

**Rapport annuel
d'activité**

2018

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

**Saison
2017-2018**

Sommaire

1	Missions et organisation du CNR.....	9
1.1	Equipes	10
1.2	Locaux et équipements	12
1.3	Démarche qualité	12
2	Activités d'expertise	13
2.1	Évolutions des techniques.....	13
2.2	Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et troussees	13
2.3	Techniques transférées vers d'autres laboratoires	14
2.4	Collections de matériel biologique et études.....	14
2.4.1	Collection de souches de virus influenza aviaire	14
2.4.2	Collection de prélèvements provenant d'études ou de firmes	14
2.4.3	Collection de souches, antigènes de référence et immun-sérums.....	15
2.4.4	Distribution de matériel biologique.....	16
2.5	Activités d'expertise au cours de la saison 2017-2018	17
2.5.1	Analyses virologiques d'échantillons cliniques humains, surveillance saisonnière des virus grippaux	17
2.5.2	Analyses virologiques d'échantillons cliniques humains, surveillance saisonnière des autres virus respiratoires.....	23
2.5.3	Analyse virologique d'échantillons cliniques humains, virus émergents	24
2.5.3.1	Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV)	24
2.5.3.2	Virus de grippe aviaire A(H7N9), A(H5N1)	25
2.5.4	Sensibilité aux antiviraux	25
2.6	Activités de séquençage	26
2.6.1	CNR-IPP	26
2.6.2	CNR-HCL.....	27
2.6.3	CNR-IPG	29
3	Activités de surveillance	30
3.1	Surveillance en Métropole	30
3.1.1	Description du réseau des partenaires.....	30
3.1.1.1	Les partenaires.....	30
3.1.1.2	Les prélèvements	33
3.1.1.3	Données d'activité médicale et sanitaire	34
3.1.2	Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections respiratoires virales..	36
3.1.2.1	Chronologie et distribution géographique du nombre des isollements/détections de virus grippaux et de VRS en France métropolitaine	36
3.1.2.2	Caractérisation antigénique des virus grippaux.....	44
3.1.2.3	Caractérisation génétique des virus grippaux isolés en France	45
3.1.2.4	Distribution par âge des cas de grippe virologiquement confirmés (Réseau Sentinelles) ...	54
3.1.2.5	Cas de grippe confirmés virologiquement chez des personnes vaccinées	54
3.1.2.6	Contribution à la surveillance microbiologique et épidémiologique des autres agents pathogènes responsables d'infections respiratoires aigües	56
3.1.3	Surveillance de la résistance aux antiviraux	64
3.1.3.1	Résistances aux adamantanes	64
3.1.3.2	Résistance aux inhibiteurs de la neuraminidase (INA)	64
3.1.3.3	Tests fluorimétriques (phénotypiques).....	65
3.2	Surveillance aux Antilles et en Guyane	66
3.2.1	Description du réseau de partenaires	66
3.2.1.1	Les partenaires.....	66
3.2.1.2	Les prélèvements	66
3.2.2	Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections respiratoires virales..	66

3.2.2.1	Chronologie et distribution géographique du nombre des détections de virus grippaux et de VRS	66
3.2.2.2	Caractérisation antigénique et génétique des virus grippaux – Antilles et Guyane	72
3.2.2.3	Distribution par âge des cas de grippe virologiquement confirmés – Antilles et Guyane	73
3.2.3	Surveillance de la résistance aux antiviraux	73
3.3	Interface avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	74
3.3.1	EISN/ECDC	74
3.3.2	FluNet/OMS	74
3.3.3	Contrôle de Qualité	74
3.4	Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	75
4	Alerte	76
5	Activités de rétro-information, de formation et de conseil	78
5.1	Conseil et expertise aux professionnels de santé	78
5.1.1	Enseignements	78
5.1.2	Formation, accueil de stagiaires	79
5.1.3	Modalités de diffusion des données de la surveillance	79
5.2	Conseil et expertise aux autorités sanitaires	80
5.2.1	Activités auprès des instances de santé nationales	80
5.2.1.1	Ministère de la Santé, DGS, DGAL, DGT	80
5.2.1.2	Santé Publique France	80
5.2.1.3	ANSES	80
5.2.1.4	COFRAC	80
5.2.1.5	Instances de santé nationales et régionales (DFA)	80
5.2.1.6	ANSM	80
5.2.2	Activités auprès des instances de santé internationales	80
5.2.2.1	EISN/ECDC	80
5.2.2.2	OMS	80
5.2.3	Membre de réseaux et membre de conseil scientifique d'institutions extérieures	81
5.3	Conseil et expertise pour d'autres cibles	81
6	Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	83
6.1	Activités de recherche en lien direct avec l'activité du CNR	83
6.1.1	CNR-IPP	83
6.1.2	CNR-HCL	85
6.2	Publications et communications en lien direct avec l'activité du CNR	88
6.2.1	Publications nationales	88
6.2.2	Publications internationales	88
6.2.3	Communications nationales	91
6.2.4	Communications ¹ Internationales	91
6.2.5	Communications Nationales sur invitation et présidence de sessions	92
6.2.6	Communications Internationales sur invitation et présidence de sessions	93
6.2.7	Comité scientifique ou d'organisation de congrès ou colloques	94
7	Coopération avec les laboratoires de santé animale	94
8	Programme d'activité pour l'année 2018-2019	95

Figures

Figure 1 : Organigramme de l'unité de Génétique Moléculaire des Virus à ARN	10
Figure 2 : Organigramme du laboratoire de virologie de l'IAI.....	11
Figure 3 : Organigramme du laboratoire de virologie de l'IPG hébergeant le CNR des virus des infections respiratoires (dont la grippe), laboratoire associé IP Guyane au 31/12/2017 (en rouge : CNR virus des infections respiratoires-IPG)	12
Figure 4: Représentation géographique des médecins généralistes Sentinelles ayant accepté de participer à la surveillance virologique des syndromes grippaux saison 2017-2018, par région (Source réseau Sentinelles, INSERM/UPMC, http://www.sentiweb.fr)	31
Figure 5 : Représentation géographique des pédiatres Sentinelles ayant accepté de participer à la surveillance virologique des syndromes grippaux saison 2017-2018, par région (Source réseau Sentinelles, INSERM/UPMC, http://www.sentiweb.fr)	32
Figure 6 : Syndromes grippaux (GC) pour 100 000 habitants et pourcentage de virus grippaux détectés en médecine générale (Réseau Sentinelles) – période S40/2017-S20/2018	35
Figure 7 : Syndrome grippaux (GC) pour 100 000 habitants par tranches d'âge en France..	35
Figure 8 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France	36
Figure 9 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France-Nord	37
Figure 10 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France-Sud	37
Figure 11 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France	38
Figure 12 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Nord	39
Figure 13 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Sud	39
Figure 14 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France	40
Figure 15 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Nord	41
Figure 16 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Sud	41
Figure 17 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France	42
Figure 18 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Nord	43
Figure 19 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Sud	43
Figure 20 : Analyse phylogénétique du gène HA des virus A(H1N1)pdm09 – saison 2017-2018	46
Figure 21 : Analyse phylogénétique du gène NA des virus A(H1N1)pdm09 – saison 2017-2018	47
Figure 22 : Analyse phylogénétique du gène HA des virus A(H3N2) – saison 2017-2018	48
Figure 23 : Analyse phylogénétique du gène NA des virus A(H3N2) – saison 2017-2018	49
Figure 24 : Analyse phylogénétique du gène HA des virus B Yamagata – saison 2017-2018	50
Figure 25 : Analyse phylogénétique du gène NA des virus B Yamagata – saison 2017-2018	51
Figure 26 : Analyse phylogénétique du gène HA des virus B Victoria – saison 2017-2018..	52
Figure 27 : Analyse phylogénétique du gène NA des virus B Victoria – saison 2017-2018...	53
Figure 28 : Détection du VRS en France	56
Figure 29 : Détection du VRS en France-Nord	57
Figure 30 : Détection du VRS en France-Sud	57
Figure 31 : Détection du VRS en France-Nord. Répartition VRS A, VRS B et VRS non typés.	58
Figure 32: Détection des rhinovirus humains en France.....	59
Figure 33: Détection des rhinovirus humains en France-Nord.....	60
Figure 34: Détection des rhinovirus humains en France-Sud	60
Figure 35: Détection des adénovirus en France	61
Figure 36: Détection des virus parainfluenza (PIV) en France.....	62
Figure 37: Détection des métapneumovirus humains en France	63
Figure 38 : Estimation du nombre hebdomadaire de consultations pour syndrome grippal, Médecins généralistes de Guyane ou CDPS – janvier 2015 à avril 2018 (Source Cire Guyane).....	67

Figure 39 : Estimation du nombre hebdomadaire de consultations en médecine de ville pour syndromes grippaux et seuil saisonnier, Guadeloupe – juillet 2015 à avril 2018 (Source Cire Antilles).....	68
Figure 40 : Estimation du nombre hebdomadaire de consultations en médecine de ville pour syndromes grippaux et seuil saisonnier, Martinique – juillet 2015 à avril 2018 (Source Cire Antilles).....	68
Figure 41 : Détection des virus grippaux aux Antilles et Guyane CNR-IPG / saison 2017-2018	69
Figure 42 : Détection des virus grippaux et VRS en Guyane - CNR-IPG / saison 2017-2018 (semaines S40/2017 à S32/2018).....	70
Figure 43 : Détection des virus grippaux aux Antilles (Martinique et Guadeloupe).....	70
Figure 44 : Répartition des virus grippaux détectés aux Antilles et Guyane	71
Figure 45 : Répartition des virus grippaux détectés en Guyane- CNR-IPG / saison 2017-2018	71
Figure 46 : Répartition des virus grippaux détectés en Martinique - CNR-IPG / saison 2017-2018	72
Figure 47 : Répartition des virus grippaux détectés en Guadeloupe - CNR-IPG / saison 2017-2018	72

Tableaux

Tableau 1 : Sérums de furets post-infectieux et souches reçus par les CNR-IPP et -HCL....	15
Tableau 2 : Bilan des prélèvements analysés par les CNR-IPP et -HCL	21
Tableau 3 : Bilan des prélèvements analysés par le CNR-IPG.....	22
Tableau 4 : Bilan des détections des autres virus respiratoires par les CNR-IPP et –HCL ...	23
Tableau 5 : : Bilan des détections des VRS par le CNR-IPG	23
Tableau 6 : Bilan des suspicions d'infections à MERS-CoV analysées par les CNR-IPP et CNR-HCL. \$ EV/HRV : entérovirus/rhinovirus.....	24
Tableau 7 : Bilan du nombre de séquences réalisées durant la saison 2017/2018.	27
Tableau 8 : Bilan du nombre de séquences réalisées durant la saison 2017/2018.	28
Tableau 9 : Répartition par région des médecins généralistes et pédiatres du Réseau Sentinelles ayant accepté de participer à la surveillance virologique et proportion par rapport aux généralistes et pédiatres en exercice dans la région - France, saison 2017-2018. (Source réseau Sentinelles, INSERM/UPMC, http://www.sentiweb.fr)	31
Tableau 10 : Liste des pathogènes.	33
Tableau 11 : <i>Distribution par âge des patients– Réseau Sentinelles</i>	54
Tableau 12 : Distribution par tranche d'âge et par (sous)-type viral - Réseau Sentinelles.....	54
Tableau 13 : Statut vaccinal - Distribution des virus grippaux détectés au CNR	55
Tableau 14 : Statut vaccinal - Distribution par tranche d'âge	55
Tableau 15 : Répartition des VRS en fonction de l'âge. France métropolitaine	58
Tableau 16 : Répartition des métapneumovirus en fonction de l'âge. France entière	63
Tableau 17 : Résultats des tests phénotypiques de sensibilité à l'oseltamivir (CNR-IPP, CNR-HCL)	65
Tableau 18 : Distribution par âge des patients – Antilles et Guyane- Surveillance sentinelle / 2017-2018	73
Tableau 19 : Distribution par tranche d'âge et par (sous)-type viral – Antilles et Guyane.....	73
Tableau 20 : Bilan des cas groupés analysés par le CNR-IPP et –HCL	76

Résumé analytique

En France métropolitaine, la saison de surveillance 2017-2018 a été marquée par une épidémie grippale précoce et particulièrement longue, avec 2 vagues successives, la première étant essentiellement due aux virus de grippe A(H1N1)pdm09 et la deuxième aux virus de grippe B de lignage Yamagata.

Les détections de virus grippaux dans les prélèvements communautaires du réseau de médecins généralistes et pédiatres Sentinelles ont augmenté dès la semaine S45/2017 pour atteindre un premier pic en semaine S52/2017. Un 2^{ème} pic a été atteint en semaine S8/2018. L'épidémie s'est terminée en semaine S15/2018. Ce sont d'abord les virus de grippe A(H1N1)pdm09 qui ont circulé en majorité avec co-circulation de virus de grippe B puis à partir de la semaine S4/2018, alors que les virus A(H1N1)pdm09 diminuaient, les virus de grippe B sont devenus largement majoritaires jusqu'à la fin de l'épidémie. Les virus A(H3N2) sont restés sporadiques durant toute la saison.

Environ 56% des 3122 prélèvements issus du réseau Sentinelles reçus aux laboratoires du CNR en métropole ont été trouvés positifs pour un virus grippal.

L'épidémie a été marquée par une sévérité et une surmortalité importantes.

Dans les TFA (Territoires Français d'Amérique), la saison 2017-2018 a été marquée par des épidémies grippales d'intensité modérée avec pour la Guyane une période et une durée inhabituelles, assez proches de celles observées en métropole. Les périodes épidémiques se sont étendues respectivement de la semaine S52/2017 à la semaine S12/2018 pour la Guyane, de la semaine S47/2017 à la semaine S7/2018 pour la Guadeloupe et de la semaine S47/2017 à la semaine S13/2018 pour la Martinique.

Dans les trois Territoires Français d'Amérique, une co-circulation des virus de type A et B a été observée avec une prédominance de virus B Yamagata en Guyane et Guadeloupe et une majorité de virus A(H1N1)pdm09 en Martinique.

Au total 56% de l'ensemble des prélèvements des réseaux Sentinelles reçus au laboratoire du CNR en Guyane (CNR-IPG) ont été testés positifs pour un virus grippal.

In France, the particular feature of the 2017-18 season's epidemic was its long duration and early start, with two successive waves, the first one essentially due to A(H1N1)pdm09 viruses and the second one due to influenza B viruses of the Yamagata lineage.

Detection of influenza viruses in the community from specimens received by Sentinelles network, increased from the week W45/2017 to reach a first peak on week W52/2017. A second peak was reached in week W8/2018. The epidemic ended on week W15/2018. The A(H1N1)pdm09 viruses circulated first with co-circulation of B viruses and then from the week W4/2018, while A(H1N1)pdm09 viruses decreased, the B viruses became widely majority till the end of the season. During the whole season, A(H3N2) viruses remained sporadic.

Approximately 56 % of the 3122 naso-pharyngeal samples from the Sentinelles network received by the laboratories of the National Reference Center in France were found positive for an influenza virus.

The epidemic was marked by an important severity and an abnormally high death rate.

In the French overseas Territories of America (FTA), the 2017-2018 season was characterized by moderate influenza epidemics with an unusual period and duration for French Guiana, quite similar to those observed in mainland France. Epidemic periods extended respectively from weeks W52/2017 to W12/2018 for French Guiana, from weeks W47/2017 to W7/2018 for Guadeloupe and from weeks W47/2017 to W13/2018 for Martinique.

Co-circulation of type A and B viruses was observed in the 3 FTAs, with a predominance of B Yamagata virus in French Guiana and Guadeloupe and a majority of A(H1N1) pdm09 virus in Martinique. Overall, 56% of all samples from the Sentinelles network received at the laboratory of the National Reference Center in French Guiana (CNR-IPG) tested positive for an influenza virus.

1 Missions et organisation du CNR

Depuis le 30 décembre 2011, date de parution au Journal Officiel, le Centre National de Référence des virus influenzae chargé de la surveillance des épidémies associées aux virus respiratoires est composé du CNR coordonnateur hébergé par l'unité de génétique moléculaire des virus à ARN à l'Institut Pasteur à Paris (CNR-IP) et de deux laboratoires associés localisés aux Hospices Civils de Lyon (CNR-HCL) et à l'Institut Pasteur de Guyane à Cayenne (CNR-IPG). Cette organisation a été reconduite pour le nouveau mandat (dans l'Arrêté du 7 mars 2017), avec la nomination des trois laboratoires comme CNR virus des infections respiratoires (dont la grippe) avec des missions étendues.

Le rapport annuel 2017-2018 repose sur l'activité des trois laboratoires composant le CNR de la semaine S40/2017 à la semaine S20/2018 avec les données de surveillance de l'ensemble de la période pour le CNR-IP et le CNR-HCL. Le rapport annuel 2017-2018 repose sur l'activité du CNR IPG de la semaine S40/2017 à la semaine S32/2018 avec les données de surveillance de l'ensemble de la période.

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

1.1 Equipes

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

➤ **CNR IPP**

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

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

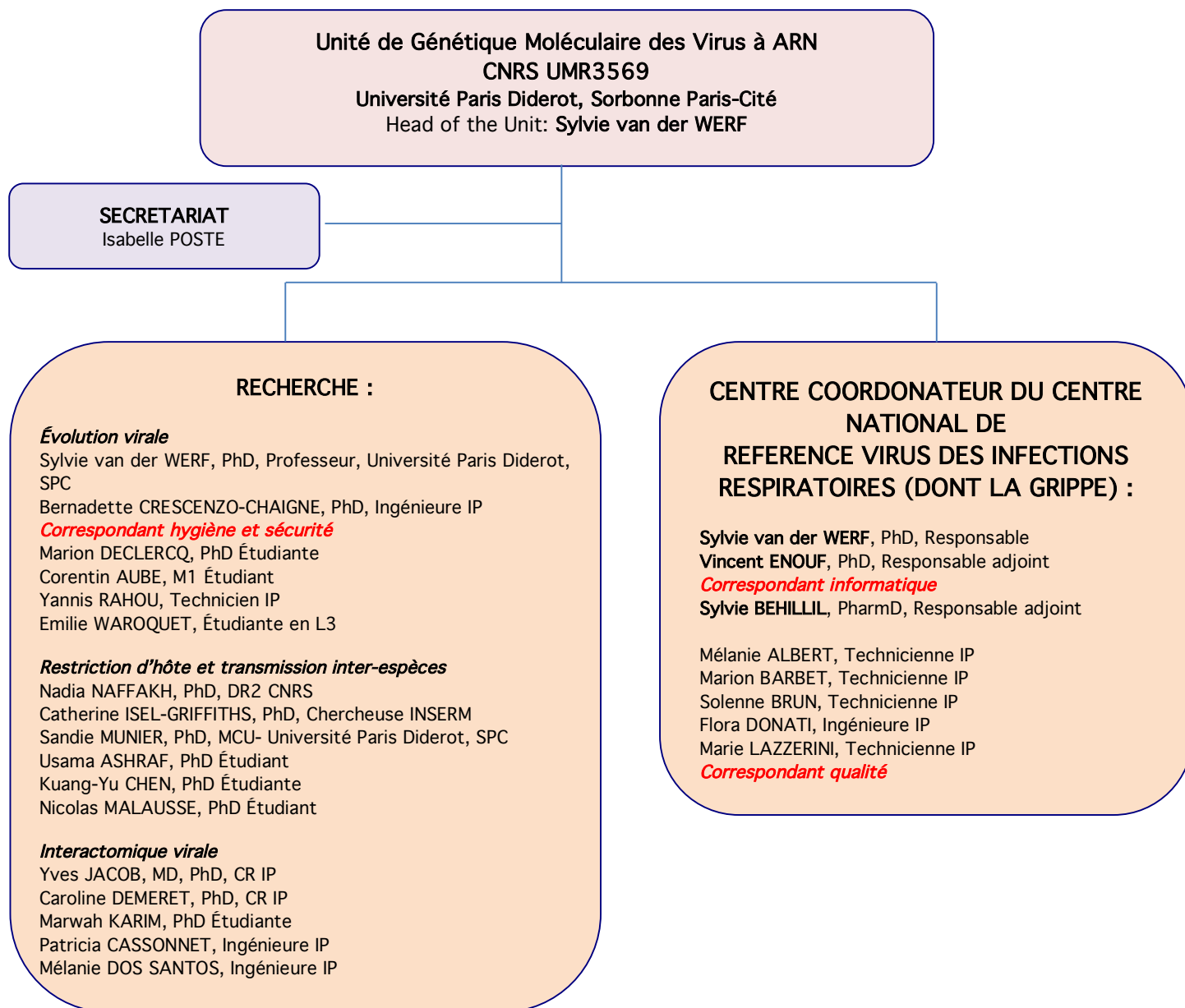


Figure 1 : Organigramme de l'unité de Génétique Moléculaire des Virus à ARN

➤ **CNR-HCL**

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

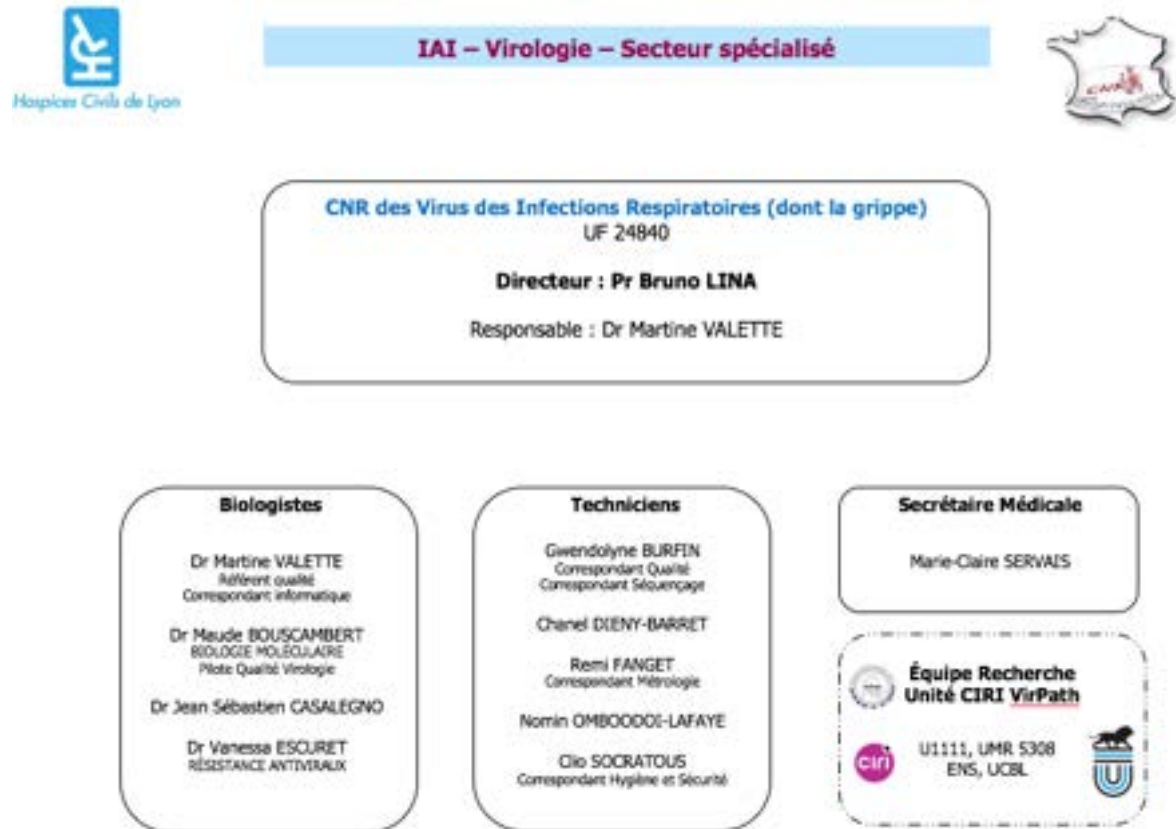


Figure 2 : Organigramme du laboratoire de virologie de l'IAI

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

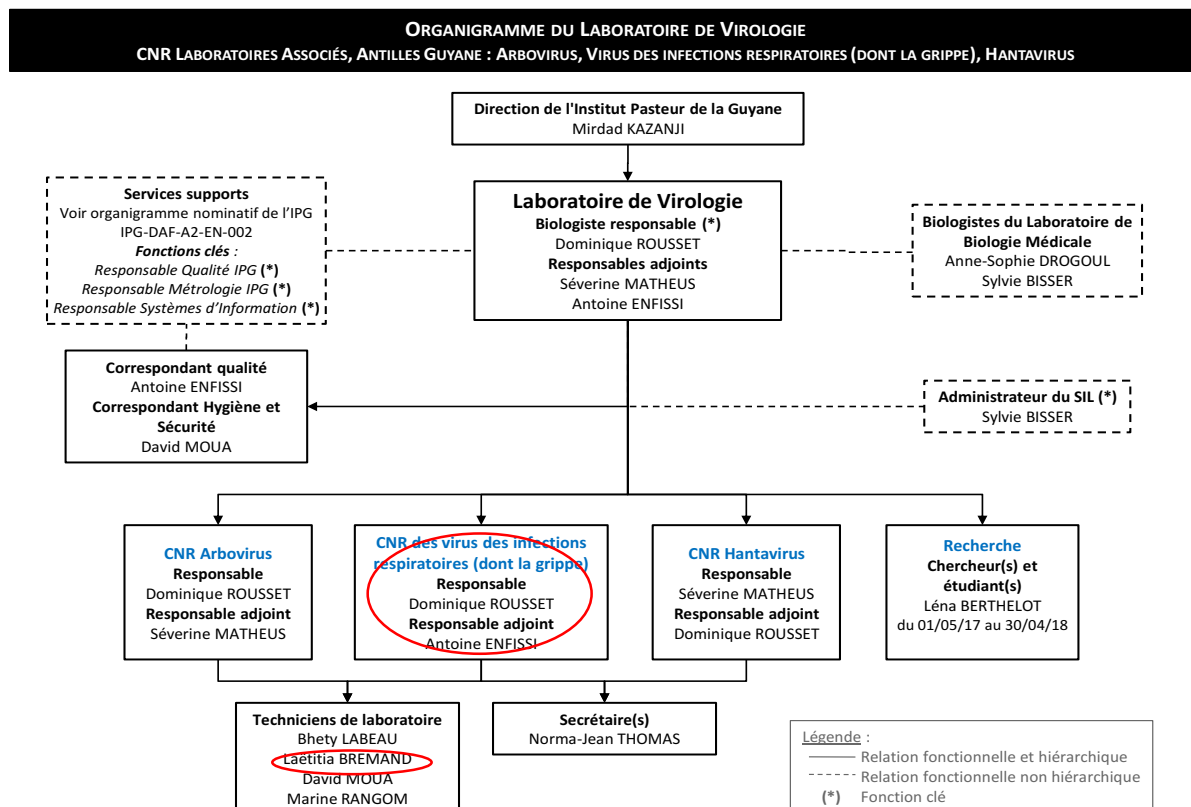


Figure 3 : Organigramme du laboratoire de virologie de l'IPG hébergeant le CNR des virus des infections respiratoires (dont la grippe), laboratoire associé IP Guyane au 31/12/2017 (en rouge : CNR virus des infections respiratoires-IPG)

1.2 Locaux et équipements

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

1.3 Démarche qualité

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

Pour les détails voir annexe 1.

2 Activités d'expertise

Au cours de la saison 2017-2018, en termes d'activités d'expertise, le CNR a, comme chaque année, vérifié l'adéquation et fait évoluer des techniques de détection, d'identification et de caractérisation génétique et phénotypique des virus influenza au regard de leur constante évolution. Conformément à l'élargissement de ses missions pour les autres virus respiratoires, ce secteur d'activité a été renforcé, notamment pour le VRS et l'évaluation de trousse de détection commerciales a été poursuivie. L'harmonisation et l'échange des procédures et des techniques reste une des priorités du CNR et un échange inter-laboratoires a été formalisé entre le CNR-IPP et le CNR-HCL.

La description des techniques disponibles est présentée en annexe 2

2.1 Évolutions des techniques

L'évolution génétique des virus grippaux de type A ne s'est pas traduite par des changements des régions cibles des qRT-PCR qui n'ont donc pas nécessité d'adaptation. Pour les virus grippaux de type B nous avons dû modifier la région cible, les performances de la qRT-PCR obtenues n'étant plus aussi bonnes.

La qRT-PCR de détection de la mutation de résistance aux antiviraux H275Y sur la HA des virus A(H1N1)pdm09 a été modifiée suite à l'apparition de virus comportant une mutation dans la région cible. Les sondes et les amorces ont été mises à jour afin de détecter également ces nouveaux virus.

Comme lors de la saison 2016-2017, les virus de sous-type A(H3N2) se cultivent très difficilement sur cellules MDCK et héماغglutinent encore plus faiblement les globules rouges de cobaye. Nous avons alors utilisé la technique ELISA pour le CNR-HCL pour détecter la présence de virus dans les cultures. La caractérisation antigénique des virus A(H3N2) doit être réalisée par inhibition d'hémagglutination en présence d'un inhibiteur de l'activité neuraminidase, l'oseltamivir, du fait du potentiel d'hémagglutination de ces virus via leur neuraminidase.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

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

L'évaluation a porté sur des trousse de tests syndromiques pour les pathogènes respiratoires. Le CNR-HCL a évalué la sensibilité analytique pour le MERS-CoV de 2 panels en comparaison des PCR de diagnostic du CNR (PCR UpE et ORF1a ; Corman *et al.* 2012).

- FilmArray® RP2plus (BioMérieux). Cette évaluation a été réalisée grâce aux échantillons du contrôle de qualité QCMD Panel 2017. Les résultats montrent que le test FilmArray® RP2plus présente les mêmes performances analytiques pour le MERS-CoV que les PCR UpE et ORF1a utilisées actuellement par le CNR.

- ePlex® Respiratory Pathogen Panel (GenMark). Cette évaluation a été réalisée grâce aux échantillons du contrôle de qualité QCMD Panel 2018. Les résultats montrent un seuil de sensibilité plus faible que les PCR UpE et ORF1a utilisées par le CNR

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Les techniques du CNR de détection par qRT-PCR des virus grippaux sont accessibles sur le site de l'OMS (http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/molecular_diagnosis/en/). Elles peuvent être ainsi mises en place par les laboratoires hospitaliers qui le souhaitent, notamment pour le sous-typage des virus de type A et plus particulièrement des virus A(H3N2). En effet, depuis la pandémie de 2009, de nombreux laboratoires hospitaliers utilisent des techniques ou des kits commercialisés capables de détecter spécifiquement les virus A(H1N1)pdm09 mais pas les virus A(H3N2). Ceci peut se traduire par des biais dans les analyses épidémiologiques.

Le CNR-HCL a diffusé les techniques de RT-PCR pour la détection et le sous-typage ou détermination du lignage des virus grippaux et le protocole de détection des Rhinovirus au CH de Mamoudzou (Mayotte).

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.

2.4 Collections de matériel biologique et études

2.4.1 Collection de souches de virus influenza aviaire

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

2.4.2 Collection de prélèvements provenant d'études ou de firmes

➤ CNR-IPP

- Réception de prélèvements respiratoires pour lesquels un virus grippal a été détecté, en provenance du Centre de Recherche Médicale et Sanitaire CERMES de Niamey, Niger. Pour caractérisation antigénique et génétique des virus grippaux. Réception de 52 échantillons en mars 2018.
- Étude VIRA : étude virologique des infections respiratoires aiguës en dehors de la période de surveillance, avec le réseau Sentinelles. Inclusion de 54 patients entre le 17/07/17 et le 28/08/2017, détection d'une grippe A(H3N2) et de 14 rhinovirus/enterovirus.
- Étude seroMERS : étude de séroneutralisation pour 75 sérums provenant des personnes contacts des 2 patients français infectés par le MERS, prélevés en 2014. Analyses réalisées après avoir obtenu l'autorisation de manipulation du MERS-CoV par l'ANSM.

- Essai d'isolement de VRS sur cellules Hep2, en collaboration avec le laboratoire de Virologie de l'hôpital Ambroise Paré à Boulogne Billancourt avec le Dr Elyanne Gault. Envoi de 32 prélèvements respiratoires frais positifs en VRS et détection d'un seul VRS B par culture.

➤ **CNR-HCL**

- **Protocole : Etude VIRA** Etude virologique des infections respiratoires aiguës vues en consultation de soins en premiers recours en France métropolitaine, en période estivale a permis d'inclure 36 patients et diagnostiquer 20 infections virales. Les virus retrouvés sont essentiellement des rhinovirus et des virus parainfluenza mais aussi des coronavirus humains, métapneumovirus et un virus grippal A(H3N2).
- **Protocole : FLUVAC.** Le CNR-HCL a reçu 120 échantillons prélevés dans le cadre du protocole FLUVAC essentiellement afin de réaliser la recherche du lignage pour les virus de type B.
- **Producteurs de Vaccins :**

GSK : 16 échantillons

A : 2 (*H1N1*)*pdm09*, A/Singapore/GP1908/2015 IVR-180 x2,
9 H3N2 (A/Hong Kong/50/2016 X297, A/Norway/3806/2016 X-295,
A/Singapore/INFIMH/16/2016 IVR-186, NIB-104x4, A/Washington/16/2017 NYMC X-301x2)

B : 5 lignage *Victoria* (B/Maryland/15/2016)

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

Les CNR-IPP et -HCL ont reçu du CCOMS de Londres (Dr J. McCauley) des sérums de furet préparés vis-à-vis des souches de virus grippaux humains de référence. Les sérums sont conservés congelés à -20°C (Tableau 6). Les CNR-IPP et -HCL ont reçu du CCOMS la nouvelle souche prototype A(H3N2) du vaccin de l'hémisphère sud 2017-2018 A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 et le sérum de furet homologue

	Souche virale	Immun-sérum
A(H1N1)pdm09		
A/California/07/2009		2017-18
A/Michigan/45/2015		2017-18
A(H3N2)		
A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016	2017-18	2017-18
A/Hong Kong/5738/2014	2017-18	2017-18
A/Hong Kong/4801/2014		2017-18
B Yamagata		
B/Wisconsin/01/2010		2017-18
B Victoria		
B/Brisbane/60/2008		2017-18
B/Norway/2409/2017	2017-18	2017-18
B/Colorado/6/2017	2017-18	2017-18

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

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

Une description détaillée des collections d'antigènes, souches et immun-sérums est donnée en annexe 1.

2.4.4 Distribution de matériel biologique

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

Le CNR-IPP a effectué 3 envois au CCOMS de Londres : en décembre 2017, en début d'épidémie, de 13 isolats (7 virus A(H1N1)pdm09, 3 virus A(H3N2), 3 virus B Yamagata) et 9 échantillons respiratoires primaires (2 virus A(H1N1)pdm09, 4 virus A(H3N2), 2 virus B Yamagata et un B Victoria). Un autre envoi a été effectué en janvier 2018 de 28 isolats (10 virus A(H1N1)pdm09, 8 virus A(H3N2) et 10 virus de type B de lignage Yamagata). Et un dernier envoi en juin 2018 de 33 isolats (10 virus A(H1N1)pdm09, 9 virus A(H3N2), 13 virus B Yamagata et un B Victoria).

Le CNR-HCL a effectué trois envois de virus grippaux au CCOMS de Londres. Le premier après plusieurs semaines de circulation en décembre 2017, de 15 isolats en provenance de la surveillance communautaire et hospitalière, (7 virus A(H1N1)pdm09) et 2 virus de type B (lignage Victoria et Yamagata) ainsi que 6 isolats (5 A(H1N1)pdm09 et 1 B Yamagata) en provenance de la surveillance communautaire de Mayotte et La Réunion en Août-novembre 2017. Puis un nouvel envoi a été effectué en Janvier 2018 de 25 isolats sélectionnés dans la surveillance communautaire et hospitalière: 6 virus A(H1N1)pdm09 dont 2 en provenance de Mayotte (Octobre 2017) 13 virus A(H3N2) et 6 virus de type B (1 Victoria et 5 Yamagata). Enfin un 3^{ème} envoi organisé en mai 2018 de 23 isolats (5 A(H1N1)pdm09, 10 B Yamagata, 1 B Victoria et 7 A(H3N2) essentiellement sélectionnés chez des patients hospitalisés dans les différents CHU du sud de la France et ayant présenté des formes graves.

Le CNR-IPG a effectué 2 envois au CCOMS d'Atlanta (CDC). Le premier en janvier 2018 en début d'épidémie, de 20 échantillons respiratoires issus de la surveillance sentinelle et des hôpitaux des Antilles et de la Guyane (6 virus A(H1N1)pdm09), 7 virus A(H3N2), 2 virus de type B de lignage Victoria et 5 virus de type B de lignage Yamagata). Le second envoi a été réalisé en juillet 2018, de 28 échantillons respiratoires issus également de la surveillance sentinelle et des hôpitaux des Antilles et de la Guyane (13 virus A(H1N1)pdm09), 5 virus A(H3N2), 3 virus de type B de lignage Victoria et 7 virus de type B de lignage Yamagata).

