

Épidémie de grippe A(H1N1)2009 en France : les paramètres virologiques

Dominique Rousset¹, Maude Bouscambert-Duchamp², Vincent Enouf¹, Martine Valette², Isidore Grog³, Valérie Caro⁴, Sylvie van der Werf¹, Bruno Lina² (bruno.lina@univ-lyon1.fr)

1/ Institut Pasteur, Centre national de référence des virus *influenza* (Région Nord), Unité de génétique moléculaire des virus à ARN, Paris, France

2/ Centre national de référence des virus *influenza* (Région Sud), Hospices civils de Lyon, GHE, Bron, France

3/ Coordination nationale des Grog, Open Rome, Paris, France

4/ Institut Pasteur, Plateforme de génotypage des pathogènes de santé publique, PF8, Paris, France

Résumé / Abstract

La surveillance de la grippe par les Centres nationaux de référence des virus *influenza* (CNR) a répondu à différents objectifs en fonction du contexte épidémiologique. Dans un premier temps, les CNR ont mis en place les outils diagnostiques adaptés et mobilisé les réseaux. Puis, lorsque les prémices de la vague épidémique sont apparues, ils ont adapté leur réponse et leur organisation afin de permettre une analyse la plus exhaustive possible des virus et des échantillons à analyser. Enfin, il a fallu assurer aussi la surveillance virologique des facteurs d'adaptation, des facteurs de virulence et de l'émergence de résistance aux antiviraux, ceci en temps réel.

Au total, au cours de cette vague épidémique qui a mobilisé des outils et des moyens à un niveau largement supérieur à ce qui se passe au cours d'une épidémie saisonnière classique, il a été analysé 103 352 prélèvements par le Réseau des laboratoires « grippe A », le Réseau national des laboratoires (Renal) et le réseau des Groupes régionaux d'observation de la grippe (Grog). Un total de 24 279 positifs ont été détectés sur la période de mai 2009 à février 2010, avec un taux de positivité hebdomadaire variant de 0 à 43 %. La vague épidémique a été observée de la semaine 43 à la semaine 52/2009, et le pic de détection des virus A(H1N1)2009 a été noté en semaine 48, avec 3 877 cas documentés. Les analyses phylogénétiques n'ont pas montré l'apparition de variants génétiques ; de rares mutants avec un possible facteur de virulence ont été détectés chez des patients présentant des formes sévères.

Influenza A(H1N1)2009 epidemic in France: virological parameters

Influenza surveillance by National Reference Centres (NRC) aimed at fulfilling several objectives according to the epidemiological situation. Initially, NRCs set up the virological diagnostic with appropriate tools and adapted techniques, and mobilized the support from networks. During the first epidemic wave, they adapted their response and organization to enable the most possible exhaustive analysis of viruses and samples. Then, virological surveillance of the virus adaptation process, virulence factors and the emergence of antiviral resistance had to be carried out in real-time.

The human resources and virological diagnostic tools involved in this outbreak greatly exceed the classical seasonal epidemic surveillance, and altogether 103,352 samples have been tested by either the 'Grippe A', the RENAL or the GROG networks. From May 2009 to February 2010, 24,279 positives were detected with a weekly positive rate varying from 0 to 43%. The epidemic wave was observed between week 43 to week 52/2009; the peak of influenza A(H1N1)2009 detection was noticed on week 48 with 3,877 documented cases. Phylogenetic analyses of the viruses did not show any emerging genetic variant, but rare mutants with possible virulence factors were detected among patients presenting with severe illness.

