

**Rapport annuel
d'activité**

2015

**Centre national de
référence des virus
influenzae**

**Saison
2014-2015**

Sommaire

1	Missions et organisation du CNR	8
1.1	Missions et objectifs	8
1.1.1	Equipes.....	8
1.1.2	Locaux et équipements.....	8
1.1.3	Démarche qualité.....	8
2	Activités d'expertise.....	12
2.1	Évolutions des techniques.....	12
2.1.1	Techniques de détection.....	12
2.1.2	Evaluation des Tests Rapides d'Orientation Diagnostic TROD	12
2.1.3	Techniques transférées vers d'autres laboratoires.....	13
2.2	Analyses virologiques au cours de la saison 2014-2015	14
2.2.1	Collection et analyses virologiques d'échantillons cliniques	14
2.2.1.1	<i>Analyses virologiques d'échantillons cliniques humains (surveillance saisonnière)</i>	14
2.2.1.2	<i>Analyses virologiques d'échantillons cliniques humains (virus émergents)</i>	20
2.2.1.3	<i>Collection de souches de virus influenza aviaire A(H5N1)</i>	21
2.2.1.4	<i>Collection de prélèvements provenant d'études ou de firmes</i>	21
2.2.1.5	<i>Collection de souches, antigènes de référence et immun-sérums</i>	22
2.2.2	Sensibilité aux antiviraux	23
2.2.2.1	<i>Tests génétiques</i>	23
2.2.2.2	<i>Test fluorimétrique (phénotypique)</i>	24
2.2.3	Distribution de matériel biologique	25
3	Activités de surveillance.....	27
3.1	Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections.....	27
3.1.1	Surveillance en Métropole.....	27
3.1.1.1	<i>Réseaux</i>	27
3.1.1.2	<i>Les prélèvements</i>	31
3.1.1.3	<i>Données d'activité médicale et sanitaire</i>	31
3.1.1.4	<i>Surveillance virologique</i>	33
3.1.1.5	<i>Contribution à la surveillance microbiologique et épidémiologique des autres agents pathogènes responsables d'infections respiratoires aiguës</i>	45
3.1.2	Surveillance en Région Antilles-Guyane	51
3.1.2.1	<i>Réseau de partenaires</i>	51
3.2	Détection et investigation de cas groupés et de phénomènes anormaux	58
3.3	Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux.....	59
3.4	Contribution aux réseaux de surveillance européen et internationaux.....	59
3.4.1	EISN/ECDC.....	59
3.4.2	FluNet/OMS	59
3.4.1	Contrôle de Qualité.....	60
3.5	Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	60
4	Alerte.....	60
5	Activités d'information, de formation et de conseil.....	62
5.1	Enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires.....	62
5.1.1	<i>Enseignements</i>	62
5.1.2	<i>Séminaires, conférences grand public et relations avec la presse</i>	63
5.1.3	<i>Formation, accueil de stagiaires</i>	63
5.2	Modalités de diffusion des données de la surveillance	64

5.3	Activités d’expertises auprès des instances de santé nationales et internationales	65
5.3.1	Activités auprès des instances de santé nationales	65
5.3.1.1	Ministère de la Santé, DGS, DGT	65
5.3.1.2	InVS	65
5.3.1.3	ANSM	65
5.3.2	Activités auprès des instances de santé internationales	65
5.3.2.1	EISN/ECDC	65
5.3.2.2	OMS	65
5.3.3	Membre de réseaux et membre de conseil scientifique d’institutions extérieures	66
6	TRAVAUX DE RECHERCHE et publications EN LIEN DIRECT AVEC L’ACTIVITE DU CNR ..	67
6.1	Activités de recherche en lien direct avec l’activité du CNR	67
6.1.1	CNR-IPP	67
6.1.2	CNR-HCL	68
6.1.3	CNR-IPG	70
6.2	Publications et communications en lien direct avec l’activité du CNR	71
6.2.1	Publications nationales	71
6.2.2	Publications internationales	72
6.2.3	Communications nationales	74
6.2.4	Communications Internationales	74
6.2.5	Communications Nationales sur invitation	74
6.2.6	Communications Internationales sur invitation et présidence de sessions	75
6.2.7	Comité scientifique ou d’organisation de congrès ou colloques	76
7	Coopération avec les laboratoires de santé animale	77
8	Programme d’activité pour les années 2014-2015 et 2015-2016	77

Figures

Figure 1 : Suspicion MERS-CoV - Répartition de la provenance.....	20
Figure 2 : Suspicion MERS-CoV - Autres étiologies	21
Figure 3 : Représentation géographique des médecins Sentinelles ayant participé à la surveillance virologique des syndromes grippaux saison 2014-2015, par région.....	29
Figure 4 : Syndromes grippaux (GC) pour 100 000 habitants et pourcentage de virus grippaux détectés en médecine générale (Réseau Sentinelles) – période 40/2014-15/2015	32
Figure 5 : Syndrome grippaux (GC) pour 100 000 habitants par tranches d'âge en France .	33
Figure 6 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France	34
Figure 7 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France-Nord	34
Figure 8 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France-Sud.....	35
Figure 9 : Détection des virus grippaux en France	36
Figure 10 : Détection des virus grippaux en France-Nord	36
Figure 11 : Détection des virus grippaux en France-Sud.....	37
Figure 12 : Détection des virus grippaux en France	37
Figure 13 : Détection des virus grippaux en France-Nord	38
Figure 14 : Détection des virus grippaux en France-Sud.....	38
Figure 15 : Détection des virus grippaux en France	39
Figure 16 : Détection des virus grippaux en France-Nord	39
Figure 17 : Détection des virus grippaux en France-Sud.....	40
Figure 18 : Détection du VRS en France	45
Figure 19 : Détection du VRS en France-Nord	46
Figure 20 : Détection du VRS en France-Sud.....	46
Figure 21 : Détection des rhinovirus humains en France.....	47
Figure 22 : Détection des rhinovirus humains en France-Nord.....	47
Figure 23 : Détection des rhinovirus humains en France-Sud	48
Figure 24 : Détection des adénovirus en France	48
Figure 25 : Détection des virus parainfluenza en France.....	49
Figure 26 : Détection des métapneumovirus humains en France.....	49
Figure 27 : Estimation du nombre hebdomadaire de consultations pour syndrome grippal ..	52
Figure 28 : Estimation du nombre hebdomadaire de consultations pour syndrome grippal ..	52
Figure 29 : Estimation du nombre hebdomadaire de consultations pour syndrome grippal ..	53
Figure 30 : Détection des virus en région Antilles Guyane CNR-IPG / saison 2014-2015	54
Figure 31 : Détection des virus grippaux et VRS en Guyane - CNR-IPG / saison 2014-2015	55
Figure 32 : Détection des virus grippaux aux Antilles (Martinique + Guadeloupe)	55
Figure 33 : Répartition des virus grippaux détectés en région Antilles-Guyane	56
Figure 34 : Répartition des virus grippaux détectés en Guyane	57
Figure 35 : Répartition des virus grippaux détectés aux Antilles (Martinique et Guadeloupe)	57

Tableaux

Tableau 1 : Bilan des prélèvements analysés par les CNR-IPP et -HCL.....	18
Tableau 2 : Bilan des prélèvements analysés par le CNR-IPG	19
Tableau 3 : Sérums de furets post-infectieux et souches reçus par les CNR-IPP et -HCL ...	22
Tableau 4 : Résultats des tests phénotypiques de sensibilité à l'oseltamivir (CNR-IPP, -HCL)	25
Tableau 5 : Composition du Réseau Sentinelles par région - France, saison 2014-2015. Source : Réseau Sentinelles	28
Tableau 6 : Liste des pathogènes	30
Tableau 7 : Distribution par âge des patients– Réseau Sentinelles.....	42
Tableau 8 : Distribution par tranche d'âge et par (sous)-type viral - Réseau Sentinelles	43
Tableau 9 : Statut vaccinal - Distribution des virus grippaux détectés au CNR	43
Tableau 10 : Statut vaccinal - Distribution par tranche d'âge.....	44
Tableau 11 : Distribution par âge des patients – Région Antilles Guyane	58
Tableau 12 : Distribution par tranche d'âge et par (sous)-type viral – Région Antilles Guyane	58

Résumé analytique

En France métropolitaine, la saison de surveillance 2014-2015 a été marquée par une épidémie grippale de forte intensité avec un pic épidémique entre les semaines S06/2015 et S08/2015. Les détections de virus grippaux dans les prélèvements communautaires du réseau de médecins généralistes Sentinelles sont restées très sporadiques jusqu'à début décembre. Les détections de virus de grippe de sous-type A(H3N2) ont ensuite augmenté de façon importante à partir de la semaine S49/2014, entraînant une vague épidémique saisonnière majoritairement due aux virus grippaux de sous-type A(H3N2) avec une co-circulation de virus de sous-type A(H1N1)pdm09 et de type B. Une augmentation de la circulation des virus grippaux de type B, principalement du lignage B-Yamagata a été observée en fin d'épidémie. Environ 55% des 2675 prélèvements issus du réseau Sentinelles reçus aux laboratoires du CNR en métropole ont été trouvés positifs pour un virus grippal

Pour la région Antilles Guyane, la saison de surveillance 2014-2015 a été marquée par des épidémies d'intensité modérée, même si en Guyane l'épidémie s'est révélée tardive et surtout prolongée sur 20 semaines au total. Près de 49% de l'ensemble des prélèvements reçus au CNR-IPG dont 63% des prélèvements reçus dans le cadre de la surveillance sentinelle ont été rendus positifs pour un virus grippal. Une co-circulation virale a été observée dans l'ensemble des DFA (Départements Français des Amériques) avec 48,9% (n=209) de virus de type A (parmi lesquels une majorité de virus de sous-type A(H3N2) (n=163 ; 78%)), et 51,1% (n=218) de virus de type B.

Sur le plan international, le coronavirus MERS-CoV a continué sa progression en Arabie Saoudite et au Moyent-Orient notamment en Jordanie. Une épidémie en Corée du Sud a sévi de mai à juillet 2015, causée par la mauvaise prise en charge d'un cas d'importation. La communauté internationale est toujours mobilisée pour prendre en charge tout voyageur présentant une symptomatologie respiratoire sévère à son retour du Moyent-Orient. Le CNR a dû faire face et traiter dans les meilleurs délais 88 prélèvements pour des cas possibles d'infection par le MERS-CoV qui se sont avérés négatifs et très souvent positifs pour d'autres virus respiratoires tels que les virus grippaux de type A et B et les rhinovirus.

1 Missions et organisation du CNR

1.1 Missions et objectifs

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

Le rapport annuel 2014-2015 repose sur l'activité des trois laboratoires composant le CNR de la semaine S40/2014 à la semaine S15/2015 avec les données de surveillance de l'ensemble de la période pour le CNR-IP et le CNR-HCL. Pour l'IPG la surveillance a été étendue de la semaine S27/2014 à la semaine S33/2015.

La description détaillée est donnée en annexe 1.

1.1.1 Equipes

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

1.1.2 Locaux et équipements

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

1.1.3 Démarche qualité

➤ **CNR-IPP**

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

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

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

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

○ Bilan des actions réalisées en 2014-2015 :

- Mise à jour du manuel qualité
- Inclusion de la vague 3 du LREMS, création d'une vague 4
- Audit COFRAC de suivi avec extension du périmètre, janvier 2015 (CIBU, CNR rage, CNR leptospirose, CNR coqueluche et autres bordetelloses, CNR Corynebactéries du complexe *Diphtheriae*, CNR virus *Influenzae*, CNR Hantavirus).
- Formation à la version 2012 de la norme mars 2015
- Audits internes techniques et qualité ISO 15189 pour les sites concernés par l'audit ISO 15189 avril 2015 (CIBU, CNR Leptospirose, CNR coqueluche et autres bordetelloses, CNR Corynebactéries du complexe *Diphtheriae*, CNR virus *Influenzae* et CNR Rage),
- Revue de direction LREMS : 22 mai 2015
- Accréditation ISO 15189 du LREMS (CIBU, CNR Leptospirose, CNR coqueluche et autres bordetelloses, CNR Corynebactéries du complexe *Diphtheriae*, CNR Virus *Influenzae* et CNR Rage) par le COFRAC

○ Perspectives 2015 :

Audit de renouvellement et de suivi ISO 15189 version 2012

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

➤ **CNR-HCL**

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

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

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

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

Le CNR-HCL a été audité à plusieurs reprises par des sociétés industrielles pour lesquelles il est prestataire (2010-2012-2014). Le CNR-HCL sera audité en tant que site du LBMMS, par le COFRAC en avril 2016. En parallèle, nous participons au programme d'audits internes du LBMMS : 1^{er} audit effectué en juin 2013 sur le périmètre de l'accréditation partielle du pré-analytique au post analytique puis en janvier 2014 audit blanc sur le périmètre de l'accréditation partielle.

Le CNR-HCL a été désigné par l'ARS pour effectuer le diagnostic de MERS-CoV. Pour cette activité de diagnostic le transcrit préparé par le CNR-IPP n'est pas considéré comme un MOT. Mais suite à l'inclusion du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) dans la liste des micro-organismes et Toxines (JO du 14 novembre 2014) le CNR-HCL a soumis à l'ANSM un dossier technique de demande d'autorisation de détention/mise en œuvre de Microorganisme et/ou de toxine.

D'autre part, le CNR-HCL déménage avec l'ensemble du laboratoire de virologie Est au cours de la première semaine du mois de novembre 2015 et donc le CNR-HCL a soumis un dossier technique de demande d'autorisation de détention/mise en œuvre de Microorganisme et/ou de toxine pour les Orthomyxovirus de type A, sous-type H5N1, H7N7 et H7N3 pour le nouveau site.

➤ **CNR-IPG**

Conformément à l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative aux activités de biologie médicale, le CNR s'est engagé dans le processus d'accréditation au référentiel NF EN ISO 15189. Le laboratoire bénéficie de l'accompagnement méthodologique et technique du service Service Qualité, Environnement et Développement Durable de l'Institut Pasteur à Paris et d'un prestataire de service qui suit les avancées des laboratoires dans ce processus d'accréditation.

Depuis le 01/12/2014, le laboratoire de virologie de l'IPG hébergeant le CNR des virus Influenzae satisfait **aux exigences de la norme NF EN ISO 15189 version 2007** et aux règles d'application du COFRAC pour les activités d'analyses en Biologie médicale / Microbiologie (Sérologie infectieuse).

Le premier audit de suivi d'accréditation, selon la version 2012 de la norme NF EN ISO 15189 s'est déroulé en août 2015. Une extension du périmètre est envisagée pour 2016.

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

2 Activités d'expertise

La description des techniques disponibles est présentée en annexe 5

2.1 Évolutions des techniques

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

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

2.1.1 Techniques de détection

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

2.1.2 Evaluation des Tests Rapides d'Orientation Diagnostic TROD

Le CNR-IPP a réalisé une étude comparative des performances (sensibilité analytique et praticabilité) du test Alere i de la société Alere. Cela a été réalisé sur des prélèvements issus de la surveillance communautaire et les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec les techniques de détection de référence du CNR-IPP.

Le même test, Alere i a aussi été testé par le laboratoire de l'hôpital Saint-Joseph et les résultats ont été comparés à la fois à la technique Xpert Flu/RSV mais aussi aux techniques de détection de référence du CNR-IPP. Une publication est en révision après soumission à "Diagnostic Microbiology and Infectious Disease".

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

Nous avons choisi 4 souches de référence de virus influenza : 2 souches de type A, A/California/7/2009(H1N1pdm09), A/Texas/50/2012(H3N2) et 2 souches de type B B/Brisbane/60/2008 (B Victoria) et B/Massachusetts/2/2012 (B Yamagata).

Cette évaluation a été publiée : *Evaluation des performances des 22 TROD de la grippe* M. Bouscambert , E. Vanhecke, B.Worms, M. Valette , B. Lina Feuillet de Biologie, N°324, Mai 2015. Et *Rapid bedside tests for diagnosis, management, and prevention of nosocomial influenza* M. Bouscambert , M. Valette , B. Lina Journal of Hospital Infection 89 (2015) 314-318.

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

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

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

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

2.2 Analyses virologiques au cours de la saison 2014-2015

2.2.1 Collection et analyses virologiques d'échantillons cliniques

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

L'ensemble des laboratoires du CNR des virus influenzae a reçu 4981 prélèvements et détecté 3079 virus grippaux.

➤ CNR-IPP et CNR-HCL

En France métropolitaine, au sein des 4106 prélèvements reçus par les CNR-IPP et -HCL, 2652 (64,6%) prélèvements ont été rendus positifs pour un ou plusieurs virus grippaux (29 co-infections). Ces détections positives proviennent de la surveillance du réseau Sentinelles (n= 1441 ; 54,3%), des laboratoires hospitaliers (n= 1098 ; 41,4%) dont une partie provient des laboratoires des armées (n=31), de l'étranger (n=78 ; 2,9%), des EHPAD (n=20 ; 0,7%) et autres (n=15 ; 0,5%).

Les virus grippaux détectés se répartissent de la manière suivante : 609 (22,7%) virus H1N1pdm09, 1506 (56,2%) virus H3N2, et 8 (0,2%) virus A non sous-typés, et 517 (19,3%) virus B-Yamagata, 28 (1,0%) virus B-Victoria et 8 (0,2%) virus B pour lesquels le lignage n'a pas été déterminé (Tableau 1).

➤ CNR-IPG

En région Antilles-Guyane, le CNR-IPG a reçu 875 prélèvements en provenance respectivement de Guyane (n=555 ; 63,4%), de Martinique (n=211 ; 24,1%) et de Guadeloupe, (n=109 ; 12,5%). Ces prélèvements proviennent respectivement du réseau sentinelle (n=274 ; 31,3%), de laboratoires hospitaliers (n=466 ; 53,3%) et de laboratoires privés, de centres de santé périphériques ou d'EHPAD (n=135 ; 15,4%).

Au total, 427 virus grippaux ont été détectés, répartis de la façon suivante : 209 (48,9%) virus grippaux de type A parmi lesquels 163 (78%) virus H3N2, 45 (21,5%) virus H1N1pdm09 et 1 virus A non sous-typé (0,5%), et 218 (51,1%) virus de type B parmi lesquels 1 (0,5%) B appartenant au lignage Victoria, et 217 (99,5%) virus B appartenant au lignage Yamagata.

Nbre de plvts / souches	Plvts positifs (A ou B)	Provenance Surveillance Population	Virus type A						Virus type B							
			TOTAL A	non sous typés	H1N1 pdm09		H3N2		TOTAL B	non sous typés	B Victoria			B Yamagata		
					PCR	isolt	PCR	isolt			Total Vic	PCR	isolt	Total Yam	PCR	isolt
2013	1309	Total Sent./Hôpitaux (FN)	1041	7	271	103	763	201	279	0	20	20	7	259	259	88
1941	1230	Total Sent./Hôpitaux (FS)	982	0	310	98	685	200	247	4	7	7	3	237	233	75
1422	810	Sentinelles (FN)	606	2	151	52	453	113	207	0	19	19	7	188	188	68
1047	567	Sentinelles (FS)	418	0	127	21	292	47	149	0	5	5	1	144	142	27
154	64	Corse	52		6	1	47	5	13					13	13	4
591	499	Lab. Hospitaliers (FN)	435	5	120	51	310	88	72	0	1	1	0	71	71	20
740	599	Lab. Hospitaliers (FS)	512	0	177	76	346	148	85	4	2	2	2	8	3	5
Alsace																
4	4	CH Strasbourg	4	0	0	0	4	0	0							
Basse Normandie																
71	57	CH Caen	54	0	15	10	39	14	3	0	0			3	3	2
Bourgogne																
133	128	CH Dijon	117	2	36	18	79	21	14	0	0			14	14	6
Bretagne																
1	1	CHRU Brest	0						1					1	1	1
8	7	CHU Rennes	6	0	2	0	4	1	1					1	1	0
Centre																
13	6	CH Orléans	4	0	1	1	3	2	2					2	2	0
Franche Comté																
2	1	CH Belfort	1	0	0		1	0	0							
1	1	CH Besançon	1	0	1	0	0	0	0							
Haute Normandie																
9	9	CH Rouen	9	0	2	1	7	3	0							
Ile de France																
9	3	CH Bichat	2	0	0		2	0	2					2	2	0
2	2	CH Cochin	2	0	1	1	2	1	0							
47	33	CH Pitié Salp.	31	0	15	5	16	5	2					2	2	0
1	1	CH Robert Debré	1	0	0	0	1	0	0							
20	20	CH Trousseau	20	0	2	1	18	10	0							
55	55	GH St Joseph	44	1	9	0	34	1	12					12	12	2
2	0	HEGP	0						0							
2	1	IM Montsouris	1	0	0		1	0	0							
43	39	CH Ambroise Paré	26	0	7	3	19	5	13	0	1	1	0	12	12	5
11	11	CH Versailles	11	0	3	1	8	1	1	0	0			1	1	0
7	6	CH Montereau	6	0	0		6	5	0							
1	0	CH Melun	0						0							
5	2	Hôpital Foch	2	0	0		2	0	0							
2	2	CH Louis Mourier	2	0	0		2	1	0							
5	4	CH Avicenne	1	0	0		1	0	4	0	0			4	4	0
2	2	Hop Aubervilliers	0						2	0	0			2	2	0
16	15	Hop Henri Mondor	15	0	4	1	11	5	0							
4	0	CHU Bicêtre	0						0							

Virus type A																	Virus type B					
Nbre de plvts / souches	Plvts positifs (A ou B)	Provenance Surveillance Population	TOTAL A	non sous typés	H1N1 pdm09		H3N2		TOTAL B	non sous typés	B Victoria			B Yamagata								
					PCR	isolt	PCR	isolt			Total Vic	PCR	isolt	Total Yam	PCR	isolt						
5	2	Hôpital Foch	2	0	0		2	0	0													
2	2	CH Louis Mourier	2	0	0		2	1	0													
5	4	CH Avicenne	1	0	0		1	0	4	0	0			4	4	0						
2	2	Hop Aubervilliers	0						2	0	0			2	2	0						
16	15	Hop Henri Mondor	15	0	4	1	11	5	0													
4	0	CHU Bicêtre	0						0													
11	11	CH Paul Brousse	8	1	1	1	6	2	3	0	0			3	3	2						
3	3	CH Argenteuil	3	0	1	0	2	0	0													
2	0	Hop Américain	0						0													
Lorraine																						
19	15	CHU Nancy	12	0	3	2	9	4	3	0	0			3	3	0						
Nord Pas de Calais																						
16	16	CH Lille	16	1	2	1	13	3	0													
Pays de Loire																						
3	3	CH Nantes	3	0	3	0	0		0													
46	28	CH Angers	21	0	7	2	14	4	7	0	0			7	7	1						
Picardie																						
4	4	CH Amiens	4	0	0		4	0	0													
Aquitaine																						
8	4	Agen	4				4	4														
149	104	Bordeaux	88		15		76		16	3				13	13							
Auvergne																						
12	3	Aurillac	3				3	1														
38	35	Clermont-Ferrand*	29		7	5	25	19	6		1	1	1	5	5	3						
Languedoc-Roussillon																						
11	11	Nîmes	10		5	2	5	3	1					1	1							
42	36	Montpellier	32		20		12		5					5	5							
Limousin																						
20	20	Limoges	10		5	5	5	3	10					10	10	10						
Midi-Pyrénées																						
2	2	Bidart	2				2															
1	1	Pau	1		1																	

			Virus type A							Virus type B						
Nbre de plvts / souches	Plvts positifs (A ou B)	Provenance Surveillance Population	TOTAL A	non sous typés	H1N1 pdm09		H3N2		TOTAL B	non sous typés	B Victoria			B Yamagata		
					PCR	isolt	PCR	isolt			Total Vic	PCR	isolt	Total Yam	PCR	isolt
2	2	Tarbes	2		1		1									
10	9	Toulouse	9		4		7	3								
PACA																
14	4	Aix-en-Provence	3		1		2		1					1		
7	7	Avignon	6		4	2	2	1	1					1		
2	2	Guillestre	2				2									
14	9	Marseille	8		2	1	6	1	1					1	1	
2		Mougins														
4	4	Nice	4		1	1	3	3								
16	16	Toulon	15		5	4	11	9	1					1	1	
Poitou-Charentes																
79	68	Poitiers	51		16	16	35	35	17					17	17	16
Rhône-Alpes																
3	3	Annonay	3				3	3								
7		Briennon														
3	2	Bron	2				2	1								
1	1	Contamine sur Arve	1				1	1								
5	5	Chambéry	5		2		3									
13	13	Grenoble	12		6	2	6	1	1					1	1	
71	66	Lyon	55		25	25	30	29	11		1	1	1	10	10	10
2		Montélimar														
9	3	Oyonnax	3				3	2								
2	2	Pringy	2				2	1								
3		St Donat														
157	139	St-Etienne	129		53	11	78	16	10	1				10	10	4
9	6	Valence	6				6	4								
Armées																
3	3	HIA Legouest	2	0	0		2	0	1	0	0			1	1	0
6	4	HIA Percy	4	0	4	3	0		0							
2	2	HIA Begin	2	0	1	0	1	0	1	0	0			1	1	1

Virus type A																	Virus type B					
Nbre de plvts / souches	Plvts positifs (A ou B)	Provenance Surveillance Population	TOTAL A	non sous typés	H1N1 pdm09		H3N2		TOTAL B	non sous typés	B Victoria			B Yamagata								
					PCR	isolt	PCR	isolt			Total Vic	PCR	isolt	Total Yam	PCR	isolt						
1	1	HIA Bordeaux	1					1	1													
19	19	HIA Lyon	12			3	1	9	7	4				4	4	1						
2	2	HIA Toulon	2			1	1	1														
32	20	EHPAD (FN)	18	0		1	0	17	10	2	0	1	1	0	1	1	1					
33	15	Autres (FN)	12	0		3	2	9	3	3		0			3	3	1					
IDF (FS)																						
2		Chilly-Mazarin																				
Total étranger																						
21	21	Antilles / Guyane (FN)	12	0		5	4	7	3	9		0			9	8						
56	49	La Réunion (FS)	37	1		19	2	17		13	4				9	9						
8	8	Papeete (FN)	8			0		8	5	0												
2107	1373	TOTAL général (FN)	1091	7		280	109	804	222	292	0	21	21	7	271	271	90					
1999	1279	TOTAL général (FS)	1019	1		329	100	702	200	260	8	7	7	3	246	242	75					
4106	2652	TOTAL général	2110	8		609	209	1506	422	552	8	28	28	10	517	513	165					

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

➤ **CNR-IPP : détection de 12 cas d'infection mixte :**

Virus grippaux A + B :

- 5x A(H3N2) + B Yamagata
- 1x A(H1N1)pdm09 + B Yamagata

Virus Grippaux A

- 6x A(H1N1)pdm09 + A(H3N2)

➤ **CNR-HCL : détection de 17 cas d'infections mixtes :**

Virus grippaux A + B :

- 3x A(H1N1)pdm09 + B Yamagata
- 1x A(H3N2) + B Yamagata

Virus Grippaux A :

- 13x A(H1N1)pdm09 + A(H3N2)

Nbre de plvts / souches	Plvts positifs (A ou B)	Provenance Surveillance Population	TOTAL A	Virus type A			Virus type B		
				non sous typés	H1N1 pdm09	H3N2	TOTAL B	B Victoria	B Yamagata
555	162	Guyane	77	0	16	61	85	1	84
344	88	Hôpital / Centre de Santé	51	0	9	42	37	1	36
318	80	Hôp. Cayenne	47	0	9	38	33	1	32
1	0	CDS Papaïchton	0	0	0	0	0	0	0
25	8	CDS Iracoubo	4	0	0	4	4	0	4
99	17	Laboratoires privés	6	0	1	5	11	0	11
112	57	Surveillance sentinelle	20	0	6	14	37	0	37
211	182	Martinique	85	0	19	66	97	0	97
141	141	CHU Fort de France	68	0	17	51	73	0	73
10	3	EHPAD	3	0	0	3	0	0	0
60	38	Surveillance sentinelle	14	0	2	12	24	0	24
109	83	Guadeloupe	47	1	10	36	36	0	36
7	7	CHU Pointe à Pitre	7	0	0	7	0	0	0
102	76	Surveillance sentinelle	40	1	10	29	36	0	36
274	171	Total sentinelle	74	1	18	55	97	0	97
601	256	Total Non Sentinelle	135	0	27	108	121	1	120
875	427	Total Général	209	1	45	163	218	1	217

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

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

Virus grippaux A + B :

1x Surveillance Sentinelle / A(H3N2) + B Yamagata

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

Le nouveau coronavirus, MERS-CoV

➤ CNR-IPP et CNR-HCL

Un total de 88 prélèvements ont été reçus pour suspicion d'infection par le nouveau coronavirus MERS-CoV provenant de 38 patients à leur retour du Moyen-Orient. Leur répartition selon le pays de provenance est la suivante, la majorité (71%) provenant d'Arabie Saoudite (voyage à la Mecque notamment) :

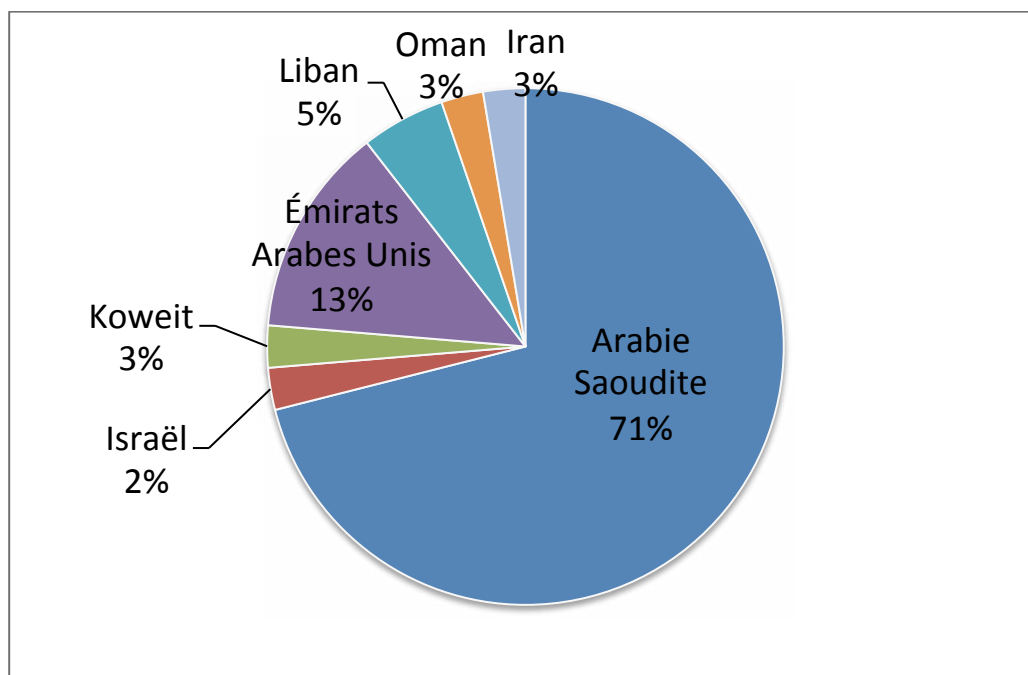


Figure 1 : Suspicion MERS-CoV - Répartition de la provenance

Pour 27 patients (71%) d'autres étiologies ont été détectées, parmi lesquelles majoritairement du rhinovirus (52%), des virus de grippe A(H3N2) (28%) et des co-infections.

