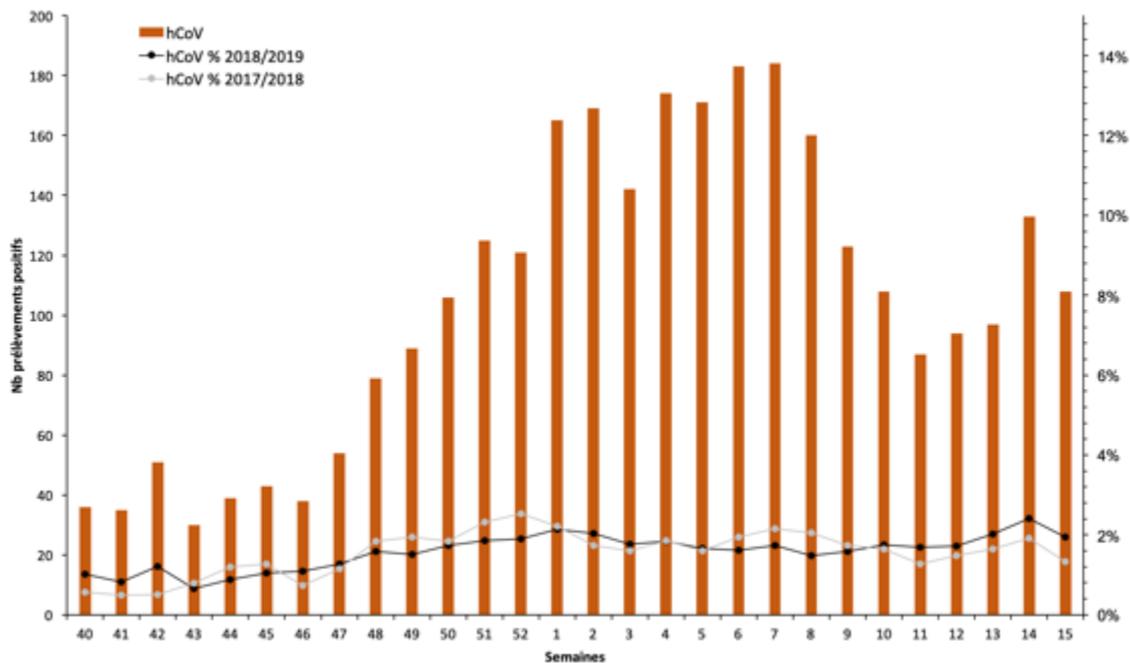


Figure 42 : Détection des coronavirus humains(hCoV) en France Réseaux RENAL / saison 2018-2019

➤ **IRA chez le sujet âgé de plus de 65 ans**

Le réseau Sentinelles a mis en place la surveillance des IRA chez le sujet âgé de plus de 65 ans en plus de la surveillance des syndromes grippaux quel que soit l'âge.

Parmi les 343 patients de plus de 65 ans présentant une infection respiratoire aigüe (IRA), les virus détectés ont été les suivants :

- 58 rhinovirus/enterovirus
- 19 metapneumovirus
- 24 VRS (14 VRS B et 10 VRS A).

3.1.3 Surveillance de la résistance aux antiviraux

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 IC₅₀ par rapport aux valeurs d'IC₅₀ pour les virus de référence sauvages (cf § 3.1.3.3).

3.1.3.1 Résistance génétique 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) : la majorité des virus testés A(H1N1)pdm09 (n=271) et A(H3N2) (n=522) présentaient une asparagine en position 31 de la séquence de la protéine M2 associée à une résistance à l'amantadine/rimantadine. Un seul virus A(H1N1)pdm09 présentant la réversion S31 a été détecté par le CNR-HCL.

3.1.3.2 Résistance génétique aux inhibiteurs de la neuraminidase (INA)

➤ **A(H1N1)pdm09**

La recherche de la mutation H275Y sur la neuraminidase, connue pour conférer une résistance élevée à l'oseltamivir et au peramivir, 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 CNR-IPP, 24 échantillons provenant de 16 patients différents ont été analysés dans le cadre de suspicion de résistance aux antiviraux, (patients en réanimation sans amélioration clinique malgré le traitement par oseltamivir, avec persistance d'excrétion virale) grâce à la technique de RT-PCR temps réel différentielle, ce qui permet une détection rapide. Deux virus A(H1N1)pdm09 présentant la mutation H275Y sur la neuraminidase N1 ont ainsi été identifiés chez des patients immunodéprimés, greffés.

Le séquençage NGS a permis de confirmer la présence de cette mutation pour l'un des deux patients. La fréquence de cette mutation était de 99,8%. L'échantillon pour l'autre patient n'a pas pu être séquençé.

Au CNR-HCL, un virus A(H1N1)pdm09 porteur de la mutation H275Y (isolat détecté résistant par test fluorimétrique et RT-PCR H275Y positive) a été détecté chez une patiente de 60 ans, suivie en hématologie pour leucémie aigüe myéloïde en rechute à 11 mois post-

allogreffe et également suivie en gynécologie pour carcinome mammaire. Cette patiente qui a contracté une grippe A(H1N1)pdm09 en hôpital de jour par contact avec un autre patient infecté, a présenté une grippe d'emblée résistante, la patiente ayant été mise sous oseltamivir en traitement préemptif.

Un autre virus A(H1N1)pdm09 a été détecté porteur de la mutation H275Y à la fois par séquençage et par RT-PCR H275Y. Ce virus provient d'un patient de 81 ans, présentant une clairance rénale altérée et traité par Tamiflu.

Aucune autre mutation d'intérêt n'a été détectée.

➤ **A(H3N2)**

Le séquençage du gène N2 permet de détecter la présence de mutations conférant une réduction de la sensibilité à l'oseltamivir, comme par exemple les mutations : E119V, R224K, R292K et N294S. Parmi les 492 prélèvements testés, 17 virus étaient porteurs de la mutation S331R, décrite pour conférer une faible réduction de sensibilité à l'oseltamivir et au zanamivir (un seul de ces virus a pu être isolé et l'analyse phénotypique n'a montré aucune perte de sensibilité aux antiviraux). Aucune autre mutation d'intérêt 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. Neuf virus B de lignage Yamagata, ont été analysés, et aucune mutation d'intérêt n'a été détectée. Pour les virus influenza B de lignage Victoria (n= 10), un virus issu du prélèvement respiratoire d'un enfant de 8 ans a été détecté, par le CNR-HCL, porteur de la mutation D197N connue pour conférer une faible diminution de sensibilité à l'oseltamivir et au zanamivir. Aucune information clinique n'a été donnée pour ce patient et nous n'avons pas obtenu d'isolat.

3.1.3.3 Résistance génétique au Baloxavir

Un nouvel antiviral le Baloxavir, pas encore commercialisé en France, a un mode d'action différent des inhibiteurs de la neuraminidase. Il cible l'activité endonucléase de la PA et bloque ainsi la synthèse d'ARMm viral. À ce jour des mutations de résistance sont connues, quel que soit le type/lignage viral. Les mutations suivantes sont liées à une diminution de sensibilité au Baloxavir : E23G, E23K, E23R, I38F, I38M, I38T, E119G ...

Sur 783 virus séquencés au total : 263 virus A(H1N1)pdm09, 501 virus A(H3N2) et 19 virus de type B, un seul virus muté a été détecté cette saison, par le CNR-HCL. U.n virus A(H3N2) porteur de la mutation I38V.

3.1.3.4 Analyse phénotypique de la sensibilité aux INA

La sensibilité des virus influenza aux inhibiteurs de neuraminidase (INA) est également analysée par un test fluorimétrique de mesure de l'activité de la NA utilisant le MUNANA comme substrat. Ce test réalisé en présence de différentes concentrations d'antiviraux permet la mesure de l'IC₅₀ (en nM) qui correspond à la concentration d'antiviral capable d'inhiber 50% de l'activité neuraminidase. Ce test nécessite de disposer d'un isolat viral produit en cellules MDCK.

Parmi les virus A(H1N1)pdm09 (n=85), A(H3N2) (n=92) et de type B (lignages B-Yamagata et B-Victoria) (n=8) dont la sensibilité aux INA a été testée, 2 virus A(H1N1)pdm09 ont présenté une sensibilité très diminuée à l'oseltamivir (IC₅₀ oseltamivir >450 nM), en

cohérence avec la présence de la mutation H275Y (Tableau 17). Pour les autres virus, les valeurs moyennes des IC₅₀ étaient proches de celles des virus de référence sensibles. Aucune évaluation phénotypique de la sensibilité aux antiviraux n'est réalisée au CNR-IPG qui n'effectue pas l'isolement viral

	Sentinelles/Hôpital	
	Sensible	Résistant
IPP		
A(H1N1)pdm09	60	1
A(H3N2)	68	0
B	3	0
tot	131	1
HCL		
A(H1N1)pdm09	23	1
A(H3N2)	24	0
B	5	0
tot	52	0
TOTAL	183	2

Tableau 17 : Résultats des tests phénotypiques de sensibilité à l'oseltamivir (CNR-IPP, CNR-HCL)

3.1.3.5 Analyse phénotypique de la sensibilité au Baloxavir

Au CNR-IPP, un test phénotypique d'évaluation de la sensibilité au Baloxavir par réduction de plages de lyse a été mis au point qui permet en présence de concentrations variables de l'antiviral de calculer une EC₅₀ (concentration de Baloxavir inhibant 50% de la formation des plages de lyse). Nous avons utilisé comme témoin positif un virus B-Yamagata de la saison 2017-18 porteur de la mutation I38T sur PA à 100% (un virus A(H3N2) de la saison 2016-17 porteur de la mutation I38M sur PA à 100% n'ayant pas été obtenu par culture, n'a pas pu être testé). Pour ce virus, une augmentation de l'EC₅₀ de 10 fois par rapport à la souche de référence correspondante a été observée, témoignant comme attendu d'une réduction de la sensibilité au Baloxavir (Figure 43). Ce test est également en cours d'essai au CNR-HCL.

Une analyse rétrospective des séquences de PA depuis 2016, a été réalisée sur l'ensemble des virus séquencés et 4 virus porteurs de mutations de résistance ont été détectés par les CNR.

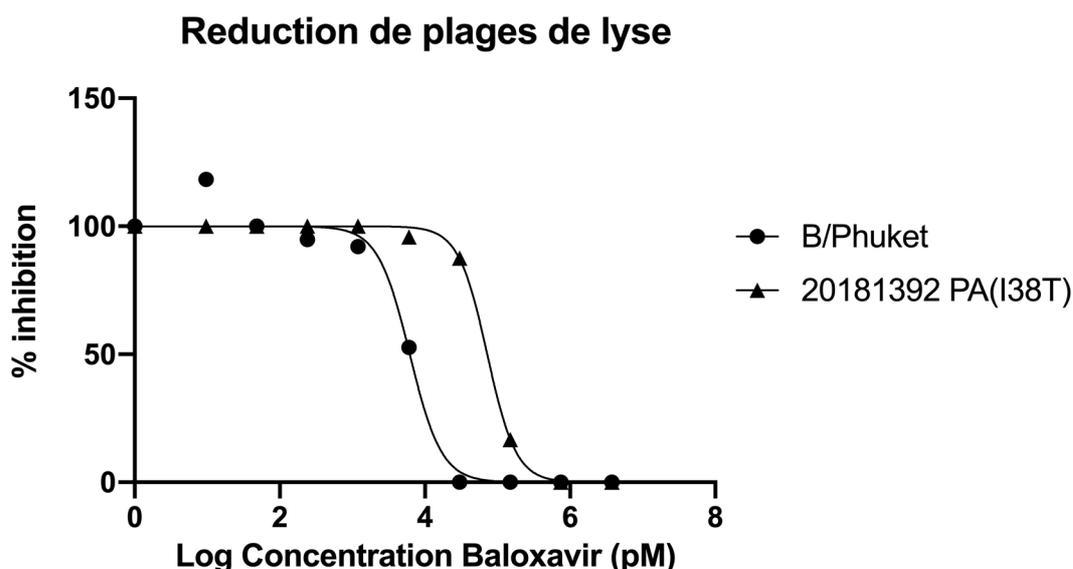


Figure 43 : Caractérisation *in vitro* de la susceptibilité au baloxavir d'un virus de la saison 2017/2018

3.2 Surveillance aux Antilles et en Guyane

3.2.1 Description du réseau de partenaires

3.2.1.1 Les 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 SpF Antilles et Guyane et les réseaux de médecins sentinelles grippe de Guyane, Martinique et Guadeloupe. En Guyane, le réseau sentinelle grippe 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, Roura, Kourou, Sinnamary 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.

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.

3.2.1.2 Les prélèvements

Le protocole prévoit, pour chaque médecin, le prélèvement des deux premiers patients de la semaine, présentant un syndrome grippal défini par « une fièvre $>39^{\circ}\text{C}$ d'apparition brutale accompagnée de myalgies et d'au moins un signe respiratoire » et évoluant depuis moins de 48H.

Dans le cadre de la surveillance hospitalière, différents types de prélèvements respiratoires sont réalisés : naso-pharyngés, expectorations, aspirations, très rarement liquides broncho-alvéolaires

3.2.1.3 Données d'activité médicale et sanitaire

Sur la base des estimations du nombre hebdomadaire de passage aux urgences ainsi que sur le nombre de patients ayant consulté un médecin généraliste, pour syndrome grippal, les cellules Antilles et Guyane définissent les périodes épidémiques.

