



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE DE LORRAINE
2012**

FACULTE DE PHARMACIE

**MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 9 octobre 2012

par Joséphine DORIN

née le 12 octobre 1984 à Strasbourg (67)

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE**

Etude épidémiologique des infections respiratoires virales des
hivers 2009 à 2012 en milieu hospitalier et apport des nouvelles
technologies au diagnostic viral

Membres du Jury

Président : Pr Chantal FINANCE, PU-PH, Université de Lorraine, CHU Nancy

Juges : Pr Alain GERARD, PU-PH, Université de Lorraine, CHU Nancy
Dr Véronique VENARD, MCU-PH, Université de Lorraine, CHU Nancy
Dr Sibylle BEVILACQUA, PH, CHU Nancy

UNIVERSITE DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2011-2012

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Président de la Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Président de la Commission Prospective Facultaire

Jean-Yves JOUZEAU

Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle

Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS :

Francine KEDZIEREWICZ

Responsable de la filière Officine :

Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD,
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement
Pharmaceutique Hospitalier :**

Jean-Michel SIMON

Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :

Bertrand RIHN

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE
Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON
Gérard SIEST
Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY
Pierre DIXNEUF
Marie-Madeleine GALTEAU
Thérèse GIRARD
Maurice HOFFMANN
Michel JACQUE
Lucien LALLOZ
Pierre LECTARD
Vincent LOPPINET
Marcel MIRJOLET
François MORTIER
Maurice PIERFITTE
Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT
Gérald CATAU
Jean-Claude CHEVIN
Jocelyne COLLOMB
Bernard DANGIEN
Marie-Claude FUZELLIER
Françoise HINZELIN
Marie-Hélène LIVERTOUX
Bernard MIGNOT
Jean-Louis MONAL
Dominique NOTTER
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANT HONORAIRE

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ ✕	82	Thérapie cellulaire
Chantal FINANCE	82	Virologie, Immunologie
Jean-Yves JOUZEAU	80	Bioanalyse du médicament
Jean-Louis MERLIN ✕	82	Biologie cellulaire
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Jean-Claude BLOCK	87	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Max HENRY	87	Botanique, Mycologie
Pierre LABRUDE	86	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Pierre LEROY	85	Chimie physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	32	Chimie organique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Nathalie THILLY	81	Santé publique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Mariette BEAUD	87	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie

ENSEIGNANTS (suite)**Section CNU*****Discipline d'enseignement**

Raphaël DUVAL	87	Microbiologie
Béatrice FAIVRE	87	Hématologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Caroline GAUCHER-DI STASIO	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Frédéric JORAND	87	Santé publique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie
Blandine MOREAU	86	Pharmacognosie
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Francine PAULUS	85	Informatique
Christine PERDICAKIS	86	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV ☞	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT ☞	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIUO	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

☞ En attente de nomination

**Discipline du Conseil National des Universités :*

80ème et 85ème : Sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81ème et 86ème : Sciences du médicament et des autres produits de santé

82ème et 87ème : Sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32ème : Chimie organique, minérale, industrielle

11ème : Langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

Serment des Apothicaires

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX
OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

Remerciements

A notre président du jury,

Madame le Professeur Chantal FINANCE,

*Vous me faites l'honneur d'accepter la
présidence de ce jury.*

*Veillez trouver ici l'expression de ma
reconnaissance et de mon profond respect.*

A nos directeurs de thèse,

Madame le Docteur Véronique VENARD,

*Vous avez accepté de diriger ce travail
avec attention et rigueur.*

*Vos conseils avisés, vos connaissances
et votre disponibilité m'ont été d'un grand secours.*

*Soyez assurée de ma profonde
reconnaissance.*

Madame le Docteur Sibylle BELIVACQUA,

*Je vous suis reconnaissante de l'intérêt
et du soutien que vous avez porté
à ce travail.*

*Soyez assurée de ma gratitude
et de mon profond respect.*

A notre juge,

Monsieur le Professeur Alain GERARD,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail.

*Veillez trouver ici le témoignage
de mon très grand respect et l'expression
de mes sincères remerciements.*

Je tiens également à remercier,

Mademoiselle le Docteur Axelle PAQUIN,

*Tu m'as encouragée et habilement guidée
et conseillée dans la rédaction
de ce manuscrit.*

Sois-en vivement remerciée.

**Et tous les techniciens, secrétaires, ingénieurs et biologistes
des laboratoires de biologie médicale,**

*Pour votre accueil, votre gentillesse, vos connaissances et
votre patience tout au long des stages que j'ai entrepris. Merci
de m'avoir transmis votre savoir et de m'avoir fait entrer dans
le monde de la biologie.*

A ma petite mamy,

Tu as été ma plus fidèle confidente, ton rire, ton humour, ta générosité et ton amour resteront à jamais gravés dans mon cœur.

Tu as fait de moi la femme épanouie que je suis aujourd'hui et je t'en serai éternellement reconnaissante.

Mes plus douces pensées montent vers toi.

Merci pour tout.

A ma maman,

Merci pour ton soutien tout au long de mon cursus et d'avoir toujours cru en moi.

Que ce travail soit l'expression de mon affection et de mon estime pour toi.

A Laurent,

Merci d'être entré dans ma vie et de l'avoir changée. Ton soutien et ton amour m'ont été précieux dans l'élaboration de ce travail. Et merci d'être toujours là pour moi.

A ma sœur Léa,

Merci d'être toi et de me faire rire.

**A toute ma famille, papa, mon frère Tobias, tata Virginie,
mes cousins Thomas, Adrien, Rodrigo et la petite Lulu,
mes grands-parents, mes oncles et tantes,**

*Merci pour l'affection dont vous m'avez entourée depuis ma
plus tendre enfance.*

*Vous avez toujours été d'un grand soutien dans les joies
comme dans les peines.*

**A mes co-internes Anne-Lise, Claire, Laure, Amélie,
Catherine, Anthony, Carole et tous les autres,**

Merci pour ces bons moments passés ensemble depuis 4 ans.

A mes meilleures amies Adeline, Jennifer et Sylvina,

*Merci d'avoir toujours répondu présentes et de continuer cette
belle amitié malgré nos routes qui se sont éloignées au fil des
années.*

A tous les autres chers à mon cœur.

Table des matières

LISTE DES TABLEAUX.....	- 5 -
LISTE DES FIGURES.....	- 6 -
LISTE DES ABRÉVIATIONS	- 8 -
INTRODUCTION.....	- 10 -
PARTIE 1 : LES INFECTIONS RESPIRATOIRES ET LES VIRUS IMPLIQUÉS	- 11 -
1. LES INFECTIONS RESPIRATOIRES BACTÉRIENNES	- 11 -
1.1. GÉNÉRALITÉS.....	- 11 -
1.2. PNEUMOPATHIE AIGÜE.....	- 12 -
1.2.1. Définitions	- 12 -
1.2.2. Diagnostic.....	- 12 -
1.2.2.1. Aspects cliniques	- 13 -
1.2.2.2. Aspects radiologiques	- 14 -
1.2.2.3. Aspects étiologiques	- 14 -
1.2.2.4. Aspects microbiologiques.....	- 15 -
1.2.3. Orientation des patients.....	- 16 -
1.2.4. Traitement.....	- 18 -
1.3. BRONCHO-PNEUMOPATHIE CHRONIQUE OBSTRUCTIVE	- 19 -
2. LES INFECTIONS RESPIRATOIRES VIRALES.....	- 21 -
2.1. GÉNÉRALITÉS.....	- 21 -
2.2. VIRUS INFLUENZA	- 23 -
2.2.1. Agent causal	- 23 -
2.2.1.1. Structure virale.....	- 23 -
2.2.1.2. Variation antigénique.....	- 26 -
2.2.1.2.1. Dérive	- 26 -
2.2.1.2.2. Cassure	- 27 -
2.2.1.3. Ecologie des virus influenza	- 28 -
2.2.1.4. Particularités du virus H1N1 pandémique	- 29 -
2.2.2. Epidémiologie.....	- 31 -
2.2.2.1. Grippe saisonnière : virus influenza A(H1N1) et A(H3N2)	- 32 -
2.2.2.2. Grippe porcine pandémique : virus influenza A(H1N1)2009.....	- 32 -
2.2.3. Clinique : la grippe.....	- 34 -
2.2.4. Diagnostic biologique.....	- 35 -

2.2.5.	<i>Prophylaxie et traitement</i>	- 35 -
2.2.5.1.	Traitement prophylactique et vaccination.....	- 35 -
2.2.5.2.	Traitement curatif.....	- 37 -
2.3.	<i>PARAMYXOVIRIDAE</i>	- 38 -
2.3.1.	<i>Virus respiratoire syncytial</i>	- 38 -
2.3.1.1.	Agent causal.....	- 38 -
2.3.1.2.	Epidémiologie.....	- 39 -
2.3.1.3.	Clinique : la bronchiolite	- 39 -
2.3.1.4.	Diagnostic biologique et traitements	- 40 -
2.3.2.	<i>Métapneumovirus humain</i>	- 40 -
2.3.2.1.	Agent causal.....	- 40 -
2.3.2.2.	Epidémiologie.....	- 40 -
2.3.2.3.	Clinique.....	- 41 -
2.3.2.4.	Diagnostic biologique et traitements	- 41 -
2.3.3.	<i>Para-influenza virus</i>	- 41 -
2.3.3.1.	Agent causal.....	- 41 -
2.3.3.2.	Clinique.....	- 42 -
2.3.3.3.	Epidémiologie.....	- 42 -
2.3.3.4.	Diagnostic biologique et traitements	- 42 -
2.4.	AUTRES VIRUS RESPIRATOIRES	- 46 -
2.4.1.	<i>Coronavirus</i>	- 46 -
2.4.1.1.	Agent causal.....	- 46 -
2.4.1.2.	Epidémiologie.....	- 46 -
2.4.1.3.	Clinique.....	- 47 -
2.4.1.4.	Diagnostic biologique et traitements	- 47 -
2.4.2.	<i>Adénovirus, bocavirus et Picornaviridae</i>	- 47 -
PARTIE 2 : LES PRÉLÈVEMENTS ET LES MÉTHODES DIAGNOSTIQUES....		- 48 -
1. LES PRÉLÈVEMENTS		- 48 -
2. LES MÉTHODES DIAGNOSTIQUES		- 50 -
2.1.	MÉTHODES CONVENTIONNELLES.....	- 50 -
2.1.1.	<i>Culture cellulaire</i>	- 50 -
2.1.2.	<i>Test de détection rapide</i>	- 50 -
2.1.3.	<i>Immunofluorescence</i>	- 52 -
2.2.	BIOLOGIE MOLÉCULAIRE	- 52 -
2.2.1.	<i>Extraction</i>	- 54 -
2.2.2.	<i>PCR ou RT-PCR en temps réel</i>	- 54 -
2.2.3.	<i>PCR ou RT-PCR multiplex</i>	- 55 -
2.2.3.1.	Technique Seeplex®.....	- 56 -

2.2.3.2.	Luminex	- 58 -
2.2.3.2.1.	Principe.....	- 59 -
2.2.3.2.1.1.	Microsphères	- 59 -
2.2.3.2.1.2.	Automate Luminex ²⁰⁰	- 59 -
2.2.3.2.2.	Applications en virologie.....	- 60 -
2.2.3.2.3.	Caractéristiques	- 60 -
2.2.3.2.4.	Evaluation de la technologie Luminex sur les virus respiratoires par rapport aux autres techniques diagnostiques.....	- 61 -
PARTIE 3 :	TRAVAIL EXPÉRIMENTAL	- 64 -
1.	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	- 64 -
1.1.	POPULATIONS ÉTUDIÉES	- 64 -
1.1.1.	<i>Etudes épidémiologiques rétrospectives nancéiennes de 2009 à 2011</i>	<i>- 64 -</i>
1.1.2.	<i>Etude épidémiologique prospective nancéienne de la période hivernale 2011/2012..</i>	<i>- 65 -</i>
1.2.	ECHANTILLONS	- 67 -
1.3.	TECHNIQUES.....	- 68 -
1.3.1.	<i>Extraction</i>	<i>- 68 -</i>
1.3.2.	<i>Panel RT-PCR grippe A/B.....</i>	<i>- 69 -</i>
1.3.3.	<i>Panel RT-PCR grippe A/H1N1.....</i>	<i>- 70 -</i>
1.3.4.	<i>Luminex</i>	<i>- 70 -</i>
2.	RÉSULTATS.....	- 72 -
2.1.	ETUDES COMPARATIVES RÉTROSPECTIVES DES 2 PÉRIODES HIVERNALES 2009/2010 ET 2010/2011	- 72 -
2.1.1.	<i>Techniques utilisées.....</i>	<i>- 72 -</i>
2.1.2.	<i>Types d'échantillons.....</i>	<i>- 72 -</i>
2.1.3.	<i>Patients étudiés.....</i>	<i>- 73 -</i>
2.1.3.1.	<i>Période hivernale 2009/2010</i>	<i>- 73 -</i>
2.1.3.2.	<i>Période hivernale 2010/2011</i>	<i>- 73 -</i>
2.1.4.	<i>Services cliniques</i>	<i>- 75 -</i>
2.1.4.1.	<i>Période hivernale 2009/2010</i>	<i>- 75 -</i>
2.1.4.2.	<i>Période hivernale 2010/2011</i>	<i>- 76 -</i>
2.1.5.	<i>Epidémiologie du virus influenza A(H1N1)2009.....</i>	<i>- 78 -</i>
2.1.5.1.	<i>Période hivernale 2009/2010</i>	<i>- 78 -</i>
2.1.5.2.	<i>Période hivernale 2010/2011</i>	<i>- 78 -</i>
2.2.	ETUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE PROSPECTIVE DE LA PÉRIODE HIVERNALE 2011/2012.....	- 79 -
2.2.1.	<i>Techniques utilisées.....</i>	<i>- 79 -</i>
2.2.2.	<i>Types d'échantillons.....</i>	<i>- 80 -</i>
2.2.3.	<i>Patients ayant bénéficié d'une recherche des virus respiratoires par technique Luminex.....</i>	<i>- 80 -</i>

2.2.4. Services cliniques	- 83 -
2.2.5. Epidémiologie.....	- 83 -
3. DISCUSSION	- 84 -
3.1. COMPARAISON DE L'ÉPIDÉMIOLOGIE DU VIRUS INFLUENZA A(H1N1)2009 AU COURS DES HIVERS NANCÉIENS DE 2009 À 2011.....	- 84 -
3.1.1. Populations étudiées.....	- 84 -
3.1.2. Services cliniques	- 85 -
3.1.3. Epidémiologie.....	- 86 -
3.2. COMPARAISON AVEC LES DONNÉES NATIONALES DE L'INVS	- 86 -
3.2.1. Période hivernale 2009/2010	- 86 -
3.2.2. Période hivernale 2010/2011	- 88 -
3.3. ETUDE PROSPECTIVE DES VIRUS INFLUENZA ET DES AUTRES VIRUS RESPIRATOIRES AU COURS DE L'HIVER 2011/2012.....	- 90 -
3.3.1. Populations étudiées.....	- 90 -
3.3.2. Services cliniques	- 90 -
3.3.3. Epidémiologie.....	- 90 -
3.3.4. Techniques : sensibilité, spécificité, temps technique.....	- 92 -
3.3.5. Coût	- 92 -
3.4. APPORT DES NOUVELLES TECHNOLOGIES AU LABORATOIRE DE VIROLOGIE DU CHU DE NANCY..	- 93 -
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	- 94 -
BIBLIOGRAPHIE	- 96 -

Liste des tableaux

Tableau I : Les différentes formes cliniques des pneumonies.....	- 13 -
Tableau II : Etiologies selon les catégories de patients.....	- 14 -
Tableau III : Stratégie diagnostique microbiologique des pneumopathies aiguës	- 16 -
Tableau IV : Score CRB-65	- 18 -
Tableau V : Stratégie thérapeutique des pneumopathies infectieuses.....	- 19 -
Tableau VI : Les stades des BPCO	- 20 -
Tableau VII : Principaux agents étiologiques dans les infections pulmonaires basses	- 21 -
Tableau VIII : Eléments distinctifs des pneumonies virales et bactériennes.....	- 22 -
Tableau IX : Fonctions des protéines des virus influenza.....	- 24 -
Tableau X : La cassure et la dérive antigéniques des virus influenza	- 27 -
Tableau XI : Hôtes naturels des virus de la grippe A.....	- 28 -
Tableau XII : Semaines de franchissement du seuil épidémique défini par le Réseau des GROG France, octobre 1992 – avril 2011	- 31 -
Tableau XIII : Groupes de population ayant un accès prioritaire à la vaccination H1N1 pandémique (ordre de priorité cotée de 1 à 5).....	- 36 -
Tableau XIV : Tableau récapitulatif de l'ensemble des virus respiratoires	- 43 -
Tableau XV : Kits utilisés au laboratoire de virologie du CHU de Nancy Brabois pour les tests de détection rapide des virus	- 51 -
Tableau XVI : Méthodes moléculaires utilisées au laboratoire pour le diagnostic viral.....	- 53 -
Tableau XVII : Panels de virus respiratoires utilisés par technique Seeplex® RV15 ACE Detection, SEEGENE®	- 56 -
Tableau XVIII : Prévalence lors de l'épidémie new-yorkaise de 2009 des virus influenza A et des autres virus respiratoires dans les échantillons analysés par différentes techniques	- 61 -
Tableau XIX : Comparaison des techniques pour la détection des virus influenza A (tous sous-types confondus) et du nouveau variant H1N1	- 62 -
Tableau XX : Fiche de recueil standardisée élaborée par l'InVS pour le signalement des cas de grippe hospitalisées.....	- 65 -
Tableau XXI : Récapitulatif de l'ensemble des techniques utilisées pour la détection des virus influenza et des prélèvements adaptés.....	- 67 -
Tableau XXII : Virus respiratoires détectés par technique Luminex (test xTAG® RVP Fast Assay, ABBOTT®).....	- 71 -
Tableau XXIII : Tableau de données des patients dont les prélèvements respiratoires ont été analysés par technique Luminex (xTAG® RVP Fast Assay, ABBOTT®)	- 81 -
Tableau XXIV : Coût des différentes techniques disponibles pour le diagnostic viral.....	- 92 -

Liste des figures

Figure 1 : Stratégie de décision d'hospitalisation devant une pneumonie communautaire.....	17 -
Figure 2 : Représentation schématique du virus influenza A.....	24 -
Figure 3 : Cycle viral des virus influenza.....	25 -
Figure 4 : Nomenclature des virus influenza.....	26 -
Figure 5 : Genèse du virus influenza A(H1N1)2009.....	30 -
Figure 6 : Pays ayant déclaré des cas confirmés de nouveau virus A(H1N1) au 5 juin 2009.....	33 -
Figure 7 : Description des phases de pandémie.....	33 -
Figure 8 : Famille des <i>Paramyxoviridae</i>	38 -
Figure 9 : Les différents types de prélèvements respiratoires.....	49 -
Figure 10 : Principe d'un test immuno-chromatographique.....	51 -
Figure 11 : Sondes TaqMan.....	55 -
Figure 12 : Principe du système Dual priming oligonucleotide (DPO).....	57 -
Figure 13 : Système Dual Primers Oligonucléotide (DPO).....	58 -
Figure 14 : Comparaison des résultats entre les techniques utilisant la PCR multiplex conventionnelle (A) et le système DPO (B).....	58 -
Figure 15 : Détection d'allèles spécifiques avec la technologie Luminex.....	60 -
Figure 16 : Fiche de renseignements cliniques associées aux demandes de Luminex au laboratoire de virologie du CHU de Nancy.....	66 -
Figure 17 : Stratégie de prise en charge des prélèvements respiratoires au laboratoire de Virologie du CHU de Nancy au cours de l'hiver 2011/2012.....	67 -
Figure 18 : Principe technique général des trousse de la société ARGENE® de PCR en temps réel.....	69 -
Figure 19 : Les différents prélèvements réceptionnés au laboratoire de virologie du CHU de Nancy pour une recherche de virus influenza au cours de l'hiver 2010/2011.....	72 -
Figure 20 : Comparaison de la répartition des échantillons positifs pour le virus influenza A(H1N1)2009 en fonction des classes d'âge au cours des hivers 2009/2010 et 2010/2011 au CHU de Nancy.....	74 -
Figure 21 : Comparaison de la répartition des classes d'âge des patients H1N1(2009) positifs hospitalisés en réanimation au cours des périodes hivernales 2009/2010 et 2010/2011.....	74 -
Figure 22 : Comparaison de l'origine de l'ensemble des prélèvements pour une recherche de virus influenza au cours des périodes hivernales 2009/2010 et 2010/2011 au CHU de Nancy.....	77 -
Figure 23 : Comparaison de la répartition des échantillons positifs pour le virus A(H1N1)2009 en fonction des services cliniques au cours des périodes hivernales 2009/2010 et de 2010/2011 au CHU de Nancy.....	78 -
Figure 24 : Comparaison de la prévalence des échantillons positifs pour le virus A(H1N1)2009 au cours des périodes hivernales 2009/2010 et 2010/2011 au CHU de Nancy.....	79 -
Figure 25 : Prévalence des échantillons positifs pour le virus influenza A non sous-typé au cours de la période hivernale 2011/2012 au CHU de Nancy.....	83 -
Figure 26 : Evolution du pourcentage et du nombre des prélèvements positifs des réseaux Grog et Renal entre les semaines 30/2009 et 10/2010.....	87 -

Figure 27 : Pourcentage des admissions pour motif de grippe aux urgences en fonction de l'âge en France entre août 2008 et mars 2010	- 88 -
Figure 28 : Cinétique de détection des virus grippaux A et B dans les prélèvements des Réseaux des Grog et proportion de positivité, semaines 36/2010 à 15/2011	- 89 -

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AEG	Altération de l'état général
AdV	Adénovirus
AFSSAPS	Agence française de sécurité sanitaire et des produits de santé
ARN	Acide ribonucléique
Asp	Acide aspartique
BoV	Bocavirus
BPCO	Broncho-pneumopathie chronique obstructive
C3G	Céphalosporine de troisième génération
CDC	Center of disease control
CHU	Centre hospitalo-universitaire
CNR	Centre national de référence
CoV	Coronavirus
CV	Capacité vitale
CRP	C-reactive protein
DEAE	Diethylaminoethyl
dNTP	Déoxynucléotide triphosphate
DPO	Dual priming oligonucleotide
EA-BPCO	Exacerbation aiguë de broncho-pneumopathie chronique obstructive
ECBC	Examen cyto-bactériologique des crachats
ECP	Effet cytopathogène
EV	Entérovirus
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
Gal	Galactose
Gly	Glycine
GROG	Groupes régionaux d'observation de la grippe
HA	Hémagglutinine
hMPV	Human metapneumovirus
HTAP	Hypertension artérielle pulmonaire
IF	Immunofluorescence
InVS	Institut de veille sanitaire
IRA	Infection respiratoire aiguë
IV	Intra-veineuse
LBA	Lavage broncho-alvéolaire

M	Protéine de matrice (1 ou 2)
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MK2	Macacus kidney
MRC5	Medical research council
NA	Neuraminidase
nm	Nanomètre
NS	Protéine non structurale (1 ou 2)
NP	Nucléoprotéine
OMA	Otite moyenne aiguë
OMS	Organisation mondiale de la santé
PA	Polymerase acide
PAC	Pneumopathie aiguë communautaire
PaO ₂	Pression artérielle partielle en oxygène
pb	Paires de bases
PB	Polymerase basique (1 ou 2)
PDP	Prélèvement distal protégé
PE	Phycoérythrine
PIV	Para-influenza virus
PFLA	Pneumopathie franche lobaire aiguë
PSI	Pneumonia severity index
RBS	Receptor binding site
RENAL	Réseau national des laboratoires hospitaliers
RNP	Ribonucléoprotéine
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
RV	Rhinovirus
RVP	Respiratory virus panel
SA	Sialic acid
SA-PE	Streptavidine-phycoérythrine
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline
SARS	Syndrome de détresse respiratoire aiguë
SPLF	Société de pneumologie de langue française
Swl	Swine-like
TDR	Test de détection rapide
UTM	Universal transport medium
VEMS	Volume expiratoire moyen par seconde
VRS	Virus respiratoire syncytial
WHO	World health organization

INTRODUCTION

Les infections respiratoires aiguës (IRA) sont des pathologies ubiquitaires très fréquentes, touchant aussi bien les adultes que les enfants. Leur évolution est potentiellement grave selon leur localisation au niveau de l'arbre respiratoire et leur survenue sur un terrain fragilisé, pouvant nécessiter une prise en charge en milieu hospitalier.

Les étiologies infectieuses sont extrêmement variées. Parmi elles, les bactéries et les virus tiennent une place prépondérante, avec comme chef de file des virus respiratoires, les virus influenza. Ces dernières années, les virus influenza et notamment le virus pandémique H1N1 survenu en 2009 a été particulièrement étudié d'un point de vue structural et épidémiologique.

Les méthodes de diagnostic viral ont évolué de manière importante avec l'avènement des techniques de biologie moléculaire et plus particulièrement des tests moléculaires dits « multiplex » permettant la détection simultanée d'un grand nombre d'agents infectieux. Ces « nouvelles » technologies permettent de réduire la durée d'hospitalisation des patients, d'optimiser les traitements médicamenteux et de réduire la pression de sélection des germes multirésistants, permettant ainsi une meilleure prise en charge des patients et *a fortiori* une réduction des coûts de santé.

Après un rappel sur la symptomatologie des infections respiratoires, les principaux agents étiologiques viraux et les différentes techniques de détection des virus, le travail réalisé s'est déroulé en 2 temps. L'objectif de l'étude était d'une part de comparer l'épidémiologie du virus influenza A pandémique lors des hivers 2009/2010 et 2010/2011 au CHU de Nancy, et d'autre part de discuter de l'apport des nouvelles technologies « multiplex » au diagnostic virologique lors de l'hiver 2011/2012.

Partie 1 : Les infections respiratoires et les virus impliqués

1. Les infections respiratoires bactériennes

1.1. Généralités

Les infections respiratoires se déclinent en infections hautes ou basses en fonction de leur localisation au niveau de l'arbre respiratoire :

- les infections hautes sont localisées entre la cavité nasale (ou buccale) et la trachée,
- les infections basses se concentrent au niveau des bronches et des bronchioles.

Les voies respiratoires supérieures sont naturellement colonisées par une flore commensale diverse et variée alors que les voies respiratoires basses sont normalement stériles. Seules les infections respiratoires basses seront abordées.

Les infections respiratoires basses constituent un groupe hétérogène de pathologies incluant les syndromes grippaux avec signes respiratoires, la bronchite aiguë, l'exacerbation aiguë de bronchite chronique (EA-BPCO), la pneumonie et la bronchiolite du nourrisson (Leophonte 1999). Les infections respiratoires basses représentent le tiers de l'ensemble des infections respiratoires touchant près de 10 millions de personnes chaque année en France. Elles sont au premier rang des causes de mortalité par pathologie infectieuse dans le monde, principalement dues aux pneumonies (Léophonte 2001).

La pneumonie est la forme la plus grave de l'ensemble des infections respiratoires basses. Elles sont au 5^{ème} ou 6^{ème} rang des causes de décès dans les pays industrialisés (mortalité pouvant atteindre jusqu'à 15 %) mais elles sont rares par rapport aux infections bronchiques (XVe Conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse 2006) ; (CMIT 2007a). Chez l'enfant, la bronchiolite est l'infection respiratoire basse la plus fréquente survenant essentiellement chez les nourrissons.