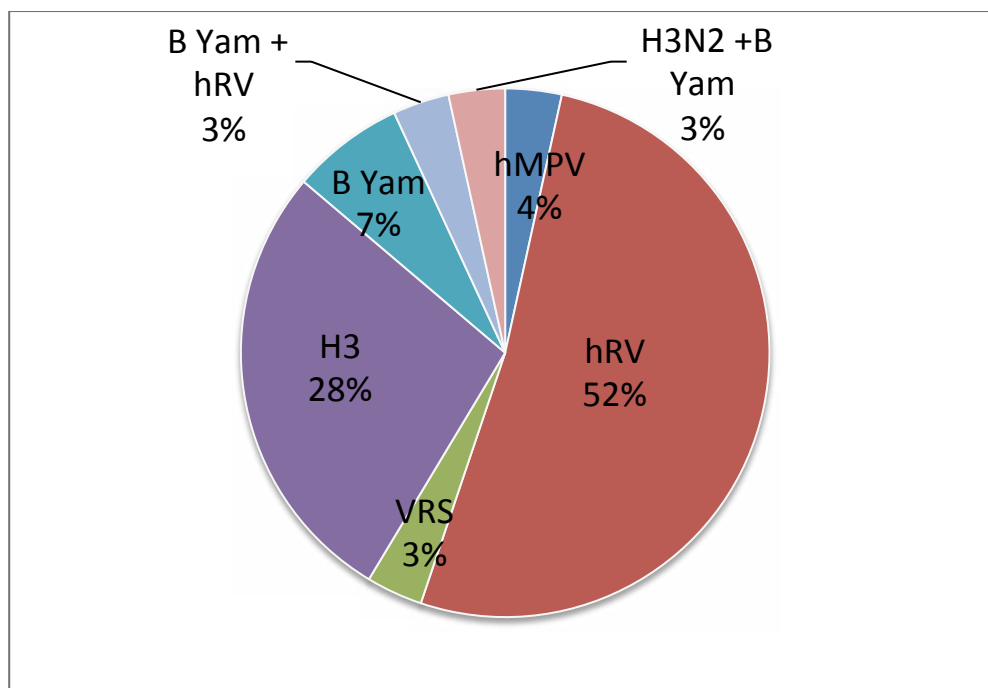


Figure 2 : Suspicion MERS-CoV - Autres étiologies

➤ **CNR IPG**

Une suspicion de MERS-CoV a été reçue au CNR-IPG en février 2015: il s'agissait d'un patient de retour d'un voyage en Asie du Sud avec escale en Jordanie, hospitalisé en réanimation pour un tableau de détresse respiratoire avec pneumopathie interstitielle bilatérale. Un diagnostic d'infection à virus Influenza A(H1N1)pdm09 a finalement été posé

Le nouveau virus de grippe aviaire A(H7N9)

Aucune suspicion A(H7N9) n'a été reçue au CNR-IPP, ni au CNR-IPG cette saison, en revanche le CNR-HCL a reçu 8 suspicions de grippe aviaire H5N1 et H7N9. Parmi ces suspicions, d'autres étiologies ont été mises en évidence : 2 virus de grippe A(H1N1)pdm09, 1 virus de grippe A(H3N2) et 2 rhino/entérovirus ont été détectés,

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

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

2.2.1.4 Collection de prélèvements provenant d'études ou de firmes

➤ **CNR-IPP**

- Étude en collaboration avec le CEA (Dr Roger Legrand) pour la mise en place d'un modèle d'infection par les virus influenza chez le macaque. D'août 2014 à novembre 2014 on été reçus: 185 prélèvements dont 71 prélèvements respiratoires (trachéal et nasal) et 114 prélèvements sanguins (sérum).
- Étude Nestlé : 423 sérums pour réalisation de la technique d'inhibition d'hémagglutination, IHA séro
- Étude BPCO 57 sérums pour la réalisation de la technique d'inhibition d'hémagglutination, IHA séro dans le cadre de l'étude « Sénescence

systémique et pulmonaire au cours de la bronchopneumopathie chronique obstructive, influence du tabagisme» dont l'INSERM est promoteur.

➤ **CNR-HCL**

- **Protocole FLUVAC 03/2015** : 594 échantillons (6 Centres: Bichat, Cochin, Limoges, Lyon, Montpellier, Rennes)
- **Thèse d'exercice de Pharmacie** Etude sur la comparaison de 3 épidémies de grippe de 2012 à 2015 chez des patients hospitalisés en réanimation (La Timone – Marseille). L'étude comprend 24 patients avec détection de virus grippaux A(H1N1)pdm09, A H3N2 et B.
- **Immunovir** : Etude chez la souris : 74 prélèvements – 66 détections de virus grippal A
- **Producteurs de Vaccins** :
 - **NOVARTIS** : 7 échantillons
 - Virus de type A** : 1 *H1N1pdm09* (A/Brisbane/10/2010) – 1 *H3N2* (A/South Australia/55/2014) – 1 *H7N9* (A/Shanghai/2/2013)
 - Virus de type B** : 2 *Lignage Yamagata* (B/Utah/9/2014) - 2 *Lignage Victoria* (B/Brisbane/60/2008)
 - Rq : les lots de semence A H7N9 ont été testés dans les conditions BSL3.*
 - **GSK** : 6 échantillons
 - A** : 1 *H3N2* (A/Switzerland/9715293/2013)
 - B** : 4 *Lignage Yamagata* (B/Brisbane/9/2014 – B/Phuket/3073/2013 x2) 1 *Lignage Victoria* (B/Brisbane/60/2008)

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

En tant que National Influenza Center (NIC) de l'OMS, les laboratoires du CNR sont destinataires chaque année, des sérums de mouton et des antigènes correspondants du kit de l'OMS dirigés contre les souches de référence entrant dans la composition vaccinale.

Les CNR-IPP et -HCL ont reçu du CCOMS de Londres (Dr J. McCauley) des sérums de furet préparés vis-à-vis des souches de virus grippaux humains de référence. Les sérums sont conservés congelés à -20°C (Tableau 3).

	Souche virale	Immun-sérum
A(H3N2)		
A/Switzerland/9715293/2013	2013-14	2014-15
A/Hong Kong/5738/2014 (W & C)	2014-15	2014-15
A/South Australia/55/2014	2014-15	2014-15
A/Norway/466/2014	2014-15	2014-15
A/Texas/50/2012		2014-15
A(H1N1)pdm09		
A/California/07/2009		2014-15
B-Yamagata		
B/Phuket/3073/2013	2012-13	2014-15
B/Massachusetts/02/2012		2014-15
B/Utah/09/2014	2014-15	2014-15
B/Wisconsin/1/2010		2014-15
B-Victoria		
B/Johannesburg/3964/2012	2014-15	2014-15
B/South Australia/81/2012	2014-15	2014-15

Tableau 3 : Sérums de furets post-infectieux et souches reçus par les CNR-IPP et -HCL (saisons de réception)

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

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

2.2.2 Sensibilité aux antiviraux

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

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

Surveillance globale :

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

Surveillance rapprochée des cas d'excrétion grippale prolongée :

Pour les patients hospitalisés, sont sélectionnés les prélèvements de patients présentant une excrétion virale prolongée (> 5 jours) ; les isolats correspondants lorsqu'ils sont obtenus sont testés en test fluorimétrique. Pour les isolats présentant une sensibilité diminuée aux INA le séquençage de la NA est réalisé. Pour les virus A(H1N1)pdm09 une RT-PCR temps réel différentielle (utilisant des sondes Taqman spécifiques) permet de détecter la mutation de résistance à l'oseltamivir H275Y dans la NA. Cette technique de RT-PCR est utilisée soit sur les isolats soit directement sur les prélèvements ce qui permet d'avoir une information même pour les prélèvements n'ayant pas permis l'isolement viral.

Surveillance des cas graves hospitalisés en réanimation :

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

2.2.2.1 Tests génétiques

Résistances aux adamantanes

Le séquençage du gène M pour les virus de type A permet de détecter la présence de mutations conférant une résistance aux adamantanes (L26F, V27A/D, A30T, S31N, G34E): tous les virus testés A(H1N1)pdm09 (n=45 CNR-IPP) et A(H3N2) (n=76 CNR-IPP) présentaient une asparagine en position 31 de la séquence de la protéine M2 associé à une résistance à l'amantadine/rimantadine.

Résistance aux inhibiteurs de la neuraminidase (INA)

➤ A(H1N1)pdm09

Au CNR-IPP, la recherche de la mutation H275Y connue pour conférer une résistance élevée à l'oseltamivir mais pas au zanamivir, a été réalisée sur un échantillonnage de prélèvements positifs pour le virus A(H1N1)pdm09 par pyroséquençage, séquençage du gène NA ou encore au moyen de RT-PCR temps réel différentielle avec des sondes spécifiques. Au total, 74 isolats et/ou prélèvements, ont été analysés, 26 provenaient de cas graves (généralement hospitalisés en réanimation).

Par séquençage du gène NA, deux virus A(H1N1)pdm09 présentant une mutation H275Y sur la neuraminidase (double population 275HY) associée à la résistance à l'oseltamivir, ont été identifiés. Le pyroséquençage a confirmé la présence de la mutation H275Y.

Un des patients hospitalisé en réanimation pour grippe grave et atteint d'une hémopathie, traitée par Tamiflu est décédé.

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

➤ A(H3N2) saisonniers

Le séquençage du gène N2 permet de détecter la présence de mutations conférant une réduction de la sensibilité à l'oseltamivir E119V, R292K et N294S. Parmi les 96 prélèvements testés, une mutation a été détectée. Un virus grippal de sous-type A(H3N2) porteur de la mutation E119V sur la neuraminidase (associée à une forte réduction de la sensibilité à l'oseltamivir) a été détecté chez un patient immunodéprimé (immunodépression pour greffe d'organe) qui avait présenté une excrétion virale prolongée malgré le traitement antiviral répété par Tamiflu. Cette réduction de la sensibilité à l'oseltamivir a été confirmée par test fluorimétrique.

➤ Virus de type B

Le séquençage du gène NA permet de détecter la présence de mutations conférant une réduction de la sensibilité à l'oseltamivir R150K, D197E/N, I221T et G407S. Aucune de ces mutations n'a été identifiée parmi les 40 virus de type B séquencés, 37 B-Yamagata, 3 B-Victoria.

2.2.2.2 Test fluorimétrique (phénotypique)

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.

Parmi les virus A(H1N1)pdm09, A(H3N2) et de type B (lignages B-Yamagata et B-Victoria) dont la sensibilité aux INA a été testée (n = 107), seuls deux ont présenté une réduction de sensibilité à l'oseltamivir (Tableau 4).

	Sentinelles/Hôpital		Autres	
	Sen	Res	Sen	Res
IPP				
A(H1N1)pdm09	9	0	0	0
A(H3N2)	12	1	0	0
B	11	0	0	0
tot	32	1	0	0
HCL				
A(H1N1)pdm09	26	1		
A(H3N2)	26	0		
B	23	0		
tot	75	1	0	0
TOTAL	107	2	0	0

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

Il s'agissait de :

- Un virus A(H3N2) isolé d'un patient de 41 ans allogreffé de cellules souches hématopoïétiques, qui a présenté une infection grippale avec excrétion persistante de virus malgré un traitement par Tamiflu. L'analyse phénotypique du virus A/Paris/1765/2015 a révélé une sensibilité très diminuée à l'oseltamivir (IC_{50} oseltamivir = 147,8 nM) en cohérence avec la détection dans la NA de la substitution E119V (détectée par séquençage)
- Un virus A(H1N1)pdm09 isolé d'une enfant atteinte d'un déficit immunitaire combiné sévère, qui a présenté une infection grippale avec excrétion persistante de virus malgré un traitement par Tamiflu. L'analyse phénotypique a révélé une sensibilité très diminuée à l'oseltamivir (IC_{50} oseltamivir = 159,8nM). L'enfant est décédée.

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

2.2.3 Distribution de matériel biologique

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

Le CNR-IPP a effectué un envoi au CCOMS de Londres en décembre 2014, en début d'épidémie, de 10 prélèvements positifs pour un virus influenza (5 virus A(H3N2) et 5 virus de grippe B de lignage Yamagata). Et un autre envoi en août 2015 de 34 prélèvements positifs pour un virus influenza (11 virus A(H1N1)pdm09, 10 virus A(H3N2), 11 virus B de lignage Yamagata et 2 virus B de lignage Victoria).

Le CNR-HCL a effectué un envoi au CCOMS de Londres en août 2014 de 8 isolats pour un virus influenza (4 virus A(H1N1)pdm09 et 4 virus de grippe B de lignage Yamagata). Il s'agissait de virus isolés de la surveillance 2014, entre le mois d'Avril et le mois de Juin 2014 à La Réunion. Puis un nouvel envoi a été effectué en janvier 2015 de 24 isolats, surveillance

communautaire et hospitalière, de virus grippaux (13 virus A(H3N2), 5 virus A(H1N1)pdm09 et 6 virus de type B lignage Yamagata).

Le CNR-IPG a effectué 1 envoi au CNR-IPP en juin 2015 de 21 prélèvements positifs pour un virus influenza (5 virus A(H1N1)pdm09, 7 A(H3N2) et 9 virus B de lignage Yamagata) et 1 envoi au CCOMS d'Atlanta (CDC) en août 2015 de 26 prélèvements positifs pour un virus influenza (7 A(H1N1)pdm09, 9 A(H3N2) 9 virus B de lignage Yamagata et 1 virus B de lignage Victoria).

Le CNR-IPP effectue aussi la diffusion de contrôles synthétiques, de souches virales et de protocoles aux laboratoires qui en font la demande (Liste en annexe 7).

Le CNR-HCL a envoyé des cellules MDCK à un laboratoire du réseau RENAL, des souches de virus grippal (A/H1N1)pdm09 et A(H3N2) à un laboratoire INSERM. En collaboration avec un laboratoire Européen, Allemagne – Hamburg, le CNR-HCL a envoyé des ARN de virus grippaux de type C et de virus grippaux de type A(H1N1)pdm09.

3 Activités de surveillance

En **Métropole**, la saison de surveillance 2014-2015 a été marquée par une épidémie grippale de forte intensité avec un pic épidémique entre les semaines S06/2015 et S08/2015 et la circulation majoritaire de virus de sous-type A(H3N2) pendant la vague épidémique. Lors de cette saison les virus de sous-type A(H3N2) ont été majoritaires dans la communauté avec 54,7% (792) des virus grippaux circulants. Parallèlement, ont également co-circulé des virus grippaux de type B 25,5% (369) et de sous-type A(H1N1)pdm09 19,6% (284).

Dans les DFA (Départements Français des Amériques) la saison 2014-2015 a été marquée par des épidémies grippales d'intensité modérée : aux Antilles, les épidémies ont démarré en semaine 4 pour se prolonger respectivement entre 10 et 13 semaines pour la Martinique et la Guadeloupe.

En Guyane, l'épidémie qui a démarré comme toujours plus tardivement, en semaine 10 (S10/2015), s'est prolongée 20 semaines au total.

Dans les 3 DFA, une co-circulation virale a été observée avec 48,9% (n=209) de virus A (parmi lesquels une majorité de A(H3N2) (n=163 ; 78%)), et 51,1% (n=218) de virus B.

3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.1.1 Surveillance en Métropole

3.1.1.1 Réseaux

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

➤ **Sentinelles**

Le réseau des médecins Sentinelles présents dans 22 régions se compose de 206 médecins généralistes préleveurs.

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

La France-Sud comporte 9 régions Aquitaine, Auvergne, Languedoc-Roussillon, Limousin, Midi-Pyrénées, Poitou-Charentes, Provence-Alpes-Côte d'Azur, Rhône-Alpes et Corse.

➤ **Réseau GROG-CHARD**

Malgré l'arrêt du réseau national GROG de surveillance de la grippe, 14 médecins du réseau des GROG de la région Champagne Ardenne ont réalisé des prélèvements cette saison. Les prélèvements ont été analysés par le laboratoire du CHU Robert Debré à Reims (Pr Laurent ANDREOLETTI) et les résultats ont été transmis au réseau Sentinelles via la CIRE Champagne Ardenne (Dr Ibrahim MOUNCHETROU NJOYA).

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

La représentativité des médecins du réseau Sentinelles est décrite dans le tableau 5 (Source Réseau Sentinelles) et leur répartition géographique est représentée Figure 3.

	Médecins généralistes	Proportion de médecins préleveurs / généralistes
Alsace	5	0,3
Aquitaine	7	0,2
Auvergne	9	0,7
Basse-Normandie	4	0,3
Bourgogne	7	0,5
Bretagne	13	0,4
Centre	15	0,7
Champagne-Ardenne	8	0,7
Corse	14	4,9
Franche-Comté	4	0,4
Haute-Normandie	3	0,2
Ile de France	22	0,2
Languedoc-Roussillon	9	0,3
Limousin	5	0,6
Lorraine	5	0,2
Midi-Pyrénées	12	0,4
Nord-Pas-de-Calais	12	0,3
Pays de la Loire	6	0,2
Picardie	3	0,2
Poitou-Charentes	4	0,2
PACA	9	0,1
Rhône-Alpes	30	0,5
FRANCE	206	0,6

*Tableau 5 : Composition du Réseau Sentinelles par région - France, saison 2014-2015.
Source : Réseau Sentinelles*

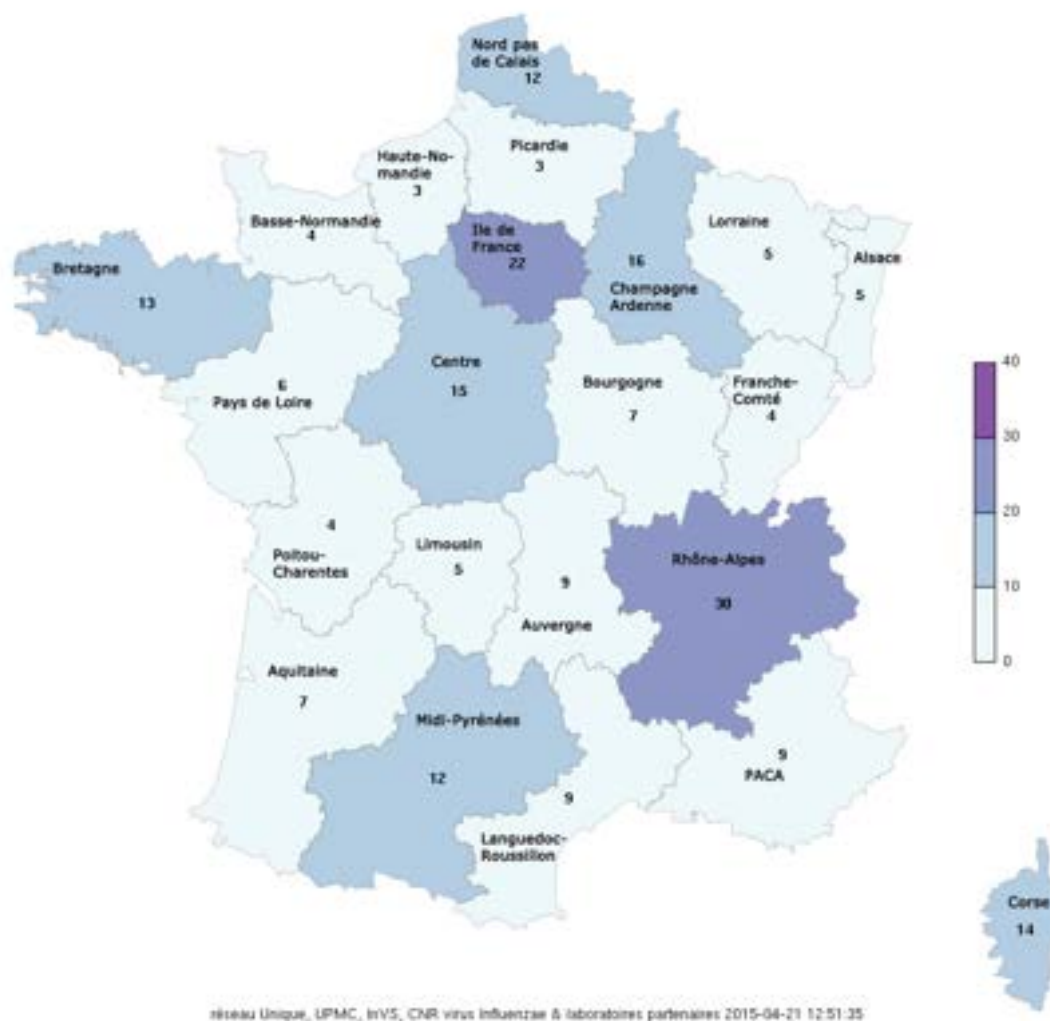


Figure 3 : Représentation géographique des médecins Sentinelles ayant participé à la surveillance virologique des syndromes grippaux saison 2014-2015, par région

➤ **RENAL**

Ce Réseau National des laboratoires hospitaliers comporte :

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

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

- en **Fance-Sud**, 15 CHU ou CHR (Aix-en-Provence, Annecy, Bordeaux, Chambéry, Clermont-Ferrand, Grenoble, Limoges, Lyon, Marseille, Montpellier, Nice, Poitiers, St Etienne, Toulon, Toulouse) qui fonctionnent toute l'année et fournissent leurs données de surveillance virologique et sérologique. La surveillance se fait de façon hebdomadaire jusqu'au mois d'avril puis à un rythme mensuel de mai à septembre.

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

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

Tableau 6 : Liste des pathogènes

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

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

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

Depuis février 2008, les laboratoires hospitaliers de la moitié nord de la France peuvent déposer leurs résultats de détection d'infections respiratoires. Pour la saison 2014-2015, le système a été modifié et a permis d'accueillir l'ensemble des données des laboratoires hospitaliers français. Aujourd'hui, environ 45 laboratoires hospitaliers participent bénévolement au réseau RENAL. Ils possèdent tous un accès sécurisé à leur page de recueil et ont la possibilité de visualiser des tableaux récapitulatifs, des analyses au cours de la saison.

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

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

3.1.1.2 Les prélèvements

Les laboratoires CNR-IPP et -HCL traitent les prélèvements qui leur sont adressés pour l'ensemble des régions respectives de France Nord et France Sud (Figure 3).

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

Dans le cadre du réseau Sentinelles, durant l'ensemble de la période de surveillance virologique (semaine 40 à semaine 15), deux patients maximum pourront être prélevés par semaine par médecin participant. Il s'agira des 2 premiers patients de la semaine consultant pour un syndrome grippal selon la définition de cas du réseau Sentinelles utilisée pour la surveillance clinique des syndromes grippaux (cf ci-dessous), s'ils n'ont pas de lien entre eux (même famille par exemple), quel que soit leur âge, et présentant des symptômes depuis moins de 48 heures.

Ce protocole de prélèvement permet en prenant en compte la patientèle de chacun des médecins généralistes, et par extension de la population surveillée, de déterminer l'impact de la grippe dans la population en métropole.

3.1.1.3 Données d'activité médicale et sanitaire

Le réseau unique, créé pour optimiser la surveillance de la grippe et d'autres indicateurs en soins de premiers recours. Depuis cette saison il est coordonné par le réseau Sentinelles.

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

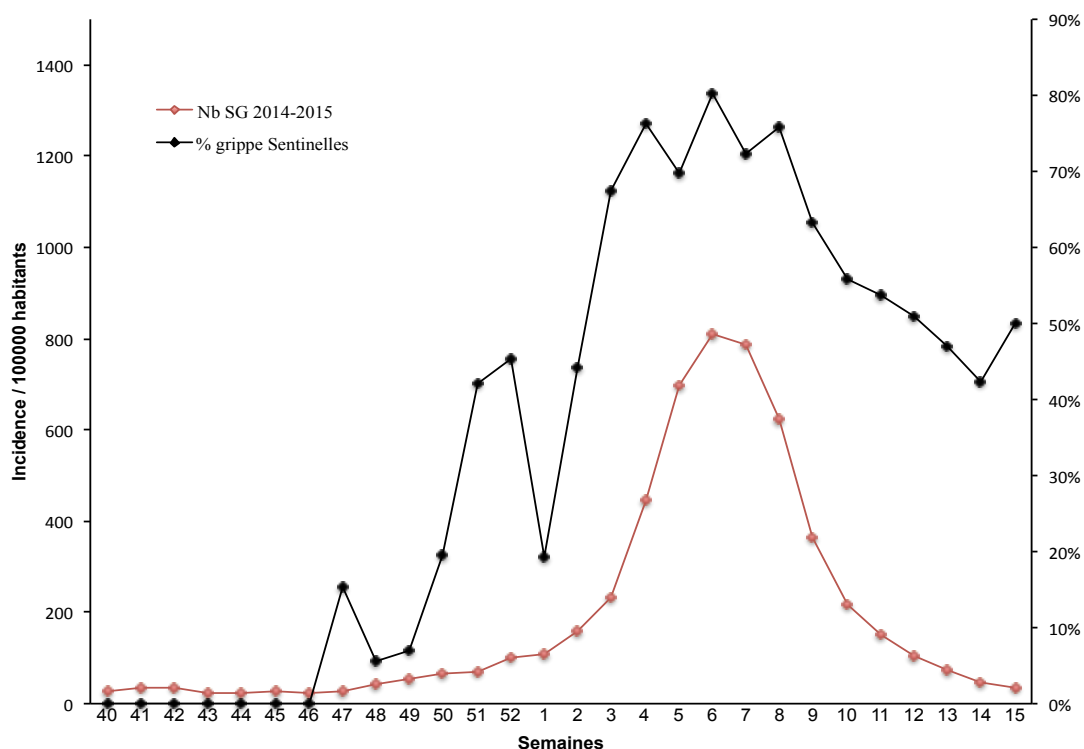


Figure 4 : Syndromes grippaux (GC) pour 100 000 habitants et pourcentage de virus grippaux détectés en médecine générale (Réseau Sentinelles) – période 40/2014-15/2015

La période épidémique pour la saison 2014-2015, définie par le franchissement du seuil épidémique du réseau Sentinelles, s'est étendue entre les semaines 03/2015 (12 au 18 janvier 2015) et 11/2015 (9 au 15 mars 2015), soit pendant 9 semaines.

Le pic d'activité a été observé en semaine 06/2015 (2 au 8 février 2015) avec un taux d'incidence de 834 consultations pour syndromes grippaux pour 100 000 habitants (Figure 4).

Comparé aux données historiques de Sentinelles et rapporté à la population, le nombre de consultations pour syndromes grippaux au pic ou sur l'ensemble de la période épidémique sont au 14^{ème} rang des valeurs les plus élevées observées ces 30 dernières saisons, confirmant une épidémie d'une ampleur forte mais non exceptionnelle.

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 5).

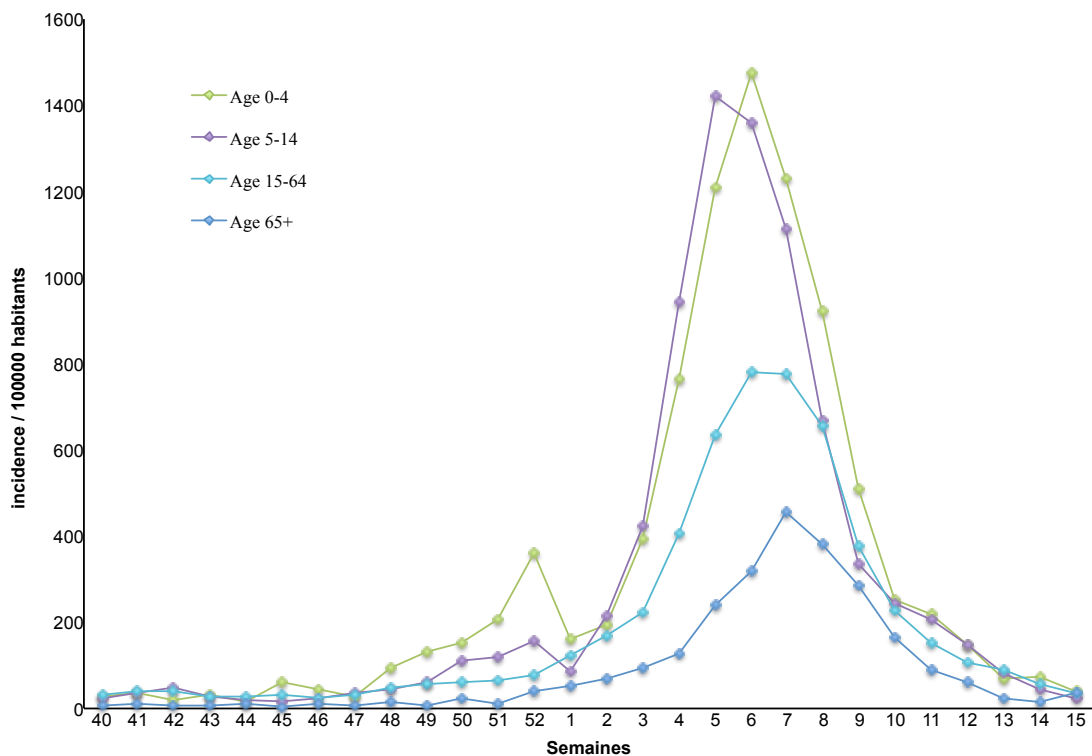


Figure 5 : Syndrome grippaux (GC) pour 100 000 habitants par tranches d'âge en France Médecine générale (réseau Sentinelles) – période 40/2014-15/2015

3.1.1.4 Surveillance virologique

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

Au plan virologique, la saison 2014-2015 présente, comme souvent, une dissociation de la circulation épidémique des VRS et des virus grippaux. Les VRS ont circulé de façon épidémiques entre les semaines S47/2014 et S09/2015 alors que la circulation épidémique des virus grippaux a débuté en semaine S02/2015 pour se terminer semaine S13/2015. L'épidémie de VRS pour la France-Sud a débuté 1 semaine après la France-Nord. Cette année, en comparaison avec la saison 2013-2014, le nombre de virus grippaux détectés a été beaucoup plus important que le nombre de VRS détectés. Comme la saison précédente, l'épidémie grippale a débuté tardivement, aux alentours de la semaine S02/2015 (Figures 6 à 8).