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

L'élargissement de la surveillance aux virus respiratoires autres que les virus grippaux a conduit les 2 laboratoires du CNR à étendre leur collaboration avec pour le VRS l'envoi de souches de VRS A et VRS B, du CNR-HCL au CNR-IPP. Un échange inter-laboratoire EIL a également été mis en place (cf § 3.3.3).

2.5 Activités d'expertise au cours de la saison 2017-2018

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

Dans leur ensemble, les laboratoires du CNR des virus des infections respiratoire (dont la grippe) ont reçu un total de 5764 prélèvements et détecté 3907 virus grippaux.

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

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

➤ CNR-IPP et CNR-HCL

En France métropolitaine, au sein des 5042 prélèvements reçus par les CNR-IPP et -HCL, 3381 (67,1% prélèvements ont été trouvés positifs pour un ou plusieurs virus grippaux (26 co-infections). Ces détections positives proviennent essentiellement de la surveillance du réseau Sentinelles (n= 1820 ; 53,8%) et des laboratoires hospitaliers (n= 1358 ; 40,2%). Le reste provient du réseau international des Instituts Pasteur (n=43 ; 1,3%), du centre médical de l'aéroport de Roissy (n=20 ; 0,6%), de laboratoires de biologie médicale (n=13 ; 0,4%), de l'Outre-mer (n=90 ; 2,7%), des EHPAD (n=28 ; 0,8%) et des laboratoires des armées (n=9 ; 0,3%).

Les virus grippaux détectés se répartissent de la manière suivante : 1939 virus grippaux de type A, avec 1506 virus A(H1N1)pdm09 (44,2%), 394 A(H3N2) (11,6%), et 39 virus de type A (1,1%) non sous-typés ; et 1468 virus grippaux de type B avec 1435 virus B-Yamagata (42,1%), 13 virus B-Victoria (0,4%) et 20 virus de type B (0,6%) pour lesquels le lignage n'a pas été déterminé (Tableau 1).

➤ CNR-IPG

Pour les Antilles et la Guyane, le CNR-IPG a reçu 722 prélèvements en provenance respectivement de Guyane (n = 423 ; 58.6%), de Martinique (n = 224 ; 31.0%) et de Guadeloupe, (n = 75 ; 10.4%). Ces prélèvements proviennent des réseaux de médecins sentinelles (n = 362 ; 50.1%), de laboratoires hospitaliers (n = 322 ; 44.6%) et de quelques laboratoires privés (n = 38 ; 5.3%).

Au total, 500 virus grippaux ont été détectés, répartis de la façon suivante : 282 (56.4%) virus grippaux de type A, avec 216 virus A(H1N1)pdm09 (44,2%), 394 A(H3N2) (11,6%), et 39 virus de type A (1,1%) non sous-typés ; et 218 (43.6%) virus de type B parmi lesquels 175 (62.1%) virus B-Yamagata et 43 virus B-Victoria (15.2%).

Le CNR-IPG a également reçu dans le cadre de la surveillance des VRS, 425 prélèvements parmi lesquels 25 VRS-A et 13 VRS-B ont été détectés.

Nbre de plvts/souches	Plvts positifs (A ou B)	Provenance Surveillance Population	Virus type A						Virus type B					
			Total A	Non sous- typés	H1N1pdm09		H3N2		Total B	Sans lignage	B Vic		B Yam	
					PCR	isolement	PCR	isolement			PCR	isolement	PCR	isolement
1707	985	Sentinelles FN	554	11	450	185	93	38	441	0	4	3	437	202
1451	770	Sentinelles FS	377	8	308	191	61	38	395	11	3	3	381	251
150	65	Sentinelles Corse	30	0	20	0	10	0	35	0	0	0	35	0
866	773	Lab hospitaliers FN	471	16	357	77	98	23	313	0	2	1	311	68
623	585	Lab hospitaliers FS	367	3	275	146	89	29	219	8	1	1	210	74
2573	1758	Total Sent./Hop FN	1025	27	807	262	191	61	754	0	6	4	748	270
2224	1420	Total Sent./Hop FS +Corse	774	11	603	337	160	67	649	19	4	4	626	325
		Alsace												
13	11	CH Strasbourg	6	0	6	0	0	0	5	0	0	0	5	0
		Bourgogne												
145	133	CH Dijon	58	1	45	16	12	4	78	0	0	0	78	39
		Bretagne												
14	12	CHU Rennes	7	0	6	1	1	0	6	0	0	0	6	0
1	1	CH Lorient	1	0	1	0	0	0	0					
66	64	CHRU Brest	43	0	29	4	14	7	21	0	0	0	21	3
		Centre												
9	5	CHR Orléans	1	0	0	0	1	0	4	0	0	0	4	1
7	7	CH de Dreux	7	0	7	2	0	0	0					
26	26	CHRU Tours	3	1	2	0	0	0	26	0	0	0	26	0
		Franche Comte												
6	5	CH Besançon	5	0	3	2	2	0	0					
		Haute Normandie												
13	12	CH Rouen	10	0	6	0	4	1	2	0	0	0	2	0
1	1	CHI Elbeuf	1	0	1	1	0	0	0					
		Ile de France												
3	3	CH Cochin	1	0	0	0	1	1	2	0	0	0	2	0
106	90	CH Pitié Salp.	69	3	57	9	9	2	21	0	0	0	21	2
20	20	Hop St Louis	15	1	11	1	3	1	5	0	0	0	5	1
91	82	CH Trousseau	37	2	26	7	9	2	46	0	1	0	45	0
22	18	CH Ambroise Paré	11	0	5	3	6	0	7	0	0	0	7	1
10	7	Hop Bichat	7	0	7	2	0	0	1	0	0	0	1	0
1	0	Hop Lariboisière	0						0					
1	0	HEGP	0						0					

Nbre de plvts/souches	Plvts positifs (A ou B)	Provenance Surveillance Population	Virus type A						Virus type B					
			Total A	Non sous- typés	H1N1pdm09		H3N2		Total B	Sans lignage	B Vic		B Yam	
					PCR	isolement	PCR	isolement			PCR	isolement	PCR	isolement
9	8	Hopital Avicenne	4	1	3	0	0	0	4	0	0	0	4	2
6	5	Hôpital Foch	1	0	0	0	1	0	4	0	1	1	3	0
18	17	CH Paul Brousse	12	1	6	2	5	0	5	0	0	0	5	2
12	11	CHU Henri Mondor	11	0	7	5	4	1	0					
10	9	CHI Créteil	4	0	3	3	1	1	5	0	0	0	5	2
31	31	CH Versailles	23	0	20	5	3	1	8	0	0	0	8	1
2	2	Hop Louis Mourier	2	0	1	0	1	0	0					
2	2	Hop St Antoine	2	0	2	0	0	0	0					
4	1	Hop Ste Camille	1	0	0	0	1	0	0					
1	1	CHI Villeneuve St G.	1	0	1	0	0	0	0					
1	0	Institut G. Roussy	0						0					
2	0	Hop. Poincaré	0						0					
1	0	Hop Américain	0						0					
6	1	CH Montereau	0						1	0	0	0	1	0
1	0	CH R. Ballanger	0						0					
3	0	CHI Meulan	0						0					
Nord Pas de Calais														
41	41	CHU Lille	19	2	16	0	1	0	22	0	0	0	22	0
1	0	CH Tourcoing	0						0					
Pays de Loire														
54	48	CH Nantes	48	2	36	1	10	2	0					
65	61	CH Angers	33	0	31	10	2	0	28	0	0	0	28	14
Picardie														
35	34	CH Amiens	24	2	15	2	7	0	11	0	0	0	11	0
3	2	CH Compiègne	2	0	2	0	0	0	0					
1	1	CH d'Abbeville	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
Aquitaine (FN)														
1	1	CHU Agen	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	CHU Toulouse	0						0					
Centre (FS)														
2	2	CH de Dreux	2	0	2	0	0	0	0					
Ile de France (FS)														
1	1	APHP	1	0	1	0	0	0	0					
Franche-Comté (FS)														
5	4	CH Besançon	0						4	0	0	0	4	2

Nbre de plvts/souches	Plvts positifs (A ou B)	Provenance Surveillance Population	Virus type A						Virus type B					
			Total A	Non sous- typés	H1N1pdm09		H3N2		Total B	Sans lignage	B Vic		B Yam	
					PCR	isolement	PCR	isolement			PCR	isolement	PCR	isolement
		Aquitaine												
2	1	Agen	1	0	1	0	0	0	0					
3	0	Bordeaux	0						0					
		Auvergne												
81	78	Clermont-Ferrand	52	0	41	29	11	6	27	2	1	1	24	16
		Languedoc- Roussillon												
1	0	Alès	0						0					
49	48	Montpellier	2	0	2	0	0	0	46	0	0	0	46	5
		Limousin												
1	1	Limoges	1	0	0	0	1	0	0					
		Midi-Pyrénées												
85	81	Toulouse	64	1	58	23	5	1	17	0	0	0	17	7
		PACA												
3	3	Aix-en-Provence	1	0	0	0	1	1	2	0	0	0	2	2
3	3	Draguignan	3	0	3	0	0	0	0					
4	3	Marseille	3	0	0	0	3	2	0					
18	15	Nice	15	0	12	8	3	1	0					
7	7	Toulon	7	0	6	3	1	1	0					
		Poitou-Charentes												
5	2	La Rochelle	2	0	2	2	0	0	0					
42	41	Poitiers	36	0	34	32	2	2	5	0	0	0	5	3
		Rhône-Alpes												
1	0	Annecy	0						0					
4	4	Bourgoin-Jallieu	4	0	4	2	0	0	0					
14	14	Chambéry	5	0	4	0	1	0	9	0	0	0	9	0
173	165	Grenoble	81	0	45	19	36	8	84	6	0	0	78	23
4	1	Lyon	1	0	1	0	0	0	0					
111	109	St Etienne	86	2	59	28	25	7	23	0	0	0	23	16
2	2	Villefranche	0						2	0	0	0	2	0
2	0	Vienne	0											
		Autres												
		Armées												
1	1	HIA Brest	1	0	0	0	1	1	0					
1	1	HIA Bégin	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1

Nbre de plvts/souches	Plvts positifs (A ou B)	Provenance Surveillance Population	Virus type A						Virus type B					
			Total A	Non sous-typés	H1N1pdm09		H3N2		Total B	Sans lignage	B Vic		B Yam	
					PCR	isolement	PCR	isolement			PCR	isolement	PCR	isolement
3	3	HIA Lyon	3	0	2	0	1	1	0					
4	4	HIA Toulon	2	0	2	2	0	0	2	0	0	0	2	2
4	4	EHPAD (FN)	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	4	0
47	24	EHPAD (FS)	16	1	0	0	15	10	8	0	0	0	8	4
27	20	Aéroport Roissy (FN)	14	0	12	5	2	1	6	0	0	0	6	2
14	13	Laboratoires de biologie médicale (FN)	5	0	5	0	0	0	9	0	0	0	9	2
5	5	Papeete (FN)	5	0	3	0	2	2	0					
47	47	La Réunion (FS)	19	0	13	0	6	1	28	1	0	0	27	1
40	38	Mayotte (FS)	39	0	35	12	4	0	0					
52	43	CERMES Niger (FN)	36	0	24	13	12	2	7	0	3	2	4	3
2677	1845	TOTAL général (FN)	1086	27	851	280	208	67	781	0	9	6	772	278
2365	1536	TOTAL général (FS)	853	12	655	351	186	79	687	20	4	4	663	332
5042	3381	TOTAL GÉNÉRAL	1939	39	1506	631	394	146	1468	20	13	10	1435	610

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

➤ **CNR-IPP : détection de 22 cas d'infections grippales mixtes**

Virus grippaux A + B :

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

Virus grippaux A :

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

➤ **CNR-HCL : détection de 4 cas d'infections grippales mixtes**

Virus grippaux A + B : 3 x A(H1N1)pdm09 + B Yamagata

Virus grippaux A : 1 x A(H1N1)pdm09 + A(H3N2)

Nbre de plvts / souches	Plvts positifs (A ou B)	Provenance Surveillance Population	Virus type A				Virus type B			
			TOTAL A	non sous typés	H1N1 pdm09	H3N2	TOTAL B	non sous typés	B Victoria	B Yamagata
423	251	Guyane	145	1	90	54	106	0	9	97
168	127	Hôp. Cayenne / Centre de Santé	78	0	48	30	49	0	2	47
23	8	Centre Médical Inter-Armée	5	0	1	4	3	0	1	2
15	8	Laboratoires privés / Médecin de ville	3	0	3	0	5	0	0	5
217	108	Surveillance sentinelle	59	1	38	20	49	0	6	43
180	102	Réseau médecins	54	1	35	18	48	0	5	43
37	6	Pédiatrie St Laurent	5	0	3	2	1	0	1	0
224	195	Martinique	119	0	114	5	76	0	21	55
154	154	CHU Fort de France	102	0	97	5	52	0	16	36
70	41	Surveillance sentinelle	17	0	17	0	24	0	5	19
75	54	Guadeloupe	18	0	12	6	36	0	13	23
0	0	CHU Pointe à Pitre	0	0	0	0	0	0	0	0
75	54	Surveillance sentinelle	18	0	12	6	36	0	13	23
362	203	Total Sentinelle	94	1	67	26	109	0	24	85
360	297	Total Non Sentinelle	188	0	149	39	109	0	19	90
722	500	Total Général	282	1	216	65	218	0	43	175

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

➤ **CNR-IPG : détection de 2 cas d'infections grippales mixtes**

Virus grippaux A : 1 x A(H1N1)pdm09 + A(H3N2)

Virus grippaux A + B : 1 x A(H1N1)pdm09 + B Yamagata

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

La recherche des autres virus respiratoires VRS, Rhinovirus/Enterovirus et Metapneumovirus est réalisée en première intention sur les échantillons provenant du réseau Sentinelles. Pour les échantillons pour lesquels aucun virus n'a été détecté, la recherche des virus parainfluenza PIV et des coronavirus hCoV est réalisée. Le bilan des autres virus détectés est présenté tableau 4, ainsi que les co-infections avec le VRS. Le laboratoire de Corte utilise, en première intention, un kit multiplex qui permet également la détection des adenovirus et des bocavirus.

Pour le CNR-IPP sur 121 échantillons analysés, 12 PIV et 9 hCoV ont été détectés. Pour le CNR-HCL sur 413 échantillons analysés, 36 PIV et 73 hCoV ont été détectés. Pour le laboratoire de Corte sur 150 échantillons analysés, 2 PIV et 8 hCoV ont été détectés.

Nb de plvts	Provenance	VRS				EnteroV/ RhinoV	MetapneumoV	Coinfection grippe +VRS	Coinfection grippe + Rhino	Coinfection grippe + hMPV
		Total	Non Typés	VRS A	VRS B					
1707	Sentinelles France nord	93	0	32	61	137	64	14	19	6
1451	Sentinelles France sud	118	9	43	67	157	69	15	27	5
150	Sentinelles Corse	17	17			8	9			
3338	Total	228	26	75	128	302	142	29	46	11

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

Pour le CNR-IPG seule la recherche des VRS est réalisée en première intention sur tous les prélèvements de Guyane : sur 425 échantillons analysés, 25 VRS A et 13 VRS B ont été détectés.

Nb de plvts/souches	Provenance surveillance Population	VRS A	VRS B	Total VRS
170	Hôp. Cayenne/Centre de Santé	19	8	27
58	Pédiatrie Hôp. Cayenne	13	6	19
112	Autres services Hôp. Cayenne	6	2	8
38	Médecin de ville / CMIA	0	0	0
217	Surveillance Sentinelles	6	5	11
180	Réseau médecins	1	2	3
37	Hôp. St Laurent	5	3	8
217	Total Sentinelles	6	5	11
208	Total non Sentinelles	19	8	27
425	Total général Guyane	25	13	38

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

2.5.3 Analyse virologique d'échantillons cliniques humains, virus émergents

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

➤ CNR-IPP et CNR-HCL

Le nombre de suspicions d'infection à MERS-Coronavirus était en diminution cette saison. Les cas suspects avaient exclusivement séjourné en Arabie Saoudite, notamment lors du pèlerinage à la Mecque. Aucune infection à MERS-CoV n'a été détectée mais d'autres étiologies ont été retrouvées dans la plupart des cas (tableau 5). Les enterovirus/rhinovirus (EV/HRV) sont les virus les plus souvent détectés chez ces patients au retour d'Arabie Saoudite présentant une infection respiratoire aigüe.

Nb patients	Nb plvts	Nb pos	Provenance	Influenza A			Influenza B		Autres virus Resp	Pays visité
				NT	H1N1	H3N2	Vic	Yam		
			Hôpital (FN)							
			Alsace							
1	2	1	Strasbourg		1				1 EV/HRV ^{\$}	A. Saoudite
			Centre							
2	4	2	Orléans			1		1		A. Saoudite
			Franche Comté							
2	5	2	Besançon		1	1				A. Saoudite
			Haute Normandie							
1	4	1	Rouen		1					A. Saoudite
			Ile de France							
1	1	0	Villejuif							A. Saoudite
1	1	1	Paris Bichat						1 EV/HRV	A. Saoudite
			Pays de Loire							
1	2	1	Nantes			1				A. Saoudite
			Hôpital (FS)							
			Bourgogne							
1	2	0	Mâcon							A. Saoudite
			Languedoc-Roussillon							
2	2	2	Nîmes						2 EV/HRV	A. Saoudite
			Rhône-Alpes							
5	9	9	Annecy	1	4	4				A. Saoudite
3	6	5	Chambéry					2	3 EV/HRV (1 co-infect hCoV)	A. Saoudite
26	58	46	Lyon	1	10	8		14	20 EV/HRV, 4 VRS, 5 hCoV (nombreuses co-infect)	A. Saoudite
1	2	0	St Etienne							A. Saoudite
9	19	8	TOTAL général (FN)		3	3		1	2 EV/HRV	
38	79	62	TOTAL général (FS)	2	14	12		16	25 EV/HRV	
47	98	70	TOTAL GENERAL	2	17	15		17	27 EV/HRV	

Tableau 6 : Bilan des suspicions d'infections à MERS-CoV analysées par les CNR-IPP et CNR-HCL. ^{\$} EV/HRV : entérovirus/rhinovirus

➤ CNR IPG

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

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

Une seule suspicion de grippe aviaire a été reçue par le CNR-IPP. Il s'agissait d'un patient de retour d'Indonésie qui présentait un syndrome grippal. Aucun virus respiratoire n'a été détecté.

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

2.5.4 Sensibilité aux antiviraux

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

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

Surveillance globale :

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

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

Pour les patients hospitalisés sous traitement par INA, sont sélectionnés les prélèvements de patients présentant une excrétion virale prolongée (> 5 jours) mais également les demandes explicites de recherche de résistance aux antiviraux chez des patients pour lesquels il n'y a pas d'amélioration clinique malgré le traitement par oseltamivir. Pour les virus A(H1N1)pdm09 une RT-PCR temps réel différentielle (utilisant des sondes Taqman spécifiques) permet de détecter la mutation de résistance à l'oseltamivir H275Y dans la NA. Le séquençage NGS des virus est réalisé si la charge virale est suffisante. Les isolats correspondants lorsqu'ils sont obtenus sont testés par test fluorimétrique de sensibilité aux INA.

2.6 Activités de séquençage

2.6.1 CNR-IPP

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

OUI, l'Institut Pasteur est doté d'une plateforme dite Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M), qui est ouverte à l'ensemble des CNR ainsi qu'aux laboratoires de référence dans le Réseau International des Instituts Pasteur et instituts associés. Dans un esprit de mutualisation technologique, P2M regroupe les demandes et permet ainsi l'utilisation en routine du séquençage à haut débit multi-pathogènes.

La technologie utilisée par cette plateforme de séquençage est la technologie Illumina (fabrication des librairies + séquenceurs). Les banques sont préparées avec le kit Nextera XT et engagées sur le séquenceur NextSeq 500. Une série de matériels est également utilisée pour réaliser les contrôles de qualité tout au long du processus de fabrication de séquence. Des robots pipeteurs et extracteurs permettent d'homogénéiser et de normaliser les ADN et amplicons avant d'entrer dans le pipeline de production.

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

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

Par ailleurs, le nombre d'ETP de bio-informaticiens affecté à la plateforme dédiée aux CNR fait l'objet d'une négociation interne annuelle.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Le séquençage a été réalisé pour 578 virus provenant du réseau Sentinelles et du réseau RENAL selon la répartition suivante (tableau 7).

Provenance	Sentinelles				RENAL et autres (Outre-Mer, EHPAD...)			
	H1N1	H3N2	B Yamagata	B Victoria	H1N1	H3N2	B Yamagata	B Victoria
Nb de séquences	132	52	156	3	116	42	76	1

Tableau 7 : Bilan du nombre de séquences réalisées durant la saison 2017/2018.

2.6.2 CNR-HCL

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

OUI, les HCL disposent de plusieurs plateformes de séquençage haut débit dont une est utilisée par le CNR-HCL pour le séquençage NGS (située sur le site Centre de biologie et Pathologie Est, Bron). Elle est partagée par les CNR des HCL (Virus des infections respiratoires, Enterovirus et Paréchovirus, Légionelles, Staphylocoques) ainsi que les équipes de BioGenet (génétique humaine). L'utilisation partagée de cette plateforme permet l'optimisation de cette nouvelle technologie par les différentes équipes de diagnostic et de recherche des HCL dans le cadre du génotypage humain, viral et bactérien.

La technologie utilisée par cette plateforme de séquençage est la technologie Illumina (fabrication des librairies + séquenceurs). Les banques sont préparées avec le kit Nextera XT et engagées sur le séquenceur NextSeq 500. Un robot pipeteur (Zephyr, Caliper) permet de standardiser la préparation et la quantification des librairies.

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

Les CNR ont à l'heure actuelle la possibilité de faire appel au support bio-informatique du site (Service de Biostatistique et Bioinformatique, HCL). Pour le CNR-HCL, un pipeline informatique dédié (publication en cours de soumission) a été mis en place permettant une validation et une analyse standardisée des données de séquençage obtenues.

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

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

- Variabilité génétique des souches circulantes (en communautaire et à l'hôpital)
- Détermination des pourcentages de variants pour une mutation connue
- Exploration de propriétés virales (diversité génomique, identification de nouvelles mutations)
 - Détection de nouveaux variants génétiques (mutation de virulence)
 - Détection de mutations de résistance, responsables de diminution de sensibilité aux antiviraux
 -

Le séquençage NGS est réalisé exclusivement sur les extractions d'acides nucléiques issues des prélèvements primaires. Pour le réseau Sentinelles il s'agit d'écouvillonnage naso-pharyngé alors que pour le réseau RENAL les natures de prélèvements sont plus variées : prélèvements du tractus respiratoire supérieur (écouvillons ou aspirations naso-pharyngées,) ou prélèvements du tractus respiratoire inférieur (crachat, aspiration trachéo bronchique, LBA, biopsies pulmonaires). Les isolats issus de la culture virale sont utilisés dans un second temps à visée de sensibilisation de la méthode si le séquençage n'a pas pu être réalisé sur le prélèvement primaire. En pratique, cela représente un faible pourcentage (<5%) des échantillons testés.

Des outils informatiques, bioinformatiques et statistiques sont utilisés pour analyser et modéliser les données NGS et les rendre lisibles sous forme d'arbres phylogénétiques ou de tableaux de variants. L'analyse en temps réel permet de réaliser des arbres phylogénétiques et les analyses plus fines (recherche de nouveaux variants, mutations ...) sont réalisées en fin de surveillance lorsque l'ensemble des données de surveillance sont disponibles.

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

Les critères de sélection des souches pour le séquençage sont différents selon qu'il s'agisse de prélèvements Sentinelles ou RENAL, mais dans tous les cas le séquençage n'est réalisable que si la charge virale est suffisante. Les prélèvements issus du réseau de médecins pédiatres et généralistes Sentinelles ne sont pas tous séquencés. La sélection tient compte en premier lieu de la non-opposition du patient à l'utilisation secondaire de son prélèvement et de ses données associées. Ensuite en plus d'une sélection au hasard pour chaque sous-type et lignage, sont sélectionnés des patients infectés et vaccinés, des patients traités par antiviral ou dont l'entourage a été traité. La sélection comporte des échantillons de chaque région.

Les prélèvements envoyés par les laboratoires hospitaliers sont séquencés en priorité s'ils proviennent de cas sévères. Pour la surveillance dans les EHPAD des représentants des épidémies dans les différentes régions sont séquencés. Une sélection des prélèvements effectués en phase pré-épidémique et post-épidémique est également réalisée afin de détecter éventuellement un nouveau variant. Les virus grippaux issus de cas d'importation (suspensions MERS-CoV, retour de voyage) sont séquencés également. Enfin, les cas particuliers vont également faire partie de la sélection (grippe nosocomiale, encéphalite, excrétion prolongée, tableau clinique particulier).

Le séquençage a été réalisé pour 190 virus provenant du réseau Sentinelles et du réseau RENAL selon la répartition suivante (tableau 8).

Provenance	Sentinelles				RENAL et autres (Outre-Mer, EHPAD...)			
	H1N1	H3N2	B Yamagata	B Victoria	H1N1	H3N2	B Yamagata	B Victoria
Nb de séquences	10	12	11	2	80	34	39	2

Tableau 8 : Bilan du nombre de séquences réalisées durant la saison 2017/2018.

2.6.3 CNR-IPG

Le CNR-IPG a un accès possible à la plateforme dite Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M) de l'Institut Pasteur. Aucune séquence de virus grippaux n'a été réalisée cette année.

Dans le cadre de projets de recherche (FEDER EFAG), le CNR-IPG prévoit, en collaboration avec le laboratoire « Interaction virus-hôtes » de l'IPG spécialisé dans cette activité, la réalisation de séquençage génomique de type WGS et NGS pour l'exploration de fièvres d'étiologie indéterminée. CLC Genomics Workbench 6 est utilisée pour l'analyse des séquences.

Enfin le laboratoire de virologie de l'IPG réalise régulièrement des activités de séquençage classique : en 2017-2018 ces activités ont essentiellement porté sur des prélèvements positifs pour un arbovirus.

Les 20 prélèvements adressés au CDC Atlanta en janvier 2018 ont été séquencés : 11 prélèvements provenaient de la surveillance sentinelle (2 A(H1N1)pdm09, 5 A(H3N2), 2 B Yamagata et 2 B Victoria) et 9 prélèvements provenaient de la surveillance hospitalières parmi lesquels 4 provenaient de réanimation sentinelle (4 A(H1N1)pdm09 (dont 2 de réanimation), 2 A(H3N2) et 2 B Yamagata (tous 2 issus de réanimation)). Les séquences correspondantes sont disponibles dans GISAID.

3 Activités de surveillance

En **Métropole**, la saison de surveillance 2017-2018 a été marquée par une épidémie grippale précoce et particulièrement longue, avec 2 vagues successives, la première étant essentiellement due aux virus grippaux A(H1N1)pdm09 et la 2^{ème} aux virus grippaux de type B de lignage Yamagata. Un premier pic a été atteint en semaine S52/2017 puis un 2^{ème} en semaine S8/18. Les virus A(H3N2) sont restés sporadiques durant toute la saison.

Dans les **Territoires Français d'Amérique** (TFA), la saison 2017-2018 a été marquée par des épidémies grippales d'intensité modérée avec pour la Guyane une période et une durée inhabituelles, assez proches de celles observées en métropole. Les périodes épidémiques se sont étendues respectivement de la semaine S52/2017 à la semaine S12/2018 pour la Guyane, de la semaine S47/2017 à la semaine S7/2018 pour la Guadeloupe et de la semaine S47/2017 à la semaine S13/2018 pour la Martinique. Dans les 3 Territoires, une co-circulation des virus de type A et B a été observée avec une prédominance de virus B Yamagata en Guyane et Guadeloupe et une majorité de virus A(H1N1)pdm09 en Martinique

3.1 Surveillance en Métropole

3.1.1 Description du réseau des partenaires

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

3.1.1.1 Les partenaires

➤ **Sentinelles**

Le réseau des médecins Sentinelles est présent dans 13 régions et comprend 314 médecins préleveurs : 239 médecins généralistes et 75 pédiatres. Parmi eux 299 (95,2%) ont réalisé au moins un prélèvement (tableau 8, figures 1 et 2).

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

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

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

Région	Médecins généralistes	Proportion de médecins préleveurs / généralistes %	Pédiatres	Proportion de pédiatres préleveurs / pédiatres %
Auvergne-Rhône-Alpes	36	0,5	15	4,7
Bourgogne-Franche-Comté	11	0,4	2	3,1
Bretagne	13	0,4	3	2,7
Centre-Val de Loire	11	0,5	2	2,6
Corse	14	4,7	1	7,1
Grand Est	24	0,5	10	4,1
Hauts-de-France	22	0,4	4	2,4
Ile-de-France	29	0,3	12	1,5
Normandie	9	0,3	6	6,8
Nouvelle-Aquitaine	20	0,3	5	2,7
Occitanie	22	0,3	7	2,7
Pays de la Loire	10	0,3	3	3,3
Provence-Alpes-Côte d'Azur	18	0,3	5	1,6
FRANCE	239	0,7	75	3,7

Tableau 9 : Répartition par région des médecins généralistes et pédiatres du Réseau Sentinelles ayant accepté de participer à la surveillance virologique et proportion par rapport aux généralistes et pédiatres en exercice dans la région - France, saison 2017-2018. (Source [réseau Sentinelles, INSERM/UPMC, http://www.sentiweb.fr](http://www.sentiweb.fr))

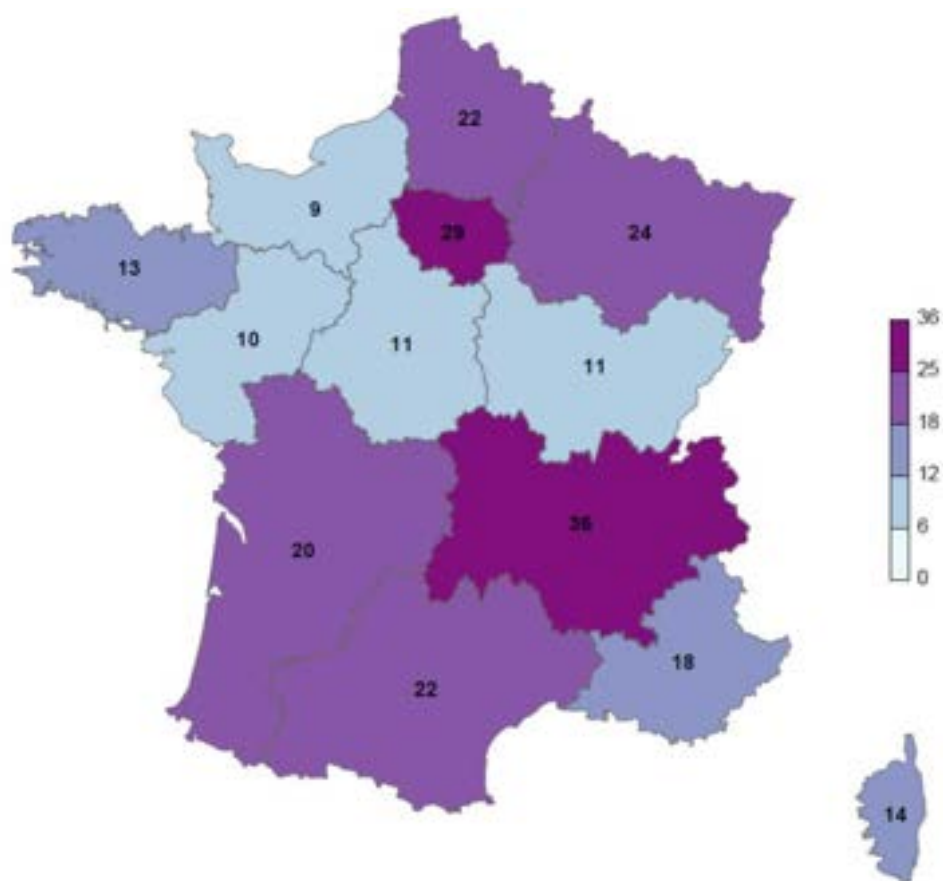


Figure 4: Représentation géographique des médecins généralistes Sentinelles ayant accepté de participer à la surveillance virologique des syndromes grippaux saison 2017-2018, par région (Source [réseau Sentinelles, INSERM/UPMC, http://www.sentiweb.fr](http://www.sentiweb.fr))

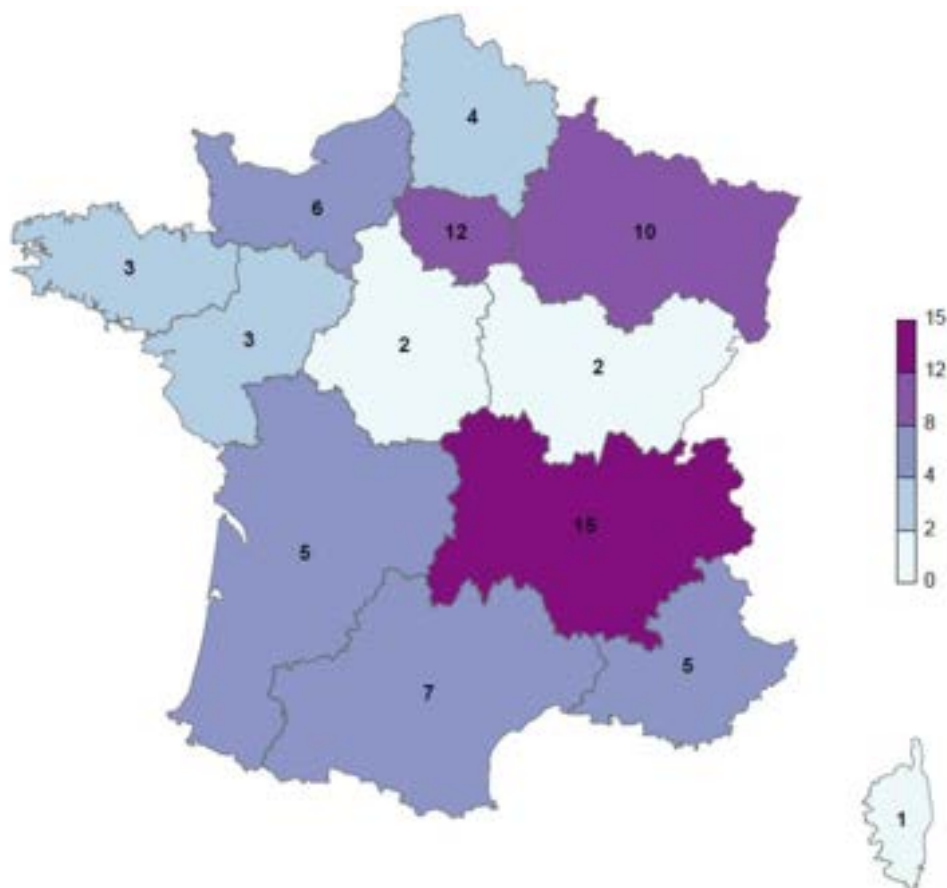


Figure 5 : Représentation géographique des pédiatres Sentinelles ayant accepté de participer à la surveillance virologique des syndromes grippaux saison 2017-2018, par région (Source [réseau Sentinelles, INSERM/UPMC, http://www.sentiweb.fr](http://www.sentiweb.fr))

➤ **RENAL**

Ce Réseau National des laboratoires hospitaliers comporte :

- en **France-Nord**, 24 CHU ou CHR :

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

- en **France-Sud**, 14 CHU ou CHR :

Aix-en-Provence, Annecy, Bordeaux, Chambéry, Clermont-Ferrand, Grenoble, Limoges, Lyon, Marseille, Montpellier, Nice, Poitiers, St Etienne et Toulouse. La surveillance se fait de façon hebdomadaire jusqu'au mois d'avril puis à un rythme mensuel de mai à septembre.

Le réseau RENAL fournit ainsi tout au long de l'année de façon hebdomadaire des données virologiques et sérologiques pour les infections respiratoires vues à l'hôpital. Sont recueillis pour les virus grippaux ainsi que pour d'autres pathogènes respiratoires viraux ou bactériens, le nombre de tests réalisés et ceux trouvés positifs. La liste des pathogènes détectés, soit par détection directe soit par sérologie, pour lesquels les données sont collectées est donnée dans le tableau 10.