Aux Antilles, les épidémies 2018-2019 ont démarré plus tardivement que les années précédentes. Elles ont duré respectivement 11 et 13 semaines : de la semaine S03/2019 à la semaine S13/2019 en Guadeloupe et de la semaine S03/2019 à la semaine S15/2019 en Martinique (Figures 44-45). Elles sont restées d'ampleur modérée dans ces deux départements. Au total, 15 et 13 cas graves ont été hospitalisés en réanimation parmi lesquels 5 et 4 sont décédés respectivement en Guadeloupe et en Martinique. La majorité de ces cas graves présentaient des facteurs de risque (22/28) et n'avaient pas été vaccinés

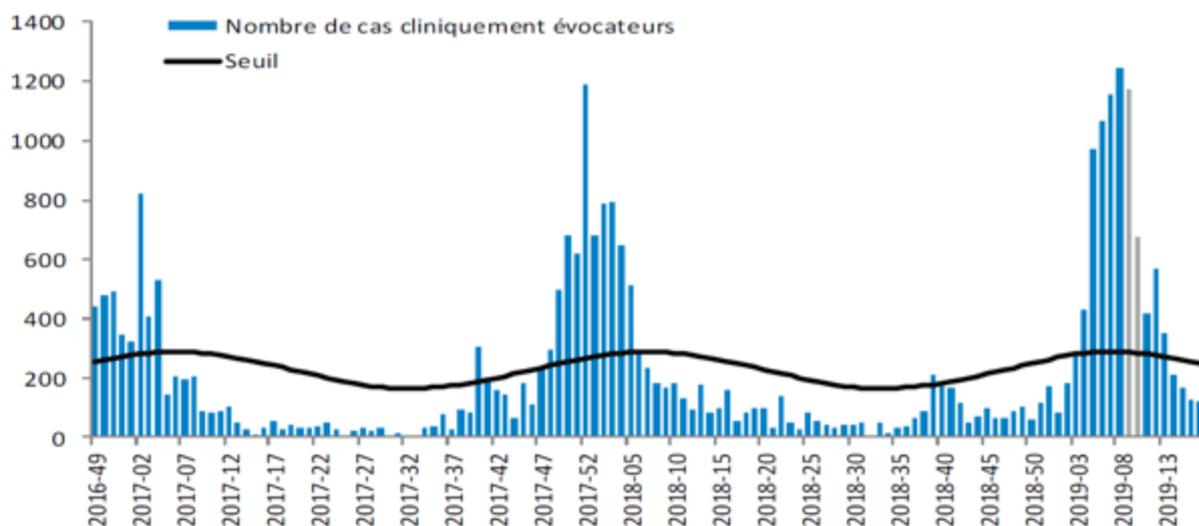


Figure 44 : Estimation du nombre hebdomadaire de consultations en médecine de ville pour syndromes grippaux et seuil saisonnier, Guadeloupe – décembre 2016 à avril 2019 (Source SpF Antilles)

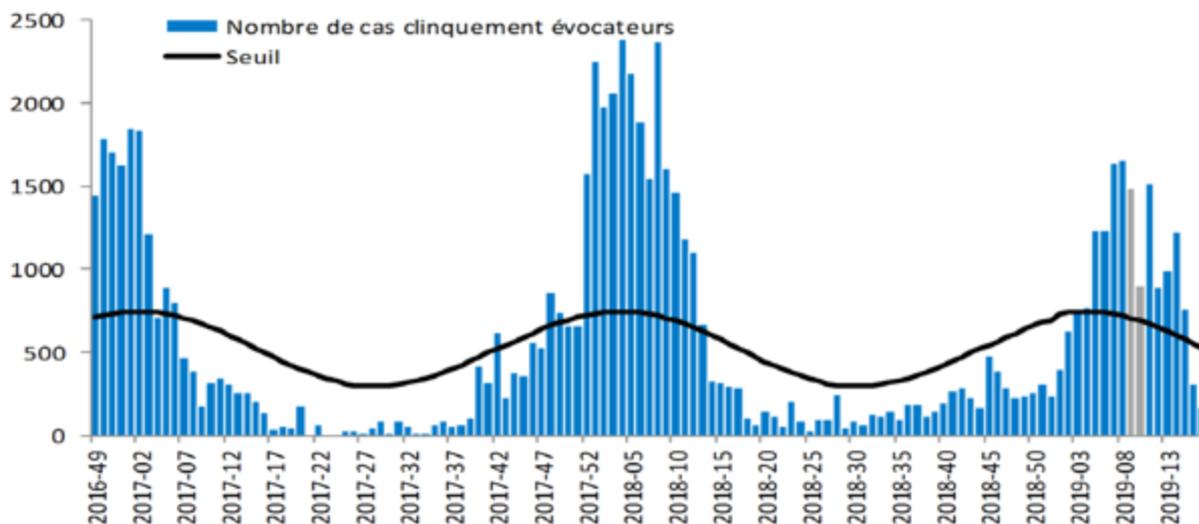


Figure 45 : Estimation du nombre hebdomadaire de consultations en médecine de ville pour syndromes grippaux et seuil saisonnier, Martinique – décembre 2016 à avril 2019 (Source SpF Antilles)

En Guyane, Santé publique France ne rapporte pas d'épidémie grippale cette année sur le département. Une circulation virale soutenue a tout de même été observée de la semaine S04/2019 à la semaine S29/2019 (Figure 46). Au cours de cette saison, 3 cas sévères ont été admis en service de réanimation de l'hôpital de Cayenne. Deux cas, dont un décès, sont liés à une infection par un virus A(H1N1)pdm09. Le troisième cas, issu de réanimation néonatale, est lié à une infection par un virus B.

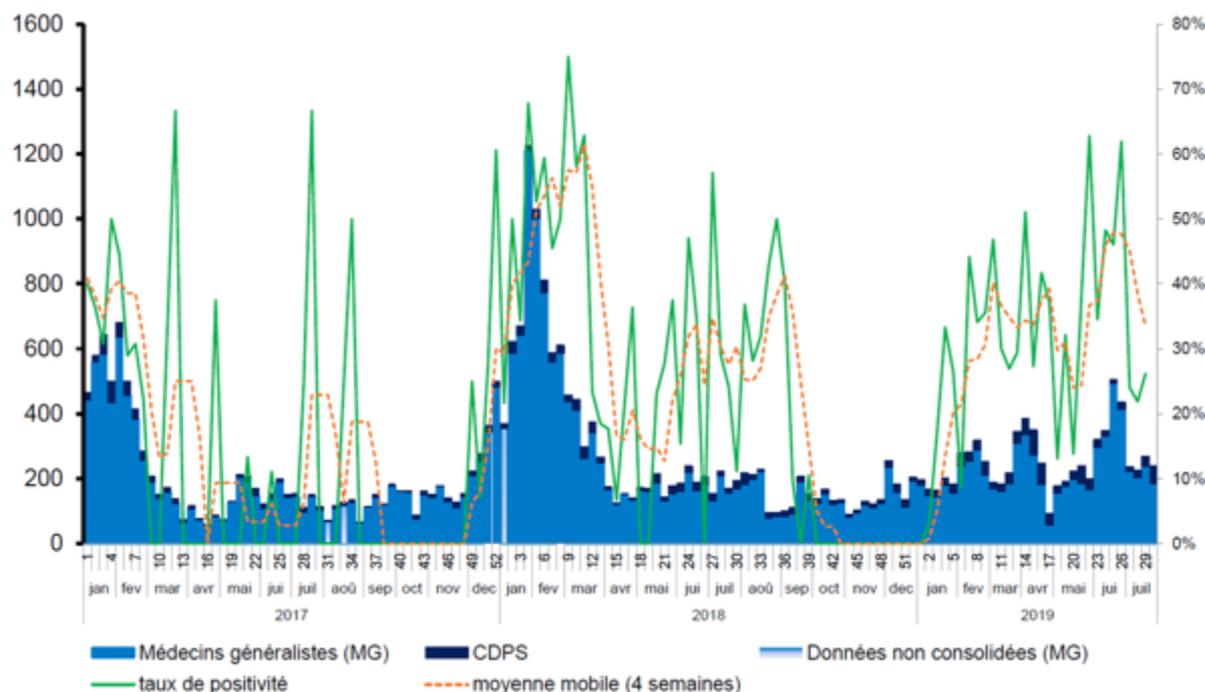


Figure 46 : Nombre de consultations pour syndromes grippaux en médecine de ville et taux de positivité, Guyane – janvier 2017 à juillet 2019 (Source : SpF Guyane)

3.2.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections respiratoires virales

3.2.2.1 Chronologie et distribution géographique du nombre des détections de virus grippaux et de VRS

En Guyane, malgré l'absence de dépassement des seuils épidémiques d'après les données de surveillance de SpF Guyane, une circulation grippale a été observée de la semaine S01/2019 à la semaine S29/2019.

Au plan virologique, la circulation des VRS au cours de la saison 2018-2019, a précédé celle des virus grippaux, puis est repartie à la hausse en seconde période de circulation des virus grippaux. Au total, le nombre de virus VRS détectés reste, comme les années précédentes, inférieur au nombre de virus grippaux détectés (Figure 47).

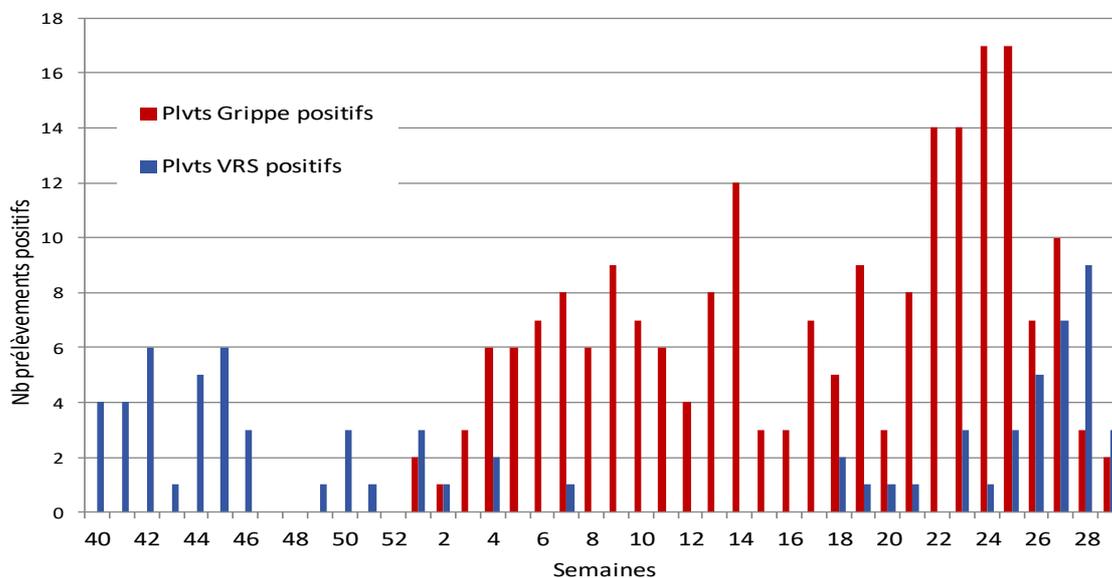


Figure 47 : Détection des virus grippaux et VRS en Guyane - CNR-IPG / saison 2018-2019 (semaines S40/2018 à S29/2019)

Parmi les virus grippaux, les virus de type A ont majoritairement circulé (84,5%) avec une large dominance de virus A(H3N2) (81,7%) par rapport aux virus A(H1N1)pdm09 (17,7%). Une circulation de virus B Victoria a cependant été observée à partir de la semaine 17/2019. La circulation de virus grippaux est encore en cours en S29/2019 (Figure 48).

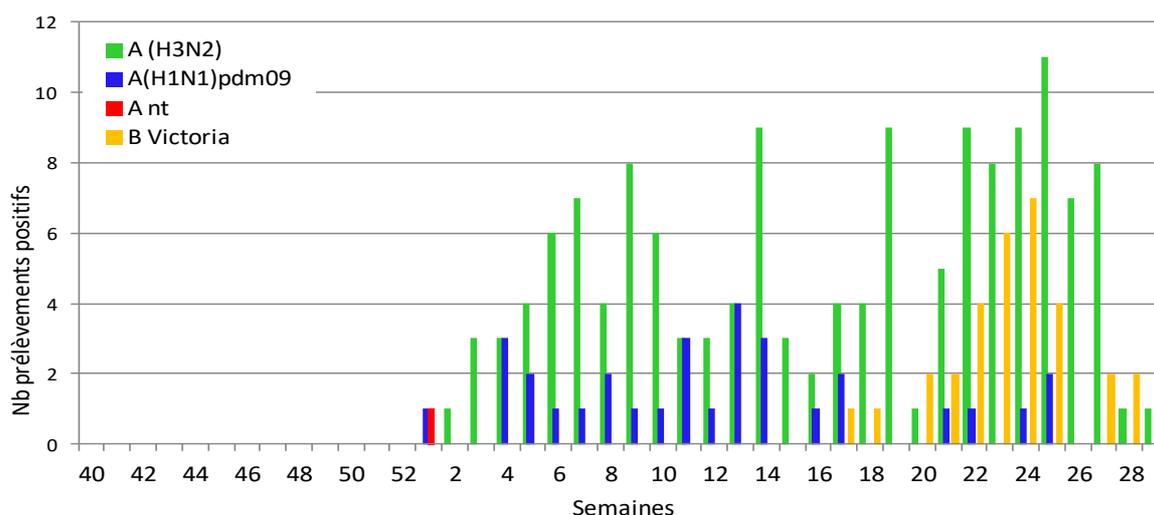


Figure 48 : Répartition des virus grippaux détectés en Guyane - CNR-IPG / saison 2018-2019

Aux Antilles, la détection des virus grippaux a été plus prolongée en Martinique qu'en Guadeloupe (Figure 49).

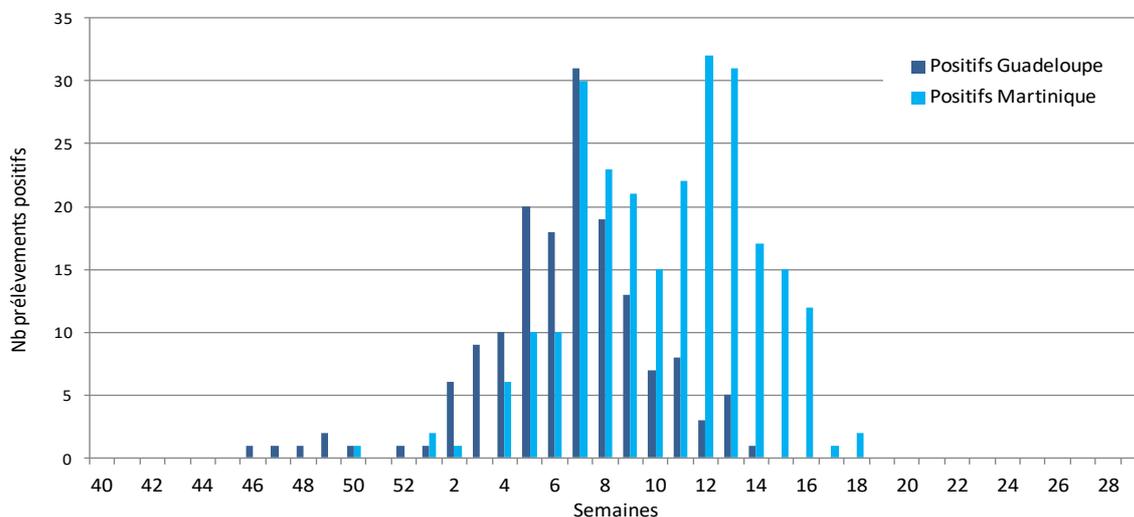


Figure 49 : Détection des virus grippaux aux Antilles (Guadeloupe et Martinique) CNR-IPG / saison 2018-2019 (semaines S40/2018 à S29/2019)

Sur le plan virologique, les épidémies aux Antilles ont été marquées par une co-circulation de virus grippaux A(H3N2) et A (H1N1)pdm09, équilibrée en Guadeloupe (52,5% de A(H3N2) et 45,6% de A(H1N1)pdm09) et avec une dominance de A(H3N2) (70,4%) en Martinique plus marquée en fin de période épidémique. Un seul virus B, de lignage Yamagata, a été identifié cette saison en Martinique (S05/2019) (Figures 50 et 51).