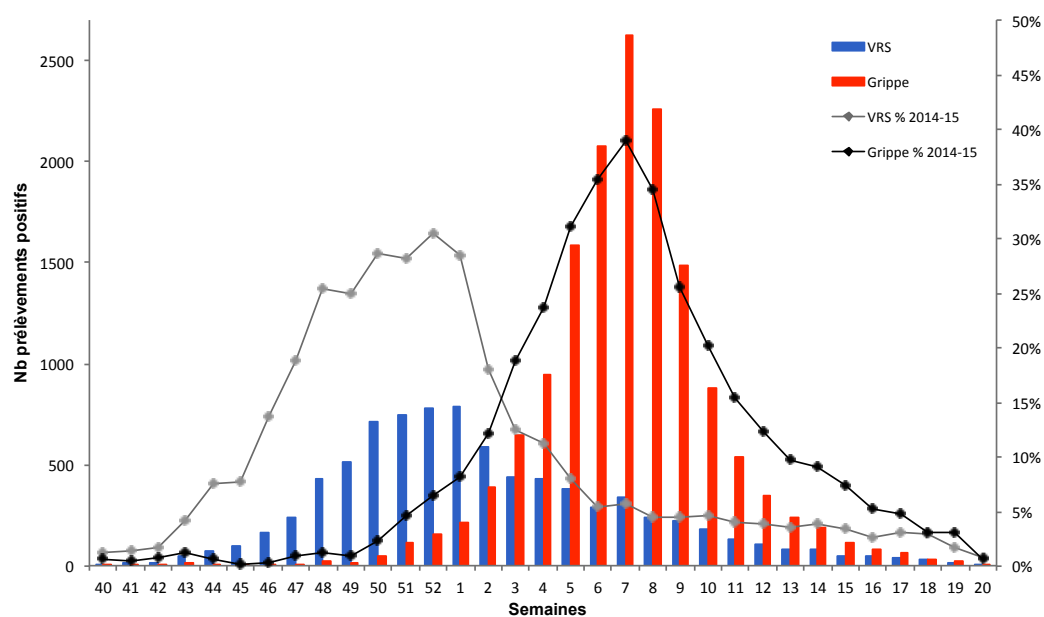


Figure 6 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2014-2015

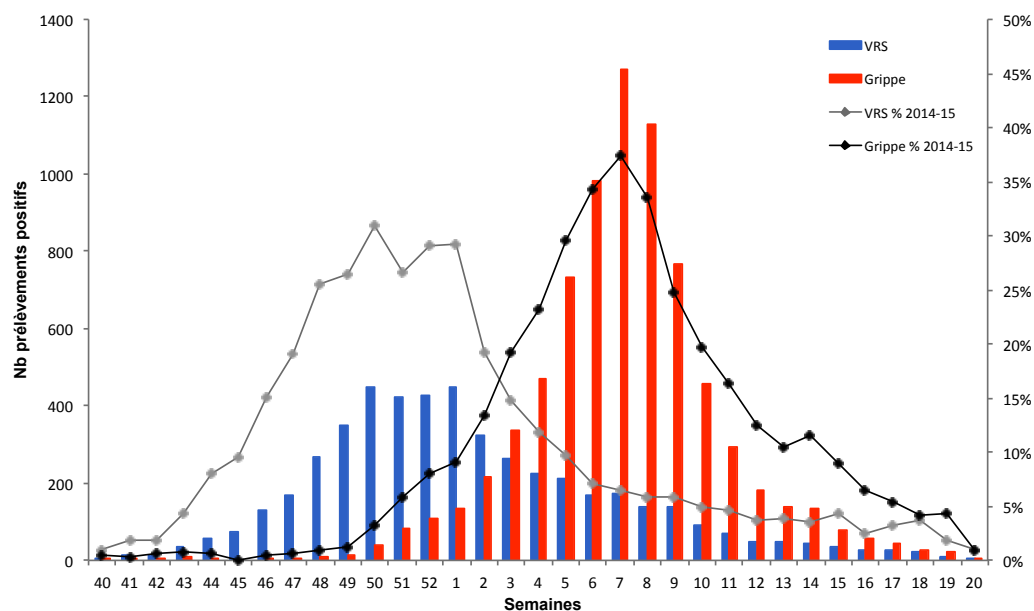
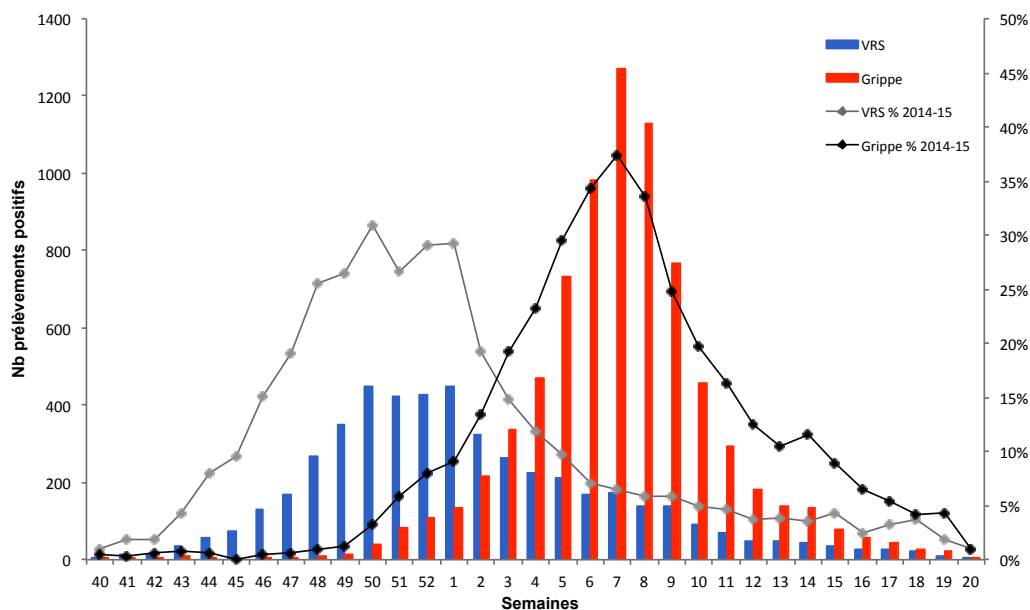


Figure 7 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France-Nord
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2014-2015



*Figure 8 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France-Sud
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2014-2015*

Au cours de la saison de surveillance 2014-2015, les détections de virus grippaux dans les prélèvements Sentinelles sont restées sporadiques jusqu'à début janvier et concernaient les 3 types/sous-types viraux, A(H3N2), A(H1N1)pdm09 et B, sans virus dominant. Les détections de virus grippaux de sous-type A(H3N2) ont ensuite augmenté de façon importante pour rester majoritaires jusqu'à la semaine S09/2015, entraînant une vague épidémique saisonnière majoritairement due aux virus grippaux de sous-type A(H3N2). Les virus grippaux de sous-type A(H1N1)pdm09 ont également circulé à un moindre niveau dépassant les 10% de prélèvements positifs des semaines S03/2015 à S08/2015 ainsi que les virus grippaux de type B (plus de 10% des prélèvements positifs des semaines S05/2015 à S14/2015). En fin de saison, à partir de la semaine S10/2015 la circulation des virus grippaux de type B était majoritaire.

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 9 semaines, de mi-janvier (S02/2015) à mars (S11/2015), avec un pic début février (S07/2015). Le taux de prélèvements positifs pour la grippe a dépassé les 10 % de mi-janvier à mi-mars, mais n'a augmenté de façon significative (>30 %) qu'au début de l'année 2015. Au pic épidémique, plus d'un prélèvement du réseau Sentinelles sur deux (75 %) était positif pour la grippe.

A l'hôpital, les mêmes tendances sont retrouvées avec des taux de détection plus faibles que ceux observés dans le cadre du réseau Sentinelles, environ 39 % de détections de virus grippaux au pic épidémique. Seuls 10 % des virus de type A sont sous-typés. En effet, la grande majorité des laboratoires hospitaliers utilise des techniques de détection capables d'identifier les virus de type A et B et de sous-typer uniquement les virus de sous-type A(H1N1)pdm09. Les virus A(H3N2) restent donc non sous-typés en grande majorité. Ce sous-typage ciblé des virus de type A(H1N1)pdm09 dans de nombreux laboratoires hospitaliers, ne permet pas d'évaluer en temps réel l'évolution épidémiologique des virus de type A. (réseau RENAL - Figures 12 à 14 ; réseaux Sentinelles et RENAL - Figures 15 à 17).

Les détections de VRS ont débuté significativement plus tôt en FN aux environs de la S43/2014. La vague épidémique a aussi été de plus forte intensité en FN avec un plateau épidémique entre les semaines S50/2014 et 01/2015. En revanche, l'évolution de l'épidémie grippale a été similaire entre FN et FS.

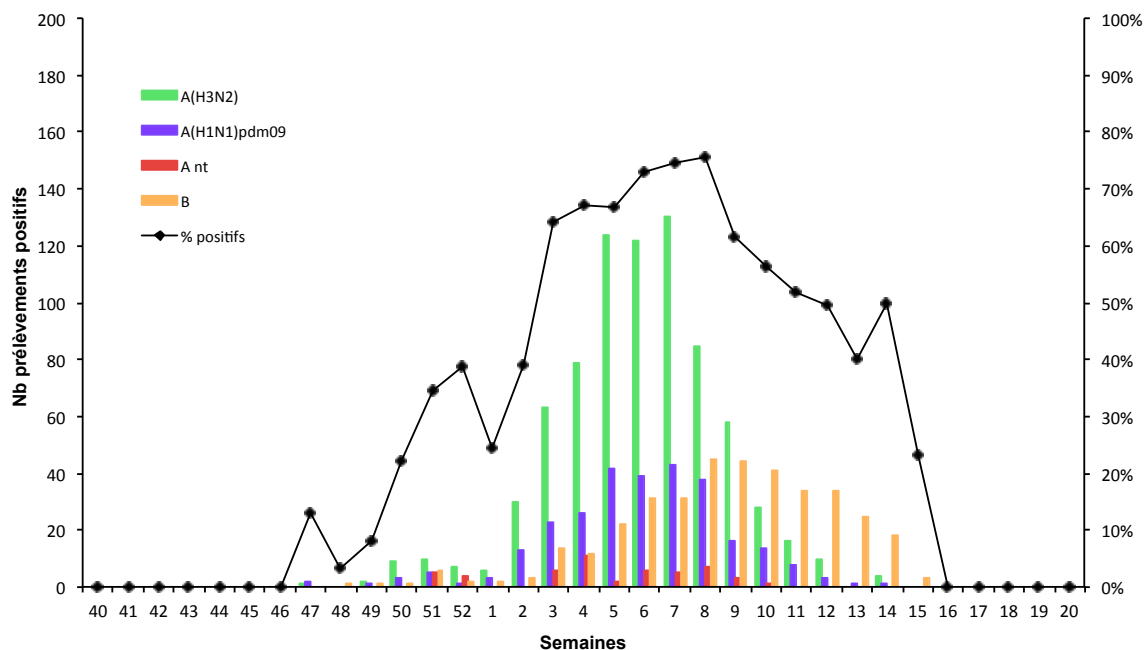


Figure 9 : Détection des virus grippaux en France
Réseau Sentinelles / saison 2014-2015

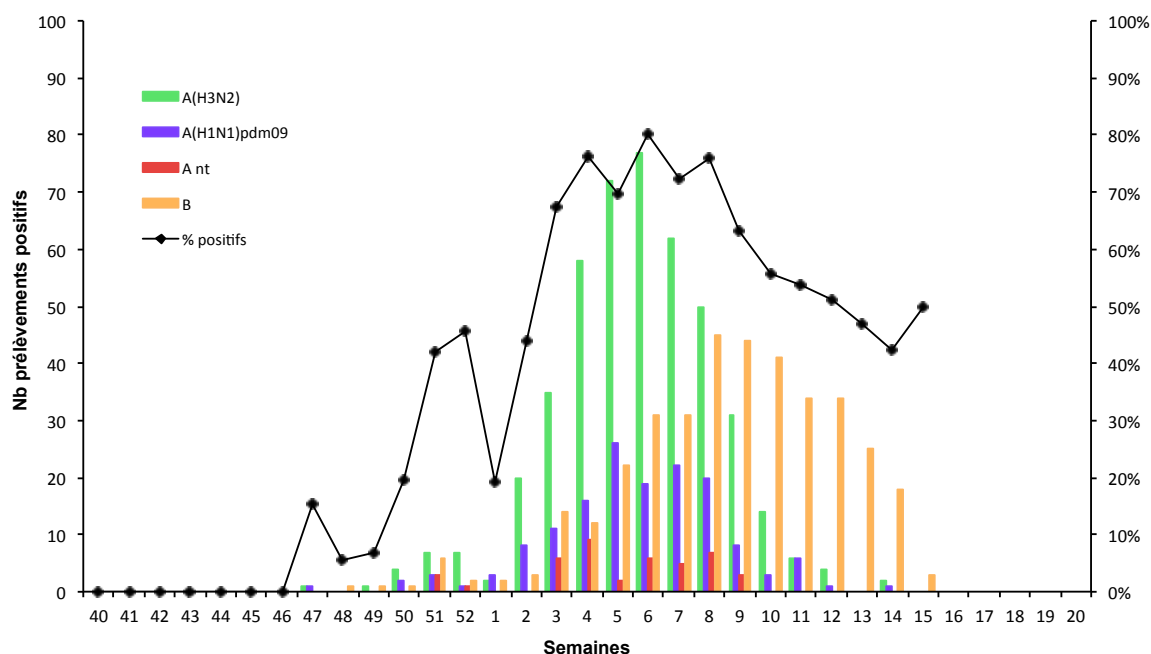


Figure 10 : Détection des virus grippaux en France-Nord
Réseau Sentinelles / saison 2014-2015

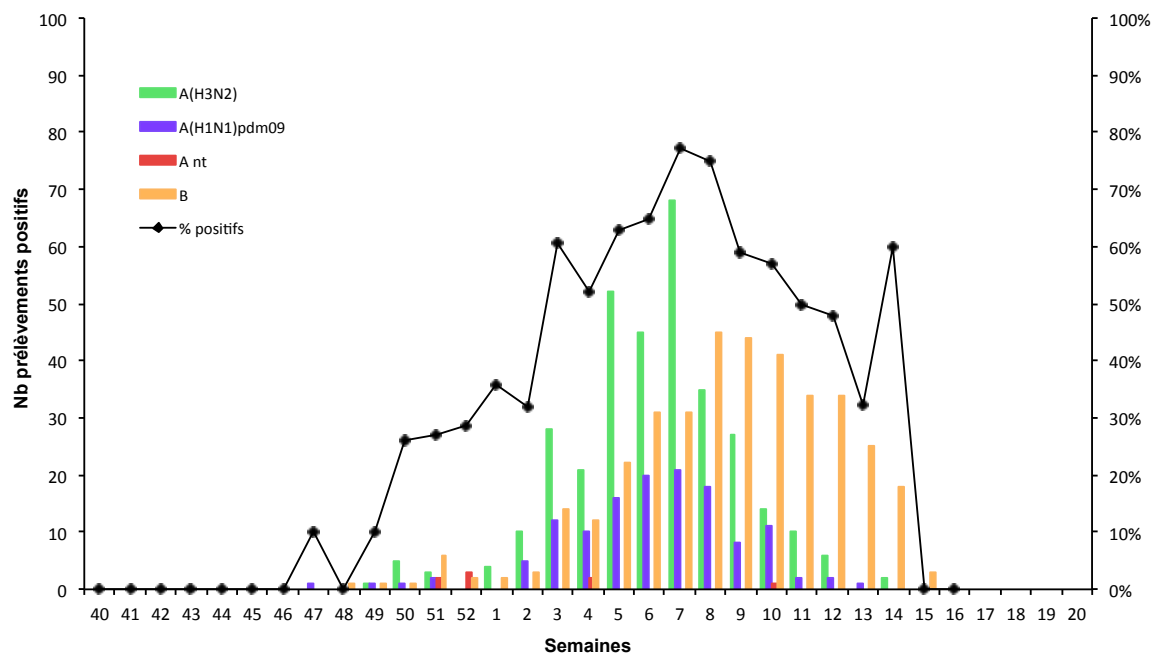


Figure 11 : Détection des virus grippaux en France-Sud
Réseau Sentinelles / saison 2014-2015

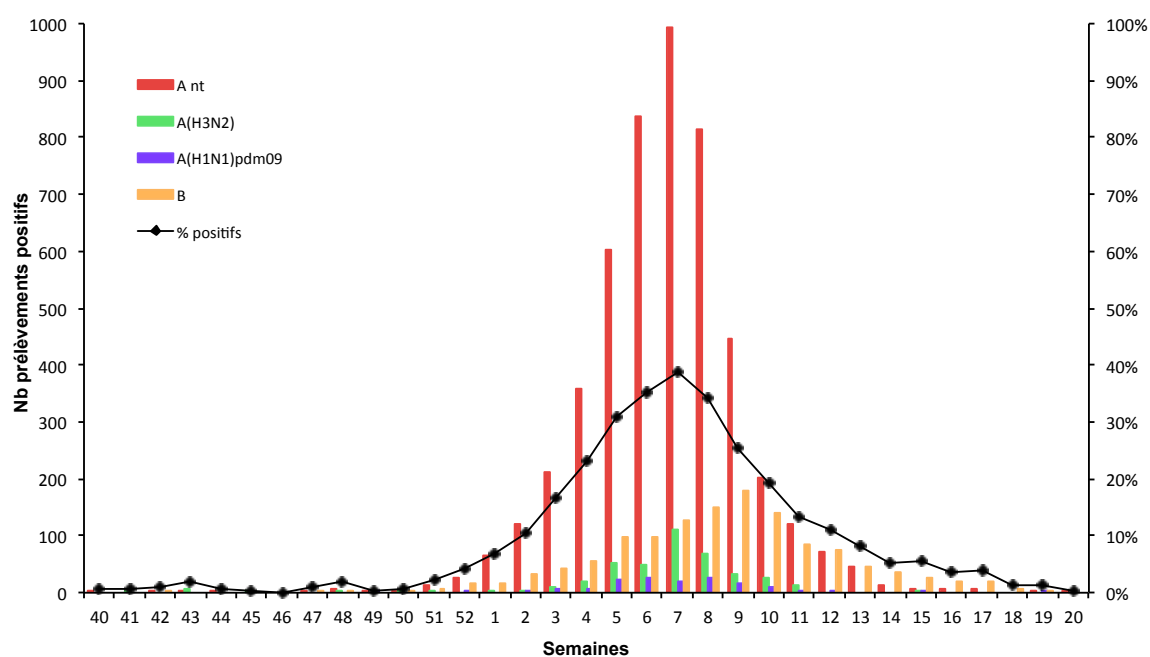


Figure 12 : Détection des virus grippaux en France
Réseau RENAL / saison 2014-2015

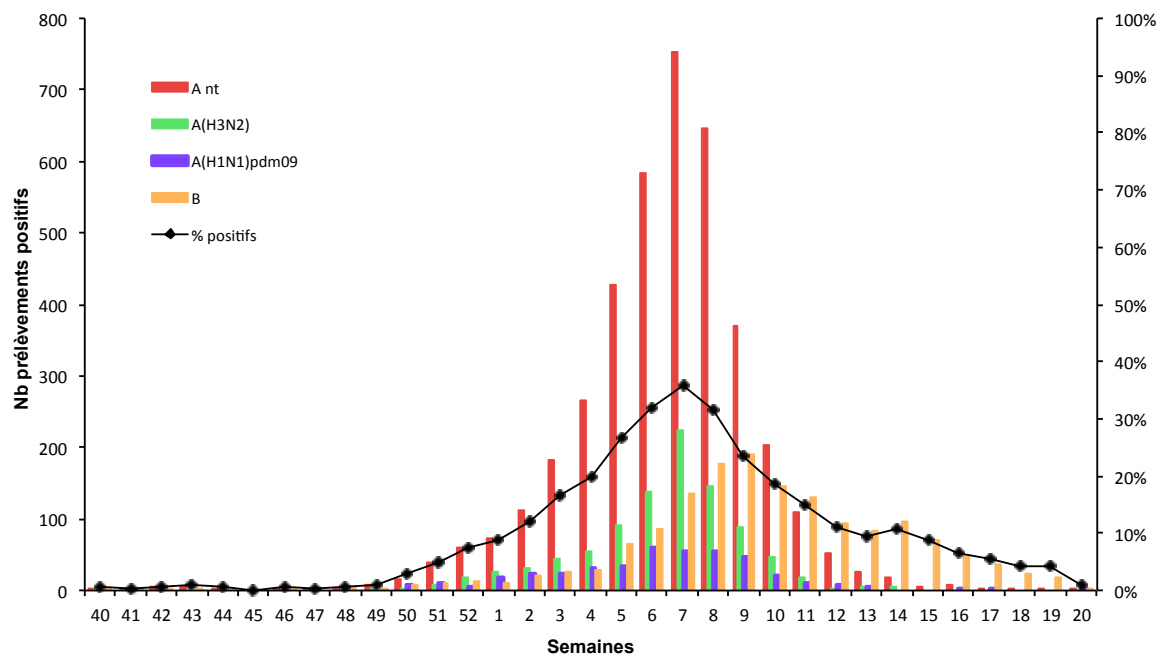


Figure 13 : Détection des virus grippaux en France-Nord
Réseau RENAL / saison 2014-2015

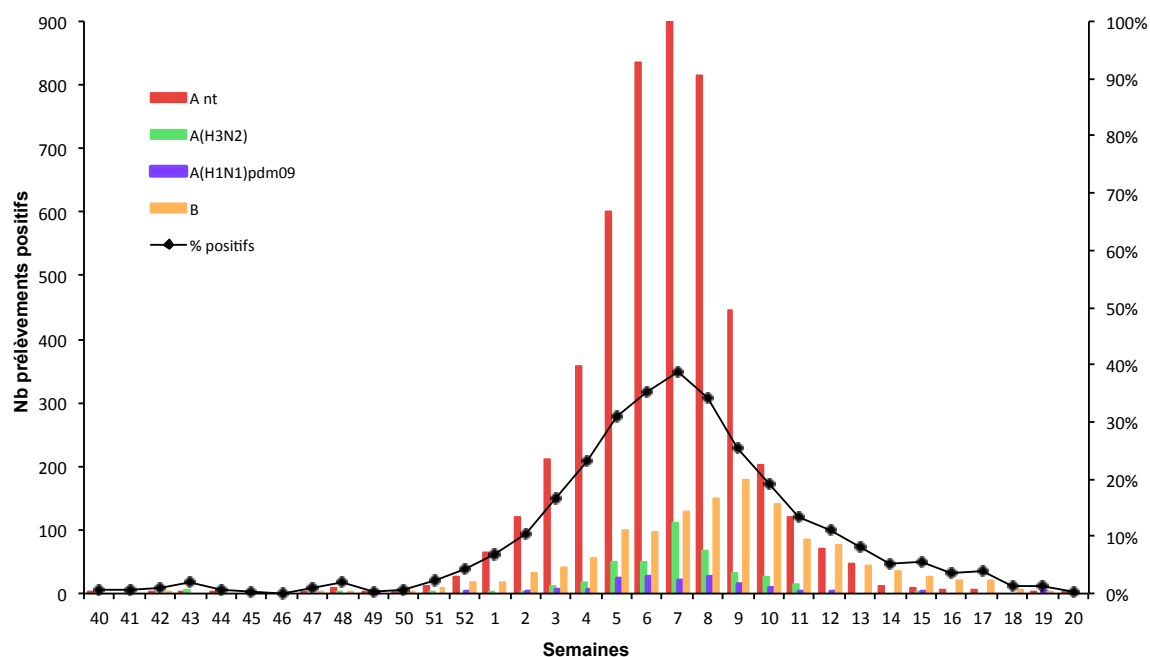


Figure 14 : Détection des virus grippaux en France-Sud
Réseau RENAL / saison 2014-2015

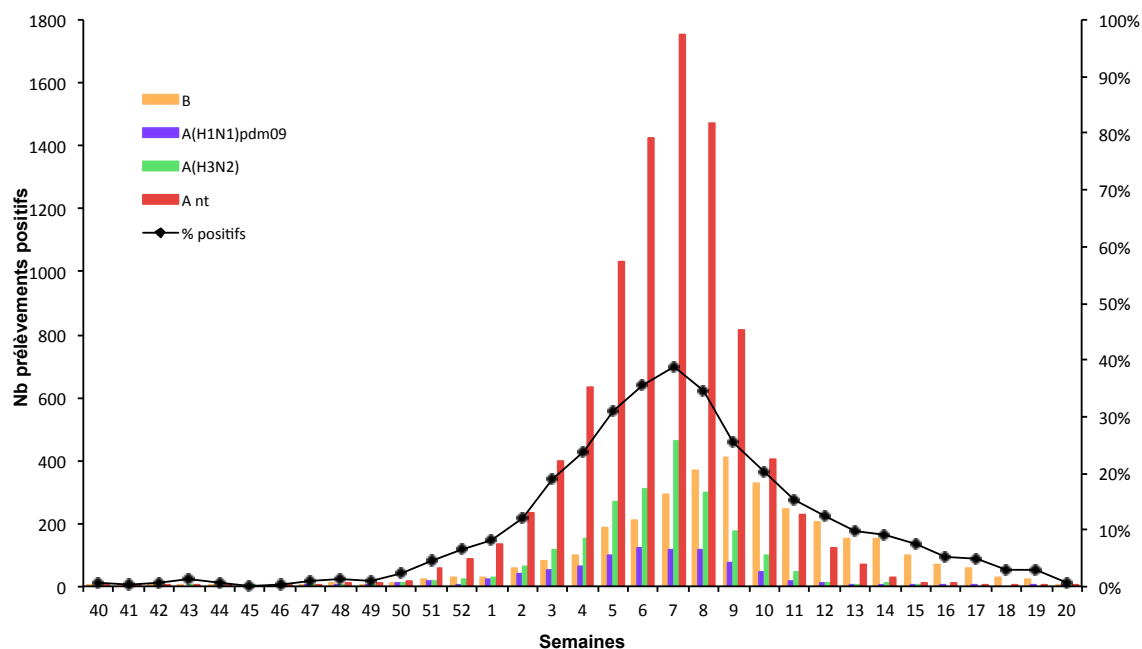


Figure 15 : Détection des virus grippaux en France
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2014-2015

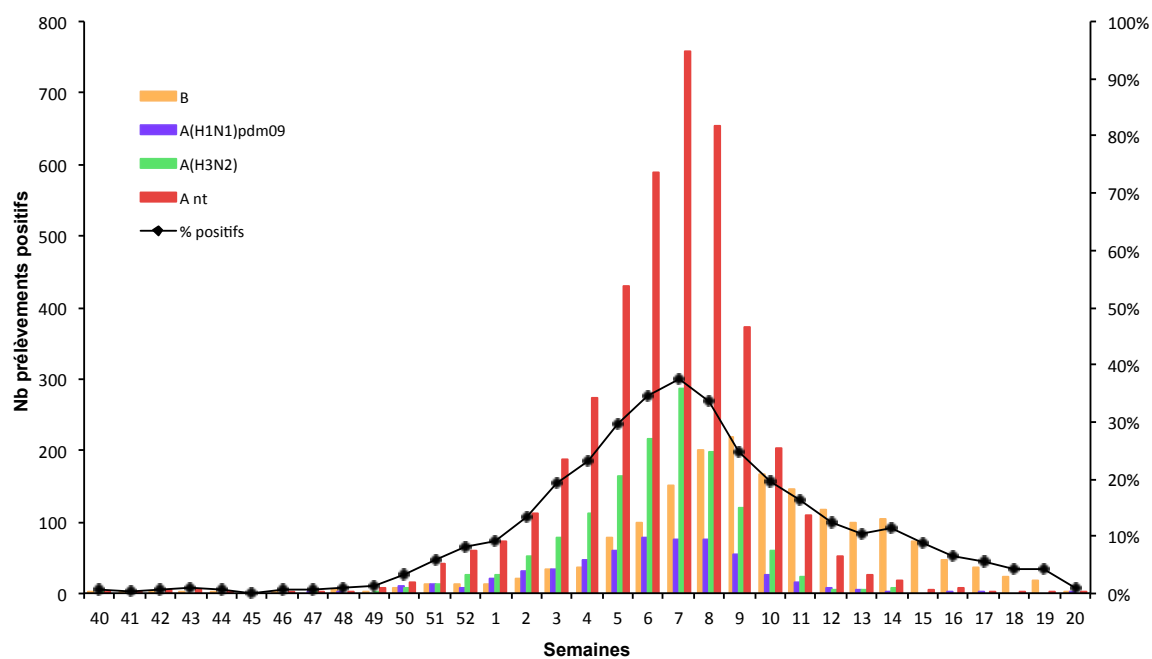


Figure 16 : Détection des virus grippaux en France-Nord
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2014-2015

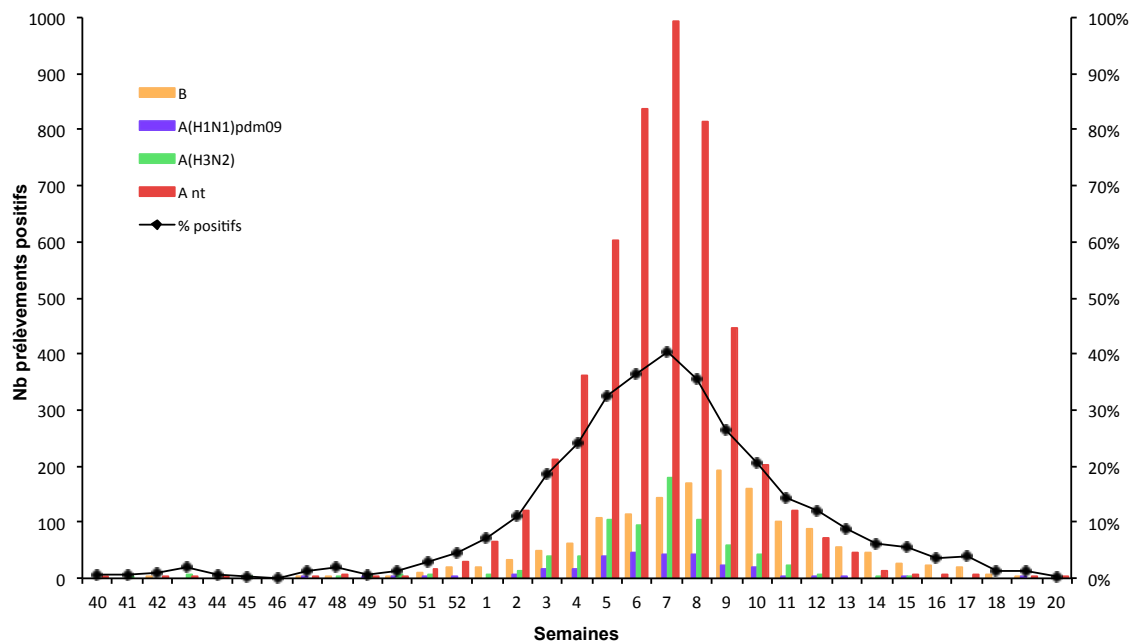


Figure 17 : Détection des virus grippaux en France-Sud
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2014-2015

➤ **Caractérisation antigénique des virus grippaux**

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

Les CNR-IPP et -HCL ont analysé par IHA un total de (709) virus grippaux parmi les virus isolés lors de la surveillance du réseau Sentinelles dans la population générale ou dans les armées ou de patients hospitalisés ou de personnes âgées vivant en collectivité. Ces souches sont issues de prélèvements des différentes régions de France.