Pathogènes détectés	
Grippe	A total
	A(H1N1)pdm09
	A(H3N2)
	B
VRS	A
	B
	Non typés
Metapneumovirus	A
	B
	Non typés
Rhinovirus/Enterovirus	
Virus parainfluenza	Typés
	Non typés
Coronavirus	Typés : 229E, OC43 ...
	Non typés
Bocavirus	
Adenovirus	
Herpesvirus	
Cytomegalovirus	
Bactéries	Chlamydiae, Mycoplasma, fièvre Q

Tableau 10 : 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 puis réseau Sentinelles) et du réseau RENAL

L'accès à la base de données RENOG pour l'enregistrement des résultats de détections et d'analyses sérologiques d'infections respiratoires est effectif depuis février 2008 pour les laboratoires hospitaliers de la moitié nord de la France. Pour la saison 2015-2016, le système a été modifié afin d'accueillir l'ensemble des données des laboratoires hospitaliers français. Aujourd'hui, environ 38 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'agréger les données Sentinelles et hospitalières, permettant ainsi de réaliser le fichier TESSy, envoyé chaque semaine à l'ECDC et à SpF.

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

3.1.1.2 Les prélèvements

Les laboratoires CNR-IPP et -HCL traitent les prélèvements qui leur sont adressés pour l'ensemble des régions respectives de France Nord et France Sud (Figures 4 -5).

Dans le cadre de la surveillance communautaire du réseau Sentinelles, pour la saison 2017-2018, durant la période de surveillance un patient au maximum a été prélevé par semaine et par médecin participant. Il s'agit du premier patient de la semaine consultant pour un syndrome grippal (SG) selon la définition de cas du réseau Sentinelles utilisée pour la surveillance clinique des syndromes grippaux (cf ci-dessous), quel que soit l'âge, présentant des symptômes depuis moins de 48 heures et ayant donné son accord pour participer à

cette surveillance. En plus de cette surveillance des syndromes grippaux, le réseau Sentinelles a mis en place cette saison une surveillance des infections respiratoires aiguës (IRA) chez les sujets de plus de 65 ans, (cf définition ci-dessous). Il s'agit du premier patient de la semaine consultant pour une IRA, ne répondant pas à la définition du SG, ayant 65 ans ou plus, présentant des symptômes depuis moins de 48 heures et ayant donné son accord pour participer à cette surveillance.

Définitions de cas:

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

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

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

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

3.1.1.3 Données d'activité médicale et sanitaire

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

La période épidémique pour la saison 2017-2018, définie par le franchissement du seuil épidémique du réseau Sentinelles, s'est étendue entre les semaines S49/2017 (4 au 10 décembre 2017) et S10/2018 (5 au 11 mars 2018), soit pendant 14 semaines. L'épidémie a été relativement précoce et de longue durée.

Le pic d'activité a été observé en semaine S52/2017 (25 au 31 décembre 2017) avec un taux d'incidence de 459 consultations pour syndromes grippaux pour 100 000 habitants (Figure 6).

Les taux d'incidence cumulée de consultations pour syndromes grippaux ont été les plus élevés dans les classes d'âge 0-4 ans et 5-14 ans et les taux les plus faibles chez les personnes de plus de 65 ans, comme classiquement retrouvé dans les épidémies antérieures (Figure 7).

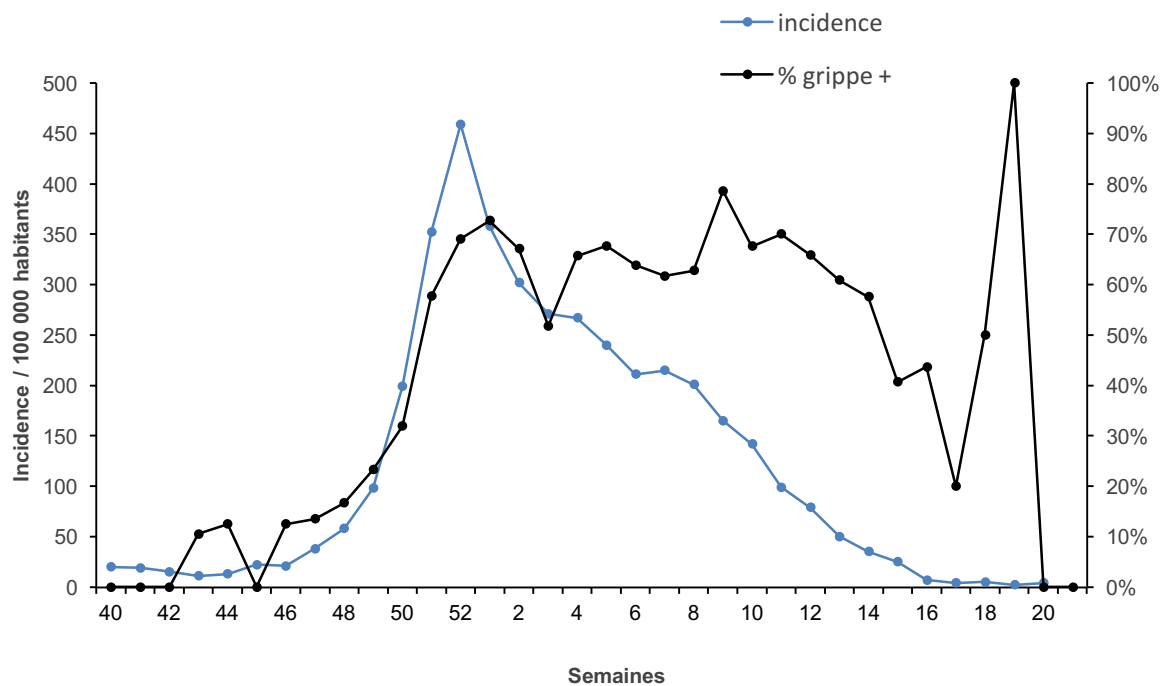


Figure 6 : Syndromes grippaux (GC) pour 100 000 habitants et pourcentage de virus grippaux détectés en médecine générale (Réseau Sentinelles) – période S40/2017-S20/2018

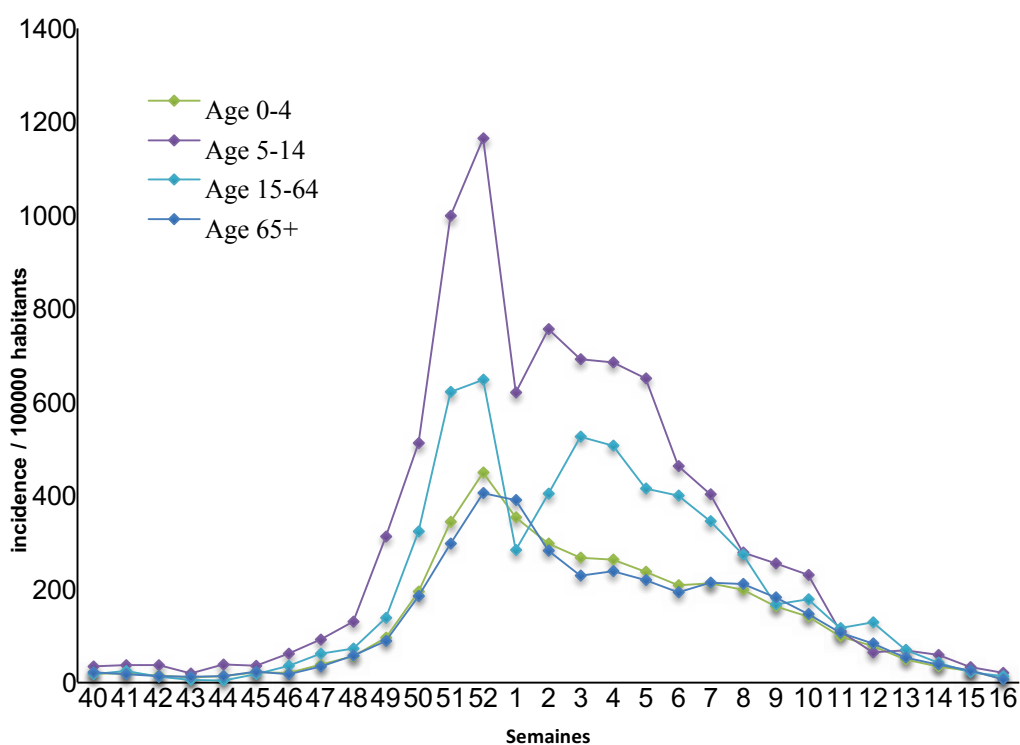


Figure 7 : Syndrome grippaux (GC) pour 100 000 habitants par tranches d'âge en France Médecine générale et pédiatres (réseau Sentinelles) – période 40/2017-16/2018

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

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

Au plan virologique, au cours de la saison 2017-2018, la circulation épidémique des VRS a précédé de quelques semaines celle des virus grippaux. Contrairement à ce qui était observé lors des saisons précédentes, excepté durant la saison 2016-2017, il n'y a pas eu de dissociation de la circulation épidémique des VRS et des virus grippaux qui ont circulé de façon concomitante pendant plusieurs semaines. Les VRS ont circulé de façon épidémique entre les semaines S43/2017 et S10/2018 et la circulation épidémique des virus grippaux a débuté en semaine S49/2017 pour se terminer semaine S16/2018. L'épidémie de VRS pour la France-Sud a débuté deux semaines après la France-Nord. Cette année, comme la saison dernière, le nombre de virus grippaux détectés a été plus important que le nombre de VRS détectés. L'épidémie grippale a débuté précocement aux alentours de la semaine S49/2017. (Figures 8 à 10).

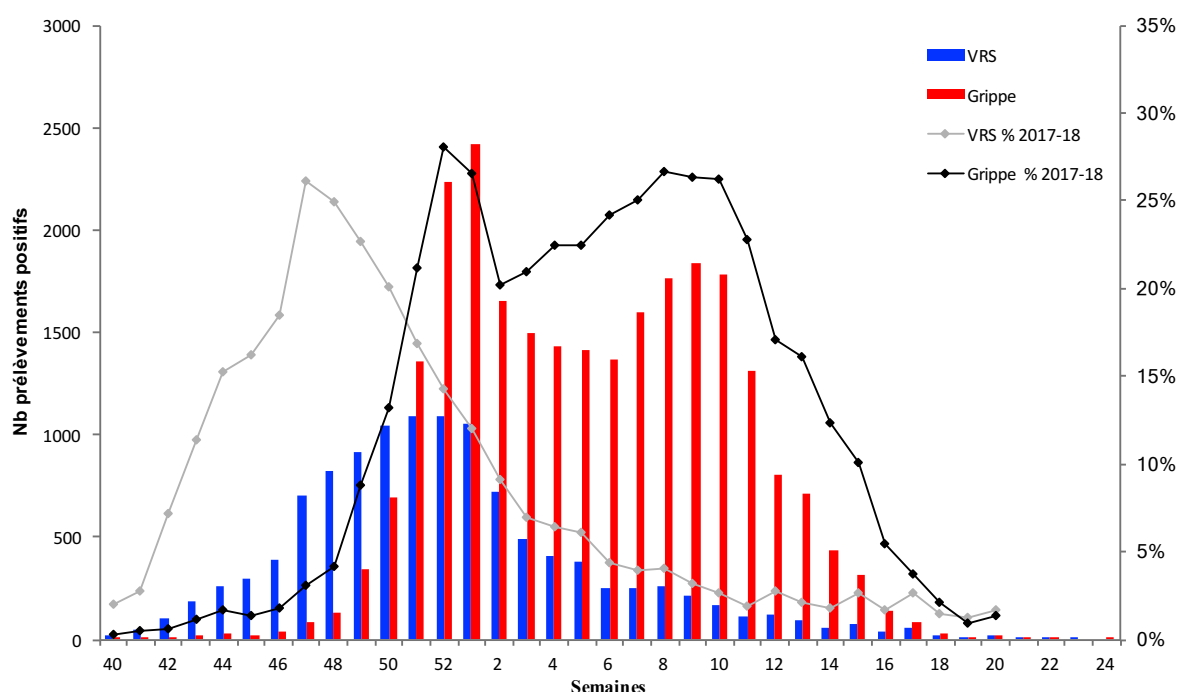


Figure 8 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2017-2018

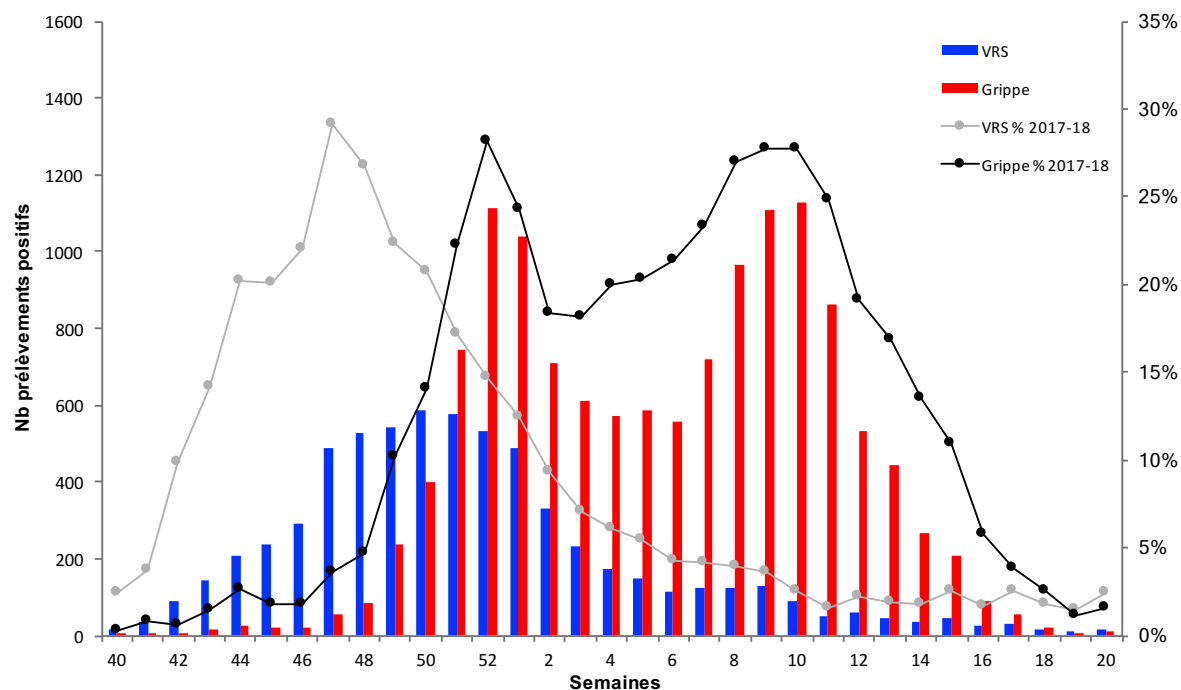


Figure 9 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France-Nord
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2017-2018

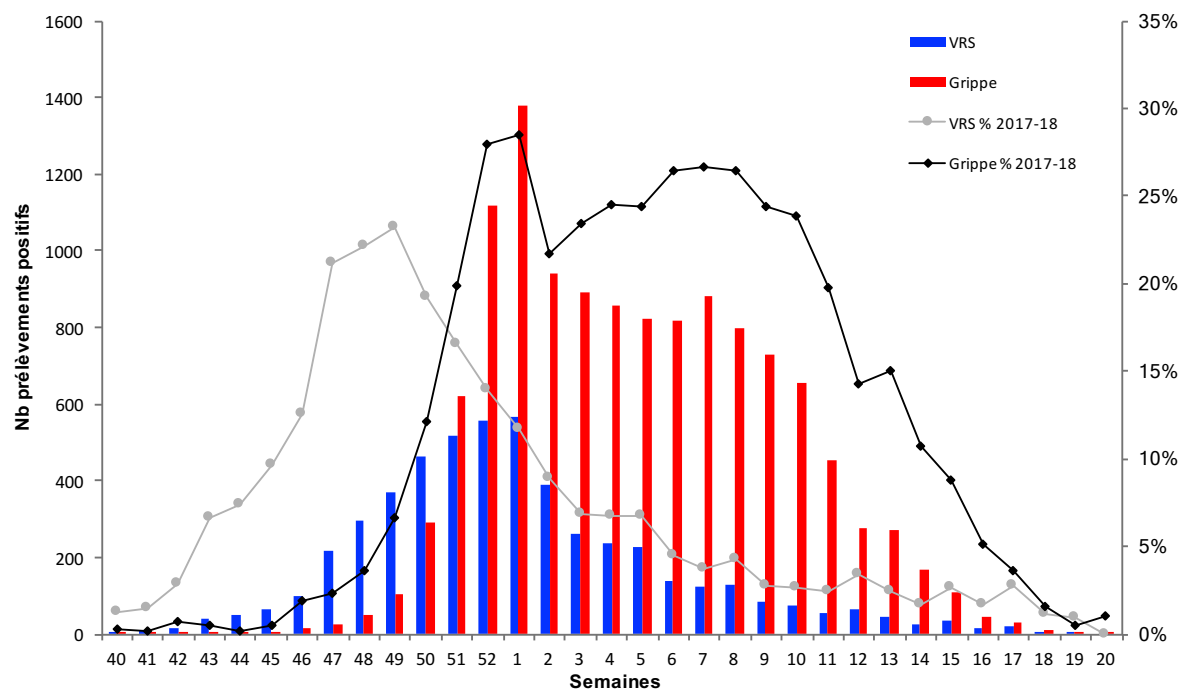


Figure 10 : Circulation du VRS et des virus grippaux en France-Sud
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2017-2018

Au cours de la saison de surveillance 2017-2018, deux vagues épidémiques ont été observées en médecine ambulatoire. Une première vague due en majorité aux virus A(H1N1)pdm09 avec co-circulation de virus de grippe B, de lignage Yamagata puis une deuxième vague pendant laquelle les virus de type B sont devenus nettement majoritaires alors que la circulation des virus de type A(H1N1)pdm09 diminuait progressivement. Les détections de virus grippaux de sous-type A(H3N2) sont restées sporadiques tout au long de la saison.

Les détections de virus grippaux ont débuté en semaine S42/2017 pour s'intensifier à partir de la semaine S49/2017.

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 21 semaines, de mi-novembre (S47/2017) à début avril (S15/2018), avec un premier pic fin décembre (S52/2017) et un deuxième pic mi-février (S08/2018). Le taux de prélèvements positifs pour la grippe a dépassé les 10 % à partir de début novembre, et a augmenté de façon significative (>30 %) à partir de fin novembre 2017. Aux pics épidémiques, plus d'un prélèvement du réseau Sentinelles sur deux (72,7% et 78,6%) était positif pour la grippe (Figures 11 à 13).

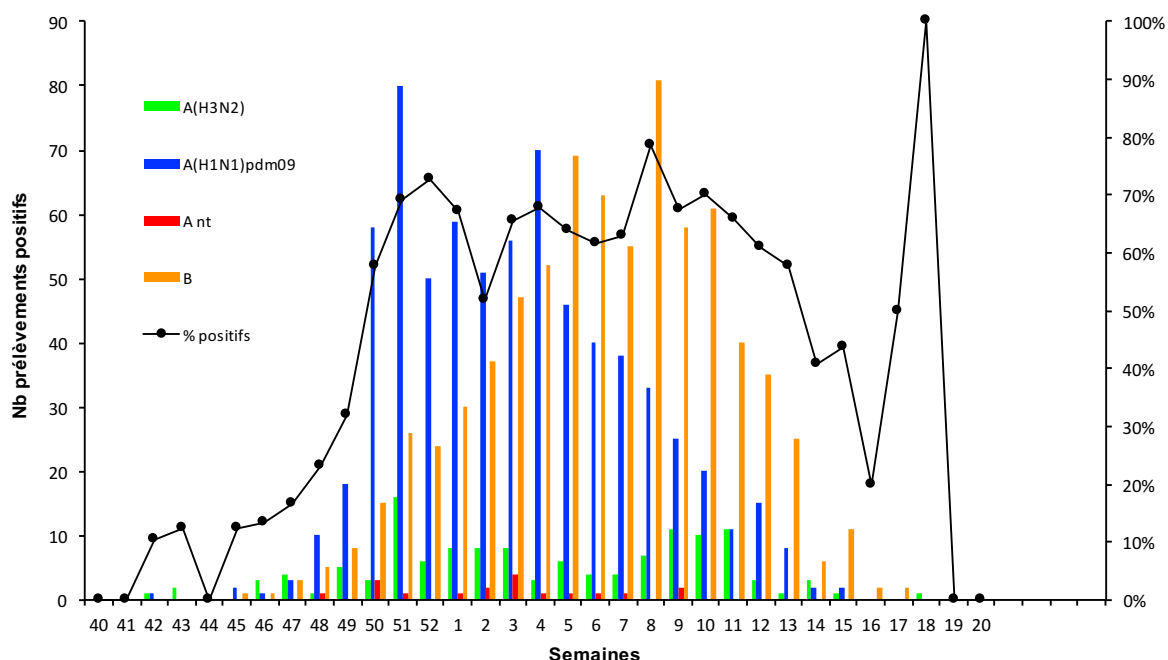


Figure 11 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France Réseau Sentinelles / saison 2017-2018

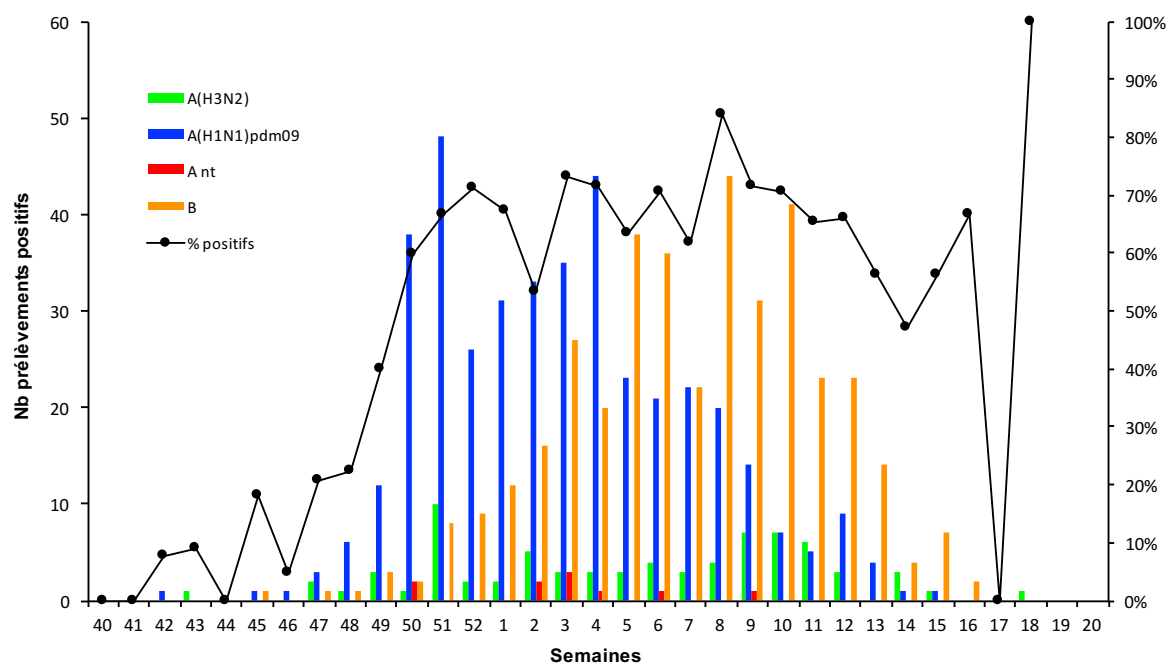


Figure 12 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Nord Réseau Sentinelles / saison 2017-2018

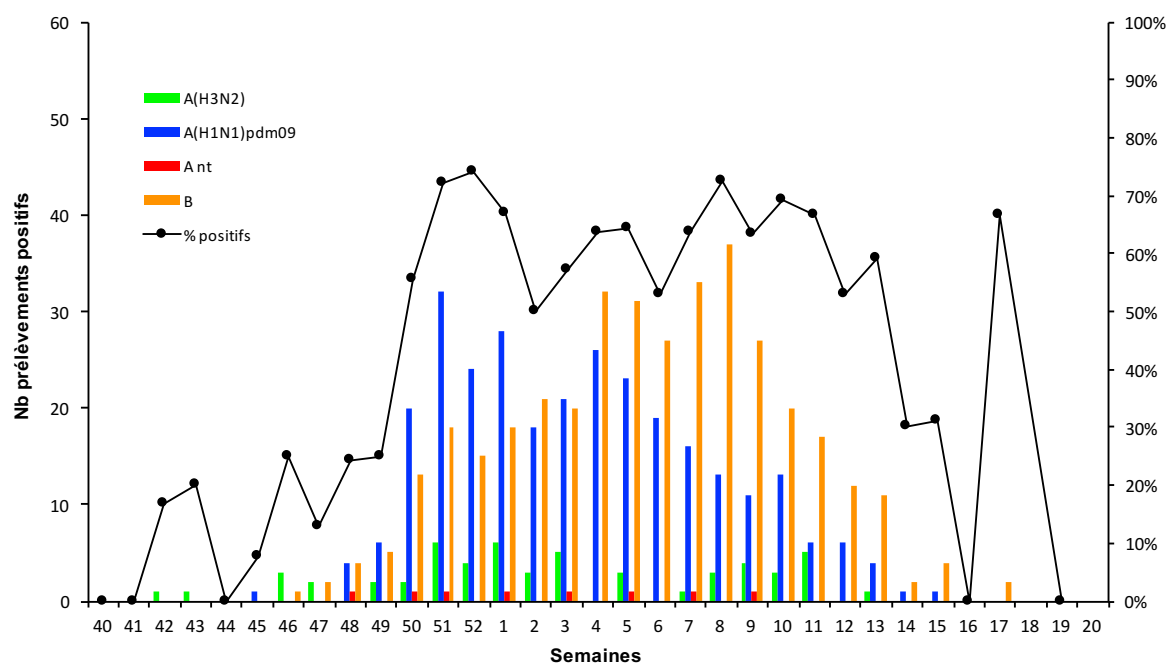


Figure 13 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Sud Réseau Sentinelles / saison 2017-2018

A l'hôpital, les mêmes tendances sont retrouvées avec des taux de détection plus faibles que ceux observés dans le cadre du réseau Sentinelles. Deux pics épidémiques ont également été observés, le premier en semaine S52/2017 avec 27,5% de détections de virus grippaux et le deuxième en semaine S08/2018 avec 25,5% de détections positives. Seule une partie des virus de type A sont sous-typés. En effet, la grande majorité des laboratoires hospitaliers utilise des kits commerciaux de détection capables d'identifier les virus de type A et B, mais le sous-typage des virus de type A n'est pas systématique. Ce manque d'information dans de nombreux laboratoires hospitaliers, ne permet pas d'évaluer en temps réel l'évolution épidémiologique des virus de type A selon les sous-types. (réseau RENAL - Figures 14 à 16 ; réseaux Sentinelles et RENAL - Figures 17 à 19).

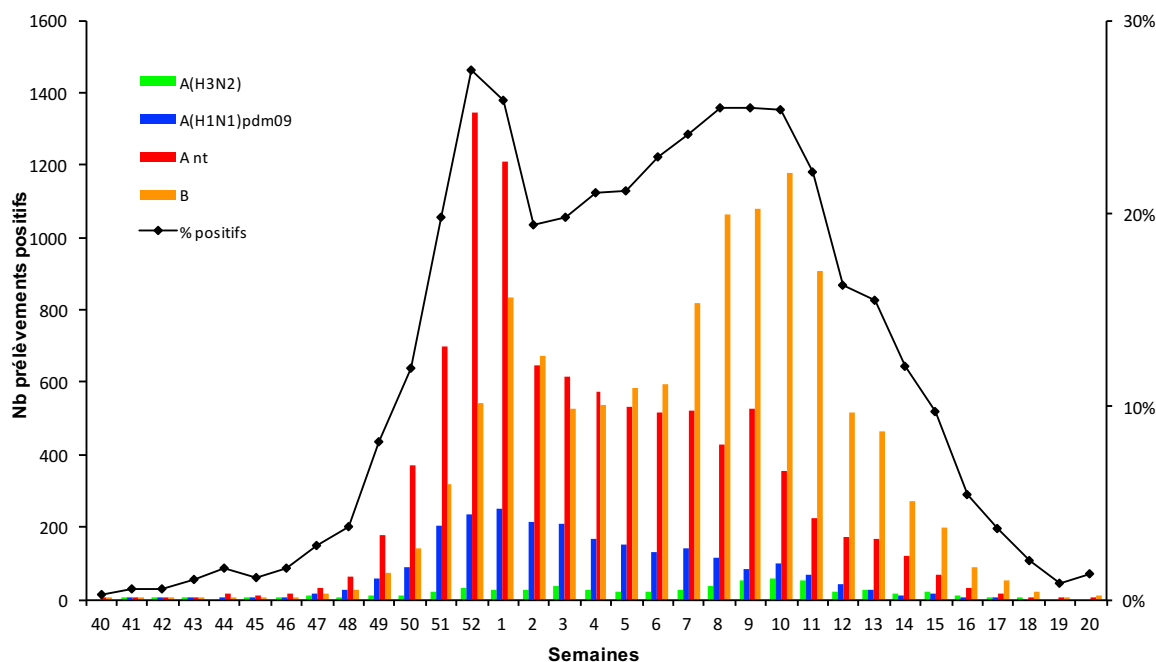


Figure 14 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France
Réseau RENAL / saison 2017-2018

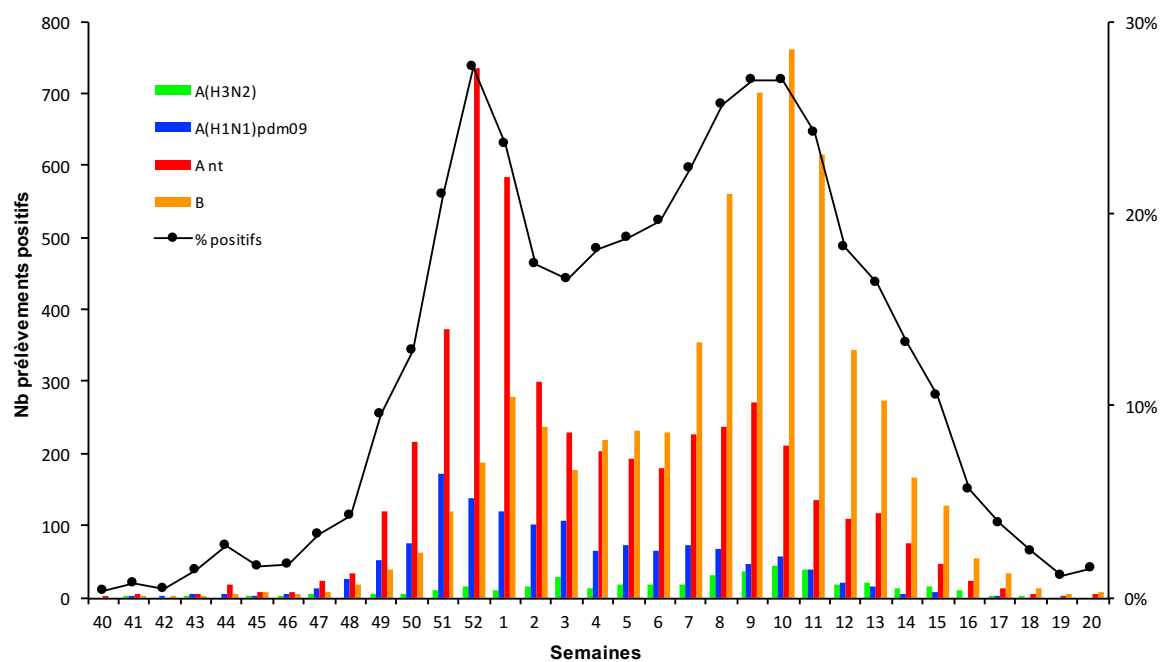


Figure 15 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Nord
Réseau RENAL / saison 2017-2018

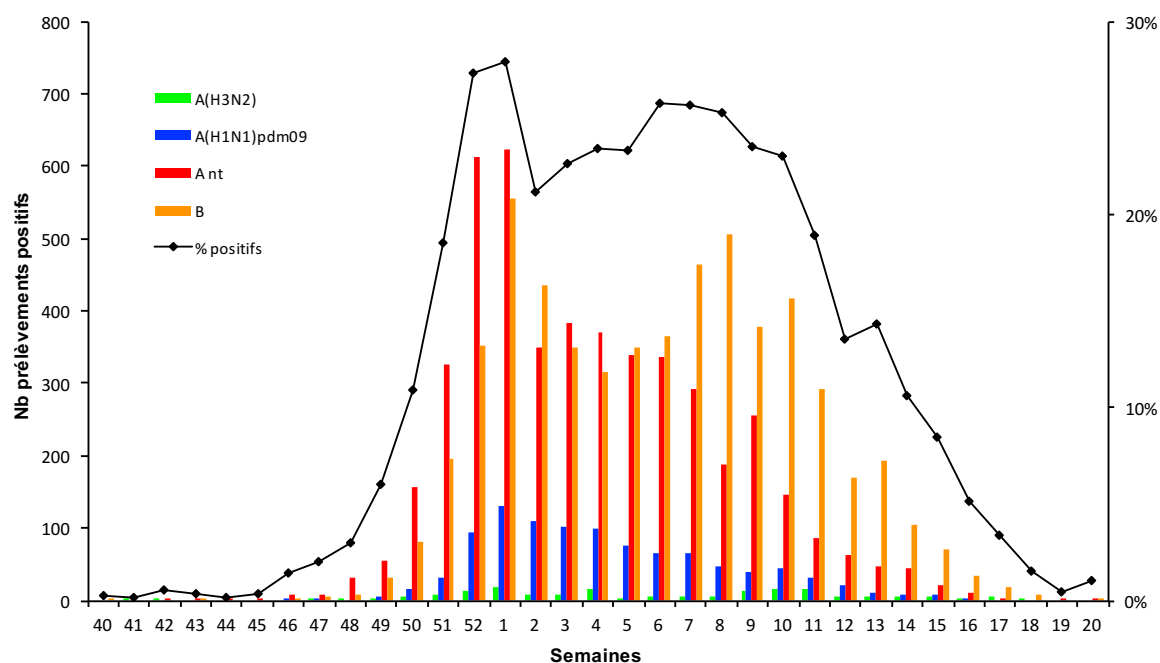


Figure 16 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Sud
Réseau RENAL / saison 2017-2018

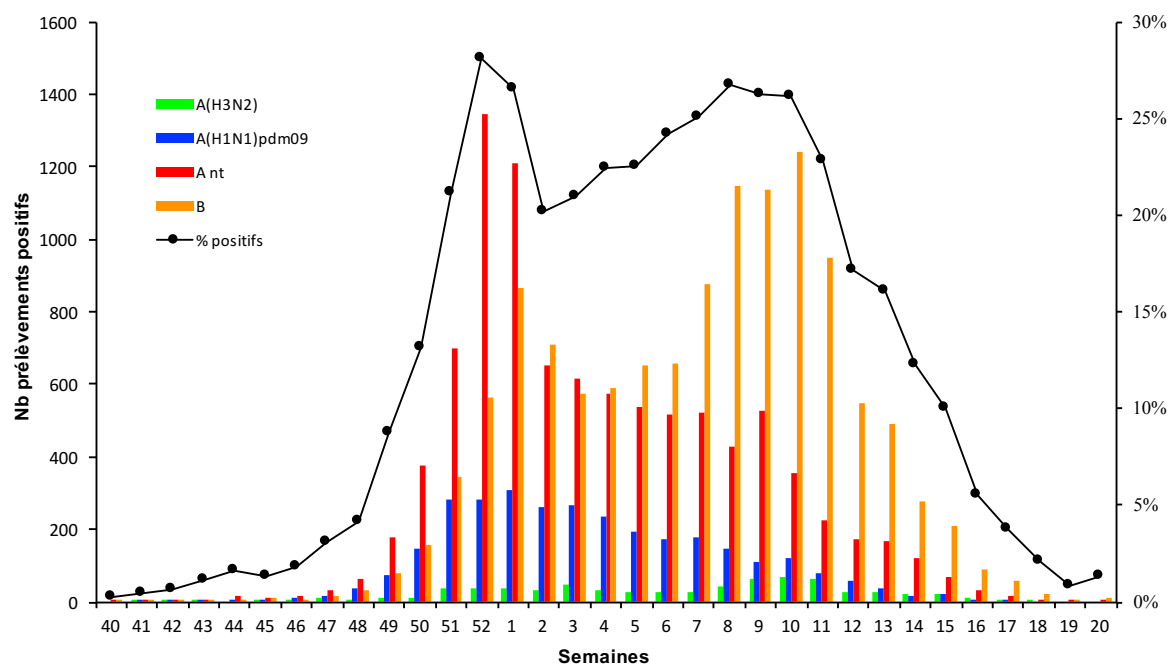


Figure 17 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2017-2018

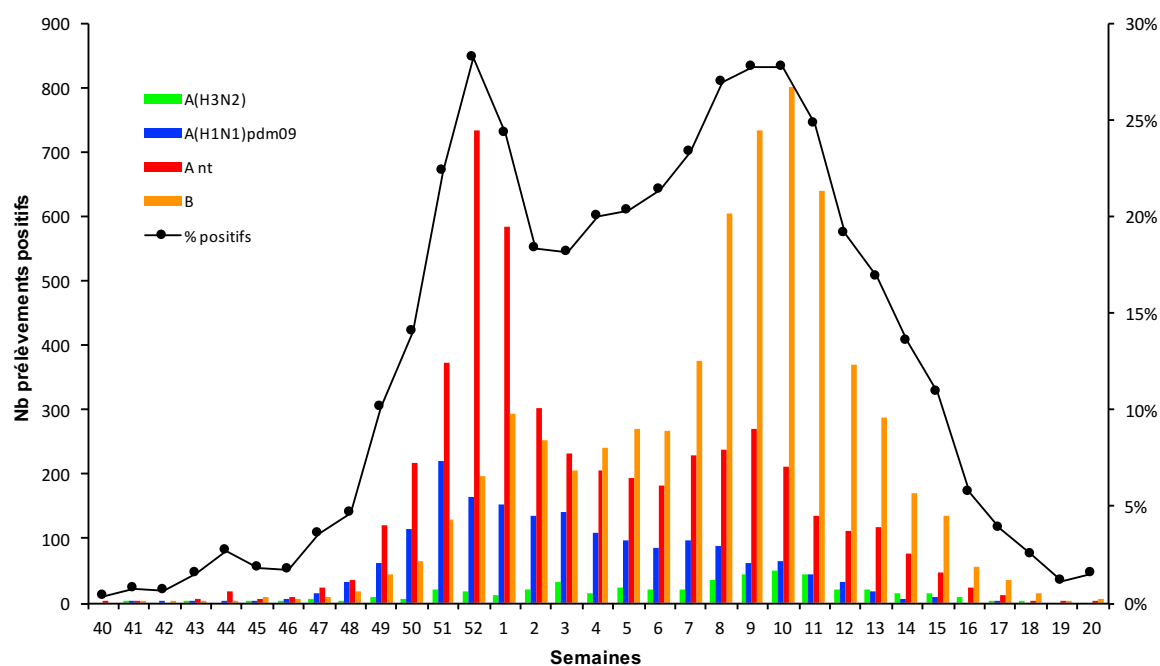


Figure 18 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Nord
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2017-2018

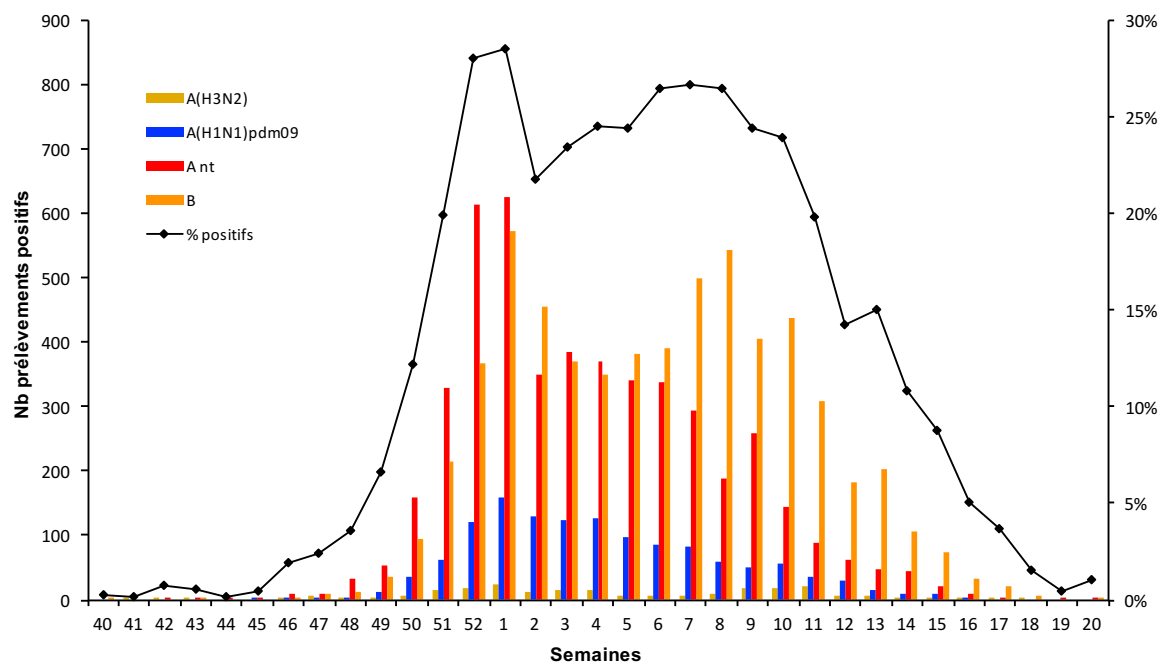


Figure 19 : Détection des virus grippaux par type et sous-type en France-Sud
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2017-2018

3.1.2.2 Caractérisation antigénique des virus grippaux

L'identification des virus grippaux est réalisée sur les virus isolés en culture cellulaire (MDCK) par inhibition de l'héماغglutination (IHA) à l'aide de sérums de furet spécifiques et de sérums de lapin hyperimmuns.