1.2. Pneumopathie aiguë

1.2.1. Définitions

La pneumopathie aiguë est une infection respiratoire basse du parenchyme pulmonaire et d'évolution aiguë.

Le terme « pneumopathie » est le terme désignant l'ensemble des affections pulmonaires. On retiendra le terme « pneumonie » qui correspond aux pneumopathies d'origine infectieuse.

On parle de pneumopathie aiguë « communautaire » (PAC) lorsqu'elle est acquise en dehors de l'hôpital ou avant la 48^{ème} heure suivant l'admission en milieu hospitalier (AFSSAPS 2010). La pneumopathie « nosocomiale » est acquise après un séjour hospitalier supérieur à 48 heures. Seules les pneumonies communautaires seront traitées.

Les pneumopathies atteignent en règle générale près de 4 millions de personnes par an aux Etats-Unis et entre 400 et 600 000 en France. Le taux d'hospitalisation varie entre 40 et 60 % (Polverino & Torres Marti 2011) ; (XVe Conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse 2006). Ce sont des infections potentiellement graves pouvant engager le pronostic vital du patient.

1.2.2. Diagnostic

Le diagnostic de pneumonie est parfois difficile, notamment dans les formes atypiques de la maladie : manque de spécificité des symptômes, inconstance de la toux, limites de l'examen clinique. Le diagnostic s'appuie ainsi sur un faisceau d'arguments à la fois cliniques et radiologiques. Cependant, aucuns d'eux ne sont pathognomoniques d'un agent infectieux particulier. Seule la confirmation biologique permettra d'affirmer le caractère infectieux de la maladie (CMIT 2007a).

1.2.2.1. Aspects cliniques

Le tableau clinique des pneumonies associe (CMIT 2007a) :

- des signes fonctionnels : toux, dyspnée, expectorations, douleurs thoraciques, polypnée,
- des signes infectieux : fièvre, frissons, asthénie, malaise général,
- des signes physiques d'atteinte du parenchyme pulmonaire : ils varient des simples râles bronchiques jusqu'à un syndrome de condensation,
- des symptômes extra-respiratoires peuvent y être associés, notamment chez les personnes âgées, tels qu'une confusion, des diarrhées, des vomissements,...

Les pneumonies se déclinent en 3 formes anatomo-cliniques (tableau I) : la pneumonie franche lobaire aiguë (PFLA), forme typique de la pneumonie, la bronchopneumonie et enfin la pneumonie interstitielle diffuse ou atypique. La pneumopathie d'inhalation est une entité classée à part (Léophonte 2001) ; (Ouarab *et al.* 2009).

Tableau I : Les différentes formes cliniques des pneumonies

Type de pneumonie	Clinique	Radiographie pulmonaire	Etiologies
Pneumonie franche lobaire aiguë	Installation brutale Fièvre, frissons, malaise, dyspnée, douleur thoracique latéralisée, toux sèche, râles crépitants, tachycardie	Opacité dense et homogène, systématisée à un lobe	Pneumocoque Autres bactéries
Broncho pneumonie	Installation rapide Fièvre, signes généraux intenses, expectoration importante, encombrement, dyspnée, râles crépitants...	Foyers multiples (dissémination d'opacités alvéolaires non systématisées)	Virus Bactéries Sur terrains fragilisés
Pneumonie interstitielle	Installation progressive Examen clinique pauvre Signes fonctionnels riches (toux, douleurs thoraciques, céphalées, myalgies)	Infiltrats peu denses non systématisés, mal limités, uni ou bilatéraux Ou signes plus étendus, sous forme d'opacités réticulaires et micronodulaires bilatérales	Virus Bactéries atypiques
Pneumonie d'inhalation	Survenue 24 à 48 heures après vomissements ou aspiration alimentaire		Médicaments Ethylisme chronique Chirurgie des voies aériennes supérieures

D'après (Léophonte 2001) ; (Ouarab *et al.* 2009)

1.2.2.2. Aspects radiologiques

La radiographie pulmonaire permet de confirmer les éléments du diagnostic clinique voire même de mettre en évidence un foyer pulmonaire non détectable à l'auscultation. Elle est réalisée de face, en inspiration, si possible debout. La réalisation d'un cliché de profil est souhaitable dans le cas où l'état respiratoire et général du patient le permet (Georges & Guery 2007).

Des images diverses peuvent se voir. Les opacités alvéolaires systématisées sont facilement reconnaissables par rapport aux opacités interstitielles ou en mottes péri-bronchiques correspondant à la bronchopneumonie. La radiographie ne permet pas d'identifier l'agent infectieux responsable.

Un scanner sans injection peut également être une aide en cas de diagnostic difficile.

1.2.2.3. Aspects étiologiques

Il existe un grand éventail d'agents infectieux responsables des pneumonies. On distingue notamment les pneumonies bactériennes, des pneumonies virales, fongiques ou encore parasitaires (Trouillet & Chastre 1997). Les bactéries les plus fréquemment impliquées dans les pneumonies communautaires en fonction des catégories de patients sont répertoriées dans le tableau II.

Tableau II : Etiologies selon les catégories de patients

Catégorie de patients	Ambulatoire	Hospitalisés	Réanimation
Bactéries responsables (%)	Bactéries atypiques (22)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (26)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (22)
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (19)	Bactéries atypiques (18)	<i>Legionella spp</i> (8)
	<i>Haemophilus influenzae</i> (3)	<i>Legionella spp</i> (4)	<i>Staphylococcus aureus</i> (8)
	<i>Legionella spp</i> (2)	<i>Haemophilus influenzae</i> (4)	Entérobactéries (7)
	Non identifiés (60)	Entérobactéries (3)	<i>Haemophilus influenzae</i> (5)
		<i>Staphylococcus aureus</i> (1)	Bactéries atypiques (3)
		Non identifiés (44)	Non identifiés (42)

Bactéries atypiques : *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Coxiella burnetii*

D'après (Blanquer & Sanz 2010)

Les pneumonies sont documentées dans moins de 50 % des cas (Polverino & Torres Marti 2011). Le pneumocoque est l'agent infectieux le plus fréquent, il représente 30 à 50 % de l'ensemble des pneumonies tous patients confondus (Leophonte 1999). La pneumonie à pneumocoque reste grave chez les patients présentant des co-morbidités (CMIT 2007a).

La notion d'épidémie, la saison, le mode de vie (rural, collectivité), le contact avec des animaux ou des oiseaux sont d'autres éléments à prendre en considération afin d'identifier l'agent étiologique en association avec la clinique et la radiographie (CMIT 2007a).

1.2.2.4. Aspects microbiologiques

La documentation bactériologique est un élément majeur de la prise en charge des pneumonies communautaires. Si les examens fondamentaux sont représentés par les ECBC et les hémocultures, les autres examens doivent être habilement guidés par la symptomatologie, la radiologie et la gravité du tableau clinique (XVe Conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse 2006) ; (Georges & Guery 2007).

- Examen cyto-bactériologique des crachats (ECBC) : Il doit être pratiqué avant toute antibiothérapie. Son interprétation peut s'avérer difficile en cas de contamination du prélèvement par la flore commensale oro-pharyngée.
- Les lavages broncho-alvéolaires (LBA) et les prélèvements distaux protégés (PDP), prélèvements invasifs, sont moins sujets à une contamination de la flore buccale.
- Hémocultures : 2 trains sont prélevés au moment du pic fébrile avant l'instauration du traitement antibiotique. L'examen est peu sensible mais très spécifique en cas de positivité.
- Antigénuries légionnelle et pneumocoque : Le test est rapide et sensible même en présence d'antibiotiques. En raison de son coût élevé, il est réservé aux pneumonies sévères.
- Sérologies : La réalisation des sérologies permet un diagnostic rétrospectif, notamment pour les germes intracellulaires.
- Biologie moléculaire : Elle permet la détection de pathogènes présents en faible quantité non détectables par les techniques précédentes. Cette technique sera plus développée ultérieurement.

Les examens biologiques recommandés en fonction des situations pathologiques sont détaillés dans le tableau III (XVe Conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse 2006).

Tableau III : Stratégie diagnostique microbiologique des pneumopathies aiguës

	Pneumopathies bénignes acquises en ville	Pneumopathies hospitalisées en réanimation	Pneumopathies hospitalisées en dehors des services de réanimation
ECBC	Non recommandé	Recommandé	Recommandé
Hémocultures	Non recommandé	Recommandé	Recommandé
Antigénuries légionnelle et pneumocoque	Non recommandé	Recommandé	Non recommandé d'emblée sauf symptômes de légionnellose, instabilité hémodynamique, hypoxémie, situation épidémique

1.2.3. Orientation des patients

Les modalités de prise en charge des patients repose sur la recherche et l'analyse des signes de gravité, des facteurs de risque de mortalité et des conditions socio-économiques (XVe Conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse 2006).

Les recommandations de prise en charge ont été revues en juillet 2010 par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire et des Produits de Santé (AFSSAPS) et la Société de Pneumologie de Langue Française (SPLF) (AFSSAPS 2010). Elles sont représentées dans le diagramme suivant (figure 1) qui précise les choix d'une prise en charge ambulatoire ou hospitalière des PAC chez l'adulte.

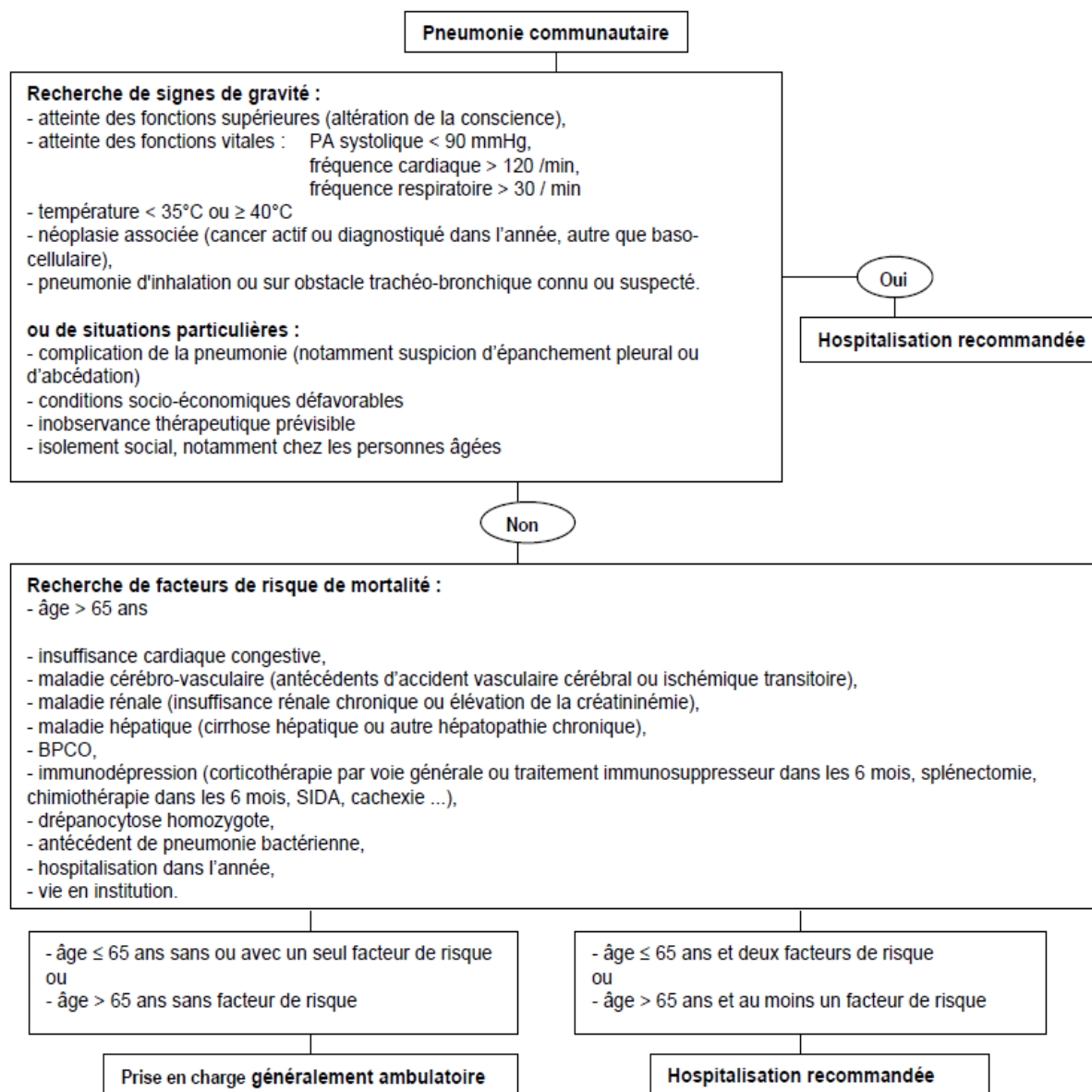


Figure 1 : Stratégie de décision d'hospitalisation devant une pneumonie communautaire

D'après (AFSSAPS 2010) ; (Georges & Guery 2007)

Parallèlement, plusieurs scores ont été mis au point ces dernières années dont le score de Fine ou PSI (Pneumonia Severity Index), le CRB-65, le CURB-65,... Le score utilisé dans le cadre des recommandations est le CRB-65. Il représente l'outil le plus facile à utiliser en médecine de ville afin d'évaluer les patients nécessitant une hospitalisation. Ses items sont détaillés dans le tableau IV.

Tableau IV : Score CRB-65

C	C onfusion	
R	R espiratory rate (fréquence respiratoire)	≥ 30 / minute
B	B lood pressure (pression artérielle)	systolique < 90 mm Hg diastolique ≤ 60 mm Hg
65	Age ≥ 65 ans*	

** l'âge physiologique, plus que l'âge physique, est à prendre en considération
Score utilisable en médecine de ville*

Si 0 critère : traitement ambulatoire possible ; ≥ 1 critère : évaluation à l'hôpital

1.2.4. Traitement

Le traitement antibiotique est instauré dès que le diagnostic est posé, idéalement dans les 4 heures, sans attente des résultats microbiologiques. Il doit prendre en compte les bactéries les plus souvent mises en cause et/ou responsables d'une mortalité élevée, le profil de résistance de certains pneumocoques (pénicillines, macrolides) et les facteurs de risque du patient. Une ré-évaluation du traitement est réalisée au bout de 48 à 72 heures d'antibiothérapie (AFSSAPS 2010). La stratégie thérapeutique est résumée dans le tableau V.

Lorsque l'infection est documentée, le traitement est adapté en fonction du germe identifié. En cas de suspicion d'infection par le virus influenza A, un traitement par oseltamivir ou zanamivir est ajouté (XVe Conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse 2006).

Tableau V : Stratégie thérapeutique des pneumopathies infectieuses

	Première intention	Echec à 48 heures de traitement
Sujet présumé sain sans facteurs de risque associé		
○ Suspicion forte de pneumocoque	Amoxicilline	Macrolides ou lévofloxacine ou pristinamycine ou télithromycine Hospitalisation en cas de 2^{ème} échec
○ Doute entre pneumocoque et bactéries atypiques	Amoxicilline ou pristinamycine ou télithromycine	Lévofloxacine ou pristinamycine ou télithromycine Hospitalisation en cas de 2^{ème} échec Hospitalisation / Ré-évaluation diagnostique et thérapeutique
○ Suspicion forte de bactéries atypiques	Macrolides	Amoxicilline ou lévofloxacine ou pristinamycine ou télithromycine Hospitalisation en cas de 2^{ème} échec
Sujet âgé et/ou avec co-morbidités sans signes de gravité		
	Amoxicilline/acide clavulanique ou lévofloxacine ou ceftriaxone	Hospitalisation
Sujet avec co-morbidités présentant une forme grave		
○ Si facteur de risque de <i>Pseudomonas</i>	Pipéracilline/tazobactam ou céfépime ou carbapénème + aminoside + macrolide iv ou lévofloxacine	

C3G : céphalosporine de 3^{ème} génération ; IV intra-veineuse

D'après (AFSSAPS 2010)

1.3. Broncho-pneumopathie chronique obstructive

La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie chronique et lentement progressive, d'origine essentiellement tabagique. Elle se caractérise par une diminution incomplètement réversible des débits aériens dont 4 stades ont été décrits (tableau VI) (XVe Conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse 2006).

La chronicité est définie par une toux et une expectoration persistante 3 mois par an depuis 2 années consécutives. Sa prévalence augmente avec l'âge et le tabagisme (CMIT 2007b).

Tableau VI : Les stades des BPCO

Stade	Caractéristiques
0 : à risque	Symptômes chroniques : toux, expectoration VEMS/CV ≥ 70 %
I : BPCO peu sévère	VEMS/CV < 70 % VEMS ≥ 80 % de la valeur prédite avec ou sans symptômes chroniques
II : BPCO moyennement sévère	VEMS/CV < 70 % 30 % $\leq$ VEMS/CV < 80 % de la valeur prédite IIa 50 % $\leq$ VEMS/CV < 80 % de la valeur prédite IIb 30 % $\leq$ VEMS/CV < 50 % de la valeur prédite avec ou sans symptômes chroniques
III : BPCO sévère	VEMS/CV < 70 % VEMS < 30 % de la valeur prédite Ou VEMS < 50 % de la valeur prédite en présence d'insuffisance respiratoire (PaO ₂ < 60 mmHg) ou de signes cliniques satellites d'HTAP

VEMS : volume expiratoire moyen par seconde ; CV : capacité vitale ; PaO₂ : pression artérielle en oxygène ; HTAP : hypertension artérielle pulmonaire

D'après (CMIT 2007b)

L'exacerbation aiguë de broncho-pneumopathie chronique obstructive (EA-BPCO) est l'accident évolutif le plus fréquent de la BPCO, engageant parfois le pronostic vital lors de décompensations. Il s'agit d'une majoration ou de l'apparition des symptômes caractérisant la BPCO tels que la toux, les expectorations ou encore la dyspnée. Elle représente 2 millions de cas par an en France.

L'origine bactérienne (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Branhamella catarrhalis*) est en cause dans 50 % des cas, notamment lors d'expectorations purulentes franches de couleur verdâtre (XVe Conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse 2006).

Le traitement antibiotique n'est pas recommandé dans toutes les formes de BPCO. Les BPCO moyennement sévères accompagnées d'une expectoration verdâtre sont traitées majoritairement par amoxicilline, quant aux BPCO sévères, le traitement est systématique par amoxicilline/acide clavulanique ou C3G injectable.

Outre l'antibiothérapie, la prise en charge se base sur l'arrêt du tabac, un traitement par bronchodilatateurs, la kinésithérapie respiratoire ou encore une courte corticothérapie (AFSSAPS 2010).

Il existe d'autres formes d'infections respiratoires basses telles que la bronchiolite ou encore certaines formes grippales. Elles seront développées dans le chapitre suivant, ces dernières étant majoritairement d'origine virale.

2. Les infections respiratoires virales

2.1. Généralités

Les infections respiratoires virales constituent un autre aspect non négligeable des infections broncho-pulmonaires. Le tableau VII détaille les virus et les bactéries responsables des différents tableaux cliniques des infections respiratoires.

Tableau VII : Principaux agents étiologiques dans les infections pulmonaires basses

Syndrome	Agents infectieux
Bronchiolite	VRS, hMPV, PIV, adénovirus , coronavirus, virus influenza, <i>Chlamydophila pneumoniae</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , rhinovirus, bocavirus
EA-BPCO / Asthme	VRS, hMPV, rhinovirus , adénovirus, PIV, coronavirus, virus influenza, <i>Chlamydophila pneumoniae</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , bocavirus
Croupe	PIV , virus influenza, adénovirus
Pneumonie	Virus influenza, Streptococcus pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, PIV, adénovirus, VRS , hMPV, <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
Pneumonie sur greffe	VRS, PIV, virus influenza, hMPV , adénovirus, rhinovirus

hMPV : métapneumovirus humain ; *PIV* : para-influenza virus ; *VRS* : virus respiratoire syncytial ;
croupe : laryngite obstructive aiguë

D'après (Pavia 2011)

Les virus engendrent les mêmes pathologies que celles décrites pour les infections respiratoires bactériennes (pneumonies, BPCO, bronchiolites,...) avec des différences au niveau de la présentation clinique, de la radiographie et de la biologie. Pour exemple, le tableau VIII représente les différences entre les pneumonies bactériennes et virales.

Tableau VIII : Eléments distinctifs des pneumonies virales et bactériennes

ETIOLOGIE	BACTERIENNE	VIRALE
Début	Brutal	Progressif
Fièvre	> 39°C	< 39°C
Etat général	Altéré	Conservé
Symptômes respiratoires	Polypnée Condensation pulmonaire Douleur thoracique	Rhinopharyngite Toux Syndrome bronchique
Symptômes extra-respiratoires	Douleur abdominale Syndrome méningé	Conjonctivite Exanthème
Radiographie thoracique	Opacité alvéolaire systématisée ± épanchement pleural	Opacité alvéolo-interstitielle, infiltrat inhomogène
Hémogramme	Polynucléose neutrophile	Leucocytose normale ou diminuée
VS – CRP	Augmentées	Normales ou peu augmentées

D'après (CMIT 2012)

La prévalence des virus dans les infections respiratoires est difficile à estimer car ils sont rarement recherchés de manière systématique en dehors de certains contextes épidémiques. Les virus respiratoires seraient responsables de 15 à 40 % des étiologies connues des pathologies respiratoires d'étiologie infectieuse (Díaz *et al.* 2011). Les virus les plus souvent incriminés sont les *Orthomyxoviridae* (virus influenza A et B), les *Paramyxoviridae* (virus respiratoire syncytial (VRS), virus para-influenza (PIV) de type 1, 2 ou 3), les adénovirus (AdV) ou encore les rhinovirus ; plus rarement peuvent être impliqués les coronavirus (CoV), le bocavirus (BoV), les entérovirus ou encore le virus para-influenza de type 4 (PIV-4) (Mahony 2008). Le tableau XIV situé pages 43-45 résume les caractéristiques des différents virus respiratoires.

Les virus précédemment cités sont dits « classiques » puisqu'ils ont un tropisme presque exclusif des cellules ciliées de l'épithélium respiratoire. Ils partagent tous une courte période d'incubation et une transmission inter-humaine par contact direct ou par émission de micro-gouttelettes sous forme d'aérosol.

Cependant, d'autres virus dits « opportunistes » peuvent donner des manifestations respiratoires chez des sujets fragilisés (principalement immunodéprimés), tels que les virus appartenant à la grande famille des *Herpesviridae* (herpès virus, varicelle-zona virus, cytomégalovirus, Epstein-Barr virus), le virus de la rougeole,... (Freymuth *et al.* 1998). Ces derniers ne seront pas développés.

2.2. Virus influenza

2.2.1. Agent causal

2.2.1.1. Structure virale

Les virus influenza appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae*, famille regroupant plusieurs types appelés virus influenza A, B et C. Le virus influenza A est responsable de la grippe hivernale épidémique voire pandémique. La grippe aviaire qui dérive du type A, infecte l'homme mais la transmission inter-humaine est faible. Le virus influenza B provoque des grippes saisonnières et le C est généralement bénin (Vabret *et al.* 2010).

La structure des virus influenza de type A (figure 2) se compose de plusieurs parties (Neumann *et al.* 2009) :

- Une enveloppe lipidique à la surface de laquelle sont ancrées les glycoprotéines de surface, l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA), dont il existe respectivement 16 et 9 sous-types. Chez l'homme, les sous-types H1, H2, H3, N1 et N2 sont majoritaires, ainsi que ponctuellement les sous-types H5 et H9 (Vabret *et al.* 2010).
 - l'hémagglutinine (HA) permet l'attachement du virus à des récepteurs riches en acides sialiques présents au niveau des cellules des espèces humaines et animales (pulmonaires, digestives,...), entraînant ainsi l'endocytose du virus.
 - la neuraminidase (NA) facilite la sortie des nouveaux virions en clivant la liaison des acides sialiques avec l'hémagglutinine.
- Le génome viral est constitué de 8 segments d'ARN monobrin codant les 11 protéines virales (tableau IX, figure 3). Les ARN viraux se présentent sous forme de ribonucléoprotéines (RNPs), ils sont associés à la nucléoprotéine (NP) et au complexe polymérase (PB1, PB2 et PA) nécessaires à la transcription et à la réplication de l'ARN.
- La protéine d'exportation nucléaire (NEP ou NS2) et la protéine de matrice (M1) permettent le transfert de l'ARN du noyau vers le cytoplasme ainsi que la formation des nouveaux virions au niveau de la membrane plasmique.
- Les fonctions de la protéine transmembranaire M2 de la chaîne ionique, de l'antagoniste de l'interféron NS1 et de la protéine PB1-F2 sont encore à l'heure actuelle discutées.