Ainsi au total, 523 virus grippaux de type A dont 196 virus A(H1N1)pdm09, 327 virus A(H3N2) et 186 virus de type B (176 lignage B-Yamagata et 10 lignage B-Victoria) ont été caractérisés.

Virus A(H3N2)

Cette saison, les virus A(H3N2) ont présenté différents profils antigéniques avec d'une part, des virus antigéniquement proches de la souche vaccinale A/Texas/50/2012 utilisée cet hiver dans l'hémisphère nord et antigéniquement apparentés à des degrés divers à la souche A/Switzerland/9715293/2013, incluse dans la composition vaccinale de l'hémisphère sud pour la saison 2015 et d'autre part des virus variants, non couverts par le vaccin et antigéniquement proches de la souche A/Switzerland/9715293/2013.

Parmi les 327 virus A(H3N2) caractérisés par test d'inhibition d'hémagglutination par le CNR, 143 (43,7%) étaient variants et antigéniquement proches de la souche A/Switzerland/9715293/2013.

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

Virus A(H1N1)pdm09

Au total, 196 isolats A(H1N1)pdm09 ont été caractérisés par IHA par les laboratoires du CNR. Ils restent antigéniquement proches des virus de la saison 2014-2015 et apparentés à la souche vaccinale A/California/7/2009.

Virus B

Parmi les isolats de virus de type B, 186 ont été caractérisés par IHA par les laboratoires du CNR. La majorité (93%) appartenait au lignage B-Yamagata et était majoritairement analogue à la souche B/Massachusetts/2/2012 incluse dans la composition du vaccin 2014-2015.

L'ensemble des virus du lignage B-Victoria était antigéniquement apparenté à la souche B/Brisbane/60/2008.

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

Le séquençage conventionnel des virus a été réalisé pour une sélection de virus représentative des virus ayant circulé en France au cours de la saison 2014-2015. Le pyroséquençage est aussi une technique utilisée au laboratoire pour séquencer rapidement de petites régions d'intérêt au niveau desquelles des mutations peuvent se traduire par des substitutions connues responsables d'une diminution de sensibilité aux antiviraux ou de nouveaux phénotypes.

Pour les CNR-IPP et -HCL, 255 virus ont été séquencés sur 2 à 3 segments :
78 A(H1N1)pdm09 (gènes M n = 41; HA n = 74; NA n = 76) + 1 pyroséquençage
183 A(H3N2) (gènes M n = 76; HA n = 175, NA n = 181) + 12 pyroséquençages
35 B-Yam (gènes M n = 14; gènes BHA n = 21; BNA n = 35).
3 B Vic (gènes M n = 1; gènes BHA n = 3; BNA n = 3)

Les analyses phylogénétiques figurent en annexe 9.

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

Il s'agit notamment de substitutions du résidu D222 dans la HA des virus A(H1N1)pdm09 dont le polymorphisme a été associé aux formes graves). Ainsi, 70 échantillons provenant de cas grave (patients hospitalisés en réanimation) ont été analysés au CNR-IPP et HCL: chez un patient hospitalisé en réanimation, un virus grippal de sous-type A(H1N1)pdm09 porteur de la mutation D222N sur l'hémagglutinine a été mis en évidence.

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

Comme le montre le tableau 7, on remarque que la majorité des prélèvements ont été réalisés dans la tranche d'âge 15 à 64 ans (72,1%) alors que la classe d'âge 0 à 4 ans est peu représentée (5,5%), comme celle des plus de 65 ans (8,3%).

Ce sont les sujets âgés de 5 à 14 ans qui ont été les plus touchés (66,8% de positivité pour la grippe) ainsi que les sujets de plus de 65 ans (59,5% de positivité).

France métropolitaine

Age	Nb Prlv	Nb Grippe +	% de + dans la tranche âge	% du groupe d'âge/ total	% + /total +
0-4	135	62	45,9	5,5	4,5
5-14	346	231	66,8	14,0	16,8
15-64	1780	961	53,9	72,1	69,8
>65	205	122	59,5	8,3	8,8
Total	2466	1376		100	100

Tableau 7 : Distribution par âge des patients– Réseau Sentinelles

Prélèvements réalisés dans le cadre du Réseau Sentinelles et trouvés positifs pour la grippe en France / Saison 2014-2015

Dans la surveillance en médecine de ville les virus de type A et B ont co-circulé, avec une nette prédominance des virus A H3N2 (53,8%). Ceux-ci ont touché toutes les classes d'âge mais dans une moindre mesure les 15-64 ans (49,7% de positivité) proportionnellement plus touchés par les virus A(H1N1)pdm09 (22,7% vs 20,1% globalement). Les virus de type B majoritairement du lignage Yamagata ont touché toutes les classes d'âge de façon équivalente (Tableau 8).

Age	Nb Grippe +	Nb grippe A non sous-typé	(%)	Nb grippe A H1pdm09	(%)	Nb grippe A/H3	(%)	Nb grippe B	(%)	total
0-4	62	0	0	12	19,3	38	61,2	12	19,3	100
5-14	231	0	0	31	13,4	147	63,6	53	22,9	100
15-64	961	2	0,2	218	22,7	478	49,7	263	27,4	100
>65	122	0	0	16	13,1	78	63,9	28	22,9	100
Total	1376	2	0,1	277	20,1	741	53,8	356	25,9	100

*Tableau 8 : 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 2014-2015*

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

Lors de la saison 2014-2015, parmi les prélèvements de patients pour lesquels le statut vaccinal était connu (98,7 % des patients Sentinelles), 8,6 % seulement provenaient de patients vaccinés (inférieur aux 11,7 % de vaccinés parmi les patients prélevés de la saison 2008-2009) (Tableau 9). Le pourcentage de détection de grippe était de 60,8% parmi les vaccinés et de 55,4 % chez les non vaccinés, valeurs différentes des années précédentes (31,5 % parmi les vaccinés et 35,4 % chez les non vaccinés en 2013-14), vraisemblablement due à la circulation de virus A(H3N2) variants.

France métropolitaine

Statut	Grippe +		Grippe -		Effectif	
	Nbre	(%)	Nbre	(%)	Nbre	(%)
Vaccinés	127	9,3	82	7,6	209	8,6
Non Vaccinés	1234	90,7	991	92,4	2225	91,4
Total	1361		1073		2434	

*Tableau 9 : Statut vaccinal - Distribution des virus grippaux détectés au CNR
Réseau Sentinelles / saison 2014-2015*

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 (1,5 à 6,7%). Pour les plus de 65 ans, qui correspondent traditionnellement à la tranche d'âge la mieux vaccinée, les prélèvements réalisés chez les vaccinés ont représenté 44,1%, valeur en baisse par rapport à l'année dernière (saison 2012-13 45,4%, saison 2013-14 51,9%) (Tableau 10).

Age (ans)	0-4	(%)	5-14	(%)	15-64	(%)	≥65	(%)
Vaccinés	2	1,5	6	1,8	111	6,7	90	44,1
Non Vaccinés	130	98,5	334	98,2	1647	93,6	114	55,9
Total	132		340		1758		204	

*Tableau 10 : Statut vaccinal - Distribution par tranche d'âge
Nombre de prélèvements de patients testés au CNR - Réseau Sentinelles / saison 2014-2015*

Remarque : Les comparaisons avec les saisons précédentes sont à prendre avec beaucoup de prudence en raison du changement de la définition de cas suite au changement de réseau de surveillance communautaire cette saison.

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

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

➤ VRS

Les circulations épidémiques du VRS et des virus grippaux ont 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 1 semaine pour la région sud (Figures 18 à 20). Sa circulation au cours de la saison a été légèrement moins intense que l'année dernière, dans les hôpitaux. Le manque de pédiatres dans le réseau Sentinelles ne permet pas d'évaluer l'incidence des VRS en médecine ambulatoire.

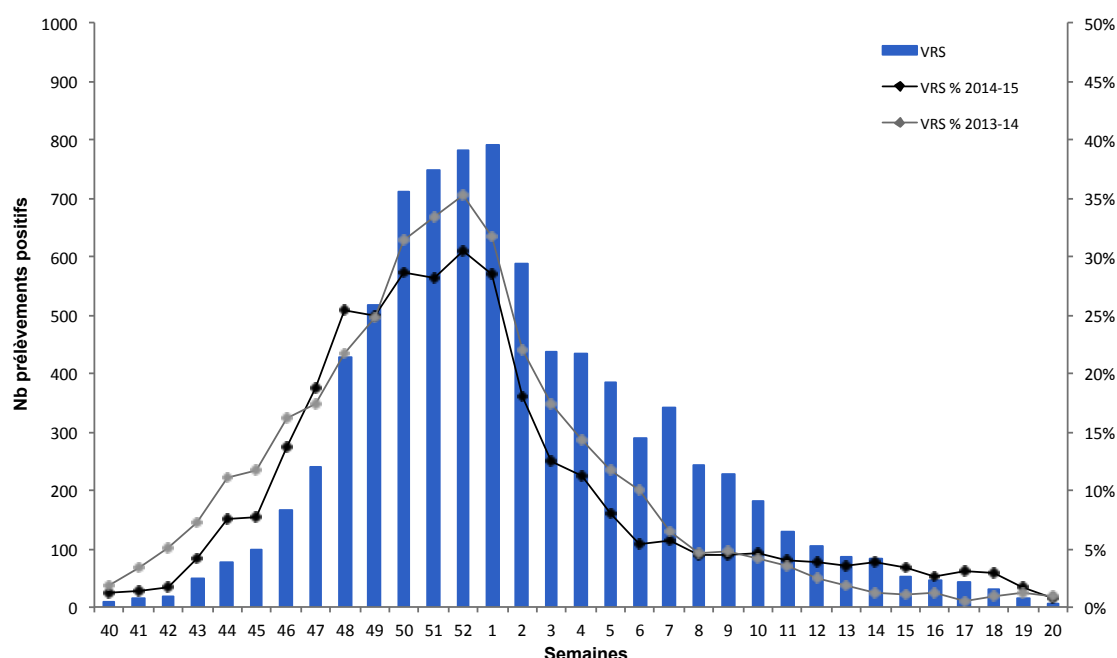


Figure 18 : Détection du VRS en France
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2014-2015

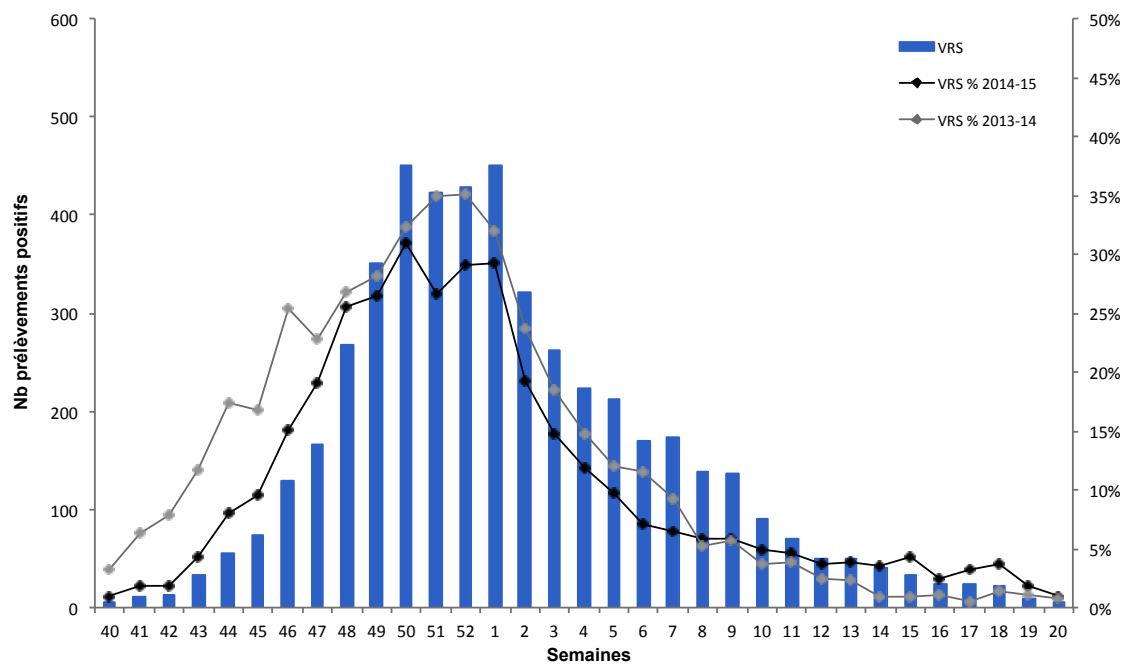


Figure 19 : Détection du VRS en France-Nord
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2014-2015

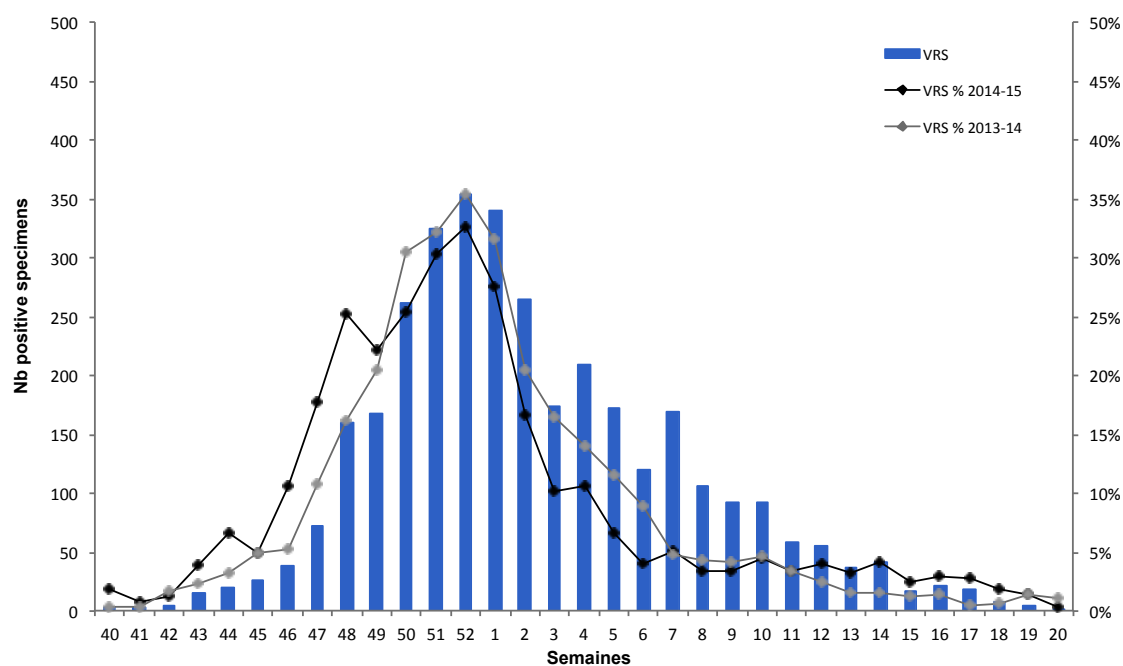


Figure 20 : Détection du VRS en France-Sud
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2014-2015

➤ Rhinovirus humains

Les rhinovirus ont été détectés de façon quasiment continue tout au long de la saison 2014-2015. Leur circulation a diminué lors de l'épidémie de VRS (S48/2014-S04/2015) et ils se sont maintenus à un taux faible tout au long de l'épidémie de grippe (S02/2015-S13/2015) (Figures 21 à 23).

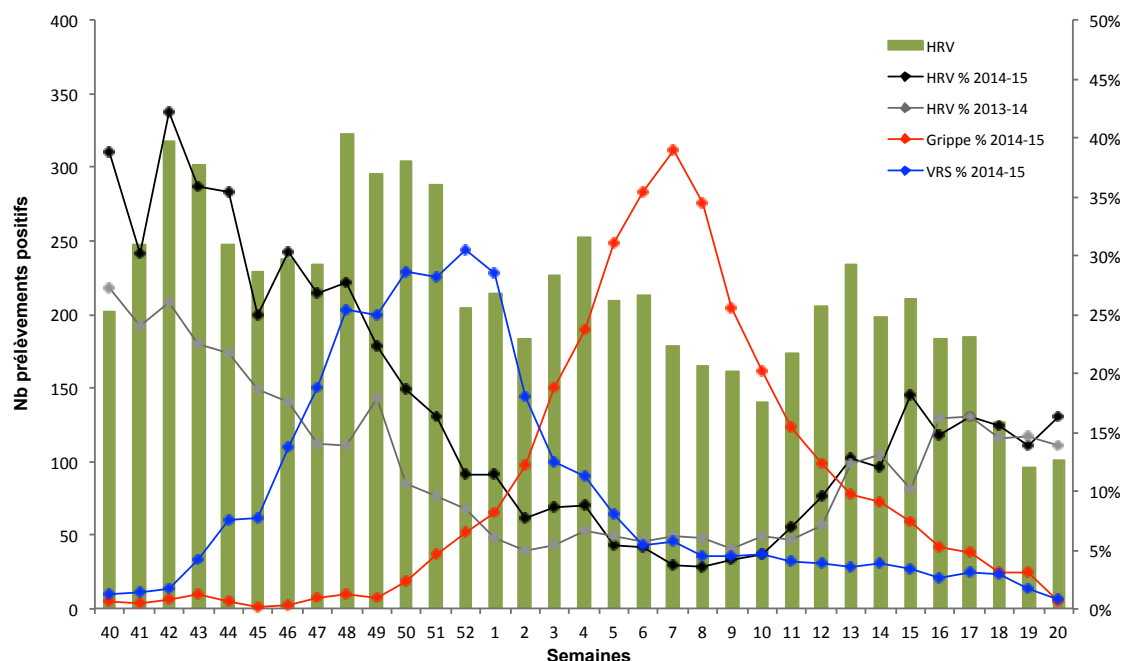


Figure 21 : Détection des rhinovirus humains en France
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2014-2015

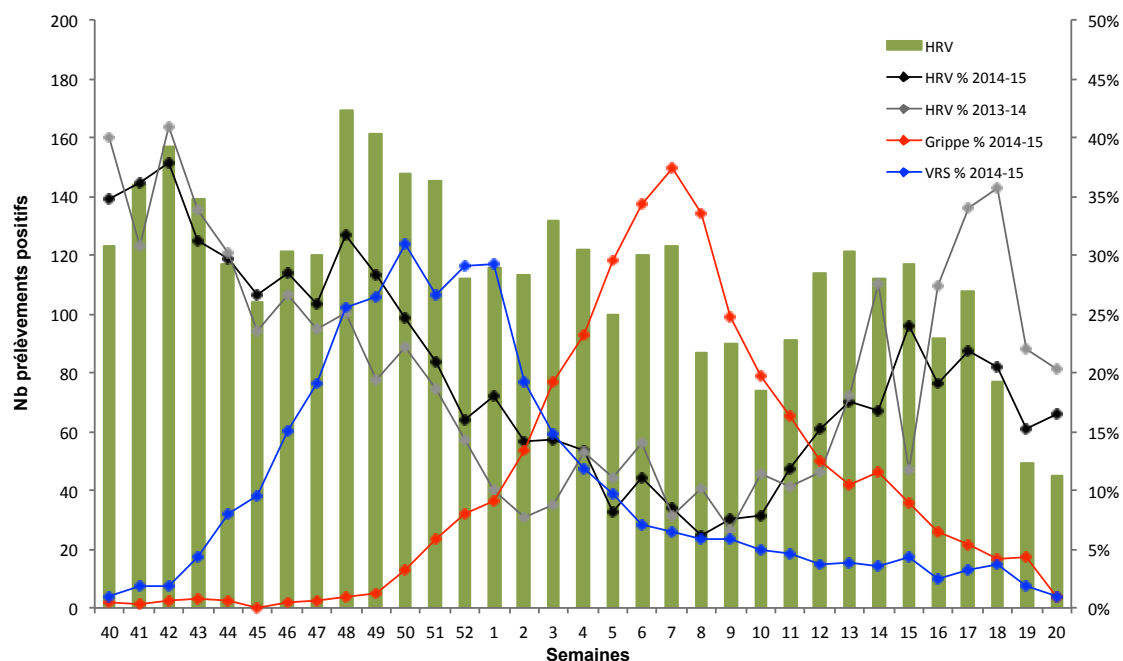


Figure 22 : Détection des rhinovirus humains en France-Nord
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2014-2015

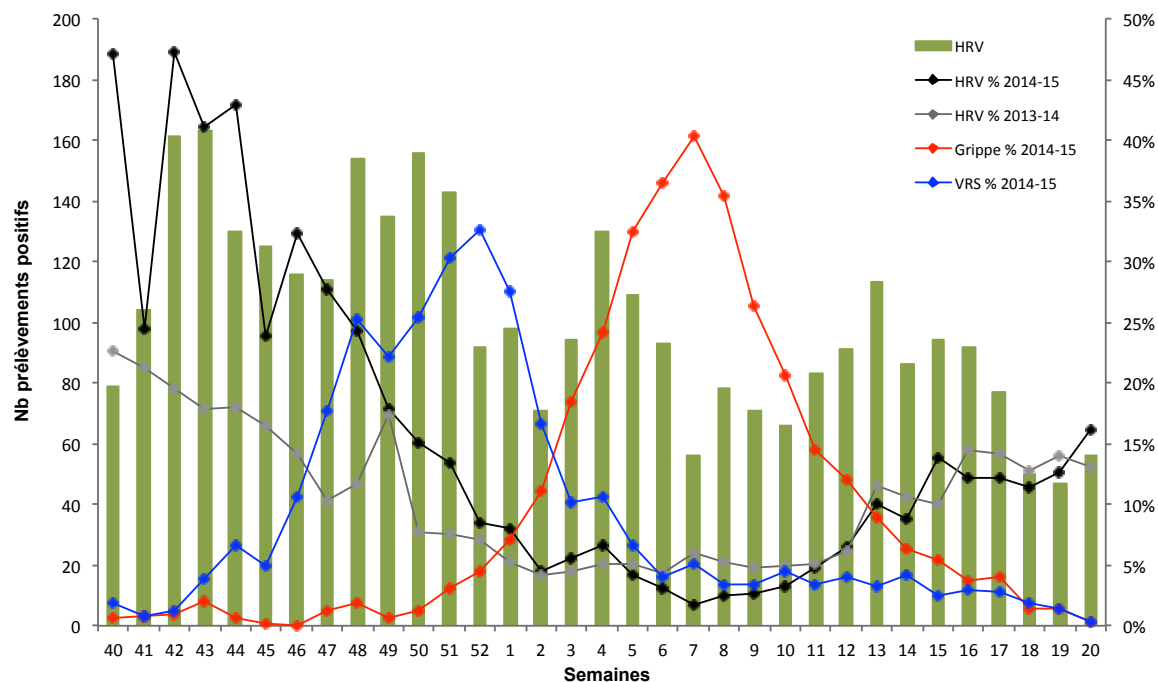


Figure 23 : Détection des rhinovirus humains en France-Sud
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2014-2015

➤ Adénovirus

Les adénovirus ont été détectés/isolés de façon continue tout au long de la saison 2014-2015 avec une circulation globalement faible et un pourcentage de prélèvements positifs toujours inférieur à 5% (Figure 24).

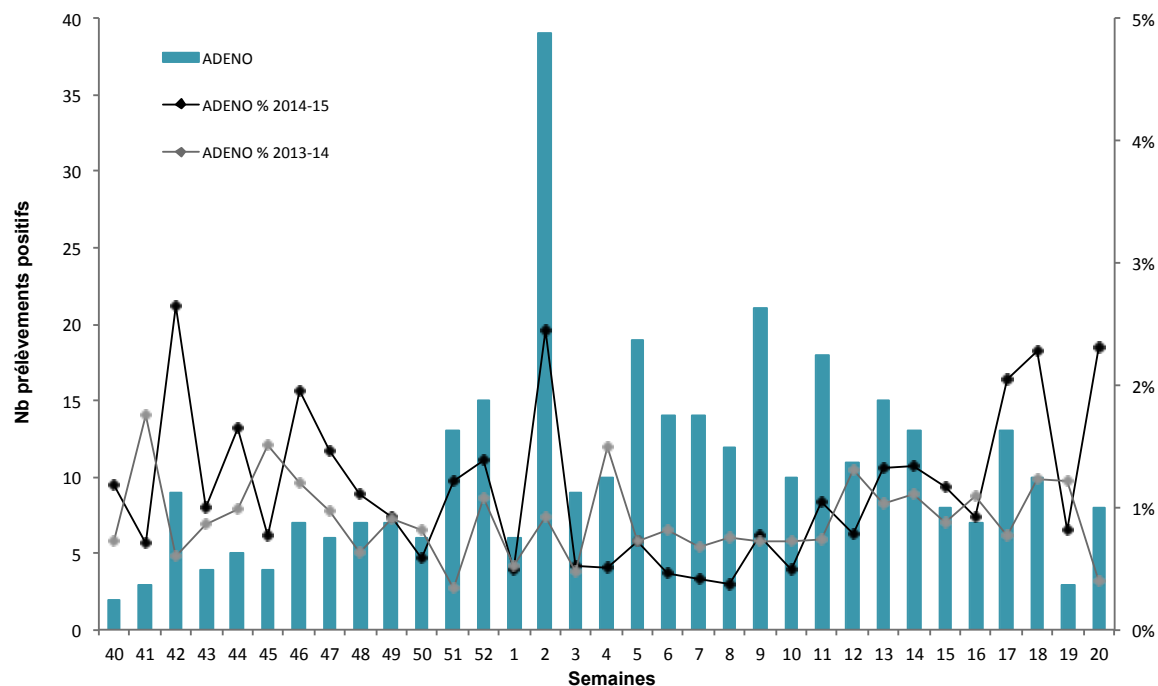


Figure 24 : Détection des adénovirus en France
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2014-2015

➤ **Virus parainfluenza**

Les virus parainfluenza ont été détectés à un niveau faible tout au long de la saison 2014-2015 (Figure 25).

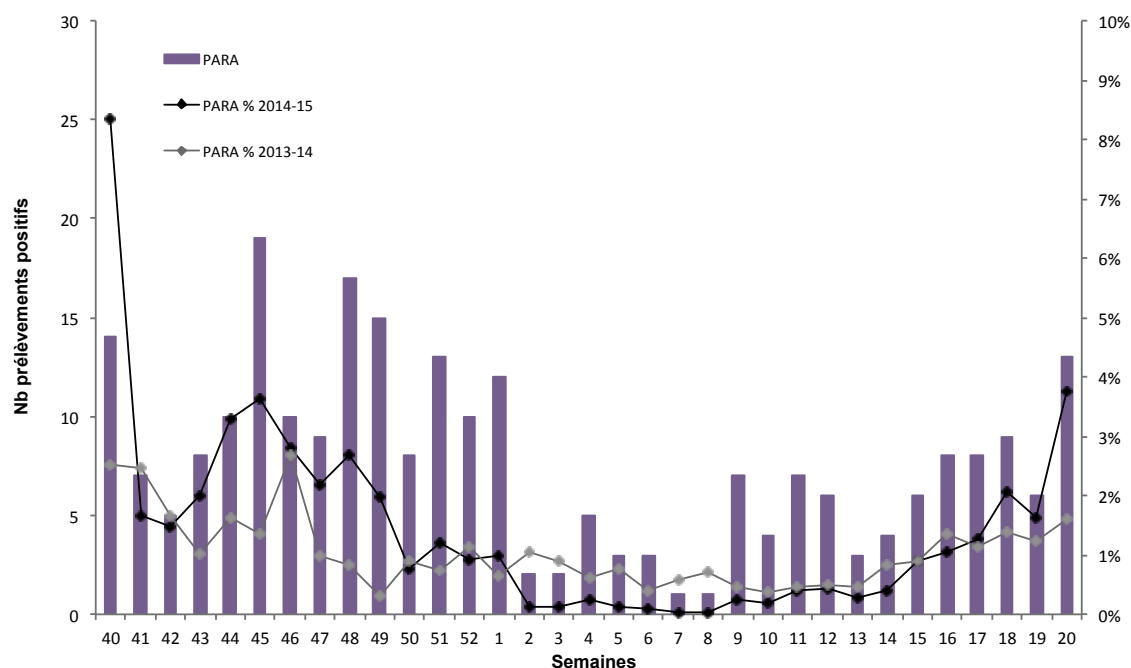


Figure 25 : Détection des virus parainfluenza en France
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2014-2015

➤ **Métapneumovirus humains**

Comme la saison dernière, la circulation des métapneumovirus humains a augmenté de façon continue tout au long de l'hiver 2014-2015 avec des valeurs légèrement inférieures à celles de la saison 2013-2014 en particulier en fin de saison (Figure 26).