Mots clés / Keywords

Grippe, virus A(H1N1)2009, pandémie, surveillance virologique / *Influenza, A(H1N1)2009 virus, pandemic, virological surveillance*

Introduction

L'émergence du virus A(H1N1)2009 au Mexique au mois de mars, rapidement caractérisé par l'OMS comme un virus réassortant de sous-type H1N1 [1], a été suivie de son introduction rapide en Europe dès fin avril 2009. Le premier cas importé en France a été détecté le 1^{er} mai en région parisienne. La dynamique de l'épidémie a été marquée par différentes phases de circulation du virus. Dans un premier temps, tous les cas étaient des cas d'importation, et leur prise en charge purement hospitalière. À la fin du mois de mai, l'hospitalisation n'était plus systématique et des chaînes de transmission communautaires ont été documentées. En juin, les premiers cas groupés sont apparus, notamment dans des écoles. Des cas sporadiques et des cas groupés ont continué à survenir pendant l'été. C'est en juillet que la surveillance de la circulation du virus, *via* le réseau des Groupes régionaux d'observation de la grippe (Grog), a été mise en place. Le début de la vague épidémique a été observé en octobre [2].

Matériel et méthodes

Période pré-épidémique : mise en place du réseau de laboratoires « Grippe A » et évaluation des tests diagnostiques

Début mai, les Centres nationaux de référence des virus *influenza* (CNR) ont développé trois techniques de RT-PCR permettant la détection rapide et sensible de tous les sous-types de virus *influenza* A (RT-PCR M) [3] et l'identification spécifique du variant A(H1N1)2009 (RT-PCRs H1pdm et N1pdm spécifiques). Durant cette première période, ces techniques ont été proposées aux 32 laboratoires de virologie (26 en métropole et six outre-mer) constituant le Réseau « Grippe A » habilités pour la réalisation des tests moléculaires ; le virus était alors classé agent pathogène de classe 3 (note de la Direction générale de la santé du 8 mai 2009, annexe 3). Dans le même temps, un groupe de sept laboratoires hospitaliers appartenant à ce réseau a évalué la sensibilité et la spécificité des tests de

diagnostic rapides (TDR) et des tests moléculaires disponibles pour la détection du virus A(H1N1)2009. Les résultats de cette évaluation, montrant les limites des TDR, ont été présentés en juin à l'ensemble des laboratoires. L'évaluation des kits de RT-PCR, terminée en septembre, a montré que la plupart avaient une bonne sensibilité pour la détection du nouveau variant.

Lorsque le virus a été déclassé en agent pathogène de classe 2+, le réseau a été élargi aux laboratoires hospitaliers de virologie disposant des techniques de RT-PCR (réseau Renal et réseau Grog).

Analyses conduites sur les souches et prélèvements reçus

Les CNR et les laboratoires des réseaux Grippe A, Renal et Grog ont réalisé un nombre important d'analyses par RT-PCR en temps réel, en utilisant les techniques proposées par les CNR, les *Centers for Disease Control and Prevention* (USA) ou des kits commerciaux, souvent sept jours sur sept. Les CNR ont réalisé l'analyse moléculaire des gènes de

l'hémagglutinine (HA) et de la neuraminidase (NA) des souches isolées sur toute la période, des tests de sensibilité aux antiviraux ainsi que le suivi des mutations d'adaptation des souches circulantes.

Résultats

Contexte épidémiologique

En septembre 2009, la recrudescence des consultations pour syndrome grippal observée lors de la rentrée des classes coïncidait avec un faible taux d'infections A(H1N1)2009 documentées. Cette recrudescence était due à la circulation d'autres virus respiratoires, notamment des rhinovirus [4]. Le début de l'épidémie a été observé en octobre 2009, où il a été noté une intense circulation du virus en Île-de-France, deux semaines avant sa diffusion dans le reste du pays. Ce décalage est resté constant durant toute l'épidémie. Des formes sévères ont été enregistrées rapidement, avec des patients présentant des durées d'excrétion virale prolongées. Les formes graves observées au début étaient majoritairement des formes purement virales, sans surinfection bactérienne. Cette surveillance des formes graves a été coordonnée par l'InVS tout au long de l'épidémie.

Bilan virologique et analyses virologiques complémentaires

Au total, entre la semaine 30/2009 et la semaine 10/2010, 103 352 prélèvements ont été analysés. Il a été détecté 24 279 positifs tous réseaux confondus, le taux de positivité hebdomadaire allant de 0% à 43% (figure 1). Le pic de détection des virus A(H1N1)2009 a été observé en semaine 48 (505 positifs Grog et 3 372 Renal). La fin de l'épidémie a été enregistrée fin décembre. Des virus ont encore été isolés en janvier et en février 2010 et des cas exceptionnels ont été détectés jusqu'en avril.