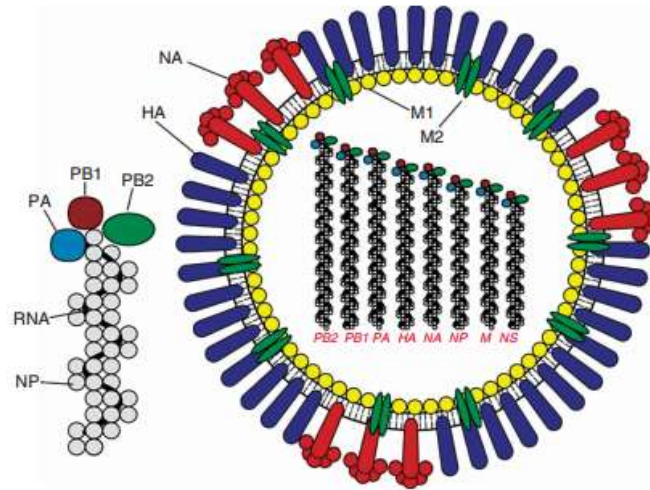


Figure 2 : Représentation schématique du virus influenza A

HA : hémagglutinine ; M : protéine de matrice ; NA : neuraminidase ; NP : nucléoprotéine ; NS : protéine non structurale ; PA : protéine acide ; PB : protéine basique ; RNA : acide ribonucléique

D'après (Cox et al. 2004)

Tableau IX : Fonctions des protéines des virus influenza

Segments	Protéines	Fonctions
1	PB2	Reconnaissance des coiffes en 5' de l'ARN _m
2	PB1	ARN polymérase ARN-dépendante
	PB1-F2	Protéine mitochondriale accessoire pro-apoptotique
3	PA	Endonucléase
4	HA	Attachement aux récepteurs cellulaires (HA1), fusion et libération du contenu (HA2)
5	NP	Nucléoprotéine associée à l'ARN, régule l'entrée du virus dans le noyau
6	NA	Relargage des nouveaux virions
7	M1	Protéine de matrice participant à la rigidité de l'enveloppe et à la compaction des nucléoprotéines
	M2	Canal ionique permettant la régulation du pH et la maturation des glycoprotéines
8	NS1	Echappement du virus à l'action anti-virale de l'interféron ?
	NS2	Export nucléaire des ARN viraux

D'après (Bouvier & Palese 2008)

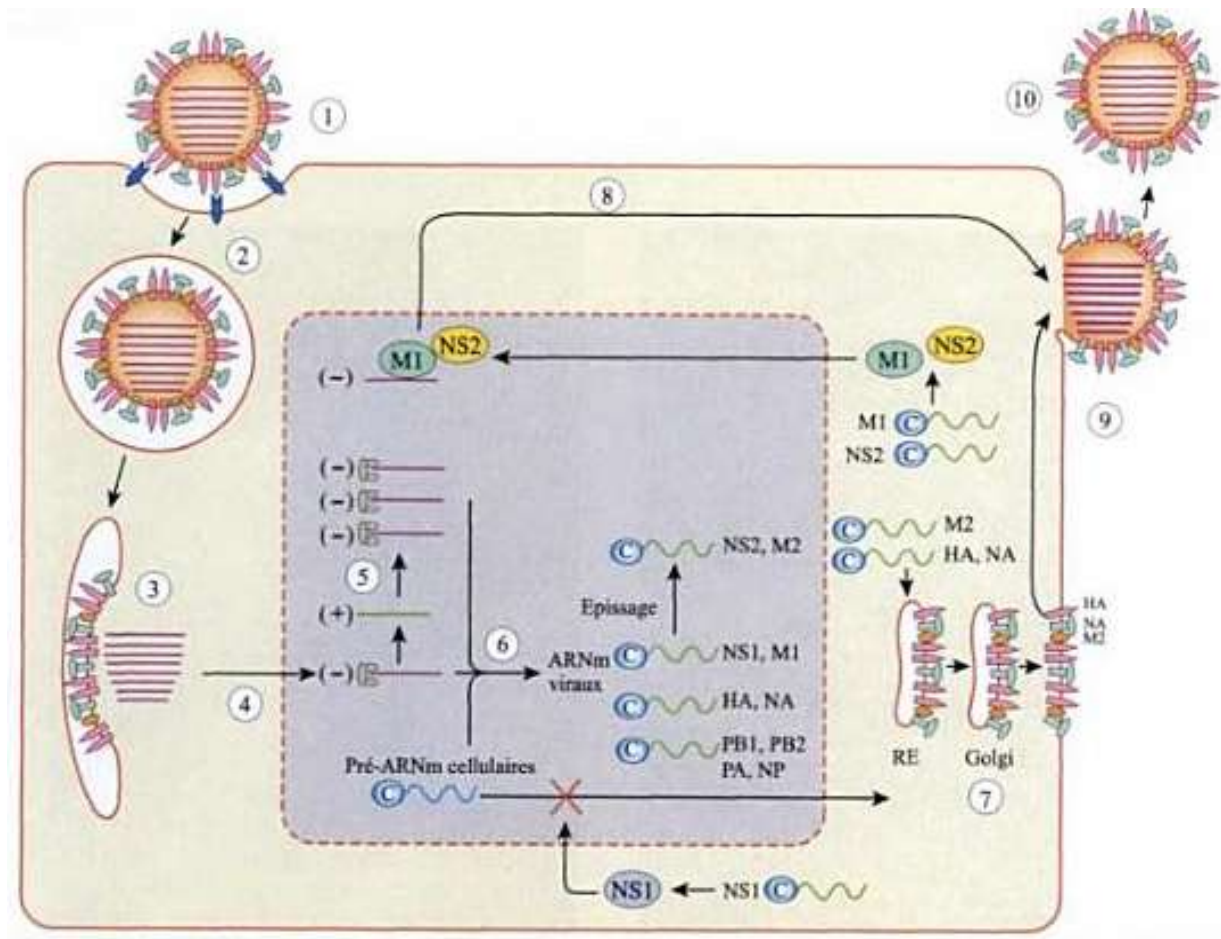


Figure 3 : Cycle viral des virus influenza

HA : hémagglutinine ; M : protéine de matrice ; NA : neuraminidase ; NP : nucléoprotéine ; NS : protéine non structurale ; PA : protéine acide ; PB : protéine basique ; ARN_m : acide ribonucléique messenger ; RNP : ribonucléoprotéine ; RE : réticulum endoplasmique

1 Fixation de l'hémagglutinine virale sur ses récepteurs cellulaires ; 2 Pénétration du virus par endocytose ; 3 Fusion entre membrane virale et membrane de l'endosome ; 4 Translocation des RNP vers le noyau ; 5 Réplication du génome viral ; 6 Transcription des ARN_m viraux ; 7 Synthèse des protéines d'enveloppe et insertion dans la membrane plasmique au niveau de radeaux lipidiques ; 8 Export des RNPs néoformées vers le cytoplasme ; 9 Assemblage et bourgeonnement des particules virales néoformées ; 10 Libération des virions par action de protéases extracellulaires.

D'après (Freymuth 2003)

La nomenclature actuellement utilisée pour nommer les virus influenza est la suivante (Vabret *et al.* 2010) (cf. exemple en figure 4) :

- type du virus (A, B ou C),
- lieu d'isolement de la souche,
- numéro d'enregistrement de la souche,
- année d'isolement,
- sous-type viral.

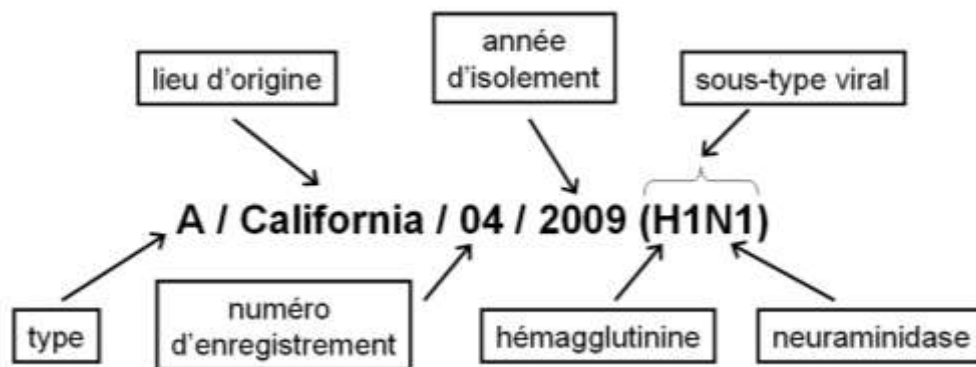


Figure 4 : Nomenclature des virus influenza

2.2.1.2. Variation antigénique

Les 2 glycoprotéines de surface HA et NA jouent un rôle primordial dans la survenue des épidémies grippales puisque leurs variations entraînent la formation de nouvelles souches virales.

Les variations antigéniques sont de 2 types : les dérives (« drift ») et les cassures (« shift »). Les changements au niveau des glycoprotéines de surface permettent au virus d'échapper au système immunitaire de l'hôte (Swedish *et al.* 2010).

2.2.1.2.1. Dérive

La dérive ou « glissement » antigénique correspond à une variation mineure mais fréquente du génome viral au niveau des gènes de l'hémagglutinine et/ou de la neuraminidase des virus influenza de type A, B et C. Elle survient par mutations ponctuelles favorisées par l'instabilité génétique de l'ARN et par le caractère infidèle des ARN polymérases virales (absence de mécanisme de relecture et de correction des erreurs). De ce fait, à l'intérieur d'un même sous-type apparaît toute une série de variants qui s'éloignent progressivement de la souche originelle (Huraux 2008).

La dérive est responsable des vagues épidémiques saisonnières survenant tous les 1 à 2 ans, les souches variantes remplacent celles des années précédentes (Peigue-Lafeuille 2002) (tableau X). Ainsi, une réactualisation annuelle de la composition des vaccins est nécessaire.

2.2.1.2.2. Cassure

La cassure ou « saut » antigénique correspond à une variation majeure et brutale survenant uniquement chez les virus influenza de type A. Elle est à l'origine des pandémies grippales survenant tous les 10 à 20 ans. Le changement complet du gène codant pour l'hémagglutinine et/ou la neuraminidase peut s'expliquer par 2 types de mécanismes (Peigue-Lafeuille 2002) :

- la transmission directe de souches animales à l'homme (cas du virus influenza A(H5N1)),
- plus fréquemment, le réassortiment génétique entre des souches humaines et animales rendu possible par la nature segmentée du génome. Le porc, animal sensible à la fois aux virus humains et aviaires, jouerait un rôle central dans l'apparition des réassortiments lors de sa co-infections par 2 souches différentes (Nafakh & Van der Werf 2003). La cassure permet ainsi la constitution de nouveaux sous-types à l'intérieur du type A (Huraux 2008).

Tableau X : La cassure et la dérive antigéniques des virus influenza

	CASSURE/SAUT « <i>shift</i> »	DERIVE/GLISSEMENT « <i>drift</i> »
Types viraux concernés	A	A, B, C
Mécanismes	Réassortiment des virus influenza humains et animaux chez le porc Transmission directe des virus animaux à l'homme	Mutations ponctuelles
Modification antigénique	Majeure	Mineure
Conséquences taxonomiques	Emergence de nouveaux sous-types	Emergence de nouveaux variants
Conséquences immunitaires	Absence d'immunité croisée entre 2 sous-types influenza A	Immunité croisée partielle entre 2 variants consécutifs
Conséquences épidémiologiques	Pandémie, tous les 10 à 30 ans	Epidémies limitées tous les 1 à 2 ans
Conséquences vaccinales	Péremption du vaccin	Vaccin peut être encore valide

D'après (Huraux 2008)

2.2.1.3. Ecologie des virus influenza

Les virus influenza de type A infectent l'homme ainsi que de nombreuses espèces animales, en particulier les oiseaux et certains mammifères tels que les porcs, les chevaux, les mammifères marins,... (tableau XI).

Les oiseaux aquatiques sauvages hébergent le plus grand nombre de sous-type viraux influenza A (16 sous-types moléculaires HA et 9 sous-types moléculaires NA). Ils sont ainsi considérés comme le réservoir de la diversité génétique des virus influenza A. L'analyse génétique démontre que les virus influenza A des mammifères dérivent essentiellement des virus aviaires. La présentation clinique dans les espèces aviaires est le plus souvent asymptomatique, exception faite de certaines souches hautement pathogènes (exemple-type de la souche virale A(H5N1)).

Les virus aviaires se répliquent préférentiellement dans le tractus digestif des oiseaux et sont excrétés dans leurs selles. Ils sont alors capables d'infecter à leur tour les mammifères (hommes, chevaux, porcs) par voie respiratoire. La transmission du virus chez le porc se fait très facilement grâce aux élevages conjoints de volaille ou de canards et de porcs (Buisson *et al.* 2007).

Tableau XI : Hôtes naturels des virus de la grippe A

Espèces	Hémagglutinines										Neuraminidases					
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10 à H16	N1	N2	N3 à N6	N7	N8	N9
Homme	+	+	+		+		+		+		+	+		+		
Porc	+		+								+	+				
Cheval			+				+							+	+	
Oiseaux	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

D'après (Buisson *et al.* 2007)

Le mécanisme d'attachement des virus influenza implique 2 structures : le domaine spécialisé de l'hémagglutinine nommé site de liaison au récepteur (RBS) et le récepteur spécifique présent à la surface de la cellule-hôte. Ce dernier contient des acides sialiques (SA) couplés à une molécule de galactose en position $\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$ (Buisson *et al.* 2007).

Les virus aviaires se lient préférentiellement aux récepteurs avec une liaison $\alpha 2,3$ de l'acide sialique au galactose, dominants sur les cellules intestinales aviaires. Au contraire, les virus humains préfèrent la liaison $\alpha 2,6$ des récepteurs exprimée par les cellules des épithéliums respiratoires humains. Chez l'homme, il existe également des acides sialiques avec une liaison $\alpha 2,3$ présents essentiellement au niveau des voies respiratoires basses (bronchioles, alvéoles) (Bouvier & Palese 2008).

Le porc est un bon réservoir pour les virus influenza. En effet, il possède à la fois les récepteurs cellulaires pour les virus humains ($\alpha 2,6$) et pour les virus aviaires ($\alpha 2,3$) au niveau respiratoire. Les recombinaisons par échanges de segments génomiques entre les différentes souches virales influenza de type A sont ainsi facilitées (Vandegrift *et al.* 2010).

2.2.1.4. Particularités du virus H1N1 pandémique

Un « nouveau » virus influenza A de sous-type H1N1 a été identifié pour la première fois en avril 2009 (Swedish *et al.* 2010).

En 1998, des virus influenza A de sous-type H1N1 « triple-réassortants » combinant des gènes porcins, aviaires et humains sont devenus prédominants dans les élevages de porcs d'Amérique du Nord occasionnant 11 cas humains sporadiques d'infection respiratoire entre décembre 2005 et février 2009. Ce virus se compose de 5 segments d'un virus H1N1 porcin classique nord-américain (NP, M, NS, HA et NA), de 2 segments d'un virus aviaire nord-américain (PA et PB2) et d'un segment d'un virus humain de sous-type H3N2 (PB1) (Enouf *et al.* 2009).

Le nouveau virus influenza A(H1N1)2009 résulte d'une combinaison unique de 6 gènes du virus de 1998 avec 2 gènes (NA et M) d'un virus porcin eurasien H1N1 identifié depuis 1979 en Europe (figure 5). Il contient donc également des gènes issus des 3 espèces (Enouf *et al.* 2009).

Ce virus est un cas particulier qui ne suit pas la définition classique des virus pandémiques, son HA est insuffisamment divergente et sa virulence moins préoccupante par rapport aux virus des pandémies majeures du XX^{ème} siècle (Schnitzler & Schnitzler 2009). On parle plutôt de « pseudo-shift » que de cassure antigénique. L'HA serait étroitement liée à celle du virus de 1918 (« grippe espagnole »). Ainsi, la plupart des personnes nées avant 1957 ont déjà été en contact avec des souches proches du virus H1N1 actuel (Girard *et al.* 2010). On ne peut pas parler non plus de dérive antigénique puisqu'il n'évolue pas directement du virus H1N1 saisonnier d'origine humaine qui circule depuis 1977 (Sullivan *et al.* 2010) ; (Gatherer 2009).

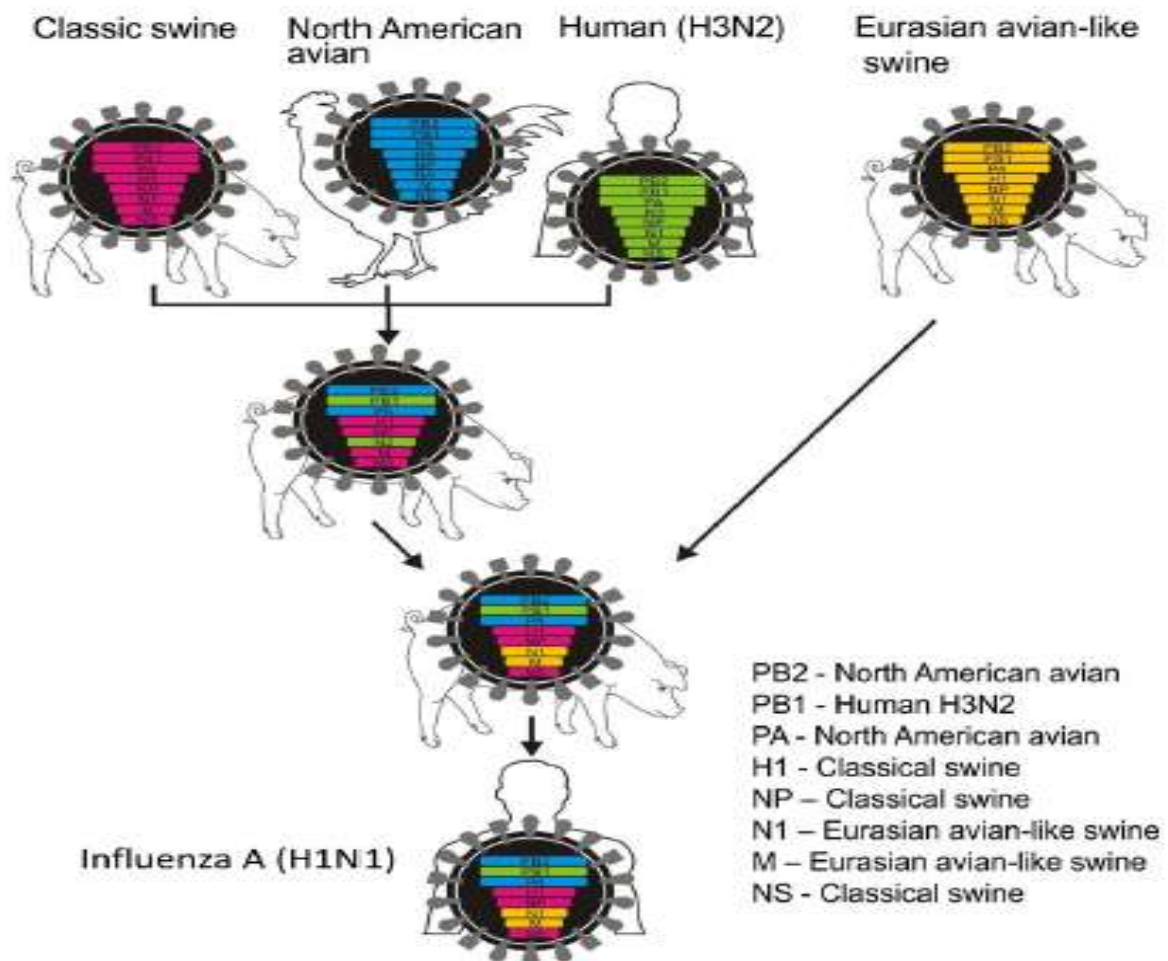


Figure 5 : Genèse du virus influenza A(H1N1)2009

D'après (Neumann *et al.* 2009)

Le virus A(H1N1)2009 ne contient pas le marqueur pathogénique PB1-F2 contrairement aux autres virus pandémiques de sous-type H1N1 de 1918 et de 1977, entraînant ainsi une présentation clinique modérée (Schnitzler & Schnitzler 2009).

Sa multiplication dans les cellules humaines pulmonaires est plus efficace que celle des virus saisonniers. En effet, l'analyse génétique des séquences de l'HA1 a révélé dans certains cas la présence de la mutation Asp222Gly (ou D222G). Elle modifie le tropisme viral en favorisant une atteinte des voies respiratoires inférieures par liaison aux acides sialiques $\alpha 2,3$. La virulence des souches porteuses d'une telle mutation permet au virus d'atteindre des patients jeunes sans facteurs de risque systématiquement associés. Cette mutation survient de manière sporadique et spontanée, elle n'est pas un déterminant de transmission (Belser *et al.* 2011).

2.2.2. Epidémiologie

Il existe peu de données complètes et accessibles sur l'épidémiologie des virus influenza. En effet, les chiffres sont difficiles à évaluer par un recueil non exhaustif des données et par l'importance des formes asymptomatiques.

La grippe engendrée par les virus influenza se manifeste classiquement sous 3 formes (Vabret *et al.* 2010) :

- Sporadique : présence de quelques cas dans la population générale,
- Epidémique : présence de nombreux cas, s'étendant rapidement et se propageant dans une région,
- Pandémique : extension rapide de l'infection à l'ensemble de la planète.

Depuis une dizaine d'années, 2 sous-types de virus influenza A saisonniers circulent de manière prépondérante. Le virus influenza A(H3N2) a dominé la majorité des hivers alors que le sous-type A(H1N1) a dominé uniquement durant les saisons 2000/2001 et 2007/2008 (Vabret *et al.* 2010) (données du GROG, tableau XII). Cependant, en février 2009, une nouvelle souche virale de sous-type H1N1 a émergé au Mexique et s'est propagée rapidement dans le monde entier.

Tableau XII : Semaines de franchissement du seuil épidémique défini par le Réseau des GROG France, octobre 1992 – avril 2011

Mois	octobre				novembre				decembre				janvier				fevrier				mars			avril			virus dominant		
	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14	15
Saisons																													
2010-2011																													B
2009-2010																													A(H1N1)pdm09
2008-2009																													A(H1N1)pdm09
2007-2008																													A(H3N2)
2006-2007																													A(H1N1)
2005-2006																													A(H3N2)
2004-2005																													B
2003-2004																													A(H3N2)
2002-2003																													A(H3N2)
2001-2002																													B
2000-2001																													A(H3N2)
1999-2000																													A(H1N1)
1998-1999																													A(H3N2)
1997-1998																													A(H3N2)
1996-1997																													A(H3N2)
1995-1996																													A(H3N2)
1994-1995																													A(H1N1)
1993-1994																													B
1992-1993																													A(H3N2)
																													B

* L'année 2009 comporte 53 semaines. Pour la saison 2009-2010, le seuil épidémique a été franchi de la semaine 47 à 53.

D'après (Réseau des GROG & CNR des virus Influenzae 2011)

2.2.2.1. Grippe saisonnière : virus influenza A(H1N1) et A(H3N2)

La grippe saisonnière donne classiquement des épidémies annuelles hivernales de novembre à mars dans les zones à climat tempéré. Dans les régions tropicales, elle circule toute l'année avec des pics survenant lors de la saison des pluies (Le Bâcle *et al.* 2006).

L'OMS estime que les épidémies annuelles de grippe seraient responsables de 3 à 5 millions de cas graves et de 250 000 à 500 000 morts chaque année dans le monde (OMS 2009a). Elles touchent en premier lieu les enfants de moins de 5 ans et les personnes âgées de plus de 65 ans.

Les virus influenza sont responsables d'environ un tiers des infections respiratoires chez les enfants hospitalisés pour une infection respiratoire (33 %), soit presque autant que le virus respiratoire syncytial (VRS, 33,9 %) et plus que les rhinovirus (20,8 %) (Vabret *et al.* 2010).

En règle générale, l'épidémie associe 2 virus influenza de type A et un virus de type B, correspondants aux souches virales présentes dans le vaccin anti-grippal de l'année en cours. Les infections impliquant le virus influenza A sont les plus fréquentes, dans près de 76,7 % des cas *versus* 23,2 % pour le virus influenza B ((Vabret *et al.* 2010), étude réalisée au CHU de Caen, septembre 2000 à avril à 2006).

2.2.2.2. Grippe porcine pandémique : virus influenza A(H1N1)2009

La pandémie grippale due au virus influenza A(H1N1)2009 a débuté au Mexique et s'est propagée à l'ensemble des continents en l'espace de 11 semaines. Sa progression s'est faite sur un mode épidémique par vagues dans les hémisphères nord et sud (Cohuet *et al.* 2009).

Les premiers cas sont survenus au Mexique (La Gloria, Veracruz) aux alentours de mi-février 2009. Aux Etats-Unis, les 2 premiers cas ont été confirmés biologiquement par le CDC (Center of Disease Control and Prevention) les 15 et 17 avril 2009 chez 2 enfants du sud de la Californie, non reliés épidémiologiquement et sans notion de voyage au Mexique. Les premiers cas français, importés du Mexique, ont été mis en évidence le 1^{er} mai 2009 (Tarantola *et al.* 2009). Au total, plus de 200 pays auraient été touchés (figure 6). L'OMS a déclaré la phase 6 de pandémie le 11 juin 2009 (figure 7).



Figure 6 : Pays ayant déclaré des cas confirmés de nouveau virus A(H1N1) au 5 juin 2009
D'après veille internationale sur données officielles (InVS, Ministère de la Santé,...)

PHASE 1	Aucun cas d'infection chez l'homme due à un virus circulant chez les animaux n'a été signalé.
PHASE 2	On sait qu'un virus grippal animal circulant chez des animaux domestiques ou sauvages a provoqué des infections chez l'homme et il est de ce fait considéré comme constituant une menace potentielle de pandémie.
PHASE 3	Un virus grippal réassorti animal ou animal-humain a été à l'origine de cas sporadiques ou de petits groupes de cas de maladie dans la population, mais n'a pas entraîné de transmission interhumaine suffisamment efficace pour maintenir les flambées à l'échelon communautaire.
PHASE 4	La transmission interhumaine d'un virus grippal réassorti animal ou animal humain capable de provoquer des flambées à l'échelon communautaire a été vérifiée.
PHASE 5	Le virus identifié a provoqué des flambées soutenues à l'échelon communautaire dans au moins deux pays d'une même Région OMS.
PHASE 6	Outre les critères définis pour la phase 5, le même virus a provoqué des flambées soutenues à l'échelon communautaire dans au moins un pays d'une autre Région de l'OMS.
PERIODE SUIVANT LE PIC DE LA PANDEMIE	Le nombre de cas de grippe pandémique a chuté au-dessous de celui observé lors du pic dans la plupart des pays exerçant une surveillance adéquate.
NOUVELLE VAGUE POSSIBLE	L'activité de la grippe pandémique augmente à nouveau dans la plupart des pays exerçant une surveillance adéquate.
PERIODE POSTPANDEMIE	L'activité grippale a retrouvé les niveaux normalement observés pour la grippe saisonnière dans la plupart des pays exerçant une surveillance adéquate.

Figure 7 : Description des phases de pandémie

D'après (OMS 2009b)

Il est estimé que près de quelques dizaines de millions de personnes auraient été atteintes par le virus A(H1N1)2009 au niveau mondial. La mortalité serait proche de celle des épidémies saisonnières avec une répartition différente en fonction des classes d'âge (Girard *et al.* 2010) ; (Vicente *et al.* 2011).

Les études françaises menées par le réseau des GROG démontraient que les personnes âgées de plus de 65 ans ont eu une contribution assez faible aux cas de grippe (2%) par rapport aux jeunes adultes mais importante aux décès (25%), résultant de la fréquence des comorbidités associées. Les facteurs de risques les plus fréquemment rencontrés étaient les pathologies respiratoires chroniques dont l'asthme (31%), le diabète (10%), les déficits immunitaires (7%) ou encore l'insuffisance cardiaque (7%). L'obésité (IMC $\geq$ 30) était fréquemment associée aux hospitalisations dues à la grippe, même si elle n'est pas encore considérée comme un réel facteur de risque.

Le nombre d'hospitalisations était élevé pour les enfants de moins de 5 ans. Les groupes de population sans facteurs de risques les plus à risque de faire une forme grave étaient les nourrissons de moins de un an dont le risque était multiplié par 5 et les femmes enceintes dont le risque était multiplié par 10. Ces dernières ont été particulièrement touchées par cette pandémie, de la même manière que lors des pandémies précédentes (Weil-Olivier 2010).

2.2.3. Clinique : la grippe

Les virus influenza sont les principaux virus responsables des formes cliniques de la grippe.

Après une courte période d'incubation de 1 à 3 jours, la grippe débute typiquement par l'apparition brutale d'une forte fièvre (38 à 41°C), de frissons, de céphalées, de myalgies, d'une toux sèche, de maux de gorge et d'une rhinite. La fièvre peut baisser transitoirement puis remonter formant un « V grippal ». La guérison est spontanée en 3 à 7 jours avec une persistance de la toux et de l'asthénie pour une durée de 2 semaines (Vabret *et al.* 2010).

La contagiosité est importante. Elle est présente 24 heures avant l'apparition des premiers signes cliniques et dure 5 à 7 jours. La contamination se fait en grande majorité par l'intermédiaire de micro-gouttelettes excrétées par les sujets contaminés.

Le diagnostic est plus difficile chez les personnes âgées de plus de 65 ans et chez les enfants de moins de 5 ans en raison d'une forme pauci-symptomatique de la maladie et de la possibilité de présenter de manière plus fréquente des symptômes extra-respiratoires (Vabret *et al.* 2010).

Au cours de la période de pandémie grippale en 2009, la présentation clinique due au « nouveau » virus était celle de la grippe saisonnière (période d'incubation, symptômes, complications,...) avec une plus forte prépondérance des symptômes extra-respiratoires (diarrhées, vomissements) dans 25 à 40 % des cas (Swedish *et al.* 2010).