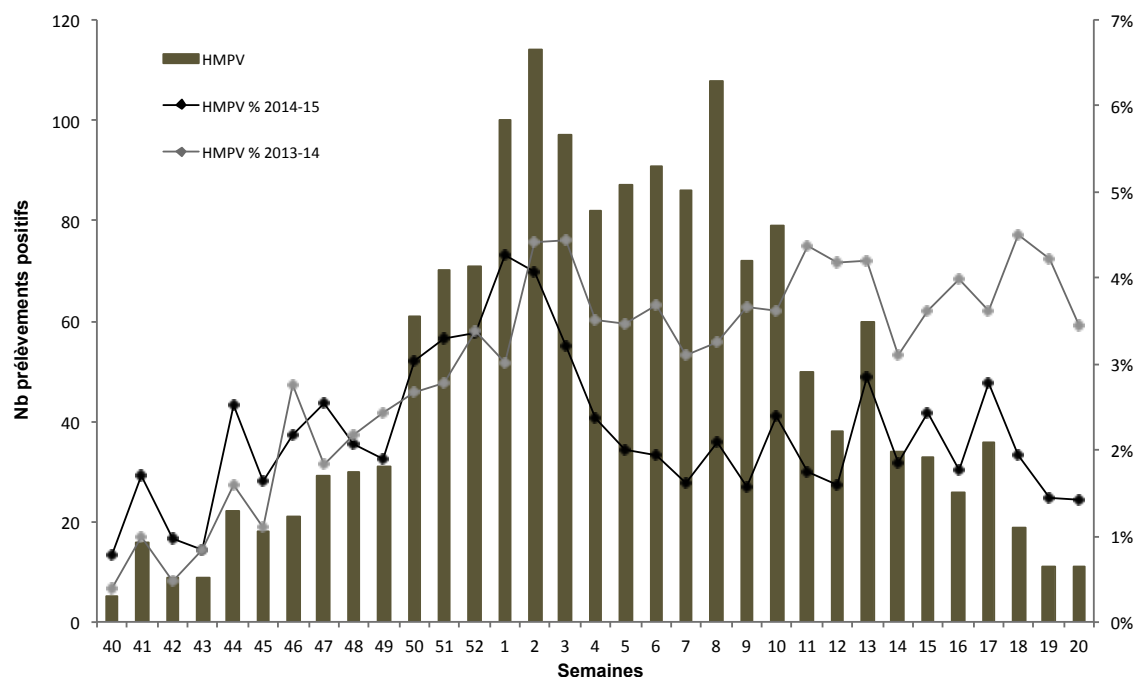


Figure 26 : Détection des métapneumovirus humains en France
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2014-2015

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

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

3.1.2 Surveillance en Région Antilles-Guyane

3.1.2.1 Réseau de partenaires

La surveillance de la grippe et des infections respiratoires aiguës repose en grande partie sur une surveillance en population générale menée en partenariat avec les ARS concernées, la Cire Antilles-Guyane et les réseaux sentinelle Grippe de Guyane, Martinique et Guadeloupe. En Guyane, le réseau sentinelle est constitué de 18 médecins généralistes choisis dans les communes du littoral (seules accessibles par la route et où réside environ 80% de la population) : Cayenne, Rémire-Montjoly, Matoury, Macouria, Kourou, Sinnamary, Mana et St Laurent du Maroni. En Guadeloupe et en Martinique, les réseaux de médecins sentinelles se composent chacun de 12 médecins généralistes. Si en Guyane, la surveillance des virus grippaux est annuelle, aux Antilles cette dernière n'est activée que de décembre à avril.

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

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

Enfin, des laboratoires d'analyses de biologie médicale (LABM) privés, dont le LABM de l'Institut Pasteur de la Guyane ou encore des Centres Délocalisés de Prévention et de Soin (CDPS) participent à cette surveillance.

➤ Résultats de la surveillance

Données d'activité sanitaire

Sur la base des estimations du nombre hebdomadaire de patients ayant consulté un médecin généraliste pour syndrome grippal, l'épidémie de syndrome grippal en Guyane a démarré, en semaine 10 (S10/2015), encore plus tardivement que les saisons précédentes. Après avoir atteint son acmé en semaine 25, elle s'est prolongée jusqu'en semaine 29, soit 20 semaines au total. Elle est restée d'ampleur modérée. 2 cas sévères hospitalisés en réanimation et 1 décès ont toutefois été rapportés.

En Guadeloupe, l'épidémie également d'ampleur modérée a démarré en semaine 04 (S04/2015) pour se prolonger jusqu'en semaine 16 (S16-2014); 3 formes sévères justifiant d'une hospitalisation en réanimation ont été enregistrées.

En Martinique, l'épidémie a également démarré en semaine 4 (S04/2015) pour se prolonger jusqu'en semaine 13 (S13-2014). Bien que de durée plus courte qu'en Guadeloupe ou surtout en Guyane (10 semaines contre 12 ou 20 semaines respectivement) l'épidémie de Martinique est celle pour laquelle le plus grand nombre de cas estimés est rapporté (20690 cas contre 7460 ou 11640 respectivement) avec également plus de cas sévères : 6 cas sévères hospitalisés en réanimation dont 1 décès). (cf Figures 27 à 29).

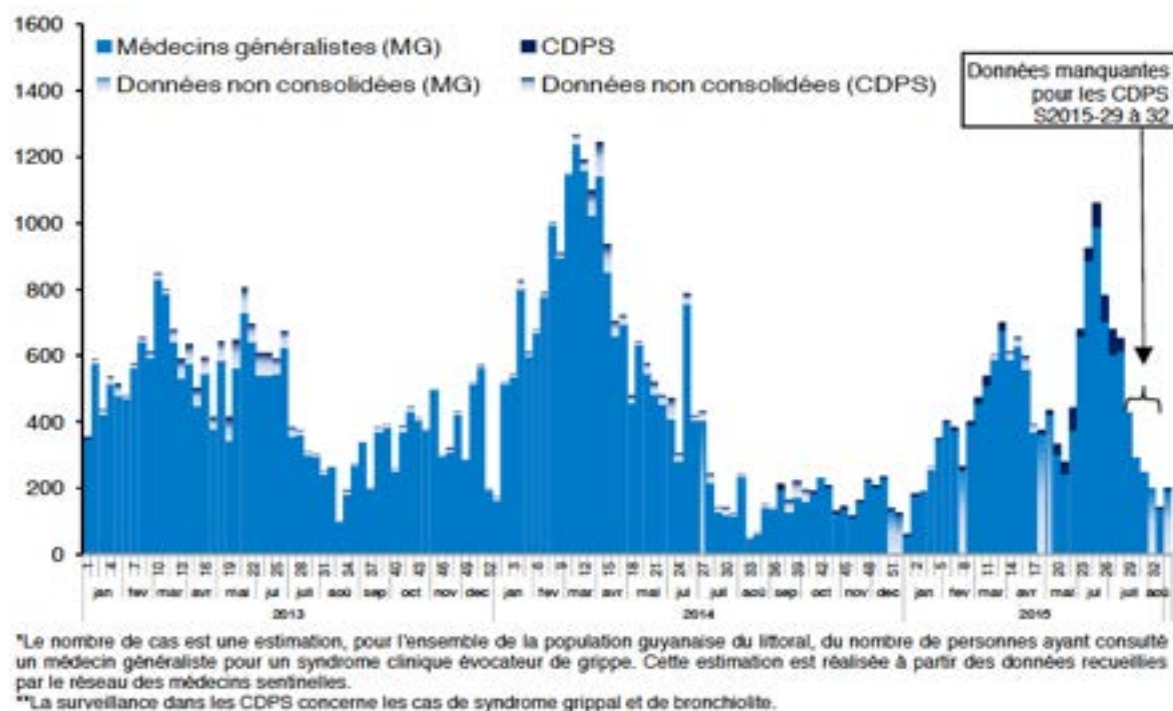


Figure 27 : Estimation du nombre hebdomadaire de consultations pour syndrome grippal Médecins généralistes de Guyane ou CDPS – janvier 2013 à août 2015 (Source Cire Antilles Guyane)

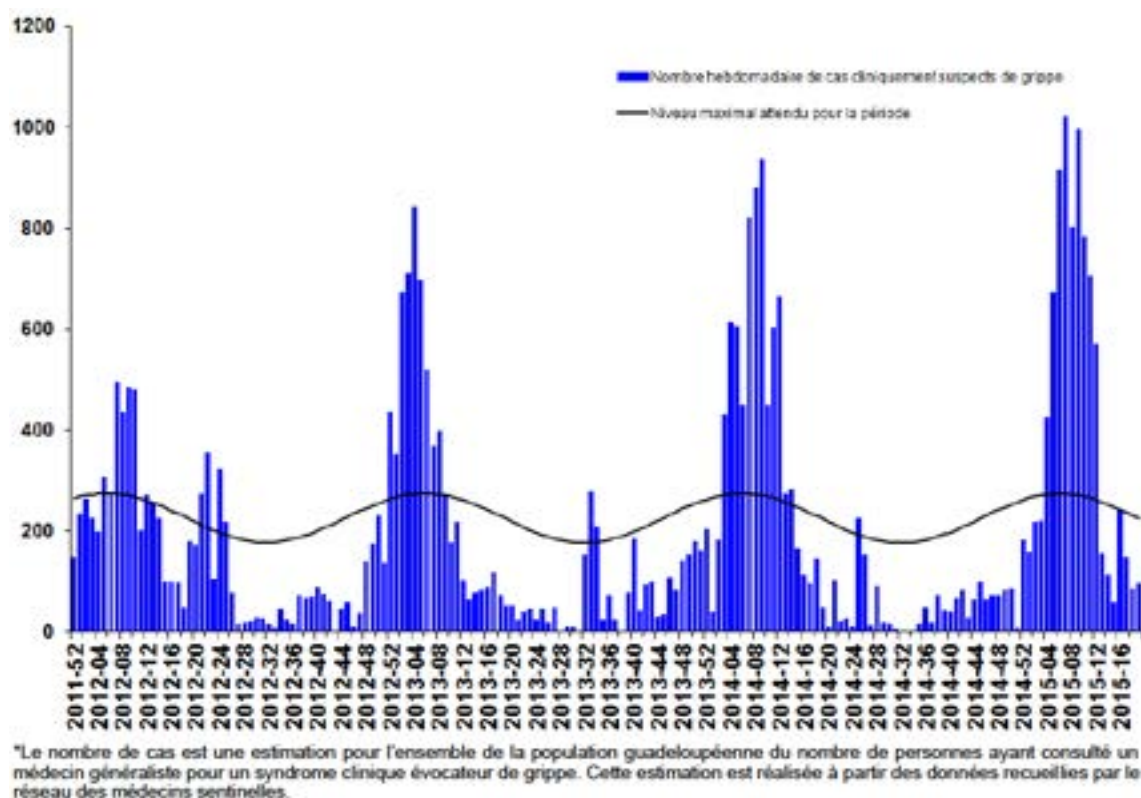
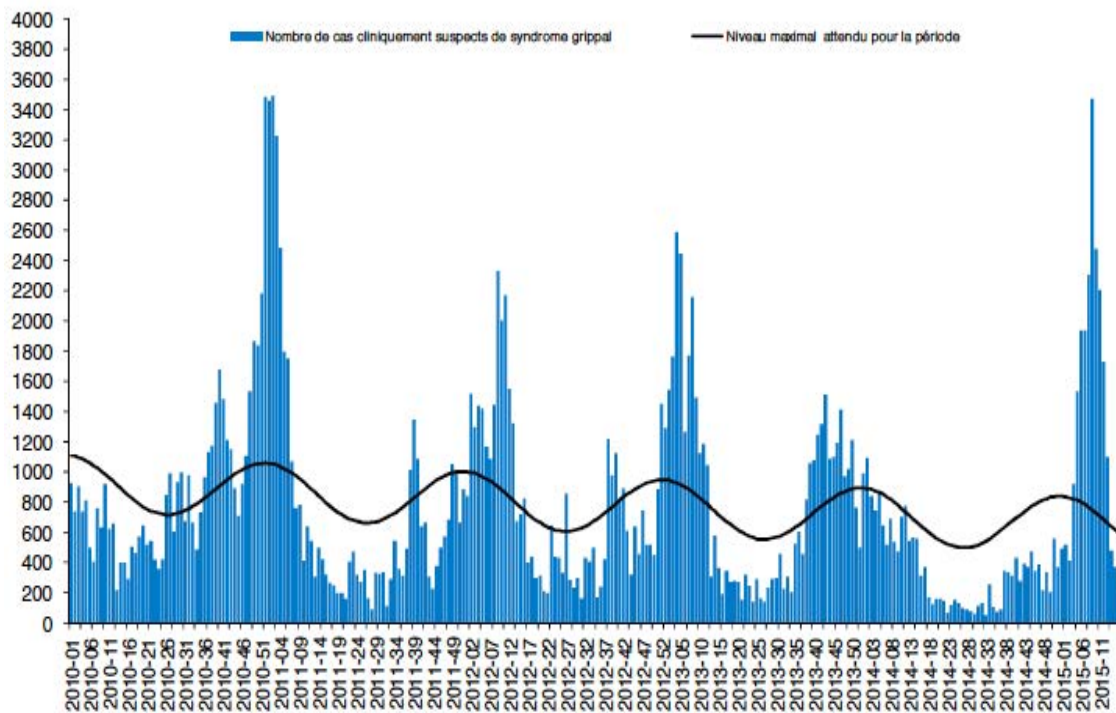


Figure 28 : Estimation du nombre hebdomadaire de consultations pour syndrome grippal Médecins généralistes de Guadeloupe – décembre 2011 à mai 2015 (Source Cire Antilles Guyane)



Source : Réseau de médecins généralistes de la Martinique

Figure 29 : Estimation du nombre hebdomadaire de consultations pour syndrome grippal
Médecins généralistes de Martinique – janvier 2010 à avril 2015 (Source Cire Antilles
Guyane)

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

Sur le plan virologique, pour les prélèvements reçus au CNR-IPG, la saison 2014-2015 a été marquée par une circulation virale quasi inexistante sur le 2^{ème} semestre de 2014 suivie d'une circulation, aux Antilles à partir de fin janvier et en Guyane à partir de début mars et jusqu'en juillet inclus (Figure 30).

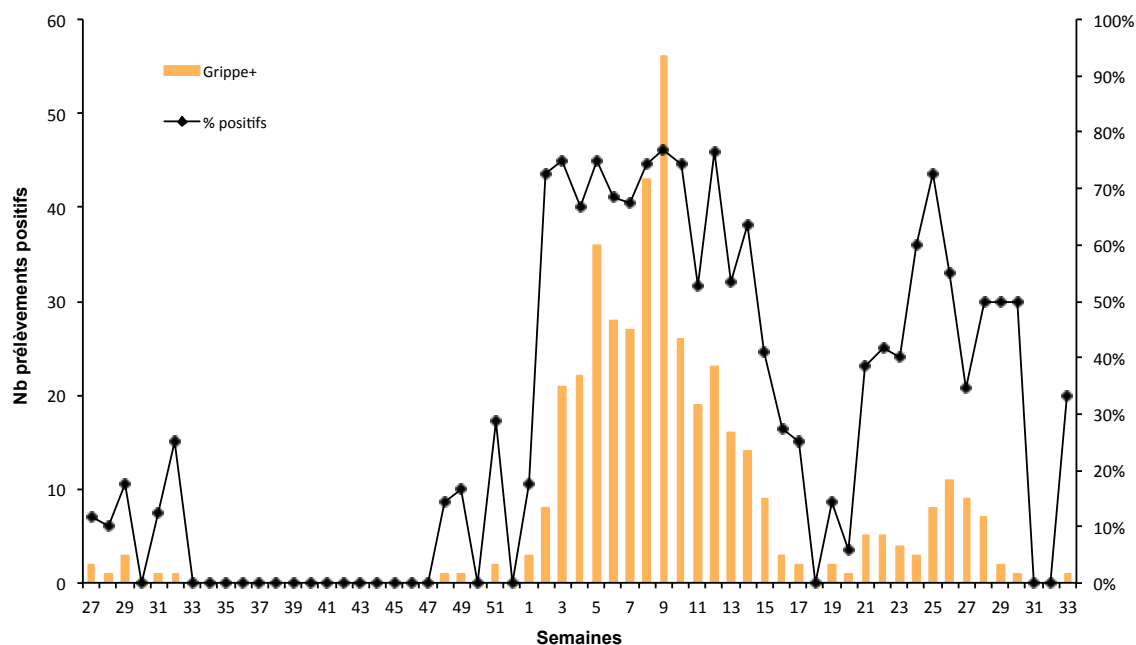


Figure 30 : Détection des virus en région Antilles Guyane CNR-IPG / saison 2014-2015

La majorité des prélèvements reçus au CNR-IPG provient de Guyane où la circulation épidémique a été biphasique (Figures 27 –30).

Chronologie et distribution géographique du nombre de détections de VRS pour la région Antilles Guyane

Comme la saison dernière, depuis la mise en place d'une détection systématique des VRS, on observe cette saison une tendance à la co-circulation des virus grippaux et VRS.

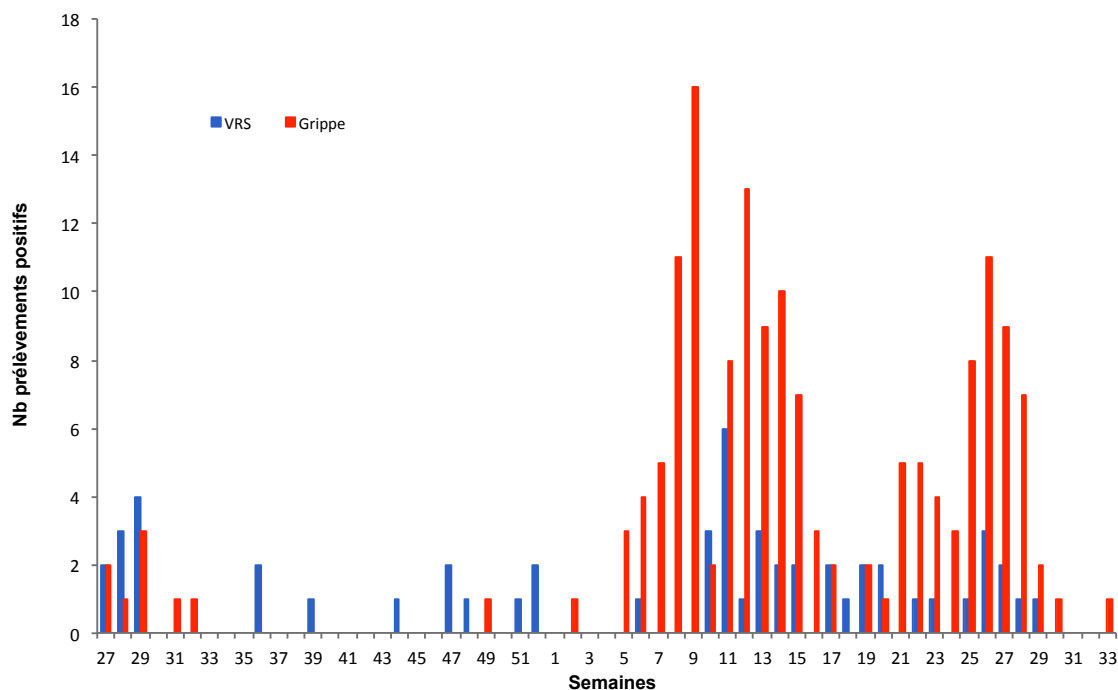


Figure 31 : Détection des virus grippaux et VRS en Guyane - CNR-IPG / saison 2014-2015

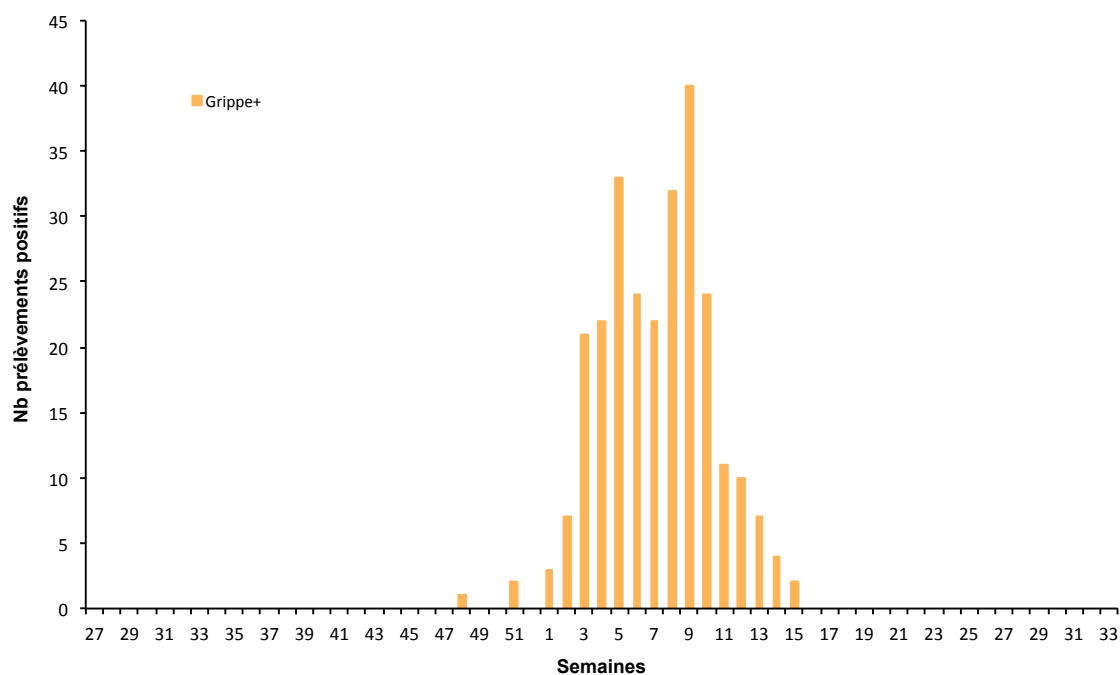


Figure 32 : Détection des virus grippaux aux Antilles (Martinique + Guadeloupe) CNR-IPG / saison 2014-2015

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

Les épidémies de grippe pour la Guyane comme les Antilles ont été marquées par une co-circulation de virus grippaux (Figures 33 à 35) :

- pour la Guyane, co-circulation virale avec sur l'ensemble de la saison une légère prédominance de virus de type B (85 ; 52,5%) et au sein des virus de type A une prédominance des virus A(H3N2) (77 virus A parmi lesquels 16 (20,8%) A(H1N1)pdm09 et 61 (79,2%) A(H3N2)).

Une évolution biphasique a néanmoins été observée sur la période épidémique avec dans une première phase (jusqu'en semaine 20 de 2015) une nette prédominance de virus de type B (70,1%) associés à des virus A(H1N1)pdm09 et A(H3N2) en proportions équivalentes (15,5% et 14,4% respectivement). Dans une seconde phase par contre, les virus A(H3N2) sont devenus dominants (69,6%) associés à des virus de type B (28,6%) et très peu de virus de sous-type A(H1N1)pdm09 (1,8%).

- pour la Guadeloupe, co-circulation virale avec co-dominance de virus A(H3N2) et de virus de type B du lignage Yamagata (43,4% chacun) associés à une circulation plus faible de virus A(H1N1)pdm09 (12%).
- pour la Martinique, co-circulation virale avec une légère prédominance de virus de type B (97 ; 53,3%) associés à des virus de type A (85 ; 46,7%) parmi lesquels 19 (22,4%) A(H1N1)pdm09 et 66 (77,6%) A(H3N2)).

Rq : Parmi les virus A(H3N2) envoyés au CNR-IPP, trois ont été caractérisés antigéniquement et génétiquement (1 en provenance de Guadeloupe et 2 de Guyane prélevés avant la semaine 12 de 2015) : tous correspondent à des virus antigéniquement proches de A/Switzerland/9715293/2013 et sont donc antigéniquement différents de la souche présente dans le vaccin de l'hémisphère nord 2014-2015.

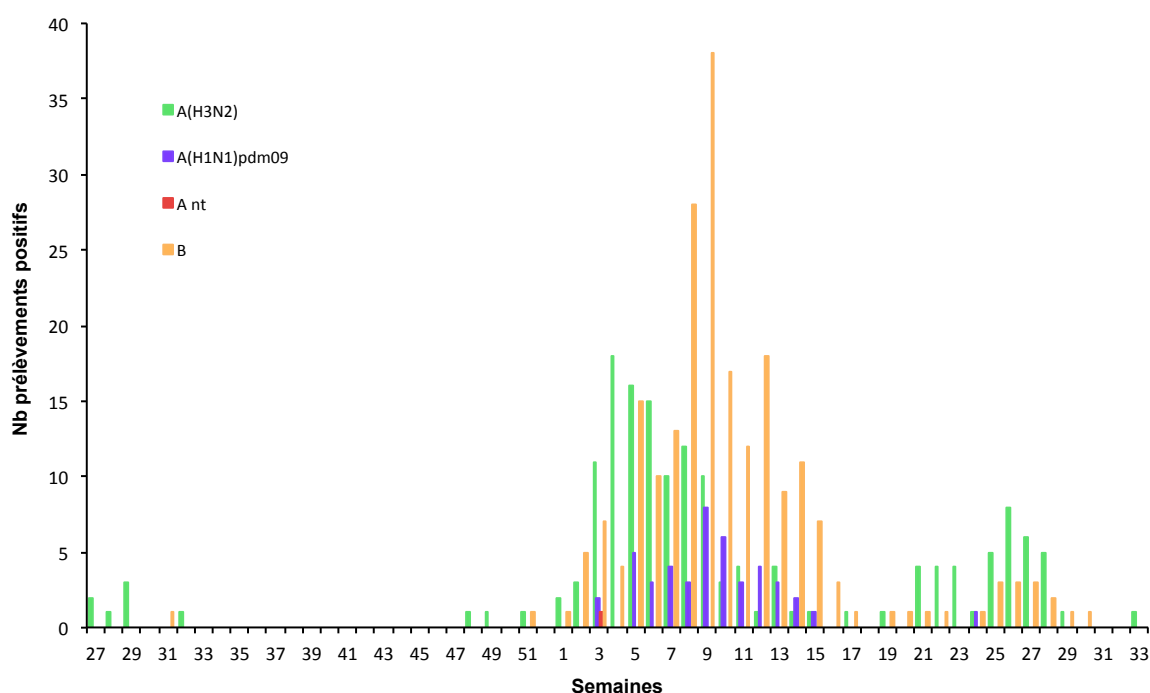


Figure 33 : Répartition des virus grippaux détectés en région Antilles-Guyane CNR-IPG / saison 2014-2015

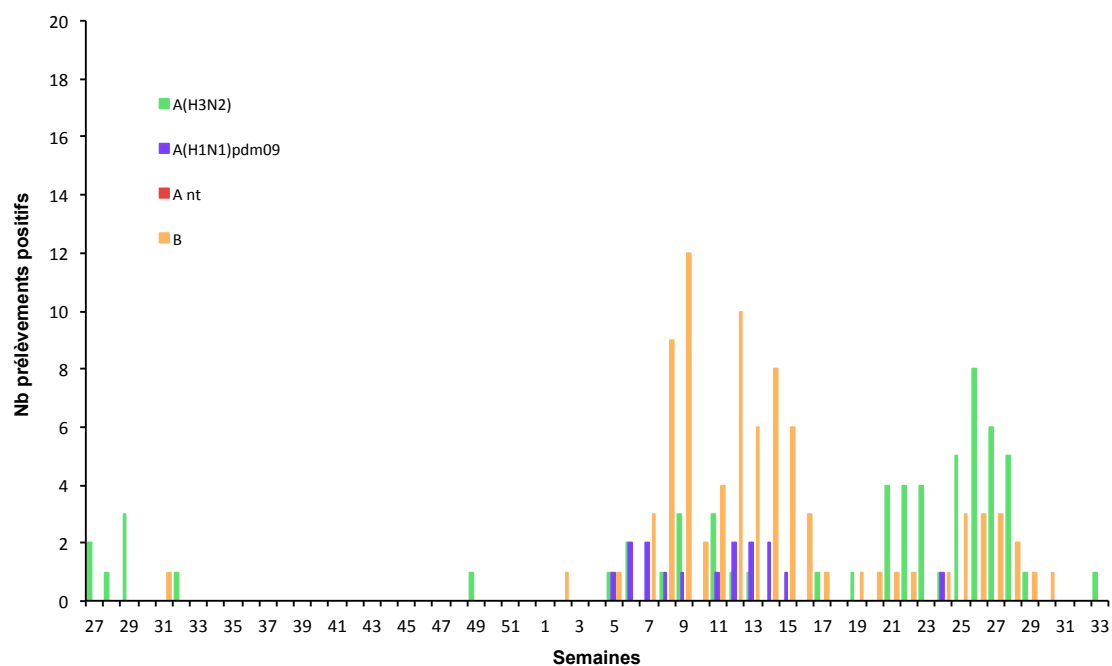


Figure 34 : Répartition des virus grippaux détectés en Guyane
CNR-IPG / saison 2014-2015

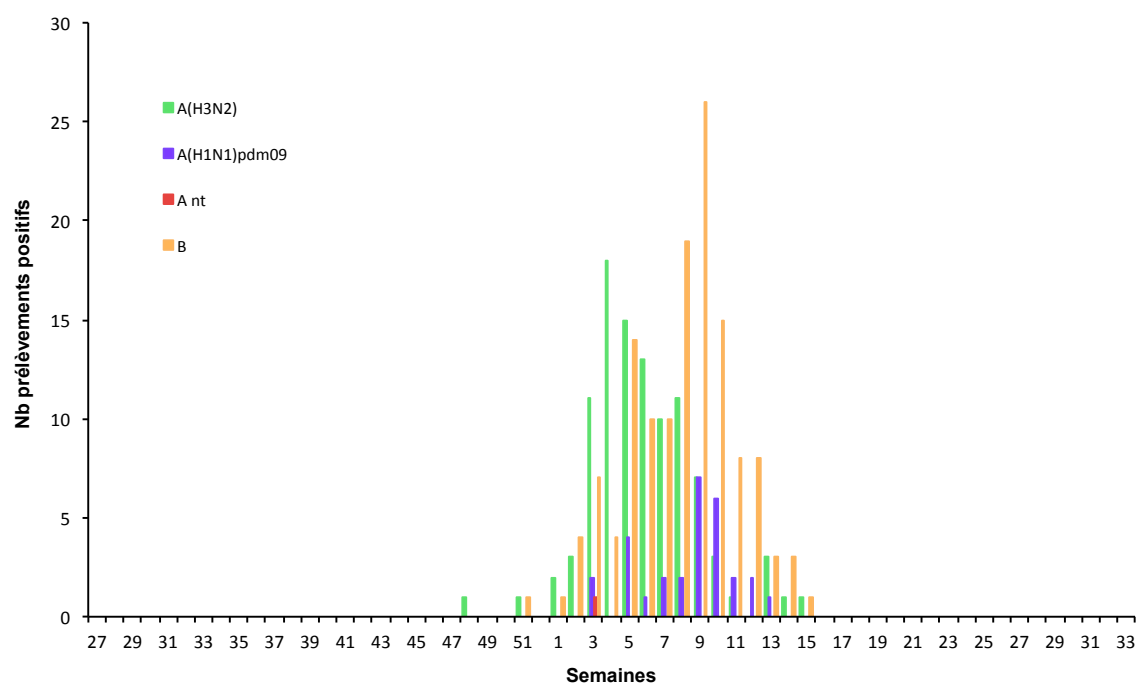


Figure 35 : Répartition des virus grippaux détectés aux Antilles (Martinique et Guadeloupe)
CNR-IPG / saison 2014-2015

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 la saison dernière la majorité des patients prélevés (66,7 %) tandis que le pourcentage de positivité pour grippe le plus élevé (65%) est observé pour les plus de 65 ans. A l'inverse, le pourcentage de positivité pour grippe le plus faible (31,3%) est observé pour les moins de 5 ans (Tableau 11). Contrairement à la saison dernière, les virus de type B ont dominé cette saison dans toutes les classes d'âge. (Tableau 12).