Les CNR-IPP et -HCL ont analysé par IHA un total de 976 virus grippaux parmi les virus isolés dans le cadre de la surveillance du réseau Sentinelles en population générale ou dans les armées ou isolés de prélèvements de patients hospitalisés ou de personnes âgées vivant en collectivité. Ces souches sont issues de prélèvements des différentes régions de France. Ainsi au total, 567 virus grippaux de type A dont 480 virus A(H1N1)pdm09, 87 virus A(H3N2) et 409 virus de type B dont 400 de lignage B-Yamagata et 9 de lignage B-Victoria ont été caractérisés.

Virus A(H1N1)pdm09

Au total, 480 isolats A(H1N1)pdm09 ont été caractérisés par IHA par les laboratoires du CNR. La majorité (463/480, 96%) des virus analysés sont apparentés à la souche vaccinale A/Michigan/45/2015.

Virus A(H3N2)

Cette saison, les virus A(H3N2) ont peu circulé. La caractérisation antigénique des virus A(H3N2) est rendue difficile par l'activité héماغglutinante 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 héماغglutinant qui ne permet plus la caractérisation de ces virus par IHA. De plus, depuis la saison dernière, les virus A(H3N2) ont la propriété de ne pas agglutiner les globules rouges de cobaye, ce qui rend la révélation de la culture délicate.

Pour le CNR-IPP les virus (n=21) qui ont pu être caractérisés antigéniquement sont en majorité (n=13) apparentés à la souche vaccinale A/Hong Kong/4801/2014, alors que d'autres sont plus proches de la souche vaccinale du vaccin de la saison 2015/2016 A/Switzerland/9715293/2013 (n=3) ou de la souche A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 du vaccin 2017-2018 de l'hémisphère sud (n=3) et certains présentent un profil d'inhibition faiblement réactif avec des titres faibles pour l'ensemble du panel de sérums testés (n=3).

Parmi les 120 échantillons A(H3N2) inoculés, seuls 65 (54%) ont donné lieu à une multiplication virale, révélée par test d'héماغglutination. La réalisation de l'IHA en présence d'oseltamivir n'a été possible que pour 51 échantillons dont seulement 27 avaient un titre supérieur ou égal à 4.

Pour le CNR-HCL, parmi les 194 échantillons A(H3N2) inoculés sur cellules MDCK, seuls 99 (51%) isolats ont été détectés par ELISA dans les surnageants de culture. Les isolats (n=66) qui ont pu être caractérisés antigéniquement en l'absence d'oseltamivir montraient pour la majorité (n=37) un profil d'inhibition faiblement réactif avec des titres faibles pour l'ensemble du panel de sérums testé. Les autres virus (n=29) sont analogues à la souche A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016.

Virus B

Parmi les isolats de virus de type B, 409 ont été caractérisés par IHA par les laboratoires du CNR. La majorité appartenait au lignage B-Yamagata (n=400) et était majoritairement analogue à la souche B/Phuket/3073/2013 (n=324). Les autres (n=76) sont variants mais avec des titres IHA faibles.

Les virus du lignage B-Victoria (n=9) étaient variants par rapport à la souche vaccinale B/Brisbane/60/2008 et analogues à la souche B/Norway/2409/2017.

3.1.2.3 Caractérisation génétique des virus grippaux isolés en France

Le séquençage haut débit du génome complet a été réalisé pour une sélection représentative des virus ayant circulé en France au cours de la saison 2017-2018. Le pyroséquençage est aussi une technique utilisable au laboratoire pour séquencer rapidement de petites régions d'intérêt au niveau desquelles des mutations peuvent se traduire par des substitutions connues responsables d'une diminution de sensibilité aux antiviraux ou de nouveaux phénotypes.

Pour les CNR-IPP et -HCL, 578 virus ont été séquencés sur 8 segments :

- 248 A(H1N1)pdm09
- 94 A(H3N2)
- 232 B-Yam
- 4 B-Vic

Les virus A(H1N1)pdm09 appartiennent au clade 6B.1 caractérisé par les mutations S84N, S162N et I216T sur l'hémagglutinine (HA). Les analyses phylogénétiques des virus A(H1N1)pdm09 sont représentées figures 20 à 21.

La majorité des virus A(H3N2) analysés font partie du clade 3C.2a caractérisé par les mutations suivantes sur la HA : L3I, N128T, N144S, N145S, F159Y, K160T, P198S, N225D et Q311H. Le sous-clade 3C.2a1 qui avait émergé la saison dernière, caractérisé par les mutations N171K sur la HA1 et I77V et G155E sur la HA2 est toujours bien présent mais d'autres sous-clades sont apparus cette saison : 3C.2a2 caractérisé par les mutations T131K, R142K et R261Q sur la HA et 3C.2a3 caractérisé par les mutations N121K et S144K. La moitié des virus A(H3N2) analysés font partie du sous-clade 3C.2a1 et l'autre moitié du sous-clade 3C.2a2, et de rares virus appartiennent au sous-clade 3C.2a3 et 3C.3a. Les analyses phylogénétiques des virus A(H3N2) sont représentées figures 22 à 23.

Les virus de type B de lignage Yamagata analysés appartiennent toujours au clade 3. Les analyses phylogénétiques des virus B Yamagata sont représentées figures 24 à 25.

Les virus de type B de lignage Victoria analysés appartiennent au groupe génétique 1A, la moitié des virus B-Victoria analysés possède la délétion Δ 162/163 sur la HA. Les analyses phylogénétiques des virus B Victoria sont représentées figures 26 à 27.

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

Les séquences ont également été analysées afin d'identifier la présence de mutations associées à des phénotypes particuliers en prenant en compte également les mutations retrouvées pour les variants minoritaires (> 5 %) au sein de la population virale (§3.1.3).

En dehors des mutations associées à une diminution de sensibilité aux antiviraux, d'autres mutations ont été recherchées, notamment les substitutions du résidu D222 dans la HA des virus A(H1N1)pdm09 dont le polymorphisme peut être associé aux formes graves, 13 virus porteurs d'une mutation en position 222 sur l'hémagglutinine ont été détectés chez 10 patients différents, avec une fréquence variable allant de 8% à 99% pour les mutations D222N et D222G.

Les virus A(H3N2) détectés parmi les cas sévères de grippe qui ont été séquencés (n = 21), n'ont pas révélé de mutation qui pourrait être liée aux formes graves.

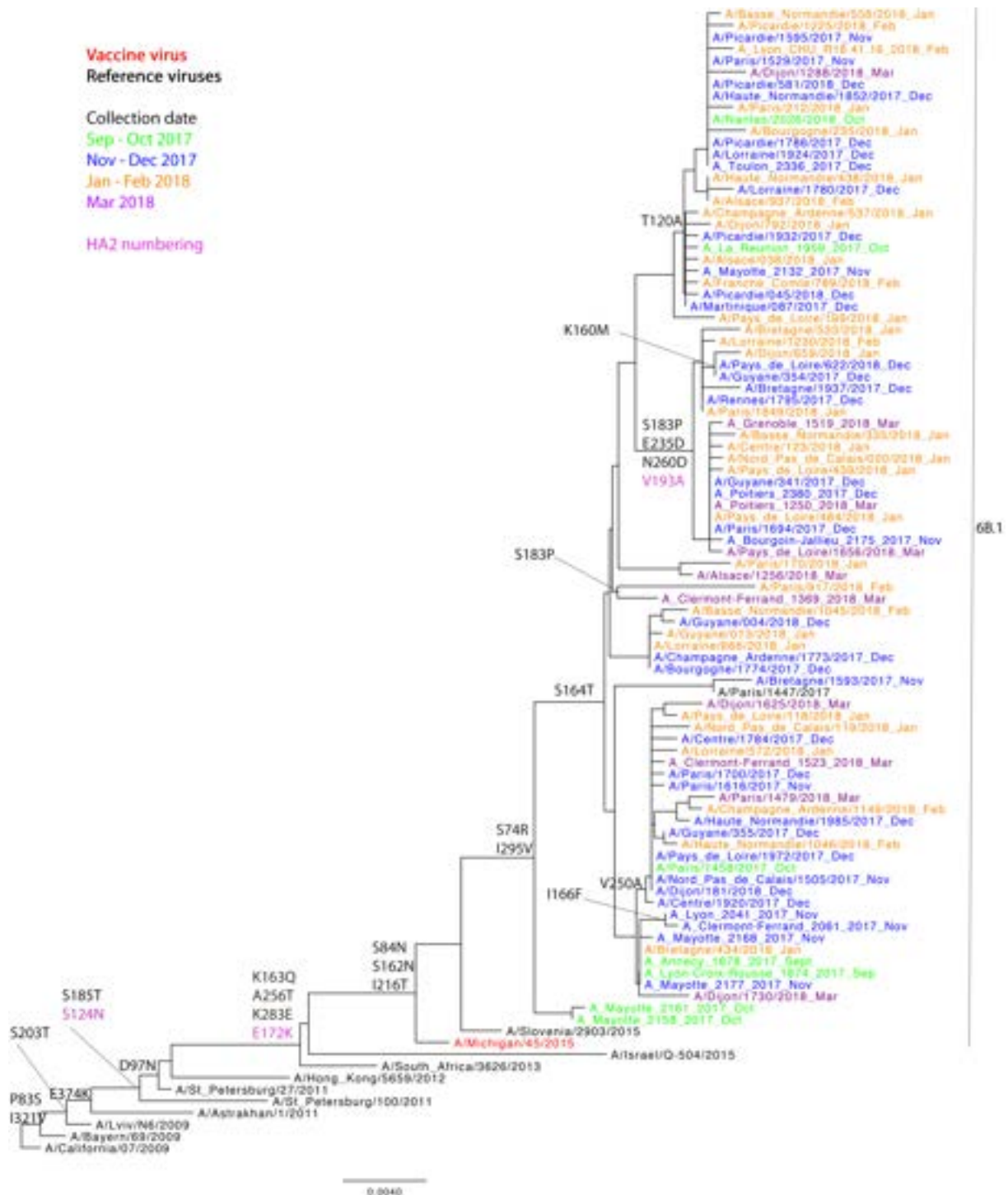


Figure 20 : Analyse phylogénétique du gène HA des virus A(H1N1)pdm09 – saison 2017-2018

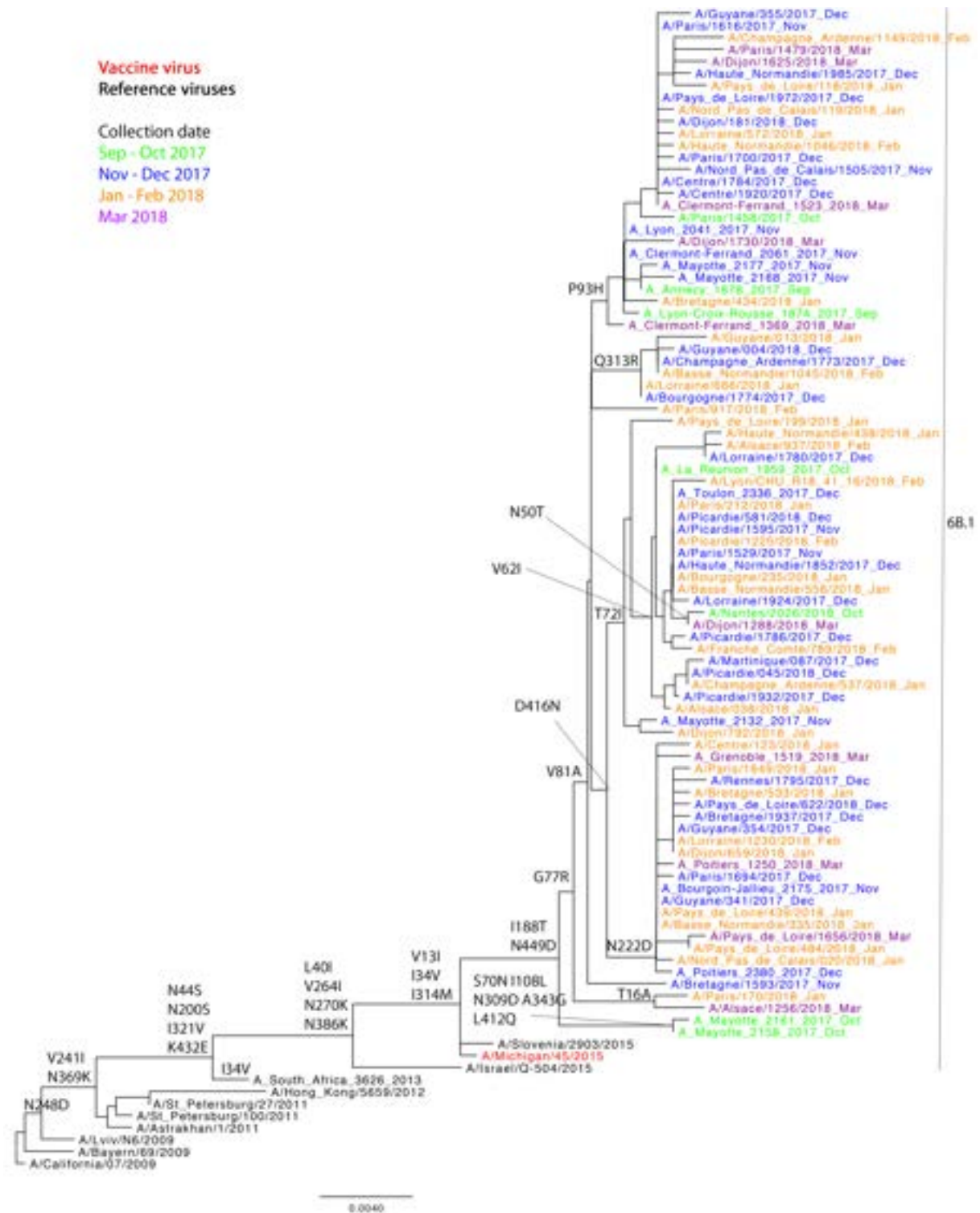


Figure 21 : Analyse phylogénétique du gène NA des virus A(H1N1)pdm09 – saison 2017-2018

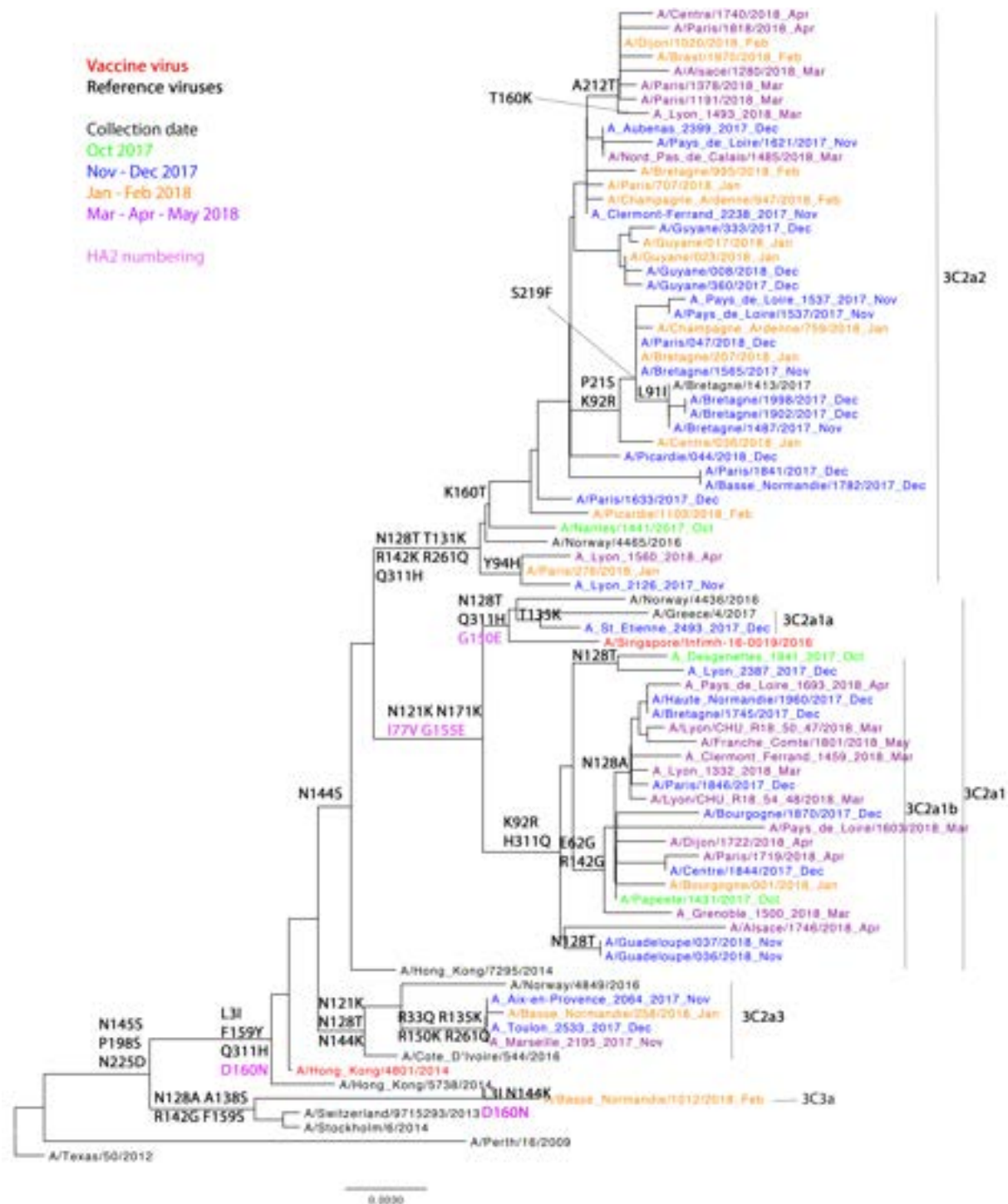


Figure 22 : Analyse phylogénétique du gène HA des virus A(H3N2) – saison 2017-2018

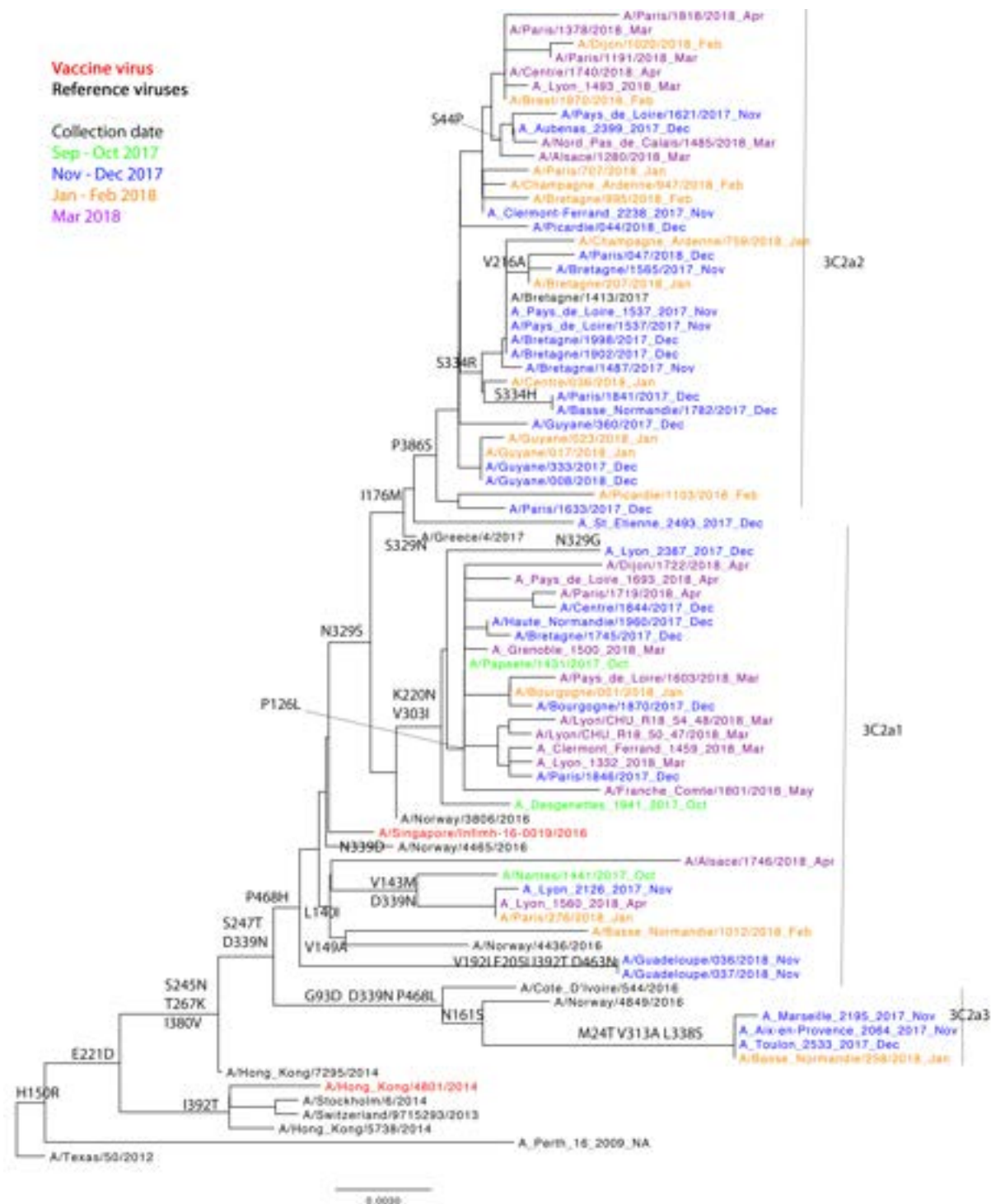


Figure 23 : Analyse phylogénétique du gène NA des virus A(H3N2) – saison 2017-2018

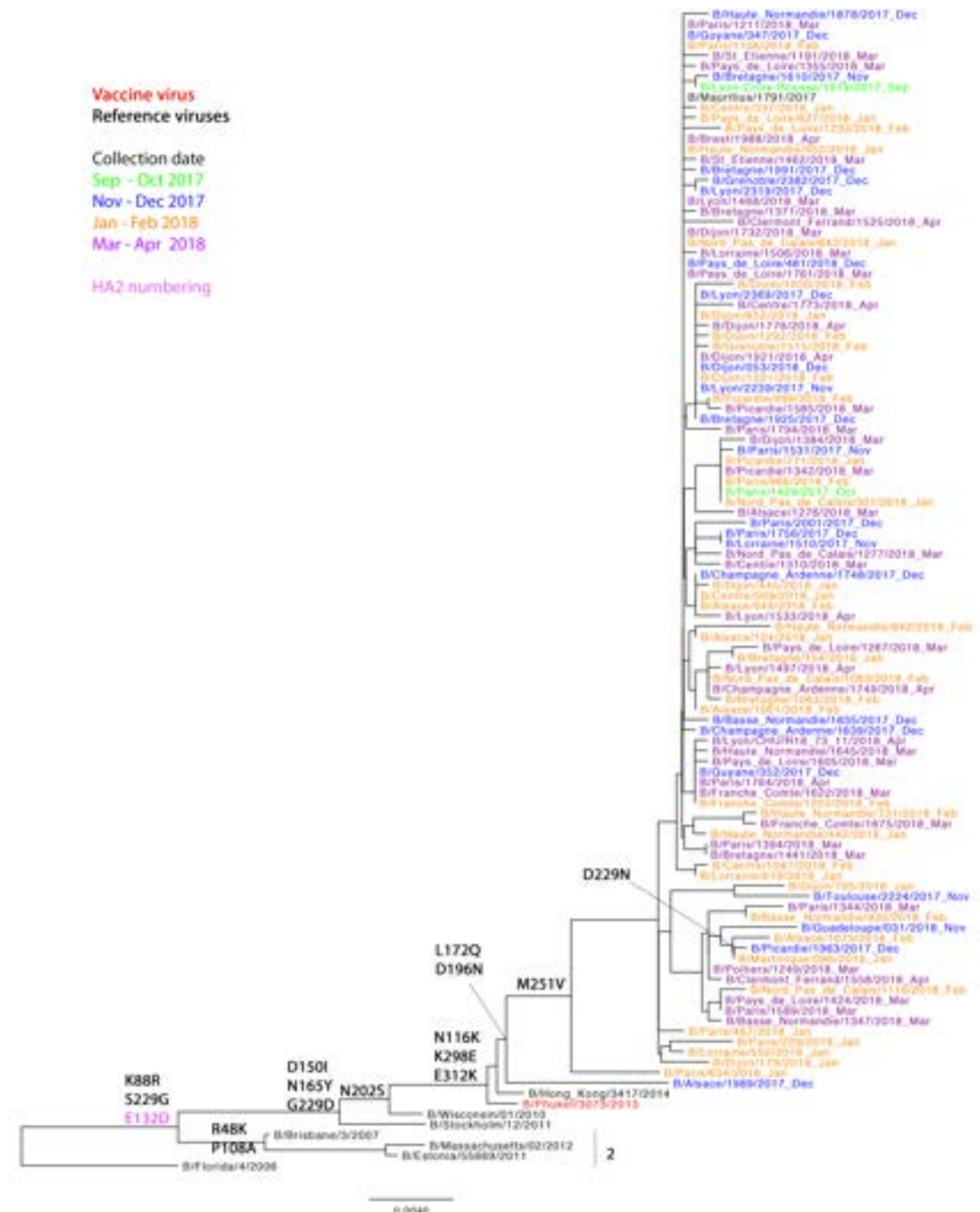


Figure 24 : Analyse phylogénétique du gène HA des virus B Yamagata – saison 2017-2018

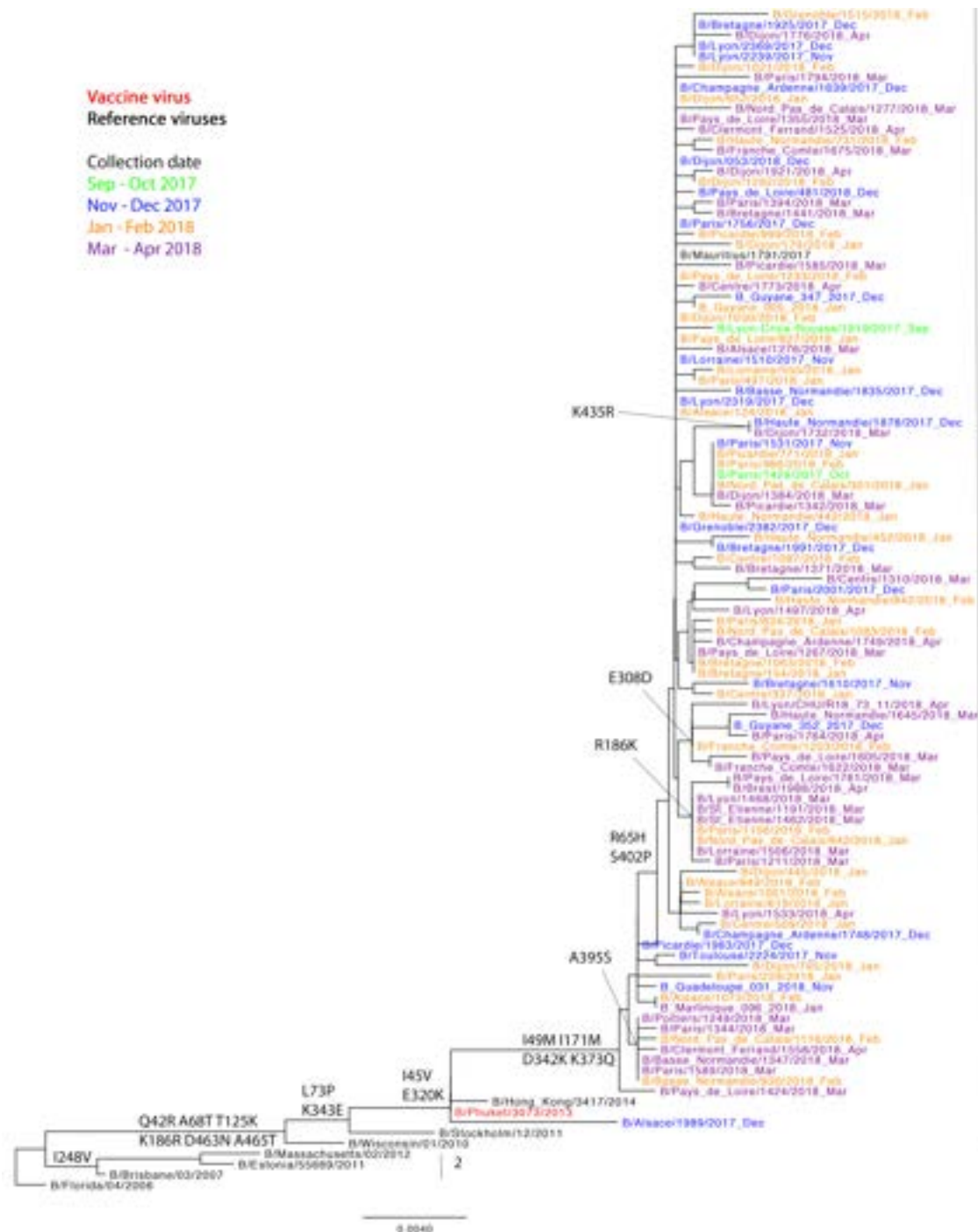


Figure 25 : Analyse phylogénétique du gène NA des virus B Yamagata – saison 2017-2018

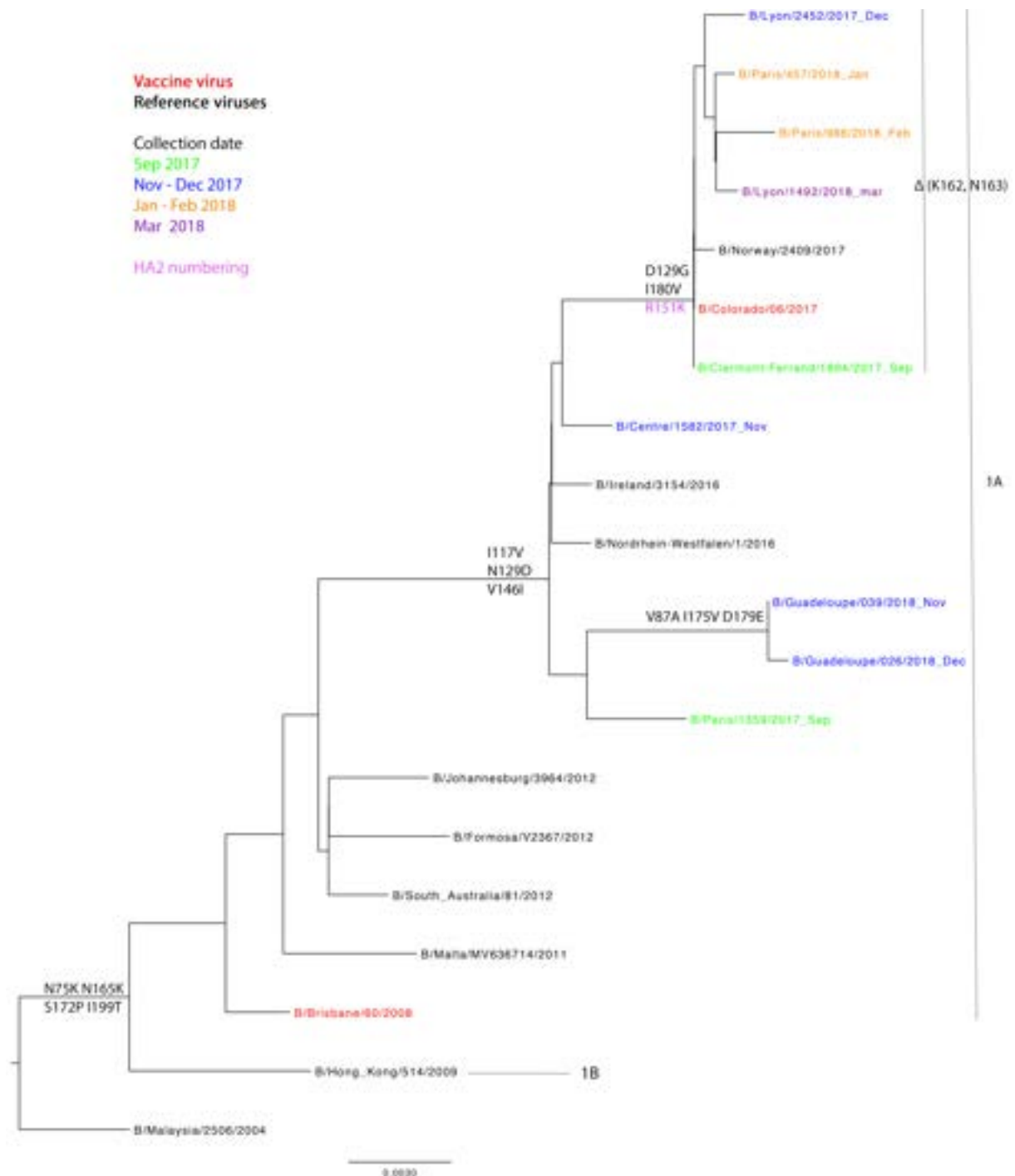


Figure 26 : Analyse phylogénétique du gène HA des virus B Victoria – saison 2017-2018