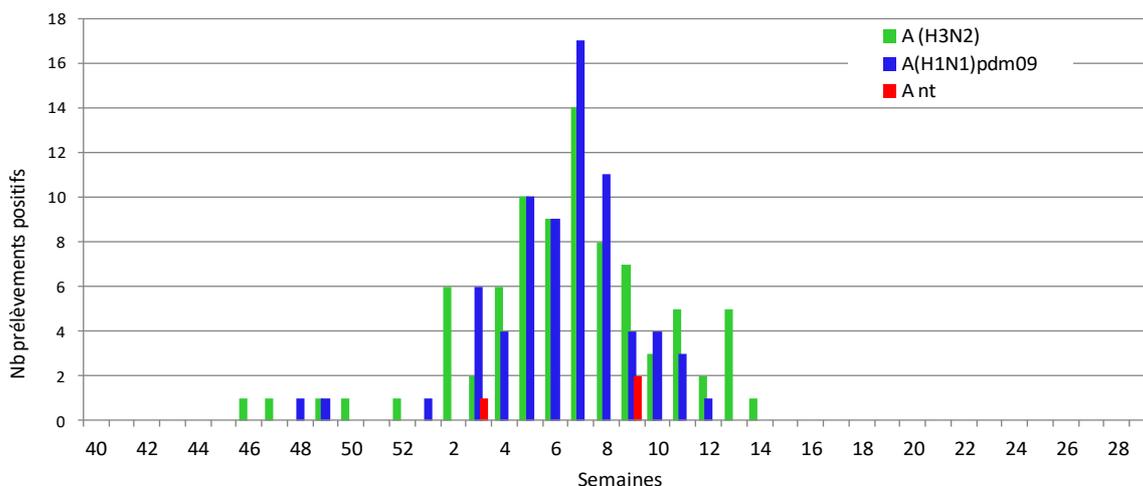


Figure 50 : Répartition des virus grippaux détectés en Guadeloupe - CNR-IPG / saison 2018-2019

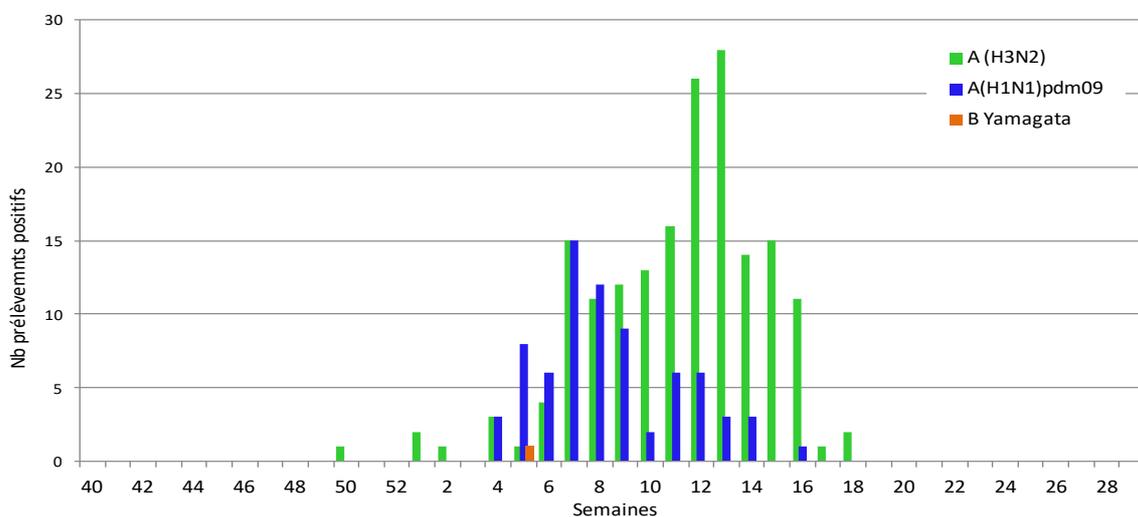


Figure 51 : Répartition des virus grippaux détectés en Martinique - CNR-IPG / saison 2018-2019

3.2.2.2 Caractérisation génétique et antigénique des virus grippaux – Antilles et Guyane

Pour les virus A(H1N1)pdm09 : les 13 virus analysés génétiquement appartiennent tous au clade phylogénétique 6B.1 (9 proviennent de Martinique, 3 proviennent de Guyane et un de Guadeloupe). Les 4 virus qui ont pu être caractérisés antigéniquement sont proches de la souche vaccinale A/Michigan/45/2015 (vaccin hémisphère nord 2018/2019).

Pour les virus A(H3N2) : parmi les 6 virus analysés génétiquement, 3 en provenance de Guyane et de Guadeloupe, appartiennent au clade phylogénétique 3C.3a, tandis que 3, en provenance de Martinique, appartiennent respectivement aux clades phylogénétiques 3C.2a1b (n=2) et 3C.2a2 (n=1). Quatre virus A(H3N2) ont été caractérisés antigéniquement : 3 se sont avérés proches de la souche A/Switzerland/9715293/2013 et 1 virus est proche de la souche A/Hong Kong/4801/2014.

3.2.2.3 Distribution par âge des cas de grippe virologiquement confirmés – Antilles et Guyane

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 (57,3%) tandis que le pourcentage de positivité pour la grippe le plus élevé (68,6%) est observé pour les 5-14 ans (Tableau 18).

Age	Nb prlv	Nb grippe+	% de + dans la tranche âge	% du groupe d'âge/total	% de + /total de +
0-4	111	24	21,6%	21,9%	11,5%
5-14	70	48	68,6%	13,8%	23,0%
15-64	290	122	42,1%	57,3%	58,4%
≥65	35	15	42,9%	6,9%	7,2%
Total	506	209	41,3%	100,0%	100,0%

Tableau 18 : Distribution par âge des patients - Antilles et Guyane - Surveillance sentinelle / 2018-2019

Toutes les classes d'âge ont été majoritairement touchées par les virus A(H3N2). Les virus A(H1N1)pdm09 ont touché préférentiellement la classe d'âge des 15-64 ans (30,3%), tandis que les virus de type B qui ont peu circulé, sont plus particulièrement retrouvés chez les 5-14 ans (16,70%) (Tableau 19).

Age	Nb Grippe+	Nb grippe A/H1pdm09 (%)	Nb grippe A/H3 (%)	Nb grippe A non sous typé (%)	Nb grippe B (%)
0-4	24	4 (16,7%)	18 (75,0%)	0 (0,0%)	2 (8,3%)
5-14	48	5 (10,4%)	35 (72,9%)	0 (0,0%)	8 (16,7%)
15-64	122	37 (30,3%)	73 (59,8%)	1 (0,8%)	11 (9,0%)
≥65	15	3 (20,0%)	12 (80,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Total	209	49 (23,4%)	138 (66,0%)	1 (0,5%)	21 (10,0%)

Tableau 19 : Distribution par tranche d'âge et par (sous)-type viral - Antilles et Guyane - Surveillance sentinelle / 2018-2019

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

Concernant les autres pathogènes responsables d'infections respiratoires aiguës, le VRS et les rhinovirus/enterovirus (HRV) sont systématiquement recherchés dans les prélèvements provenant de Guyane.

➤ VRS

Contrairement à la saison précédente, les circulations saisonnières du VRS et des virus grippaux n'ont pas été associées. Le VRS a circulé d'octobre à février puis de mai à juillet (Figure 52).

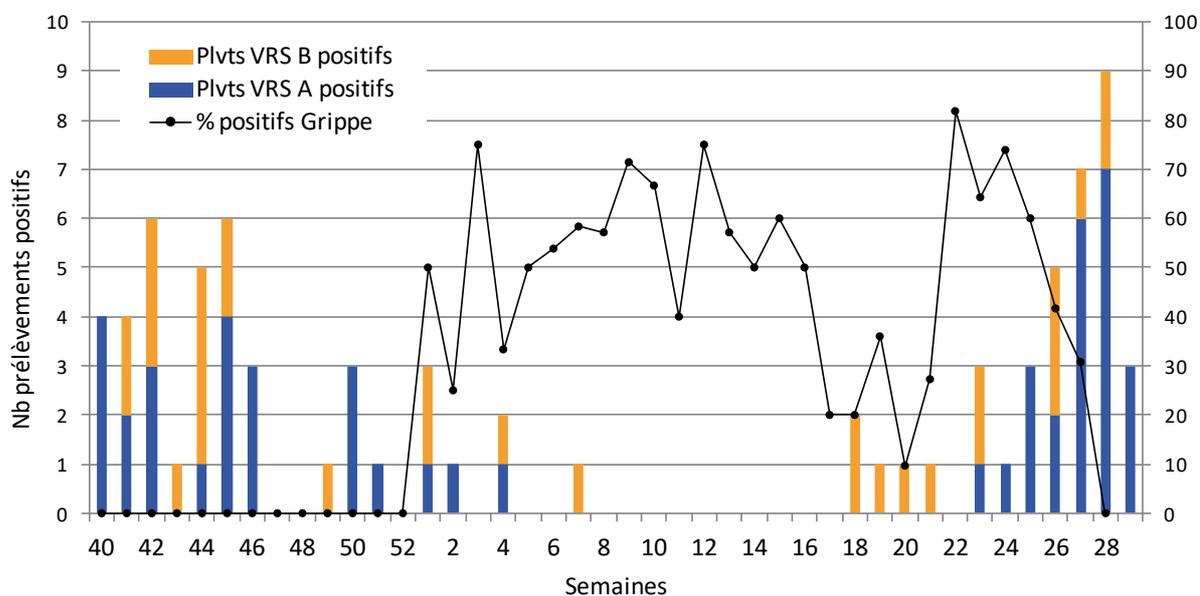


Figure 52 : Répartition VRS A et VRS B en Guyane - CNR-IPG / saison 2018-2019

Parmi les 520 échantillons analysés, 47 VRS A et 30 VRS B ont été détectés. Aucune infection mixte VRS A / VRS B n'a été mise en évidence.

Les VRS ont été principalement détectés parmi la classe d'âge 0-4 ans (90,9%). (Tableau 20).

Age	VRSA	VRSB	Nb VRS +	% de + dans la tranche âge	% de + /total de +
0-4	45	25	70	37,8%	90,9%
5-14	0	2	2	2,9%	2,6%
15-64	2	3	5	2,1%	6,5%
≥65	0	0	0	0,0%	0,0%
Total	47	30	77	14,8%	100,0%

Tableau 20 : Répartition des VRS en fonction de l'âge en Guyane - CNR-IPG / saison 2018-2019

➤ Rhinovirus/enterovirus humains (HRV)

Les rhinovirus/enterovirus ont été détectés de façon quasiment continue tout au long de la saison 2018-2019 (Figure 53).

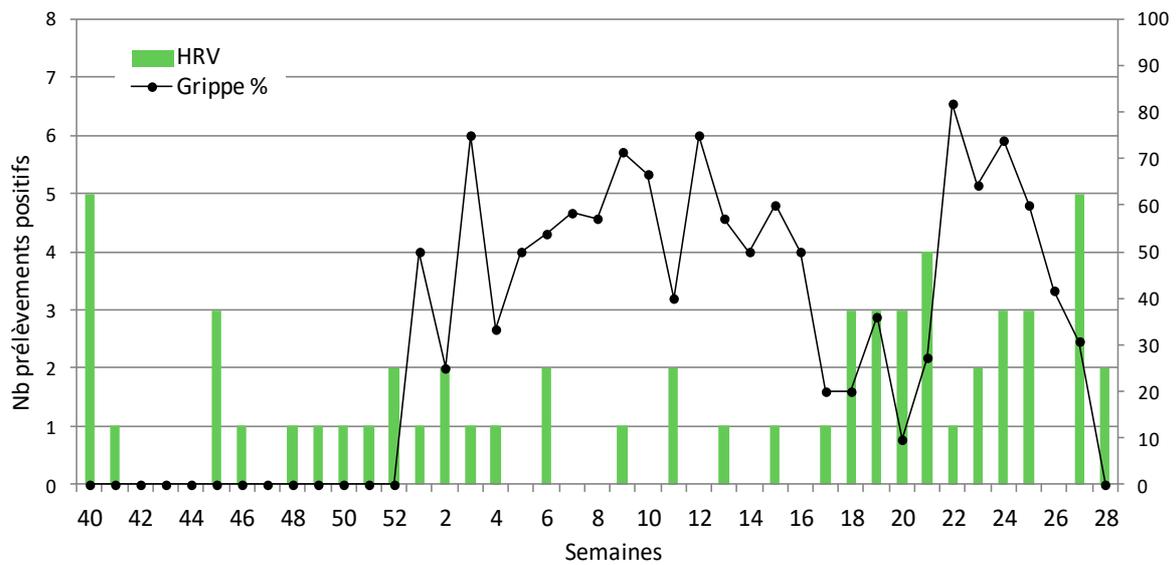


Figure 53 : Détection des rhinovirus/enterovirus humains en Guyane - CNR-IPG / saison 2018-2019

3.2.3 Surveillance de la résistance aux antiviraux

Aucune évaluation phénotypique de la sensibilité aux antiviraux n'est réalisée au CNR-IPG qui n'effectue pas l'isolement viral. Parmi les virus envoyés au CNR-IPP et ayant été séquencés, aucune mutation liée à une résistance aux antiviraux n'a été détectée.

3.3 Interface avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

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.

3.3.1 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.

3.3.2 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 pour les CNR-IPP et -HCL ; par l'intermédiaire d'une saisie des données en ligne pour l'IPG). Elles permettent de contribuer à la surveillance globale de la circulation des virus grippaux.

3.3.3 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 2018-2019, nous avons reçu en mai 2019 un panel (EQAP panel 18) de contrôles de qualité moléculaires 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 2 virus influenza H5, un H1pdm09, 2 H3, 2 H7, 2 B et un échantillon négatif.

Les CNR-IPP, -HCL et IPG ont pu sous-typer correctement tous les virus. L'EQAP comportait également 4 échantillons pour détermination de la sensibilité aux antiviraux, par tests phénotypiques et génotypiques. Une résistance à l'oseltamivir a été détectée, liée à la mutation H275Y sur la neuraminidase pour 2 échantillons.

Virus MERS-CoV

Le CNR-HCL a participé au contrôle de qualité moléculaire proposé par QCMD. Le CNR a reçu en juin 2019 un panel (Viral EQA MERS coronavirus MERS19) pour la détection

identification du MERS-CoV et autres coronavirus humains. Ce panel comportait 8 échantillons de virus inactivés correspondant à 5 MERS-CoV, un NL63, un OC43 et un échantillon négatif. Le CNR a détecté correctement les échantillons contenant du MERS-CoV

Autres virus respiratoires

Les CNR-IPP et HCL ont continué cette saison un accord de partenariat pour l'organisation d'un échange inter-laboratoire EIL. Cet échange, d'un panel de 10 échantillons respiratoires positifs pour un ou plusieurs, des virus suivants : VRS, rhinovirus/enterovirus et metapneumovirus, s'est déroulé en novembre 2018 et en mars 2019. Tous les virus ont été correctement identifiés par les 2 CNR. Ces échanges vont continuer, il est prévu d'y ajouter d'autres virus respiratoires tels que virus parainfluenza, coronavirus, adenovirus.

Une comparaison inter-laboratoire (CIL) « PCR Grippe et VRS » a également été mise en place entre le CNR-IPG et le laboratoire de l'hôpital de Saint-Laurent du Maroni (CHOG).

3.4 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 2018-2019.

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 les Antilles et la Guyane, le CNR-IPG alerte les cellules SpF et les ARS concernées.

Au cours de la saison grippale 2018-2019, aucune note d'alerte n'a été diffusée. Toutefois le CNR a régulièrement fourni à SpF tout au long de la saison des informations concernant les caractéristiques antigéniques des virus grippaux de sous-types A(H1N1)pdm09 et A(H3N2) responsables de l'épidémie cette saison.

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

Le CNR-IPP a été contacté par l'ARS Centre-Val de Loire fin janvier 2019 pour des cas groupés de grippe dans un établissement du Loiret, avec 6 décès dont 2 personnes membres du personnel de l'établissement (EHPAD et centre de rééducation fonctionnelle). Le CNR a alors expertisé les échantillons des personnes décédés et des personnes contact. Les virus responsables étaient les virus grippaux saisonniers circulants à cette période. Et le CNR est resté en contact avec l'ARS, la DGS, SpF et le Centre Hospitalier d'Orléans pour différentes réunions et en tant qu'experts et conseil.

De rares cas groupés ont donné lieu à l'analyse de prélèvements par les laboratoires du CNR cette saison (Tableau 21).