L'évolution de la grippe peut se compliquer en raison d'une virulence particulière de la souche virale ou encore de la fragilité du terrain. Les complications s'observent particulièrement chez les personnes âgées et/ou porteuses d'une affection chronique respiratoire, cardiaque, métabolique ou d'un déficit immunitaire. Les complications les plus fréquentes sont les surinfections respiratoires bactériennes (pneumonies, sinusites, bronchites, otites,...), l'aggravation d'une maladie chronique pré-existante ou encore la pneumonie grippale primaire. Cette dernière peut évoluer exceptionnellement vers un tableau de « grippe maligne » avec un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) de sombre pronostic (Vabret *et al.* 2010) ; (Buisson *et al.* 2007).

2.2.4. Diagnostic biologique

Le diagnostic virologique direct se fait par test rapide immunochromatographique, par culture cellulaire sur cellules de rein de chien (MDCK), par immunofluorescence ou encore par biologie moléculaire (RT-PCR). Toutes ces techniques seront développées ultérieurement.

2.2.5. Prophylaxie et traitement

2.2.5.1. Traitement prophylactique et vaccination

La meilleure prophylaxie repose sur la vaccination anti-grippale. Les mesures d'hygiène fondamentales (lavage des mains, décontamination des surfaces,...) ainsi que les mesures d'isolement des patients hospitalisés sont d'autres moyens de prévenir la transmission des virus. Un traitement médicamenteux prophylactique n'est pas systématiquement recommandé. Il peut éventuellement être instauré en post-exposition chez des sujets non vaccinés présentant des facteurs de risque (SPILF 2005).

La vaccination n'a pas de caractère obligatoire, mais est une mesure individuelle à bénéfice collectif. Elle permet de prévenir 70 à 90 % des infections chez les adultes sains. Chez les personnes âgées, le vaccin réduit la sévérité de la maladie ainsi que la survenue des complications à 60 % et des décès à 80 % (OMS 2009a).

Lors des épidémies annuelles pré-pandémiques, la vaccination était recommandée chez les personnes âgées de plus de 65 ans et chez les sujets à haut risque de faire des complications (co-morbidités associées). Elle était également recommandée chez les professionnels de santé en contact régulier et prolongé avec les sujets à risque (Le Bâcle *et al.* 2006).

En octobre 2009, une campagne de vaccination massive contre le virus influenza A(H1N1)2009 a été proposée à l'ensemble de la population française. Les groupes de population prioritaires ont été modifiés face à l'épidémiologie différente du nouveau virus (tableau XIII). Cependant, la population française a été peu réceptive aux messages des autorités sanitaires par rapport aux autres pays comme les Etats-Unis ou le Royaume-Uni. En effet, seule 7,9 % de la population a été vaccinée essentiellement les enfants en bas âge et les femmes enceintes. Les raisons en sont un impact négatif des controverses faites autour du vaccin et la perception de cette grippe comme une infection finalement peu grave (Guthmann *et al.* 2010).

Tableau XIII : Groupes de population ayant un accès prioritaire à la vaccination H1N1 pandémique (ordre de priorité cotée de 1 à 5)

Groupes de population	Priorité	Objectifs
Femmes enceintes à partir du début du 2 ^{ème} trimestre	1	Réduire le risque de formes graves et de décès, surtout au cours des 2 ^{ème} et 3 ^{ème} trimestres de grossesse
Nourrissons âgés de 6 à 23 mois avec facteurs de risque	1	Réduire le risque de formes graves et de décès. Ce groupe comprend des nourrissons atteints de pathologies chroniques sévères
Entourage des nourrissons de moins de 6 mois	1	Réduire le risque de formes graves et de décès chez les nourrissons de moins de 6 mois ne pouvant pas encore être vaccinés
Sujets âgés de 2 à 64 ans avec facteurs de risque	2	Réduire le risque de formes graves et de décès. Ce groupe comprend des personnes atteintes de pathologies chroniques sévères
Sujets âgés de 65 ans et plus avec facteurs de risque	3	Réduire le risque de formes graves et de décès
Nourrissons âgés de 6 à 23 mois sans facteurs de risque	3	Réduire la transmission et le risque de formes graves et de décès
Sujets âgés de 2 à 18 ans sans facteurs de risque	4	Réduire la transmission
Sujets âgés de 19 ans et plus sans facteurs de risque	5	Réduire le risque de formes graves et de décès

D'après (Weil-Olivier 2010)

Les vaccins disponibles lors de la pandémie étaient des vaccins inactivés monovalents dont 2 d'entre eux contenaient un adjuvant destiné à renforcer leur immunogénicité, le squalène (PANDEMRIX®, FOCETRIA®). De tels vaccins n'étaient pas recommandés pour les femmes enceintes et les enfants de moins de 2 ans (Weil-Olivier 2010). La protection était assurée en 3 semaines.

Chaque année, l'OMS définit la composition d'un vaccin anti-grippal trivalent. La composition est modifiée lorsque se manifestent des changements des souches circulantes rendant le vaccin précédent inefficace. En février 2010, l'OMS a demandé d'inclure la souche pandémique A(H1N1)2009 dans le vaccin trivalent de la prochaine saison. Ainsi, les souches présentes dans les vaccins des saisons 2010/2011 et 2011/2012 étaient : « A/California/7/2009 (H1N1) », « A/Perth/16/2009 (H3N2) » et « B/Brisbane/60/2008 » (Nicand *et al.* 2011).

2.2.5.2. Traitement curatif

Le traitement curatif est symptomatique dans la très grande majorité des cas : repos, hydratation, anti-pyrétiques. Un traitement spécifique n'est recommandé que chez les patients présentant un haut risque de complications ou une forme sévère de la maladie. Il est idéalement instauré dans les 48 heures suivant les premiers signes cliniques, pour une durée de 5 jours (Swedish *et al.* 2010).

Il existe 2 classes de médicaments efficaces dans le traitement de la grippe :

- les adamantanes ou inhibiteurs de la protéine M2 : amantadine et rimantadine.

Ils empêchent l'acidification de la vésicule d'endocytose nécessaire à la libération des ARN viraux dans la cellule. Certains virus influenza sont résistants aux adamantanes tels que le virus influenza A(H1N1)2009 (Sullivan *et al.* 2010). Ces molécules sont très peu utilisées à l'heure actuelle.

- les inhibiteurs de la neuraminidase (NA) : zanamivir RELENZA® et oseltamivir TAMIFLU®.

Ce sont des analogues de l'acide sialique bloquant ainsi la libération des nouveaux virions. Ils sont très majoritairement utilisés car leurs effets secondaires sont moins importants, leur spectre d'action plus large et la sélection de mutants résistants moindre (SPILF 2005). Cependant, il existe des cas de résistance à l'oseltamivir, essentiellement les souches virales porteuses de la mutation H275Y (mutation spontanée remplaçant en position 275 l'histidine par la tyrosine), telles que les souches H1N1 saisonnières et H5N1 aviaires. Ces souches restent toujours sensibles au zanamivir (Vabret *et al.* 2010).

2.3. Paramyxoviridae

La grande famille des *Paramyxoviridae* regroupe plusieurs virus à l'origine d'infections respiratoires mais aussi d'autres virus qui ne sont pas des agents directs d'infections respiratoires (agents de la rougeole et des oreillons). L'arbre phylogénétique de la famille des *Paramyxoviridae* est représenté dans la figure 8.

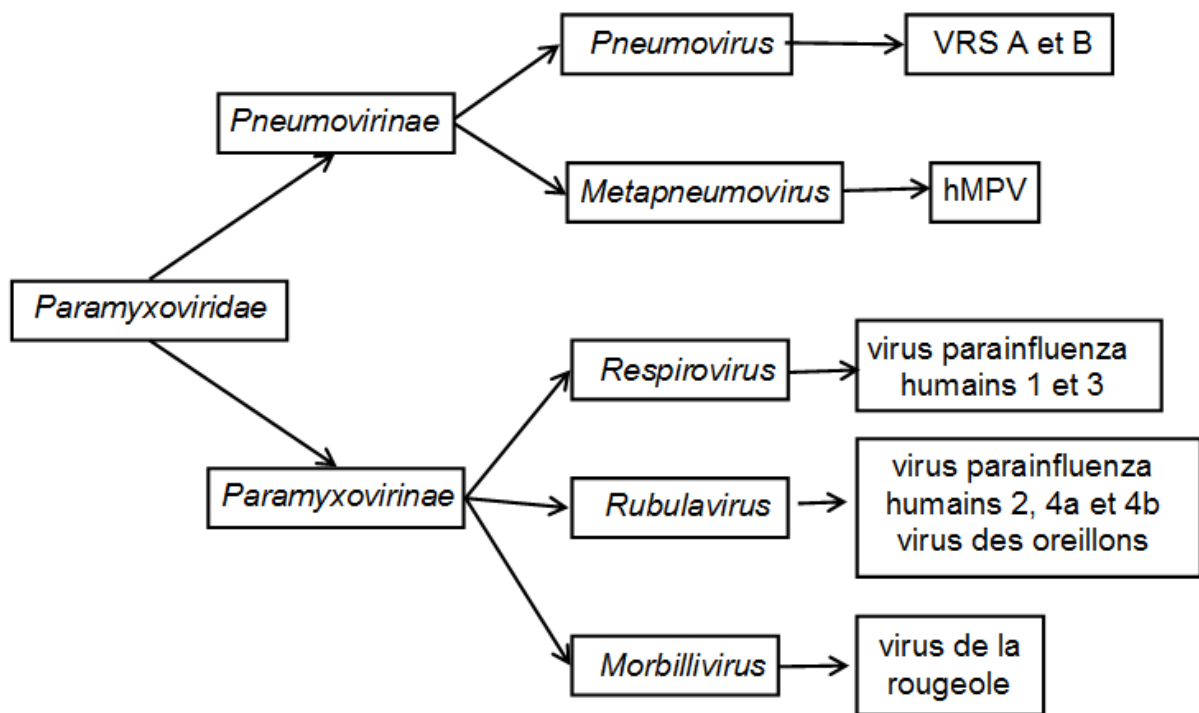


Figure 8 : Famille des *Paramyxoviridae*

D'après (Freymuth 2003)

2.3.1. Virus respiratoire syncytial

2.3.1.1. Agent causal

Le virus respiratoire syncytial (VRS) a été décrit pour la première fois par Breton *et al.* en 1961 dans une épidémie chez des nouveaux-nés prématurés (Freymuth *et al.* 2010).

Le VRS est un virus enveloppé à ARN dont il existe 2 sous-types majeurs : le sous-type A est responsable de symptômes plus sévères que le sous-type B (Leung *et al.* 2005).

2.3.1.2. Epidémiologie

Le VRS est responsable de la majorité des bronchiolites hospitalisées dans les pays développés (33,9 %), devant les virus influenza (33 %) et les rhinovirus (20,8 %) (Freymuth *et al.* 2010).

L'épidémie de bronchiolite survient chez les nourrissons de 1 mois à 2 ans avec un maximum entre 2 et 8 mois. Chaque année, elle touche environ 30 % soient 460 000 nourrissons (Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé 2000). A 2 ans, il est estimé que tous les enfants ont été contaminés par au moins une souche de VRS.

L'épidémie débute mi-octobre jusqu'à la fin de l'hiver avec un pic d'incidence unique au mois de décembre (Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé 2000).

La transmission interhumaine est favorisée par la promiscuité, l'urbanisation, la mise en collectivité précoce des enfants, la prématurité, les maladies cardio-pulmonaires, l'immunosuppression, le tabac, le statut socio-économique des parents,...

2.3.1.3. Clinique : la bronchiolite

Le terme de « bronchiolite aiguë » correspond à l'ensemble des bronchopathies obstructives le plus souvent imputées au VRS. Cependant, d'autres virus peuvent être impliqués tels que les virus influenza, les virus para-influenza, les adénovirus ou encore les rhinovirus (Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé 2000).

Selon la conférence de consensus de 2001, la bronchiolite est définie comme « un premier épisode survenant en période épidémique chez un nourrisson de plus de un mois et de moins de 2 ans, au décours immédiat (48 à 72 heures) d'une rhino-pharyngite peu ou pas fébrile, associant une toux, une dyspnée obstructive avec polypnée, tirage, surdistension thoracique (clinique ou radiologique), un *wheezing* (ou sifflements) ou des râles sibilants ou sous-crépitaux à prédominance expiratoire » (Freymuth *et al.* 2010).

La physio-pathologie est due à la formation d'un bouchon muqueux formé de cellules nécrotiques, de sécrétions muqueuses et d'exsudat séro-fibrineux obstruant ainsi la lumière bronchiolaire. Il existe un risque de fausses routes non négligeables du fait de la polypnée (Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé 2000).

Dans la plupart des cas, la maladie évolue favorablement vers la guérison, les signes d'obstruction bronchique persistent une dizaine de jours et la toux résiduelle une quinzaine de jours. Une surinfection bactérienne est observée dans 40 à 50 % des cas (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*) objectivée par une fièvre

élevée, une otite moyenne aiguë (OMA), des sécrétions bronchiques muco-purulentes, un foyer pulmonaire radiologique, une augmentation de la C-Reactive Protein (CRP).

2.3.1.4. Diagnostic biologique et traitements

Le diagnostic virologique est direct et il est effectué par test rapide immunochromatographique, par culture cellulaire sur fibroblastes pulmonaires humains (MRC5) ou cellules de carcinome de larynx (Hep-2), par immunofluorescence ou encore par RT-PCR (Thouvenot *et al.* 2004).

La prophylaxie repose essentiellement sur la mise en place de mesures d'hygiène primaires. Un traitement préventif par un anticorps monoclonal (palivizumab) peut être administré chez les enfants porteurs d'une maladie chronique respiratoire et chez les nouveaux-nés prématurés.

Le traitement curatif est essentiellement symptomatique (désobstruction naso-pharyngée, kinésithérapie respiratoire). Une oxygénothérapie peut être utilisée chez les patients avec une désaturation inférieure à 94 %. L'intérêt d'un traitement par ribavirine est encore discuté à l'heure actuelle (Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé 2000).

2.3.2. Métapneumovirus humain

2.3.2.1. Agent causal

Le métapneumovirus humain (hMPV) a été découvert en 2001 par une équipe hollandaise mais circulait déjà en Hollande depuis 1958.

Le hMPV est un virus à ARN. 2 sous-types se distinguent : le sous-type A est plus fréquent chez les enfants de moins de 3 ans et le sous-type B est plus fréquent chez les adultes (Freymuth *et al.* 2009).

2.3.2.2. Epidémiologie

La contamination est précoce dans la vie, la majorité des enfants étant infectés avant l'âge de 5 à 10 ans.

Il sévit plutôt en hiver tout comme le VRS. En effet, l'épidémie survient brutalement au mois de novembre et atteint son pic d'incidence aux mois de décembre et janvier pour se terminer très progressivement en mars. Cependant, la distribution saisonnière varie en

fonction des climats. Les infections à hMPV représentent 5 à 10 % des infections virales chez les enfants hospitalisés pour une infection respiratoire aiguë (Freymuth *et al.* 2009).

Il est possible d'avoir des co-infections du fait des saisonnalités et des cibles partagées avec les autres virus respiratoires, augmentant ainsi la fréquence des bronchiolites et des pneumonies chez les patients co-infectés par le hMPV.

2.3.2.3. Clinique

Les signes cliniques engendrés par le hMPV sont proches de ceux du VRS. L'infection reste limitée à l'arbre respiratoire (rhinite, toux, dyspnée,...) bien que d'autres manifestations cliniques associées sont parfois retrouvées. Cependant, à la différence du VRS, le hMPV atteint des enfants plus âgés, provoque plutôt des pneumonies ou de l'asthme qu'une bronchiolite et la sévérité clinique est moindre. En effet, les lésions au niveau des cellules épithéliales sont plus modérées (perte de ciliature, œdème, afflux de polynucléaires neutrophiles, désorganisation architecturale de l'épithélium respiratoire, sécrétion plus faible de cytokines,...) (Freymuth *et al.* 2009).

2.3.2.4. Diagnostic biologique et traitements

La méthode de choix pour le diagnostic direct est une RT-PCR, le virus peut aussi être recherché par des techniques moins sensibles telles que l'immunofluorescence ou encore la culture cellulaire sur cellules de rein de singe MK2 avec un ECP variable (Freymuth *et al.* 2009).

La prophylaxie repose sur les mesures d'hygiène classiques. Le traitement curatif est symptomatique.

2.3.3. Para-influenza virus

2.3.3.1. Agent causal

Les virus para-influenza (PIV) sont des virus à ARN monocaténaire avec une capside hélicoïdale et une enveloppe pourvue de spicules hémagglutinants. Il existe 4 sérotypes prédominants : PIV-1, PIV-2, PIV-3 et PIV-4 (Hall 2001).

Les 3 premiers virus para-influenza ont été découverts dans les années 50, le dernier, PIV-4, s'est rajouté aux autres en 1959 (Henrickson 2003).

2.3.3.2. Clinique

Les infections sont assez proches de la symptomatologie grippale, localisées au niveau de l'arbre respiratoire :

- le sous-type PIV-3 est essentiellement responsable d'infections hautes (rhinites, trachéites, laryngites) chez les enfants de 2 ans et d'infections respiratoires basses (pneumonies, bronchiolites) chez les nourrissons,
- les sous-types PIV-1 et PIV-2 infectent plus largement le larynx (laryngo-trachéites aiguës) chez des enfants plus âgés (5 ans) (Hall 2001),
- le sous-type PIV-4 entraînerait des atteintes respiratoires mineures (Henrickson 2003).

2.3.3.3. Epidémiologie

Le sous-type PIV-3 est le sous-type le plus fréquemment retrouvé (62,7 %) devant les autres sous-types PIV-1 (25,3 %), PIV-2 (7,3 %) et PIV-4 (4,6 %). Les virus para-influenza représentent 6,8 % de l'ensemble des virus isolés chez les enfants hospitalisés pour une infection respiratoire (Freymuth *et al.* 2010).

Les infections dues au sous-type PIV-3 surviennent au printemps et surtout en été de chaque année. Le sous-type PIV-1 est plus rare et évolue sous une forme épidémique au moment de l'automne tous les 2 ans. Le sous-type PIV-2 survient également à l'automne (Hall 2001). Quant à l'épidémiologie du sous-type PIV-4, elle est mal connue.

Les réinfections par les virus para-influenza sont possibles (Hall 2001).

2.3.3.4. Diagnostic biologique et traitements

Le diagnostic est direct et est réalisé par culture cellulaire sur cellules MK2 ou Hep-2, par immunofluorescence ou encore par biologie moléculaire (RT-PCR) (Thouvenot *et al.* 2004).

La prophylaxie repose sur les mesures d'hygiène classiques. Le traitement curatif est symptomatique.

Tableau XIV : Tableau récapitulatif de l'ensemble des virus respiratoires

VIRUS	CLASSIFICATION	STRUCTURE	EPIDEMIOLOGIE	PREVALENCE	CLINIQUE	TRAITEMENT PREVENTION	BIOLOGIE	REFERENCE
Influenza virus	Famille <i>Orthomyxoviridae</i> Genre <i>Influenzavirus</i> Espèce Influenza A virus (FLUAV) Sous-types circulants H1N1 H3N2	ARN – sb Virus enveloppé (HA, NA) Capside hélicoïdale	H1N1 pandémique Apparition mi-février 2009 Mexique ⇒ USA ⇒ Europe Quelques dizaines de millions de cas dans le monde Démarrage précoce Jeunes adultes 18-49 ans plus touchés Formes graves (SDRA) H3N2, H1N1 saisonniers Epidémies novembre-mars Personnes âgées > 65 ans et enfants < 2 ans 3-5 millions de cas graves par an dont 250 à 500 000 morts dans le monde	2 ^{ème} rang des infections virales respiratoires (33 %)*	Incubation 2 à 7 jours Fièvre brutale élevée, frissons, céphalées, myalgies, toux sèche, maux de gorge, rhinite Guérison 3 à 7 jours Persistance toux et asthénie 2 semaines Complications fréquentes sur terrains à risque	Traitement symptomatique +++ Traitement des patients à risque de complications et des formes graves de la maladie : Inhibiteurs de NA (oseltamivir, zanamivir) - 5 jours Vaccination annuelle des populations à risque et des soignants	Culture (MDCK) IF TDR RT-PCR	(Vabret <i>et al.</i> 2010)
Para influenza virus (PIV)	Famille <i>Paramyxoviridae</i> Sous-famille <i>Paramyxovirinae</i> Genre <i>Respirovirus</i> Espèces hPIV-1 et 3 Genre <i>Rubulavirus</i> Espèces hPIV-2, 4a et 4b	ARN – sb Virus enveloppé (HA) Capside hélicoïdale	PIV-1 et 2 Petites épidémies automnales (2-3 ans) Peu fréquents PIV-3 Epidémies fréquentes au printemps et en été Possibles réinfections PIV-4 Epidémiologie mal connue	5 ^{ème} rang des infections virales respiratoires (6,8 %)*	PIV-1 et 2 Laryngo-trachéites aiguës Enfants de 5 ans PIV-3 Incubation 3-5 jours Infections hautes +++ (rhinites, laryngites), enfants de 2 ans Pneumonies bronchiolites, < 6 mois PIV-4 Infections respiratoires minimes	Pas de traitement spécifique Prévention par mesures d'hygiène	Culture (MK2, Hep-2) IF RT-PCR	(Hall 2001)

* Etude réalisée chez les enfants hospitalisés pour une infection respiratoire aiguë au CHU de Caen et à l'hôpital de Flers de 2000 à 2006 (Freymuth *et al.* 2010)

VIRUS	CLASSIFICATION	STRUCTURE	EPIDEMIOLOGIE	PREVALENCE	CLINIQUE	TRAITEMENT PREVENTION	BIOLOGIE	REFERENCE
Virus respiratoire syncytial (hVRS)	Famille <i>Paramyxoviridae</i> Sous-famille <i>Paramyxovirinae</i> Genre <i>Pneumovirus</i> Espèces hVRS-A et B	ARN – sb Virus enveloppé Capside hélicoïdale	3 à 5 millions/an Acquisition précoce : 90 % à 2 ans, pic 2-6 mois Epidémies hivernales (novembre à mai, pic janvier-février) Souche A prédominante Contagiosité et manuportage +++ Réinfections fréquentes	1 ^{er} rang des bronchiolites (33,9 %)*	Incubation 2-4 jours Agent principal de la bronchiolite du nourrisson (+ autres infections respiratoires basses Fièvre, toux, respiration sifflante, détresse respiratoire	Hospitalisation des cas sévères : O ₂ , antipyrétiques,... Prévention par mesures d'hygiène Ig anti-VRS et anticorps monoclonal (palivizumab) chez prématurés et enfants avec terrain à risque	Culture (Hep-2, MRC5) IF RT-PCR	(Leung <i>et al.</i> 2005)
Méta pneumo virus (hMPV)	Famille <i>Paramyxoviridae</i> Sous-famille <i>Paramyxovirinae</i> Genre <i>Metapneumovirus</i> Espèces hMPV-A et B	ARN – sb Virus enveloppé Capside hélicoïdale ?	Contamination précoce (5- 10 ans) Epidémies hivernales (novembre à mars, pic décembre-janvier)	5 à 10 % des étiologies virales respiratoires chez les enfants hospitalisés	Incubation 2 jours Clinique comparable au VRS Pneumonies, asthme < bronchiolites Clinique moins sévère Evolution possible (OMA, conjonctivite...)	Traitement symptomatique Prévention par mesures d'hygiène	Culture (MK2, Hep-2) IF RT-PCR	(Freymuth <i>et al.</i> 2009)
Rhinovirus (RV)	Famille <i>Picornaviridae</i> Genre <i>Rhinovirus</i> Espèces hRV-A et B 101 sérotypes humains	ARN + sb Virus nu Capside icosaédrique	Tous les âges Circule toute l'année avec 2 pics saisonniers (mars- avril ; septembre-octobre)	3 ^{ème} rang des infections virales respiratoires (20,8 %)*	Incubation 1-4 jours Agent étiologique le plus courant du rhume et autres infections respiratoires hautes Infections basses rares OMA complication principale de l'enfant	Traitement symptomatique Absence de vaccin, prévention par hygiène (lavage des mains)	Culture (MRC5) RT-PCR	(Billaud & Lina 2004)
Entérovirus (EV)	Famille <i>Picornaviridae</i> Genre <i>Enterovirus</i> Espèces h-EV A, B, C, D 108 sérotypes	ARN + sb Virus nu Capside icosaédrique	Evolution toute l'année (pic épidémique entre mai et octobre) Incidence des sérotypes variable tous les ans et en fonction de l'âge Enfants < 1 an + touchés		Atteintes variées : neurologiques, cardiaques, cutanéomuqueuses, respiratoires hautes et basses, néonatales	Traitement symptomatique Prévention par mesures d'hygiène Vaccination en cours d'évaluation	RT-PCR	(Andréoletti <i>et al.</i> 2009)

*Etude réalisée chez les enfants hospitalisés pour une infection respiratoire aiguë au CHU de Caen et à l'hôpital de Flers de 2000 à 2006 (Freymuth *et al.* 2010)

**Etude réalisée à Caen entre novembre 2004 et mai 2005 chez les enfants hospitalisés pour lesquels la recherche de virus respiratoires classiques était négative (Freymuth *et al.* 2010)

VIRUS	CLASSIFICATION	STRUCTURE	EPIDEMIOLOGIE	PREVALENCE	CLINIQUE	TRAITEMENT PREVENTION	BIOLOGIE	REFERENCE
Coronavirus (CoV)	Famille <i>Coronaviridae</i> Genre <i>Coronavirus</i> Espèces hCoV répartis en 4 groupes Groupe 1 : 229E, NL63 Groupe 2 : OC43, HKU1 Groupe 3 : virus aviaires Groupe 4 : SARS-CoV	ARN + sb Virus enveloppé en couronne Capside hélicoïdale	Contamination précoce (100 % à 5 ans) Epidémies entre janvier et mai (pic en février)	4 ^{ème} rang des infections virales respiratoires (9,8 %)**	Infections respiratoires hautes et basses Syndrome pseudo-grippal ⇒ signes respiratoires ⇒ guérison ou détresse respiratoire SARS-CoV : mort par défaillance multi-viscérale Infections digestives, neurologiques ?? Contagiosité modérée	Traitement symptomatique Prévention par mesures d'hygiène	RT-PCR	(Vabret <i>et al.</i> 2009)
Bocavirus (BoV)	Famille <i>Parvoviridae</i> Sous-famille <i>Parvovirinae</i> Genre <i>Bocavirus</i> Espèce hBoV	ADN sb Virus nu Capside icosaédrique	Acquisition précoce (< 2 ans, pic 12 mois, rare < 6 mois) Circule toute l'année avec un pic en hiver et au début du printemps Co-infections fréquentes	5 à 10 % des infections virales respiratoires chez les jeunes enfants	Toux, fièvre, rhinorrhée ⇒ dyspnée, détresse respiratoire, OMA, signes digestifs, cutanés,... Tableaux d'intensité variable	Traitement symptomatique Prévention par mesures d'hygiène	PCR	(Foulongne & Segondy 2009)
Adénovirus (AdV)	Famille <i>Adenoviridae</i> Genre <i>Mastadenovirus</i> Espèces A, B, C, D, E, F 51 sérotypes humains	ADN db Virus nu Capside icosaédrique	Circule toute l'année avec recrudescence saisonnière (fin de l'hiver - début du printemps) Sérotypes endémiques : 1, 2, 5, 6 Sérotypes épidémiques : 7, 14, 21, 4	5 à 10 % des infections virales respiratoires	Infections respiratoires hautes (2, 1, 7, 3, 5) Infections digestives (40, 41) Infections oculaires (3, 7, 8, 19, 37) Infections disséminées chez l'immunodéprimé Aussi exanthèmes, cystites hémorragiques	Traitement symptomatique Prévention par mesures d'hygiène Ribavirine chez l'immunodéprimé	Culture (Hep-2) TDR IF PCR	(Venard <i>et al.</i> 2001)

**Etude réalisée à Caen entre novembre 2004 et mai 2005 chez les enfants hospitalisés pour lesquels la recherche de virus respiratoires classiques était négative (Freymuth *et al.* 2010)

2.4. Autres virus respiratoires

2.4.1. Coronavirus

2.4.1.1. Agent causal

Les coronavirus (CoV) constituent un grand groupe de virus infectant à la fois les mammifères et les oiseaux, dont 5 d'entre eux peuvent infecter l'homme : HCoV-229E et HCoV-OC43 découverts dans les années 60 ; SARS-CoV, le plus pathogène, responsable de l'épidémie de syndrome de détresse respiratoire aiguë sévère (SARS) de 2003 ; HCoV-NL63 et HCoV-HKU1 découverts plus récemment, respectivement en 2004 et en 2005 (Vabret *et al.* 2009).