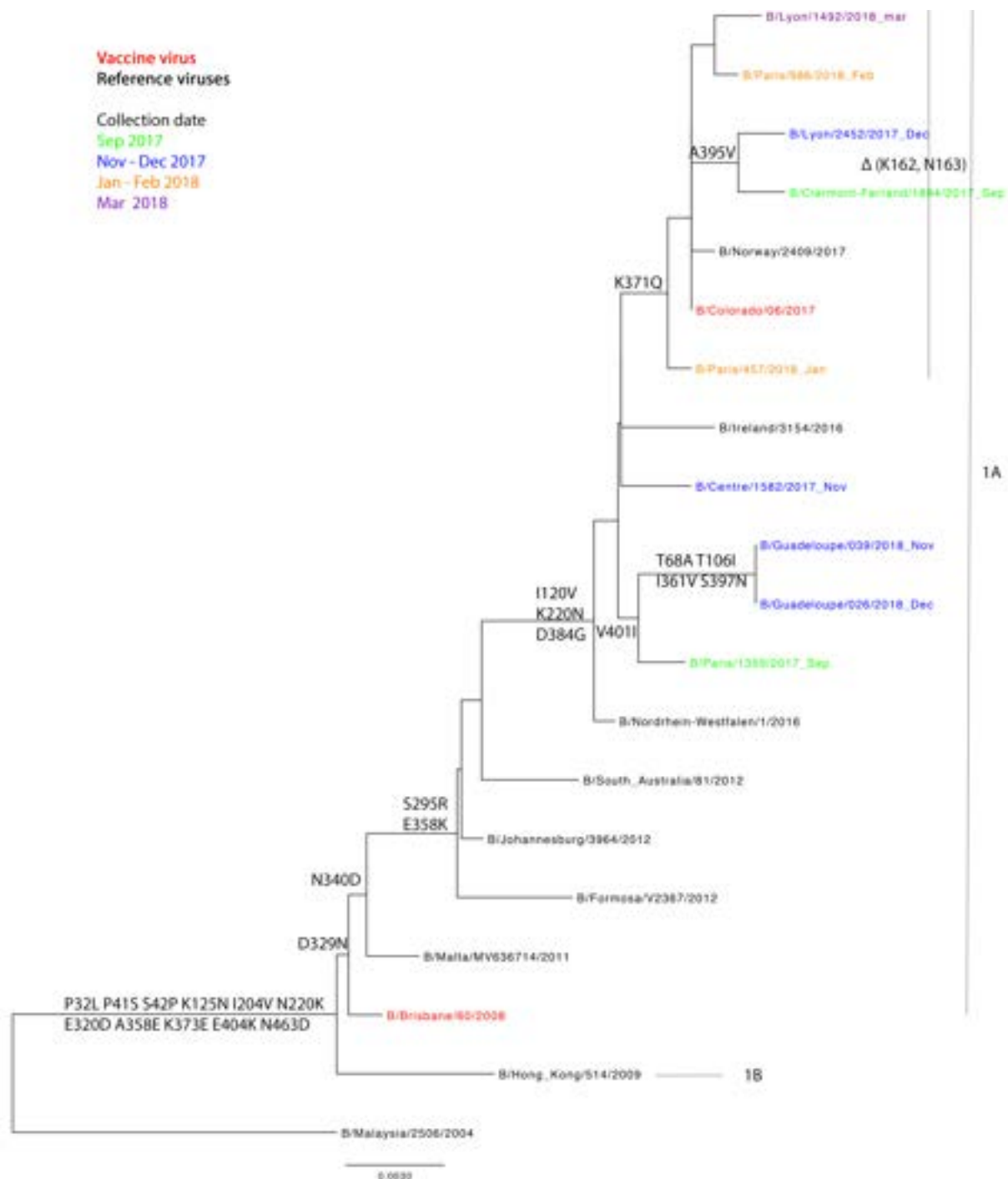


Figure 27 : Analyse phylogénétique du gène NA des virus B Victoria – saison 2017-2018

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

Comme le montre le tableau 11, on remarque que la majorité des prélèvements ont été réalisés dans la tranche d'âge 15 à 64 ans (46,8%) alors que la classe d'âge des plus de 65 ans est peu représentée (14,8%) mais plus que durant la saison 2016-2017 (7,4%). La classe d'âge 0 à 4 ans continue à être bien représentée cette année grâce à l'activité des pédiatres (21,8% contre 5,5% en 2014/2015). Ce sont les sujets âgés de 5 à 14 ans qui ont été les plus touchés (70,3% de positivité pour la grippe) ainsi que les sujets de 15 à 64 ans (60,2% de positivité) (Tableau 11).

France métropolitaine

Age	Nb Prlvt	Nb Grippe +	% de + dans la tranche âge	% du groupe d'âge/total	% + /total +
0-4	682	295	43,2	21,8	17,0
5-14	519	365	70,3	16,6	21,1
15-64	1460	879	60,2	46,8	50,7
≥65	461	194	42,1	14,8	11,2
Total	3122	1733		100	100

Tableau 11 : Distribution par âge des patients– Réseau Sentinelles

Prélèvements réalisés dans le cadre du Réseau Sentinelles et trouvés positifs pour la grippe en France / Saison 2017-2018

D'après les données de la surveillance en médecine de ville les virus de type A et B ont co-circulé, les virus de grippe A(H1N1)pdm09 touchant particulièrement la classe d'âge des moins de 5 ans (68,1%) alors qu'inversement les virus de type B, dont 99% du lignage B-Yamagata, touchaient préférentiellement la classe d'âge des plus de 65 ans (59,3%). Les virus de grippe A(H3N2) ont peu circulé, on les retrouve plus particulièrement chez les plus de 65 ans (17,0%) (Tableau 12).

Age	Nb Grippe +	Nb grippe A non sous-typé	(%)	Nb grippe A H1pdm09	(%)	Nb grippe A/H3	(%)	Nb grippe B	(%)	total
0-4	295	5	1,7	201	68,1	23	7,8	66	22,4	100
5-14	365	3	0,8	140	38,3	21	5,7	201	55,1	100
15-64	879	9	1,0	350	39,8	72	8,2	448	51,0	100
≥65	194	2	1,0	44	22,7	33	17,0	115	59,3	100
Total	1733	19	1,1	735	42,4	149	8,6	830	47,9	100

Tableau 12 : Distribution par tranche d'âge et par (sous)-type viral - Réseau Sentinelles

Prélèvements réalisés dans le cadre du Réseau Sentinelles et trouvés positifs pour la grippe en France / Saison 2017-2018

3.1.2.5 Cas de grippe confirmés virologiquement chez des personnes vaccinées

Lors de la saison 2017-2018, parmi les prélèvements de patients pour lesquels le statut vaccinal était connu (3100 sur 3158, soit 98,7 % des patients Sentinelles prélevés), 11,7% (364 sur 3100) provenaient de patients vaccinés (supérieur aux 7,5 % de patients vaccinés en 2016-2017, et aux 4,5% de patients vaccinés en 2015-2016) (Tableau 13). Le pourcentage de détection de virus grippaux était de 43,4% parmi les vaccinés et de 57,2 % chez les non vaccinés. Bien que la proportion de patients vaccinés soit faible, la détection

des virus grippaux est moins importante chez les patients vaccinés que chez les non vaccinés (Tableau 13).

France métropolitaine

Statut	Grippe +		Grippe -		Effectif	
	Nbre	(%)	Nbre	(%)	Nbre	(%)
Vaccinés	158	9,2	206	14,9	364	11,7
Non Vaccinés	1564	90,8	1172	85,1	2736	88,3
Total	1722		1378		3100	

Tableau 13 : Statut vaccinal - Distribution des virus grippaux détectés au CNR Réseau Sentinelles / saison 2017-2018

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 (1,6 à 7,1%). Pour les plus de 65 ans, qui correspondent traditionnellement à la tranche d'âge la mieux vaccinée, les prélèvements réalisés chez les vaccinés ont représenté 51%, valeur en hausse par rapport à la dernière saison (44,9% saison 2016-17) (Tableau 14).

Age (ans)	0-4	(%)	5-14	(%)	15-64	(%)	≥65	(%)
Vaccinés	19	2,8	8	1,6	103	7,1	234	51,0
Non Vaccinés	653	97,2	506	98,4	1352	92,9	225	49,0
Total	672		514		1455		459	

*Tableau 14 : Statut vaccinal - Distribution par tranche d'âge
Nombre de prélèvements de patients testés au CNR - Réseau Sentinelles / saison 2017-2018*

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

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

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

➤ VRS

Les circulations épidémiques du VRS et des virus grippaux n'ont pas été dissociées. Comme la saison dernière, le VRS a circulé de façon épidémique au cours des mois d'octobre à mars avec un retard d'environ une semaine pour la région sud (Figures 28 à 30). Sa circulation au cours de la saison a été un peu plus intense que la saison dernière, dans les hôpitaux.

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

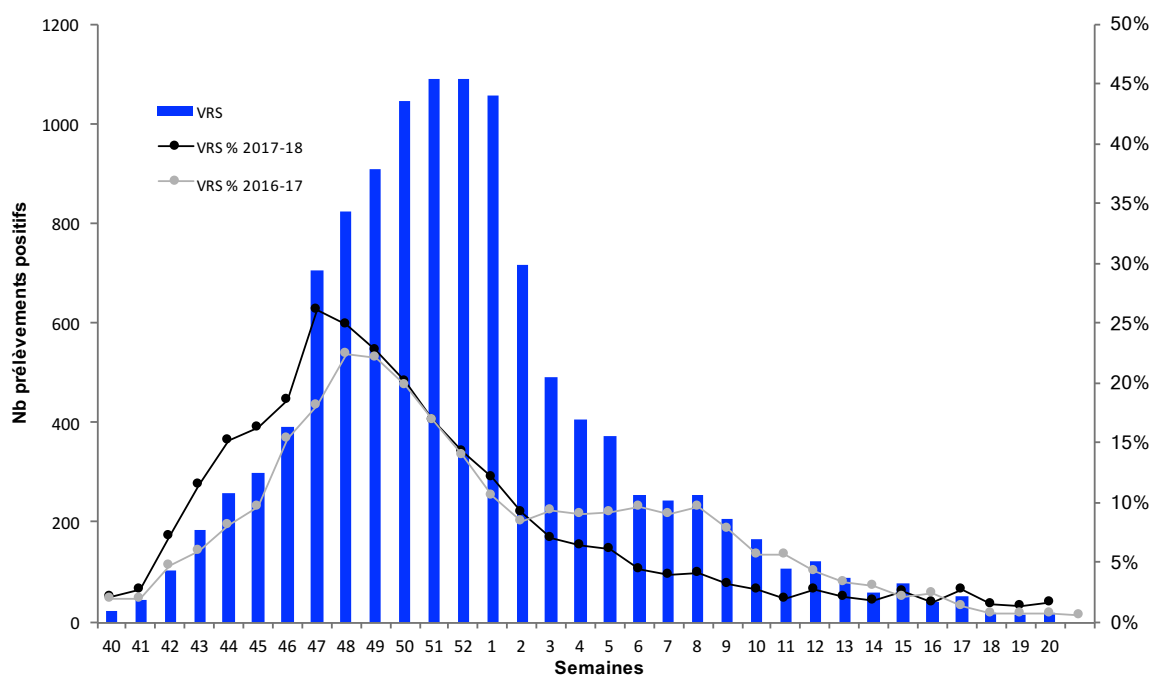


Figure 28 : Détection du VRS en France
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2017-2018

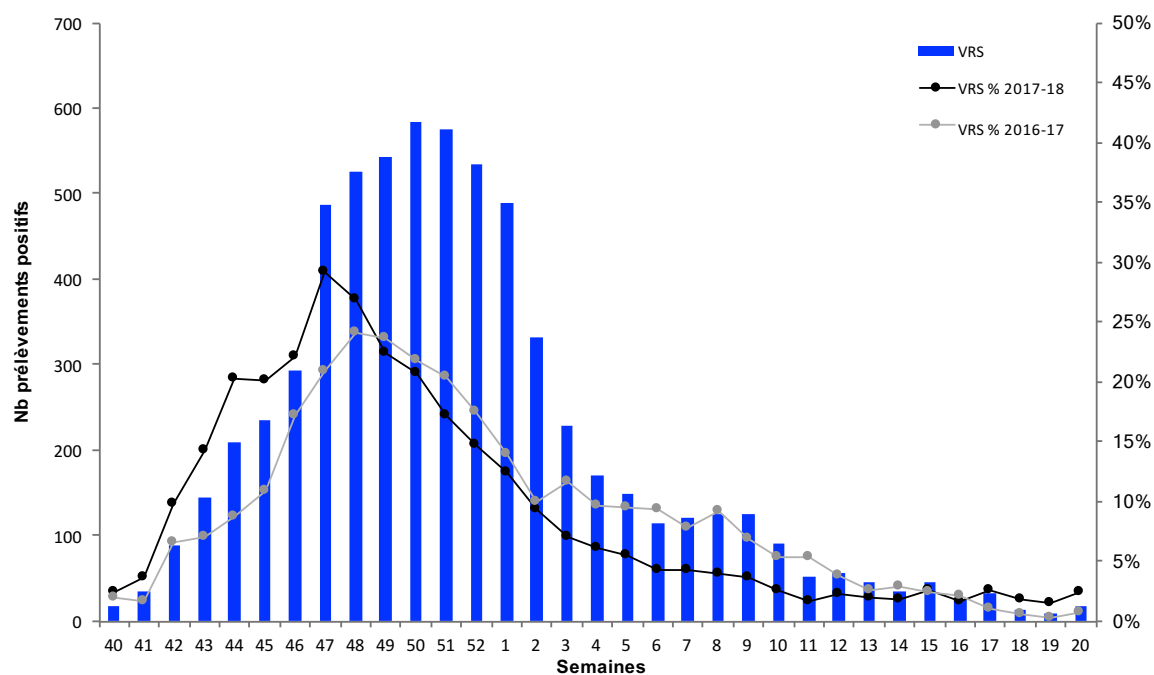


Figure 29: Détection du VRS en France-Nord
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2017-2018

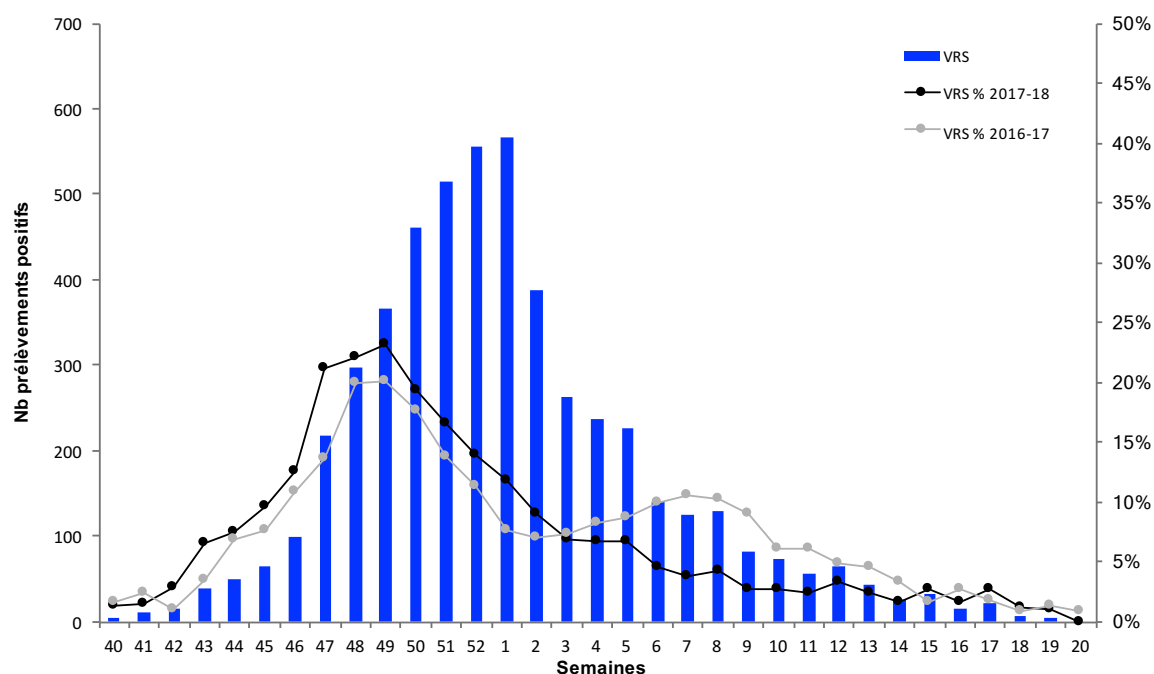


Figure 30: Détection du VRS en France-Sud
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2017-2018

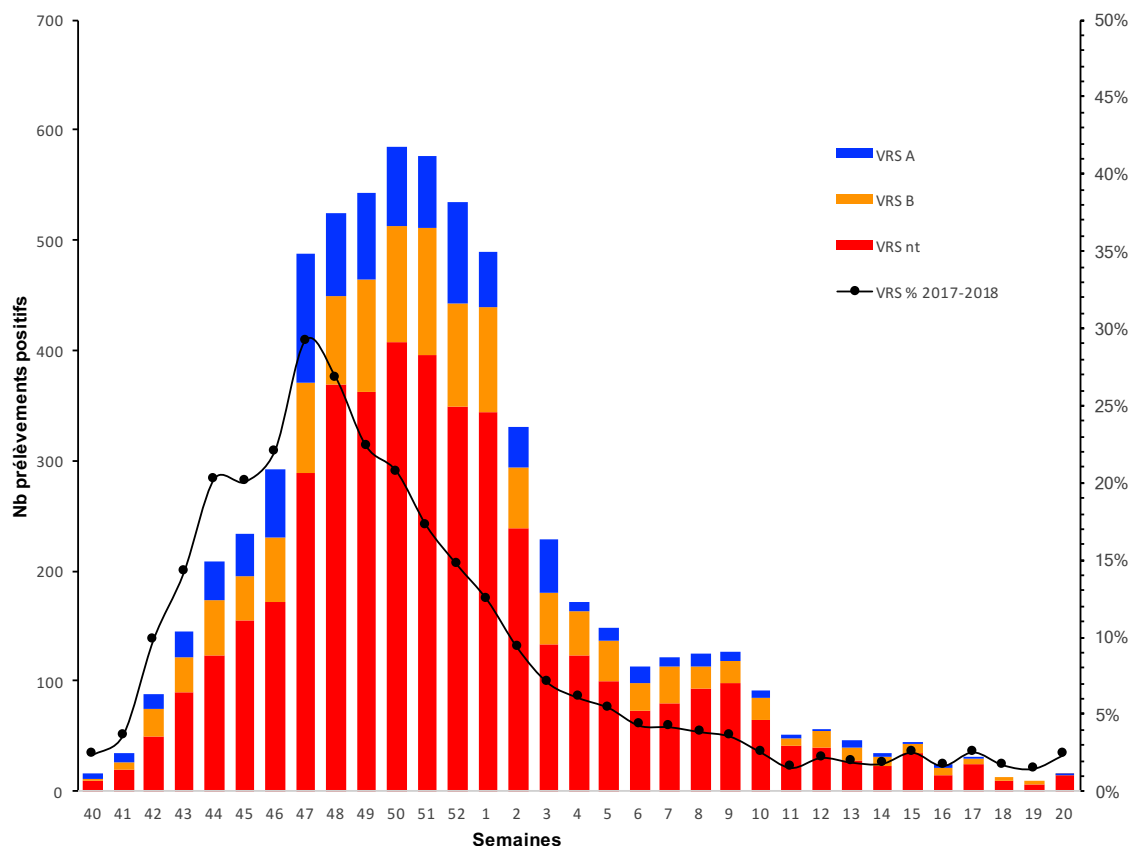


Figure 31 : Détection du VRS en France-Nord. Répartition VRS A, VRS B et VRS non typés. Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2017-2018

En population générale pour la France métropolitaine, sur 2463 échantillons prélevés lors d'un syndrome grippal (SG), 169 VRS ont été détectés principalement parmi la classe d'âge 0-4 ans (69,2%) Parmi les 333 patients de plus de 65 ans présentant une infection respiratoire aigüe (IRA), 20 VRS B ont été détectés et 4 VRS A.

La plupart des laboratoires hospitaliers n'effectuent pas la détermination de groupe : VRS A et VRS B, cependant pour ceux qui l'ont réalisée, on observe une proportion similaire de VRS A et de VRS B cette saison (Figure 31).

Age	VRS A	VRS B	Nb VRS +	%
0-4	55	62	117	69,2
5-14	4	5	9	5,3
15-64	7	31	38	22,5
≥65	1	4	5	3,0
Total	67	102	169	100

Tableau 15 : Répartition des VRS en fonction de l'âge. France métropolitaine Réseau Sentinelles - SG / saison 2017-2018

➤ Rhinovirus humains

Les rhinovirus ont été détectés de façon quasiment continue tout au long de la saison 2017-2018. Leur circulation a commencé à diminuer légèrement lors de l'épidémie de VRS (S43/2017-S10/2018) et ils se sont maintenus à un taux faible tout au long de l'épidémie de grippe (S48/2017-S16/2018). Leur circulation a de nouveau augmenté à partir de la semaine S11/2018 jusqu'à la semaine S17/2018 pour se maintenir à un niveau élevé (> 20% de détections positives) les semaines suivantes (Figures 32 à 34).

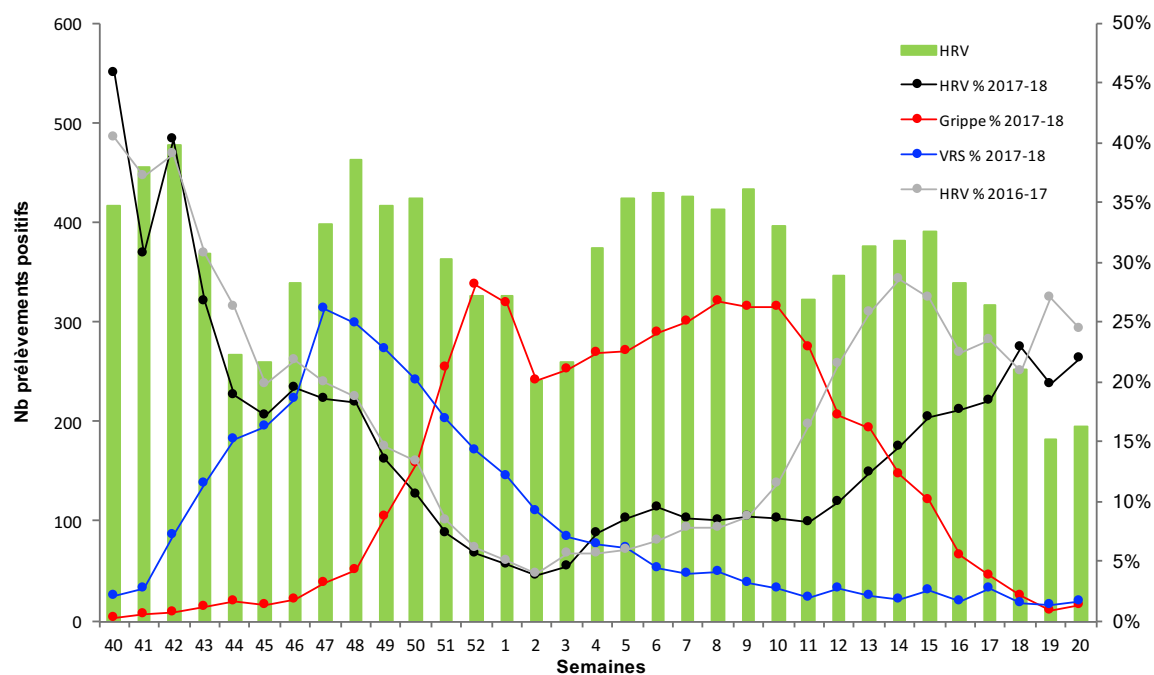


Figure 32: Détection des rhinovirus humains en France
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2017-2018

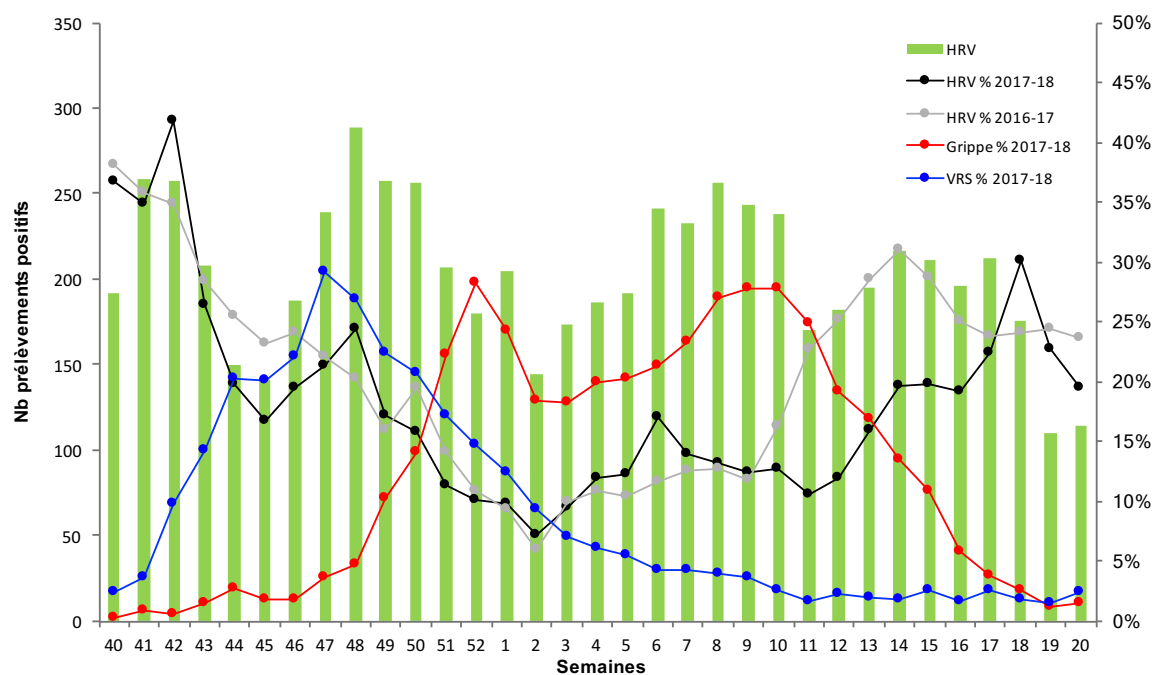


Figure 33: Détection des rhinovirus humains en France-Nord
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2017-2018

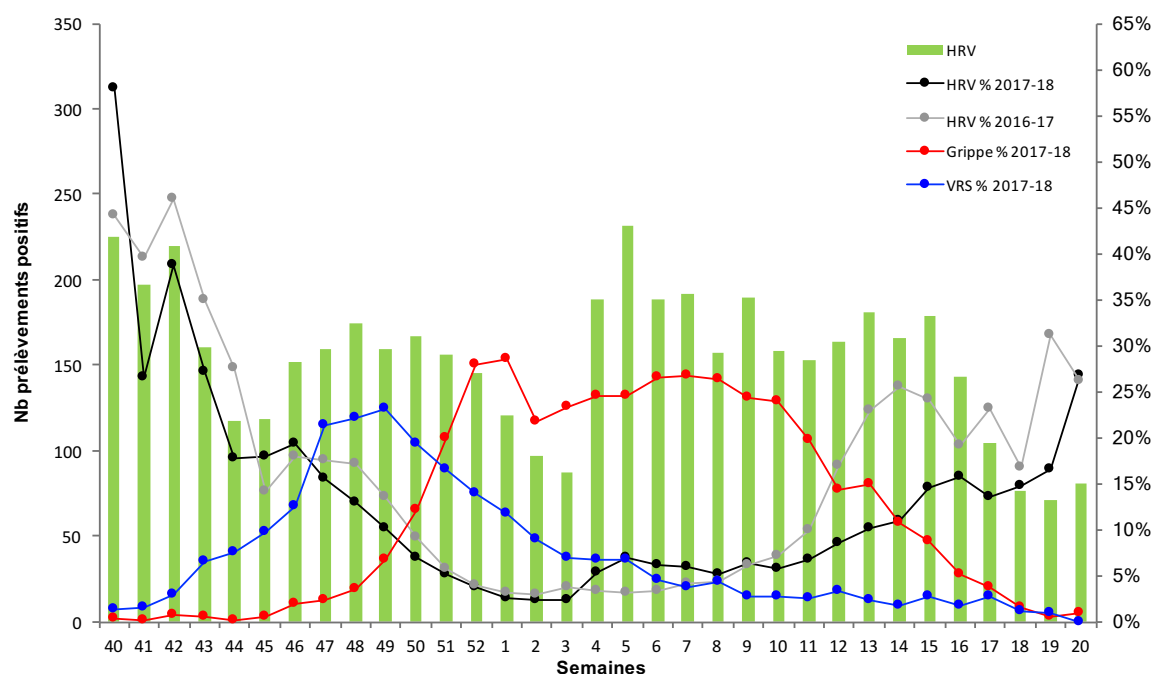


Figure 34: Détection des rhinovirus humains en France-Sud
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2017-2018

➤ Adénovirus

Les adénovirus ont été détectés/isolés de façon continue tout au long de la saison 2017-2018 avec une circulation globalement faible et un pourcentage de prélèvements positifs toujours inférieur à 5% (Figure 35).

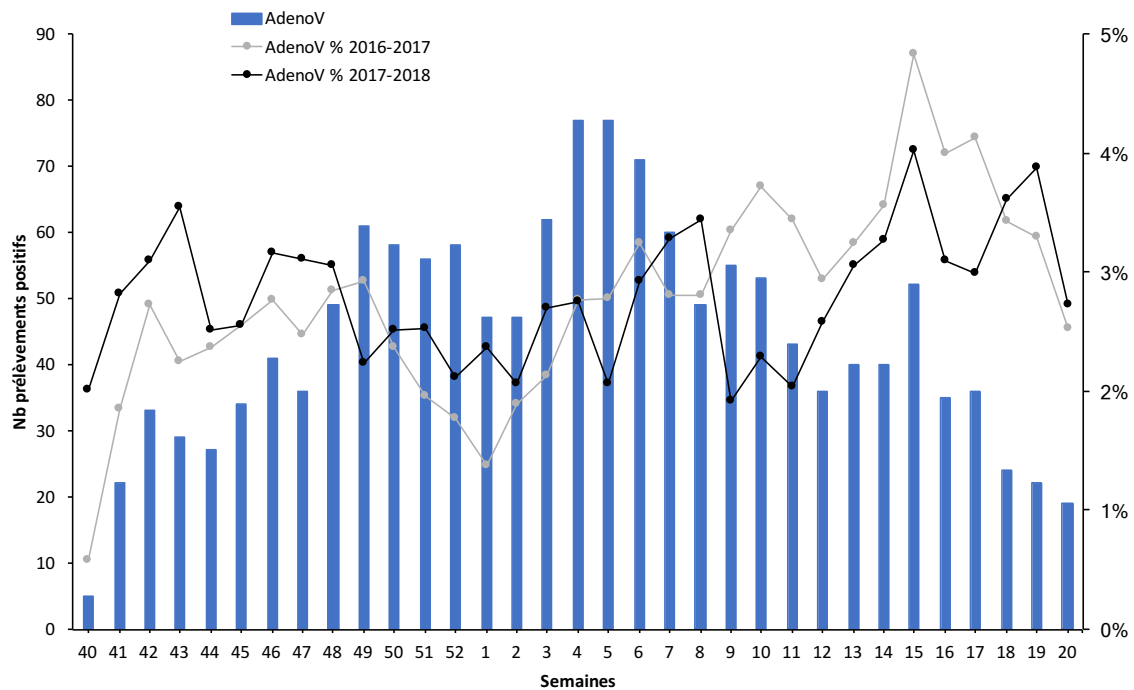


Figure 35: Détection des adénovirus en France
Réseau RENAL / saison 2017-2018

➤ Virus parainfluenza

Les virus parainfluenza ont été détectés à un niveau faible tout au long de la saison 2017-2018, avec des taux supérieurs à 8% en début et en fin de période de surveillance (Figure 36).

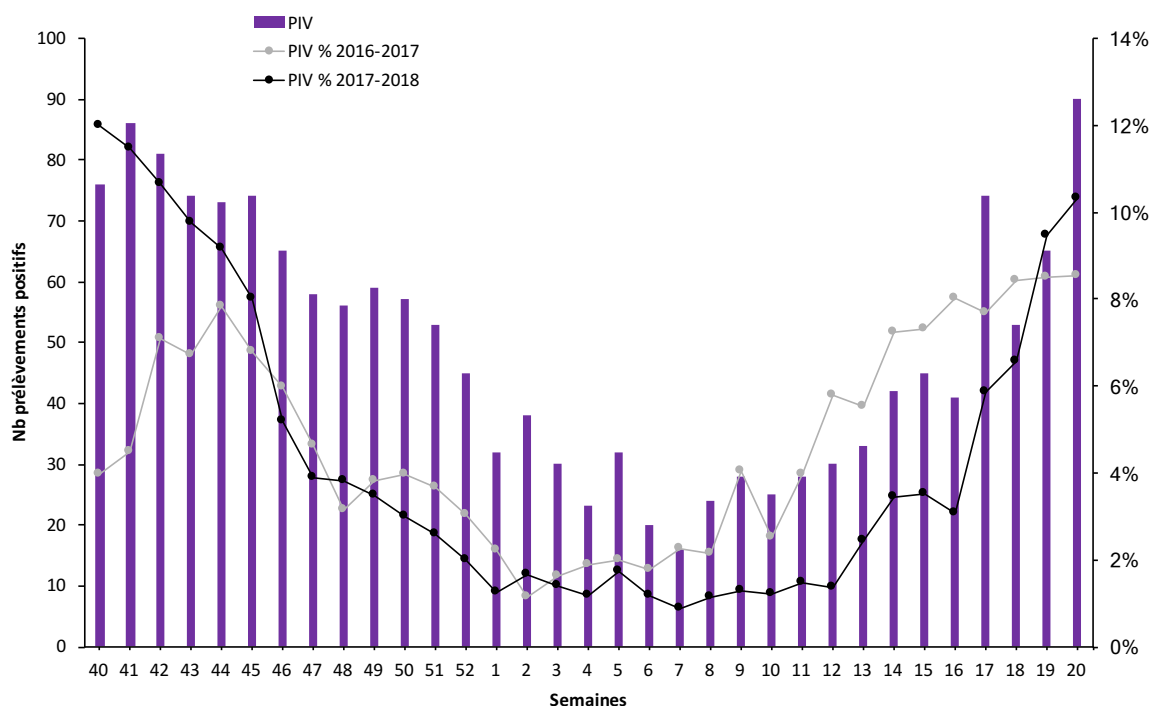


Figure 36: Détection des virus parainfluenza (PIV) en France
Réseaux RENAL / saison 2017-2018

* pour semaine 3 la valeur attribuée correspond à la moyenne des semaines 2 et 4 (problème données)

➤ **Métapneumovirus humains**

Comme la saison dernière, la circulation des métapneumovirus humains est restée stable tout au long de la saison 2017-2018 avec des pourcentages de détections positives faibles (< ou égale 5%) (Figure 37).