Nb patients	Nb plvts positifs	Provenance	Contexte	Virus détectés
4	4	Libourne	EHPAD	4 B Yamagata
1	0	St Galmier	EHPAD	
3	2	St Vallier	EHPAD	2 rhinoV
6	4	Tournon	EHPAD	4 rhinoV

Tableau 21 : Bilan des cas groupés analysés par le CNR- HCL

5 Activités de rétro-information, de formation et de conseil

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

5.1.1 Enseignements

➤ Pr Sylvie van der WERF

En tant que Professeur à l'Université Paris Diderot, Sylvie van der WERF a dispensé les enseignements suivants en 2018-2019:

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 22h : Virologie

De l'Immunologie à l'Immunothérapie : M1-IMVI

Cours 2h

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

UE Virologie Fondamentale – responsable de l'UE

Cours 2h : Les virus de l'Influenza ; Table Ronde 2h : Virus émergents

UE Séminaires bibliographiques : audition 15h

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

Cours 3h30 : 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

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

ENS Lyon

M2 Advanced Immunology and Diseases : Master Biosciences

Cours 1h30 : Influenza vaccines - challenges, improvements and new perspectives

➤ Pr Bruno LINA

Université Claude Bernard Lyon 1

Médecine

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

Participation aux enseignements des Diplômes Inter-Universitaire :

- Pathologie infectieuse pédiatrique : grippe chez l'enfant (2h),
- Transplantation : infections respiratoires (2h),
- Chimiothérapie anti-infectieuse et vaccins : vaccins contre la grippe (2h)

- Vaccinologie : vaccin contre la grippe (1h)
- Médecine d'Urgence : Gestion des épidémies et pandémies (3h)
- Médecine de Catastrophe : Urgences sanitaires virales (2h)
- Histoire des épidémies (2h)

Fédération Science et Biologie

Enseignement en Master 1 :

Physiopathologie des maladies transmissibles : variabilité des virus influenza (4h)

Enseignement en Master 2 :

- Ecologie microbienne (Lyon I) : influenza virus (2h30),
- EPIRIS (Lyon I) : épidémiologie de la grippe (2h)
- Cours master Erasmus - Influenza vaccine (1h30)

Université Paris Est

Enseignement en Master 2 :

Vaccinologie: Flu vaccins : objectives and strategies (2h)

5.1.2 Formation, accueil de stagiaires

Au CNR-IPP, accueil d'un stagiaire du réseau international des instituts Pasteur, provenant de l'Institut Pasteur de Madagascar (Tsiry Hasina RANDRIAMBOLAMANANTSOA), dans le cadre de sa thèse pour une durée d'un mois. Projet : apprendre la préparation des échantillons biologiques (amplicons et cDNA) pour le séquençage génome entier NGS et initiation à l'analyse des séquences des virus grippaux et des VRS.

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, janvier 2019 - avril 2019),. Et d'un stagiaire M1 (Hugo NAVARRO), mémoire sur l'intérêt de l'étude des variants minoritaires pour le suivi de la grippe hospitalisée.

5.1.3 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.

Une analyse des détections virologiques réalisées sur les prélèvements adressés par les médecins du réseau Sentinelles est également présentée dans le bulletin hebdomadaire du réseau Sentinelles pendant la période de surveillance active de la grippe (semaines 40 à 15) et fait l'objet d'une validation par le CNR.

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. Le système de recueil de l'information par internet (logiciel Voozoo "RENOG") sur un site sécurisé par mot de passe 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.

➤ **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 chaque semaine pour la Guyane ou dès qu'ils sont disponibles pour les Antilles, à l'ARS (ARS Martinique, ARS Guadeloupe ou ARS Guyane) et à la cellule SpF (Antilles ou Guyane) concernées sous forme de fichier informatique, sécurisé et anonymisé. Un résultat nominatif est adressé au médecin préleveur.

Les cellules SpF des Antilles et Guyane pilotent en parallèle un système de surveillance syndromique des syndromes grippaux dans les TFA. Le recueil de l'ensemble de ces données fait l'objet de " Points Epidémiologiques Périodiques ", mensuels ou hebdomadaires en fonction du contexte épidémiologique. Ces bulletins de rétro-information sont édités par les cellules SpF (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 TFA, de SpF et de la DGS, tout en faisant le point sur la situation épidémiologique du moment.

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

5.2.1 Activités auprès des instances de santé nationales

5.2.1.1 Ministère de la Santé, DGS, DGAL, DGT

Membre du Groupe de travail permanent « grippe-coronavirus » 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)

5.2.1.2 Santé Publique France

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

5.2.1.3 ANSES

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

5.2.1.4 COFRAC

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

5.2.1.5 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)

5.2.1.6 ANSM

Expert ponctuel pour l'évaluation des dossiers des vaccins contre la grippe (B. Lina).

5.2.2 Activités auprès des instances de santé internationales

5.2.2.1 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 du EUPHEM advisory forum pour l'ECDC (B Lina)
- Membres du working group pour l'ECDC : "Objectives and opportunities of Next Generation Sequencing (NGS) for influenza surveillance". Mai 2019 (S. Behillil, L. Josset)

5.2.2.2 OMS

- Directeur du Laboratoire de Référence de l'OMS pour le SRAS (S. van der Werf)
- Directeur du Laboratoire de Référence de l'OMS pour les virus H5 (S. van der Werf)
- Membre du PIP Framework working group (S. van der Werf - depuis 2015).
- Expert pour l'évaluation des virus H5Nx et H9N2 à l'aide de l'outil TIPRA (Tool for the Influenza Pandemic Tisk Assessment) et la mise à jour de l'outil TIPRA (S. van der Werf)

5.2.3 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 de l'Association et membre du bureau du Réseau des Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe (GROG)
- 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 Scientific Advisory Council de GISAID (depuis 2017)
- Membre du board de ISIRV (depuis 2018) et du comité scientifique du antiviral group ISIRV Editeur Associé pour la revue Eurosurveillance

➤ *Pr Bruno LINA*

- Président du Conseil Scientifique du groupe de travail Groupe d'Etude et d'Information sur la Grippe (GEIG) au sein de la SFM
- Membre du Scientific Advisory Board de I4D
- 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
- Co-Chair du scientific committee du Global Influenza and RSV Initiative
- Chair de l'independent scientific committee Global Influenza Hospital surveillance Network
- Président du Comité Scientifique d'Immuniser-Lyon
- Editeur associé de Journal of Clinical Virology
- Scientific coordination of the EISN ERLIN-NET meeting (WHO-ECDC) in 2014, 2015, 2016, 2017, 2018 and 2019
- Membre du Scientific evaluation of the ESCMID abstracts related to the ESGREV, ESCMID Study Group (2018, 2019)
- Membre du Scientific committee of the ESV meeting in Rotterdam (2019).

5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles

➤ **Pr Sylvie van der Werf**

- Conférence invitée :

« La Vaccination Introduction » et animation de la table ronde, session « Vaccination », Congrès SPOT-Pharma, 7 décembre 2018, Cité Internationale Universitaire, Paris.

- Interviews pour la presse écrite et audiovisuelle

➤ **Pr Bruno Lina**

- Conférences invitées :

« Vaccination » Echelon médical de l'Assurance Maladie de la région ARA les 25 octobre et 13 novembre 2018

« La grippe à travers les âges » Réunion scientifique GREPI, Paris, 21 Novembre 2018

« Grippe et personnel soignant » audition Académie de Pharmacie, 14 novembre 2018

« Conférence de Presse Immuniser.lyon : vaccination et territoires en santé » Mairie de Lyon, 19 décembre 2018

« Vaccination des soignants : état des lieux » 13^e journée IREVAC, Paris, 22 mars 2019

« Conférence débat : vaccination des soignants », ARS AURA et semaine de vaccination, Lyon 14 mai 2019

- Interviews pour la presse écrite et audiovisuelle française et internationale

➤ **Dr Vincent Enouf**

- Interviews pour la presse écrite et audiovisuelle : selon le bilan des retombées presse de l'institut Pasteur pour l'année 2018, Vincent Enouf est cité dans 92 retombées ce qui représente une audience de 4 millions de personnes.

➤ **Dr Sylvie Behillil**

- Interviews pour la presse écrite et audiovisuelle.

➤ **Dr Martine Valette**

- Interviews pour la presse écrite et radio.

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-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), du projet Institut Carnot Pasteur MS- F2E FluCD (coordinateur S. van der Werf) 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). Ces travaux ont permis de montrer à partir de prélèvements primaires issus de patients des différences de diversité génétique selon les sous-types viraux (*Barbezange et al. Front. Microbiol. 2018*). Ces études seront poursuivies en s'intéressant à la nature des variations de composition des populations virales. Nous cherchons également à déterminer dans quelle mesure l'évolution des variants minoritaires au décours 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. Par des approches de mutagenèse aléatoire ou dirigée des gènes du complexe polymérase et de la nucléoprotéine (NP) requis pour la réplication du génome viral, et analyse de l'impact de mutations sur la réplication, la capacité de multiplication virale, la sensibilité à différents mutagènes ainsi que la diversité de la population virale nous avons identifié 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 (*F. Andrieux, Thèse de doctorat*). 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.

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. Notre approche consiste à produire des virus recombinants dans lesquels les séquences non codantes d'un segment donné sont

remplacées par celles de chacun des 7 autres segments, comme précédemment publié pour le segment NA (*Crescenzo et al. Sci Rep 2017*). L'étude de la viabilité, de la vitalité et de l'efficacité d'incorporation des segments modifiés ainsi que l'analyse des mutations qui restaurent le phénotype sauvage couplé à des analyses d'interactions ARN-ARN nous renseigne sur de nouveaux déterminants qui gouvernent l'emballage des segments viraux. Ces données devraient permettre de mieux comprendre quels sont les éléments mis en jeu lors des événements de réassortiment entre souches virales.

➤ **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 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. Ainsi, l'étude des interactions différentielles de la protéine PB2 avec le système ubiquitine protéasome ont permis de mettre en évidence une corrélation entre les signatures d'interactions et l'origine et le degré d'adaptation de PB2 à l'homme (*Biquand et al. mSphere 2017*). De même, l'étude par complémentation protéique (PCA) 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 a permis d'identifier des facteurs cellulaires qui interagissent avec les protéines du complexe polymérase (parfois de façon différentielle selon l'origine des protéines virales) (*M. Declercq, Thèse de doctorat*). Des approches d'interactomique à très haut débit et robustes développées par le groupe de Y. Jacob (*Choi et al. Nature Com. 2019*), 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'ORFOME 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 utilisables notamment en cas de nouvelle pandémie.

➤ **Potentiel zoonotique des virus influenza D et comparaison avec les virus influenza C**

Un nouveau type de virus influenza (type D) (IDV) 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 avons entrepris l'évaluation de sa stabilité selon différentes conditions physicochimiques (température, pH, etc.). Par qRT-PCR spécifique que nous avons développée nous avons recherché la présence de ce virus chez les patients atteints d'IRA au cours des saisons 2010/2011 à 2017/2018 dans les régions à prédominance rurale. Aucun virus influenza D n'a été détecté alors que quelques rares prélèvements étaient positifs pour le virus influenza C (ICV). 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*). Par ailleurs, dans le cadre du projet FluCD (coll. M. Ducatez, INRA/ENVT, Toulouse) nous avons identifié les déterminants moléculaires spécifiques de type qui gouvernent la transcription/réplication de mini-génomés correspondant à chacun des segments. De plus, nous avons développé un système de génétique inverse IDV compatible avec une version optimisée du système de génétique inverse précédemment développé pour ICV (*B. Crescenzo, Y. Rahou, en préparation*). Cela nous permet aujourd'hui d'étudier la possibilité de production de virus réassortants entre IDV

et ICV et ainsi d'évaluer le risque zoonotique consécutif à des réassortiments potentiel lié à la co-circulation de ces virus dans les populations porcines et bovines.

➤ **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, 2018*). Egalement, nous avons contribué à une étude montrant une association temporelle entre circulation des rhinovirus et infections ostéoarticulaires à *Kingella kingae* (*Droz et al. J Pediatr. 2018*). Par ailleurs, nous avons contribué à une étude de la prévalence du bocavirus humain (HBoV) au Gabon chez les enfants de moins de 5 ans présentant un syndrome grippal ou une diarrhée. Ces travaux ont mis en évidence la circulation du génotype HBoV-1 avec une prévalence de 4.4% et 2.2% dans les prélèvements respiratoires et dans les selles, respectivement. L'analyse génétique a montré que une forte similarité entre les virus détectés dans les prélèvements respiratoires et les selles (*Lekana-Douki et al. BMC Res Notes 2018*).

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. Pour ce faire, des méthodes permettant la production de virus mutés par génétique inverse à haut débit sont en cours de développement (*F. Donati, B. Crescenzo*).

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. Le CNR-IPP a ainsi contribué à une étude multicentrique chez des patients infectés par le virus A(H1N1)pdm09 hospitalisés en réanimation avec une SDRA et traités par oseltamivir. Chez ces patients la prévalence de la mutation H275Y dans la neuraminidase associée à une réduction élevée de la sensibilité à l'oseltamivir était de 23%. Une mortalité à J28 des patients infectés par un virus porteur de la mutation H275Y significativement plus élevée a été observée (80% vs 12%; $p=0.011$) (*Behillil et al. Clin Infect Dis. 2019*).

6.1.2 CNR-HCL

Le programme de recherche de l'équipe VIRPATH du CIRI (Inserm U1111, CNRS 5308, ENS de Lyon, UCBL) dont le thème est de l'émergence au contrôle, 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, et le développement d'outils pour mieux comprendre l'évolution des virus et comment lutter à la fois avec de nouveaux antiviraux et de nouveaux vaccins. 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 les processus d'évolution des virus, du détournement des fonctions cellulaires au profit du virus, et enfin l'étude des altérations de la réponse immunitaire, en lien avec l'activation ou l'inactivation des récepteurs cellulaires. Ces différents programmes de recherche sont brièvement décrits ci-dessous. Par ailleurs, nous étudions l'évolution des virus et populations virales par des approches de métagénomique, des virus influenza, afin de faire des analyses de fitness des virus émergents.

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

La détermination des interactions entre les composants des RNP et entre RNP durant l'empaquetage 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 non seulement l'exposition des nucléotides à l'extérieur du couple ARN-NP, mais aussi l'existence de boucles ARN non recouverte de NP. Dès lors, même si les interactions entre les segments d'ARN restent imparfaitement élucidées, il a été démontré que, lors de l'empaquetage, se mettait en place un réseau d'interaction entre vRNP, probablement par interaction ARN-ARN entre ces boucles. Dans une première approche de cryo-tomo-électromicroscopie, nous avons pu décrire l'organisation interne de la particule virale. Puis, un réseau d'interactions entre segments d'ARN nus a été établi *in vitro*, donnant, pour H3N2, la structure putative du réseau, identifiant de plus les régions (boucles) 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 avons pu montrer 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 ces régions dites de « packaging », essentiellement les régions 5' non codantes des segments de gène, nous avons pu montrer que le réassortiment devenait plus facile, notamment entre virus d'origine humaine et aviaire. Une ANR (PsyFlu) visant à analyser en détail le réseau d'interaction pour les virus A/PR8 (H1N1) servant à préparer les virus réassortants vaccinaux est en phase finale. 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.