En parallèle, quelques virus saisonniers ont été détectés et caractérisés : 9 A(H1N1), 61 A(H3N2) et 8 B. Les virus A(H3N2) ont tous présenté un profil qui les apparente aux virus du lignage Perth (souche A/Perth/16/2009), lignage introduit dans la composition vaccinale 2010-2011.

Études phylogénétiques des isolats cliniques

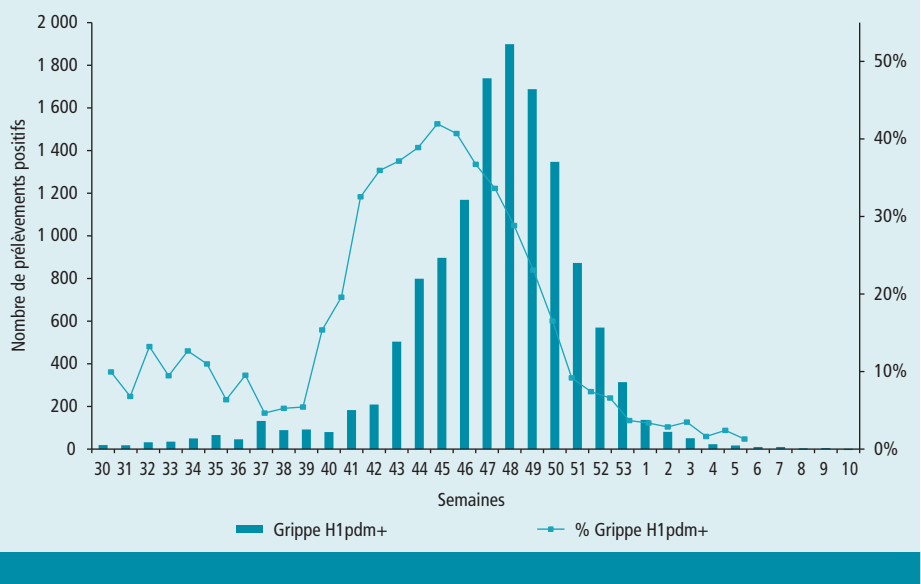
La caractérisation antigénique et phylogénétique¹ des souches ayant circulé de mai à février en France a confirmé la stabilité des virus A(H1N1)2009, à l'image de ce que rapporte l'OMS [5].

Analyses complémentaires de l'hémagglutinine

Des formes sévères associées à une mutation D222G sur HA1 ont été rapportées en novembre 2009 [6]. Théoriquement, cette mutation pourrait entraîner une modification de tropisme viral contribuant à la sévérité de la maladie en favorisant une atteinte du tractus respiratoire inférieur [7]. L'impact exact de cette mutation sur la virulence des souches reste encore discuté.

¹ Les figures représentant les analyses phylogénétiques des séquences nucléotidiques du gène H1 et du gène N1 des virus A(H1N1)2009 pandémiques sont téléchargeables à l'adresse : http://www.invs.sante.fr/beh/2010/24_25_26/analyses_phylogenetiques_ah1n1.pdf.

Figure 1 Évolution du nombre et du pourcentage de prélèvements positifs entre les semaines 30/2009 et 10/2010 parmi les prélèvements des réseaux Grog et Renal / *Figure 1 Trends in the numbers and percentage of positive samples between weeks 30/2009 and 10/2010 among the RENAL and GROG samples*



Par séquençage des virus et/ou pyroséquençage directement sur prélèvements primaires chez 597 patients, dont 129 cas graves (hospitalisés en réanimation ou soins intensifs) et 464 non graves (182 patients Grog et 282 patients hospitalisés non graves), il a été détecté 8 cas avec mutations D222G, uniquement chez des cas graves (6 sont décédés et 2 ont dû être placés sous assistance cardio-respiratoire (oxygénation par membrane extracorporelle - ECMO). Aucune transmission n'a été documentée. Un polymorphisme D222E a été observé dans près de 15% des cas en France, comme dans d'autres pays.