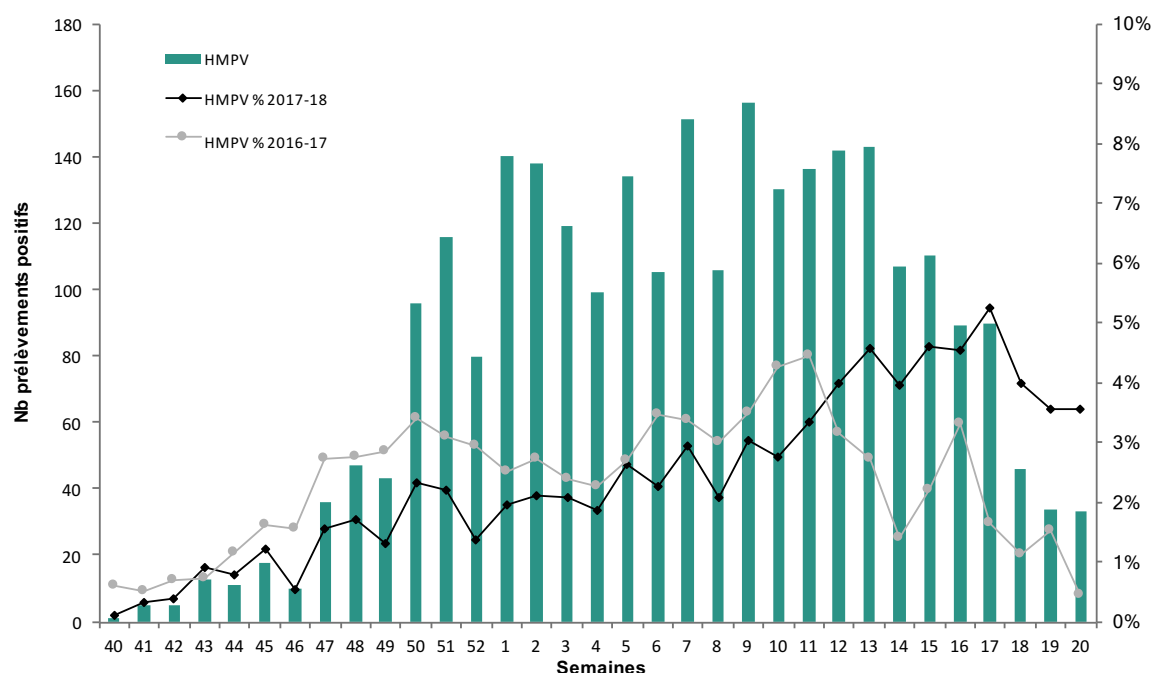


Figure 37: Détection des métapneumovirus humains en France
Réseaux Sentinelles et RENAL / saison 2017-2018

Dans la population générale en France métropolitaine, les métapneumovirus ont représenté 4,2% (133 sur 3158 échantillons) des détections positives. Parmi les cas de SG en médecine de ville (Réseau Sentinelles) (n=2463), 102 (4,1%) métapneumovirus ont été détectés, principalement retrouvés dans la classe d'âge 0-4 ans et 15-64 ans. Sur 333 cas d'IRA prélevés chez les 65 ans et plus, 19 (5,7%) métapneumovirus ont été détectés.

SG		
Age	hMPV	%
0-4	51	50,0
5-14	12	11,7
15-64	33	32,4
≥65	6	5,9
Total	102	100

Tableau 16 : Répartition des métapneumovirus en fonction de l'âge. France entière
Réseau Sentinelles / saison 2017-2018

3.1.3 Surveillance de la résistance aux antiviraux

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

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

La résistance (ou réduction de la sensibilité) phénotypique est déterminée en fonction des variations des IC₅₀ par rapport aux valeurs d'IC₅₀ pour les virus de référence sauvages (cf § 3.1.3.3).

3.1.3.1 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=248 CNR-IPP) et A(H3N2) (n=94 CNR-IPP) présentaient une asparagine en position 31 de la séquence de la protéine M2 associée à une résistance à l'amantadine/rimantadine, à l'exception d'un virus A(H3N2) pour lequel une Ser en position 31 a été observé. Quelques virus avec une réversion de la mutation en position 31 de la M2 et sensibles aux adamantanes ont été rapportés de façon sporadique ailleurs dans le monde.

3.1.3.2 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 cette saison pour de nombreuses suspicions de résistance aux antiviraux, dans le cas de patients en réanimation sans amélioration clinique malgré le traitement par oseltamivir, notamment en Ile de France, grâce à l'intervention d'un réanimateur de l'hôpital Henri Mondor qui avait remarqué que certains patients ne présentaient pas d'amélioration clinique sous traitement et ceci de façon inhabituelle par rapport aux autres saisons.

Cette recherche est possible au moyen de RT-PCR temps réel différentielle avec des sondes spécifiques, ce qui permet une détection rapide. Au total, 83 prélèvements (dont plusieurs séries de prélèvements séquentiels à différents temps pour un même patient) ont été analysés. Et 4 virus A(H1N1)pdm09 présentant la mutation H275Y sur la neuraminidase N1 ont été identifiés par RT-PCR.

Le séquençage NGS a permis de confirmer la présence de cette mutation et de détecter un 5^{ème} patient dont le virus présentait cette substitution. La fréquence de cette mutation était variable d'un patient à l'autre, de 12% à 99,9%.

Ces 5 patients étaient hospitalisés en réanimation. Pour l'un des patients nous n'avons pas pu recueillir d'informations. Pour les 4 autres patients, il s'agissait de patients de sexe masculin, âgés de 49 à 68 ans ; 3 patients présentaient des facteurs de risque (greffe rénale, pathologies cardiovasculaires, diabète) alors qu'un seul n'avait aucun facteur de risque. Ils sont décédés tous les 4 malgré l'instauration d'un traitement antiviral par zanamivir.

Au CNR-HCL, un virus A(H1N1)pdm09 porteur de la mutation H275Y a été détecté chez une patiente de 31 ans, immunodéprimée par un traitement immunosuppresseur pour une greffe pulmonaire.

L'analyse des séquences a permis de détecter également 2 virus présentant la mutation I223R sur la NA, liée à une diminution de sensibilité à l'oseltamivir et au zanamivir (CNR-IPP). Dans un cas cette mutation était associée à la H275Y (patient en réanimation) ce qui entraîne une diminution de sensibilité encore plus élevée à ces 2 antiviraux. Dans l'autre cas il s'agissait d'un patient en médecine ambulatoire non traité.

➤ **A(H3N2)**

Le séquençage du gène N2 permet de détecter la présence de mutations conférant une réduction de la sensibilité à l'oseltamivir E119V, R224K, R292K et N294S. Parmi les 140 prélèvements testés, dont 55 provenaient de cas graves de grippe hospitalisés en réanimation, aucune mutation n'a été détectée.

➤ **Virus de type B**

Le séquençage du gène NA permet de détecter la présence de mutations conférant une réduction de la sensibilité à l'oseltamivir E117V, R150K, D197E/N, I221L et R374K. Au total 290 prélèvements, ont été analysés, 103 provenaient de cas graves. La mutation D197N a été détectée chez un patient diabétique de 75 ans, décédé Cette mutation était présente à une fréquence de 52,9% (CNR-IPP).

3.1.3.3 Tests fluorimétriques (phénotypiques)

Ce test réalisé en présence de différentes concentrations d'antiviraux permet la mesure de l'IC₅₀ (en nM) qui correspond à la concentration d'antiviral capable d'inhiber 50% de l'activité neuraminidase. Ce test nécessite la multiplication du virus sur cellules MDCK.

Parmi les virus A(H1N1)pdm09 (n=67), A(H3N2) (n=50) et de type B (lignage B-Yamagata) (n=64) dont la sensibilité aux INA a été testée, deux virus A(H1N1)pdm09 ont présenté une sensibilité très diminuée à l'oseltamivir (IC₅₀ oseltamivir >450 nM), en cohérence avec la présence de la mutation H275Y et un virus A(H1N1)pdm09 présentait une réduction de la sensibilité à l'oseltamivir et au zanamivir correspondant à la présence de la mutation I223R.

Un virus B Yamagata présentait une sensibilité diminuée à l'oseltamivir en lien avec la mutation D197N (Tableau 17).

	Sentinelles/Hôpital	
	Sensible	Résistant
IPP		
A(H1N1)pdm09	37	3
A(H3N2)	23	0
B	38	1
tot	98	4
HCL		
A(H1N1)pdm09	27	0
A(H3N2)	27	0
B	25	0
tot	79	0
TOTAL	177	4

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

3.2 Surveillance aux Antilles et en Guyane

3.2.1 Description du réseau de partenaires

3.2.1.1 Les partenaires

La surveillance de la grippe et des infections respiratoires aiguës repose en grande partie sur une surveillance en population générale menée en partenariat avec les Cires Antilles et Guyane et les réseaux de médecins sentinelles Grippe de Guyane, Martinique et Guadeloupe. En Guyane, le réseau sentinelles grippe est constitué de 18 médecins généralistes choisis dans les communes du littoral (seules accessibles par la route et où réside environ 80% de la population) : Cayenne, Rémire-Montjoly, Matoury, Roura, Kourou, Sinnamary, 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.

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.

3.2.1.2 Les prélèvements

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

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

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

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

Sur la base des estimations du nombre hebdomadaire de patients ayant consulté un médecin généraliste pour syndrome grippal, la CIRE Guyane rapporte une épidémie en Guyane d'intensité plus importante mais de durée plus courte que les années précédentes : durée de 13 semaines de la semaine S52/2017 à la semaine S12/2018 avec un pic épidémique en semaine S04/2018 et 7990 cas estimés (Figure 38).

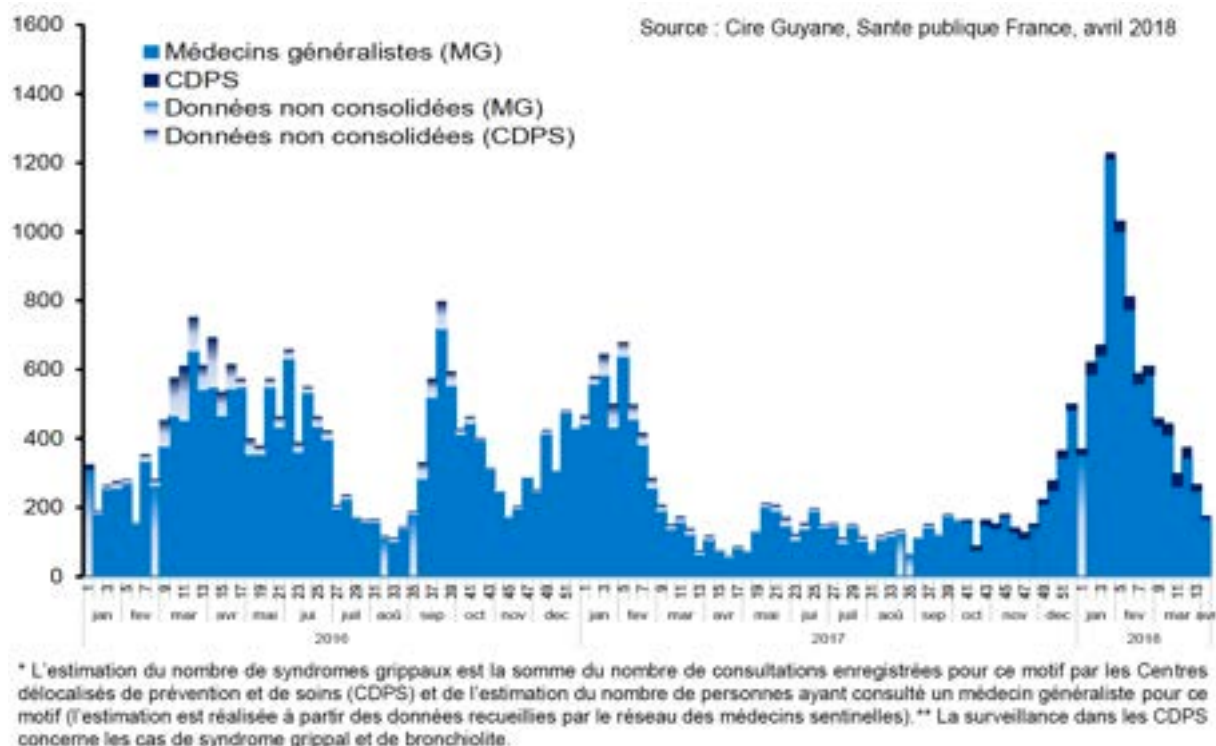


Figure 38 : Estimation du nombre hebdomadaire de consultations pour syndrome grippal, Médecins généralistes de Guyane ou CDPS – janvier 2015 à avril 2018 (Source Cire Guyane)

Au cours de cette épidémie, 3 cas sévères, tous liés à une infection par un virus de type B lignage Yamagata, ont été admis en service de réanimation de l'hôpital de Cayenne et un décès a été recensé. Les 3 patients bien que présentant des facteurs de risque ciblés par la vaccination, n'avaient pas été vaccinés.

Deux autres cas sévères liés respectivement à une infection par un virus B Yamagata et un virus A(H1N1)pdm09 avaient été recensés juste avant le démarrage de l'épidémie ; l'un d'entre eux est également décédé.

Aux Antilles, l'épidémie 2017-2018 a duré respectivement 12 et 18 semaines : de la semaine S47/2017 à la semaine S07/2018 en Guadeloupe et de la semaine S47/2017 à la semaine S13/2018 en Martinique (Figures 39-40). Les épidémies sont restées d'ampleur modérée dans ces deux départements, avec respectivement 9 et 16 cas graves hospitalisés en réanimation (dont 2 et 5 décès) en Guadeloupe et en Martinique.

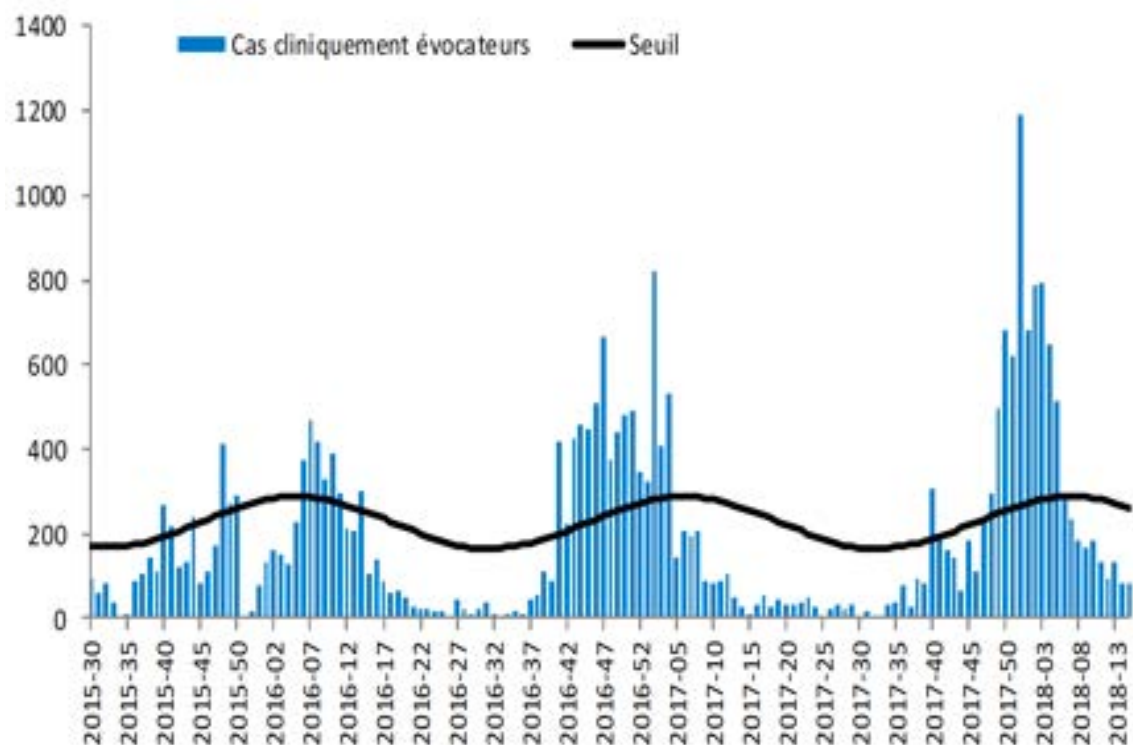


Figure 39 : Estimation du nombre hebdomadaire de consultations en médecine de ville pour syndromes grippaux et seuil saisonnier, Guadeloupe – juillet 2015 à avril 2018 (Source Cire Antilles)

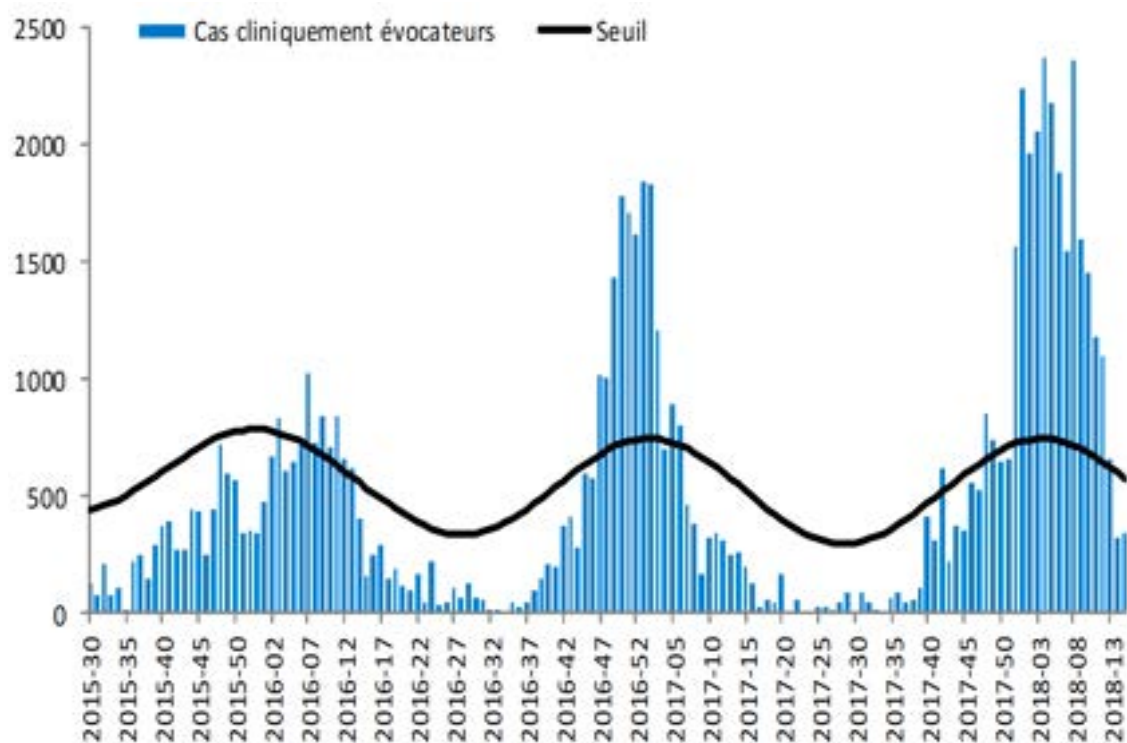


Figure 40 : Estimation du nombre hebdomadaire de consultations en médecine de ville pour syndromes grippaux et seuil saisonnier, Martinique – juillet 2015 à avril 2018 (Source Cire Antilles)

Les périodes épidémiques observées aux Antilles et en Guyane pour la saison 2017-2018 sont assez similaires à celle observée en métropole se distinguant notamment pour la

Guyane par une intensité plus importante et surtout une durée plus courte qu'habituellement. La circulation virale s'est ensuite poursuivie à un niveau plus faible (Figures 41 à 43).

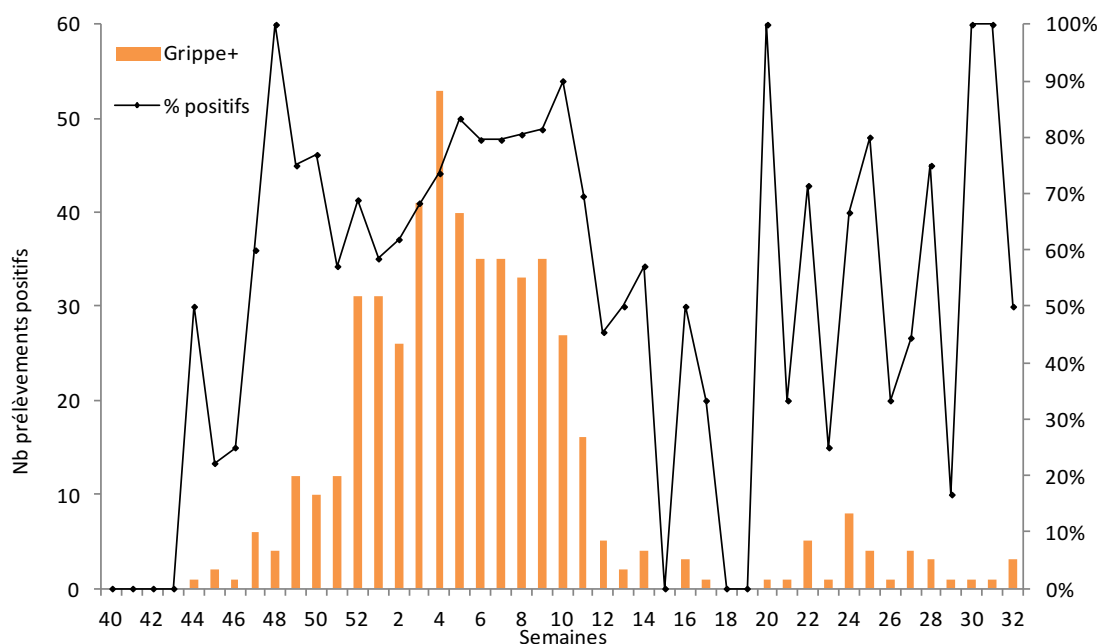


Figure 41 : Détection des virus grippaux aux Antilles et Guyane CNR-IPG / saison 2017-2018

Le nombre de prélèvements reçus au CNR-IPG pour la saison 2017-2018 est en augmentation par rapport à la saison précédente du fait d'une augmentation des prélèvements du réseau de médecins Sentinelles pour la Guyane et des prélèvements hospitaliers pour la Martinique.

Sur le plan virologique, les virus grippaux de type A et B ont co-circulé dans les 3 territoires. Par ailleurs, en Guyane, de la même façon qu'en métropole, une circulation concomitante virus grippaux et des VRS a été observée cette saison (Figure 42).

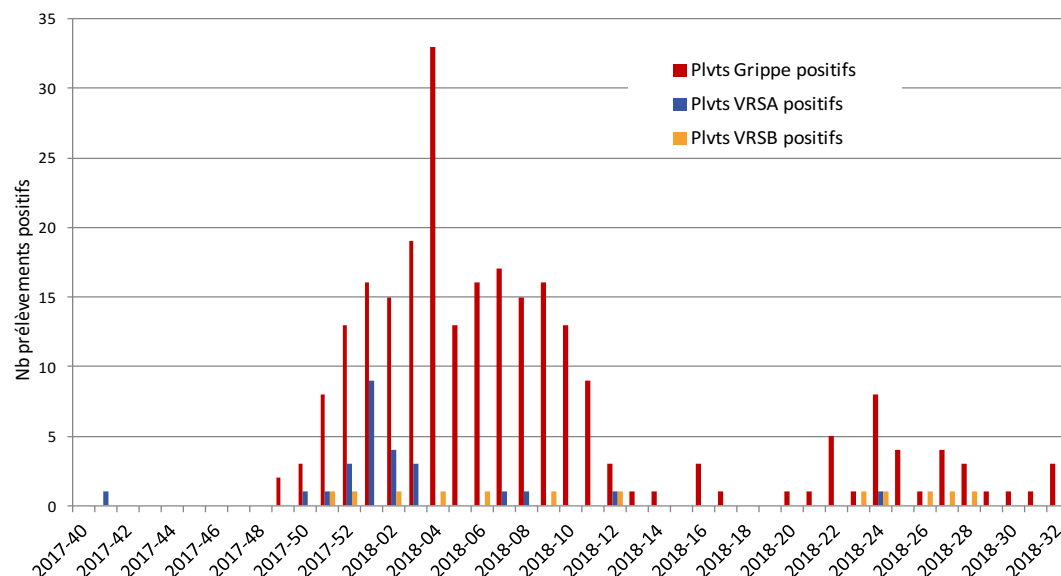


Figure 42 : Détection des virus grippaux et VRS en Guyane - CNR-IPG / saison 2017-2018 (semaines S40/2017 à S32/2018)

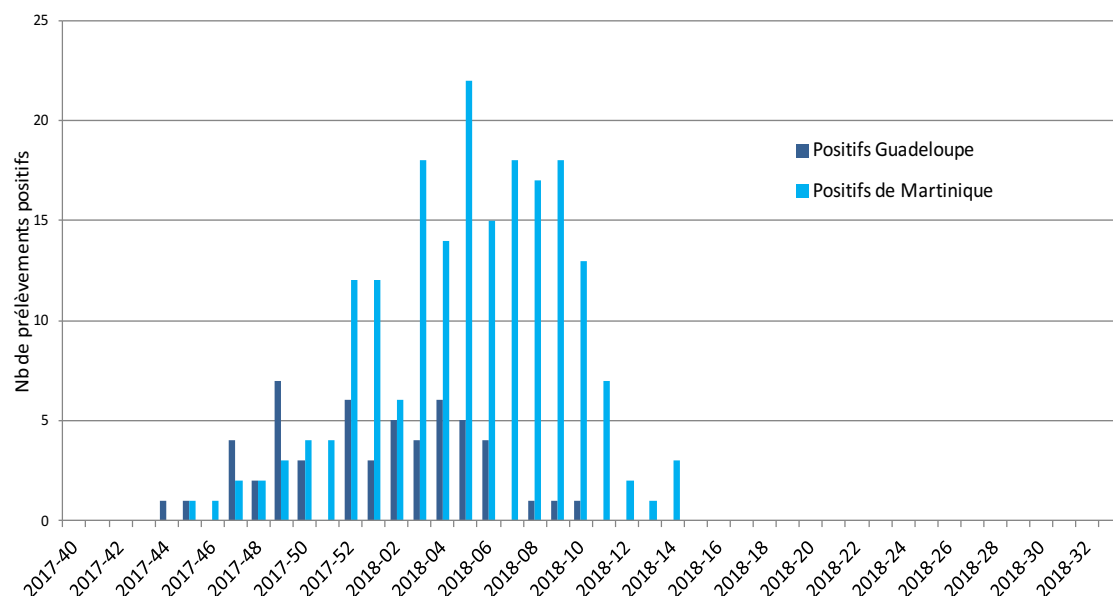


Figure 43 : Détection des virus grippaux aux Antilles (Martinique et Guadeloupe) CNR-IPG / saison 2017-2018 (semaines S40/2017 à S32/2018)

Les épidémies de grippe pour la Guyane comme pour les Antilles ont été marquées par une large co-circulation de virus grippaux de type A et B avec une prédominance de virus B Yamagata en Guyane et en Guadeloupe et une prédominance des A(H1N1)pdm09 en Martinique (Figures 44 à 47). Par contraste, la circulation virale post épidémique en Guyane se caractérise par large majorité de virus de type A.

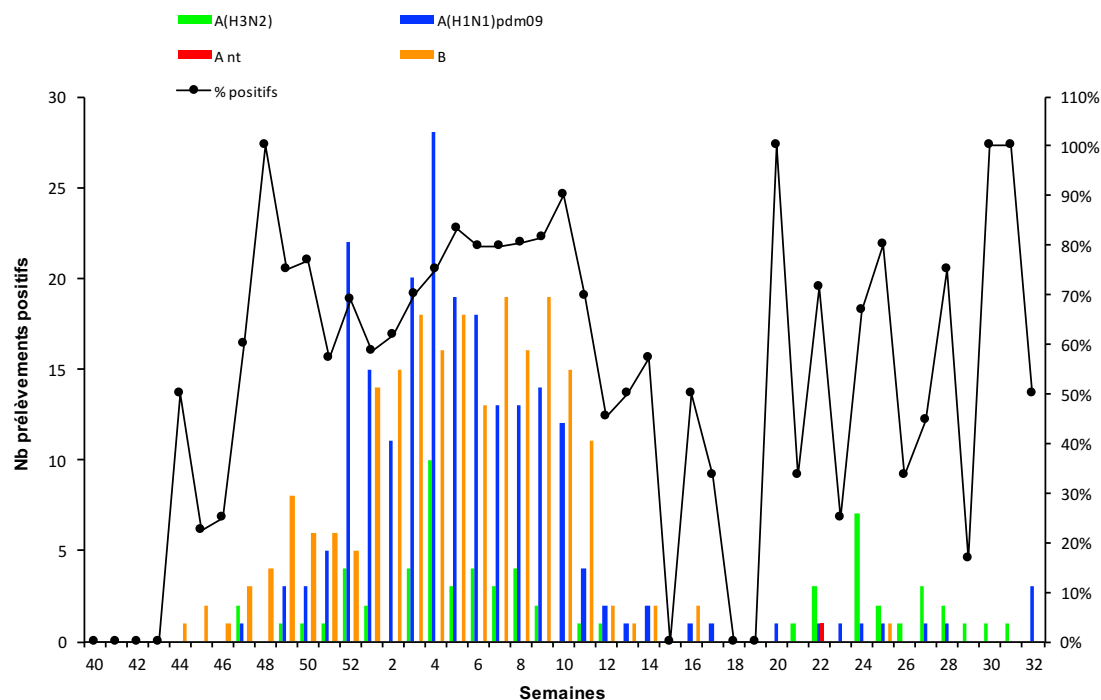


Figure 44 : Répartition des virus grippaux détectés aux Antilles et Guyane
CNR-IPG / saison 2017-2018

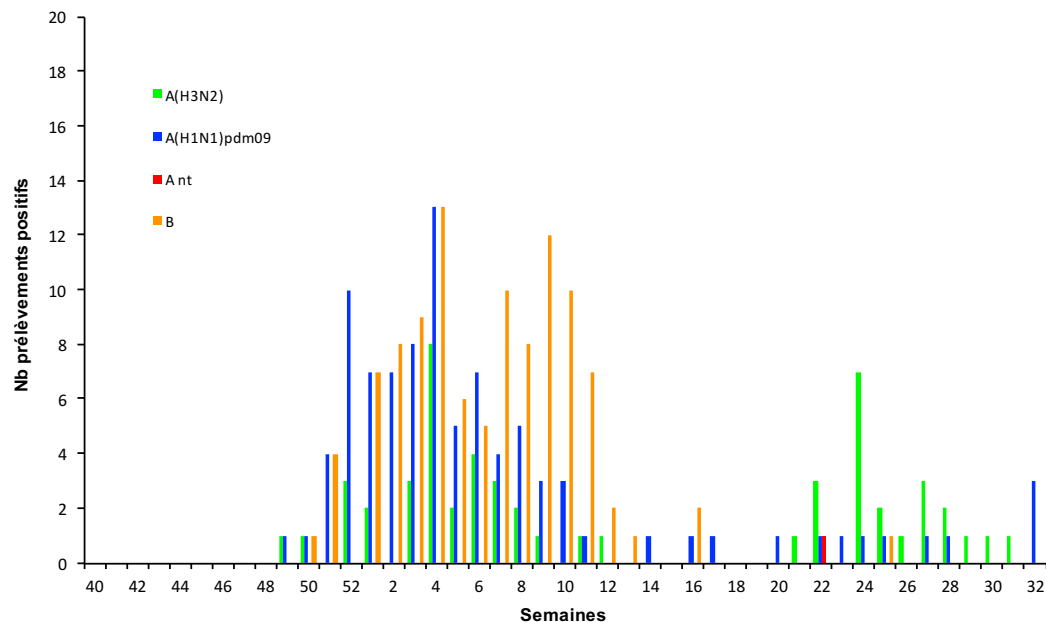


Figure 45 : Répartition des virus grippaux détectés en Guyane- CNR-IPG / saison 2017-2018

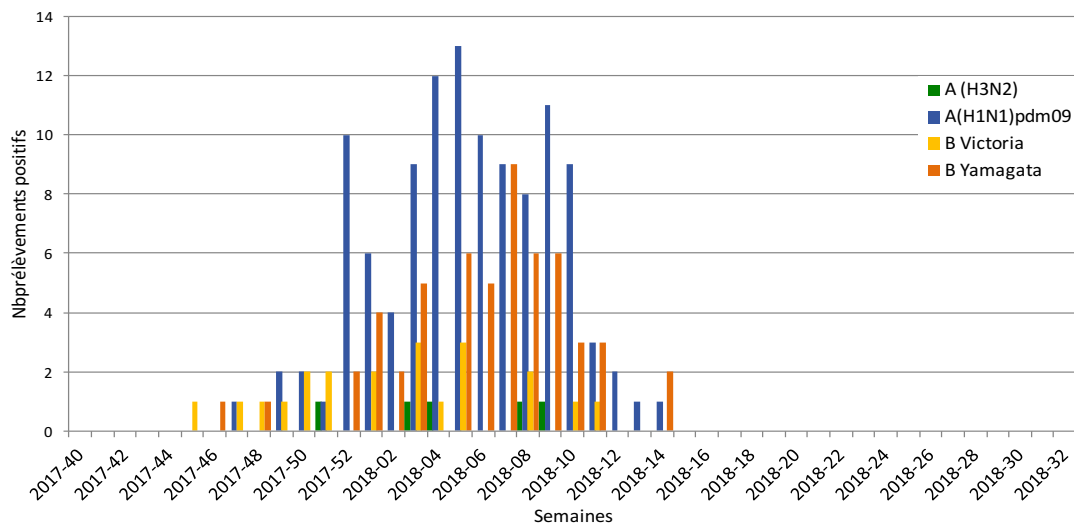


Figure 46 : Répartition des virus grippaux détectés en Martinique - CNR-IPG / saison 2017-2018

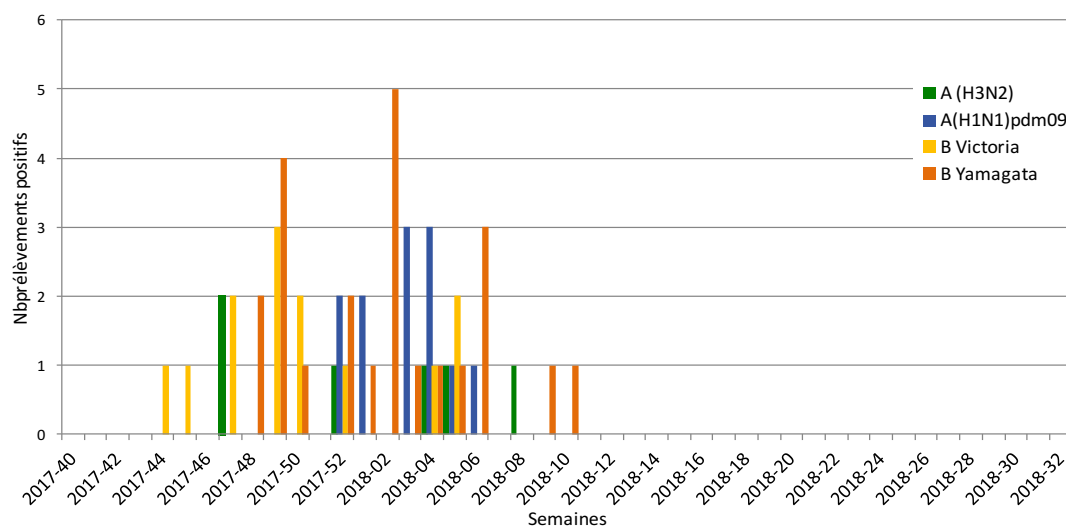


Figure 47 : Répartition des virus grippaux détectés en Guadeloupe - CNR-IPG / saison 2017-2018

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

Les résultats des caractérisations des 20 virus sélectionnés et envoyés au CDC en janvier 2018, (6 virus A(H1N1)pdm09), 7 virus A(H3N2), 2 virus de type B de lignage Victoria et 5 virus de type B de lignage Yamagata) sont disponibles. A l'exception des virus B Yamagata (non représentés dans le vaccin trivalent), tous se sont avérés antigéniquement proches des souches présentes dans le vaccin hémisphère nord 2017-2018.

Pour les virus A(H1N1)pdm09 : les 6 virus analysés appartiennent à la clade phylogénétique 6B.1 et les 5 virus qui ont pu être caractérisés antigéniquement se sont avérés être antigéniquement proches de la souche A/Michigan/45/2015.

Pour les virus A(H3N2) : les 5 virus provenant de Guyane appartiennent au clade phylogénétique 3C.2a, tandis que les 2 virus de Guadeloupe appartiennent au sous clade phylogénétique 3C.2a1. Tous sont apparentés à la souche vaccinale A/HongKong/4801/2014.

Pour les virus B Yamagata : les 5 virus testés appartiennent au clade phylogénétique Y3 et sont apparentés à la souche B/Phuket/3073/2013.

Pour les virus B Victoria : les 2 virus testés appartiennent au clade phylogénétique V1A et sont apparentés à la vaccinale B/Brisbane/60/2008.