➤ **Axe2 : 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 surinfections 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 Panton-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). Par ailleurs, nous avons monté des modèles ex-vivo de reconstruction d'épithélium respiratoires permettant de faire les études de coopération virus bactérie (épithélium Mucilair® sur un système Vitrocell®). Enfin, dans le cadre d'un appel d'offre interne à CIRI et d'un second mené par l'IDEX université de Lyon, nous avons renforcé notre collaboration avec deux équipes de bactériologie (Staphylocoque et Légionelles) et une équipe de chimie de l'environnement (IRCE Lyon). Dans ce cadre, nous avons fait l'acquisition d'un système dit « lung-on-a-chip » reproduisant une alvéole pulmonaire fonctionnelle comportant un pseudo capillaire sanguin et une alvéole pulmonaire reconstruite en 3-D capable de reproduire les mouvements respiratoires. Avec ces deux modèles ex-vivo, nous allons étudier la coopération virus bactérie et les impacts sur les cellules de l'épithélium respiratoire, mais aussi regarder l'impact de la pollution (particules fines reconstruites) sur la capacité des cellules respiratoires à lutter contre l'infection virale (Projet Wanted).

- **Axe3 : Projets de recherche translationnelle ou appliquée en lien étroit 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 gènes 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 (Pichon et al).

Par l'épidémiologie moléculaire en approche dite de whole genome sequencing, il est aussi possible de détecter des virus d'intérêt portant des caractéristiques génétiques observées sur les protéines (HA, NA ou autre), soit des constellations de gènes (réassortants intra-sous-typiques) pouvant être associées à une virulence accrue (Simon B et al). Concomitamment, la masse d'information collectée par ces systèmes NGS permet de faire des études plus précises sur l'évolution des virus, et notamment sur la co-évolution des deux glycoprotéines de surface. En collaboration avec l'équipe de M Laessig (U Bonn, Germany), nous avons réalisé une analyse de l'épistasie HA-NA des virus H1N1 saisonniers dans le contexte de l'émergence de virus résistants à l'Oseltamivir, et nous avons montré que cette épistasie avait conduit à la sélection de clades génétiques mutuellement exclusifs ayant in fine induit l'apparition de la substitution H275Y.

De manière prospective, nous avons aussi regardé et confirmé que les virus H1N1pdm09 actuels ne présentaient pas un tel risque évolutif. Ce travail a été récemment confirmé par une autre équipe (Simon et al, soumis).

Antiviraux : marqueurs de résistance, nouveaux produits

Dans le cadre de la surveillance, un suivi étroit de la sensibilité aux antiviraux est réalisé, tant pour les INA que pour les inhibiteurs de la polymérase (Baloxavir-Marboxyl et Pimodivir). 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 glycoprotéines, et des méthodes de criblage rapide par mesure de réduction d'effet cytopathique en lecture automatisée sont en cours de développement (V Escuret).

Par ailleurs, des stratégies antivirales innovantes sont développées en lien avec l'équipe de recherche, utilisant des combinaisons d'antiviraux disponibles, ou testant des nouvelles molécules antivirales identifiées par une analyse de signatures transcriptomiques inverses (Pizzorno et al). A ce titre, des essais précliniques sur modèle animal et des essais cliniques de phase 2 sont en cours (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 (Gaymard et al, *J Antimicrob Chemother.* 2016).

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) (Gaymard et al, en préparation).

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

6.2.1 Publications nationales

Behillil S., Enouf V., van der Werf S. (2019) Virus, épidémies et réseaux de surveillance de la grippe. *Actualités pharmaceutiques*, sous presse

Equipes de surveillance de la grippe* (2019) Surveillance de la grippe en France, Saison 2018-2019, *Bull Epidémiol Hebd* ; sous presse

van der Werf S., Morfin F., Lina B. (2018) « Virus de la grippe ». In : *REMIC v6.1, Société Française de Microbiologie Ed, ch87*

Janin H, Vilain Parce A, Kaminski H, Valette M., Cazanave C. [The 2015-2016 influenza epidemic: Late onset, clinical severity and emergence of the B Victoria virus]. *Med Mal Infect.* 2018 Feb;48(1):73-74.

Gaymard A, Frobert E, Lina B., Escuret V. (2017) Infections humaines par les virus influenza A (H7N9) : émergence des virus, évolution et risque pandémique. *Virologie*, 2017, 21(6) :255-264

Equipes de surveillance de la grippe* (2018) Surveillance de la grippe en France, Saison 2017-2018, *Bull Epidémiol Hebd* ; 34 : 664-673

Lina B Clinique et diagnostic de la grippe saisonnière (2019) *Actualités pharmaceutiques*, sous presse

Lina B. Thérapeutique et vaccination antigrippale (2019) *Actualités pharmaceutiques*, sous presse

Lina B., Boivin G. Nouvelles modalités vaccinales et thérapeutiques pour les virus influenza. (2019) *Virologie*, sous presse

Lina B. Grippe. EMC – *Savoirs et soins infirmiers* (MAJ Traité).

Pichon M, Pelissier R, Valette M., Lina B., Josset L. Diversité génomique virale : évaluation et conséquences sur la virulence des infections respiratoires, *Virologie*, 2018, 22(3) : 173-182 (IF : 0.1)

Pichon M, Lina B., Josset L. Caractérisation et impact du microbiote bactérien respiratoire sur les maladies virales. *Virologie*, 2018 ; 22(3) :161-172 (IF : 0.1)

Lina B. Lutte contre le fléau grippal : tous concernés. *Revue du Praticien Médecine Générale*, 2018 ; 32 (1010) 765-6

Pichon M, Gaymard A, Bouscambet M., Lina B. Influenza virus. *Traité de Virologie Médicale*, Thomas Mourez, Sonia Burrel, David Boutolleau, Sylvie Pillet eds, SFM 2019

Josset L. Place du Virome au sein du microbiome. *Traité de Virologie Médicale*, Thomas Mourez, Sonia Burrel, David Boutolleau, Sylvie Pillet eds, SFM, 2019

6.2.2 Publications internationales

Choi SG, Olivet J, Cassonnet P, Vidalain PO, Luck K, Lambourne L, Spirohn K, Lemmens I, Dos Santos M, Demeret C, Jones L, Rangarajan S, Bian W, Coutant EP, Janin YL, van der Werf S, Trepte P, Wanker EE, De Las Rivas J, Tavernier J, Twizere JC, Hao T, Hill DE, Vidal M, Calderwood MA, Jacob Y. Maximizing binary interactome mapping with a minimal number of assays. *Nat Commun*. 2019 Aug 29;10(1):3907. doi: 10.1038/s41467-019-11809-2.

Behillil S*, May F*, Fourati S, Luyt C-E, Chicheportiche T, Sonnevile R, Tandjaoui-Lambiotte Y, Roux D, Guérin L, Mayaux J, Maury E, Ferré A, Georger J-F, Voiriot G, Enouf V, van der Werf S, Mekontso Dessap A, de Prost N. Oseltamivir resistance in severe influenza A(H1N1)pdm09 pneumonia and acute respiratory distress syndrome: a French multicenter observational cohort study. *Clin Infect Dis*, 2019 Sep 20. pii: ciz904. doi: 10.1093/cid/ciz904. [Epub ahead of print] (* co-first authors)

Loubet P, Enouf V, Launay O. The risk of a swine influenza pandemic: still a concern? *Expert Rev Respir Med*. 2019 Jul 24:1-3.

Chastagner A*, Enouf V*, Peroz D, Hervé S, Lucas P, Quéguiner S, Gorin S, Beven V, Behillil S, Leneveu P, Garin E, Blanchard Y, van der Werf S, Simon G. (2019) Bidirectional Human–Swine Transmission of Seasonal Influenza A(H1N1)pdm09 Virus in Pig Herd, France, 2018. *Emerg Infect Dis*. 2019 Oct;25(10):1940-1943. doi: 10.3201/eid2510.190068. (* co-first authors)

Filippone C, Castel G, Murri S, Ermonval M, Korva M, Avšič-Županc T, Sironen T, Vapalahati O, McElhinney LM, Ulrich RG, Groschup MH, Caro V, Sauvage F, van der Werf S, Manuguerra JC, Gessain A, Marianneau P, Tordo N. Revisiting the genetic diversity of emerging hantaviruses circulating in Europe using a pan-viral resequencing microarray. *Sci Rep*. 2019 Aug 27;9(1):12404. doi: 10.1038/s41598-019-47508-7.

Choi SG, Olivet J, Cassonnet P, Vidalain P-O, Luck K, Lambourne L, Spirohn K, Lemmens I, Dos Santos M, Demeret C, Jones L, Rangarajan S, Bian W, Coutant EP, Janin YL, van der Werf S, De Las Rivas J, Tavernier J, Twizere J-C, Hao T, Hill DE, Vidal M, Calderwood MA, Jacob Y. [Towards an "assayome" for binary interactome mapping](#) (2019) *bioRxiv* 530790; doi:10.1101/530790

Gonçalves E, Bonduelle O, Soria A, Loulergue P, Rousseau A, Cachanado M, Bonnabau H, Thiebaut R, Tchitchek N, Behillil S, van der Werf S, Vogt A, Simon T, Launay O, Combadière B. (2019) Innate gene signature distinguishes humoral versus cytotoxic responses to influenza vaccination. *The Journal of Clinical Investigation*, Mar 7;129(5):1960-1971.

Souty C, Masse S, Valette M, Behillil S, Bonmarin I, Pino C, Turbelin C, Capai L, Vilcu AM, Lina B, van der Werf S, Blanchon T, Falchi A, Hanslik T. (2019) [Baseline characteristics and clinical symptoms related to respiratory viruses identified among patients presenting with influenza-like illness in primary care](#). *Clin Microbiol Infect*. 2019 Sep;25(9):1147-1153.

Souty C, Amoros P, Falchi A, Capai L, Bonmarin I, van der Werf S, Masse S, Turbelin C, Rossignol L, Vilcu AM, Lévy-Bruhl D, Lina B, Minodier L, Dorléans Y, Guerrisi C, Hanslik T, Blanchon T. (2019) [Influenza epidemics observed in primary care from 1984 to 2017 in France: A decrease in epidemic size over time](#). *Influenza Other Respir Viruses*. 2019 Mar;13(2):148-157.

Barbezange C, Jones L, Blanc H, Isakov O, Celniker G, Enouf V, Shomron N, Vignuzzi M*, van der Werf S.* (2018) Seasonal Genetic Drift of Human Influenza A Virus Quasispecies Revealed by Deep Sequencing. *Front Microbiol*. 2018 Oct 31;9:2596 (* co-last authors)

Kissling E, Valenciano M, Pozo F, Vilcu AM, Reuss A, Rizzo C, Larrauri A, Horváth JK, Brytting M, Domegan L, Korczyńska M, Meijer A, Machado A, Ivanciuc A, Višekruna Vučina V, van der Werf S, Schweiger B, Bella A, Gherasim A, Ferenczi A, Zakikhany K, O'Donnell J, Paradowska-Stankiewicz I, Dijkstra F, Guiomar R, Lazar M, Kurečić Filipović S, Johansen K, Moren A; I-MOVE/I-MOVE+ study team. (2018) [2015/16 I-MOVE/I-MOVE+ multicentre case-control study in Europe: Moderate vaccine effectiveness estimates against influenza A\(H1N1\)pdm09 and low estimates against lineage-mismatched influenza B among children](#). *Influenza Other Respir Viruses*. 2018 Jul;12(4):423-437

Lefeuve C, Behillil S, Triau S, Monteiro-Rodrigues A, Templier F, Tran CT, Le Guillou-Guillemette H, Lunel-Fabiani F, Enouf V, Ducancelle A. (2018) [Fatal Myopericarditis Following an Influenza A \(H3N2\) Infection](#). *Am J Case Rep*. 2018 May 8;19:540-544

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. (2018) 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.* 2018 Apr;24(4):431

Domenech de Cellès M, Arduin H, Varon E, Souty C, Boëlle PY, Lévy-Bruhl D, van der Werf S, Soulayr J-C, Guillemot D, Watier L, Opatowski L (2018) Characterizing and Comparing the Seasonality of Influenza-Like Illnesses and Invasive Pneumococcal Diseases Using Seasonal Waveforms. *Am J Epidemiol*, 187(5):1029-1039.

Lekana-Douki SE, Behillil S, Enouf V, Leroy EM, Berthet N. (2018) [Detection of human bocavirus-1 in both nasal and stool specimens from children under 5 years old with influenza-like illnesses or diarrhea in Gabon.](#) *BMC Res Notes.* 2018 Jul 20;11(1):495.

Droz N, Enouf V, Bidet P, Mohamed D, Behillil S, Simon AL, Bachy M, Caseris M, Bonacorsi S, Basmaci R. (2018) [Temporal Association Between Rhinovirus Activity and Kingella kingae Osteoarticular Infections.](#) *J Pediatr.* 2018 Jan;192:234-239.e2.

Nicolas de Lamballerie C, Pizzorno A, Dubois J, Julien T, Padey B, Bouveret M, Traversier A, Legras-Lachuer C, Lina B, Boivin G, Terrier O, Rosa-Calatrava M. Characterization of cellular transcriptomic signatures induced by different respiratory viruses in human reconstituted airway epithelia. *Sci Rep.* 2019 Aug 7;9(1):11493.

Simon B, Pichon M, Valette M, Burfin G, Lina B, Josset L. Whole genome sequencing of A(H3N2) influenza viruses reveals variants associated with severity during the 2016-2017 season, *Viruses*, 2019 Jan 28;11(2). (IF 3.7)

Dubois J, Traversier A, Julien T, Padey B, Lina B, Bourdon JC, Marcel V, Boivin G, Rosa-Calatrava M, Terrier O. The non-structural NS1 protein of influenza viruses modulates TP53 splicing through the host factor CPSF4, *J Virol.* 2019 Mar 21;93(7). (IF 4.36)

Pizzorno A, Terrier O, Nicolas de Lamballerie C, Julien T, Padey B, Traversier A, Roche M, Hamelin ME, Rhéaume C, Croze S, Escuret V, Poissy J, Lina B, Legras-Lachuer C, Textoris J, Boivin G, Rosa-Calatrava M. Repurposing of drugs as novel influenza inhibitors from clinical gene expression infection signatures. *Frontiers in Immunology*, 2019, Jan 29;10:60. (IF 5.51)

Dahdal S, Saison C, Valette M, Bachy E, Pallet N, Lina B, Koenig A, Monneret G, Defrance T, Morelon E, Thaunat O. Residual Activatability of Circulating Tfh17 Predicts Humoral Response to Thymodependent Antigens in Patients on Therapeutic Immunosuppression. *Frontiers in Immunology.* 2019 Feb 5;9:3178.(IF 5.51)

Del Campo J, Pizzorno A, Djebali S, Bouley J, Haller M, Pérez-Vargas J, Lina B, Boivin G, Hamelin ME, Nicolas F, Le Vert A, Leverrier Y, Rosa-Calatrava M, Marvel J, Hill F. OVX836 a recombinant nucleoprotein vaccine inducing cellular responses and protective efficacy against multiple influenza A subtypes. *NPJ Vaccines.* 2019 Jan 23;4:4. (IF 3.14)

Pichon M, Gaymard A, Zamolo H, Bazire C, Valette M, Sarkozy F, Lina B. Web-based analysis of adherence to influenza vaccination among French healthcare workers. *J Clin Virol.* 2019 Apr 28;116:29-33.(IF 3.1) (PM & AG co-first)

Jeannoël M, Lina G, Rasigade JP, Lina B, Morfin F, Casalegno JS. Microorganisms associated with respiratory syncytial virus pneumonia in the adult population. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019 Jan;38(1):157-160 (IF 2.5)