Age	Nb privt	Nb grippe+	% de + dans la tranche âge	% du groupe d'âge/total	% de + /total de +
0-4	16	5	31,3%	5,9%	2,9%
5-14	55	35	63,6%	20,1%	20,5%
15-64	182	118	64,8%	66,7%	69,0%
≥65	20	13	65,0%	7,3%	7,6%
Total	273	171	62,6%	100,0%	100,0%

Tableau 11 : Distribution par âge des patients – Région Antilles Guyane
Surveillance sentinelle / 2014-2015

Age	NB Grippe+	Nb grippe A/H1pdm09	(%)	Nb grippe A/H3	(%)	Nb grippe B	(%)
0-4	5		0,0%	2	40,0%	3	60,0%
5-14	35	4	11,4%	9	25,7%	22	62,9%
15-64	118	14	11,9%	40	33,9%	62	52,5%
≥65	13		0,0%	3	23,1%	10	76,9%
Total	171	18	10,5%	54	31,6%	97	56,7%

Tableau 12 : Distribution par tranche d'âge et par (sous)-type viral – Région Antilles Guyane

3.2 Détection et investigation de cas groupés et de phénomènes anormaux

Le CNR-IP et le CNR-IPG n'ont pas été saisis cette saison pour l'investigation de cas groupés ou de phénomènes anormaux.

Le CNR-HCL a été sollicité pour l'investigation de cas d'infections respiratoire dans des EHPAD

EHPAD – Agen

En septembre, nous recevons un appel pour un signalement d'épisodes respiratoires dans un EHPAD. Le cas index ainsi que 2 autres résidents sont prélevés. La recherche de virus grippal est négative mais nous détectons du Rhinovirus chez les 3 patients.

EHPAD – Les Collines (Drôme)

En octobre, dans un contexte d'épidémie de 9 cas chez 13 résidents présentant des rhinopharyngites et quelques surinfections bronchiques, nous avons reçu 3 échantillons. La recherche de virus grippal était négative mais nous avons détecté un entérovirus (entérovirus 68).

Fondation Richard- Lyon

Début février nous recevons un appel de la Fondation Richard (Centre pour Jeunes et Adultes handicapés moteur) suite à l'apparition de 3 puis 7 cas groupés d'infection respiratoire aiguë chez les résidents. Cet épisode est signalé à l'ARS et nous fournissons des kits de prélèvements afin de faire un diagnostic virologique. Nous recevons 3

prélèvements. Le diagnostic de grippe A(H3N2) est confirmé pour les 3 patients. Les virus isolés chez 2 patients sont antigéniquement proches.

EHPAD – Briennon (Loire)

Nous recevons un appel en juin 2015 concernant une épidémie d'IRA dans un EHPAD de la Loire (Briennon), débuté le 04/06, signes cliniques : toux grasse, fièvre (37°8, 38° pour certains), 16 résidents/62 malades depuis le 04/06 et toux pour 2 personnels. Les patients ont été prélevés le 9/06 (2) puis le 10/06 (5) : il s'agit d'une épidémie à Rhinovirus, le virus a été retrouvé chez 5 patients. Pour information, la circulation des Picornavirus a augmenté dans la région RA et dans le sud de la France au cours du mois de Mai.

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

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

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

La résistance (ou réduction de la sensibilité) phénotypique est déterminée en fonction des variations des IC₅₀ par rapport aux valeurs d'IC₅₀ pour les virus de référence sauvages.

Les résultats sont présentés au § 2.2.2.

La tendance en matière de sensibilité aux antiviraux est restée stable au cours de la saison 2014-2015 par rapport à la saison précédente.

3.4 Contribution aux réseaux de surveillance européen et internationaux

3.4.1 EISN/ECDC

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

3.4.2 FluNet/OMS

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

Les données des CNR-IPP, -HCL et -IPG, sont transmises à l'OMS par voie internet de façon bi-mensuelle dans la base FLUNET¹ à accès sécurisé par mot de passe. Elles permettent de contribuer à la surveillance globale de la circulation des virus grippaux. Les responsables ont également contribué, à la demande de l'OMS, à différents groupes de travail sur divers aspects en lien avec les activités de surveillance.

3.4.1 Contrôle de Qualité

Virus Influenza

Comme tous les ans, les trois laboratoires du CNR ont participé au contrôle qualité externe "WHO External Quality Assessment Programme for the Detection of Influenza A Virus Type A by PCR" (EQAP) organisé par l'OMS depuis 2007. Au cours de la saison 2014-2015, nous avons reçu 1 panel en mai 2015 (EQAP panel 13). Ce contrôle de qualité moléculaire pour la détection et le sous-typage des virus de type A (H1pdm09, H3, H5, H7 et H9) et de type B par RT-PCR.

Ainsi, le panel reçu en mai 2015 (EQAP panel 13) comportait 10 échantillons d'ARN extraits correspondant à 4 virus influenza H5, 2 H1pdm09, 1 H3, 1 H7, 1 B et 1 échantillon négatif. Les CNR-IPP, -HCL et -IPG ont pu sous-typer correctement tous les virus.

Les CNR-IPP et -HCL ont aussi participé au contrôle qualité externe "EISN Influenza virus Culture (EISN_INF15) EQA" organisé par la société QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics) pour le compte de l'ECDC. Le panel reçu en juin 2015 comportait 10 échantillons qui ont été traités comme des prélèvements issus de la surveillance communautaire. Cela consiste en une recherche par qRT-PCR des virus grippaux, la caractérisation après isolement sur cellules MDCK et la réalisation du test de susceptibilité aux antiviraux. Le panel comportait 3 H1pdm09, 3 H3, 3 B-Yamagata et 1 B-Victoria et 1 échantillon négatif.

Les CNR-IPP, -HCL ont pu sous-typer correctement l'ensemble des virus.

Virus MERS-CoV

Pour la 2nd fois nous avons reçu un contrôle de qualité pour la détection du nouveau coronavirus MERS-CoV en mai 2015 : WHO International PTP for the Detection of MERS-CoV by PCR organisé par l'OMS, composé de 11 échantillons. Le panel comportait 8 MERS-CoV, 3 coronavirus humains et 1 échantillon négatif.

Le CNR-IPP a pu détecter correctement tous les virus.

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

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

4 Alerte

En cas de détection de phénomène anormal en métropole, les CNR-IPP et -HCL en collaboration avec la coordination nationale du réseau des GROG adressent une note de

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

synthèse à l'InVS et la DGS. Pour la région Antilles-Guyane, le CNR-IPG alerte la CIRE et l'ARS.

Au cours de la saison grippale 2014-2015 aucune note d'alerte n'a été diffusée. Toutefois, le CNR a régulièrement fourni à l'InVS tout au long de la saison des informations concernant les caractéristiques antigéniques des virus grippaux A(H3N2) et l'évolution de la proportion de virus antigéniquement variants par rapport à la souche de la composition vaccinale de la saison 2014-2015.

5 Activités d'information, de formation et de conseil

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

5.1.1 Enseignements

➤ **Pr Sylvie van der WERF**

En tant que Professeur à l'Université Paris Diderot, Paris 7, Sylvie van der WERF a dispensé les enseignements suivants en 2014-2015:

Université Paris Diderot, Paris 7

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

Cours 6h : Caractéristiques et variabilité du monde viral; Infection virale-Généralités ; Quelques exemples de réussites virales.

Virologie : M1-IMVI – responsable de l'UE

Cours 20 h : Virologie

Immunopathologie/Relations hôte pathogènes : M1-IMVI

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

M2 IMVI- responsable du Master

UE Virologie Moléculaire et Médicale – responsable de l'UE

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

UE Virologie Fondamentale – responsable de l'UE

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

UE Séminaires bibliographiques : audition

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

Cours 3h : Introduction à la lutte contre les pathogènes ; Stratégie de lutte contre les pathogènes viraux ; Table Ronde 2h : stratégies de lutte

UE « Immunologie anti-virale »

Cours 1h30 : pandémies à virus respiratoires et vaccins

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

Ecole Doctorale Gc2iD : co-directrice 2009-2014

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

ENS Ulm

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

Cours 3h : Introduction à la virologie ; Origine du MERS-CoV et risque pandémique

➤ **Pr Bruno LINA**

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

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

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

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

Participation aux Diplômes Inter-Universitaire :

Pathologie infectieuse pédiatrique : grippe chez l'enfant (2h),
Transplantation : infections respiratoires (2h),
Chimiothérapie anti-infectieuse : vaccins et antiviraux (2h)
Vaccinologie : vaccin contre la grippe (1h)

5.1.2 Séminaires, conférences grand public et relations avec la presse

➤ Pr Sylvie van der Werf

Interviews pour la presse écrite et audiovisuelle

➤ Pr Bruno Lina

Connecting the actors of innovation in vaccinology. Table ronde Biovision, Lyon, Avril 2015

Virus de la grippe : variation des souches et nouveaux vaccins, Académie de Médecine, Paris, Avril 2015

Table ronde Vaccination, 2èmes assises nationales du vaccin - Institut Choiseul, Institut Pasteur, Paris Mars 2015

Conferences de la Villa Gillet : Forum des savoir : la maladie entre l'imaginaire social et le fait politique – Lyon avril 2015

Conférence grand public : Les conférences du Grand Lyon : la grippe, un virus imprévisible en constante réémergence, Lyon mars 2015

Interviews pour la presse écrite et audiovisuelle

Participation à l'émission RTL Grand soir le 13 octobre 2014 (RTL)

➤ Dr Vincent Enouf

Interviews pour la presse écrite et audiovisuelle

5.1.3 Formation, accueil de stagiaires

Au CNR-HCL, accueil du Dr Raquel GUIOMAR (CNR grippe Lisbonne) pour 2 semaine de formation sur les méthodes de serodiagnostic (IHA et séroneutralisation) dans le cadre du programme « twinning training » de l'ECDC et accueil d'une étudiante en Thèse venant de Tunisie (Amira DRIRA) : étude des virus respiratoires dans les Bronchiolites de l'enfant.

Au CNR-IPP, accueil également dans le cadre du programme "twinning training" de l'ECDC de Lyudmyla SEKAN (Ingénieur, Laboratoire de Santé du Luxembourg – resp : Dr Matthias OPP) pour une semaine, du 22 au 26 septembre 2014. Elle a pu se perfectionner aux techniques d'isolement et d'amplification virale ainsi qu'aux techniques de séquençage.

5.2 Modalités de diffusion des données de la surveillance

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

Chaque semaine, les laboratoires du CNR en métropole adressent à l'InVS les informations relatives aux types, sous-types, caractéristiques antigéniques et sensibilité aux antiviraux des virus grippaux circulants. Ces informations sont également reprises par le bulletin hebdomadaire d'information sur la grippe édité par l'InVS. Les laboratoires du CNR assurent la rédaction des données virologiques en concertation avec l'InVS pour ce bulletin.

Les données collectées dans le cadre du réseau RENAL font l'objet de bulletins d'information hebdomadaires pendant la période de surveillance active de la grippe (semaines 38 à 15) et mensuels tout au long de l'année, édités par le CNR. Pour la région Nord, le système de recueil de l'information par internet (logiciel Voozanoo "RENOG") sur un site sécurisé par mot de passe rendu opérationnel depuis la saison 2007-2008, permet aux correspondants du réseau RENAL d'intégrer et de consulter les données de la surveillance pour chacune des grandes régions à tout moment et propose également une analyse plus complète des données en temps réel. Le logiciel de recueil des données RENOG a évolué et a aussi été utilisé par les laboratoires hospitaliers de la Région Sud au cours de la surveillance 2014-2015 et par l'IPG. L'ensemble des données de surveillance récoltées par le CNR est regroupé sur un site unique sécurisé.

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

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

5.3.1 Activités auprès des instances de santé nationales

5.3.1.1 Ministère de la Santé, DGS, DGT

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

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

5.3.1.2 InVS

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

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

5.3.1.3 ANSM

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

5.3.2 Activités auprès des instances de santé internationales

5.3.2.1 EISN/ECDC

- Membre du réseau européen de surveillance de la grippe EISN (S. van der Werf, B. Lina)
- External Advisor du réseau EISN auprès de l'ECDC (B. Lina)
- Membre du groupe de travail "virus characterization" du réseau de laboratoires ERLI-Net (S. van der Werf)
- Membre du groupe de travail "antiviraux" du réseau de laboratoires ERLI-Net (V. Enouf , B. Lina)
- Membre du groupe de travail "contrôle qualité" du réseau de laboratoires ERLI-Net (M. Valette)
- ERLI-Net (former CNRL) ECDC coordination Meeting, Stockholm 17-18 mars 2015 (B. Lina)
- Membre du EUPHEM advisory forum pour l'ECDC (B. Lina)

5.3.2.2 OMS

- Directeur du Laboratoire de Référence de l'OMS pour le SRAS (S. van der Werf)
- Directeur du Laboratoire de Référence de l'OMS pour les virus H5 (S. van der Werf)
- Participation au « Technical Consultation on Maternal Influenza Immunization Evidence and Implementation », 25-26 March 2015, WHO-HQ, Geneva, Switzerland (S. van der Werf).
- Participation au 10th Meeting of the WHO Global Action Plan (GAP) Advisory Group (AG) for Influenza Vaccines (Closed Session), 19 March 2015, Sao Paulo, Brazil (S. van der Werf).
- Membre du Working Group on Molecular diagnostics; participation au WHO PCR Working Group Meeting, 19-20 July 2014, Geneva, Switzerland (V. Enouf)
- Temporary advisor for the WHO DG's Consultation with member states (IGM for the sharing of influenza viruses and benefits) (B. Lina)
- Participation au groupe "Fight against respiratory viruses" (B. Lina)

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

➤ Pr Sylvie van der WERF

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

➤ Pr Bruno LINA

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

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

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

6.1.1 CNR-IPP

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

➤ *Evolution génétique des virus grippaux*

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

Un deuxième volet concerne le deuxième mécanisme de variation génétique des virus grippaux, le **réassortiment**. En se fondant sur les travaux antérieurs relatifs aux déterminants de la spécificité de type, A versus C, localisés au sein des séquences non-codantes des segments d'ARN génomique, nous analysons la capacité de multiplication de virus grippaux de type A ou C dont l'un des segments est muni de séquences non-codantes hétérotypiques ou dérivées d'un autre segment. Ces travaux ont notamment permis de préciser les éléments des séquences non codantes conservées ou non conservées entre segments nécessaires à la multiplication virale et d'analyser leur impact sur la régulation de l'expression des gènes des segments concernés ainsi que sur l'emballage des segments génomiques dans les particules virales (Crescenzo et al. PLoS One 2013 ; PLoS One, 2014). Ces données devraient permettre de mieux comprendre quels sont les éléments mis en jeu lors des événements de réassortiment entre souches virales. (*B. Crescenzo-Chaigne, IR, IP*).

➤ *Immunité post-vaccinale*

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

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

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

Cette thématique menée depuis de nombreuses années au sein de l'unité a pour objectif de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les étapes de transmission inter-espèces et d'adaptation au nouvel hôte et tout particulièrement à l'homme. Ces études menées par le groupe de N. Naffakh au sein de l'unité se focalisent plus particulièrement sur les déterminants portés par les ribonucléoprotéines (RNP) des virus influenza A et l'identification des interacteurs cellulaires et leur rôle fonctionnel dans la multiplication et la restriction d'hôte en s'intéressant aux virus influenza aviaires versus humains ainsi qu'au virus H1N1pdm09 et ses précurseurs. Ces travaux qui ont d'ores et déjà permis d'identifier de nouveaux interacteurs des RNP se focalisent plus particulièrement sur les mécanismes du trafic nucléocytoplasmique des RNP virales (Fournier et al. PLoS Path 2014). Des approches d'interactomique à haut débit développées par le groupe de Y. Jacob, telle que l'iPCA pour l'analyse des interactions dans le contexte des cellules, permet d'envisager l'étude différentielle des réseaux d'interaction des RNP à large échelle ou de façon plus spécifique les interactions différentielles des RNP avec le système ubiquitine protéasome. Ces travaux devraient aussi permettre l'identification de nouvelles cibles pour le développement d'antiviraux. Ils s'inscrivent entre autres dans le cadre du projet européen FP7 FLUPHARM (Coordinateur S. Cusack, EMBL Grenoble) (N. Naffakh, DR2 CNRS ; S. Munier, MCU P7, G. Fournier, Post-Doctorant, C. Diot, étudiant M2, Y. Jacob, CR IP, C. Demeret, CR IP).

6.1.2 CNR-HCL

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

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

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

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

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

des vRNP pouvait lever ce frein à l'incorporation de segments d'origine différente dans un fond génétique d'un virus H3N2 (Essere et al, 2013, Isel et al, Vaccine 2013). Nos travaux sur l'assemblage vont continuer, afin de définir pour chaque segment les positions nucléotidiques impliquées dans l'assemblage des vRNP de PR8 et WSN.

Les mutations des virus influenza sont le reflet des quasi-espèces qui constituent l'inoculum infectieux. Au cours de l'infection, une quantité importante de virus est produite avec un taux de mutation élevé. Dès lors, la compréhension des facteurs de risque de développer une infection grave liée à des virus présentant des facteurs de risque identifiés ou suspectés repose sur la détermination précoce de la présence de ces facteurs dans la population des virus responsable des cas sévères. Pour cela, nous avons développé une approche de séquençage à haut débit sur les échantillons biologiques des patients présentant des formes graves, afin de pouvoir mieux prédire l'évolution de la maladie, et d'optimiser la prise en charge du patient (Pichon Etal, Communication orale, ESCV meeting Edinburg sept 2015). De même, l'identification des marqueurs prédictifs précoces de ces infections graves serait aussi utile pour améliorer la survie des patients atteints de formes de grippe sévère. En se basant sur des travaux préliminaires (Berri et al, Cell Mol Life Sci. 2014), et l'utilisation d'outils de NGS maîtrisés par le laboratoire (Josset et al, J Virol 2012, Josset et al, Plos One 2010), et grâce à un financement PHRC (projet antigrippe), nous réalisons une étude prospective sur les marqueurs prédictifs précoces de l'évolution des formes de grippe sévères admises en réanimation.

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

Depuis de nombreuses années, le laboratoire décrit les interactions qui existent entre les deux glycoprotéines de surface en terme de virulence et de pathogénèse (Casalegno et al, Plos One 2014, Ferraris et al, Antivir Res, 2012, Richard et al Plos One 2012, Pourceau et al, Chembiochem. 2011), et le rôle de certaines mutations sur la résistance aux inhibiteurs de la neuraminidase (Ferraris et al, J Clin Virol 2008, Richard et al, AAC 2011, Casalegno et al, Antiviral Res. 2010, Escuret et al JID 2014). Nous souhaitons continuer ce travail, notamment en déterminant si les mutations décrites dans les sous-types de virus influenza humains peuvent être transposées aux sous-types aviaires ; pour cela, nous allons reconstruire par génétique inverse des virus aviaires comportant des neuraminidases dont les séquences auront été modifiées afin de tester les mutations 275 dans les NA du groupe 1 et les mutations 119 et 292 dans les NA des virus du groupe 2 (Gaymard A et al, Communication ESCV meeting Edinburg sept 2015). Par ailleurs, nous allons préparer des systèmes de production de glycoprotéines fonctionnelle solubles afin de pouvoir mieux caractériser à la fois les affinités et les capacités catalytiques des HA et NA.

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

En lien avec l'analyse des mécanismes de virulence et de pathogénèse décrits ci-dessus, nous avons développé une approche « Omique » pour l'étude de l'impact des virus influenza dans des systèmes *in vitro* et chez l'homme. Cette approche mise au point en 2010 (Joset et al, Plos One 2010) a montré que l'obtention de signatures transcriptomiques détaillées permettait d'identifier des voies cellulaires à cibler par des molécules antivirales. En effet, en perturbant l'état cellulaire favorable à l'infection, il est théoriquement possible de développer des stratégies antivirales ciblant des protéines cellulaires qui auraient pour effet de bloquer la réplication virale et donc l'infection. A l'issue du travail initial, une première molécule a été identifiée et un essai clinique financé par un PHRC a été réalisé entre 2010 et 2014 (FLUMED). Les résultats sont en cours d'analyse. Par ailleurs, lors d'un autre essai (COMBINA), il a été possible de recueillir des échantillons de lavage nasal de personnes infectées par les virus H1N1 et H3N2, et réaliser chez ces patients des profils transcriptomiques lors de l'infection, et après guérison. Ces données, en cours d'exploitation, ouvrent de nouvelles perspectives en termes de molécules potentiellement antivirales qui pourraient être issues d'un repositionnement thérapeutique (Projet Flunext). Enfin, les profils ont aussi montré des voies d'activation de la voie P53 et en particulier de l'interaction entre NS1 et P53 et mdm2 qui pourraient aussi être des cibles antivirales (Terrier et al, FEBS Lett. 2013, Terrier et al, Virol J 2011).

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

Lors de la surinfection bactérienne, les mécanismes de coopération entre les virus et les bactéries sont connus, mais parfois que de façon purement descriptive. En collaboration avec l'équipe du CNR des Staphylocoques (F Vandensech et G Lina), un programme sur les co-infections grippe-staphylocoque a été initié en 2011 à la suite d'une étude rétrospective (Casalegno et al, Med Mal Inf 2011, Lamand V, Clin Microbiol Infect. 2012). Dans un premier temps, il a été testé la possibilité d'une coopération entre les toxines PVL et les virus de la grippe. Le travail est encore en cours et les résultats préliminaires montrent que le virus potentialise l'effet délétère de la PVL sur les polynucléaires humains (Casalegno et al, RICA 2013, Jeannoel M et al, Communication ESCV Edinburg sept 2015).

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

Le CNR est aussi impliqué dans la réalisation de travaux sur l'estimation de l'efficacité vaccinale mesurée à posteriori (Amour et al, Vaccine 2012), ou en temps réel (Fluvac, étude en cours), et l'impact des couvertures vaccinales sur la prévention de la grippe dans les services hospitaliers (Benet et al, BMC Infect Dis. 2012). Il participe aussi à des enquêtes sur les grippes nosocomiales à l'hôpital, et conjointement avec l'équipe d'hygiène hospitalière, il a analysé la diffusion d'un virus influenza dans une unité de soins (Eibach et al, J Hosp infect 2014). En parallèle, un travail a été mené combinant le recueil des contacts entre individus par le biais de badges à haute fréquence portés par le personnel et les patients pendant 2 semaines dans une unité de gériatrie (Stele J, PLoS One. 2011 ; Voirin N, et al, Infect Control Hosp Epidemiol 2015). L'analyse des contacts et des cas observés va être réalisée, montrant le rôle important des infirmiers dans le risque de dissémination nosocomiale des virus influenza.

6.1.3 CNR-IPG

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

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

6.2.1 Publications nationales

Lina B. Grippe : le point en 2015. La Revue du Praticien – Médecine Générale, 2015

Bouscambert M, Vanhecke E, Worms B, Valette M, Lina B. Evaluation des performances des 22 tests rapides d'orientation diagnostique de la grippe A et B en France en 2014. Les Feuilles de Biologie, mai 2015, n° 324, 13-18

Émilie Mosnier, Luisiane Carvalho, Aba Mahamat, Jean-Loup Chappert, Martine Ledrans, Muriel Ville, Mireille Renaud, Pierre Chesneau, Dominique Rousset, Jacques Rosine, Vincent Pommier de Santi, Mathieu Nacher, Magalie Demar, Philippe Abboud, Pierre Couppié, Félix Djossou. Épidémies multiples dans des camps d'orpaillage en forêt amazonienne (Guyane française) en 2013: quelles leçons pour l'accès aux soins et à la prévention ? *BEH*, 2015 ; 11-12: 181-189.

S. van der Werf, Virus De La Grippe, *REMIC: Société Française de Microbiologie Ed; Avril 2015; ch87; p663-668* (2015).

Equipes de surveillance virologique de la grippe* Surveillance virologique de la grippe : saison 2014-2015 *BEH*, 2015 (*in press*)

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

Jaffar-Bandjee MC, Brottet E, Valette M, Lina B et le réseau des médecins sentinelles de la réunion. Surveillance virologique de la grippe à la Réunion. Bulletin de Veille Sanitaire (BVS), 2014, n° 22, 6-8

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

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

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

6.2.2 Publications internationales

Mosnier A, Caini S, Daviaud I, Bensoussan JL, Stoll-Keller F, Bui Tan T, Lina B, van der Werf S, Cohen JM and behalf of the GROG network. Ten influenza seasons in France: distribution and timing of influenza A and B circulation, 2003-2013. *BMC Infectious Diseases*, 2015, 15:357

Mosnier A, Caini S, Daviaud I, Nauleau E, Bui TT, Debost E, Bedouret B, Agius G, van der Werf S, Lina B, Cohen JM; GROG network. [Clinical Characteristics Are Similar across Type A and B Influenza Virus Infections](#). *PLoS One*. 2015 Sep 1;10(9):e0136186. doi: 10.1371/journal.pone.0136186. eCollection 2015. PMID:26325069

S. van der Werf, and D. Levy-Bruhl, 'Influenza - the Need to Stay Ahead of the Virus', *Euro Surveill*, 20 (2015), 21030.

J. Beaute, P. Zucs, N. Korsun, K. Bragstad, V. Enouf, A. Kossyvakis, A. Griskevicius, C. M. Olinger, A. Meijer, R. Guimar, K. Prosenc, E. Staronova, C. Delgado, M. Brytting, and E. Broberg, 'Age-Specific Differences in Influenza Virus Type and Subtype Distribution in the 2012/2013 Season in 12 European Countries', *Epidemiol Infect* (2015), 1-9.

E. Broberg, R. Snacken, C. Adlhoch, J. Beaute, M. Galinska, D. Pereyaslov, C. Brown, P. Penttinen, W. H. O. European Region, and Network the European Influenza Surveillance, 'Start of the 2014/15 Influenza Season in Europe: Drifted Influenza A(H3N2) Viruses Circulate as Dominant Subtype', *Euro Surveill*, 20 (2015).

O. Munoz, M. De Nardi, K. van der Meulen, K. van Reeth, M. Koopmans, K. Harris, S. von Dobschuetz, G. Freidl, A. Meijer, A. Breed, A. Hill, R. Kosmider, J. Banks, K. D. Stark, B. Wieland, K. Stevens, S. van der Werf, V. Enouf, G. Dauphin, W. Dundon, G. Cattoli, and I. Capua, 'Genetic Adaptation of Influenza A Viruses in Domestic Animals and Their Potential Role in Interspecies Transmission: A Literature Review', *Ecohealth* (2015).

J. Poissy, A. Goffard, E. Parmentier-Decrucq, R. Favory, M. Kaut, E. Kipnis, D. Mathieu, S. van der Werf, B. Guery, MERS-CoV Biology Group. Kinetics and Pattern of Viral Excretion in Biological Specimens of Two Mers-Cov Cases', *J Clin Virol*, 61 (2014), 275-8.

Bouscambert M, Valette M, Lina B. Rapid bedside tests for diagnosis, management and prevention of nosocomial influenza. *Journal of Hospital Infection*, 2015

Vanhems P, Voirin N, Bénet T, Roche S, Escuret V, Régis C, Giard M, Lina B, Comte B, Coppéré B, Ecochard R, and collaborative clinical units. Detection of hospital outbreaks of influenza-like illness based on excess of incidence rates compared to the community. *Am J Infect Control*. 2014 Dec;42(12):1325-7.

Lê VB, Schneider JG, Boergeling Y, Berri F, Ducatez M, Guerin JL, Adrian I, Errazuriz-Cerda E, Frasilho S, Antunes L, Lina B, Bordet JC, Jandrot-Perrus M, Ludwig S, Riteau B. Platelet Activation and Aggregation Promote Lung Inflammation and Influenza Virus Pathogenesis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015

Voirin N, Payet C, Barrat A, Cattuto C, Khanafer N, Régis C, Kim BA, Comte B, Casalegno JS, Lina B, Vanhems P. Combining high-resolution contact data with virological data to investigate influenza transmission in a tertiary care hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2015 Mar;36(3):254-60.