Résistance aux antiviraux et analyses complémentaires de la neuraminidase

Ces analyses ont confirmé la sensibilité des virus A(H1N1) aux inhibiteurs de la neuraminidase (oseltamivir, zanamivir et peramivir) et leur résistance aux inhibiteurs de la protéine M2 (amantadine et rimantadine) du fait de la mutation S31N du gène M2 [8]. Du fait de l'utilisation large de l'oseltamivir, les CNR ont surveillé l'émergence de résistances au moyen de tests génotypiques (pyroséquençage ciblé et/ou RT-PCR spécifique H275Y [9] et/ou séquençage de la neuraminidase) et phénotypiques (méthode fluorimétrique) [10]. Au total, sur les virus isolés de 1983 patients, seuls 11 ont présenté une résistance à l'oseltamivir et au peramivir associée à la mutation H275Y. Pour 10 d'entre eux il s'agissait de patients immunodéprimés (immunosuppression pour greffe d'organe ou pathologie hématologique) traités par de l'oseltamivir, un seul était un patient Grog pour lequel il n'y avait pas de notion de traitement antiviral.

Les tests phénotypiques réalisés sur 314 souches virales (175 hospitalières et 139 Grog) ont confirmé l'absence de résistance, à l'exception des mutants H275Y. Les IC50 à l'oseltamivir des souches sensibles sont de 1,5 nM contre 400 nM pour les souches H275Y résistantes (haut niveau de résistance).

Nous avons observé chez un patient immunodéprimé, ayant développé une mutation H275Y sous oseltamivir et ayant reçu un traitement alternatif de 10 jours de zanamivir, l'apparition d'une résistance au zanamivir (IC50 zanamivir multipliée par un facteur >20) associée à une mutation I223R. Un cas similaire a été observé aux Pays-Bas. Des analyses complémentaires sont en cours.

Discussion et conclusion

Au total, durant l'hiver 2009-2010, les activités de surveillance de la grippe ont atteint des niveaux historiques. Cette surveillance étroite a été possible grâce aux réseaux de surveillance de la grippe (Renal et Grog) qui ont fait preuve d'une excellente réactivité. Pour une grande partie des laboratoires de virologie en France, le diagnostic a reposé sur des techniques moléculaires, améliorant significativement la rapidité de la réponse apportée au clinicien et donc la prise en charge des patients. Le suivi de l'évolution antigénique et du niveau de sensibilité aux antiviraux des virus circulants nécessite toutefois le maintien de l'isolement sur cellules des souches virales. L'observation des cas de résistance aux inhibiteurs de la neuraminidase chez les sujets immunodéprimés confirme qu'il existe un risque particulier, et que leur prise en charge thérapeutique doit être étroitement suivie. À cette fin, une part importante des patients ayant présenté des formes graves ou des patients immunodéprimés hospitalisés ont eu une analyse complète des souches virales responsables de leur infection (isolement, séquençage, sensibilité aux antiviraux), l'objectif étant d'optimiser leur prise en charge.

Remerciements

Aux laboratoires du réseau Grippe A et Renal : Aix-en-Provence : Dr E. Lagier ; Anney : Dr B.Chanzay ; Bordeaux : Pr H. Fleury ; Chambéry : Dr D. Raffenot ; Clermont-Ferrand : Pr H. Peigue-Lafeuille ; Grenoble : Pr J.-M. Seigneurin ; Limoges ; Pr F. Denis ; Lyon : Pr B. Lina, Pr P. André ; Marseille : Pr D. Raoult ; Montpellier : Pr Van De Perre ; Nice : Pr V. Giordanengo ; Poitiers : Pr G. Agius ; Saint-Etienne : Pr B. Pozzetto ;