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

Dans le cadre de la surveillance sentinelle, l'analyse de la distribution par âge montre que ce sont les patients de 15 à 64 ans qui constituent comme les saisons précédentes la majorité des patients prélevés (63.5%) tandis que le pourcentage de positivité pour la grippe le plus élevé (72.1%) est observé pour les 5-14 ans (Tableau 18).

Age	Nb prlt	Nb grippe+	% de + dans la tranche âge	% du groupe d'âge/total	% de + /total de +
0-4	65	23	35,4%	18,0%	11,3%
5-14	43	31	72,1%	11,9%	15,3%
15-64	230	139	60,4%	63,5%	68,5%
≥65	24	10	41,7%	6,6%	4,9%
Total	362	203	56,1%	100,0%	100,0%

Tableau 18 : Distribution par âge des patients – Antilles et Guyane- Surveillance sentinelle / 2017-2018

La classe d'âge des moins de 5 ans a été majoritairement touchée par les virus A(H1N1)pdm09 tandis que les autres classes d'âge ont été majoritairement touchées par les virus de type B.

Age	Nb Grippe+	Nb grippe A/H1pdm09	(%)	Nb grippe A/H3	(%)	Nb grippe A non sous typé	(%)	Nb grippe B	(%)
0-4	23	12	52,2%	2	8,7%	0	0,0%	9	39,1%
5-14	31	5	16,1%	7	22,6%	0	0,0%	19	61,3%
15-64	139	47	33,8%	16	11,5%	1	0,7%	75	54,0%
≥65	10	3	30,0%	1	10,0%	0	0,0%	6	60,0%
Total	203	67	33,0%	26	12,8%	1	0,5%	109	53,7%

Tableau 19 : Distribution par tranche d'âge et par (sous)-type viral – Antilles et Guyane Surveillance sentinelle / 2017-2018

3.2.3 Surveillance de la résistance aux antiviraux

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

3.3 Interface avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

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

3.3.1 EISN/ECDC

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

3.3.2 FluNet/OMS

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

L'OMS a accès aux données des CNR-IPP, -HCL et -IPG (par l'intermédiaire du fichier TESSy pour les CNR-IPP et -HCL). Elles permettent de contribuer à la surveillance globale de la circulation des virus grippaux.

3.3.3 Contrôle de Qualité

Virus Influenza

Comme tous les ans, les laboratoires du CNR ont participé au contrôle qualité externe "WHO External Quality Assessment Programme for the Detection of Influenza Virus Type A by PCR" (EQAP) organisé par l'OMS depuis 2007. Au cours de la saison 2017-2018, nous avons reçu un panel en mai 2018 (EQAP panel 17) de contrôles de qualité moléculaires pour la détection et le sous-typage des virus de type A (H1pdm09, H3, H5, H7 et H9) et de type B par RT-PCR. Ce panel comportait 10 échantillons d'ARN extraits correspondant à 2 virus influenza H5, un H1pdm09, un H3, 2 H7, un H9, 2 B et un échantillon négatif.

Les CNR-IPP, -HCL et IPG ont pu sous-typer correctement tous les virus. L'EQAP comportait également 3 échantillons pour détermination de la sensibilité aux antiviraux, une résistance à l'oseltamivir a été détectée, liée à la mutation H275Y sur la neuraminidase.

Les CNR-IPP et -HCL ont aussi participé au contrôle qualité externe "EISN Influenza virus Culture (EISN_INF18) EQA" organisé par la société QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics) pour le compte de l'ECDC. Le panel reçu en mars 2018 comportait 14 échantillons dont 10 destinés à évaluer les techniques de détection (q-RT-PCR et caractérisation après isolement sur cellules MDCK) et 4 autres pour détermination du profil de résistance aux antiviraux par séquençage et test phénotypique.

Le panel comportait un H1pdm09, 2 H3, 2 B-Yamagata et 2 B-Victoria et 1 échantillon négatif.

Les CNR-IPP, -HCL et -IPG ont réalisé correctement l'ensemble des analyses demandées.

Virus MERS-CoV

Les 3 laboratoires du CNR n'ont pas reçu durant la saison 2017/18 de contrôle de qualité pour la détection du MERS-CoV.

Autres virus respiratoires

Les CNR-IPP et HCL ont mis en place cette saison un accord de partenariat pour l'organisation d'un échange inter-laboratoire EIL. Cet échange, d'un panel de 10 échantillons respiratoires positifs pour un des virus suivants : VRS, rhinovirus/enterovirus et métapneumovirus, s'est déroulé en mars 2018. Tous les virus ont été correctement identifiés par les 2 CNR. Un envoi d'un 2^{ème} panel est prévu au cours du dernier trimestre 2018.

3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Aucune enquête ou étude ponctuelle concourant à la surveillance n'a été effectuée au cours de la saison 2017-2018.

4 Alerte

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

Au cours de la saison grippale 2017-2018, aucune note d'alerte n'a été diffusée. Toutefois le CNR a régulièrement fourni à SpF tout au long de la saison des informations concernant les caractéristiques antigéniques des virus grippaux de sous-type A(H1N1)pdm09 responsables de l'épidémie cette saison puis des virus grippaux de type B-Yamagata qui ne faisaient pas partie de la composition vaccinale.

De rares cas groupés ont été détectés cette saison (Tableau 20).

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

Nb patients	Nb plvts positifs	Provenance	Contexte	Virus détectés
4	4	Alsace	EHPAD	B Yamagata
3	3	Ile de France	Réanimation néonatale	A(H1N1)pdm09
2	2	Aquitaine/Agen	EHPAD	rhinoV
8	7	Aubenas	EHPAD	6 A(H3N2), 1 rhinoV
3	3	Belleville	EHPAD	rhinoV
2	2	Bourg de Péage	EHPAD	B Yamagata
9	7	Lyon	EHPAD	1 A(H3N2), 3 rhinoV, 3 PIV
14	10	St Etienne	EHPAD	8 A(H3N2), 1 rhinoV, 1 hCoV, 1 A non typé
2	2	St Galmier	EHPAD	rhinoV
4	4	Valence	EHPAD	3 B Yamagata, 1 VRS

Tableau 20 : Bilan des cas groupés analysés par le CNR-IPP et –HCL

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

EHPAD –Alsace

En mars, un épisode dans un EHPAD, 4 échantillons reçus, détection de 4 virus grippaux de type B de lignage Yamagata.

Service de réanimation néonatale – Ile de France

Transmission nosocomiale de grippe A(H1N1)pdm09 en janvier par un parent, 3 nouveaux-nés infectés.

EHPAD –Aquitaine (Nerac)

En septembre (29/09), un épisode dans un EHPAD, 2 échantillons reçus, détection de 2 Rhinovirus.

EHPAD –Rhône-Alpes

- **Aubenas** : Episode grippal le 11/12/2017 dans 3 unités d'un même établissement (TROD positif Virus Grippal A) réception de 8 échantillons. L'épisode de grippe A(H3N2) est confirmée (détection de 6 grippe A(H3N2)). Pour un échantillon la recherche de virus grippal était négative mais détection d'un rhinovirus.

- **Belleville** : En mai (24/05/2018) Signalement d'un épisode de cas groupés à Belleville, 3 échantillons testés, détection de 3 rhinovirus.
- **Bourg de Péage** : En mars (8/03/2018), épisode de cas groupés mais TROD négatif et hospitalisation d'un résident. Réception de 2 échantillons et confirmation d'un épisode grippal : détection d'un virus grippal B Yamagata pour les 2 échantillons.
- **Lyon** : Signalement d'un épisode en janvier (18-19/01/2018) 1 TROD positif grippe A mais 5 autres TROD négatifs. Réception de 9 échantillons. Détection d'un virus grippal A H3N2 et 3 Rhinovirus et 3 virus Parainfluenza.
- **St Etienne** :
 - Déclaration épisode le 19/11 (TROD positif Virus grippal A), 10 échantillons prélevés entre le 24/11 et le 4/12. L'épisode de grippe A (détecté dans 5 échantillons) est confirmé il s'agit de virus grippal A H3N2 (détecté dans 4 échantillons). Nous avons détecté une infection mixte pour 1 patient (virus grippal de type A et entéro/rhinovirus) ainsi qu'un Coronavirus humain.
 - Episode de cas groupés (2-13/12/2017) avec hospitalisation des résidents. Réception de 4 échantillons et détection de 4 virus grippaux A(H3N2).
- **Saint Galmier** : Episode de cas groupés avec TROD négatif. Réception de 2 échantillons de patients hospitalisés. Détection de 2 rhinovirus.
- **Valence** : Déclaration épisode de cas groupés avec TROD positif (Grippe B) et hospitalisation de 3 résidents. Réception de 4 échantillons et confirmation de l'épisode de grippe B Yamagata pour 3 échantillons et un VRS B pour le 4ème patient.

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

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

5.1.1 Enseignements

➤ *Pr Sylvie van der WERF*

En tant que Professeur à l'Université Paris Diderot, Paris 7, Sylvie van der WERF a dispensé les enseignements suivants en 2017-2018:

Université Paris Diderot, Paris 7

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

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

Virologie : M1-IMVI – responsable de l'UE

Cours 22 h : Virologie

M2 IMVI- responsable du Master

UE Virologie Moléculaire et Médicale – responsable de l'UE

Cours 4h30 : Virus Influenza humains ; Stratégies antivirales pour les virus des infections aiguës : ex des Orthomyxovirus

UE Virologie Fondamentale – responsable de l'UE

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

UE Séminaires bibliographiques : audition 12h

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

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

UE « Immunologie anti-virale »

Cours 1h30 : pandémies à virus respiratoires et vaccins

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

➤ *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 (Lyon I) : influenza virus (2h30),

EPIRIS (Lyon I) : épidémiologie de la grippe (2h)

Vaccinologie (Paris Est) : Flu vaccines : objectives and strategies (2h)

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

Participation aux enseignements des Diplômes Inter-Universitaire :

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

Transplantation : infections respiratoires (2h),

Chimiothérapie anti-infectieuse et vaccins : vaccins contre la grippe (2h)

Vaccinologie : vaccin contre la grippe (1h)

Médecine d'Urgence : Gestion des épidémies et pandémies

Médecine de Catastrophe : Urgences sanitaires virales

5.1.2 Formation, accueil de stagiaires

Au CNR-IPP, accueil d'un stagiaire du réseau international des Instituts Pasteur, provenant du Centre de Recherche Médicale et Sanitaire CERMES, Niamey Niger, dans le cadre de sa thèse pour une durée de deux fois 3 mois. Projet : caractérisation antigénique et génétique des virus grippaux pour améliorer la surveillance de la grippe au Niger

Au CNR-HCL, accueil d'une étudiante Cambodgienne (Bonath KA, Thèse en co-tutelle) pour la mise en place d'un système de surveillance de la grippe au Cambodge (4 mois septembre 2017 - décembre 2017), et accueil d'un étudiant EUPHEM dans le cadre du training de l'ECDC (Rolf Kramer training EPIET-EUPHEM).

5.1.3 Modalités de diffusion des données de la surveillance

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

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

Les données collectées dans le cadre du réseau RENAL font l'objet de bulletins d'information hebdomadaires pendant la période de surveillance active de la grippe (semaines 40 à 15) et mensuels tout au long de l'année, édités par le CNR. Le système de recueil de l'information par internet (logiciel Voozanoo "RENOG") sur un site sécurisé par mot de passe permet aux correspondants du réseau RENAL d'intégrer et de consulter les données de la surveillance pour chacune des grandes régions à tout moment et propose également une analyse plus complète des données en temps réel.

Afin d'optimiser la qualité des échanges et des données collectées pour la surveillance de la grippe et des autres virus respiratoires en milieu hospitalier les CNR-IPP et -HCL ont organisé une réunion de travail en mars 2018 avec les acteurs du réseau RENAL. Pour servir de support à la discussion et afin de mieux connaître les pratiques et techniques employées à l'hôpital, un questionnaire a été envoyé à l'ensemble des laboratoires hospitaliers.

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

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

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

5.2.1 Activités auprès des instances de santé nationales

5.2.1.1 Ministère de la Santé, DGS, DGAL, DGT

Membre des groupes de travail « Grippe aviaire », « antiviraux et grippe saisonnière » de la Commission spécialisée Maladies transmissibles du Haut Conseil de Santé Publique (S. van der Werf)

Audition par le groupe de travail « mesures non pharmaceutiques de lutte contre maladies transmissibles » de la Commission spécialisée Maladies transmissibles du Haut Conseil de Santé Publique (S. van der Werf)

Membre du Groupe de travail permanent « grippe-coronavirus » de la Commission spécialisée Maladies transmissibles du Haut Conseil de Santé Publique (S. van der Werf, B. Lina)

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

5.2.1.2 Santé Publique France

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

5.2.1.3 ANSES

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

5.2.1.4 COFRAC

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

5.2.1.5 Instances de santé nationales et régionales (DFA)

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

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

5.2.1.6 ANSM

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

5.2.2 Activités auprès des instances de santé internationales

5.2.2.1 EISN/ECDC

- Membre du réseau européen de surveillance de la grippe EISN (S. van der Werf, B. Lina)
- External Advisor du réseau EISN auprès de l'ECDC (B. Lina)
- Membre du RSV working group pour l'ECDC 2015-2017 (B. Lina)
- Membre du EUPHEM advisory forum pour l'ECDC (B. Lina)

5.2.2.2 OMS

- Directeur du Laboratoire de Référence de l'OMS pour le SRAS (S. van der Werf)
- Directeur du Laboratoire de Référence de l'OMS pour les virus H5 (S. van der Werf)
- Membre du PIP Framework working group (S. van der Werf - depuis 2015).

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

➤ Pr Sylvie van der WERF

- Membre du Conseil Scientifique du Groupe d'Etude et d'Information sur la Grippe (GEIG)
- Membre du European Scientific Working Group on Influenza (ESWI)
- Membre du réseau européen de surveillance de la grippe EISN
- Membre du consortium CONSIZE for the harmonization of serological studies
- Membre du consortium ISARIC
- Membre du board de ISIRV (depuis 2018) et du comité scientifique du antiviral group ISRV
- Membre de l'Association et membre du bureau du Réseau des Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe (GROG)
- Editeur Associé pour la revue Eurosurveillance

➤ Pr Bruno LINA

- Président du Conseil Scientifique du groupe de travail Groupe d'Etude et d'Information sur la Grippe (GEIG) au sein de la SFM
- Membre du Scientific Advisory Board de 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
- Co-Chair du scientific committee du Global Influenza Initiative
- Membre du comité scientifique du Global Influenza Hospital surveillance Network
- Président du Comité Scientifique d'Immuniser-Lyon
- Editeur associé de Journal of Clinical Virology

➤ Vincent ENOUF

- Evaluation des capacités techniques des laboratoires de virologie du réseau international des Instituts Pasteur, dans le cadre du projet ASIDE, financé par le CDC au Cameroun.

5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles

➤ Pr Sylvie van der Werf

- Conférence invitée :
« Retour d'expérience en dualité du programme PREDEMICS », Comité Science et Biosécurité, Académie des sciences, Paris, 14 décembre 2017
- Interviews pour la presse écrite et audiovisuelle

➤ **Pr Bruno Lina**

- Conférences invitées :

- « Vaccination des professionnels de santé contre la grippe saisonnière » Entretiens de Bichat, Paris, 6 octobre 2017
- « Evaluation du panel RP2 & Mers-CoV de Biofire » Réunion scientifique BioMérieux, Lyon, 2 Novembre 2017
- « La face cachée des virus de la grippe » Soirée Fondation HCL, Lyon, 14 novembre 2017
- « Grippe et voyages » Ecole de Santé des Armées Bron, 18 novembre 2017
- « Vaccination, mesures préventives et initiatives locales » réunion ARS AURA, Lyon, 12 décembre 2017
- « Diversité génétique et évolution des virus grippaux (saisonnier – pandémie). Points de repères, intérêt pour la surveillance. » Santé Publique France, Paris, 7 mars 2018
- « Epidémiologie récente de la grippe : le vaccin tétravalent est il la solution ? » Réunion interne de la SPLIF, Paris, 18 mai 2018
- « Point sur le grippe et la vaccination antigrippale » Académie de Médecine, Paris 12 juin 2018

- Interviews pour la presse écrite et audiovisuelle

➤ **Dr Vincent Enouf**

- Interviews pour la presse écrite et audiovisuelle

➤ **Dr Sylvie Behillil**

- Interviews pour la presse écrite et radio.

➤ **Dr Martine Valette**

- Interviews pour la presse écrite et radio.

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

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

6.1.1 CNR-IPP

Les thématiques de recherche menées actuellement au sein de l'unité de Génétique Moléculaire des Virus à ARN dirigée par Sylvie van der Werf en rapport avec l'activité du CNR-IPP sont centrées sur l'évolution génétique des virus influenza et les mécanismes qui sous-tendent cette évolution en lien avec la capacité de changement d'espèce des virus influenza ainsi que sur le décryptage des interactions virus-hôte avec pour objectifs une meilleure compréhension de la spécificité d'hôte et de la pathogénèse virale ainsi que l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Ces travaux s'inscrivent notamment dans le cadre des projets européens, FP7-PREPARE (coordinateur H. Goossens, Antwerpen, Belgique), du Labex IBEID (coordinateurs P. Cossart et P. Sansonetti, IP, Paris), du projet ANR FLUD (coordinateur G. Meyer, INRA/ENVT, Toulouse), du projet Institut Carnot Pasteur MS- F2E FluCD (coordinateur S. van der Werf) et du projet H2020 EVAg (coordinateur J-L Romette, Marseille).

➤ *Evolution génétique des virus grippaux*

Un premier volet de ces recherches a pour objectif de déterminer l'ampleur des **variations génétiques** au sein des populations virales pour des virus influenza de différents types et sous-types et selon leur origine en utilisant les approches de séquençage de nouvelle génération (NGS) (collaboration M. Vignuzzi, IP, Paris). La diversité génétique est explorée pour des isolats viraux produits sur différents substrats cellulaires représentant les différents niveaux du tractus respiratoire ou provenant de différents hôtes à différentes températures ainsi que sur des prélèvements primaires issus de l'activité du CNR. Ces travaux ont permis de montrer à partir de prélèvements primaires issus de patients des différences de diversité génétique selon les sous-types viraux (*Barbezange et al. soumis pour publication*).

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

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

Parallèlement, nous avons entrepris l'étude de l'interaction des protéines du complexe polymérase et de la NP issus de virus de différents sous-types et espèce hôte d'origine avec une sélection de protéines cellulaires impliquées dans des activités exo(ribo)nucléases et de relecture/correction, ou appartenant aux réseaux exosomes de la cellule. Des facteurs cellulaires qui interagissent avec les protéines du complexe polymérase (parfois de façon

différentielle selon l'origine des protéines virales) ont été identifiés en utilisant un essai de complémentation protéique (PCA). Pour une sélection de facteurs, nous avons entrepris la caractérisation des domaines d'interaction et l'étude de leurs implications fonctionnelles pour la réplication virale, la sensibilité aux mutagènes et la diversité des populations virales. L'identification et la caractérisation de partenaires cellulaires impliqués dans la modulation de la fidélité de la polymérase des virus influenza pourraient permettre, à long terme, d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques utilisables notamment en cas de nouvelle pandémie. (M. Declercq, Doctorante).

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

Ces données devraient permettre de mieux comprendre quels sont les éléments mis en jeu lors des événements de réassortiment entre souches virales.

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

Cette thématique menée depuis de nombreuses années au sein de l'unité a pour objectif de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les étapes de transmission inter-espèces et d'adaptation au nouvel hôte et tout particulièrement à l'homme. Ces études se focalisent plus particulièrement sur les déterminants portés par les ribonucléoprotéines (RNP) des virus influenza A et l'identification des interacteurs cellulaires et leur rôle fonctionnel dans la multiplication et la restriction d'hôte en s'intéressant aux virus influenza aviaires versus humains ainsi qu'au virus H1N1pdm09 et ses précurseurs. Ainsi, l'étude des interactions différentielles de la protéine PB2 avec le système ubiquitine protéasome ont permis de mettre en évidence une corrélation entre les signatures d'interactions et l'origine et le degré d'adaptation de PB2 à l'homme (Biquand et al. *mSphere* 2017). Des approches d'interactomique à très haut débit développées par le groupe de Y. Jacob, permettent aujourd'hui d'aborder l'étude différentielle des réseaux d'interaction des protéines virales à très large échelle (i.e. vis à vis de l'ensemble de l'ORFOME humain) et de façon comparative pour les protéines virales issues de virus influenza de différents sous-types, espèce hôte d'origine et niveau de pathogénicité. L'application à d'autres virus respiratoires tels que le VRS ou le MERS-CoV est envisagée selon l'obtention de financements. Ces travaux devraient permettre une meilleure compréhension des bases moléculaires de la pathogénèse virale et potentiellement conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

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

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

dans différents segments de la population est également prévue (V. Enouf ; S. Behillil). Par ailleurs, dans le cadre du projet FluCD (coll. M. Ducatez, INRA/ENVIT, Toulouse) nous avons entrepris d'identifier les déterminants moléculaires spécifiques de type qui gouvernent la réplication de ces virus (B. Crescenzo, Y. Rahou).

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

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

Epidémiologie

Notre expertise et les données de la surveillance sont régulièrement mises à profit pour contribuer à des études épidémiologiques. Ainsi par exemple, nous avons contribué à l'évaluation de la corrélation entre syndromes grippaux et infection invasive à pneumocoque (Domenech et al. *Am J Epidemiol*, 2018). Egalement, nous avons contribué à une étude montrant une association temporelle entre circulation des rhinovirus et infections ostéoarticulaires à *Kingella kingae* (Droz et al. *J Pediatr*. 2018).

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

Evaluation de caractéristiques génétiques ou phénotypiques particulières

L'identification dans le cadre de la surveillance de mutations en lien avec des caractéristiques phénotypiques d'intérêt (variations de la spécificité pour le récepteur, de la sensibilité aux antiviraux, de la vitalité virale, etc..) pourra faire l'objet d'analyses spécifiques faisant appel aux outils disponibles dans le cadre de la recherche (génétiq ue inverse, test de transcription/réplication transitoire, interactomique, etc..) afin de comprendre les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les variations observées. Pour ce faire, des méthodes permettant la production de virus mutés par génétique inverse à haut débit sont en cours de développement (F. Donati, B. Crescenzo).

Immunité post-vaccinale et évaluation de nouveaux antiviraux

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

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

6.1.2 CNR-HCL

Le programme de recherche de l'équipe VIRPATH du CIRI (Inserm U1111, CNRS 5308, ENS de Lyon, UCBL) dont le thème est de l'émergence au contrôle, se focalise sur la compréhension des mécanismes d'émergence et de ré-émergence, la pathogenèse et les relations hôte-pathogène lors de l'infection par les virus influenza, et le développement d'outils pour mieux comprendre l'évolution des virus et comment lutter à la fois avec de nouveaux antiviraux et de nouveaux vaccins. Les objectifs principaux de l'Unité sont complémentaires de ceux en ligne directe avec les activités de CNR. Au total, la part strictement fondamentale vise à comprendre les processus d'empaquetage et de réassortiment, à étudier les altérations du processus de biogenèse des ribosomes résultant du stress ribosomique au cours de l'infection virale ainsi que l'impact de ces modifications

sur la réplication, la synthèse des protéines virales, et le détournement des fonctions cellulaires au profit du virus, et enfin l'étude des altérations de la réponse immunitaire, en lien avec l'activation ou d'inactivation des récepteurs cellulaires. Ces différents programmes de recherche sont brièvement décrits ci-dessous. Par ailleurs, nous étudions l'évolution des virus et populations virales par des approches de métagénomique, de coévolution des protéines (balance HA-NA) et segments de gènes (réassortiment) des virus influenza, afin de faire des analyses de fitness des virus émergents.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Epidémiologie moléculaire

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

Par l'épidémiologie moléculaire en approche dite de whole genome sequencing, il est aussi possible de détecter des virus d'intérêt portant des caractéristiques génétiques observées sur les protéines (HA, NA ou autre), soit des constellations de gènes (réassortants intra-soustypiques) pouvant être associées à une virulence accrue (Simon B et al soumis).

Antiviraux : marqueurs de résistance, nouveaux produits

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

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

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

Profils de résistance chez les virus non humains

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

possible de déterminer a priori si ces substitutions sont aussi responsables de résistance (Gaymard et al, *J Antimicrob Chemother.* 2016).

Un travail est en cours afin de tester chez des représentants de l'ensemble des neuraminidases retrouvées chez des virus aviaires si la connaissance des profils génétiques de résistance aux antiviraux pour les virus humains pouvait être inférée à l'ensemble des neuraminidases des virus aviaires, en combinant une approche de génétique inverse (mutagénèse dirigée) et de tests protéiques (production de protéines purifiées en baculovirus) (Gaymard et al, *Clin Microbiol Infect.* 2016, Gaymard et al, en préparation).

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

6.2.1 Publications nationales

Equipes de surveillance de la grippe* Surveillance de la grippe en France, Saison 2017-2018, *Bull Epidémiol Hebd* ; sous presse

van der Werf S, Morfin F, Lina B. Virus de la grippe. In : *REMIC.*, sous presse

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

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

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

Equipes de surveillance de la bronchiolite (2017) Surveillance de la bronchiolite en France, saison 2016-2017 *Bull Epidémiol Hebd* ; 31 : 650-657.

Equipes de surveillance de la grippe* (2017) Surveillance de la grippe en France, Saison 2016-2017, *Bull Epidémiol Hebd* ; 22 : 466-475

6.2.2 Publications internationales

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

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

Vilcu AM, Souty C, Enouf V, Capai L, Turbelin C, Masse S, Behillil S, Valette M, Guerrisi C, Rossignol L, Blanchon T, Lina B, Hanslik T, Falchi A. (2018) Estimation of seasonal influenza vaccine effectiveness using data collected in primary care in France: comparison of the test-negative design and the screening method. *Clin Microbiol Infect.* 2018 Apr;24(4):431

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

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

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

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

Biquand E, Poirson J, Karim M, Declercq M, Malausse N, Cassonnet P, Barbezange C, Straub ML, Jones L, Munier S, Naffakh N, van der Werf S, Jacob Y, Masson M, Demeret C. (2017) [Comparative Profiling of Ubiquitin Proteasome System Interplay with Influenza A Virus PB2 Polymerase Protein Recapitulating Virus Evolution in Humans](#). *mSphere*. 2017 Nov 22;2(6). pii: e00330-17. doi: 10.1128/mSphere.00330-17.

Minodier L, Masse S, Capai L, Blanchon T, Ceccaldi PE, van der Werf S, Hanslik T, Charrel NR, Falchi A. (2017) [Risk factors for seasonal influenza virus detection in stools of patients consulting in general practice for acute respiratory infections in France, 2014-2016](#). *Influenza Other Respir Viruses*. 2017 Nov 16. doi: 10.1111/irv.12523.

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

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

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

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

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

Langevin S, Pichon M, Smith E, Morrison J, Bent Z, Green R, Baker K, Solberg O, Gillet Y, Javouhey E, Lina B, Katze M, and Josset L. (2017) Early nasopharyngeal microbial signatures are associated with severe influenza in children: a retrospective pilot study *Journal of General Virology*, 2017 98(10):2425-2437

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Participation à publication – Liste de publiants :

✓ The European Influenza Surveillance Network

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

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

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

✓ I-Move :

Rondy M, Gherasim A, Casado I, Launay O, Rizzo C, Pitigoi D, Mickiene A, Marbus SD, Machado A, Syrjänen RK, Pem-Novose I, Horvath JK, Larrauri A, Catilla J, Vanhems P, Alfonsi V, Ivanciuc AE, Kuliese M, van Gageldonk-Lafeber R, Gomez V, Ikonen N, Lovric Z, Ferenczi A, Moren A. Low 2016/17 season vaccine effectiveness against hospitalized influenza A(H2N3) among elderly: awareness warranted for 2017/18 season. Euro Surveillance, octobre 2017, 22(41)

Rondy M, Larrauri A, Casado I, Alfonsi V, Pitigoi D, Launay O, Syrjänen RK, Gefenaite G, Machado A, Vučina VV, Horváth JK, Paradowska-Stankiewicz I, Marbus SD, Gherasim A, Díaz-González JA, Rizzo C, Ivanciuc AE, Galtier F, Ikonen N, Mickiene A, Gomez V, Kurečić Filipović S, Ferenczi A, Korcinska MR, van Gageldonk-Lafeber R. 2015/16 seasonal vaccine effectiveness against hospitalisation with influenza A(H1N1)pdm09 and B among elderly people in Europe: results from the I-MOVE+ project. Euro Surveillance, juillet 2017, 22(30)

Kissling E, Rondy M. Early 2016/17 vaccine effectiveness estimates against influenza A(H3N2): I-MOVE multicentre case control studies at primary care and hospital levels in Europe. Euro Surveillance, février 2017, 22(7)

✓ The European Influenza Surveillance Network :

Broberg EK, Waris M, Johansen K, Snacken R, Penttinen . Seasonality and geographical spread of respiratory syncytial virus epidemics in 15 European countries, 2010 to 2016. Euro Surveillance, février 2017, 22(7)

6.2.3 Communications¹ nationales

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

6.2.4 Communications¹ Internationales

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

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

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

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

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

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

Kramer R., Pichon M., Houhamdi L., Gerbier-Colomban S., Forissier M.F., Pasquet-Volckmann C., Lina B, Josset L., Effect of a reinforced hospital campaign for seasonal influenza vaccination of healthcare workers 2016-2017 on nosocomial outbreaks in the University Hospital of Lyon, France. Communication orale, 6th ESWI Influenza conference, September 10th-13th 2017, Riga (Lettonie).

Langevin, Pichon M., Smith E., Morrison J., Bent Z., Green R., Baker K., Solberg O., Gillet Y., Javouhey E., Lina B, Katze MG., Josset L. Nasopharyngeal microbial signatures associated with severe influenza in children and in adults. Communication orale, 6th ESWI, Septembre 2017, Riga (Lettonie)

Gaymard A., Charles A., Sabatier M., Cortay J.C., Frobert E., Picard C., Casalegno J.S., Ferraris O., Valette M, Ottmann M., Lina B, Escuret V. Impact on antiviral resistance of E119V, I222L and R292K substitutions in influenza A viruses bearing a group 2 neuraminidase (N2, N3, N6, N7 and N9). 6th ESWI, Septembre 2017, Riga (Lettonie)

Barthelemy D., Guerre P., Pichon M., Potinet V., Jeannoël M., Huot L., Serrier H., Chidiac C., Ferry T., Lina B. Economic impact of POCT Alere™ i influenza a&b® in emergencies of hospital Lyon Croix-rousse, France. 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, April 22th-25th 2017, Vienne, Autriche.

Etievant S., Barthelemy D., Thomas M., Valette M., Gaymard A., Gillet Y., Lina B, Morfin F., Josset L., Pichon M. RSV infections during 2014 -2016 epidemics: clinical and sequencing characteristics in University Hospital of Lyon, France. 20th Annual Meeting of the European Society of Clinical Virology. September, 13th-16th 2017 Stresa, Italie.

¹ seules les présentations orales sont indiquées

6.2.5 Communications Nationales sur invitation et présidence de sessions

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

van der Werf S. Retour d'expérience en dualité du programme PREDEMICS. Présentation orale sur invitation. Comité Science et Biosécurité, Académie des sciences, 14 décembre 2017, Paris.

van der Werf S. Indications de contre-mesures non-pharmaceutiques pertinentes pour limiter la diffusion de maladies transmissibles: virus influenza et MERS-CoV. Audition CS-MIME CSP, 8 décembre 2017, Paris.

van der Werf S. Retour d'expérience en dualité du programme PREDEMICS. Présentation orale sur invitation. Congrès National de la SFM. 9-11 octobre 2017, Cité des Sciences, Paris

van der Werf S. Unit of Molecular Genetics of RNA Viruses. Présentation orale sur invitation. Journées du Département de Virologie. 18 octobre 2017, Louan-Villegruis-Fontaine.

Lina B. Compréhension : pourquoi et comment des réponses différentes vis à vis des vaccinations ? Et par extension à tout âge : L'aventure des vaccinations. Conférence sur invitation, Présentation Orale, 6^e journée annuelle de Gériatrie et de Pédiatrie « Grandeurs et servitudes immunitaires des parcours de vie », 23 mars 2018, Rilleux la Pape

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

Bouaziz J, Hees L, Valette M, Mezgueldi E, Casalegno J-S, Lina B., Gillet Y, Josset L, Pichon M. Épidémie pédiatrique de virus respiratoire 2016-2017: une saison atypique? 37^e RICAI, 18-19 Décembre 2017, Paris, France

Lina B. Virus des infections respiratoires dans la session Le réseau des CNR : quelles nouveautés en 2017. 37^e RICAI, 18-19 décembre 2017, Paris

Lina B. Vaccination, mesures preventives et initiatives locales. Invitation pour table ronde, Présentation Orale, Journée Régionale de Veille Sanitaire, 12 décembre 2017, Lyon

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

Lina B. Vaccination anti grippale. 15^e journée du Groupe Transplantation et Infection, Vaccination du patient transplanté, 12 mai 2017, Paris

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

Lina B. Eléments de réponse aux questions posées par le comité d'experts pandémie grippale de Santé Publique France. Audition, Présentation Orale, 19 décembre 2017, Paris

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6.2.6 Communications Internationales sur invitation et présidence de sessions

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

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

van der Werf S. Intrinsic and extrinsic factors for the emergence of zoonotic viruses at the animal-human interface. Invited oral presentation. 6th Eurosurveillance scientific seminar, ESCAIDE Meeting – 6 November, 2017, Stockholm, Sweden

van der Werf S. Vaccination in the extreme ages of life. Invited oral presentation and contribution to Round Table "How to develop new projects about vaccination in elderly" – 12 December, 2017, Paris

van der Werf S. Co-infections by respiratory pathogens in humans. Invited oral presentation. International Conference on Respiratory Pathogens (ICoRP) – 1-3 November 2017 - Rostock, Germany

van der Werf S. Chair Plenary session "late breakers". 6th ESWI International Conference, 10-13 September 2017, Riga, Latvia.

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

Lina B. Influenza epidemiology - insights from the 2017-2018 season, 28th ECCMID, 21-24 avril 2018, Madrid (Espagne)

Lina B. Diagnostic dilemmas in respiratory viruses: point-of-care, multiple tests, targeted molecular tests, 28th ECCMID, 21-24 avril 2018, Madrid (Espagne)

Lina B. Emerging data on acute myocardial infarction following influenza. GII roundtable meeting, 4-5 juin 2018, Paris

Lina B. Prevention of RSV: current and future options. GII roundtable meeting, 4-5 juin 2018, Paris

Lina B. Molecular diagnostic for the management of viral respiratory infections. Conférence sur invitation, Présentation Orale, Hologic Molecular Days, 29 juin 2018, Barcelone

Lina B. Bases de l'émergence virale. Conférence sur invitation, Présentation orale, 1ères Journées Internationales d'Infectiologie de l'EHS El Hadi Flici, 2-3 novembre 2017, Alger, (Algérie)

Lina B. Molecular diagnostics for the management of viral respiratory infections. Hologic Molecular Days, 29 juin 2017, Barcelone (Espagne)

Lina B. Evolution des techniques de la PCR. Les 1ères journées Médico-Chirurgicale Internationales de Batna, 25-27 mars 2017, Batna (Algérie)

Lina B. Sequencing data experience : how to develop a platform able to sequence data from the GIHSN, GIHSN Annual Meeting, 16-17 oct 2017, Barcelone (Espagne)

Lina B. Influenza in Southern and Western Europe, GII 2017 roundtable meeting, 13-14 sept, Riga (Lettonie)

6.2.7 Comité scientifique ou d'organisation de congrès ou colloques

- Rencontres sur la grippe, GEIG, Lyon, Novembre 2017 (B. Lina, S. van der Werf)
- Organisation de la session grippe du Congrès de la SFM, Paris Octobre 2017 (B Lina)
- 6th ESWI Influenza Conference, Riga, Latvia - 10-13 September **2017**(S. van der Werf, member of scientific committee)
- Preparedness, Prediction and Prevention of Emerging Zoonotic Viruses: Challenges and Opportunities, Château de Montvillargenne, Gouvieux, France - 6-7 April 2017 (S. van der Werf, co-organizer)
- Mise en place d'un « Study Group on respiratory viruses (ESGREV) » lors du meeting ESCMID de Madrid en avril 2018 (Chrysanthi Skevaki & B Lina)

7 Coopération avec les laboratoires de santé animale

Le CNR-IPP a été en relation avec le laboratoire de référence pour la grippe porcine (G Simon, ANSES, Ploufragan) pour la comparaison des séquences des virus porcins H1N1pdm01 circulant chez l'homme et dans les élevages porcins.