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. Implementation of Alere i Influenza A & B point of care test for the diagnosis of influenza in an ED. *Am J Emerg Med.* 2018 Jun;36(6):916-921 (IF 1.29)

Pichon M, Picard C, Simon B, Gaymard A, Renard C, Massenavette B, Malcus C, Monneret G, Morfin-Sherpa F, Valette M, Javouhey E, Millat G, Lina B, Josset L, Escuret V. Clinical management and viral genomic diversity analysis of a child's influenza A(H1N1)pdm09 infection in the context of a severe combined immunodeficiency. *Antiviral Research*, 2018, 160:1-9 (IF 4.3)

Bal A, Pichon M, Picard C, Casalegno JS, Valette M, Schuffenecker I, Billard L, Vallet S, Vilchez G, Cheynet V, Oriol G, Trouillet-Assant S*, Gillet Y, Lina B, Brengel-Pesce K, Morfin F, Josset L. Quality control implementation for universal characterization of DNA and RNA viruses in clinical respiratory

samples using single metagenomic next-generation sequencing workflow. *BMC Infect Dis*. 2018 Oct 29;18(1):537 (IF 2.6)

Lina B, Boucher C, Osterhaus A, Monto AS, Schutten M, Whitley RJ, Nguyen-Van-Tam JS. Five years of monitoring for the emergence of oseltamivir resistance in patients with influenza A infections in the Influenza Resistance Information Study. *Influenza Other Respir Viruses*. 2018 Mar;12(2):267-278 (IF 2.9)

Kramer R, Duclos A, The VRS study group in Lyon, Lina B, Casalegno JS. Cost and burden of RSV related hospitalisation from 2012 to 2017 in the first year of life in Lyon, France. *Vaccine*, 2018 Oct 29;36(45):6591-6593. (IF 3.3)

Roussel M, Pontier D, Cohen JM, Lina B, Fouchet D. Linking influenza epidemic onsets to covariates at different scales using a dynamical model. *PeerJ*. 2018 Mar 8;6:e4440 (IF 2.2)

Gaymard A, Bouscambert-Duchamp M, Pichon M, Frobert E, Vallee J, Lina B, Casalegno JS, Morfin F. Genetic characterization of respiratory syncytial virus highlights a new BA genotype and emergence of the ON1 genotype in Lyon, France, between 2010 and 2014. *J Clin Virol*. 2018 May;102:12-18 (IF 3.1)

Jeannoel M, Casalegno JS, Ottmann M, Badiou C, Dumitrescu O, Lina B, Lina G. Synergistic Effects of Influenza and Staphylococcus aureus Toxins on Inflammation Activation and Cytotoxicity in Human Monocytic Cell Lines. *Toxins (Basel)*. 2018 Jul 11;10(7). pii: E286. (IF 3.2)

Ferraris O, Casalegno JS, Frobert E, Bouscambert-Duchamp M, Valette M, Jacquot F, Raoul H, Lina B, Ottmann M. The NS Segment of H1N1pdm09 Enhances H5N1 Pathogenicity in a Mouse Model of Influenza Virus Infections. *Viruses*. 2018 Sep 17;10(9) (IF 3.7)

Pizzorno A, Dubois J, Machado D, Cartet G, Traversier A, Julien T, Lina B, Bourdon JC, Rosa-Calatrava M, Terrier O. Influenza A viruses alter the stability and antiviral contribution of host E3-ubiquitin ligase Mdm2 during the time-course of infection. *Sci Rep*. 2018 Feb 27;8(1):3746 (IF 4.1)

Lina B. I (Influenza) will be back! *Anaesth Crit Care Pain Med*. 2018, Feb;37(1):9-10. (IF 2.2)

Participation à publication – Liste de publiants :

✓ *The European Influenza Surveillance Network*

Segaloff H, Melidou A, Adlhoch C, Pereyaslov D, Robesyne E, Penttinen P, Olsen SJ; *Who European Region And The European Influenza Surveillance Network*. [Co-circulation of influenza A\(H1N1\)pdm09 and influenza A\(H3N2\) viruses, World Health Organization \(WHO\) European Region, October 2018 to February 2019](#). *Euro Surveill*. 2019 Feb;24(9).

Adlhoch C, Snacken R, Melidou A, Ionescu S, Penttinen P. Dominant influenza A(H3N2) and B/Yamagata virus circulation in EU/EEA, 2016/17 and 2017/18 seasons, respectively. *Euro Surveill* mars 2018, 23(13)

Broberg EK, Waris M, Johansen K, Snacken R, Penttinen P. Seasonality and geographical spread of respiratory syncytial virus epidemics in 15 European countries, 2010 to 2016. *Euro Surveill* février 2018, 23(5)

Melidou A, Broberg E. Erratum to "Predominance of influenza A(H3N2) virus genetic subclade 3C.2a1 during an early 2016/17 influenza season in Europe – Contribution of surveillance data from World Health Organization (WHO) European region to the WHO vaccine composition consultation for northern hemisphere 2017/18. [*Vaccine* 35 (2017) 4828-4835] *Vaccine* 2018, 36(19), 2740-2741

✓ *I-Move/I-Move+* :

Kissling E, Rose A, Emborg H-D, Gherasim A, Pebody R, Pozo F, Trebbien R, Mazagatos C, Whitaker H, Valenciano M, [European IVE group](#). Interim 2018/19 influenza vaccine effectiveness: six European studies, October 2018 to January 2019. *Euro Surveill*. 2019;24(8):pii=1900121.

Rondy M, Kissling E, Emborg HD, Gherasim A, Pebody R, Trebbien R, Pozo F, Larrauri A, McMenemy J, Valenciano M; I-MOVE/I-MOVE+ group. [Interim 2017/18 influenza seasonal vaccine effectiveness: combined results from five European studies](#). *Euro Surveill*. 2018 Mar;23(9).

6.2.3 Communications¹ Internationales

Casalegno JS. Use of existing hospital databases and specimens to set up a local RSV surveillance system in order to identify at risk population. Expert Meeting on a platform for biomarker-based surveillance in communities to guide disease control interventions – Mérieux Foundation USA, 25–27 juillet 2018, Les Pensières Center for Global Health, Annecy

Benet T, Valette M, Amour S, Aho-Glele S, Berthelot P, Grando J, Landelle C, Lina B, Vanhems P, and AFP Group. Incidence of symptomatic and asymptomatic influenza among healthcare workers: a multicentre prospective cohort study. Présentation Orale, IDWeek 2018, 3-7 octobre, San Francisco (USA).

Bouscambert-Duchamp M, Valette M, Lina B. Evaluation of the Filmarray Biofire RP2plus sensitivity for MERS-CoV detection and clinical impact of its use in comparison with non automated screening PCRs. 28th ECCMID, 21-24 avril, Madrid (Espagne)

Bal. A., Cheynet V., Sarkozy C., Oriol G., Becker J., Vilchez G., Guichard A., Trouillet-Assant S., Sesques P., Pichon M., Mallet F., Ader F., Lina B., Josset L., Morfin F., Reynier F., Salles G., Brengel-Pesce K. Blood viral metagenomic monitoring of autologous stem cell transplant recipients: a prospective case-control study, 2015-2017, Lyon, France. Communication Orale. 28th ECCMID, 21th-24th April 2018, Madrid, Espagne.

Pichon M., Balandine A., Valette M., Schuffenecker I., Morfin F., Lina B., Billaud G. Evaluation of Panther Fusion® Respiratory kit in a hospitalized population. Communication Orale. 21th Annual Meeting of the European Society of Clinical Virology. September, 24th-26th 2018, Athens, Greece

Bal. A., Cheynet V., Sarkozy C., Oriol G., Becker J., Vilchez G., Guichard A., Trouillet-Assant S., Sesques P., Pichon M., Mallet F., Ader F., Lina B., Josset L., Morfin F., Reynier F., Salles G., Brengel-Pesce K. Blood viral metagenomic monitoring of autologous stem cell transplant recipients: a prospective case-control study, 2015-2017, Lyon, France. Communication Orale. 28th ECCMID, 21th-24th April 2018, Madrid, Espagne.

Simon B, Pompei S, Pichon M, Gaymard A, Casalegno JS, Ruchnewitz D, Escuret V, Luksza M, Violot S, Josset L, Lässig M, Lina B. HA – NA Epistasis contributed to the emergence of the seasonal oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) virus (2006-2007). Options for the Control of Influenza X, 28 august-1st septembre 2019, Singapore

Lina B, Paget J, Andrew MK, Ferdinands J, Feng L, Ortiz JR, Danilenko D, Lopes-Labrador X, Reiner Jr RC, Nunes MC, Commaille-Chapus C, El Guerche-Seblain C. Developments of the Global Hospital Influenza Surveillance Network to support better monitoring of influenza virus genetic evolutions: the GIHSN- SevVIR Network Options for the Control of Influenza X, 28 august-1st septembre 2019, Singapore

6.2.4 Communications Nationales sur invitation et présidence de sessions

van der Werf S. Unit of Molecular Genetics of RNA Viruses and National Reference Center, Journées du Département de Virologie de l'Institut Pasteur, 5-7 juin 2019, Maintenon

van der Werf S. Communication « La Vaccination Introduction » et animation de la table ronde, session « Vaccination », Congrès SPOT-Pharma, 7 décembre 2018, Cité Internationale Universitaire, Paris.

van der Werf S. Analyse préliminaire de la charge virale dans les prélèvements en ambulatoire et à l'hôpital en fonction des saisons et des virus. Séminaire scientifique sur la grippe, 19 octobre 2018, SpF, Saint-Maurice.

van der Werf S. Modérateur session "Infections à RSV", Journées Francophones de Virologie. 22-23 mars 2018, Paris.

Enouf V. Évolution épidémiologique des virus grippaux, JNI, Lyon 4 et 5 juin 2019

Enouf V. Surveillance de la grippe, Salon des séniors, Paris Porte de Versailles, 3 avril 2019

Enouf V. La grippe sous haute surveillance, université ouverte de l'Université de Franche comté, Lure, 15 novembre 2018

Enouf V. Séquençage de nouvelle génération, organisation pasteurienne, routine en Santé Publique. Séminaire scientifique grippe SpF, 19 octobre 2019

Enouf V. Surveillance de la grippe, Quart d'heure Pasteur-Médecine, Institut Pasteur Paris, 10 octobre 2018

Enouf V. Surveillance de la grippe, cycle conférences grand public Pasteur, 2 octobre 2018

Lina B. Vaccination du personnel soignant, JNI, Lyon 4 et 5 juin 2019

Lina B. Module de e-learning pour convaincre les soignants à la vaccination contre la grippe, SF2H, Strasbourg le 5 juin 2019

Lina B. Evolution du virus grippal, Journées Francophones de Virologie, Lyon, 29 mars 2019

Lina B. Les défis de la vaccination contre la grippe, Congres de la SFM, Paris 2 octobre 2018

Lina B. Aspects thérapeutiques et antiviraux, RICAI, Paris 22 decembre 2018

Lina B. Intérêt du WGS pour la surveillance de la grippe. Séminaire scientifique de Santé publique France 19 octobre 2018

Hénaff L, Martin-Gaujard G, Comte B, Ecuret V, Régis C, Dananché C, Marion E, Amour S, Lina B, Vanhems P. La grippe nosocomiale dans un service de gériatrie à l'hôpital Edouard Herriot, Lyon (France) : surveillance de 12 saisons grippales (2004-2017). 38e journées annuelles de la société française de gériatrie et gérontologie, 26-28 novembre, Paris

6.2.5 Communications Internationales sur invitation et présidence de sessions

van der Werf S. Chair session III "Other studies". I-MOVE 12th annual meeting, 17-20 June 2019, Veyrier du Lac, France

van der Werf S. Chair session "Virus Diversity". Symposium Influenza 2018: Centenary of the 1918 Pandemic, 24-26 June 2018, Francis Crick Institute, London, UK

van der Werf S. Can new therapeutics and vaccines reduce risks associated with influenza pandemics? Emerging Infections and Pandemic Risk Conference. Invited oral presentation and contribution to Round Table on Pandemics Impact – 22 June, 2018, Paris

Lina B. HCW and influenza vaccination, invitation ESCV Workshop, Freiburg 4 avril 2019

Lina B. Using Influenza Whole Genome Sequencing (WGS) for a better understanding and monitoring of virus pathogenesis, evolution and immune escape, invitation 9th GHISN meeting, Paris, 15 oct 2018

Lina B. Sequencing Severe Cases of Hospitalised Influenza (Lyon) and GISHN, invitation GIRI meeting, Singapour 26-27 aout 2019,

Lina B. RSV Passive Immunity, invitation GIRI meeting, Singapour 26-27 aout 2019,

Lina B. Chair Session 2B: Influenza, 5th European Congres of Virology, Rotterdam 28 avril -1er mai 2019

6.2.6 Comité scientifique ou d'organisation de congrès ou colloques

- Journées du Département de Virologie de l'Institut Pasteur, 5-7 juin 2019, Maintenon (S. van der Werf)
- Rencontres sur la grippe, GEIG, Paris, Novembre 2018 (B. Lina, S. van der Werf)
- Suivi du « Study Group on respiratory viruses (ESGREV) » lors du meeting ESCMID de Amsterdam en avril 2019 (Chrysanthi Skevaki & B Lina)

7 Coopération avec les laboratoires de santé animale

Cette saison aucune coopération n'a semblé nécessaire entre les laboratoires de santé animale et le CNR-IPP.

8 Programme d'activité pour l'année 2019-2020

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. Un renforcement de la surveillance des virus respiratoires, notamment VRS, dans les EPHAD sera réalisé en lien avec SpF pour la saison prochaine.

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 continuera à être mis 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 dont la mise en place a été initiée avec plusieurs CHU de métropole au cours de la saison hivernale 2017-2018, reconduite l'année suivante (hiver 2018-2019) et les résultats de l'analyse seront présentés lors de la RICAI en décembre 2019. En parallèle, comme par le passé et selon les besoins, les techniques de détections rapides 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 le cas échéant 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) puis communiquée par une publication en français (feuilles de Biologie par exemple). Ces évaluations seront faites à la demande de la DGS, conjointement avec l'ANSM si une analyse exhaustive des dispositifs commercialisés en France est demandée.

➤ **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, ELISA, mesure de l'activité neuraminidase, test munana) 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. Le CNR-IPP s'attachera à renforcer ses partenariats avec des laboratoires hospitaliers proches (e.g. Pr Elyane Gault, Ambroise Paré) qui sont en capacité de réaliser cet isolement et/ou de fournir des prélèvements frais.

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).

Le CNR-HCL maintiendra aussi ses capacités d'isolement viral pour les parainfluenzavirus (1-4), les metapneumovirus, les adenovirus, les coronavirus et les rhinovirus. A ce titre, il pourra fournir des représentants de ces virus aux laboratoires demandeurs, accompagnés des procédures permettant leur isolement (SOP).

➤ **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, peramivir) sera réalisée par test fluorimétrique. Des tests d'inhibition de la multiplication virale ou de réduction de plage seront mis en œuvre si besoin pour évaluer la sensibilité à d'autres antiviraux (Favipiravir, Pimodivir, Baloxavir-Marboxyl) dont la cible est différente (polymérase).

Pour ces antiviraux ciblant la polymérase, Le CNR-IPP évaluera la performance de tests de transcription/réplication de mini-génomés doté d'un rapporteur luciférase comme alternative aux tests d'inhibition de la multiplication virale. Des méthodes rapides d'introduction des mutations dans les gènes ciblés par les antiviraux seront développées afin de permettre l'évaluation de l'impact des variations génétiques sur la sensibilité à ces antiviraux en absence d'isolement viral dans le cadre de la surveillance. Une collection de virus de

référence porteurs des mutations connues de réduction de la sensibilité à ces antiviraux sera développée par génétique inverse.