Les coronavirus sont des virus à ARN. Leur enveloppe possède une structure caractéristique en forme de « couronne » visible en microscopie électronique, due aux spicules présents en surface. Ils possèdent le plus grand ARN viral connu à ce jour (27 à 31 000 nucléotides). Les mutations et les recombinaisons sont fréquentes (Vabret *et al.* 2009).

2.4.1.2. Epidémiologie

Les coronavirus ont été mis sur le devant de la scène depuis l'épidémie de SARS qui est survenue entre novembre 2002 et juillet 2003. L'épidémie a débuté à Hong Kong par un scientifique qui aurait contracté le virus dans la province de Guangdong. Contaminant 10 personnes dans l'hôtel où il a séjourné, l'épidémie a ensuite diffusé hors de la Chine, puis dans le reste du monde (Christian *et al.* 2004).

Les autres coronavirus, hors agents du SARS, provoquent des épidémies essentiellement entre les mois de janvier et de mai avec un pic d'incidence en février dans les pays au climat tempéré. Les 4 coronavirus co-circulent. Les primo-infections surviennent essentiellement pendant les premières années de la vie mais les réinfections sont fréquentes chez les adultes (Vabret *et al.* 2009).

Ils se classent derrière les infections respiratoires dues aux rhinovirus, VRS, hMPV et virus influenza à égale fréquence avec les virus para-influenza chez les enfants hospitalisés (Vabret *et al.* 2009).

2.4.1.3. Clinique

Les coronavirus font partie des agents responsables d'infections respiratoires hautes et basses. La contamination se fait par l'intermédiaire des gouttelettes des sécrétions oro-pharyngées des patients infectés, la transmission manu-portée est par contre rare. Ce virus est ainsi modérément contagieux.

Le tableau clinique débute par un syndrome pseudo-grippal puis apparaissent les signes respiratoires qui en s'aggravant conduisent à une détresse respiratoire grave nécessitant une ventilation assistée (Vabret *et al.* 2009). Dans le cas du SARS, le décès survient par une défaillance multi-viscérale. La mortalité est de 9,6 % et peut s'élever jusqu'à 45 % chez les personnes âgées de plus de 60 ans. Leur responsabilité dans les infections digestives et neurologiques est encore aujourd'hui controversée (Christian *et al.* 2004).

2.4.1.4. Diagnostic biologique et traitements

Les techniques moléculaires constituent les méthodes de choix pour la mise en évidence des coronavirus. Ils sont difficilement cultivables par absence d'ECP caractéristique et il n'existe pas encore d'anticorps spécifiques permettant de réaliser des techniques d'immunofluorescence (Vabret *et al.* 2009).

La prophylaxie repose sur les mesures d'hygiène classiques. Le traitement curatif est symptomatique.

2.4.2. Adénovirus, bocavirus et *Picornaviridae*

Il existe d'autres virus responsables d'une symptomatologie respiratoire non détaillés dans cette thèse. Il s'agit notamment de virus à ADN tels que les adénovirus (AdV) et le bocavirus humain (hBoV). Les rhinovirus et entérovirus appartenant à la famille des *Picornaviridae*, virus à ARN, doivent aussi être cités et sont très courants, essentiellement dans les infections respiratoires hautes d'évolution bénigne.

Les rhinovirus et les adénovirus n'ont pas de saisonnalité marquée et peuvent ainsi survenir à tout moment chez tout type de patient quelque soit son âge.

Partie 2 : Les prélèvements et les méthodes diagnostiques

1. Les prélèvements

La qualité du prélèvement est la condition indispensable pour tout diagnostic virologique fiable. Le prélèvement est effectué le plus tôt possible après le début de l'infection. Le site du prélèvement est orienté par la symptomatologie et le mode de transmission (porte d'entrée du virus, site d'excrétion et/ou site de multiplication primaire) (Pozzetto 2002).

Le prélèvement de choix pour diagnostiquer une infection respiratoire est l'aspiration nasale. Les écouvillonnages sont une alternative avec une sensibilité moindre. Les virus peuvent également être recherchés sur des prélèvements pulmonaires plus profonds (LBA, biopsie pulmonaire) (Leruez-Ville 2007).

Les prélèvements les plus couramment effectués pour un diagnostic virologique respiratoire sont les suivants (figure 9) :

- Écouvillonnage nasal : l'écouvillon est introduit dans la narine, il est poussé par rotations douces jusqu'à rencontrer une résistance au niveau de l'os,
- Écouvillonnage pharyngé : l'écouvillon est appliqué fermement sur les amygdales et la paroi postérieure de l'oro-pharynx sans toucher les dents, les joues, la langue ou les gencives lors du retrait,
- Écouvillonnage naso-pharyngé : l'écouvillon est introduit dans la narine parallèlement au palais, il est maintenu ainsi quelques secondes afin d'absorber les sécrétions,
- Aspiration nasale et naso-pharyngée : lavage et aspiration des sécrétions (plus aisée chez les patients intubés),
- Lavage broncho-alvéolaire (LBA) : il est réalisé au cours d'une fibroscopie par instillation et aspiration du sérum physiologique au niveau de bronches sous-segmentaires.

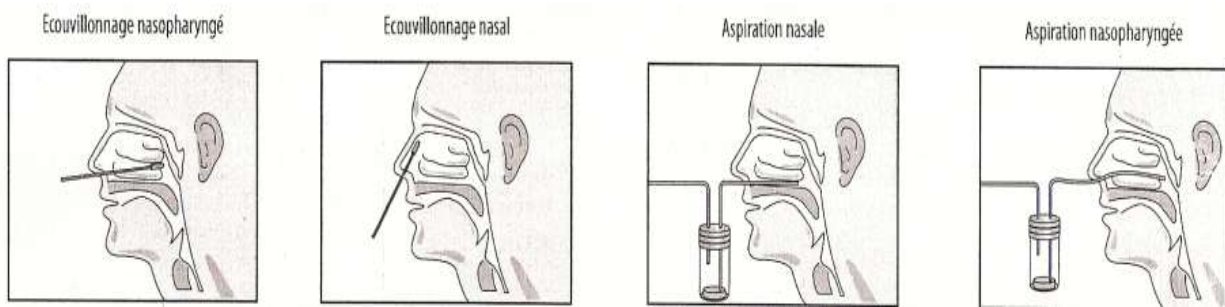


Figure 9 : Les différents types de prélèvements respiratoires

Les écouvillons doivent être placés dans un milieu de transport adapté (milieu UTM (Universal Transport Medium)). Dans le cas contraire, les écouvillons secs risquent de générer des résultats faussement négatifs, les virus étant des micro-organismes fragiles.

La culture cellulaire et les techniques d'immunofluorescence nécessitent des prélèvements riches en cellules. Les crachats sont de mauvais prélèvements par l'absence de virus adsorbés au niveau des cellules épithéliales.

Les LBA recueillis dans un récipient stérile à usage unique sont d'excellents prélèvements dans le cadre des infections respiratoires basses qui sont à privilégier pour le diagnostic moléculaire viral.

2. Les méthodes diagnostiques

Il existe plusieurs techniques utilisées dans le cadre du diagnostic virologique. Les méthodes conventionnelles sont en général longues (culture) ou manquent de sensibilité (IF) par rapport aux techniques de biologie moléculaire qui se sont développées de manière importante depuis plusieurs années.

2.1. Méthodes conventionnelles

2.1.1. Culture cellulaire

La culture cellulaire classique est la technique de référence en virologie. Elle est longue, fastidieuse et relativement coûteuse. Cependant, elle garde son intérêt pour le diagnostic des infections à virus facilement cultivables (herpès, CMV,...) et elle est irremplaçable pour l'isolement du virus sous sa forme infectieuse.

Chaque virus ayant un tropisme cellulaire propre, il n'existe pas de système de culture universel. Il existe différents types de cultures cellulaires : les cellules primaires issues de tissus normaux et les cellules en lignées continues (Pozzetto 2002).

Les prélèvements sont inoculés sur une nappe cellulaire. La présence de virus entraîne la formation d'un effet cytopathogène (ECP) évocateur d'un virus ou d'une famille de virus (Leruez-Ville 2007). Tout ECP observé fera l'objet d'une technique d'identification spécifique pour confirmer son origine virale (Thouvenot *et al.* 2004) .

Le délai de réponse est long, jusqu'à 3 semaines dans certains cas (Leruez-Ville 2007), d'où la difficulté d'employer la culture comme technique de routine. Toutefois, il existe des cultures dites rapides permettant de raccourcir le temps de réponse. Elles associent une centrifugation du prélèvement sur les cellules et une révélation à l'aide d'anticorps monoclonaux ciblant des antigènes précoces (Pozzetto 2002).

2.1.2. Test de détection rapide

Les tests de détection rapide (TDR) permettent une détection différentielle et qualitative rapide en 10 à 30 minutes des antigènes viraux. Les TDR peuvent être réalisés directement à partir des prélèvements respiratoires (écouvillons sur milieu de transport, aspirations).

Il s'agit de tests unitaires immunochromatographiques sur membrane au niveau de laquelle sont pré-adsorbés des anticorps monoclonaux de souris spécifiques du virus recherché et marqués par une enzyme (figure 10).

Les échantillons sont mis en présence du diluant contenu dans le kit, constitué des mêmes anticorps monoclonaux de souris également marqués. Ainsi, lorsque le virus est présent, le complexe antigène-anticorps migre par diffusion passive et se fixe au niveau de la bandelette où sont ancrés les anticorps (réaction de type « sandwich »). Une bande colorée se forme en réponse à la réaction enzyme-substrat. La bande contrôle justifie de la migration de l'échantillon et doit être présente pour valider le test (Leruez-Ville 2007).

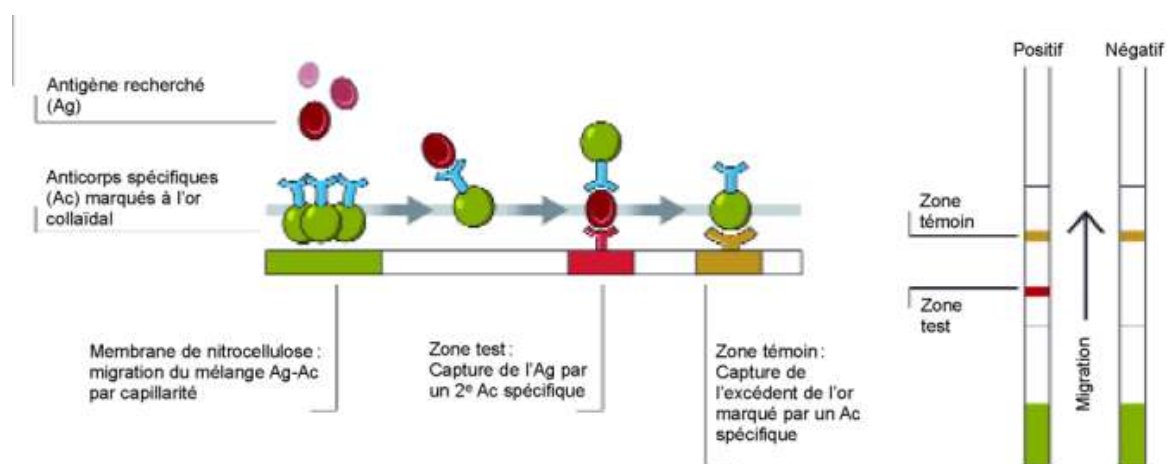


Figure 10 : Principe d'un test immuno-chromatographique

D'après (Goffard 2010)

La sensibilité des tests est inférieure à celle de la culture (75 à 80 % selon les études) et à celle des techniques de biologie moléculaire par RT-PCR (45 à 75 % selon les études). De plus, un test négatif n'exclut pas une infection (Leruez-Ville 2007).

Il existe des TDR pour détecter les virus de la grippe A, de la grippe A et B (et de la grippe A pandémique H1N1), ainsi que pour le VRS. Les kits utilisés au laboratoire de virologie du CHU de Nancy sont recensés dans le tableau XV.

Tableau XV : Kits utilisés au laboratoire de virologie du CHU de Nancy Brabois pour les tests de détection rapide des virus

Virus	Nom du kit	Fournisseur	Protéine cible
Influenza	Influenza Ag A/B/A(H1N1) Pandemic	SD Bioline	Hémagglutinine
VRS	Rapidiag VRS	BMD	Protéine F

2.1.3. Immunofluorescence

L'immunofluorescence (IF) permet la détection directe ou indirecte d'antigènes viraux présents à la surface des virus (constituants protéiques ou glycoprotéiques). Il s'agit d'une technique simple et rapide qui ne nécessite pas le maintien de l'infectiosité du virus. Toutefois, elle ne s'applique qu'aux infections riches en matériel viral (Pozzetto 2002).

Cette technique est très utilisée, notamment pour la détection des virus respiratoires (virus influenza A et B, virus para-influenza 1, 2 et 3, adénovirus, VRS, hMPV). D'excellents anticorps monoclonaux d'origine murine sont aujourd'hui disponibles dont l'intérêt réside dans la précision de l'épitope reconnu. Il est possible d'utiliser des anticorps ciblant un antigène de groupe commun à plusieurs virus ou au contraire ciblant un antigène spécifique (Société Française de Microbiologie 2000).

Des inclusions vertes sur contre-coloration rouge sont retrouvées dans les cellules infectées lors de la lecture au microscope à fluorescence.

La sensibilité de la technique reste inférieure à celle de la culture cellulaire (Leruez-Ville 2007).

Les techniques précédemment développées sont limitées en terme de sensibilité. Les TDR ont un spectre limité au VRS et aux virus influenza. Quant à la culture, elle est longue à mettre en œuvre et certains virus ne sont pas cultivables. C'est pourquoi ces techniques sont supplantées aujourd'hui par les techniques de biologie moléculaire beaucoup plus sensibles et permettant d'identifier un grand nombre de virus.

2.2. Biologie moléculaire

La PCR (Polymerase chain reaction) ou RT-PCR (Reverse transcriptase polymerase chain reaction) est la technique par excellence de biologie moléculaire employée pour la détection du génome viral. Son principe a été découvert par Kary Mullis en 1983. La PCR est une méthodologie hautement sensible et spécifique dont il existe de très nombreuses applications.

La PCR est une réaction en chaîne au cours de laquelle les produits issus d'un premier cycle d'amplification servent de matrice pour le cycle suivant. La quantité théorique des produits de PCR double à chaque cycle d'amplification par répétition des étapes de dénaturation, d'hybridation et d'élongation (Tse *et al.* 2003).

Le mélange réactionnel se compose d'ADN, d'amorces, de dNTPs, d'un tampon à base de magnésium ainsi que d'ADN polymérase. Chaque tube contenant ce mélange est placé dans un automate, le thermocycleur, qui a pour fonction de placer les tubes à une certaine température pendant un temps défini pour plusieurs cycles. Dans le cas d'un matériel génétique sous forme d'ARN, une étape préliminaire nécessite sa transformation en ADN complémentaire par la transcriptase inverse, c'est la RT-PCR.

Les limites sont le risque de générer des résultats faussement positifs par contaminations et des résultats faussement négatifs par la présence d'inhibiteurs de PCR contenus dans le prélèvement initial (Tse *et al.* 2003).

Au fil des années, la technologie a évolué avec le développement des PCR en temps réel puis plus récemment des PCR dites « multiplex » permettant de détecter plusieurs virus à la fois. Des PCR ou RT-PCR sont disponibles pour l'ensemble des virus respiratoires. Elles diffèrent entre elles par la cible choisie.

Les différences entre les 3 techniques de PCR sont explicitées dans le tableau XVI.

Tableau XVI : Méthodes moléculaires utilisées au laboratoire pour le diagnostic viral

Méthode	Description	Commentaires
PCR ou RT-PCR conventionnelle	Détection par électrophorèse sur gel avec agent intercalant, Southern blot suivi par une hybridation de sondes marquées (enzymes, radio-isotopes)	Absence de quantification Contaminations fréquentes Technique obsolète
PCR OU RT-PCR en temps réel	Produits de PCR évalués à chaque cycle Amorces spécifiques fluorescentes : hydrolyse, FRET	Multiplexage limité Quantitatif ou semi-quantitatif Hautement spécifique Faible risque de contamination Possibilité de PCR « maison »
PCR ou RT-PCR multiplex	PCR conventionnelle afin de fixer les amorces aux cibles Plusieurs amorces et cibles dans la même réaction d'amplification	Excellent multiplexage Quelques tests commercialisés Absence de quantification Risque de contamination

D'après (Olofsson *et al.* 2011)

2.2.1. Extraction

Avant toute réaction de PCR, une étape d'extraction préliminaire est nécessaire. L'extraction peut se faire de manière manuelle sur colonne de silice ou de manière automatisée par l'intermédiaire de particules de silice magnétisées.

Quel que soit le type d'extraction utilisé, le principe reste le même. Il repose sur la propriété de la silice à fixer les acides nucléiques (ADN et/ou ARN) par l'interaction des charges positives des groupements DEAE (diéthylaminoéthyl) situés à la surface de la résine de silice avec les charges négatives des groupements phosphate des acides nucléiques.

Ainsi, le matériel génétique est adsorbé à la surface de la résine, il sera purifié puis élué (lavage « final ») par différents lavages dans un tampon ou de l'eau distillée, permettant ainsi d'obtenir un matériel génétique purifié.

2.2.2. PCR ou RT-PCR en temps réel

Tous les systèmes de PCR en temps réel reposent sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits, permettant ainsi une quantification du matériel génétique. Il existe 2 principes généraux : les agents se liant à l'ADN (SYBR®Green) et les sondes fluorescentes. Ces dernières se déclinent en 4 technologies : hydrolyse de sondes (TaqMan), hybridation de 2 sondes par principe FRET (HybProbes), balises moléculaires (Molecular Beacons) et amorces scorpions (Scorpion primers) (Poitras & Houde 2002).

La technique de PCR en temps réel la plus fréquemment utilisée se fait par l'intermédiaire des sondes TaqMan.

Les sondes TaqMan sont des sondes oligonucléotidiques marquées en 5' par un fluorochrome émetteur (encore appelé reporter) dérivé de la fluorescéine et en 3' par un fluorochrome suppresseur (encore appelé quencher) dérivé de la rhodamine. Lorsque les 2 fluorochromes se trouvent à proximité l'un de l'autre, c'est-à-dire en absence de réaction de PCR, le quencher inhibe la fluorescence émise par le reporter. A l'inverse, lorsqu'il est stimulé, le fluorochrome émetteur transmet son énergie au fluorochrome suppresseur voisin par le principe FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfert) qui dissipe cette énergie sous forme de chaleur plutôt que d'émettre de la fluorescence. Lors de la réaction, l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase est mise à profit : elle va hydrolyser la sonde hybridée sur sa cible séparant alors le quencher du reporter. Ainsi, le reporter peut émettre sa

fluorescence dont le signal est proportionnel au nombre de sondes hydrolysées à la fin de chaque cycle d'amplification. La figure 11 schématise les différentes étapes de la PCR en temps réel utilisant les sondes TaqMan.

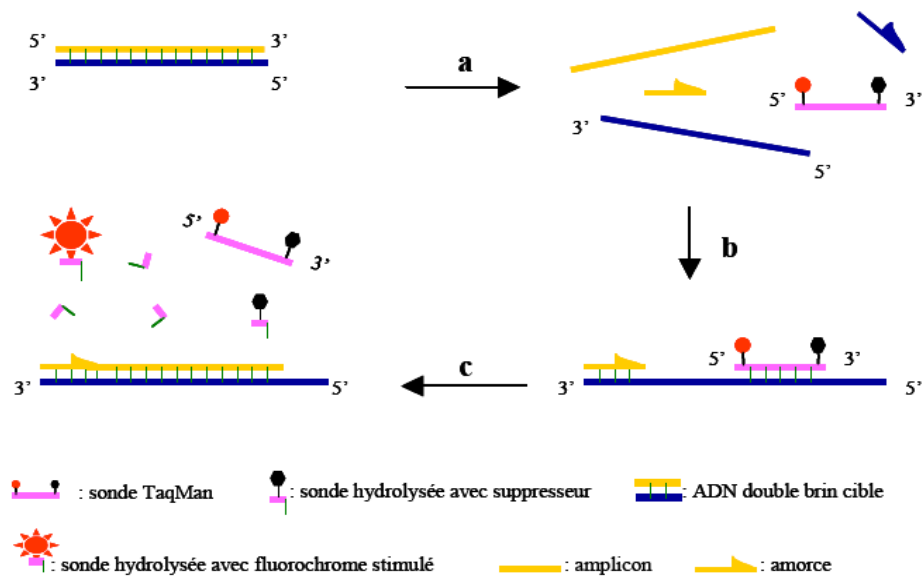


Figure 11 : Sondes TaqMan

(a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.

D'après (Poitras & Houde 2002)

La PCR en temps réel est une technique très spécifique, sensible, rapide et quantitative. Il s'agit d'un système fermé ne nécessitant pas de manipulations post-PCR permettant ainsi de s'affranchir des risques de contaminations et de réduire le temps de l'analyse (Poitras & Houde 2002). La PCR en temps réel permet également le multiplexage en détectant plusieurs cibles au cours de la même réaction d'amplification.

2.2.3. PCR ou RT-PCR multiplex

Les tests moléculaires multiplex permettent la détection simultanée d'un grand nombre d'agents pathogènes (jusqu'à 15 micro-organismes différents voire plus). Elle consiste en différentes amplifications indépendantes les unes des autres à l'aide d'un mélange d'amorces et de sondes contenues dans un seul tube. Toutes les cibles virales sont ainsi amplifiées au cours d'une seule réaction d'amplification. Dans ces conditions, la sensibilité de certains virus est diminuée, comparativement à une PCR en temps réel amplifiant un seul et unique virus à la fois.

2 techniques sont intéressantes à développer : Seeplex® et Luminex. Elles utilisent le principe d'une PCR classique : la réaction se déroule dans un thermocycleur standard avec une révélation en point final.

2.2.3.1. Technique Seeplex®

La technique Seeplex® est une technique multiplex permettant de détecter un grand nombre de virus respiratoires (Seeplex® RV15 ACE Detection, SEEGENE®).

La technique comprend en premier lieu une RT-PCR permettant de transformer l'ARN en ADN complémentaire (ADN_C). Elle est suivie d'une amplification dans 3 mix de PCR différents, chaque mix permettant d'amplifier un panel formé de 5 virus respiratoires (tableau XVII).

Tableau XVII : Panels de virus respiratoires utilisés par technique Seeplex® RV15 ACE Detection, SEEGENE®

Panels	Taille (pb)
<i>RV15 ACE (A Set)</i>	
Contrôle interne	850
Human adenovirus	534
Human coronavirus 229E/NL63	375
Human parainfluenza virus 2	264
Human parainfluenza virus 3	189
Human parainfluenza virus 1	153
<i>RV15 ACE (B Set)</i>	
Contrôle interne	850
Human coronavirus OC43	578
Human rhinovirus A/B/C	394
Human RSV A	269
Influenza A virus	206
Human RSV B	155
<i>RV15 ACE (C Set)</i>	
Contrôle interne	850
Human bocavirus 1/2/3/4	579
Influenza B virus	455
Human metapneumovirus	351
Human parainfluenza virus 4	249
Human enterovirus	194

RSV : Respiratory syncytial virus

La détection des produits issus des 3 PCR se fait manuellement par une électrophorèse sur gel d'agarose, ou à l'aide d'un automate utilisant une technique d'électrophorèse capillaire. Les molécules d'ADN, chargées négativement par la présence de groupements phosphate,

migrent vers l'anode sous l'effet d'un champ électrique. La séparation des fragments d'ADN dépend de leur masse moléculaire.

Il est nécessaire d'avoir au moins une bande de contrôle interne visible justifiant ainsi du bon déroulement de l'extraction et de l'amplification. Les autres bandes correspondent à la présence d'un type de virus dont l'identification se fait grâce au marqueur de taille associé.

La technique Seeplex® (Chun *et al.* 2007) ; (Kim *et al.* 2009) est basée sur une PCR multiplex utilisant des amorces en 2 parties (DPO, Dual Priming Oligonucleotide), de tailles différentes et séparées par une séquence polydeoxyinosine. Cette séquence possède la propriété d'avoir une faible température d'hybridation grâce à ses liaisons hydrogène de faible énergie (figure 12).

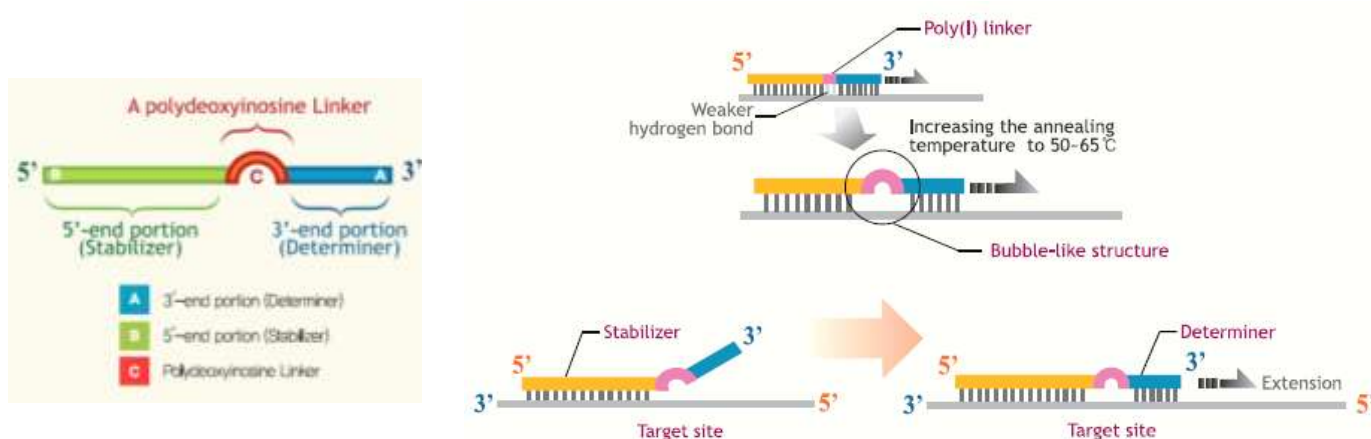


Figure 12 : Principe du système Dual priming oligonucleotide (DPO)

L'extrémité 5' se fixe préférentiellement à la matrice d'ADN. Elle agit comme « stabilisateur ».
L'extrémité 3' se fixe sélectivement à la cible et permet l'amplification sélective de celle-ci. Elle agit comme « déterminant ».