Rondy M, Launay O, Puig-Barberà J, Gefenaite G, Castilla J, de Gaetano Donati K, Galtier F, Hak E, Guevara M, Costanzo S; European hospital IVE network, Moren A. 2012/13 influenza vaccine effectiveness against hospitalised influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B: estimates from a European network of hospitals. *Euro Surveill*. 2015 Jan 15;20(2). pii: 21011

B. Crescenzo-Chaigne, C. Barbezange, V. Frigard, D. Poulain, and S. van der Werf, 'Chimeric NP Non Coding Regions between Type a and C Influenza Viruses Reveal Their Role in Translation Regulation', *PLoS One*, 9 (2014), e109046.

J. W. Dunning, L. Merson, G. G. Rohde, Z. Gao, M. G. Semple, D. Tran, A. Gordon, P. L. Olliaro, S. H. Khoo, R. Bruzzone, P. Horby, J. P. Cobb, K. S. Longuere, P. Kellam, A. Nichol, S. Brett, D. Everett, T. S. Walsh, T. T. Hien, H. Yu, M. Zambon, G. Ruiz-Palacios, T. Lang, T. Akhvlediani, Isaric Council Isaric Working Group, F. G. Hayden, J. Marshall, S. Webb, D. C. Angus, N. Shindo, S. van der Werf, P. J. Openshaw, J. Farrar, G. Carson, and J. K. Baillie, 'Open Source Clinical Science for Emerging Infections', *Lancet Infect Dis*, 14 (2014), 8-9.

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

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

Escuret V, Collins PJ, Casalegno JS, Vachieri SG, Cattle N, Ferraris O, Sabatier M, Frobert E, Caro V, Skehel JJ, Gamblin S, Valla F, Valette M, Ottmann M, McCauley JW, Daniels RS, Lina B. A novel I221 L substitution in neuraminidase confers high level resistance to oseltamivir in influenza B viruses. *J Infect Dis*. 2014 Oct 15;210(8):1260-9

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

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

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

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

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

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

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

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

6.2.3 Communications nationales

Mosnier A, Daviaud I, Vabret A, van der Werf S, Lina B, Debost E, Cohen JM. Virus Respiratoire Syncytial : un impact non négligeable chez les séniors. Poster, 15èmes Journées Nationales d'Infectiologie (JNI), 11-13 juin 2014, Bordeaux

Rémi Flicoteaux, Camelia Protopopescu, Annick Tibi, Xavier Duval, Bruno Lina, Sylvie van der Werf, Thierry Blanchon, Anne Mosnier, Sylvie Chevret, Catherine Leport. Facteurs de non observance à une bi-thérapie anti-grippale : études des données d'un essai randomisé dans le cadre de la grippe saisonnière. RICAI 2014, 34ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, 27-28 November 2014, CNIT-Paris la Défense, France. (2014).

6.2.4 Communications Internationales

Lina B. Boucher C, Osterhaus A, Schutten M, Monto A, Whitley RJ, Nguyen-Van-Tam J Six years of monitoring emergent oseltamivir resistance in patients with influenza A virus infections in the Influenza Resistance Information Study (IRIS). 4th isirv Antiviral Group Conference, Austin, USA, Juin 2015

Barbezange C, I. O., Enouf V, Shomron N, van der Werf S, Vignuzzi M. . Use of deep-sequencing to evaluate the intrinsic heterogeneity of human influenza type A viruses directly in nasal swabs. *4th International Influenza Meeting, 21-23 September 2014, Münster, Germany*. (2014).

Kerviel A, Panthu B, Decimo D, Faivre-Moskalenko C, Favard C, Ohlmann T, Lina B, Ottmann M, Muriaux D. Describing the role of the M1 matrix protein basic residues in influenza virus A/H1N1 assembly. Communication orale, Influenza 2014, 9-11 septembre 2014, Oxford UK

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

6.2.5 Communications Nationales sur invitation

Lina B. Virus de la grippe : variation des souches et nouveaux vaccins, Académie de Médecine, Paris, Avril 2015

Lina B, invitation à la table ronde Vaccination, 2èmes assises nationales du vaccin - Institut Choiseul, Institut Pasteur, Paris Mars 2015

Lina B. Emergences virales et risques épidémiques, Journée Enseignement Recherche "FormaSciences 2015", 26 février 2015, Lyon

Lina B. Grippe et pneumocoque : même combat ? 15èmes Journées Nationales d'Infectiologie (JNI), 11-13 juin 2014, Bordeaux

Lina B. Les tests rapides grippe : Leur utilisation en pratique de ville. 15èmes Journées Nationales d'Infectiologie (JNI), 11-13 juin 2014, Bordeaux

Lina B. apport de la virologie à la détection et la compréhension des épidémies de grippe. Surveillance et recherche en médecine générale – Evolution du Réseau Sentinelles, 5 décembre 2014, Paris

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

van der Werf S. Mode d'action des nouvelles classes d'anti-grippe (favipiravir, et DAS). Rencontres du GEIG (Groupe d'Expertise et d'Information sur la Grippe) : 27èmes Rencontres sur la grippe et sa prévention (Paris), 20 novembre 2014, Paris, France. (2014).

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

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

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

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

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

Antoine Enfissi : « Missions du CNR des virus influenzae et données en lien avec la circulation des virus influenza et VRS en Guyane » – Réunion ARAVEG (Association pour le Réseau d'Accès aux Soins de Veille sanitaire et Epidémiologique de la Guyane)- 24 Mars 2015

6.2.6 Communications Internationales sur invitation et présidence de sessions

Lina B. Viral respiratory infections. 18th ESCV meeting, Edinburg, Septembre 2015

Lina B. Influenza transmission among HCWs and patients. GII 2015 Global Roundtable meeting, Hong Kong, Juillet 2015

Lina B. Limits of VE studies in previously immunized patients. GII 2015 Global Roundtable meeting, Hong Kong, Juillet 2015

Lina B. The discrepant perception of influenza between community and hospital. Annual Influenza Meeting, ECDC, Stockholm Juin 2015

Lina B. Emergences virales, risques épidémiques et pandémiques. Journée Médicale de Guinée, Conakry (Guinée), Mai 2015

Lina B. Connecting the actors of innovation in vaccinology. Invitation pour participer a la table ronde Biovision, Lyon, Avril 2015

Lina B. Actualités sur autres virus émergents. Journée d'étude sur le virus Ebola, La Fondation nationale pour la promotion de la santé et le Développement de la Recherche (FOREM), 4 décembre 2014, Hussein-Dey (Algérie)

Lina B. Nosocomial flu: Resistant strains and utility of rapid tests at bedside for diagnostic, management and prevention. HIS 2014, 16-18 novembre 2014 Lyon, France

van der Werf S. PREDEMICS Ebola activities. Coordinators Meeting Ebola Project, 19 January 2015, Brussels, Belgium. (2015).

van der Werf S. Chair session Emerging infectious diseases: a continuous global threat. EU-CIS ISTC Meeting on Emerging and Reemerging Infectious Diseases. 14-15 september 2015, Les Pensières, Veyrier du Lac, France

van der Werf S. Short overview of IP's international influenza activities with relevance to GAP. 10th Meeting of the WHO Global Action Plan (GAP) Advisory Group (AG) for Influenza Vaccines (Closed Session), 19 March 2015, Sao Paulo, Brazil. (2015).

van der Werf S. Chair session « Inhibitors of virion attachment/Fusion proteins ». 4th Isirv - AVG Conference. Novel Antiviral Therapies for Influenza and other Respiratory Viruses: Bench to Bedside, 02-04 June 2015, Austin, Texas, U.S.A. (2015).

van der Werf S. Chair session « Significance and communication of information » Workshop on Next Generation Sequencing of Viruses, ISIRV AVG-GISAID-PREDEMICS meeting, 20-21 May, Institut Pasteur, Paris

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

Enouf V. Flu Viruses. Surveillance and diagnostics. PCR WG Meeting - WHO, 22-24 June 2015, Geneva, Switzerland. (2015).

Enouf V. Role of PCR in virological surveillance and Diagnostics. RT-PCR Meeting (WHO), 19-20 June 2014, Geneva, Switzerland. (2014).

Enouf V. Outcome of surveillance working group. Annual Influenza Meeting (ECDC & WHO). 10-13 June 2014, Vienna, Austria. (2014).

6.2.7 Comité scientifique ou d'organisation de congrès ou colloques

- Rencontres sur la grippe, GEIG, Avril 2014 (B. Lina, S. van der Werf)
- Workshop on Next Generation Sequencing of Viruses, ISIRV AVG-GISAID-PREDEMICS meeting, 20-21 May, Institut Pasteur, Paris (S. van der Werf, co-organizer)
- 4th Isirv - AVG Conference. Novel Antiviral Therapies for Influenza and other Respiratory Viruses: Bench to Bedside, 02-04 June 2015, Austin, Texas, U.S.A. (S. van der Werf, membre du comité scientifique)

7 Coopération avec les laboratoires de santé animale

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

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

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

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

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

➤ Détection virale

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

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

➤ Isolement, et identification

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

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

➤ **Caractérisation génétique des virus influenza**

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

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

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

➤ **Analyses sérologiques**

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

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

➤ **Activités de surveillance**

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

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

Un effort particulier sera réalisé en direction des laboratoires hospitaliers du réseau RENAL afin de pallier une diminution attendue du nombre de prélèvements issus de la communauté. Les laboratoires CNR-IPP et -HCL veilleront tout particulièrement à se procurer les prélèvements ou souches virales détectées comme positives pour les virus grippaux avant et après la période de circulation épidémique, c'est à dire à un moment où la surveillance communautaire sera moins sensible que dans le cadre du réseau des GROG pour détecter les premiers et derniers virus circulant en métropole du fait de l'utilisation d'une définition de cas nettement plus restrictive que précédemment. Les efforts seront également poursuivis pour améliorer le recueil des données cliniques associées aux prélèvements ou souches en provenance des hôpitaux ainsi que pour les données de sous-typage des virus A(H3N2).

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

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

➤ **Démarche Qualité**

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

Annexes

2015

**Centre national de
référence des virus
influenzae**

**Saison
2014-2015**

Sommaire

ANNEXE 1 : MISSIONS ET OBJECTIFS	4
ANNEXE 2 : EQUIPES ET ORGANIGRAMMES.....	6
ANNEXE 3 : PLANS DES LOCAUX.....	9
ANNEXE 4 : LISTE DES PRINCIPAUX EQUIPEMENTS	14
ANNEXE 5 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR	17
1.1 Techniques de détection	17
1.1.1 Techniques de (RT-)PCR en temps réel (q(RT-)PCR).....	17
1.1.2 Autres techniques de détection.....	19
1.2 Techniques d'isolement.....	19
1.3 Techniques d'identification.....	19
1.4 Caractérisation génétique des virus influenza	19
1.4.1 Techniques de détection de polymorphismes génétiques	19
1.4.2 Techniques de séquençage.....	19
1.5 Techniques sérologiques.....	19
1.6 Caractérisation phénotypique des virus grippaux	20
ANNEXE 6 : DESCRIPTION DES COLLECTIONS.....	21
ANNEXE 7 : LISTE DES LABORATOIRES	24
ANNEXE 8 : TECHNIQUES DIVERSES	27
ANNEXE 9 : ANALYSE PHYLOGENETIQUE DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES DES GENES HA ET NA DES VIRUS DE TYPE A ET B	28

ANNEXE 1 : MISSIONS ET OBJECTIFS

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

Cela ne s'applique pas à la Guyane où existe une circulation annuelle de virus grippaux.

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

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

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

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

l'Unité de Génétique Moléculaire des Virus à ARN – Institut Pasteur – Paris (laboratoire coordonateur du CNR) pour la région Nord (CNR-IP);

le Laboratoire de Virologie Est - HCL Lyon (laboratoire associé) en région Sud (CNR-HCL);

le laboratoire de Virologie de l'Institut Pasteur de la Guyane (laboratoire associé) en région Antilles Guyane (CNR-IPG).

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

1. Apporter une expertise microbiologique

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4. Expertise et conseil

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

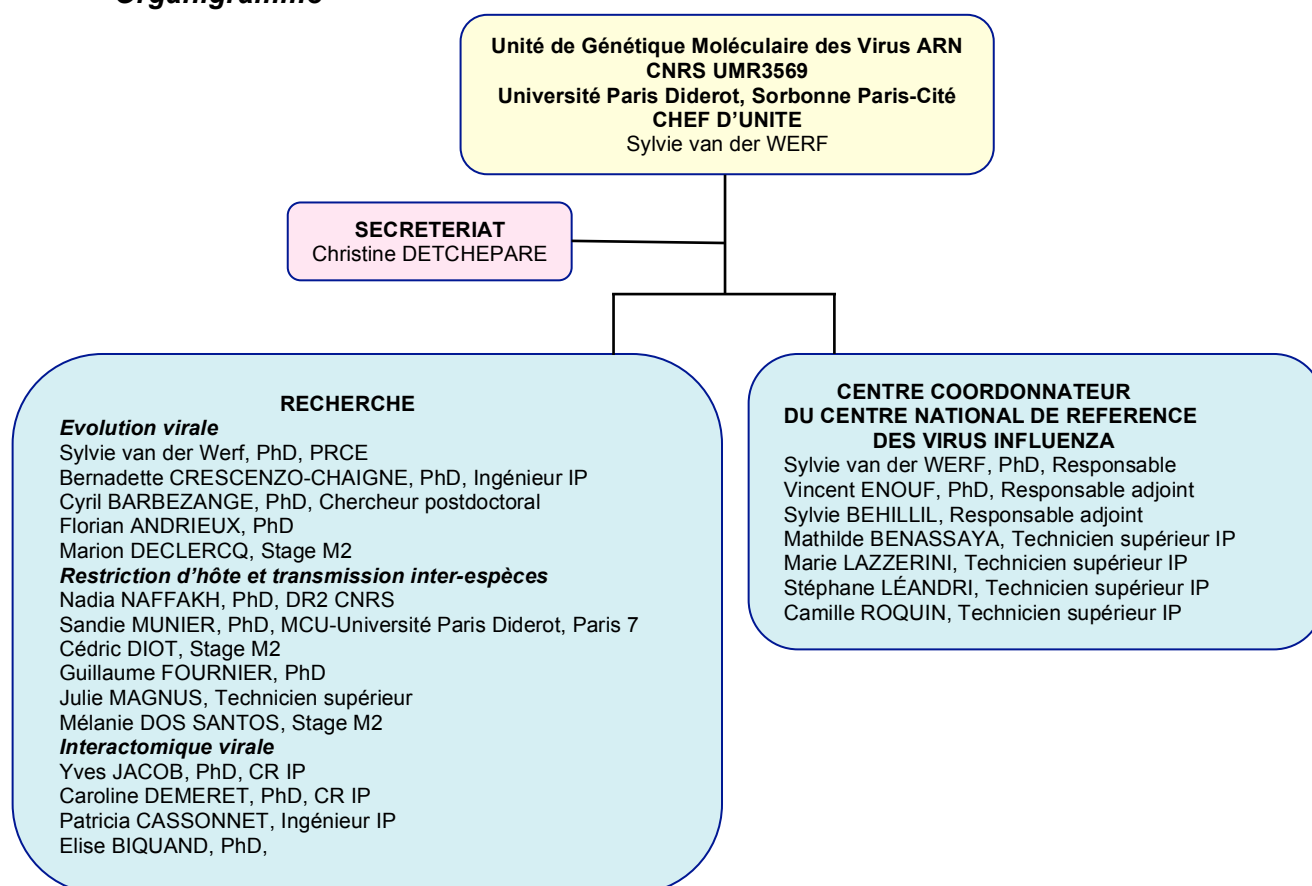
Contribuer aux travaux de préparation à une pandémie grippale de la Direction Générale de la Santé

ANNEXE 2 : EQUIPES ET ORGANIGRAMMES

➤ CNR-IPP

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

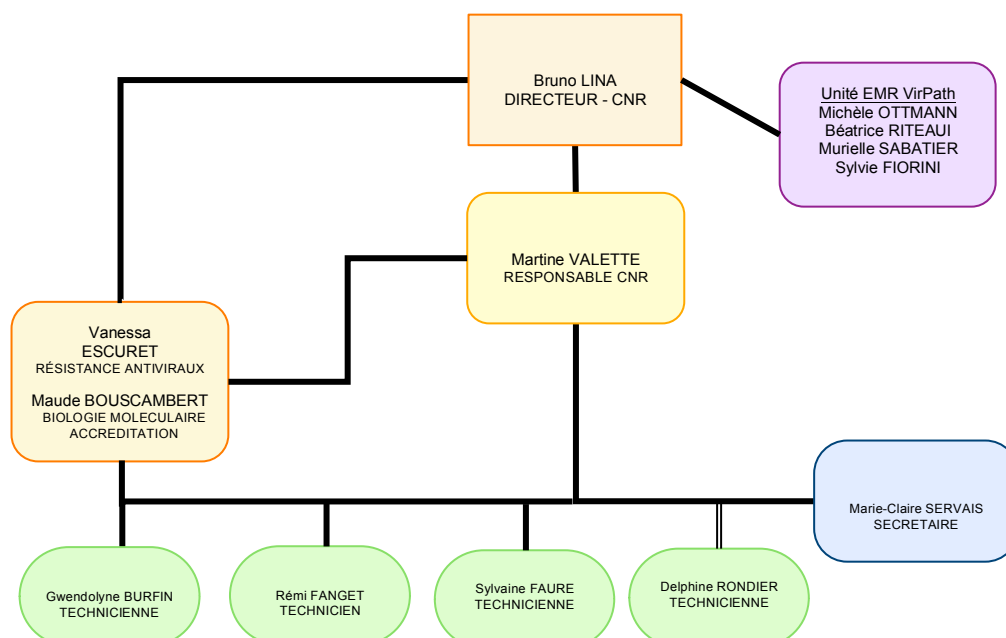
Organigramme



➤ **CNR-HCL**

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

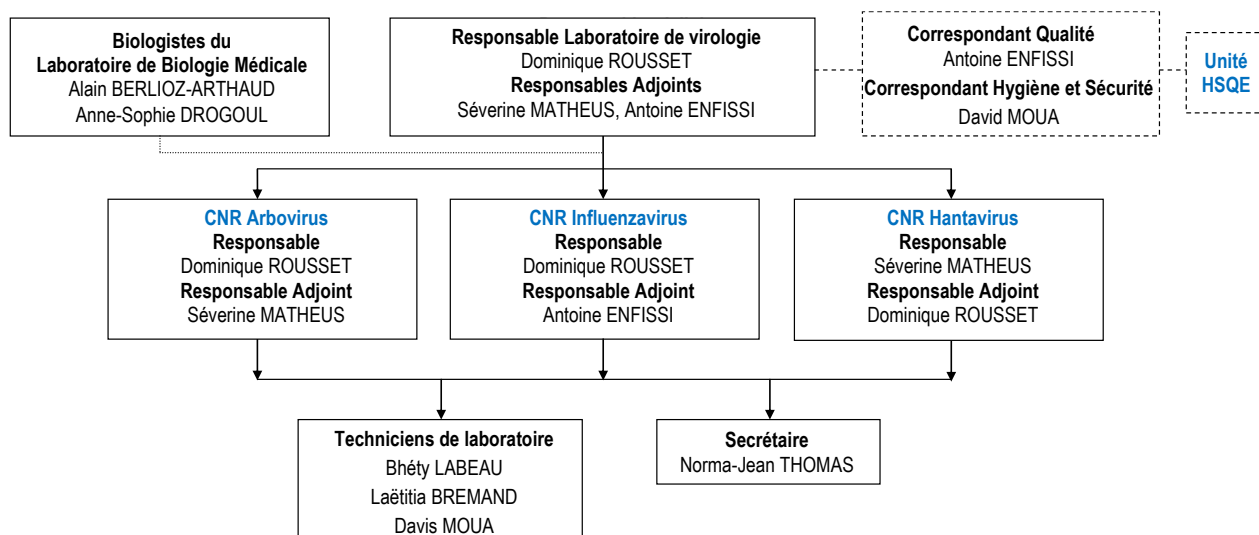
Organigramme



➤ **CNR-IPG**

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

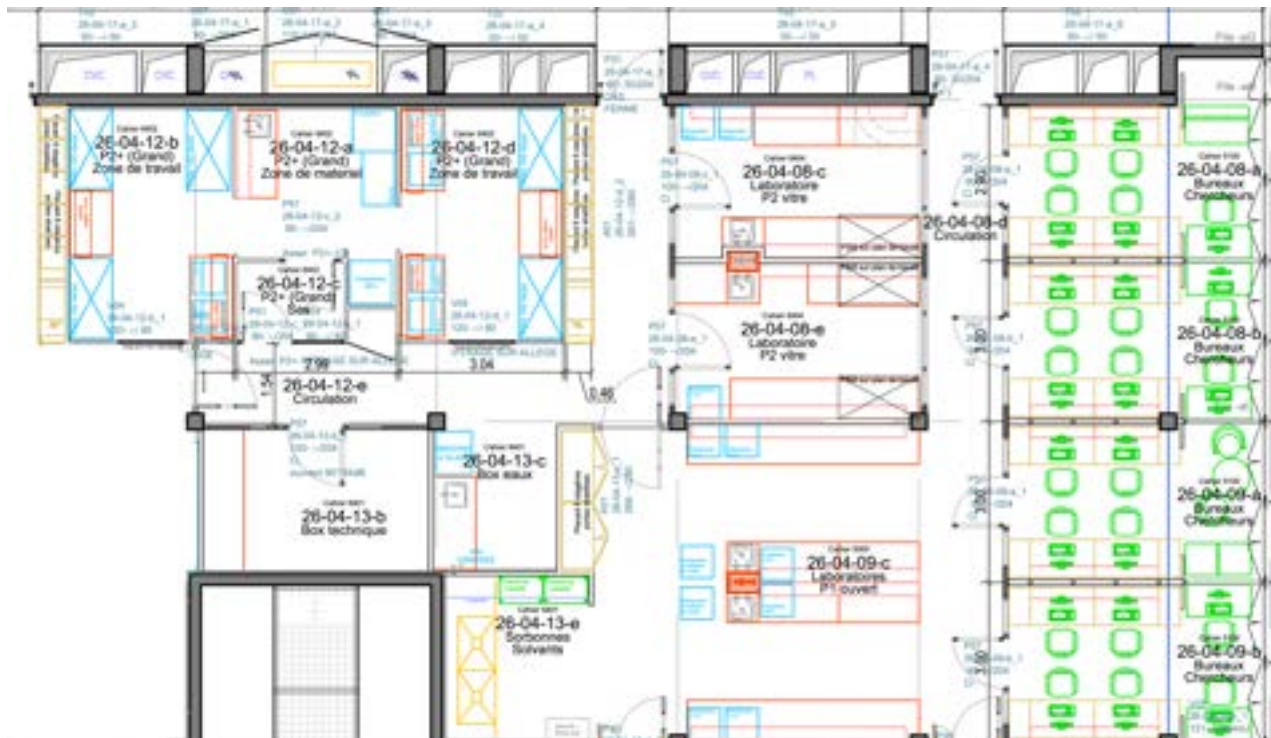
Organigramme



ANNEXE 3 : PLANS DES LOCAUX

➤ CNR-IPP

Centre François Jacob / étage 4



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

LSB2+ : 26-04-12

Réception échantillons : 26-04-08c

Culture cellulaire : 26-04-08e

Biologie moléculaire : 26-04-09c

Stockage matériel : 26-04-13b

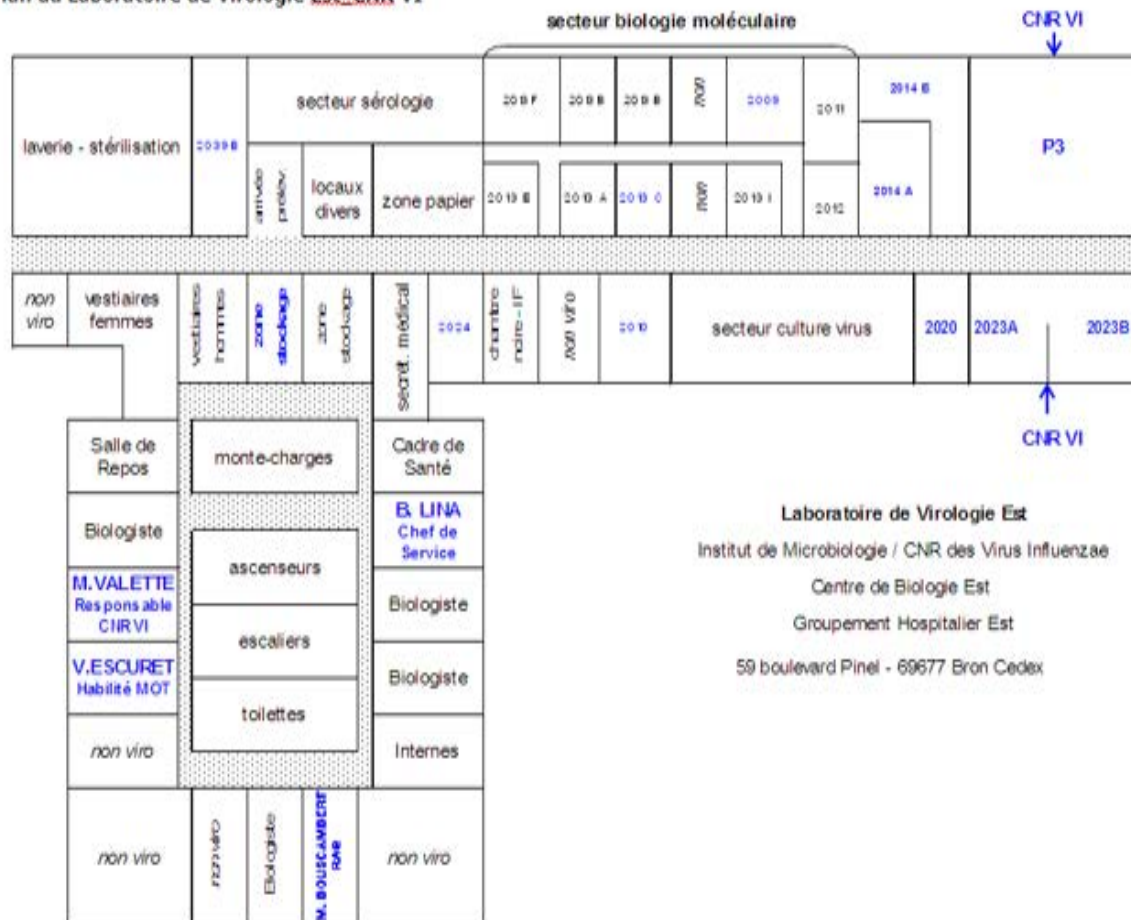
Un laboratoire type LSB2 (pièces 26-S2-10) est utilisé exclusivement par le CNR pour réaliser les mélanges réactionnels de PCR, les extractions d'acides nucléiques et l'ajout des contrôles positifs

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

➤ **CNR-HCL**

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

Plan du Laboratoire de Virologie Est CNR VI

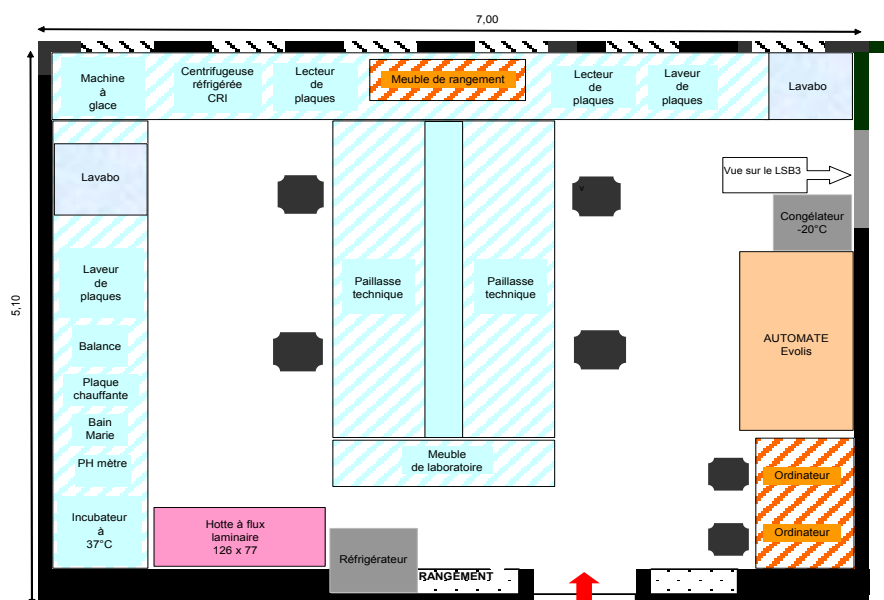


Laboratoire de Virologie Est
 Institut de Microbiologie / CNR des Virus Influenzae
 Centre de Biologie Est
 Groupement Hospitalier Est
 59 boulevard Pinel - 69677 Bron Cedex

➤ **CNR-IPG**

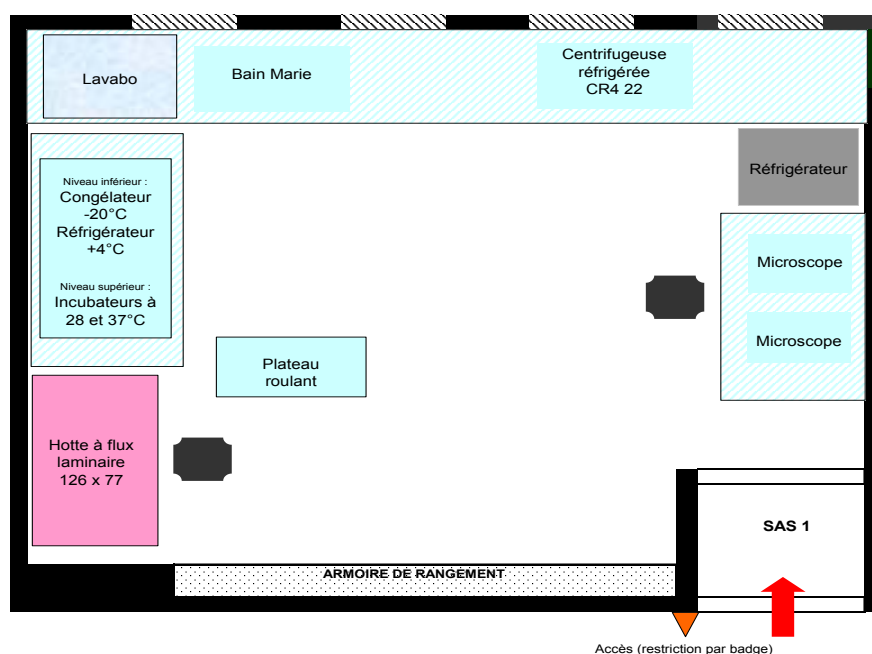
Le laboratoire bénéficie d'une superficie technique de 105 m² pour répondre aux besoins de ses activités. Il dispose de :

- Un laboratoire où sont réalisées les sérologies (34 m²).