L'arrivée future d'antiviraux anti-VRS implique le besoin de méthodes d'évaluation de l'efficacité de molécules antivirales, la recherche de substitutions associées à la résistance ainsi que la caractérisation des conséquences de ces substitutions sur la sensibilité des souches virales. Pour cela, des tests phénotypiques seront réalisés en présence de concentrations croissantes d'antiviraux (inhibiteurs de fusion et de polymérase). L'inhibition de la réplication virale sera évaluée au CNR -IPP par la réduction de plages de lyse (souche VRS-18, souches cliniques) en présence de différentes concentrations d'antiviraux. Un set de virus de référence porteurs de mutations associées à la résistance sera développé par génétique inverse. Parallèlement, le CNR-IPP développera des tests phénotypiques d'inhibition ne nécessitant pas le recours à l'isolement viral. Pour les inhibiteurs de la polymérase l'activité de antivirale sera évaluée par mesure de l'activité luciférase d'un mini-génome VRS et pour les inhibiteurs de la fusion par un test de fusion reposant sur l'activation d'un gène rapporteur.

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. A noter que les procédures de séquençage direct sur échantillon ont été échangées entre les deux laboratoires pour optimiser et harmoniser les méthodes. Le séquençage sera réalisé directement à partir de prélèvements dont la charge virale est suffisante (en général CT autour de 32 pour virus de type A et 30 pour virus de type B) 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+ (CNR-IPP). Par ailleurs, on s'attachera à réaliser en priorité le séquençage des prélèvements de cas graves (détection de mutations associées à la virulence), d'échec thérapeutique (détection de mutations de résistance aux antiviraux), ou d'échec vaccinal (détection de mutations d'échappement à la réponse immunitaire). Afin d'améliorer l'exhaustivité de la détermination des sous-types ou lignages des virus détectés dans les formes sévères rapportées par les laboratoires du réseau RENAL, un circuit de recueil des échantillons sera mis en place en lien avec SpF en cohérence avec la modification de la surveillance des formes graves qui ne visera plus à l'exhaustivité mais s'appuiera sur une sélection représentative de services de réanimation.

Les optimisations méthodologiques auront pour objectif d'abaisser encore 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'émergence 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, l'optimisation du protocole de NGS virome par séquençage haut-débit sans a priori permettant 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 (Bal A et al, 2019). Les données et outils de génotypage des rhinovirus seront partagés avec le CNR des enterovirus (CNR coordonnateur à Lyon) qui

réalise déjà de nombreuses identifications par génotypage. Les performances du séquençage de type « long reads » qui permet d'évaluer l'association de mutations seront explorées au CNR-IPP et au CNR-HCL, notamment avec la technologie MinION.

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. A noter que le CNR-HCL développe actuellement différents tests de type ELISA pour la détermination des profils sérologiques au cours des infections à VRS chez le nouveau-né et le très jeune enfant. Ces home-brew tests sont réalisés à partir de protéines recombinantes fournies par l'équipe de JF Elouet (INRA).

➤ **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 pour adapter les modalités du recueil de données et de prélèvements pour une meilleure surveillance des VRS (et des 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 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). Une nouvelle réunion d'échange avec l'ensemble des laboratoires du réseau RENAL sera organisée. Par ailleurs, les efforts pour développer un sous-réseau plus spécifiquement en charge de l'isolement des VRS seront poursuivis.

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.

➤ **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 dans le cadre du LREMS de l'Institut Pasteur, les CNR-IPP et -IPG, bénéficient d'ores et déjà d'une accréditation pour une partie des méthodes de détection.

Par ailleurs, dans le cadre de l'accréditation LBBMS des HCL, le CNR-HCL bénéficie d'une accréditation partielle pour la détection des virus (ligne d'accréditation ouverte pour la culture des virus et la détection moléculaire) et pour les tests IHA

➤ **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, ANSM etc...) son expertise dans le domaine de la prévention et du contrôle de la grippe, du VRS, des virus influenza aviaries du MERS-CoV, 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 1 & 2

2019

**Centre national de référence
virus des infections
respiratoires (dont la grippe)**

**Saison
2018-2019**

Sommaire

1	Annexe 1 : missions et objectifs	4
1.1	Missions du CNR et de ses laboratoires associés	4
1.2	Organisation du CNR et de ses laboratoires associés.....	6
1.3	Locaux et équipements.....	8
1.4	Collections de matériel biologique	14
1.5	Démarche qualité du laboratoire	17
2	Annexe 2 : capacités techniques du CNR.....	20
2.1	Liste des techniques de référence	20
2.1.1	Techniques de détection.....	20
2.1.2	Techniques d'isolement	22
2.1.3	Techniques d'identification.....	22
2.1.4	Caractérisation génétique des virus influenza	22
2.1.5	Techniques sérologiques.....	23
2.1.6	Caractérisation phénotypique des virus grippaux	23
2.2	Liste des techniques recommandées par le CNR	23
3	Annexe 3 : autres informations	24

1 Annexe 1 : missions et objectifs

1.1 Missions du CNR et de ses laboratoires associés

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(H5Nx), 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 Nord - 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 no 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 influenza, 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 œuvre les techniques de sous-typage des virus de la grippe ;
- en contribuant à l'analyse virologique des épisodes respiratoires dans les EHPAD ; le diagnostic virologique permet d'identifier le virus responsable de l'épidémie : virus grippal ou autre virus respiratoire (VRS, Rhinovirus ...)
- en assurant la disponibilité de données de typage des virus responsables de cas graves, d'épidémies en collectivités de personnes âgées ;
- en réalisant des analyses génomiques des virus responsables de cas graves, de foyers épidémiques ;
- 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.

1.2 Organisation du CNR et de ses laboratoires associés

➤ 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	0,80
BEHILLIL	Sylvie	Responsable adjoint	PharmD	IP, Paris	1,0
BARBET	Marion	Technicien supérieur		IP, Paris	1,0
BRUN	Solenne	Technicien supérieur		IP, Paris	1,0
LAZZERINI	Marie	Technicien supérieur		IP, Paris	1,0
ALBERT	Mélanie	Technicien supérieur		IP, Paris	0,5
DONATI	Flora	Ingénieure		IP, Paris	1,0
POSTE	Isabelle	Assistante		IP, Paris	0,4

➤ **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 PA	Pharm; PhD	HCL	0,8
BOUSCAMBERT	Maude	PH	Pharm; PhD	HCL	0,1
ESCURET	Vanessa	MCU-PH	Pharm; PhD	HCL & UCBL	0,1
CASALEGNO	Jean-Sébastien	MCU-PH	Méd; PhD	HCL & UCBL	0.05
BURFIN	Gwendolyne	Technicien titulaire		HCL	0,8
FANGET	Rémi	Technicien titulaire		HCL	0,8
SOCRATOUS	Clio	Technicien titulaire		HCL	0.8
OMBOODOI-LAFAYE	Nomin	Technicien contractuel		HCL (contrat recherche)	1
DIENY BARRET	Chanel	Technicien contractuel		HCL (contrat recherche)	1
SERVAIS	Marie-Claire	Secrétaire médicale		HCL	0.4

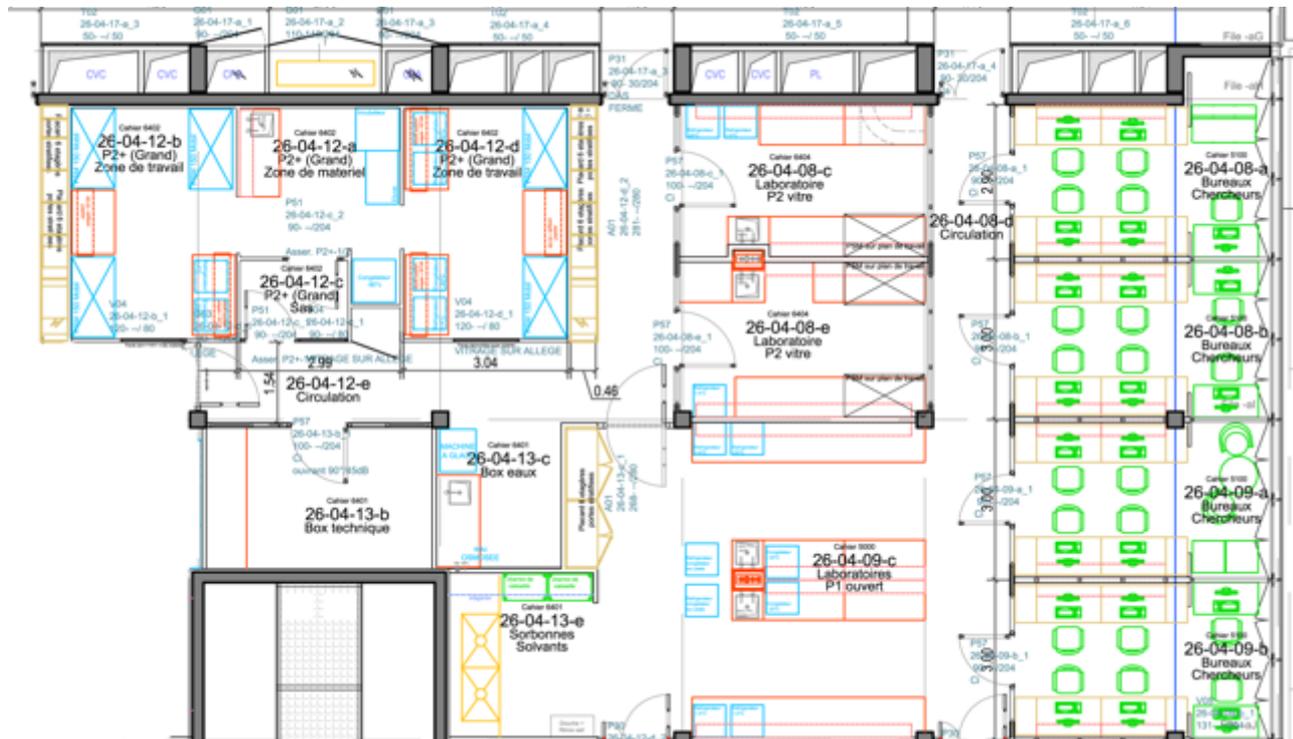
➤ **CNR-IPG**

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

1.3 Locaux et équipements

➤ CNR-IPP

Centre François Jacob / étage 4



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

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.

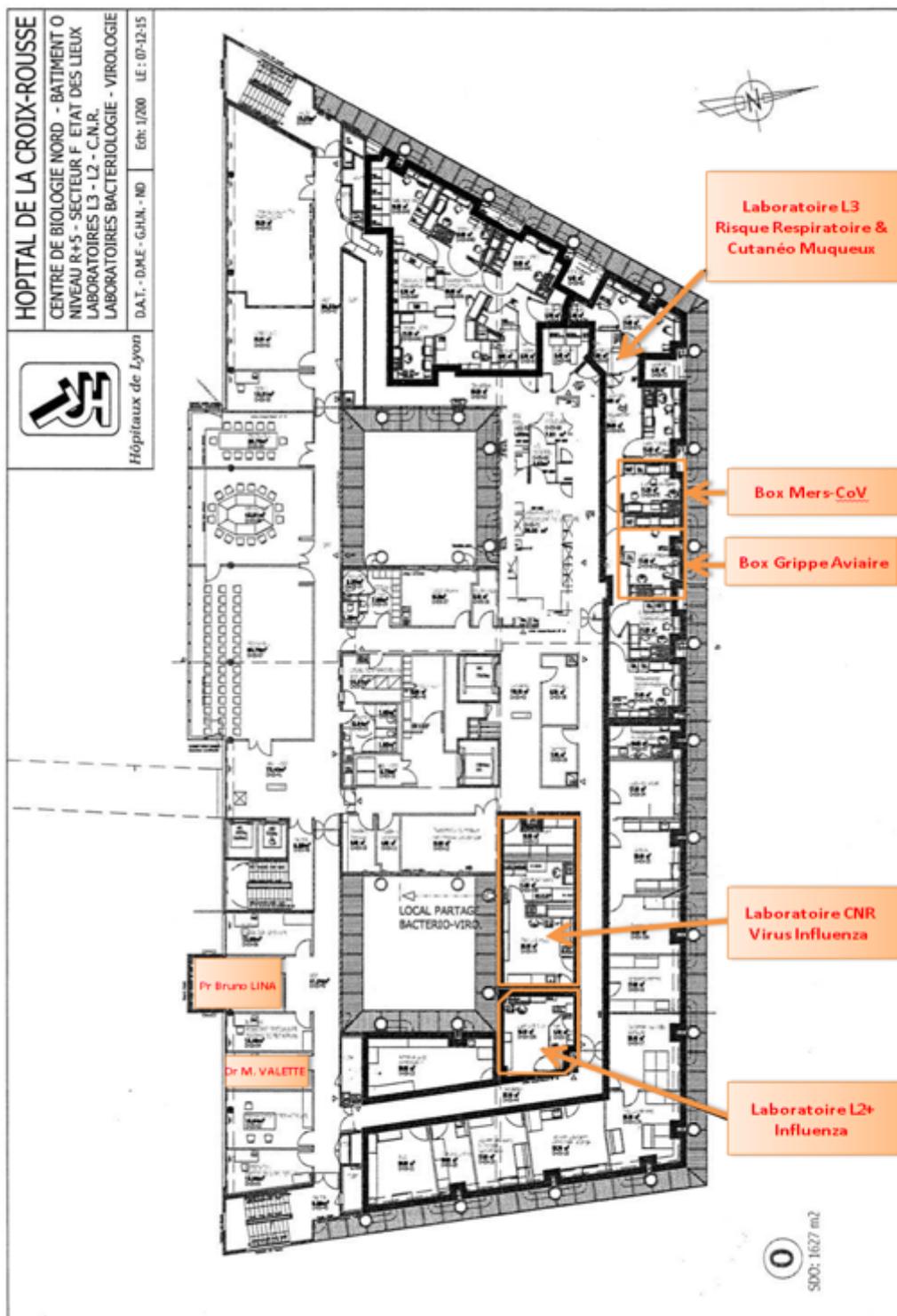
Les principaux équipements utilisés par le CNR-IPP sont les suivants :

Qtité	Désignation	Utilisation
10	POSTE de SECURITE MICROBIOLOGIQUE	partagés
9	POMPE A VIDE	partagées
4	MICROCENTRIFUGEUSE	partagées
5	CENTRIFUGEUSE REFRIGEREE	partagées
8	RERIGERATEUR +4°C	partagées
2	RERIGERATEUR/CONGEL	
10	CONGELATEUR -20°C	partagés
8	CONGELATEUR -80°C	partagés
2	CONTAINER D'AZOTE LIQUIDE	
5	INCUBATEUR A CO2	partagés
1	LECTEUR DE MICROPLAQUES	partagés
1	LAVEUR DE MICROPLAQUES	partagés
1	INCUBATEUR SANS CO2	
2	THERMOMIX	
13	AGITATEUR DE TUBES - VORTEX	partagés
2	MICROSCOPE INVERSES	partagés
3	BALANCE STANDARD	
4	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
3	BAINS SECS	partagés
2	HOTTE ASPIRANTE	
1	BALANCELLE	
1	MINION	
1	MINIT	