D'après (Seegene 2012)

L'étude menée par Chun (Chun *et al.* 2007) a permis de comparer la technique DPO à une PCR multiplex utilisant des amorces classiques. La PCR multiplex est une méthode rapide et économique mais elle est à l'origine de résultats faussement positifs du fait de la compétition entre les différentes amorces, de la formation de dimères ou encore de l'utilisation de différentes températures d'hybridation. La technique DPO permet justement de faire abstraction des amplifications non spécifiques, assurant ainsi une bonne spécificité de l'amplification sans générer de bruit de fond. En effet, les deux extrémités 3' et 5' des amorces DPO doivent toutes les 2 s'hybrider correctement pour générer une amplification de la séquence-cible (figures 13 et 14).

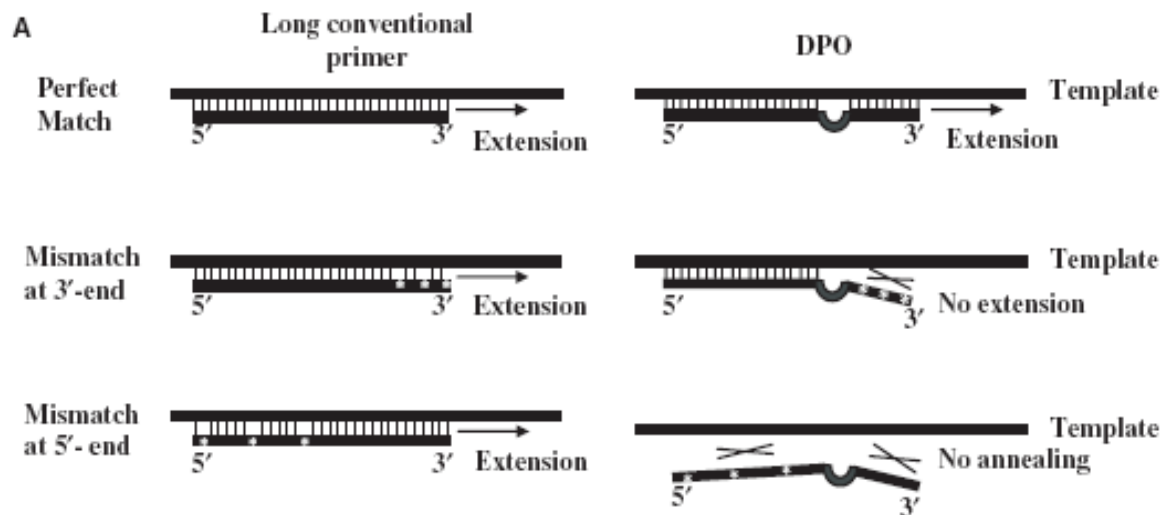


Figure 13 : Système Dual Primers Oligonucléotide (DPO)

D'après (Chun *et al.* 2007)

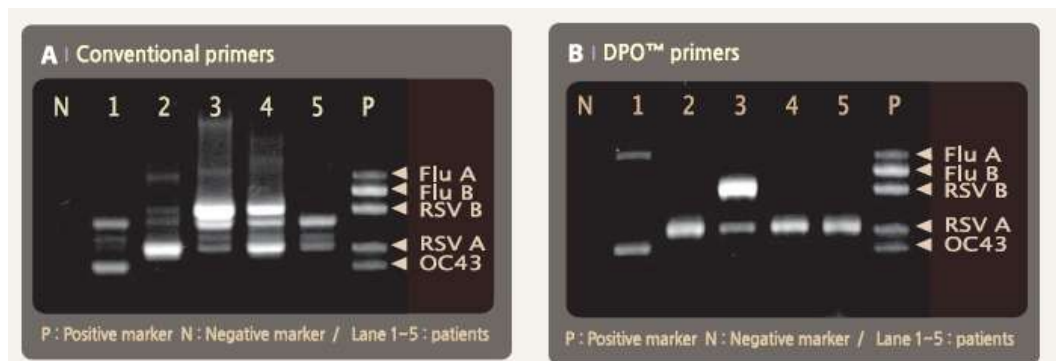


Figure 14 : Comparaison des résultats entre les techniques utilisant la PCR multiplex conventionnelle (A) et le système DPO (B)

D'après (Seegene 2012)

2.2.3.2. Luminex

La technologie Luminex²⁰⁰ xMAP® Technology combine les compétences de la technique de « cytométrie » en flux à 2 lasers et une utilisation de microsphères ou microbilles en polystyrène.

Cette nouvelle technologie connaît des applications diverses dans plusieurs disciplines de la biologie médicale (microbiologie, histo-compatibilité, auto-immunité, génétique,...).

La sensibilité est cependant toujours inférieure par rapport aux techniques multiplex en temps réel.

2.2.3.2.1. Principe

2.2.3.2.1.1. Microsphères

Les microsphères sont des billes de polystyrène de 5,6 µm de diamètre dans lesquelles sont incorporés 2 fluorochromes au cours de leur fabrication leur permettant d'émettre dans le rouge (longueur d'onde de 675 nm) et dans l'infra-rouge (longueur d'onde supérieure à 712 nm). Chaque bille contient un ratio différent des 2 fluorochromes permettant ainsi à chaque bille d'avoir son propre « code couleur ». De ce fait, elles sont toutes différentes les unes des autres (Moalic *et al.* 2004).

Les billes, par l'intermédiaire de leurs groupements carboxylate, servent de support solide à différentes molécules s'y liant de manière covalente par leurs groupements aminés : antigènes purifiés, anticorps de capture, sondes nucléiques caractéristiques d'allèles particuliers.

2.2.3.2.1.2. Automate Luminex²⁰⁰

Le principe de l'appareil est similaire à celui d'un cytomètre en flux, les cellules étant dans ce cas remplacées par les billes de polystyrène. En effet, la suspension de billes contenue dans chaque puits est aspirée, puis acheminée devant les 2 lasers par une veine liquide, permettant ainsi un passage de chaque bille de manière séparée.

Chaque laser a un rôle bien défini et différent :

- le laser « rouge » à diode (633 nm) excite les fluorochromes contenus dans les billes. Elles émettent ainsi dans le rouge et l'infra-rouge, permettant ainsi l'identification précise de chaque bille.
- le laser « vert » (532 nm) excite le fluorochrome (phycoérythrine PE) couplé à une molécule reporter. Cette molécule (anti-immunoglobuline ou produit d'amplification) permet de détecter l'interaction antigène/anticorps ou sonde/amplicon à la surface des billes. Ainsi, la fluorescence émise est le témoin de la positivité de la réaction (Moalic *et al.* 2004).

2.2.3.2.2. Applications en virologie

Dans le cadre des applications de la technologie Luminex en virologie, les sondes nucléotidiques couplées aux billes sont spécifiques d'une séquence virale (région très conservée au sein d'un virus ou d'une famille de virus).

L'étape préliminaire consiste à amplifier des régions cibles très conservées de différents virus par PCR ou RT-PCR grâce à des amorces biotinylées. Les produits de PCR sont ensuite dénaturés puis mis en contact avec les billes, cette étape est appelée « hybridation » : l'amplicon se fixe à la sonde complémentaire adsorbée au niveau des billes.

L'interaction est ensuite révélée à l'aide de la streptavidine conjuguée à la phycoérythrine par l'intermédiaire de la biotine présente au niveau de l'amplicon (figure 15) (Moalic *et al.* 2004).

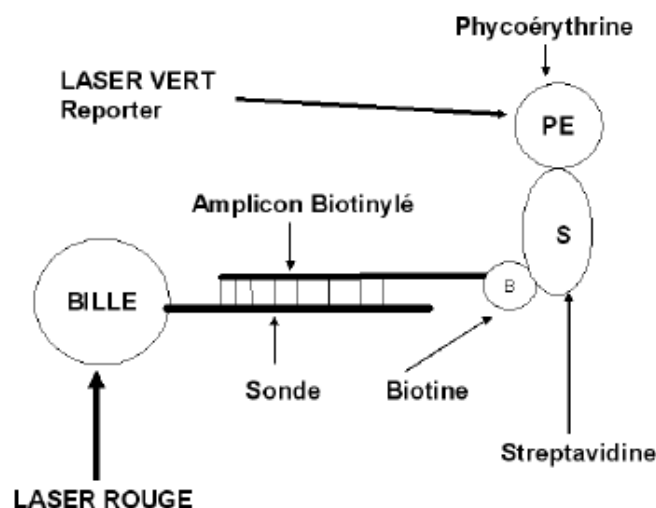


Figure 15 : Détection d'allèles spécifiques avec la technologie Luminex
D'après (Moalic et al. 2004)

2.2.3.2.3. Caractéristiques

La spécificité de la technique dépend des sondes fixées sur les billes. La sensibilité dépend de la qualité du marquage fluorescent (à noter que les billes sont extrêmement sensibles à la lumière).

La technique est simple à mettre en oeuvre. Chaque plaque ELISA possède 96 puits permettant ainsi l'analyse d'une grande quantité d'échantillons au cours d'une même série. De plus, la lecture d'un puits est rapide, en 20 à 90 secondes.

Elle permet également un multiplexage des analyses du fait de la présence de jusqu'à 100 billes différentes dans un même puits.

2.2.3.2.4. Evaluation de la technologie Luminex sur les virus respiratoires par rapport aux autres techniques diagnostiques

La PCR ou RT-PCR multiplex est utilisée dans le but de détecter la présence de un ou plusieurs virus respiratoires dans les échantillons. L'émergence de 5 nouveaux virus depuis l'an 2000 (hMPV, SARS-CoV, H5N1, CoV-NL63, CoV-HKU1, hBoV) représente un challenge aujourd'hui pour les laboratoires de virologie (Mahony *et al.* 2007).

Un test RVP (xTAG® Respiratory Virus Panel assay, ABBOTT®) a été mis en place et peut détecter jusqu'à une vingtaine de cibles virales respiratoires différentes au cours d'une même réaction d'amplification. Plusieurs études ont été entreprises afin d'étudier son intérêt et ses performances par rapport aux techniques d'utilisation courante.

L'étude de Ginocchio (Ginocchio *et al.* 2009) a comparé les différentes techniques (TDR, IF, R-Mix culture, Luminex xTAG® RVP Fast) au cours de l'épidémie de 2009 dans la région new-yorkaise (du 24 avril au 27 mai 2009).

Les prévalences des prélèvements positifs analysés par TDR, culture cellulaire, IF et RVP sont détaillées dans le tableau XVIII. La prévalence est nettement plus élevée pour le test RVP, reflet d'une plus grande sensibilité de ce dernier et d'un panel plus large de virus testés.

Tableau XVIII : Prévalence lors de l'épidémie new-yorkaise de 2009 des virus influenza A et des autres virus respiratoires dans les échantillons analysés par différentes techniques

	Virus influenza A	Autres virus respiratoires
TDR	13,7 % (518/3789)	Non effectué
R-Mix culture	17,7 % (482/2726)	▫ Adénovirus (1,2%), ▫ hMPV (1%), ▫ VRS (0,5%), ▫ PIV-1 (1,2%), PIV-2 (0,03%), PIV-3 (4,9%), ▫ Influenza B (0,5%)
IF	12,1 % (397/3271)	9,2 % (302/3289)
RVP <i>xTAG®</i> <i>RVP Fast</i> <i>Assay,</i> <i>ABBOTT®</i>	46,6 % (1265/2715)	<i>Prélèvements négatifs pour le virus influenza A</i> 21,4 % (580/2715) <i>Tous les prélèvements</i> 24,5 % (580 + 86 / 2715) ▫ Adénovirus (0,9%), ▫ hMPV (2,1%), ▫ VRS (0,6%), ▫ PIV-1 (1,6%), PIV-2 (0,1%), PIV-3 (2,8%), PIV-4 (0,7%), ▫ Influenza B, ▫ Coronavirus (0,6%), ▫ Entérovirus-rhinovirus (16,6%)

D'après (Ginocchio *et al.* 2009)

Les sensibilités et spécificités des techniques pour la détection des virus influenza A et du sous-type viral H1N1(2009) sont répertoriées dans le tableau XIX. Une plus grande sensibilité et spécificité de la technique RVP est constatée par rapport aux techniques classiques par culture cellulaire, immunofluorescence ou test immunochromatographique.

Tableau XIX : Comparaison des techniques pour la détection des virus influenza A (tous sous-types confondus) et du nouveau variant H1N1

	Sensibilité (%)		Spécificité (%)		VPP (%)		VPN (%)	
	Influenza A	H1N1	Influenza A	H1N1	Influenza A	H1N1	Influenza A	H1N1
TDR	20,7	17,8	93,6	93,6	84,1	77,4	41,8	47,9
IF	48,6	46,7	94,5	94,5	93,5	91,3	52,8	58,9
R-Mix	82,7	88,9	100	100	100	100	77,9	87,9
culture								
RVP	97,8	97,8	100	100	100	100	99,1	97,3

4 échantillons non sous-typés (uniquement positifs en culture)

175 échantillons positifs pour les virus influenza A (1 H1N1 saisonnier, 42 H3N2 saisonnier, 132 H1N1 pandémique)

D'après (Ginocchio *et al.* 2009)

L'étude menée par Gadsby (Gadsby *et al.* 2010) avait pour objectif de comparer les différentes techniques disponibles, à savoir la culture cellulaire et l'immunofluorescence (IF) par rapport aux techniques de biologie moléculaire (RVP Fast par Luminex et PCR en temps réel multiplex « maison » analysée sur ABIPRISM 7500).

La PCR en temps réel « maison » comprend 3 PCR multiplex et quelques PCR monoplex afin de couvrir l'ensemble des virus potentiellement responsables d'infections respiratoires :

- Panel 1 : Virus influenza A et B, VRS,
- Panel 2 : PIV-1, 2 et 3,
- Panel 3 : Adénovirus et *Mycoplasma pneumoniae*,
- PCR en temps réel monoplex pour les virus PIV-4, hMPV, CoV (229E, NL63, OC43, HKU1), rhinovirus, entérovirus/rhinovirus, hBoV.

La prévalence des échantillons positifs est de 13,6 % pour la culture et l'IF (39 prélèvements positifs sur 286 prélèvements totaux étudiés). Cette étude met clairement en évidence la plus grande sensibilité de la biologie moléculaire avec une prévalence augmentée à 49,7 % avec la PCR « maison » en temps réel (142 prélèvements positifs) et à 46,2 % avec la trousse RVP Fast (132 prélèvements positifs). Cette étude a permis également de mettre en évidence la présence de co-infections par 2 à 4 virus (15 % par PCR « maison » et 11,9 % par RVP Fast).

En comparant la technique par RVP Fast avec les résultats obtenus par PCR « maison », la sensibilité et la spécificité sont respectivement de 78,8 % et de 99,6 %. La technique RVP Fast par Luminex est donc un peu moins performante (c'est-à-dire moins sensible) du fait de la présence d'une plus grande quantité d'amorces et de sondes dans le but de détecter l'ensemble des cibles virales. Cependant, elle permet un gain de temps considérable du fait d'une seule et même réaction pour détecter l'ensemble des virus recherchés.

Partie 3 : Travail expérimental

L'objectif du travail réalisé est dans un premier temps de comparer l'épidémiologie des virus influenza et notamment celle du virus A(H1N1)2009 au cours des hivers 2009/2010 et 2010/2011 chez les patients hospitalisés en Lorraine. Les résultats obtenus ont également été comparés aux données rassemblées par l'InVS au niveau national.

Dans un second temps, le point sera fait sur les nouvelles technologies utilisées au laboratoire de virologie du CHU de Nancy lors de la saison hivernale 2011/2012. En effet, un automate Luminex a été mis à disposition au laboratoire depuis peu.

1. Matériel et méthodes

1.1. Populations étudiées

1.1.1. Etudes épidémiologiques rétrospectives nancéiennes de 2009 à 2011

De manière rétrospective, l'ensemble des patients ayant eu une recherche de virus influenza au cours des périodes hivernales nancéiennes de 2009/2010 (entre le 19 septembre 2009 et le 4 mars 2010) et de 2010/2011 (entre le 24 décembre 2010 et le 5 mai 2011) pour l'ensemble des services demandeurs (au CHU de Nancy et pour les CH extérieurs lorrains) ont été étudiés.

Pour la période hivernale 2009/2010, les données ont été recueillies selon les critères définis par l'InVS. En effet, dans le cadre de la surveillance épidémiologique de la pandémie grippale, les cas de grippe A(H1N1)2009 nécessitant une hospitalisation avaient pour obligation d'être signalés à l'InVS pour l'ensemble du territoire français (Fuhrman *et al.* 2009). Le signalement était effectué grâce à une fiche de renseignements standardisée et disponible en ligne sur le site internet de l'InVS (www.invs.sante.fr, lien exact dorénavant non disponible). Elle tenait compte des items répertoriés dans le tableau XX.

Tableau XX : Fiche de recueil standardisée élaborée par l'InVS pour le signalement des cas de gripes hospitalisées

ITEMS	COMPLEMENTS
Nom du laboratoire	
Numéro du prélèvement	
Nom du patient	3 premières lettres
Prénom du patient	en toutes lettres
Age ou date de naissance	
Code postal de résidence	
Commune de résidence	
Type de prescripteur	Urgentiste, praticien hospitalier, praticien libéral, pédiatre
Contexte clinique ou épidémiologique justifiant le prélèvement	Catégories A à G : ☐ <u>A</u> : Patient présentant des signes de gravité, ☐ <u>B</u> : Patient traité par antiviraux et présentant une aggravation clinique, ☐ <u>C</u> : Cas sporadique revenant de l'hémisphère Sud (zone où le virus A(H1N1)v circule), ☐ <u>D</u> : Cluster ou cas groupés, ☐ <u>E</u> : Patient sous chimioprophylaxie antivirale avec signes de grippe, ☐ <u>F</u> : Autre (à préciser dans l'onglet commentaire), ☐ <u>G</u> : Ne sait pas.
Date du prélèvement	
Lieu du prélèvement	
Hospitalisation	oui/non
Test de détection rapide	oui/non
Résultats de PCR M ou PCR grippe A	
Résultats de PCR H1sw	
Interprétation	
Commentaires	

1.1.2. Etude épidémiologique prospective nancéienne de la période hivernale 2011/2012

Les patients de l'étude prospective de l'année 2011/2012 (entre le 30 novembre 2011 et le 16 mai 2012) étaient essentiellement des patients issus des services de réanimation et de maladies infectieuses et tropicales du CHU de Nancy.

La technique Luminex (xTAG® RVP Fast assay, ABBOTT®) a été mise en place en réponse à la demande des services de réanimation qui souhaitaient disposer d'un panel plus large de virus respiratoires testés pour leurs patients. A chaque demande de l'ensemble des virus respiratoires analysés par technique Luminex, une fiche de renseignements cliniques y était associée (figure 16).

Demande d'analyses virologiques sur les prélèvements endoscopiques Laboratoire de Virologie Secteur de génomique microbienne Secrétariat du laboratoire : Tél : 03 83 15 34 68	
Nom : Prénom : DDN :	Date de prélèvement : Service : Téléphone : Médecin prescripteur :
N° de demande :	Nature du prélèvement : Quantité recueillie :

• **Recherches demandées**

- ☐ Virus respiratoires par biologie moléculaire
- ☐ Herpes Simplex Virus 1-2 (HSV1-2) par biologie moléculaire
- ☐ Cytomégalovirus (CMV) par biologie moléculaire
- ☐ Autres virus : à préciser ...

Renseignements cliniques obligatoires :

Date de début des symptômes :

Indications du prélèvement :

Contexte clinique :

Signes généraux :

- ☐ Fièvre ☐ Altération de l'état général ☐ Céphalées

Signes cliniques associés :

☐ Respiratoires :

- ☐ Sibilants, crépitants, râles... ☐ Rhinite, otite, conjonctivite, sinusite...
☐ Bronchite, bronchiolite ☐ Pneumopathie
☐ Insuffisance respiratoire aiguë ☐ SDRA

☐ Neurologiques :

- ☐ Méningite / Encéphalite ☐ Autres : myélite, Guillain Barré

☐ Digestifs

☐ Cardiaques : myocardite, péricardite.

☐ Autres : cutanés, rénaux, hématologiques....

Résultats radiologiques : Radio pulmonaire / TDM

- ☐ Normale ☐ Distension thoracique ☐ Foyer systématisé ☐ Sd broncho- alvéolaire

Résultats endoscopiques : à préciser...

Figure 16 : Fiche de renseignements cliniques associées aux demandes de Luminex au laboratoire de virologie du CHU de Nancy

Dans les autres cas de demandes de grippe, sans contexte clinique particulier à l'appui, le laboratoire effectuait une RT-PCR grippe A (dont H1N1) et B (Influenza A/B r-gene®, ARGENE®) (figure 17).

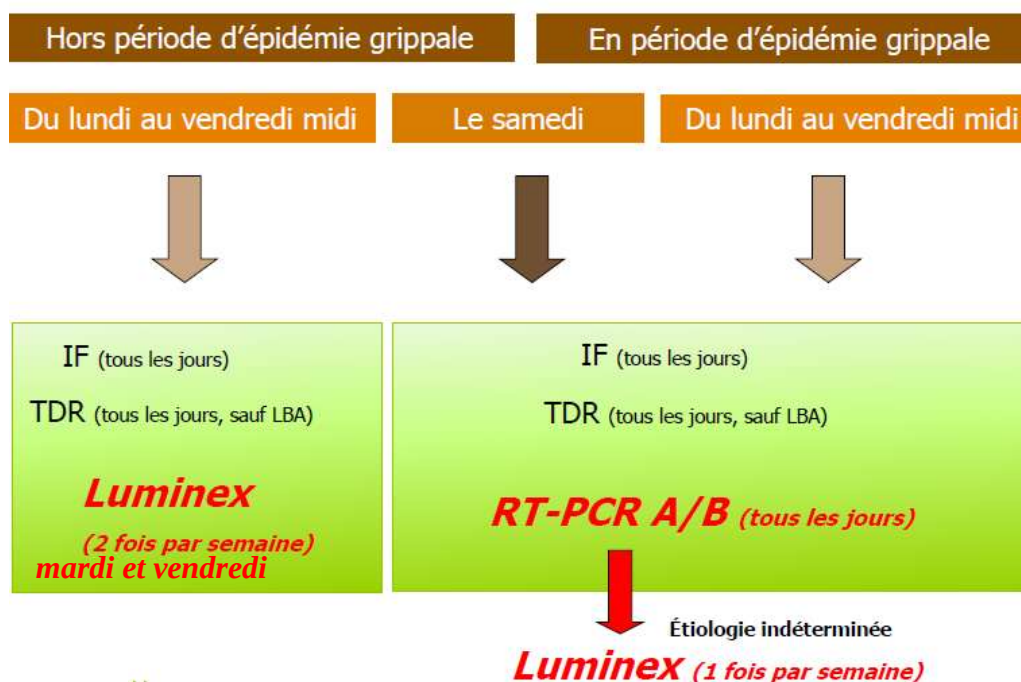


Figure 17 : Stratégie de prise en charge des prélèvements respiratoires au laboratoire de Virologie du CHU de Nancy au cours de l'hiver 2011/2012

1.2. Echantillons

Il existe plusieurs échantillons utilisés dans le cadre de l'analyse des virus respiratoires quelle que soit la technique utilisée (tableau XXI). Il s'agit des écouvillons (nasaux, pharyngés ou naso-pharyngés) transportés sur milieu UTM, des aspirations (nasales, pharyngées, trachéales) ou encore des prélèvements plus profonds (LBA, PDP).

Les crachats et les écouvillons secs sont des prélèvements à proscrire pour l'analyse des virus respiratoires.

Tableau XXI : Récapitulatif de l'ensemble des techniques utilisées pour la détection des virus influenza et des prélèvements adaptés

	TDR	IF	RT-PCR	LUMINEX
Ecouvillon naso-pharyngé (UTM)	+		+++	+++
Aspiration naso-pharyngée	+	+++	+++	+++
Aspiration trachéale		+++	+++	+++
LBA		+	+++	+++

+++ prélèvements conformes pour la technique ; + prélèvements tolérés

1.3. Techniques

Dans les études rétrospectives de 2009/2010 et 2010/2011, les échantillons ont été analysés par le panel RT-PCR grippe A/H1N1swl (Influenza A(M) & swl r-gene®, ARGENE®).

Dans l'étude prospective effectuée sur l'hiver 2011/2012, les prélèvements accompagnés d'une demande spécifique ont été analysés par technique Luminex (xTAG® RVP Fast Assay, ABBOTT®). Cette technique permet de détecter les virus influenza ainsi qu'un panel plus étendu des virus respiratoires. Les autres prélèvements sont analysés par la technique RT-PCR grippe A/B (Influenza A/B r-gene® amorces/sondes, ARGENE®).

Pour tous les prélèvements, une extraction de leur matériel génétique (ADN ou ARN) doit être effectuée au préalable.

1.3.1. Extraction

En période épidémique les années antérieures à 2009 et au début de la pandémie grippale de l'année 2009/2010, l'extraction était effectuée de façon manuelle sur colonne (QIAamp® viral RNA mini kit, QIAGEN® pour l'extraction des virus à ARN ; QIAamp® DNA mini kit, QIAGEN® pour celle des virus à ADN). Très vite, au vu du grand nombre de prélèvements reçus pour une recherche de virus H1N1 durant l'hiver 2009, l'extraction a été réalisée en méthode automatisée sur MagNA Pure LC, ROCHE® (Total nucleic acid Isolation kit - High Performance).

Depuis le début de la saison 2011/2012, un autre automate traite les prélèvements respiratoires, le Nuclisens®EasyMag (Nuclisens® EasyMag Extraction kit, protocole Generic B, BIOMERIEUX®).

Des contrôles sont extraits en même temps que les prélèvements quelle que soit la méthode d'extraction utilisée :

- Un contrôle négatif d'extraction et d'amplification W_0 : il permet de détecter les contaminations qui peuvent survenir lors des étapes d'extraction et d'amplification. Le W_0 est traité comme un échantillon, en même temps et selon le même protocole.
- Un contrôle interne inclus dans chaque échantillon : il permet de valider l'extraction et la RT-PCR pour les échantillons de la série (présence d'inhibiteurs). Il s'agit du MS2 (ARN simple brin linéaire de 3569 nucléotides) utilisé pour la technique Luminex. Aucun contrôle interne n'est inclus dans les échantillons testés pour la RT-PCR grippe A/B ou A/H1N1swl.

- Un contrôle cellulaire (Cell control r-gene®, ARGENE®) : il est associé à la RT-PCR grippe A/B et A/H1N1swl. Il permet de contrôler la présence de cellules dans l'échantillon et de visualiser les éventuels inhibiteurs présents.

1.3.2. Panel RT-PCR grippe A/B

La technique est une RT-PCR utilisée en routine pour le diagnostic des virus influenza A (dont le sous-type A(H1N1)2009) et des virus influenza B. Il s'agit d'une RT-PCR en temps réel réalisée au moyen de la technique des sondes d'hydrolyse TaqMan dont la fluorescence est mesurée par l'instrument ABI PRISM 7000 ou 7500, Applied BioSystems®.

Les trousseaux utilisés sont les trousseaux Influenza A/B r-gene® et Cell control r-gene® (contrôle cellulaire), ARGENE®. Le principe global des trousseaux fournis par la société ARGENE® est schématisé dans la figure 18.