Le CNR-HCL a reçu des virus venant du laboratoire de référence de la Grippe porcine (G Simon, ANSES, Ploufragan) pour tester les kits diagnostic destinés à la détection des virus humains sur les virus porcins circulant actuellement (H1N1, H1N2). Par ailleurs, il a aussi testé leur sensibilité aux antiviraux.

8 Programme d'activité pour l'année 2018-2019

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

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

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

Au plan des techniques et stratégies d'analyses des prélèvements et souches virales, globalement, les activités pour les virus influenza seront poursuivies comme précédemment en tenant compte des possibles évolutions virales et seront adaptées si besoin suite à l'apparition ou l'émergence d'un nouveau virus. Pour ce qui concerne les autres virus respiratoires, l'accent sera mis en premier lieu sur la mise en place des techniques nécessaires à la caractérisation des VRS.

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

➤ Détection virale

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

Le CNR poursuivra le développement autant que de besoin des qRT-PCR pour l'ensemble des sous-types de virus influenza zoonotiques susceptibles d'infecter l'homme (ex : H10N8, H6N1, H5N8 etc..). De plus, des q(RT)-PCR éventuellement multiplex seront développées pour les autres virus respiratoires (hCoV, hPIV,...). Nous n'écarterons pas la possibilité d'utiliser des kits commerciaux. Comme par le passé, dans la mesure du possible, le CNR-IPP fournira les témoins nécessaires, notamment sous forme de transcrits synthétiques ou de plasmides et les laboratoires du CNR fourniront un appui technique aux laboratoires hospitaliers autant que de besoin. Par ailleurs, le CNR réalisera l'évaluation des performances des principales trousse de (RT)-PCR multiplex disponibles sur le marché. Cette évaluation sera assortie d'une évaluation médico-économique dans le cadre du projet RIHN piloté par le CNR-HCL. Cette évaluation dont la mise en place a été initiée avec plusieurs CHU de métropole au cours de la saison hivernale 2017-2018, sera reconduite l'année prochaine ((hiver 2018-2019) selon les résultats de l'analyse intermédiaire en cours pour déterminer si les données collectées à partir des 591 fiches remplies permettent déjà de clore l'évaluation. En parallèle, comme par le passé et selon les besoins, les techniques de détections rapides disponibles sur le marché ou en développement (TROD et tests moléculaires rapides) tant pour les virus influenza que pour les VRS seront évalués en premier lieu par le CNR-HCL afin de vérifier la stabilité de leur performance. Une synthèse de ces évaluations sera le cas échéant diffusée via le site web du CNR et leurs modalités d'utilisation communiquées conjointement avec Santé Publique France (gestion des cas en EHPAD par exemple). Ces évaluations pourront se faire à la demande de la DGS ou de SpF, conjointement avec l'ANSM si une analyse exhaustive des dispositifs commercialisés en France est demandée, puis communiquée par une publication en français (feuilles de Biologie par exemple).

➤ **Isolement viral, et identification**

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

Comme précédemment, une attention particulière sera portée aux virus A(H3N2) dont les évolutions récentes en termes d'affinité pour le récepteur ainsi que pour certains d'entre eux la capacité d'attachement au récepteur via leur neuraminidase et non pas seulement via leur hemagglutinine rendent difficile leur détection par test d'hemagglutination lors de l'isolement. Des stratégies alternatives (isolement en cellules SIAT ; détection de l'isolement par qRT-PCR, ELISA, mesure de l'activité neuraminidase) seront mises en œuvre pour pallier ces difficultés et les solutions méthodologiques seront partagées entre les 3 laboratoires du CNR.

Parallèlement, l'isolement des VRS sera mis en œuvre aux CNR-HCL et -IPG. Le CNR-IPP s'attachera à renforcer ses partenariats avec des laboratoires hospitaliers proches (e.g. Pr Elyane Gault, Ambroise Paré) qui sont en capacité de réaliser cet isolement et/ou de fournir des prélèvements frais.

Pour l'isolement viral, on s'attache à disposer d'une sélection représentative en terme spatio-temporel et on privilégiera comme précédemment l'isolement à partir des prélèvements des formes graves notamment de patients sans facteurs de risque et sans complications bactériennes (recherche de déterminants de virulence); des cas d'échec de traitement (recherche de résistances aux antiviraux) ; des cas d'échec vaccinal (variants antigéniques).

➤ **Caractérisation phénotypique des isolats**

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

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

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

➤ **Caractérisation génétique des virus**

La caractérisation génétique des virus sera poursuivie en privilégiant le séquençage direct à partir des prélèvements. L'optimisation des méthodes de séquençage haut débit et de leur analyse en lien avec la plateforme P2M de l'Institut Pasteur et la plateforme de séquençage des HCL permettant le séquençage du génome complet (8 segments) des virus influenza

quel que soit le type ou sous-type sera poursuivi. A noter que les procédures de séquençage direct sur échantillon ont été échangées entre les deux laboratoires pour optimiser et harmoniser les méthodes. Le séquençage sera réalisé directement à partir de prélèvements dont la charge virale est suffisante (en général CT autour de 32 pour virus de type A et 30 pour virus de type B) pour une sélection aléatoire représentative en terme spatio-temporel des types, sous-types et lignages de virus influenza circulants. Une part de ces analyses de séquences permettront de contribuer aux études d'efficacité vaccinale selon le groupe génétique des virus dans le cadre du projet européen iMove/iMove+. Par ailleurs, on s'attachera à réaliser en priorité le séquençage des prélèvements de cas graves (détection de mutations de virulence), d'échec thérapeutique (détection de mutations de résistance aux antiviraux), ou d'échec vaccinal (détection de mutation d'échappement à la réponse immunitaire). Afin d'améliorer l'exhaustivité de la détermination des sous-types ou lignages des virus détectés dans les formes sévères rapportées par les laboratoires du réseau RENAL, un circuit de recueil des échantillons sera mis en place en lien avec SpF en cohérence avec la modification de la surveillance des formes graves qui ne visera plus à l'exhaustivité mais s'appuiera sur une sélection représentative de services de réanimation. Les optimisations méthodologiques auront pour objectif d'abaisser encore le seuil de charge virale à partir duquel un séquençage génome entier de qualité peut être obtenu directement à partir des prélèvements positifs pour un virus grippal. On s'assurera également de la performance de la méthodologie quel que soit le sous-type et l'origine des virus influenza A afin d'être en capacité de l'appliquer en cas d'émergence d'un nouveau virus aviaire ou porcin au potentiel zoonotique. De plus, l'adaptation des méthodes d'analyse sera poursuivie pour une meilleure prise en compte de la diversité des populations virales, y compris des variants minoritaires, pour le suivi de l'évolution virale dans le cadre de la surveillance ou l'investigation de foyers épidémiques.

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

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

➤ **Analyses sérologiques**

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

La possibilité de développement de méthodologies haut débit moins consommatrices de sérum continueront d'être explorées par l'utilisation de virus recombinants exprimant un rapporteur fluorescent (CNR-IPP) ou par l'emploi de techniques d'agglutination de particules de latex porteuses de la HA et la NA (CNR-HCL).

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

➤ Activités de surveillance

Dans le cadre de la collaboration avec le réseau Sentinelles, les laboratoires CNR-IPP et CNR-HCL poursuivront l'adaptation de leurs bases de données, systèmes d'extraction et circuits de communication de données. Comme pour les saisons précédentes, afin de s'assurer d'un apport suffisant de prélèvements en temps réel indispensable pour le suivi en temps réel des évolutions génétiques et antigéniques des virus circulant et la détection précoce de nouveaux virus ou variants, les laboratoires CNR-IPP et CNR-HCL prendront en charge les prélèvements pour l'ensemble des régions en métropole à l'exception de la Corse. En lien avec SFP, et les responsables du réseau Sentinelles, les CNR-IPP et -HCL s'impliqueront adapter les modalités du recueil de données et de prélèvements pour une meilleure surveillance des VRS (et d'autres virus respiratoires) avec une éventuelle mise en place d'une surveillance pendant l'intersaison selon les moyens disponibles, pour assurer une meilleure représentativité pour la tranche d'âge de plus de 65 ans dans la surveillance communautaire et également pour renforcer la surveillance dans les EPHAD.

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

Un effort particulier sera poursuivi en direction des laboratoires hospitaliers du réseau RENAL afin d'assurer la qualité du recueil des données virologiques, notamment afin de permettre leur inclusion dans les analyses régionales en temps réel. Comme précédemment, les CNR-IPP et HCL veilleront tout particulièrement à se procurer les prélèvements ou souches virales détectées comme positives pour les virus grippaux avant et après la période de circulation épidémique, c'est à dire à un moment où la surveillance communautaire est moins sensible du fait de l'utilisation d'une définition de cas restrictive. Les efforts seront également poursuivis pour améliorer le recueil des données cliniques associées aux prélèvements ou souches en provenance des hôpitaux ainsi que pour les données de sous-typage des virus A(H3N2). Une nouvelle réunion d'échange avec l'ensemble des laboratoires du réseau RENAL sera organisée comme la saison précédente. Par ailleurs, les efforts pour développer un sous-réseau plus spécifiquement en charge de l'isolement des VRS seront poursuivis.

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

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

Par ailleurs, l'adaptation des outils informatiques de recueil de données microbiologiques et sérologiques auprès des correspondants du réseau RENAL par Internet (logiciel Voozanoo développé par Epiconcept) sera poursuivie afin de prendre en compte les évolutions du système de surveillance. Le système de recueil unique RENOG pour l'ensemble des laboratoires participants continuera de servir de base pour l'édition des différents bulletins ainsi que pour la transmission des données hebdomadaires à l'attention des autorités de santé nationales et internationales.

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

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

➤ **Démarche Qualité**

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

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

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

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

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

Annexes

2018

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

**Saison
2017-2018**

Sommaire

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

1 Annexe 1 : missions et objectifs

1.1 Missions du CNR et de ses laboratoires associés

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

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

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

Par ailleurs, dans le contexte de risque pandémique lié à la survenue de cas d'infection zoonotique tels que l'infection par des virus grippaux aviaires A(H5Nx), A(H7N9) ou porcins A(H3N2)v, les laboratoires du CNR effectuent l'analyse virologique des prélèvements en cas de suspicion de grippe zoonotique. Le cas échéant, en cas de diagnostic positif de virus de grippe zoonotique, ils ont en charge d'en réaliser l'isolement et de caractériser la souche virale en cause.

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

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

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

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

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

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

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

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

1. Expertise

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

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

2. Conseil

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

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

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

4. Contribution à l'alerte

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

1.2 Organisation du CNR et de ses laboratoires associés

➤ CNR-IPP

Nom	Prénom	Fonction	Qualification	Organisme payeur	ETP CNR Virus Influenzae
van der WERF	Sylvie	Responsable	Professeur; PhD	IP, Paris	0,05
ENOUF	Vincent	Responsable adjoint	PhD	IP, Paris	0,80
BEHILLIL	Sylvie	Responsable adjoint	Pharm	IP, Paris	1,0
BARBET	Marion	Technicien supérieur		IP, Paris	1,0
BRUN	Solenne	Technicien supérieur		IP, Paris	1,0
LAZZERINI	Marie	Technicien supérieur		IP, Paris	1,0
ALBERT	Mélanie	Technicien supérieur		IP, Paris	0,5
DONATI	Flora	Ingénieure		IP, Paris	
POSTE	Isabelle	Assistante		IP, Paris	0,4

➤ **CNR-HCL**

Nom	Prénom	Fonction	Qualification	Organisme payeur	ETP CNR Virus Influenzae
LINA	Bruno	Responsable PU-PH	Med; PhD	HCL & UCBL	0,25
VALETTE	Martine	Responsable adjoint Praticien attaché	Pharm; PhD	HCL	0,8
BOUSCAMBERT	Maude	Praticien hospitalier	Pharm; PhD	HCL	0,1
ESCURET	Vanessa	MCU-PH	Pharm; PhD	HCL & UCBL	0,1
BURFIN	Gwendolyne	Technicien titulaire		HCL	0,8
FANGET	Rémi	Technicien titulaire		HCL	0,8
SOCRATOUS	Clio	Technicien contractuel		HCL & Contrat privé	0,8
OMBOODOI-LAFAYE	Nomin	Technicien contractuel/8 mois		HCL (contrat recherche)	1
SERVAIS	Marie-Claire	Secrétaire médicale		HCL	0,4

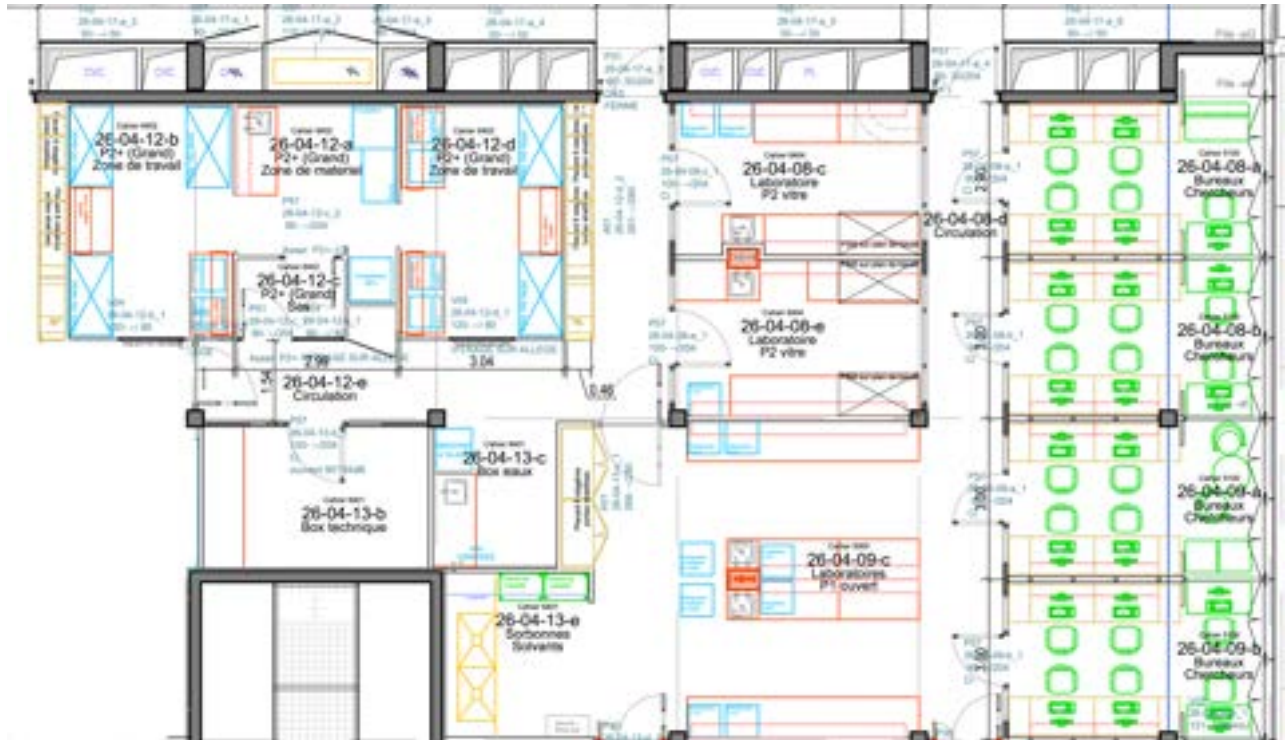
➤ **CNR-IPG**

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

1.3 Locaux et équipements

➤ CNR-IPP

Centre François Jacob / étage 4



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

LSB2+ : 26-04-12

Réception échantillons : 26-04-08c

Culture cellulaire : 26-04-08e

Biologie moléculaire : 26-04-09c

Stockage matériel : 26-04-13b

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

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

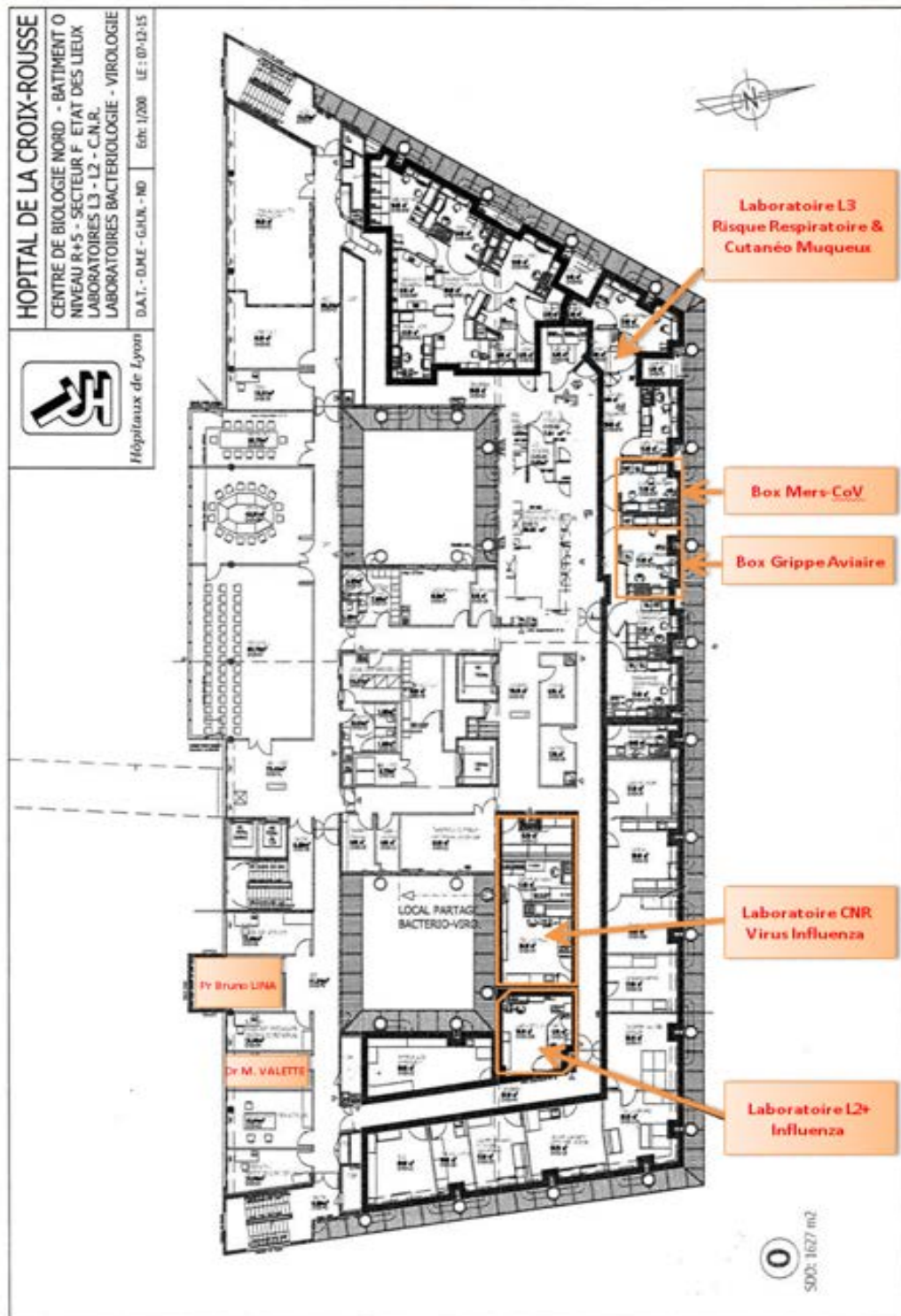
Les principaux équipements utilisés par le CNR-IPP sont les suivants :

Qtité	Désignation	Utilisation
10	POSTE de SECURITE MICROBIOLOGIQUE	partagés
8	POMPE A VIDE	partagées
2	MICROCENTRIFUGEUSE	partagées
5	CENTRIFUGEUSE REFRIGEREE	partagées
9	RERIGERATEUR +4°C	partagées
3	RERIGERATEUR/CONGEL	
10	CONGELATEUR -20°C	partagés
8	CONGELATEUR -80°C	partagés
2	CONTAINER D'AZOTE LIQUIDE	
5	INCUBATEUR A CO2	partagés
1	LECTEUR DE MICROPLAQUES	partagés
1	LAVEUR DE MICROPLAQUES	partagés
1	INCUBATEUR SANS CO2	
2	THERMOMIX	
13	AGITATEUR DE TUBES - VORTEX	partagés
2	MICROSCOPE INVERSES	partagés
3	BALANCE STANDARD	
4	BAIN-MARIE	partagés
2	THERMOCYCLEUR PCR CONVENTIONNELLE	partagés
2	LIGHT CYCLER 480 (plaque 96)	partagés
1	PYROSEQUENCEUR	Commun CIBU/CNR
2	CUVE ET GENERATEUR POUR ELECTROPHORESE	
1	SYSTEME DE DOCUMENTATION DE GEL	partagé
2	COUVEUSES RETOURNEMENT AUTO	partagées
1	LYOPHILISATEUR	partagé
2	AUTOCLAVE	
1	FLUORIMETRE	partagé
1	MICROSCOPE A FLUORESCENCE	partagé
1	ACCÈS PLATEFORME P2M*	partagé
3	BAINS SECS	partagés
1	HOTTE ASPIRANTE	

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

➤ **CNR-HCL**

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



Liste des principaux équipements utilisés par le CNR-HCL :

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

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

Equipements Cultures

Qtité	Désignation	Utilisation
1	POSTE de SECURITE MICROBIOLOGIQUE	Commun labo Viro
1	INCUBATEUR TISSUS	Commun labo Viro
1	INCUBATEUR A CO2	Commun labo Viro
1	RERIGERATEUR/CONGEL	Commun labo Viro
1	MICROSCOPE INVERSÉ	
1	COMPTEUR DE CELLULES	

Equipements Biologie Moléculaire

Qtité	Désignation	Utilisation
1	EXTRACTEUR (EasyMag)	Commun labo Viro
1	POSTE de SECURITE MICROBIOLOGIQUE	Commun labo Viro
1	HOTTE	Commun labo Viro
1	MICROCENTRIFUGEUSE	Commun labo Viro
1	RERIGERATEUR/CONGEL	Commun labo Viro
1	RERIGERATEUR	Commun labo Viro
1	CONGELATEUR -20°C	Commun labo Viro
2	THERMOCYCLEURS	Commun labo Viro
1	EXTRACTEUR	Commun labo Viro
2	THERMOCYCLEURS ABI	
2	THERMOCYCLEURS EPPENDORF	
1	CENTRIFUGEUSE DE PLAQUES PCR	
1	CENTRIFUGEUSE DE PAILLASSE	
2	VORTEX	

➤ CNR-IPG

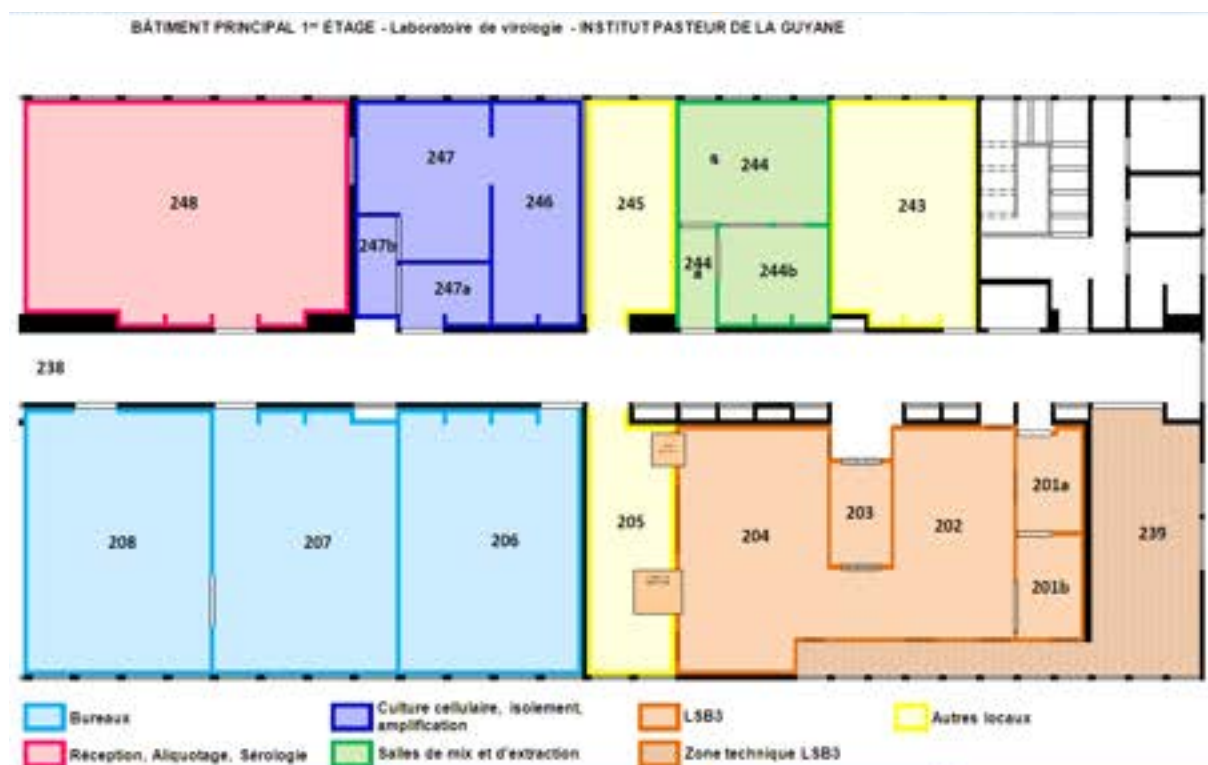
Le laboratoire de virologie dispose d'une surface de 310 m² (plan annexe 43).

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

- une salle (pièce 248) où sont réalisées la réception et l'aliquotage des échantillons (35 m²). Ce local est équipé d'un PSM, d'une centrifugeuse réfrigérée, d'un bain-marie, d'un incubateur, d'agitateurs magnétiques, d'un pH-mètre, d'une balance de précision, d'un congélateur -20°C, d'un laveur de plaques, d'un lecteur de plaques, d'un réfrigérateur, d'une machine à glace et d'une hotte chimique.
- un laboratoire LSB2 (pièces 247 et 246) dédié à l'entretien des cultures cellulaires, à l'isolement des virus de classe 2 (25 m²). Ce laboratoire est équipé de deux PSM, d'une centrifugeuse réfrigérée, de 3 incubateurs (28°C, 37°C et 37°C atmosphère 5% CO₂) et d'un microscope inversé.
- un laboratoire LSB2 dédié aux activités de biologie moléculaire de 20 m² comprenant une pièce pour la préparation des mix réactionnels (pièce 244b) et une pièce pour l'extraction des ARN (pièce 244). Cet espace est équipé d'un PSM pour la préparation des mix, d'une centrifugeuse réfrigérée haute vitesse, de deux micro-centrifugeuses, de deux congélateurs -20°C, de deux réfrigérateurs, d'une hotte à UV utilisée pour le dépôt des ARN et d'un bloc chauffant.
- le nouveau laboratoire LSB3 de 70 m². Il est équipé de 2 PSM, d'un congélateur -80°C, d'un incubateur à CO₂, d'une centrifugeuse et d'un microscope.

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

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



Plan général du laboratoire de virologie

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

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

1.4 Collections de matériel biologique

➤ Collections de Prélèvements et Souches virales

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

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

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

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

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

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

Une collection d'isolats primaires et de prélèvements positifs de virus influenza aviaires associés aux données de collecte (date, lieu et espèce) est également disponible (CNR-IPP). Des virus porcins des différents sous-types (H1N1, H1N2 et H3N2) et correspondant aux lignages Nord-Américain et Eurasiatique ainsi que des isolats de virus porcins français sont également disponibles (CNR-IPP, CNR-HCL).

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

➤ Collections de Sérums

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

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

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

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

➤ Conditions de stockage

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

Conditions de mise à disposition des collections

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

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

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

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

L'accès aux souches, aux prélèvements biologiques et données associées collectées dans le cadre de l'activité du CNR-IPP est conditionné par la mise en place de documents contractuels

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

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

Différents points essentiels sont appréhendés dans ces accords :

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

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

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

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

1.5 Démarche qualité du laboratoire

➤ CNR-IPP

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

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

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

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

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

12 CNR et la CIBU du LREMS sont accrédités COFRAC selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588. L'annexe d'accréditation est disponible sur le site du COFRAC www.cofrac.fr

Les 2 autres CNR ont déposé leur demande d'extension le 1^{er} avril 2016. Leur audit d'extension s'est déroulé du 23 au 25 janvier 2018 et la confiance des évaluateurs a été accordée à ces CNR. Les conclusions officielles de l'évaluation doivent être communiquées au LREMS et publiées sur le site du COFRAC prochainement.

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

La saison 2017-2018 qualité du CNR-IPP s'est organisée comme suit :

Etapes clés LRE-MS	Périodes de réalisation
Audit de surveillance ET d'extension	23-25 janvier 2018
Revue qualité	11 avril 2018
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d'extension	16 mai 2018
Audits internes qualité et technique	8 septembre et 4 octobre 2017
Finalisation des dossiers de validation de méthode pour les extensions et les ajouts	PCR VRS en cours de finalisation

Perspectives 2019 :

Etapes clés	Prévision de réalisation
Revue qualité LRE	janvier - avril 2019
Audits internes qualité et technique	octobre 2018
Revue de direction LRE-MS	mai 2019
Portée d'accréditation complète	octobre 2020

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

➤ CNR-HCL

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

Le LBMMS est accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 – 2012 (ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013) pour les disciplines de BIOCHIMIE, HEMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE, MICROBIOLOGIE (dont VIROLOGIE), GENETIQUE ET BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION (numéro 8-3442 rev-7 / disponible sur le site du COFRAC www.cofrac.fr)

L'institut des agents infectieux est accrédité pour ses activités de sérologies infectieuses (Parasitologie-Mycologie et Bactériologie) et de biologie moléculaire (Virologie). L'accréditation du LBMMS a été reconduite après l'audit de suivi de juin 2018.

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

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

- **inspections ANSM (13-15 mai 2008, 2-4 juin 2014, 4-5 novembre puis 7-8 décembre 2015 et 9 février 2018)**
- **audits qualité selon les GMP's ([Good Manufacturing Practices] Bonnes pratiques de fabrication (*directives européennes 2001/83/CE du 6/11/2001 et 2003/94/EC du 08/10/2003 et directives américaines FDA / Code Fédéral et de Régulation 21CFR parts 210 et 211*) organisés par les sociétés producteurs de vaccins dont nous sommes sous-traitants (en 2007, 2010, 2012 et 2014)**
- **audits internes (4, 20 avril 2016 et un audit prévu dernier trimestre 2018)**

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

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

Les dossiers de validation de méthodes sont en cours mais les différents moyens de maîtrise du pré-analytique, de la traçabilité et des processus analytiques sont en place au CNR.

➤ **CNR-IPG**

Le laboratoire de virologie qui héberge le CNR-IPG, est accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 et les règles d'application du COFRAC sous le numéro 8-3373 depuis novembre 2014 pour la version 2007 et depuis novembre 2015 pour la version 2012 de cette norme (sous famille concernée : sérologie infectieuse / portée A). Le maintien de cette accréditation a été obtenue en août 2017.

Une demande d'extension du périmètre d'accréditation a été déposée en septembre 2017 pour la sous-famille : VIROH pour les techniques de détection moléculaire : « détection et identification des virus influenza de type A et de type B chez l'homme »

La saison 2017-2018 qualité du CNR s'est organisée comme suit :

Etapes clés	Périodes de réalisation
Dépôt de demande d'extension : Détection et identification des virus influenza de type A et B	26 septembre 2017
Revue qualité du laboratoire de virologie	15 janvier 2018
Revue de direction de l'IPG	26 janvier 2018
Participation à l'EQAP OMS (Panel 17)	mai 2018
Audits internes qualité et technique	25-31 mai 2018
Audit COFRAC de renouvellement et d'évaluation de l'extension demandée.	09-10 juillet 2018

Perspectives 2019 :

Etapes clés	Prévision de réalisation
Finalisation des dossiers de validation de méthode pour les extensions et les ajouts	PCR VRS : 1 ^{er} semestre 2019
Revue qualité et revue de direction	janvier 2019
Audits internes qualité et technique	1 ^{er} trimestre 2019
Portée d'accréditation complète	octobre 2020

2 Annexe 2 : capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

2.1.1 Techniques de détection

Depuis la saison 2009-2010, la stratégie d'analyse prévoit en première intention la détection moléculaire des virus de grippe A et B dans les prélèvements primaires. En complément, la détection des VRS, hMPV et HRV est réalisée en routine sur les prélèvements communautaires.

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

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

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

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

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

➤ Non commerciales

- qRT-PCR ciblant le gène M pour la détection des virus influenza de type A
- qRT-PCR ciblant les gènes HA ou NA pour la détection des virus influenza de type B
- qRT-PCR[§] 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 (CNR-IPP & IPG)

- qRT-PCR ciblant le gène de la polymérase pour la détection des VRS B (CNR-IPP, -HCL & -IPG)
- qRT-PCR ciblant le gène N pour la détection des hMPV (CNR-IPP)
- qRT-PCR ciblant la région 5' non-codante du génome pour la détection des rhinovirus
- qRT-PCR ciblant le gène POL (2 régions distinctes) pour la détection du SARS-CoV, CNR-IPP
- qRT-PCR ciblant le gène N pour la détection du SARS-CoV, CNR-IPP
- qRT-PCR ciblant le gène UpE pour la détection du MERS-CoV (Corman *et al.* 2012)
- qRT-PCR ciblant le gène ORF1a pour la détection du MERS-CoV (Corman *et al.* 2012)
- qRT-PCR ciblant le gène ORF1b pour la détection du MERS-CoV (Corman *et al.* 2012)
- RT-PCR conventionnelle générique ciblant le gène POL pour la détection des coronavirus (CNR-IPP[§] & -HCL)
- qRT-PCR ciblant le gène POL pour la détection du SARS-CoV (CNR-IPP[§])
- RT-PCR conventionnelle pour la détection des agent bactériens dits « atypiques » *mycoplasma pneumoniae* et *chlamydia pneumoniae* (CNR-IPP[§])
- qPCR ciblant le gène NP1 pour la détection des Bocavirus humains (CNR-IPP[§])
- PCR conventionnelle pour la détection des adénovirus (CNR-IPP[§])

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

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

➤ **PCR ciblant des gènes de ménage**

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

➤ **Techniques accréditées par le CNR**

Les techniques accréditées actuellement sont les suivantes :

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

➤ **Techniques de RT-PCR commerciales**

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

Transcrits synthétiques ou plasmides quantifiés contrôles

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

- qRT-PCR ciblant le gène M pour la détection des virus influenza de type A
- qRT-PCR ciblant le gène NS pour la détection des virus influenza de type C
- qRT-PCR ciblant le gène N1
- qRT-PCR ciblant le gène H1pdm09
- qRT-PCR ciblant le gène H5 (clade 1 / taille <500 pb)
- qRT-PCR ciblant le gène H10 du virus aviaire H10N8

- qRT-PCR ciblant le gène N8 du virus aviaire H10N8
- qRT-PCR ciblant le gène H5 du virus aviaire H5N8
- qRT-PCR ciblant le gène N8 du virus aviaire H5N8
- qRT-PCR ciblant le gène N9 du virus aviaire H7N9
- qRT-PCR ciblant le gène H7 du virus aviaire H7N9
- qRT-PCR ciblant le gène POL du SARS-CoV
- qRT-PCR ciblant le gène N du SARS-CoV
- qRT-PCR ciblant le gène UpE du MERS-CoV (transcrit non MOT)
- qRT-PCR ciblant le gène ORF1a du MERS-CoV (transcrit non MOT)
- qRT-PCR ciblant le gène ORF1b du MERS-CoV
- qPCR ciblant le gène NP1 des Bocavirus humains
- qRT-PCR ciblant la GAPDH

2.1.1.2 Autres techniques de détection

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

2.1.2 Techniques d'isolement

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

2.1.3 Techniques d'identification

- inhibition d'hémagglutination (IHA)
- microneutralisation

2.1.4 Caractérisation génétique des virus influenza

2.1.4.1 Techniques de détection de polymorphismes génétiques

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

2.1.4.2 Techniques de séquençage

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

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

Le CNR-HCL a développé le séquençage haut débit (NGS). La stratégie initialement adoptée au CNR-HCL est maintenue afin de sélectionner d'une part des échantillons de la surveillance représentatifs de l'épidémie (répartition géographique, début, pic & fin de l'épidémie) pour lesquels le séquençage porte essentiellement sur le gène de l'hémagglutinine. D'autre part, un autre échantillonnage est réalisé pour les échantillons de patients hospitalisés (cas graves, réanimation), pour les excréctions prolongées, pour des situations particulières (cas groupés EHPAD ...) le séquençage porte alors sur les 8 segments.

2.1.5 Techniques sérologiques

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

2.1.6 Caractérisation phénotypique des virus grippaux

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

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

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

3 Annexe 3 : autres informations

Cf document joint.