* 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**

Pôle HCL : Plan des locaux du Centre de Biologie Nord – IAI – 5è étage



Liste des principaux équipements utilisés par le 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-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 (EMag)	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
1	THERMOCYCLEUR	
1	EXTRACTEUR	Commun labo Viro
2	THERMOCYCLEURS ABI	
2	THERMOCYCLEURS EPPENDORF	
1	CENTRIFUGEUSE DE PLAQUES PCR	
1	CENTRIFUGEUSE DE PAILLASSE	
2	VORTEX	
1	Plateforme automatisée (PANTHER)	Commun labo Viro
1	Plateforme automatisée (BioFire)	Commun IAI

➤ CNR-IPG

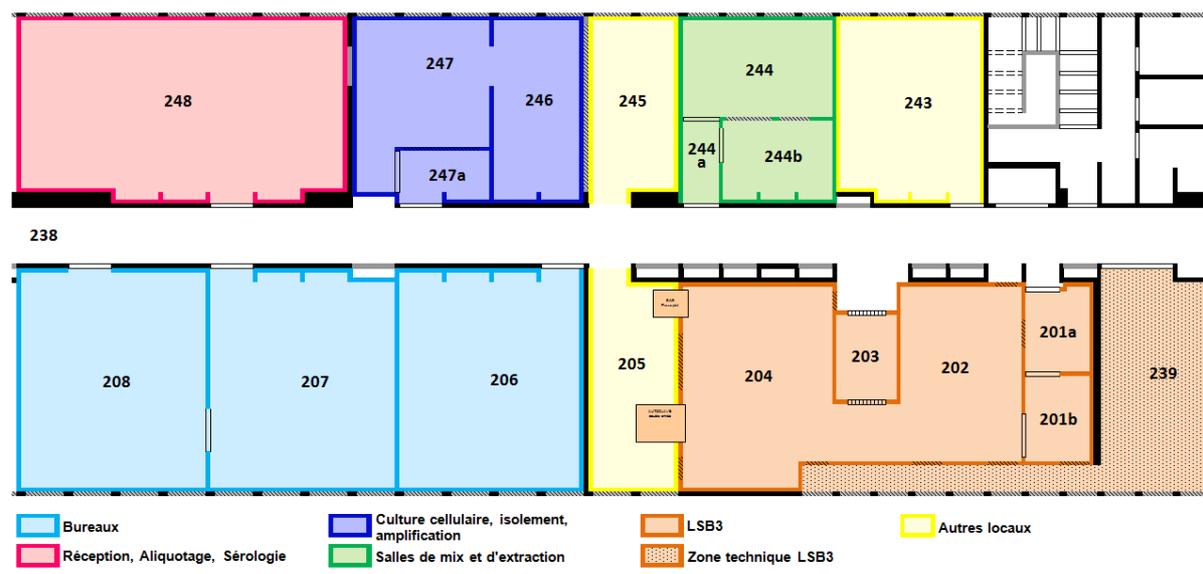
Le laboratoire de virologie dispose d'une surface de 310 m² (plan annexe 43).

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 m²). 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, de 2 congélateurs -20°C, de 2 laveurs 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 m²). Ce laboratoire est équipé de deux PSM, d'une centrifugeuse réfrigérée, de 3 incubateurs (28°C, 37°C et 37°C atmosphère 5% CO₂) et d'un microscope inversé.
- un laboratoire LSB2 dédié aux activités de biologie moléculaire de 20 m² 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.
- un laboratoire LSB3 de 70 m². Il est équipé de 2 PSM, d'un congélateur -80°C, d'un combiné congélateur -20°C/réfrigérateur +4°C, d'un incubateur à CO₂, 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 et 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

Les principaux équipements utilisés par le CNR-IPG sont les suivants :

Qtité	Désignation
4	PSM
2	CENTRIFUGEUSES RÉFRIGÉRÉE
1	CENTRIFUGEUSE RÉFRIGÉRÉE HAUTE VITESSE
3	BAINS-MARIE
4	INCUBATEURS
2	INCUBATEURS A CO ₂
2	MICROSCOPES
2	MICROSCOPES INVERSÉS
1	PH-MÈTRE
1	BALANCE DE PRÉCISION
5	CONGÉLATEURS -20°C
5	CONGÉLATEURS -80°C
2	LAVEURS 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

1.4 Collections de matériel biologique

➤ 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 6000 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 différents 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 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 équine 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, -IPG). 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 États 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 collectées 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.

1.5 Démarche qualité du laboratoire

➤ CNR-IPP

Le CNR virus des infections respiratoires (dont la grippe) fait partie des Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur qui sont au nombre de 14. Ils sont organisés en multi-site et constituent, avec la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-site (LREMS). Le LREMS est sous démarche d'accréditation.

Cette accréditation répond à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale.

Le projet d'accréditation ISO 15189 de l'Institut Pasteur est une démarche dynamique pilotée par :

- la Direction aux Ressources Techniques et à l'Environnement et son Service Qualité, Environnement et Développement Durable (QEDD) qui apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 du LREMS (certifié ISO 9001 v 2015)
- la Direction des Affaires médicales et de Santé Publique ;
- et la Coordination des Centres Nationaux de Référence de l'Institut Pasteur.

Les services supports de l'Institut Pasteur participent également à la démarche d'accréditation du LREMS en apportant les ressources nécessaires au bon déroulement des activités.

Suite à l'évaluation de Janvier 2018, les 14 CNR de l'Institut Pasteur et la CIBU du LREMS sont accrédités COFRAC selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588. L'annexe d'accréditation est disponible sur le site du COFRAC www.cofrac.fr.

L'ensemble des CNR participent annuellement à des contrôles externes de la qualité. Ceux-ci n'étant pas des programmes pérennes, lorsque ces CQE sont suspendus ou ne sont pas organisés annuellement, les CNR organisent des essais inter laboratoires avec des laboratoires homologues ou confrères européens ou mondiaux.

La saison 2018-2019 qualité du CNR-IPP s'est organisée comme suit :

Étapes clés LRE-MS	Périodes de réalisation
Audit interne qualité	5 octobre 2018
Audit interne technique	10 octobre 2018
Revue qualité	27 mars 2019
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d'extension	3 juin 2019
Finalisation des dossiers de validation de méthode pour les extensions et les ajouts : PCR VRS, amélioration des PCR H1 et N1	mars et juillet 2019

Perspectives 2019/2020 :

Étapes clés CNR	Prévision de réalisation
Audit interne technique	11 septembre 2019
Audit interne technique	novembre 2019
Finalisation des dossiers de validation de méthode suivants : PCR rhinovirus, PCR metapneumovirus, PCR de détection de la mutation H275Y sur la NA des virus A(H1N1)pdm09	Avant mars 2020
Nouveaux dossiers de validation de méthode : PCR virus émergents (MERS-CoV et HA des virus aviaires)	Courant 2020
Portée d'accréditation complète	octobre 2020

En 2018, le CNR a atteint un taux de 75% d'accréditation.

La liste des techniques accréditées du LREMS est disponible en annexe 2.

➤ CNR-HCL

Le CNR associé des virus des infections respiratoires (dont la grippe) fait partie de l'Institut des agents infectieux (IAI /Hôpital de la Croix Rousse) qui regroupe toutes les activités de microbiologie des Hospices Civils de Lyon. L'ensemble des 20 laboratoires et disciplines différentes de Biologie Médicale et d'Anatomo-Cyto Pathologie, réparties dans 3 groupements hospitaliers, constitue le Laboratoire de Biologie Médicale Multi-site (LBMMS). En tant qu'établissement de santé public, les HCL, soumis à l'obligation de certification mise en œuvre par la Haute Autorité de Santé (HAS) est certifié par l'HAS avec une note de A (1^{er} CHU de France noté A) depuis 2016 (Certification V2014).

Le LBMMS est accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 – 2012 (ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013) pour les disciplines de BIOCHIMIE, HEMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE, MICROBIOLOGIE (dont VIROLOGIE), GENETIQUE ET BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION (numéro 8-3442 rev-7 / disponible sur le site du COFRAC www.cofrac.fr) L'institut des agents infectieux est accrédité pour ses activités de sérologies infectieuses (Parasitologie-Mycologie et Bactériologie) et de biologie moléculaire (Virologie). L'accréditation du LBMMS a été reconduite après l'audit de suivi de juin 2019.

Notre système d'assurance qualité repose sur une gestion informatisée sur KALILAB des documents, de la formation et de l'habilitation du personnel, du suivi des non-conformités, des revues et de la validation de méthode.

Le CNR participe annuellement aux différents contrôles de qualité externes organisés par l'ECDC, l'OMS et QCMD. Il est inspecté ou audité régulièrement :

- inspections ANSM (13-15 mai 2008, 2-4 juin 2014, 4-5 novembre puis 7-8 décembre 2015 et 9 février 2018)
- audits qualité selon les GMP's ([Good Manufacturing Practices] Bonnes pratiques de fabrication (*directives européennes 2001/83/CE du 6/11/2001 et 2003/94/EC du 08/10/2003 et directives américaines FDA / Code Fédéral et de Régulation 21CFR parts 210 et 211*) organisés par les sociétés producteurs de vaccins dont nous sommes sous-traitants (en 2007, 2010, 2012 et 2014)

- audits internes (4, 20 avril 2016, avril 2019 et un audit prévu dernier trimestre 2019)

Les objectifs du CNR sont guidés par la stratégie du LBMMS :

- Extension de portée dans la famille VIROH en mars 2020 pour les analyses suivantes : détection duplex des virus influenza A et B, sous-typage H3, H5, H7 et N1 par RT-PCR en temps réel et détermination du lignage B (RT-PCR Vic-Yam) et PCR de détection H275Y (portée B)
- Ajout en mars 2019 pour la PCR VRS A/B (portée A)

Les dossiers de validation de méthodes sont en cours mais les différents moyens de maîtrise du pré-analytique, de la traçabilité et des processus analytiques sont 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 novembre 2014 pour la version 2007 et depuis novembre 2015 pour la version 2012 de cette norme (Domaine / Sous-famille / Portée concernés : Biologie médicale / Microbiologie générale / portée A).

L'audit de renouvellement de cette accréditation a été réalisé en juillet 2018. Au cours de cet audit, une extension du périmètre d'accréditation a été examinée (Biologie médicale / Virologie spécialisée / Portée B) pour les techniques de détection moléculaire : « détection et identification des virus influenza de type A et de type B chez l'homme ».

Le renouvellement et l'extension de cette accréditation ont reçu un avis favorable en décembre 2018.

La saison 2018-2019 qualité du CNR s'est organisée comme suit :

Étapes clés	Périodes de réalisation
Audit COFRAC de renouvellement et d'évaluation de l'extension demandée.	09-10 juillet 2018
Obtention du renouvellement et de l'extension	01 décembre 2018
Revue qualité du laboratoire de virologie	15 janvier 2019
Revue de direction de l'IPG	01 février 2019
Participation à l'EQAP OMS (Panel 18)	22 mai 2019
Audit interne qualité	10-12 juillet 2019
Audit interne technique	24 juillet 2019

Perspectives 2019-2020 :

Étapes clés	Prévision de réalisation
Audit COFRAC	novembre 2019
Revue qualité du laboratoire de virologie	janvier 2020
Revue de direction de l'IPG	Février 2020
Finalisation du dossier de validation de méthode : gestion de portée flexible (PCR VRS)	1 ^{er} semestre 2020

2 Annexe 2 : capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

2.1.1 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.

2.1.1.1 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^s ciblant le gène NS pour la détection des virus influenza de type C
- qRT-PCR ciblant les gènes PB1 et NP pour la détection des virus influenza de type D
- qRT-PCR ciblant les gènes de l'hémagglutinine (HA) ou de la neuraminidase (NA) pour le sous-typage des virus influenza A humains : H1, N1, H1pdm09, N1pdm09, H3, N2
- qRT-PCR multiplex ciblant les gènes HA des virus influenza B et permettant la distinction des lignages B-Yamagata et B-Victoria au CNR-IPP, -HCL et -IPG ([Watzinger et al., J Clin Microbiol. 2004 November; 42\(11\): 5189–5198](#))
- qRT-PCR ciblant les gènes HA ou NA de virus influenza aviaires des sous types suivants : H5 (2 formats ciblant des régions distinctes pour les clades 1, 2 et 3), 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 & H10 ; N9 CNR-HCL ; H5, H7 & N9 CNR-IPG;
- qRT-PCR ciblant les gènes HA de virus influenza aviaires des sous types suivants : H5 (format CDC ciblant des régions distinctes pour les clades 1, 2 et 3)
- qRT-PCR ciblant la NP des virus porcins (format CDC)
- RT-PCR conventionnelle ciblant les gènes HA ou NA de virus influenza aviaires des sous types suivants : H1, H3, H4, H6, N2av, N3, N6, N8, H5 site de clivage et H7 site de clivage (CNR-IPP) ou H7, H9 et H5 site de clivage (CNR-HCL)

- qRT-PCR ciblant chacun des 8 segments des virus influenza A de référence (CNR-IPP)
- qRT-PCR ciblant 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[§] & -HCL)
- qRT-PCR ciblant le gène POL pour la détection du SARS-CoV (CNR-IPP[§])
- RT-PCR conventionnelle pour la détection des agent bactériens dits « atypiques » *mycoplasma pneumoniae* et *chlamydia pneumoniae* (CNR-IPP[§])
- qPCR ciblant le gène NP1 pour la détection des Bocavirus humains (CNR-IPP[§])
- PCR conventionnelle pour la détection des adénovirus (CNR-IPP[§])

* 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 accréditées par le CNR

Les techniques accréditées actuellement sont les suivantes :

- Détection rapide du virus influenza de type A chez l'homme (CNR-IPP & -IPG)
- Détection rapide des différentes lignées du virus influenza de type B chez l'homme (CNR-IPP & -IPG)
- Détection rapide des virus influenza A(H1N1)pdm09 et A(H3N2) chez l'homme (CNR-IPP & -IPG)
- Détection rapide des virus respiratoires syncytiaux A et B (VRS A et B) chez l'homme (CNR-IPP)

➤ Techniques de RT-PCR commerciales

Kits Argène/Biomérieux pour la détection des virus suivants (PCR duplex) : RSV/hMPV, AdV/BoV, HCoV/HPIV et Chla/Myco pneumo.

Kit BioMérieux BioFire (FilmArray Respiratory panel 2 *plus*) approche syndromique pour la détection de 15 virus respiratoires et 4 bactéries.

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

2.1.1.2 Autres techniques de détection

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

2.1.2 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 D en cellules ST (CNR-IPP)
- isolement des virus influenza A, B, C sur œuf de poule embryonné voie amniotique ou allantoïque (CNR-IPP, -HCL)

2.1.3 Techniques d'identification

- inhibition d'hémagglutination (IHA)
- microneutralisation
- test de suivi de l'activité enzymatique de la neuraminidase (test Munana en point final)

2.1.4 Caractérisation génétique des virus influenza

2.1.4.1 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)

2.1.4.2 Techniques de séquençage

Les laboratoires du CNR disposent des techniques de séquençage haut débit NGS (cf paragraphe 2.6 du rapport) permettant le séquençage des génomes complets pour les différents virus respiratoires à partir d'amplicons ou sans a priori à partir de cADN produit par amorçage aléatoire.

2.1.5 Techniques sérologiques

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

2.1.6 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

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

Les techniques de détection développées par le CNR ainsi que les témoins positifs requis sont fournis à l'ensemble des laboratoires qui en font la demande.