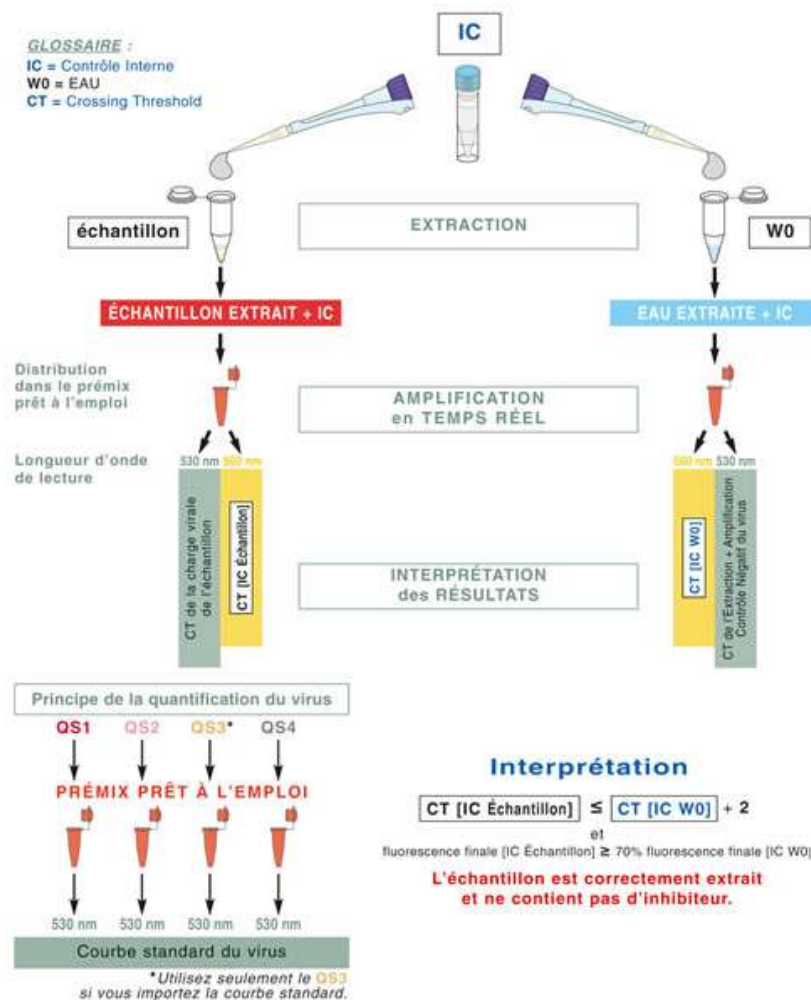


Figure 18 : Principe technique général des trousseaux de la société ARGENE® de PCR en temps réel

Les échantillons et les W_0 sont amplifiés par les 2 trousse ARGENE® (Influenza A/B r-gene® et Cell control r-gene®). Des contrôles positifs prêts à l'emploi sont également amplifiés :

- PC40 : contrôle positif correspondant à 2 plasmides reconnus spécifiquement par les amorces et les sondes de la trousse Influenza A/B r-gene®, ARGENE®,
- QS1 : standard de quantification de la trousse Cell control r-gene®, ARGENE®.

Les amorces ciblent une région très conservée au sein des virus influenza au niveau du gène M codant la protéine matricielle. Les fragments amplifiés mesurent 233 paires de base (pb) pour le virus influenza A et 146 pb pour le virus influenza B. Cette technique ne permet pas de différencier les sous-types des virus influenza A, notamment la souche A(H1N1) pandémique.

1.3.3. Panel RT-PCR grippe A/H1N1

La RT-PCR utilisant la trousse Influenza A(M) Group & swl r-gene®, ARGENE® se base sur le même principe que la RT-PCR précédente. L'identification spécifique du virus H1N1 requiert l'amplification du gène de la matrice M (233 pb) commun à tous les virus influenza A, ainsi que celle du gène de l'HA, spécifique au sous-type H1N1(2009). Cette trousse ne permet pas la détection des virus influenza de type B.

1.3.4. Luminex

La réaction est réalisée grâce à la trousse xTAG® Respiratory Virus Panel (RVP) Fast Assay, ABBOTT®. Les virus respiratoires détectés sont répertoriés dans le tableau XXII. Cette technique permet la détection simultanée et différenciée des virus influenza A(H1N1) saisonnier, A(H3N2) saisonnier, A(H1N1)2009 et B.

Tableau XXII : Virus respiratoires détectés par technique Luminex (test xTAG® RVP Fast Assay, ABBOTT®)

Virus	Type/sous-type viral
Influenza A	H1
	H3
Influenza B	
VRS	
Coronavirus	NL63
	HKU1
	229E
	OC43
Para-influenza	Para-influenza 1
	Para-influenza 2
	Para-influenza 3
	Para-influenza 4
hMPV	
Adénovirus	
Bocavirus	

La première réaction est une RT-PCR multiplex se déroulant dans un thermocycleur standard à différentes températures programmées pendant plusieurs cycles. L'étape suivante d'hybridation sur les billes est réalisée également dans un thermocycleur à une température constante de 45°C.

Au cours de la réaction, sont amplifiés les échantillons des patients, le ou les W_0 , le contrôle positif lambda et le contrôle négatif. Tous les échantillons sont ensuite analysés sur le Luminex.

2. Résultats

2.1. Etudes comparatives rétrospectives des 2 périodes hivernales 2009/2010 et 2010/2011

2.1.1. Techniques utilisées

Au cours des 2 périodes hivernales 2009/2010 et 2010/2011, la technique utilisée pour la recherche des virus influenza était la RT-PCR en temps réel (Influenza A(M) Group & swl r-gene®, ARGENE®).

2.1.2. Types d'échantillons

Le type d'échantillons respiratoires réceptionnés au laboratoire de virologie du CHU de Nancy Brabois pour une recherche de virus influenza a été évalué sur la période hivernale 2010/2011.

L'essentiel des prélèvements était représenté par les écouvillonnages des fosses nasales, qui représentaient 82,3 % de l'ensemble des échantillons reçus. Les autres prélèvements, dans des proportions bien plus faibles, étaient représentés par d'autres types d'écouvillonnages (buccal, pharyngé, gorge), des aspirations (nasale, trachéale), des prélèvements plus profonds de type LBA

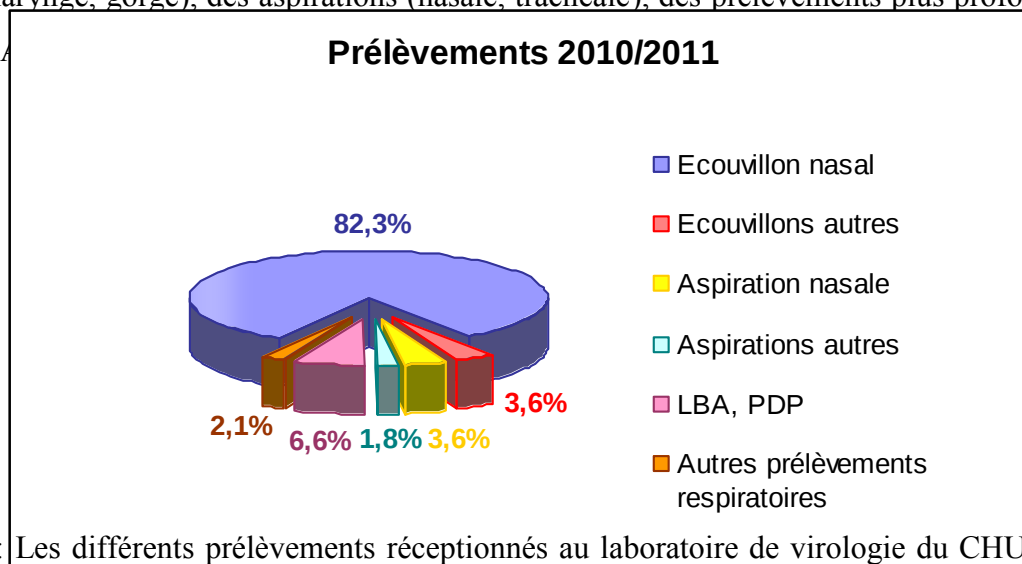


Figure 19 : Les différents prélèvements réceptionnés au laboratoire de virologie du CHU de Nancy pour une recherche de virus influenza au cours de l'hiver 2010/2011

Cette étude n'a pas été réalisée au cours de l'hiver 2009/2010 car l'item « type de prélèvement » ne faisait pas partie de ceux à renseigner pour l'InVS. De plus, au vu de la grande quantité de prélèvements reçus au cours de l'hiver 2009/2010, la recherche dans le logiciel informatique était difficile à entreprendre.

2.1.3. Patients étudiés

2.1.3.1. Période hivernale 2009/2010

Au cours de l'hiver 2009/2010, 1198 prélèvements ont été analysés pour une recherche de virus influenza A. Le sexe-ratio (homme/femme) au sein de la population étudiée était de 0,87 soient 556 hommes pour 641 femmes (et un patient dont le sexe n'était pas renseigné) avec une moyenne d'âge de 26 ans.

Le sexe-ratio (homme/femme) des échantillons positifs pour le virus A(H1N1)2009 était de 0,82 soient 170 hommes pour 208 femmes. La moyenne d'âge des patients dont les échantillons étaient positifs était de 19,8 ans. Les patients les plus jeunes étaient majoritairement atteints (56,2 % des échantillons positifs), puis les patients de 20 à 40 ans (28,4 %), et enfin les patients de 40 à 60 ans (12,4 %), les patients de plus de 60 ans ne représentant que 3 % (figure 20).

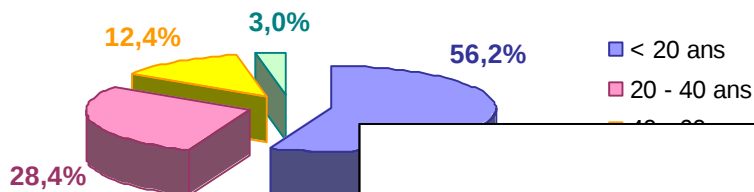
Les cas graves imputables au virus influenza A(H1N1)2009 avaient une répartition en fonction des classes d'âge différente de la précédente. Les personnes âgées de 20 à 40 ans représentaient 52,5 % des personnes hospitalisées dans les services de réanimation et positives pour le virus H1N1. Les personnes âgées de plus de 60 ans représentaient 31,8 % de cette même population (figure 21).

2.1.3.2. Période hivernale 2010/2011

Au cours de l'hiver 2010/2011, 333 échantillons ont été analysés pour une recherche de virus influenza A. Le sexe-ratio (homme/femme) au sein de cette population était de 1,15 soient 178 hommes pour 155 femmes avec une moyenne d'âge s'élevant à 49,25 ans.

Les échantillons positifs pour le virus A(H1N1)2009 avaient un sexe-ratio (homme/femme) de même ordre que celui obtenu pour l'ensemble de la population étudiée, soit 1,15, avec 46 hommes et 40 femmes. La moyenne d'âge des patients dont les échantillons étaient positifs était de 42,3 ans. La classe d'âge la plus atteinte au cours de l'hiver 2010/2011 était celle des patients âgés de 20 à 40 ans (45,5 % des échantillons positifs), suivie des plus de 60 ans (26,1 %), puis des 40-60 ans (21,6 %), et enfin les jeunes de moins de 20 ans représentaient 6,8 % (figure 20).

Hiver 2009/2010



Hiver 2010/2011

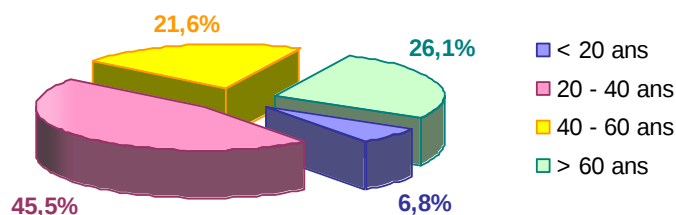
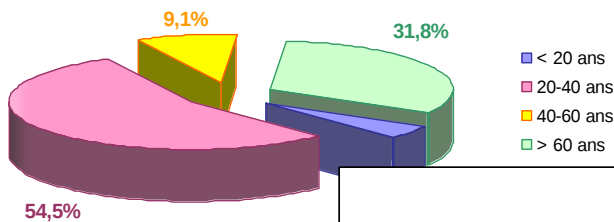


Figure 20 : Comparaison de la répartition des échantillons positifs pour le virus influenza A(H1N1)2009 en fonction des classes d'âge au cours des hivers 2009/2010 et 2010/2011 au CHU de Nancy

De même que lors de la saison précédente, les classes d'âge intermédiaires présentaient majoritairement une forme clinique grave. Les personnes âgées de 20 à 40 ans représentaient 30,8 % et les personnes âgées de 40 à 60 ans 46,2 % des patients hospitalisés en réanimation et dont les prélèvements étaient positifs pour le virus influenza A(H1N1)2009. Les personnes âgées de plus de 60 ans représentaient 23,1 % de cette population (figure 21).

Au total, 10 patients sont décédés dont 9 étaient hospitalisés en réanimation et 1 en hématologie avec une moyenne d'âge de 47,7 ans.

Hiver 2009/2010



Hiver 2010/2011

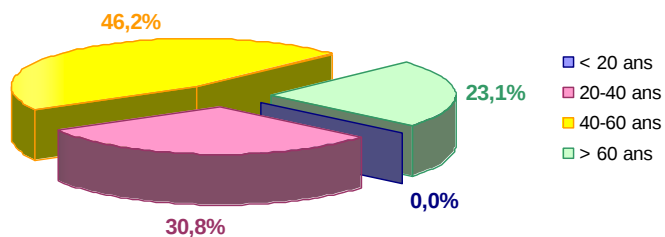


Figure 21 : Comparaison de la répartition des classes d'âge des patients H1N1(2009) positifs hospitalisés en réanimation au cours des périodes hivernales 2009/2010 et 2010/2011

2.1.4. Services cliniques

2.1.4.1. Période hivernale 2009/2010

La répartition des prélèvements en fonction des services cliniques prescripteurs a été étudiée pour l'ensemble de la population de l'étude ainsi que pour les échantillons positifs pour le virus influenza A(H1N1)2009.

Les résultats obtenus pour la période hivernale 2009/2010 sont les suivants (figure 22) :

- Dans les services de réanimation, de soins intensifs ou encore de surveillance continue, 123 prélèvements ont été effectués dont 13 se sont révélés positifs pour le virus influenza A(H1N1)2009. Ils représentaient 10,6 % de l'ensemble des prélèvements effectués au sein de ces services et 1,1 % des prélèvements totaux effectués tous services confondus.
- Dans les autres services hospitaliers (maladies infectieuses, pneumologie, cardiologie,...), 506 prélèvements ont été effectués dont 106 sont positifs. Ils représentaient 20,9 % des prélèvements effectués au sein de ces services et 8,8 % des prélèvements totaux.
- Au cours des consultations externes et autres admissions en service d'urgence, 490 prélèvements ont été effectués dont 226 sont positifs. Ils représentaient 46,1 % des prélèvements effectués au sein de ces services et 18,9 % des prélèvements totaux.
- Certains services ne sont pas renseignés, notamment en ce qui concerne la notion d'hospitalisation ou non des patients (CH extérieurs, maternité). Parmi eux, 79 prélèvements ont été effectués dont 33 sont positifs. Ils représentaient 41,8 % des prélèvements effectués au sein des services non renseignés et 2,8 % des prélèvements totaux.

En considérant uniquement les prélèvements positifs pour le virus A(H1N1)2009, 3,4 % provenaient de patients issus des services de réanimation, 28,1 % des autres services hospitaliers, 59,8 % des consultations externes et 8,7 % d'entre eux étaient de provenance non renseignée (CH extérieurs, maternité,...) (figure 23).

2.1.4.2. Période hivernale 2010/2011

La répartition des prélèvements en fonction des services cliniques a également été étudiée pour l'ensemble de la population de l'étude ainsi que pour les échantillons positifs pour le virus influenza A(H1N1)2009 lors de la période hivernale 2010/2011 (figure 22) :

- Dans les services de réanimation, de soins intensifs ou encore de surveillance continue, 112 prélèvements ont été effectués dont 22 se sont révélés positifs pour le virus influenza A(H1N1)2009. Ils représentaient 19,6 % des prélèvements effectués au sein de ces services et 6,6 % des prélèvements totaux tous services confondus. Pour 5 de ces prélèvements, l'analyse n'a pas été effectuée.
- Dans les services d'hématologie, 53 prélèvements ont été effectués dont 18 sont positifs. Ils représentaient 34 % des prélèvements effectués au sein de ces services et 5,4 % des prélèvements totaux. Pour un prélèvement, l'analyse n'a pas été effectuée.
- Dans les autres services hospitaliers (maladies infectieuses, pneumologie, cardiologie,...), 46 prélèvements ont été effectués dont 8 sont positifs. Ils représentaient 17,4 % des prélèvements au sein de ces services et 2,4 % des prélèvements totaux. Pour un prélèvement, l'analyse n'a pas été effectuée.
- Au cours des consultations externes et autres admissions en service d'urgence, 48 prélèvements ont été effectués dont 35 sont positifs. Ils représentaient 72,9 % des prélèvements effectués au sein de ces services et 10,5 % des prélèvements totaux.
- Les prélèvements en provenance des CH extérieurs n'ont pas été renseignés sur la notion d'hospitalisation ou de consultations des patients prélevés. Parmi eux, 74 prélèvements ont été effectués dont 3 sont positifs. Ils représentaient 4,1 % des prélèvements effectués au sein des services non renseignés et 0,9 % des prélèvements totaux.

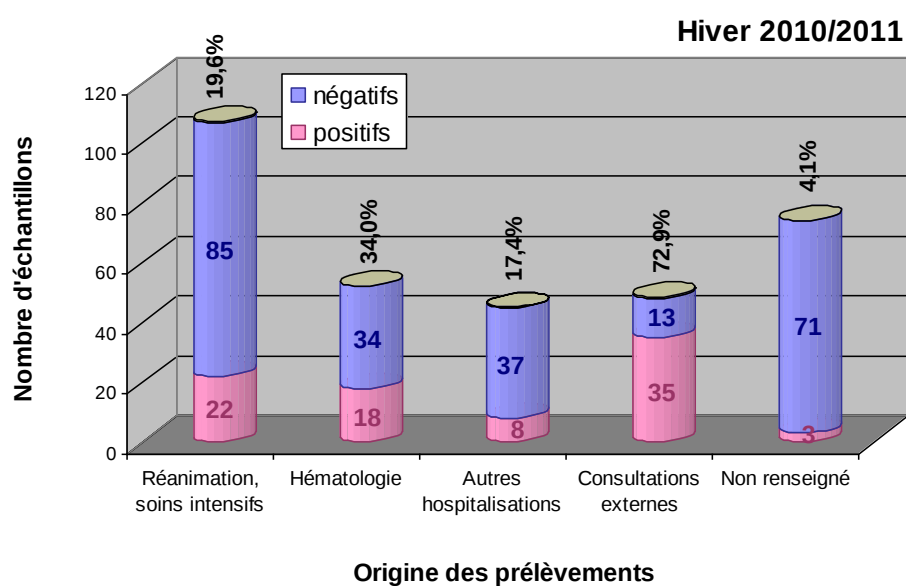
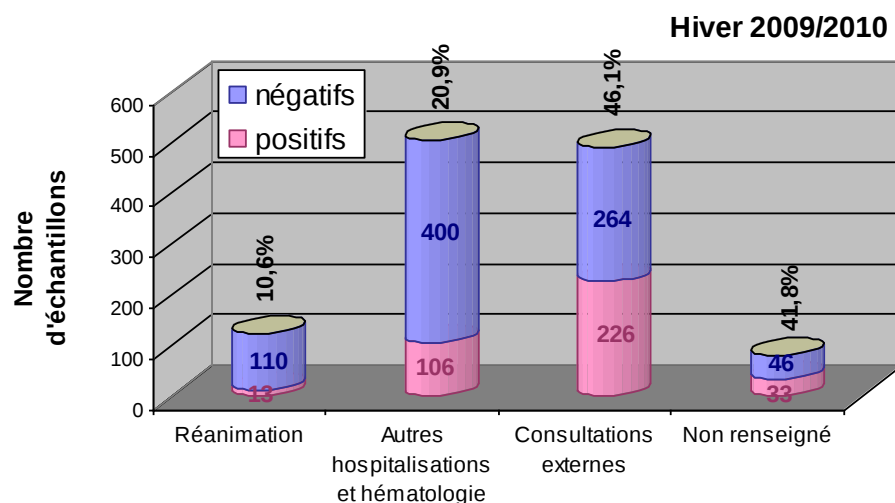
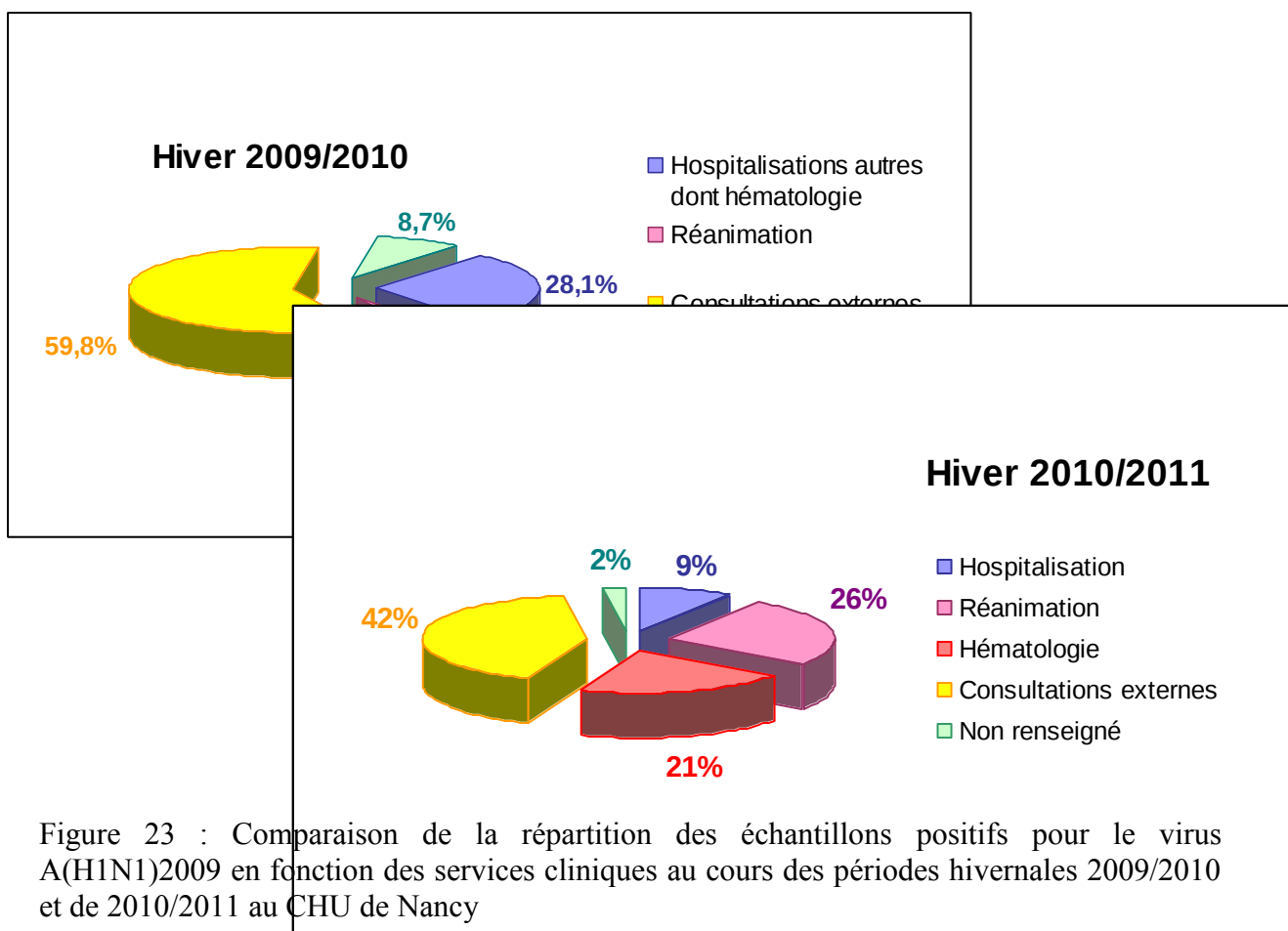


Figure 22 : Comparaison de l'origine de l'ensemble des prélèvements pour une recherche de virus influenza au cours des périodes hivernales 2009/2010 et 2010/2011 au CHU de Nancy

Parmi les échantillons positifs pour le virus A(H1N1)2009 de l'hiver 2010/2011, 25,6 % d'entre eux provenaient de patients issus de services de réanimation, 20,9 % des services d'hématologie, 9,3 % des autres services hospitaliers, 44,2 % des services de consultations externes et 3,5 % étaient de provenance non renseignée (CH extérieurs,...) (figure 23).



2.1.5. Epidémiologie du virus influenza A(H1N1)2009

2.1.5.1. Période hivernale 2009/2010

La proportion de positivité des échantillons au cours de l'hiver 2009/2010 était de 31,6 % tous virus influenza A confondus et de 31,1 % en ne tenant compte que des virus influenza A de sous-type H1N1 pandémique. Ce qui représentait un total de 378 prélèvements positifs (dont 373 étiquetés H1N1) pour 820 prélèvements négatifs. Le pic de détection est survenu lors de la semaine 47/2009 (16 novembre 2009) (figure 24).

2.1.5.2. Période hivernale 2010/2011

Au cours de l'hiver 2010/2011, la proportion de positivité des échantillons pour le virus influenza A(H1N1)2009 était de 26,4 %, ce qui représentait 86 échantillons positifs pour 240 échantillons négatifs (pour 7 prélèvements, l'analyse n'a pas été effectuée). Le pic de détection se situait au niveau de la semaine 4/2011 (24 janvier 2011) (figure 24).