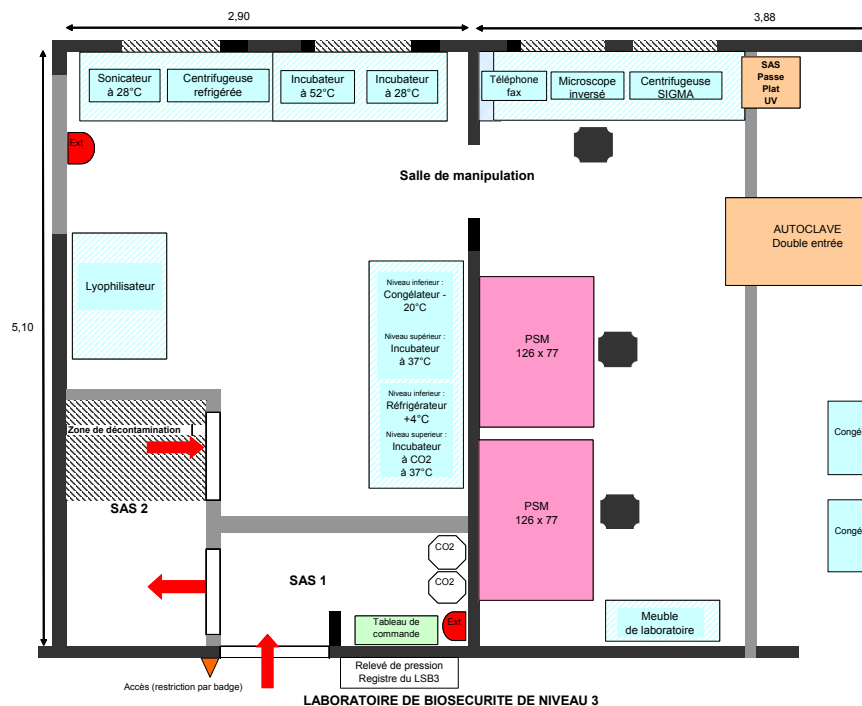
LABORATOIRE DE SEROLOGIE (Pièce 248)

- Un laboratoire de sécurité biologique de niveau 2 (LSB2) dédié à l'entretien des cultures cellulaires (18 m²).

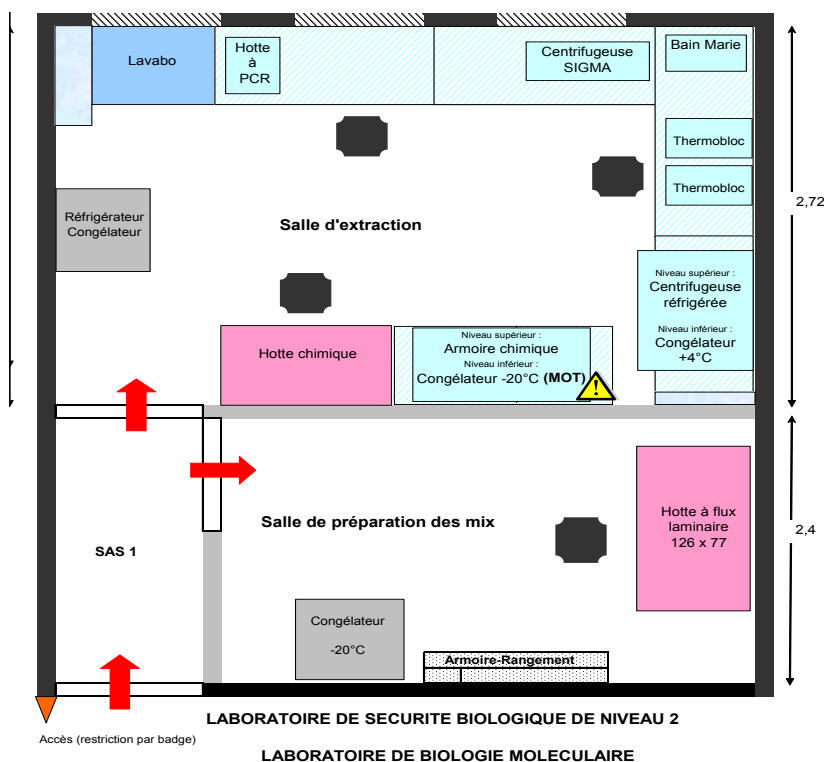


LABORATOIRE DE CULTURE CELLULAIRE (Pièce 205)

- Un laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 (LSB3) de 25 m²



- Un LSB2 dédié aux activités de biologie moléculaire de 18 m² comprenant une pièce pour l'extraction des ARN viraux et une pièce pour la préparation des mix.



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

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

ANNEXE 4 : LISTE DES PRINCIPAUX EQUIPEMENTS

➤ CNR-IPP

Qtité	Désignation	Utilisation
8	POSTE de SECURITE MICROBIOLOGIQUE	partagés
4	POMPE A VIDE	partagées
5	MICROCENTRIFUGEUSE	partagées
2	CENTRIFUGEUSE REFRIGEREE	partagées
8	RERIGERATEUR +4°C	partagées
2	RERIGERATEUR/CONGEL	
8	CONGELATEUR -20°C	partagés
8	CONGELATEUR -80°C	partagés
1	CONTAINER D'AZOTE LIQUIDE	
7	INCUBATEUR A CO2	partagés
1	LECTEUR DE MICROPLAQUES	partagés
1	LAVEUR DE MICROPLAQUES	partagés
1	PLAQUE CHAUFFANTE	
1	AGITATEUR MAGNETIQUE	
4	AGITATEUR DE TUBES - VORTEX	partagés
2	MICROSCOPE INVERSES	partagés
1	BALANCE STANDARD	
6	BAIN-MARIE	partagés
2	THERMOCYCLEUR PCR CONVENTIONNELLE	partagés
2	LIGHT CYCLER 480 (plaque 96)	partagés
1	PYROSEQUENCEUR	Commun CIBU/CNR
2	CUVE ET GENERATEUR POUR ELECTROPHORESE	
1	SYSTEME DE DOCUMENTATION DE GEL	partagé
2	COUVEUSES RETOURNEMENT AUTO	partagées
1	LYOPHILISATEUR	partagé
2	AUTOCLAVE	
1	FLUORIMETRE	partagé
1	MICROSCOPE A FLUORESCENCE	partagé
1	SEQUENCEUR NGS / Junior Roche	partagé
1	Accès plateforme P2M*	partagé

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

➤ **CNR-HCL**

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

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

Equipements Cultures

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

Equipements Biologie Moleculaire

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

Equipement Antivirogrammes

Qtité	Désignation	Utilisation
1	FLUORIMETRE	

➤ CNR-IPG

- Le laboratoire de sérologie est équipé des équipements suivants : PSM2, centrifugeuse, bain-marie, incubateur, agitateurs magnétiques, pH-mètre, balance de précision, un congélateur -20°C, un réfrigérateur et une machine à glace, l'automate EVOLIS® (chaîne ELISA – Bio-Rad).
- Le LSB2 dédié à l'entretien des lignées cellulaires est équipé d'une hotte à flux laminaire, un microscope inversé, de deux incubateurs (28°C et 37°C), d'un congélateur -20°C, d'un réfrigérateur et d'une centrifugeuse.
- Le LSB3 est équipé de deux PSM2, d'une centrifugeuse réfrigérée, de 4 incubateurs (28°C, 37°C et 37°C atmosphère 5% CO₂, 52°C), d'un microscope inversé, d'un plateau agitateur.
- Le laboratoire dispose par ailleurs de 2 congélateurs -20°C et de 4 congélateurs -80°C pour le stockage de la sérothèque et de la virothèque.
- Pour la biologie moléculaire, le laboratoire dispose de¹ :
 - Hotte à flux laminaire pour la préparation des mix réactionnels, hotte chimique pour l'extraction des ARN, centrifugeuse haute vitesse, microcentrifugeuses, 2 congélateurs -20°C, 2 réfrigérateurs, hotte PCR pour dépôt du cDNA, un bain-marie et 2 blocs chauffant à sec.
 - Trois thermocyclers (GeneAmp 9700 Applied Biosystems), deux automates de PCR en temps réel (Applied Biosystems 7300 et StepOnePlus®)
 - Une hotte PCR disposée dans une pièce séparée pour la préparation des PCR nichées.
 - Plusieurs générateurs et cuves d'électrophorèse horizontales/verticales, une hotte chimique, un transilluminateur relié à une caméra numérique, un agitateur pour culture cellulaire, une balance de précision, 2 minicentrifugeuses, un congélateur -20°C et un réfrigérateur.

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

1.1 Techniques de détection

Depuis la saison 2009-2010, la stratégie d'analyse prévoit en première intention la détection moléculaire des virus de grippe A et B dans les prélèvements primaires.

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

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

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

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

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

➤ Non commerciales

- qRT-PCR ciblant le gène M pour la détection des virus influenza de type A
- qRT-PCR ciblant les gènes HA ou NA pour la détection des virus influenza de type B
- qRT-PCR^s ciblant le gène NS pour la détection des virus influenza de type C
- qRT-PCR ciblant les gènes de l'hémagglutinine (HA) ou de la neuraminidase (NA) pour le sous-typage des virus influenza A humains : H1, N1, H1pdm09, N1pdm09, H3, N2
- qRT-PCR multiplex ciblant les gènes HA des virus influenza B et permettant la distinction des lignages B-Yamagata et B-Victoria au CNR-IPP, -HCL et -IPG (*Watzinger et al., J Clin Microbiol.* 2004 November; 42(11): 5189–5198)
- qRT-PCR ciblant les gènes HA ou NA de virus influenza aviaires des sous types suivants : H5 (2 formats ciblant des régions distinctes pour les clades 1, 2 et 3), H5 de H5N8, H7, H9, H10, N1av, N7, N9, N8(H10), N8(H5) CNR-IPP; pour le gène HA des sous-types H2, H7 & H9 CNR-HCL ; H5, H7 & N9 CNR-IPG;
- qRT-PCR ciblant les gènes HA de virus influenza 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 et B (CNR-IPP & IPG)

- qRT-PCR ciblant le gène N pour la détection des hMPV (CNR-IPP)
- qRT-PCR ciblant la région 5' non-codante du génome pour la détection des rhinovirus
- qRT-PCR ciblant le gène POL (2 régions distinctes) pour la détection du 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-IPP)

➤ **Techniques de RT-PCR commerciales**

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

Transcrits synthétiques ou plasmides quantifiés contrôles

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

- qRT-PCR ciblant le gène M pour la détection des virus influenza de type A
- qRT-PCR ciblant le gène NS pour la détection des virus influenza de type C
- qRT-PCR ciblant le gène N1
- qRT-PCR ciblant le gène H1pdm09
- qRT-PCR ciblant le gène H5 (clade 1 / taille <500 pb)
- qRT-PCR ciblant le gène H10 du virus aviaire H10N8
- qRT-PCR ciblant le gène N8 du virus aviaire H10N8
- qRT-PCR ciblant le gène H5 du virus aviaire H5N8
- qRT-PCR ciblant le gène N8 du virus aviaire H5N8
- qRT-PCR ciblant le gène POL du SARS-CoV
- qRT-PCR ciblant le gène N du SARS-CoV
- qRT-PCR ciblant le gène UpE du MERS-CoV (transcrit non MOT)
- qRT-PCR ciblant le gène ORF1a du MERS-CoV (transcrit non MOT)
- qRT-PCR ciblant le gène ORF1b du MERS-CoV
- qPCR ciblant le gène NP1 des Bocavirus humains
- qRT-PCR ciblant la GAPDH

1.1.2 Autres techniques de détection

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

1.2 Techniques d'isolement

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

1.3 Techniques d'identification

- inhibition d'hémagglutination (IHA)
- microneutralisation

1.4 Caractérisation génétique des virus influenza

1.4.1 Techniques de détection de polymorphismes génétiques

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

1.4.2 Techniques de séquençage

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

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

1.5 Techniques sérologiques

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

1.6 Caractérisation phénotypique des virus grippaux

- titrage par plages de lyse
- titrage en TCID50
- cinétique de multiplication virale
- tests de sensibilité aux antiviraux par :
 - tests de fluorescence ou fluorimétrique (substrat MUNANA) pour la détermination de la sensibilité aux antineuraminidases.
 - Tests de réduction de plaque ou de réduction de titre HA pour la sensibilité aux adamantanes

ANNEXE 6 : DESCRIPTION DES COLLECTIONS

Collections de Prélèvements et Souches virales

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

Les 3 laboratoires du CNR détiennent et maintiennent une collection de souches de virus grippaux de référence d'origine nationale et internationale comprenant notamment les souches de la composition vaccinale des sous-types H1N1, H2N2, H3N2 et de type B dont les plus anciennes remontent à 1933. Une collection structurée de 72 souches virales remontant à l'année 1968 et associant les informations suivantes : titre viral en pfu/ml, caractérisation antigénique ; séquences des gènes HA, NA, M, etc... a été mise en place au CNR-IPP avec l'aide de la CRBIP. 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 (lignées B-Yamagata et B-Victoria) ainsi qu'à des isolats viraux ayant des caractéristiques particulières (résistance aux antiviraux, mutations de virulence, etc..) ont été conservés et mis en collection. Les données cliniques associées ainsi que, pour une sélection de 20 à 50 isolats chaque saison, les séquences des gènes HA, NA, et éventuellement d'autres segments (M notamment) sont disponibles. Ainsi, le CNR-IPP dispose d'une collection de plus de 23 000 isolats de virus grippaux humains.

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

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

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

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

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

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

Collections de Sérums

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

En outre, les 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 différentes clades de virus H5N1 aimablement fournis par le CCOMS d'Atlanta.

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

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

Conditions de stockage

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

Conditions de mise à disposition des collections

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

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

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

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

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

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

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

Différents points essentiels sont appréhendés dans ces accords :

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

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

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

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

ANNEXE 7 : LISTE DES LABORATOIRES

a) Réseau RENAL et Grippe A

Région Nord

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

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

Région Sud

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

Hôpitaux Militaires : Bordeaux – Lyon - Marseille – Toulon

b) Liste des laboratoires habilités – cas MERS-CoV

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

c) Liste des échanges avec des organismes extérieurs

Exportations

➤ CNR-IPP

Adresse	Interlocuteur	Désignation produit	Date
HIA Ste Anne	Dr JANVIER	Protocole typage virus type A	10/09/2014
CNR grippe Sud / LYON	Dr VALETTE	Sérums humains / SEROMERS InVS	03/09/2014
CNR grippe Sud / LYON	Dr VALETTE	Sérums humains / SEROMERS InVS	11/09/2014
IP Guyane	Dr ROUSSET	Souche virus rabique drosophile	25/10/2014
Hop. Paul Brousse	Dr DEBACK	Souche virus grippal / type A et B	18/11/2014
Hop. Pitié Salpêtrière	Dr AUTRAN	Souche virus grippal / Type A PR8	25/11/2014
CHRU de Brest	Dr PILORGE	Protocole typage virus type B	24/02/2015
CHU de Nantes	Dr MOREAU-KLEIN	Protocole typage virus type B	21/04/2015
Institut Louis Malardé/Papeete	Dr NHAN	Protocole typage virus type A	21/04/2015
Hop. Zobda-Quitman (Fort-de-France)	Dr NAJIOULLAH	ARN synthétiques MERS-CoV	25/06/2014
CHU Versailles	Dr MARQUE	Souche virus grippal / type A et B	16/07/2015
Hop. Saint Louis	Dr LE GOFF	Souche virus grippal / type A	20/07/2015

ANNEXE 8 : TECHNIQUES DIVERSES

Méthode de prélèvement naso-pharyngé

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

L'écouvillon est introduit dans un tube contenant du milieu de transport pour virus. Chaque prélèvement est accompagné d'une fiche clinique qui comporte des renseignements concernant le patient : identification, âge, sexe, signes cliniques, statut vaccinal, traitement ainsi que les coordonnées du médecin préleveur.

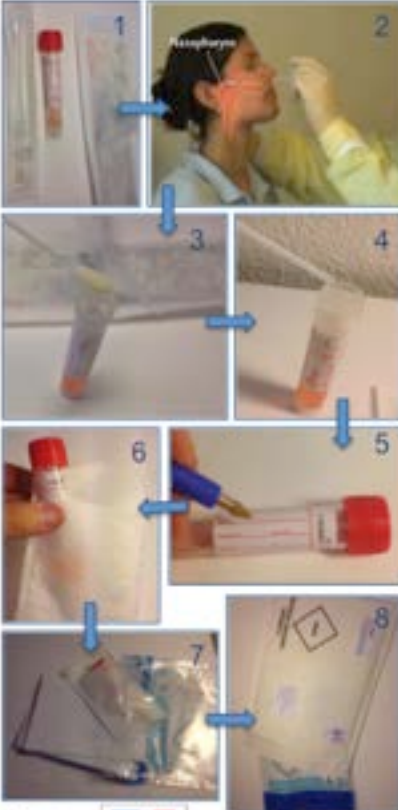
L'écouvillon est adressé au laboratoire par la poste dans un emballage sécurisé.

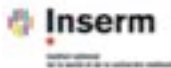
Ci-dessous le mode opératoire de l'écouvillonnage naso-pharyngé adressé au médecin

Sentinelles

Mode opératoire de l'écouvillonnage naso-pharyngé

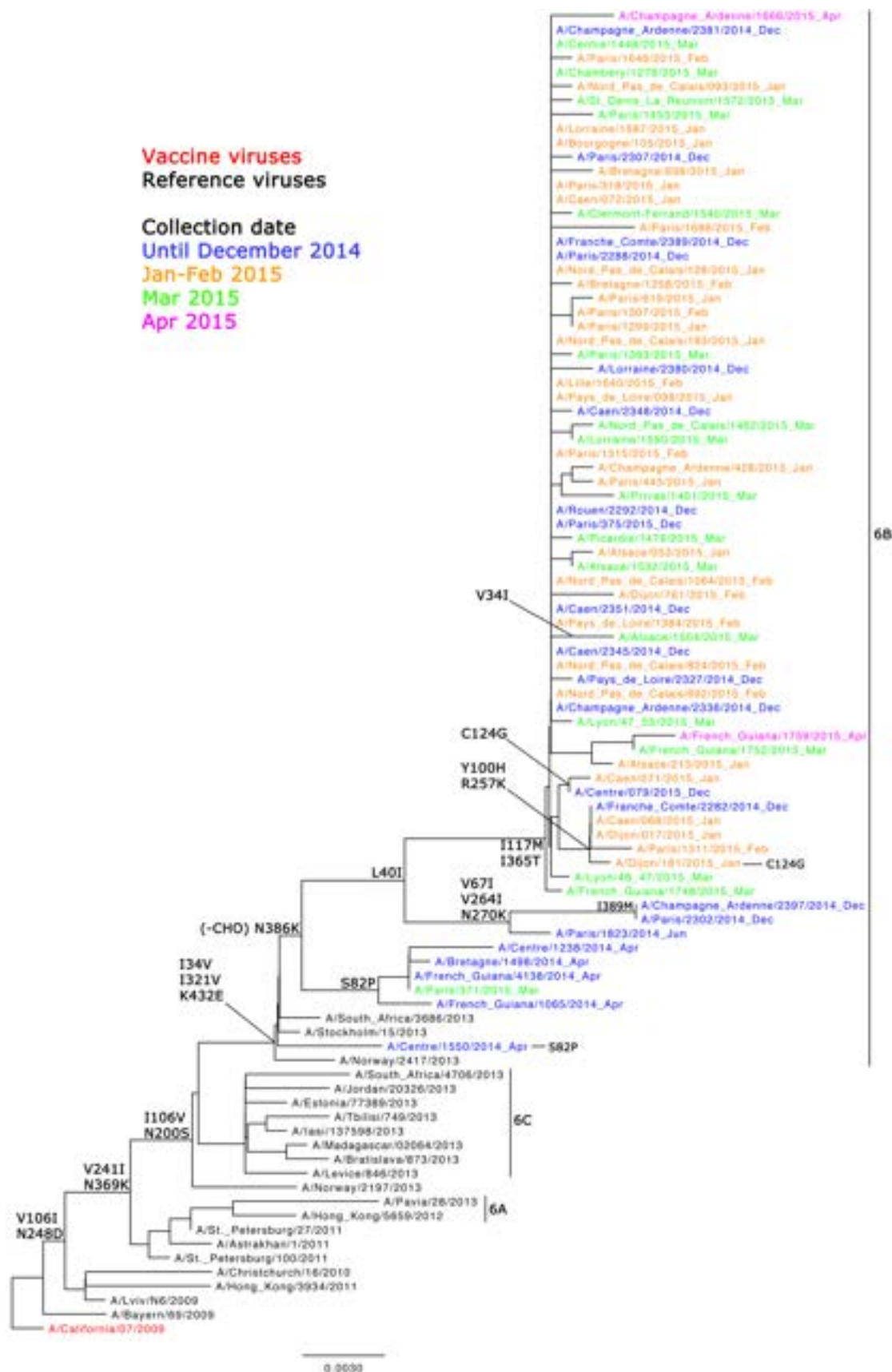
1. Ouvrir le sachet contenant l'écouvillon
2. Insérer le plus loin possible l'écouvillon dans la narine
Effectuer une rotation lente contre la paroi nasale afin de détacher des cellules (peut donner envie d'éternuer)
3. Placer l'écouvillon dans le milieu de transport
4. Casser la tige de l'écouvillon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



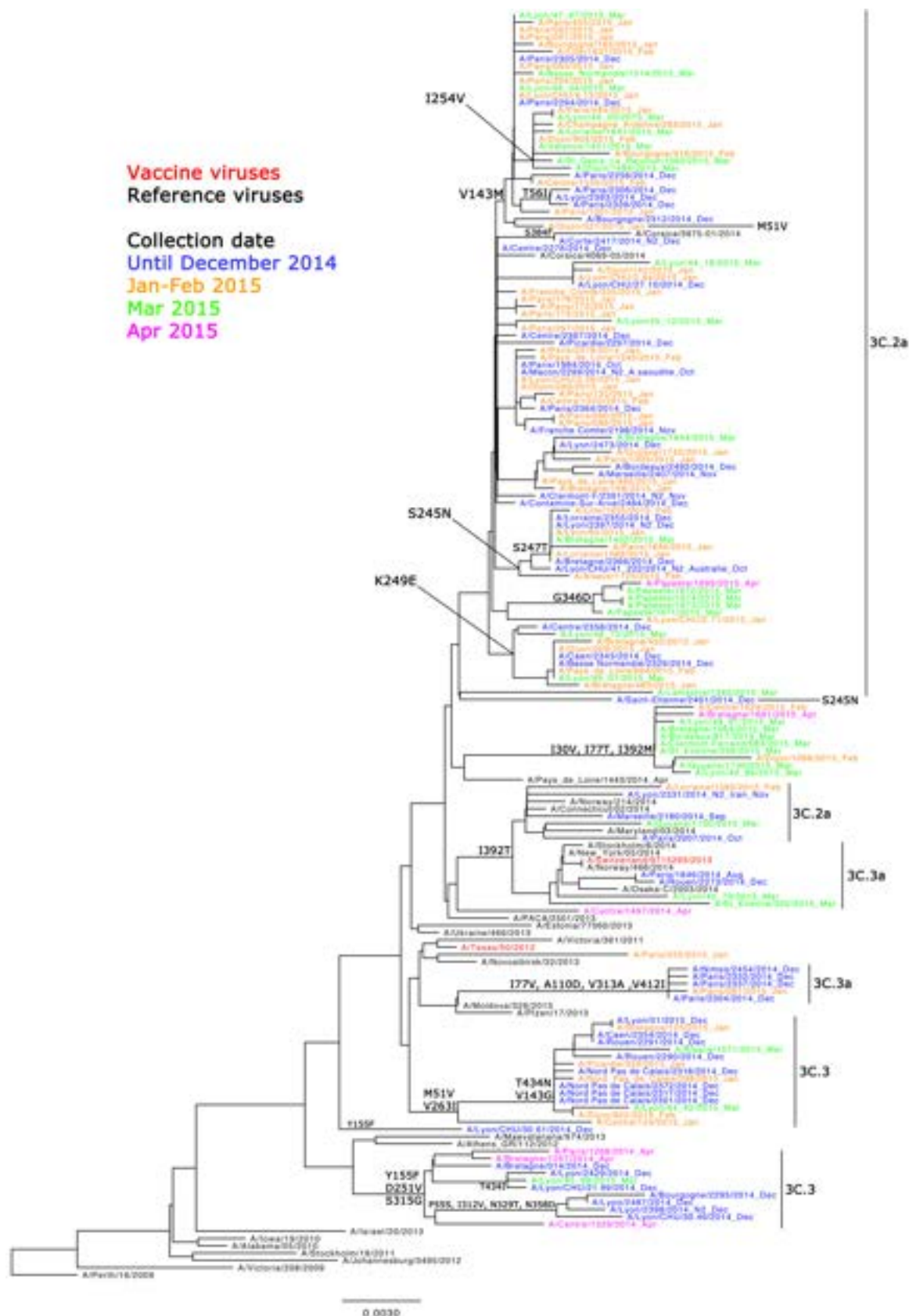


Analyse phylogénétique du gène HA des virus A(H1N1)pdm09 / saison 2014-2015

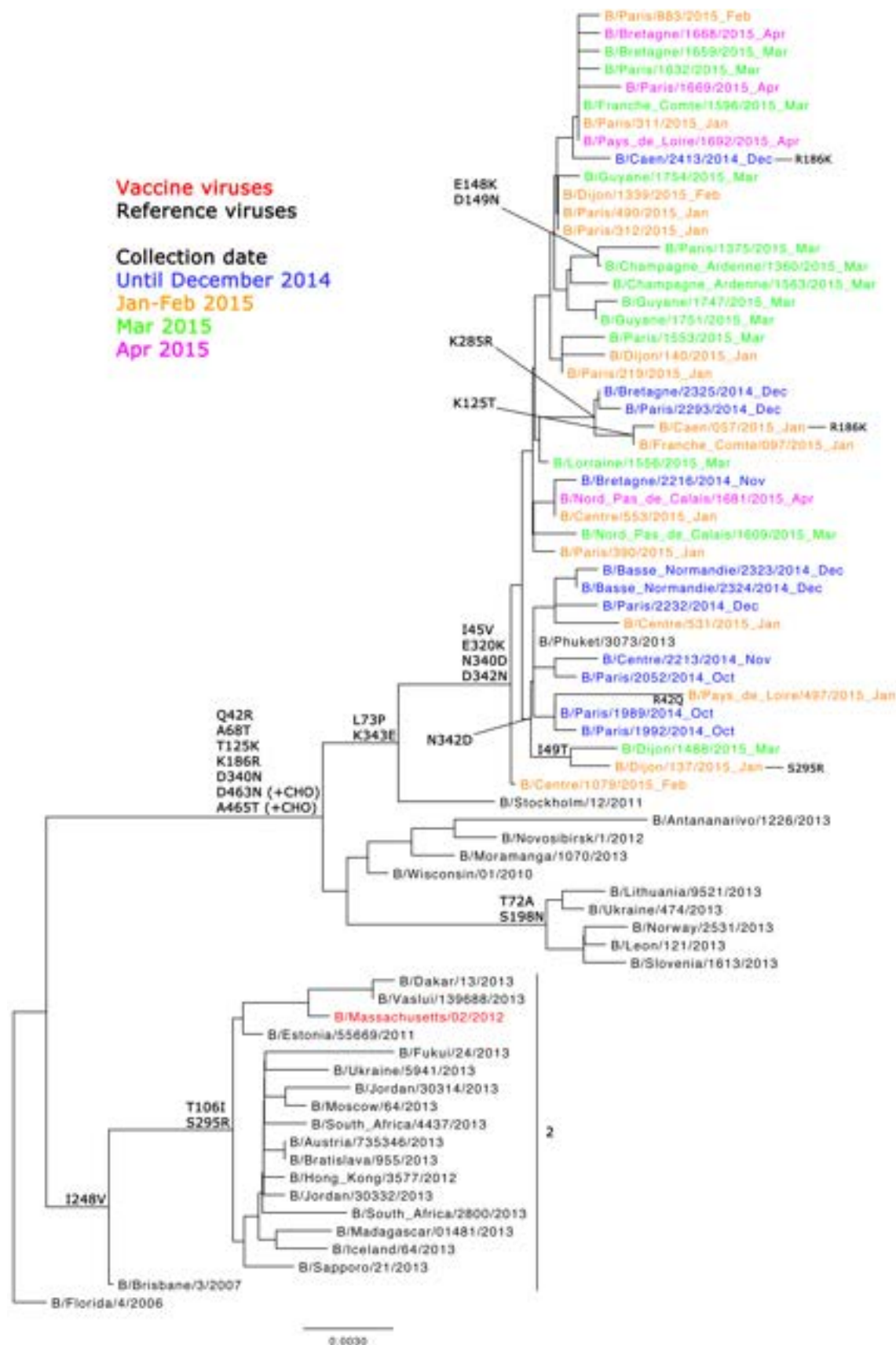




Analyse phylogénétique du gène NA des virus A(H1N1)pdm09 / saison 2014-2015



Analyse phylogénétique du gène NA des virus A(H3N2) / saison 2014-2015



Analyse phylogénétique du gène NA des virus B-Yamagata / saison 2014-2015