Toulouse : Pr J. Izopet. Hôpitaux Militaires de Bordeaux, Lyon, Marseille, Toulon. Île-de-France : Ambroise Paré : Dr E. Gault ; Avicenne : Dr P. Denis ; Bécélère : Pr J-C. Nicolas ; Bichat : Pr F. Brun-Vezinet ; Kremlin-Bicêtre : Pr P. Nordmann ; Henri Mondor : Pr C.-J. Soussy ; Versailles : Dr M. Harzic ; Necker : Dr M. Leruez-Ville ; Paul Brousse : Pr E. Dussaix ; Pitié-Salpêtrière : Pr H. Agut ; Robert Debré : Dr E. Bingen ; Saint-Louis : Pr F. Simon ; Saint-Vincent de Paul : Pr F. Rozenberg ; Trousseau : Pr A. Garbarg-Chenon ; Pontoise : Dr M. Thibault ; Poissy : Dr V. Serazin. Strasbourg : Pr F. Stoll-Keller, Dijon : Pr Pierre Pothier ; Reims : Pr L. Andreoletti ; Nancy : Pr V. Venard ; Besançon : Pr J.-C. Plantier, Angers : Pr D. Hober ; Amiens : Pr G. Duverlie et Pr F. Eb ; Caen : Pr Astrid Vabret ; Brest : Pr M.-C. Legrand-Quillien ; Rennes : Pr R. Colimon ; Orléans : Dr M. Mace ; Tours : Dr C. Gaudy-Graffin, Rouen : Pr J.-C. Plantier, Angers – Dr H. Le Guillou-Guillemette ; Nantes : Dr M. Coste-Burel. Hôpitaux Militaires : HIA Val de Grâce : Dr E. Nicand ; HIA Begin : Dr A. Merens ; HIA Legouest : Dr Y. Robert, HIA Clermont-Tonnerre – Dr P. Le Guen.

Aux médecins Vigies et aux coordinations régionales des Groupements d'observation de la grippe (Grog)

Références

- [1] Munier S, Moisy D, Marc D, Naffakh N. Interspecies transmission, adaptation to humans and pathogenicity of animal influenza viruses. *Pathol Biol.* 2010;58(2):e59-68.
- [2] Vaux S, Brouard C, Fuhrman C, Turbelin C, Cohen JM, Valette M, *et al.* Dynamique et impact de l'épidémie A(H1N1)2009 en France métropolitaine, 2009-2010. *Bull Epidemiol Hebd.* 2010;24-25-26; 259-63.
- [3] Duchamp MB, Casalegno JS, Gillet Y, Frobert E, Bernard E, Escuret V, *et al.* Pandemic A(H1N1)2009 influenza virus detection by real time RT-PCR: is viral quantification useful? *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(4):317-21.
- [4] Casalegno JS, Ottmann M, Duchamp MB, Escuret V, Billaud G, Frobert E, *et al.* Rhinoviruses delayed the circulation of the pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus in France. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(4):326-9.
- [5] World Health Organization. Pandemic (H1N1)2009. Weekly virological surveillance update. Update 99. 2010. Disponible à : http://www.who.int/csr/disease/swineflu/laboratory07_05_2010/en/index.html
- [6] Kilander A, Rykkvin R, Dudman SG, Hungnes O. Observed association between the HA1 mutation D222G

in the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus and severe clinical outcome, Norway 2009-2010. *Euro Surveill.* 2010;15(9):pii=19498. Disponible à : <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19498>

[7] Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawakami Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 2006;440(7083):435-6.

[8] Pielak RM, Schnell JR, Chou JJ. Mechanism of drug inhibition and drug resistance of influenza A M2 channel. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(18):7379-84. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(27):11425.

[9] Carr MJ, Sayre N, Duffy M, Connell J, Hall WW. Rapid molecular detection of the H275Y oseltamivir resistance gene mutation in circulating influenza A (H1N1) viruses. *J Virol Methods.* 2008;153(2):257-62.

[10] Ferraris O, Kessler N, Lina B. Sensitivity of influenza viruses to zanamivir and oseltamivir: a study performed on viruses circulating in France prior to the introduction of neuraminidase inhibitors in clinical practice. *Antiviral Res.* 2005;68(1):43-8.

Surveillance syndromique dans le cadre de la pandémie grippale A(H1N1)2009 : intérêts et limites

Loïc Josseran¹ (l.josseran@invs.sante.fr), Nadège Caillère¹, Nicolas Goncalves¹, Dominique Ringard², Christophe Leroy³, Nelly Fournet¹, Anne Fouillet¹, Marie-Christine Delmas¹, Danièle Illef¹

1/ Institut de veille sanitaire, Saint-Maurice, France

2/ SOS Médecins France, Paris, France

3/ Service des urgences, Hôpital Louis Mourier, AP-HP, Colombes, France

Résumé / Abstract

Introduction – La surveillance sanitaire de la grippe constitue un enjeu majeur de santé publique car son impact sur la population peut être important. En France, cette surveillance est fondée sur le Réseau Sentinelles, le Grog et les Centres nationaux de référence dédiés à la grippe. Par ailleurs, l'Institut de veille sanitaire (InVS) déploie depuis 2004 un réseau de surveillance syndromique fondé sur les services d'urgences, SOS Médecins et les données de décès, avec l'objectif d'une surveillance sanitaire permanente, sensible et non spécifique. Cet article décrit les limites et intérêts d'un tel système pendant la surveillance de l'épidémie de grippe A(H1N1)2009.

Méthode – Les données individuelles sont enregistrées à partir des 250 services d'urgences, 55 associations SOS Médecins et 1000 bureaux d'état-civil informatisés composant le système de surveillance syndromique Sursaud[®] entre 2008 et 2010. Une description de la dynamique de l'épidémie et une analyse par classes d'âge ont été réalisées pour les deux premières sources. La surveillance de la mortalité s'est effectuée à partir du nombre hebdomadaire de décès pour 100 000 habitants.

Résultats – L'analyse des données de grippe à partir du système Sursaud[®] a permis de suivre parfaitement l'évolution de l'épidémie. Son impact sur la population est visible entre les semaines 35 de 2009 et 01 de 2010 à partir de l'activité des urgences ou de SOS Médecins, avec des classes d'âge jeunes plus souvent touchées ; l'impact sur la mortalité reste très limité.

Discussion – La description de l'épidémie de grippe à partir des données de surveillance syndromique est conforme à celle obtenue par les autres réseaux de surveillance. L'évolution par classes d'âge est également conforme à ce qui a été observé au niveau international. La surveillance syndromique s'avère être d'un apport nouveau dans la surveillance de la grippe, grâce à la production de résultats sur l'âge des patients et leur positionnement géographique, ainsi qu'à la réactivité de cette méthode.

Syndromic surveillance in the context of the A(H1N1)2009 pandemic: interest and limits

Introduction – Influenza surveillance is a major public health threat due to its possible heavy impact among population. In France this surveillance is based on the Sentinelles Network, the Grog and National Reference Centers dedicated to influenza virus. Moreover, since 2004, the French National Institute for Public Health is building a national syndromic surveillance system based on emergency wards, SOS Médecins, and city hall for mortality data. This article describes interests and limits of such a system in the context of the A(H1N1)2009 pandemic influenza.

Methods – Individual data are recorded from 250 ED, 55 SOS Médecins associations, and 1,000 city halls (from 2008 to March 2010). All of them are included in the syndromic surveillance system called Sursaud[®]. A description of the outbreak kinetics and an analysis by age groups were conducted for the first two data sources. The monitoring of mortality was based on the weekly number of deaths/100,000 inhabitants.

Results – The monitoring of the outbreak was possible on the basis of data produced by the Sursaud[®] syndromic surveillance system. The influenza pandemic outbreak impact is visible between week 35 of 2009 and week 01 of 2010 based on the ED and SOS Médecins activities. Mortality remained in the expected values.

Discussion – The description of the influenza outbreak in 2009 using syndromic surveillance data from Sursaud[®] is consistent with descriptions made by other surveillance systems in France and with international results. Syndromic surveillance brings new aspects of influenza public health surveillance: monitoring by age groups, spatial analysis and reactivity.

Mots clés / Keywords

Surveillance syndromique, grippe, pandémie, A(H1N1)2009 / *Syndromic surveillance, influenza, pandemic, A(H1N1)2009*