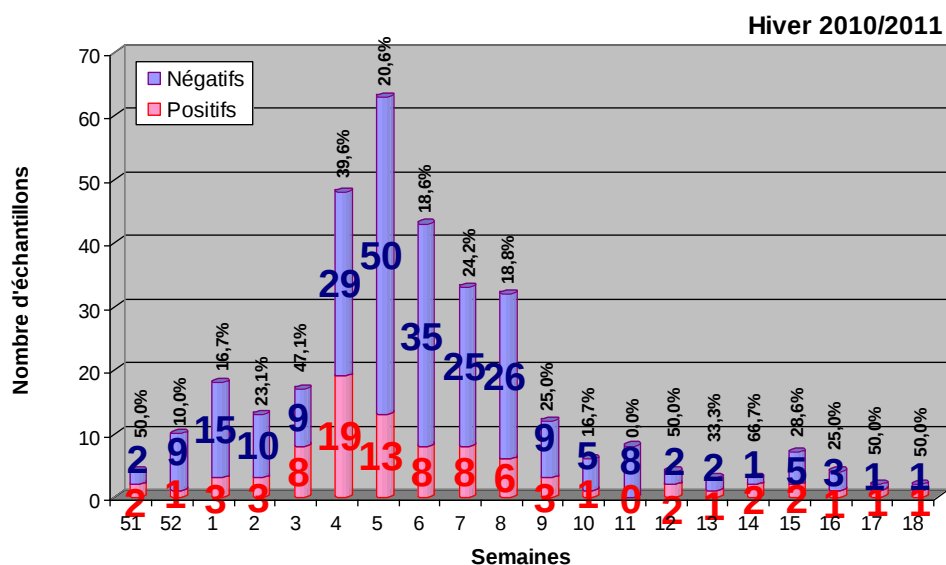
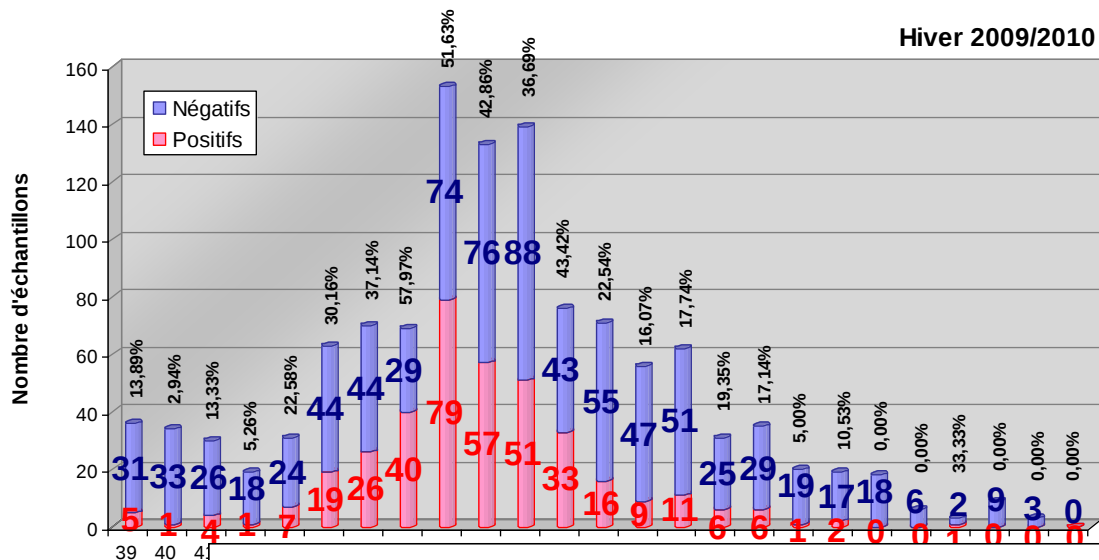


Figure 24 : Comparaison de la prévalence des échantillons positifs pour le virus A(H1N1)2009 au cours des périodes hivernales 2009/2010 et 2010/2011 au CHU de Nancy

2.2. Etude épidémiologique prospective de la période hivernale 2011/2012

2.2.1. Techniques utilisées

Durant la période hivernale 2011/2012, 89 patients ont eu un prélèvement pour une recherche de grippe, 68 ont été analysés par RT-PCR (Influenza A/B r-gene®, ARGENE®) et 21 par technique Luminex (xTAG® RVP Fast assay, ABBOTT®). L'extraction est réalisée par l'automate EasyMAG®, BIOMERIEUX®.

2.2.2. Types d'échantillons

Les prélèvements réceptionnés au laboratoire de virologie du CHU de Nancy Brabois étaient majoritairement des écouvillons (76 %), puis plus rarement des aspirations (14 %) ou encore des LBA (10 %).

2.2.3. Patients ayant bénéficié d'une recherche des virus respiratoires par technique Luminex

Le détail des renseignements recueillis grâce à la fiche de renseignements élaborée par le laboratoire de virologie du CHU de Nancy est décrit dans le tableau XXIII de la page suivante.

Les patients étaient des personnes majoritairement âgées (moyenne d'âge de 61,3 ans) : 48 % avaient plus de 65 ans, 33 % entre 45 et 65 ans alors que 19 % d'entre eux avaient moins de 45 ans. Ils avaient un terrain d'immunosuppression dans 67 % des cas.

Tous les patients dont les prélèvements ont été analysés avaient des signes cliniques respiratoires évocateurs. De la fièvre était présente chez 90 % des patients, souvent associée à une altération de l'état général (AEG) dans 52 % des cas. Les patients présentaient très fréquemment un syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA) dans 62 % des cas. Les autres symptômes étaient représentés par des syndromes pseudo-grippaux, la présence de sibilants à l'auscultation, des pneumopathies,... Très fréquemment, une image radiologique (81 %) était associée aux symptômes.

Le délai entre les premiers symptômes et le prélèvement respiratoire était majoritairement court. Pour 40 % des prélèvements reçus, le délai était de moins de 3 jours, pour 20 % entre 3 et 7 jours, pour 20 % entre 1 et 2 semaines, enfin pour 10 % il était supérieur à 2 semaines.

Tableau XXIII : Tableau de données des patients dont les prélèvements respiratoires ont été analysés par technique Luminex (xTAG® RVP Fast Assay, ABBOTT®)

NOM	SEXE	AGE	SERVICE CLINIQUE PRESCRIPTEUR	TYPE ECHANTILLON	DELAI (jours)	IMMUNO DEPRESSION	FIEVRE	SIGNES GENERAUX	SIGNES RESPIRATOIRES	AUTRES SIGNES	SIGNES RADIOLOGIQUES	VIRUS RESPIRATOIRES TESTES PAR TECHNIQUE LUMINEX	AUTRES AGENTS INFECTIEUX IDENTIFIES
CO	M	71	Réanimation	Aspiration nasale	2	O	O	Fièvre, AEG	SDRA, IRA	N	O	NEGATIF	NEGATIF
MU	M	79	Réanimation	Ecouvillon nasal	6	N	O	Fièvre	SDRA	N	O	NEGATIF	NEGATIF
SI	M	73	Réanimation	LBA	1	O	O	Fièvre	SDRA	N	O	NEGATIF	NEGATIF
BA	F	63	Réanimation	Ecouvillon naso-pharyngé	3	O	N	AEG	SDRA	N	N	NEGATIF	SASM, <i>Pneumocystis jiroveci</i>
WA	M	61	Réanimation	Ecouvillon	5	N	O	Fièvre	IRA, SPG	N	O	NEGATIF	NEGATIF
BO	M	80	Maladies infectieuses	Ecouvillon naso-pharyngé	4	N	O	Fièvre	Pneumopathie, sibilants	N	O	H3N2	Non réalisé
CH	F	86	Maladies infectieuses	Ecouvillon	3	N	O	Fièvre, AEG	Pneumopathie, SPG	O	N	H3N2	Non réalisé
RO	M	55	Soins continus	Aspiration nasale	13	O	O	Fièvre, Céphalées	IRA, sibilants	N	O	HCoV-229E	Non réalisé
ZA	F	69	Réanimation	Aspiration nasale	3	N	O	Fièvre, AEG	SDRA, sibilants, sepsis	N	NR	EV-RV	Non réalisé
GI	F	71	Réanimation	Ecouvillon naso-pharyngé	25	N	O	Fièvre, AEG	SDRA, pneumopathie	O	O	EV-RV	NEGATIF
GL	F	89	Réanimation	Ecouvillon naso-pharyngé	2	N	O	Fièvre, AEG	IRA, pneumopathie, sibilants	N	O	H3N2	NEGATIF

F : Féminin ; M : Masculin ; LBA : Lavage broncho-alvéolaire ; N : Non ; O : Oui ; NR : Non renseigné ; AEG : Altération de l'état général ; IRA : Insuffisance respiratoire aiguë ; SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aiguë ; EV-RV : Enterovirus/Rhinovirus ; SASM : Staphylococcus aureus sensible à la méticilline

NOM	SEXE	AGE	SERVICE CLINIQUE PRESCRIPTEUR	TYPE ECHANTILLON	DELAI (jours)	IMMUNO DEPRESSION	FIEVRE	SIGNES GENERAUX	SIGNES RESPIRATOIRES	AUTRES SIGNES	SIGNES RADIOLOGIQUES	VIRUS RESPIRATOIRES TESTES PAR TECHNIQUE LUMINEX	AUTRES AGENTS INFECTIEUX IDENTIFIES
PE	M	74	Réanimation	Ecouvillon	2	N	O	Fièvre	SDRA, IRA, bronchite	N	O	EV-RV	<i>Haemophilus influenzae</i>
PO	M	53	Réanimation	Ecouvillon naso-pharyngé	2	O	O	Fièvre, AEG	SDRA	N	O	NEGATIF	<i>Streptococcus agalactiae</i>
GO	F	22	Réanimation	Ecouvillon	NR	N	O	Fièvre, Céphalées	SDRA, IRA, pneumopathie, sibilants	N	O	NEGATIF	NEGATIF
HO	M	44	Réanimation	Ecouvillon naso-pharyngé	15	N	O	Fièvre, AEG	IRA, sibilants, bronchite	N	O	NEGATIF	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
GO	M	64	Réanimation	Ecouvillon nasal	15	N	O	Fièvre	SDRA, IRA, pneumopathie	N	NR	NEGATIF	<i>Escherichia coli</i>
KR	M	55	Réanimation	Ecouvillon naso-pharyngé	6	N	O	Fièvre, AEG	SDRA, IRA, pneumopathie, sibilants	N	N	NEGATIF	<i>Legionnella sp</i>
DE	M	55	Réanimation	Ecouvillon nasal	11	N	O	Fièvre, AEG	IRA, pneumopathie	N	O	NEGATIF	<i>Candida, Pneumocystis jiroveci</i>
FR	M	72	Réanimation	Ecouvillon nasal	9	N	N	AEG	SDRA, sibilants, hémorragie intra-alvéolaire	N	O	NEGATIF	NEGATIF
SO	M	25	Réanimation	LBA	2	O	O	Fièvre, AEG	SDRA	N	O	NEGATIF	NEGATIF
TH	F	34	Réanimation	Ecouvillon naso-pharyngé	NR	O	O	Fièvre, AEG	IRA, sibilants, pneumopathie	O	O	NEGATIF	<i>Haemophilus influenzae</i>

F : Féminin ; M : Masculin ; LBA : Lavage broncho-alvéolaire ; N : Non ; O : Oui ; NR : Non renseigné ; AEG : Altération de l'état général ; IRA : Insuffisance respiratoire aiguë ; SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aiguë ; EV-RV : Enterovirus/Rhinovirus ; SASM : Staphylococcus aureus sensible à la méticilline

2.2.4. Services cliniques

Les patients dont les prélèvements ont été analysés étaient essentiellement issus des services de réanimation dans 86 % des cas (Réanimation Médicale Hôpital Central et Hôpital de Brabois adultes).

2.2.5. Epidémiologie

L'épidémie a débuté lors de la semaine 3/2012 (16 janvier 2012) avec un pic lors de la semaine 5/2012 (30 janvier 2012) (figure 25). La proportion de prélèvements positifs, tous virus influenza A confondus, était de 23,5 %. Le sous-typage n'était plus systématiquement

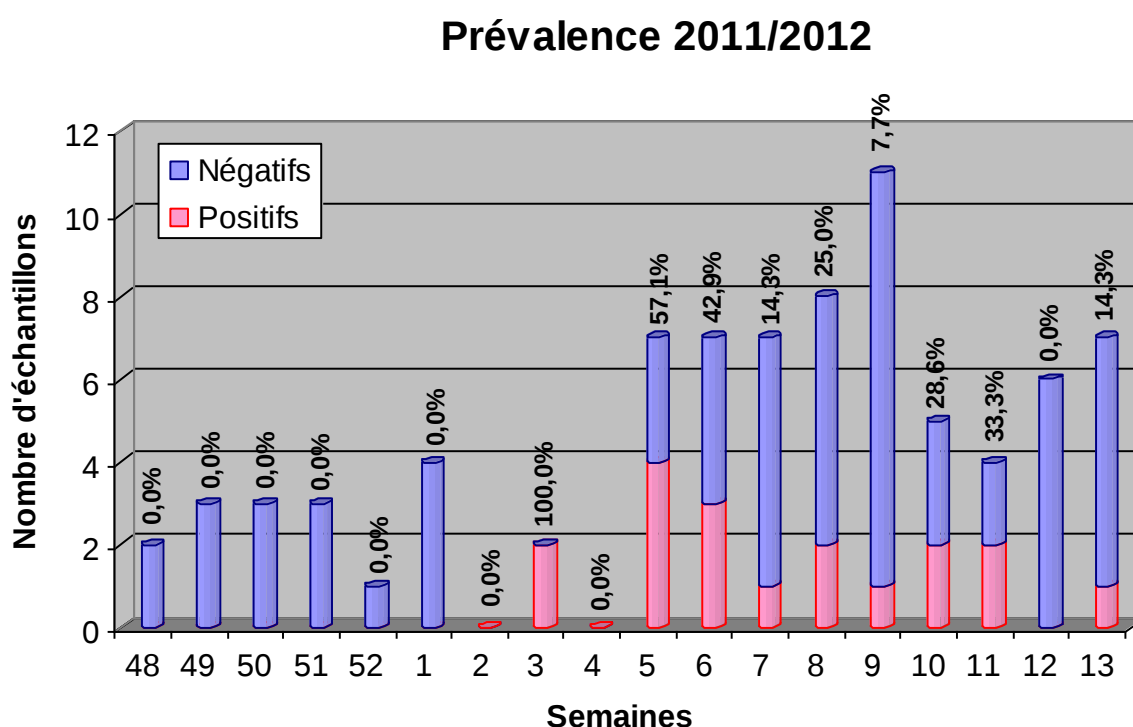


Figure 25 . Prévalence des échantillons positifs pour le virus influenza A non sous-typé au cours de la période hivernale 2011/2012 au CHU de Nancy

En réalisant la technique Luminex, 14 prélèvements étaient négatifs (67 % des prélèvements analysés sur le Luminex) et 7 positifs pour l'un ou l'autre des virus respiratoires testés (33 %). Parmi les prélèvements positifs, 3 ont été étiquetés positifs pour le virus influenza A(H3N2), 3 pour les rhinovirus/entérovirus et un pour le coronavirus 229E (tableau XXIII).

Pour les prélèvements négatifs pour les virus respiratoires testés sur le Luminex, d'autres étiologies ont parfois été mises en évidence : bactériennes (légionnellose ou autres bactéries dans 40 % des prélèvements négatifs) ou parasitaires (pneumocystose dans 13 % des prélèvements négatifs). L'étiologie est restée inconnue dans 47 % des prélèvements négatifs.

3. Discussion

Dans un premier temps, les données des hivers 2009/2010 et 2010/2011 précédemment décrites dans la partie « résultats » ont été comparées entre elles ainsi qu'aux données recueillies par l'InVS sur le territoire français.

Dans un second temps, l'étude menée sur les patients au cours de l'hiver 2011/2012 à l'aide de la technologie Luminex a permis de tirer quelques conclusions.

3.1. Comparaison de l'épidémiologie du virus influenza A(H1N1)2009 au cours des hivers nancéiens de 2009 à 2011

Les scénarii pré-pandémiques n'avaient pas pris en compte certaines caractéristiques telles que l'immunité pré-existante d'une partie de la population, la grande stabilité du virus, la fréquence des formes asymptomatiques, l'efficacité des antiviraux et des systèmes de soins,... En effet, au vu des conséquences préoccupantes des précédentes pandémies grippales, la réalité s'est révélée en deçà des estimations (Bonmarin *et al.* 2011).

3.1.1. Populations étudiées

La répartition des âges des patients atteints par le virus pandémique A(H1N1)2009 a été très différente entre les 2 saisons.

Au cours de la première saison 2009/2010, la majorité des patients atteints étaient les enfants suivis par les jeunes adultes ; les personnes âgées de plus de 60 ans étaient très peu touchées. Les personnes nées avant 1957 auraient déjà été exposées à des souches virales de sous-type H1N1 dans le passé. En effet, le nouveau virus influenza A(H1N1)2009 partagerait des homologues antigéniques avec les souches virales datant de la grippe espagnole survenue en 1918. Cette population était ainsi porteuse d'anticorps neutralisants réduisant ainsi l'impact du nouveau virus sur la population générale (Greenbaum *et al.* 2009) ; (Hancock *et al.* 2009).

Cependant, au cours de la deuxième saison 2010/2011, la classe d'âge des 20-40 ans était la plus touchée, les enfants l'étaient moins en réponse à leur immunisation acquise lors de la saison précédente (vaccination, infection symptomatique ou asymptomatique). Malgré les campagnes de vaccination intensives entreprises par le gouvernement français, il était estimé que près de 70 % de la population n'était pas protégée à la fin de la première vague épidémique (Bonmarin *et al.* 2011).

Au cours des 2 saisons hivernales, les cas graves imputables au virus A(H1N1)2009 ont majoritairement touché les classes d'âge intermédiaires sans facteurs de risque associés. Les souches porteuses de la mutation D222G seraient responsables des tableaux cliniques de syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA). En effet, près de 18 % des souches virales associées à une symptomatologie sévère étaient porteuses de cette mutation (Belser *et al.* 2011). Les personnes âgées de plus de 60 ans étaient également touchées en raison de la présence de co-morbidités associées mais de manière moins importante par rapport aux jeunes adultes. Les décès constatés survenaient majoritairement dans une population d'âge moyen.

3.1.2. Services cliniques

La répartition des échantillons selon les services cliniques prescripteurs était également différente entre les 2 saisons hivernales.

En 2009/2010, la majorité des prélèvements étaient issus de patients venus en consultation externe ou admis aux urgences, de manière plus ou moins équivalente aux patients hospitalisés en structure de soins. Cependant, les prélèvements positifs pour le virus A(H1N1)2009 étaient majoritairement issus des consultations externes, suivis de près par les services d'hospitalisation.

Lors de cette saison de « pandémie » grippale, beaucoup de personnes sont venues consulter devant l'apparition d'un simple syndrome pseudo-grippal plus par « peur » d'une réelle pandémie grippale telle que celle de la grippe espagnole survenue en 1918.

En 2010/2011, l'essentiel des prélèvements étaient issus des services de réanimation. Parmi les prélèvements positifs, ceux provenant des consultations étaient toujours majoritaires, suivis de près par les services de réanimation et d'hématologie.

Les prélèvements ne sont plus systématiquement effectués en consultation et dans les services d'urgence du fait d'une meilleure connaissance du virus. En effet, le virus A(H1N1)2009 se manifeste majoritairement par une symptomatologie modérée comparable à celle de la grippe saisonnière (Swedish *et al.* 2010). Cependant, les cas les plus graves continuaient à être surveillés de près, justifiant ainsi une demande plus importante de recherche des virus influenza de ces services lors de l'hiver 2010/2011.

3.1.3. Épidémiologie

Au cours de la saison 2009/2010, le virus A(H1N1)2009 a été le virus circulant majoritaire et presque exclusif. Son pic de détection au cours de l'hiver 2009/2010 se situait aux alentours de la semaine 47/2009 (16 novembre 2009) de manière plus précoce par rapport aux grippes saisonnières qui surviennent majoritairement aux mois de janvier et février. Le pic de détection au cours de l'hiver 2010/2011 est survenu en semaine 4/2011 (24 janvier 2011), retrouvant ainsi la configuration habituelle des épidémies grippales hivernales.

En terme de quantité de prélèvements reçus, la différence était majeure avec une nette diminution au cours de l'hiver suivant : 1198 prélèvements en 2009 contre 333 en 2011. De même, la proportion de prélèvements positifs était plus élevée en 2009 : 31,6 % en 2009 *versus* 24,6 % en 2011. Ces chiffres démontrent bien que la deuxième saison a été moins marquée par un phénomène de panique d'une hypothétique pandémie grippale. Les prélèvements n'étaient plus systématiques en dehors des cas sévères. D'autre part, la baisse était corrélée avec la réduction équivalente du virus pandémique dans la communauté (Bonmarin *et al.* 2011).

Le diagnostic est désormais essentiellement clinique avec la mise en place de mesures d'isolement dans les services cliniques. Le traitement n'est plus systématique sauf dans le cas d'une présentation sévère de la maladie et/ou d'un risque important de développer des complications.

3.2. Comparaison avec les données nationales de l'InVS

3.2.1. Période hivernale 2009/2010

Selon les données de l'InVS, la surveillance nationale de la pandémie grippale de l'année 2009/2010 s'est déroulée entre la semaine 30/2009 (20 juillet 2009) et la semaine 10/2010 (14 mars 2010). L'épidémie a sévi entre le début du mois d'octobre et la fin du mois de décembre 2009.

Un total de 103 352 prélèvements a été analysé, 24 279 étaient positifs pour le virus influenza A(H1N1)2009 soit une proportion de 23,5 %, moins élevée que lors de l'étude réalisée au CHU de Nancy (31,6 %). En parallèle, quelques virus saisonniers ont été identifiés (9 A(H1N1) saisonniers, 61 A(H3N2) et 8 B) (Rousset *et al.* 2010). Ces derniers n'étaient pas recherchés au laboratoire de virologie du CHU de Nancy puisque la technique utilisée (Influenza A(M) Group & swl r-gene®, ARGENE®) ne testait que l'ensemble des virus influenza A et la souche pandémique A(H1N1)2009.

A l'échelle nationale, une élévation des cas de virus A(H1N1)2009 a eu lieu entre la semaine 35/2009 et la semaine 48/2009 avec un premier pic de détection en semaine 38/2009 (19 septembre 2009), puis 2 pics plus importants en semaine 44/2009 (31 octobre 2009) et en semaine 48/2009 (29 novembre 2009) (figure 26) (Josseran *et al.* 2010). A Nancy, le pic de détection survenant en semaine 38/2009 n'a pas été observé, il serait vraisemblablement dû au pic épidémique observé en Ile-de-France qui a été plus précoce que dans les autres départements français (Josseran *et al.* 2010).

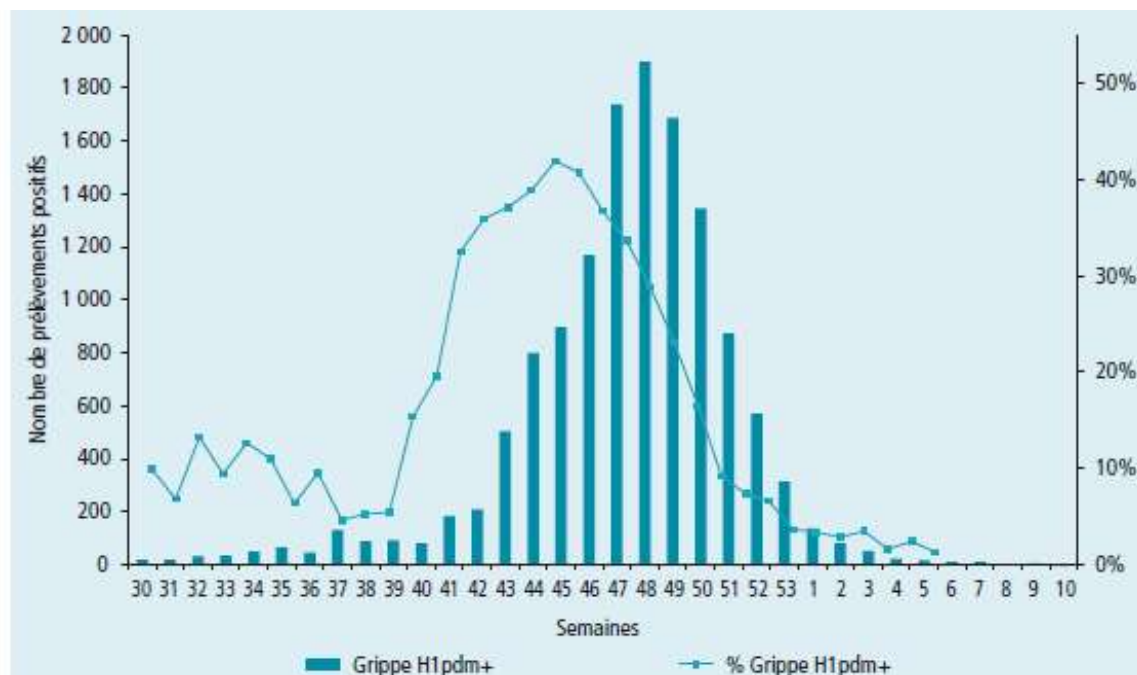


Figure 26 : Evolution du pourcentage et du nombre des prélèvements positifs des réseaux Grog et Renal entre les semaines 30/2009 et 10/2010

D'après (Rousset *et al.* 2010)

La répartition en fonction des sexes et des classes d'âge se recoupait entre les données de l'InVS et les résultats obtenus au laboratoire de virologie du CHU de Nancy. En effet, les femmes ont été touchées autant que les hommes (Vaux *et al.* 2010) et les plus jeunes ont été majoritairement atteints, notamment les enfants de moins de 14 ans suivis par les 15-64 ans. Les personnes âgées de plus de 64 ans ont été beaucoup moins touchées (figure 27) (Josseran *et al.* 2010).

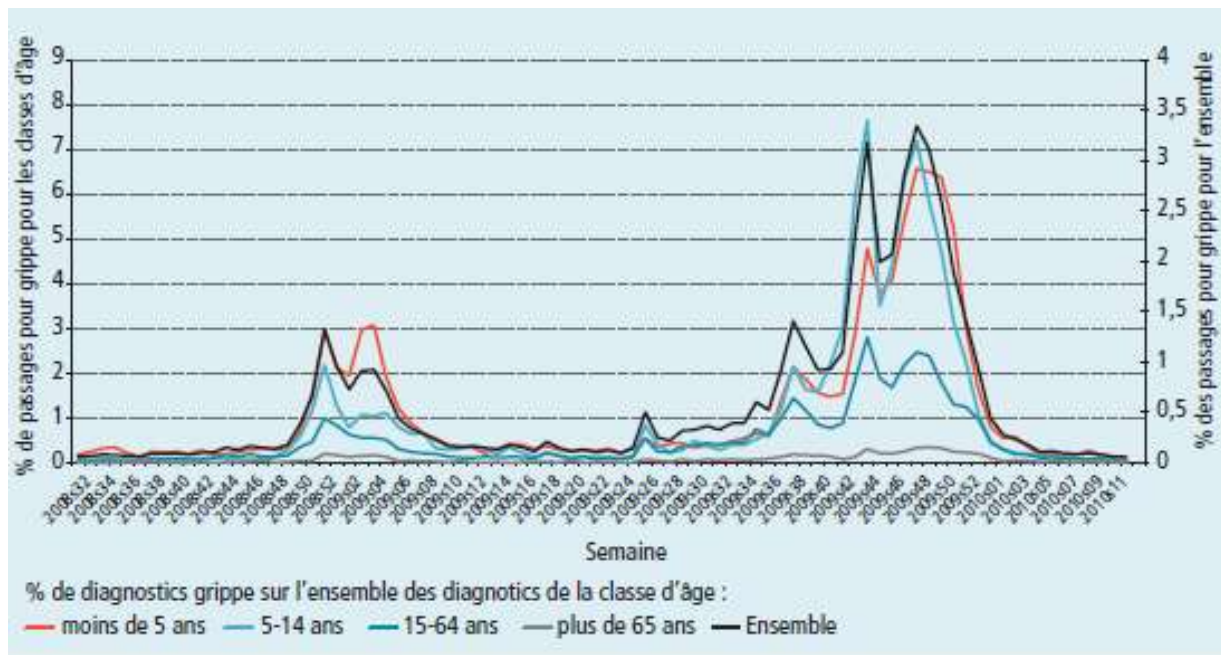


Figure 27 : Pourcentage des admissions pour motif de grippe aux urgences en fonction de l'âge en France entre août 2008 et mars 2010

D'après (Josseran et al. 2010)

La sévérité particulière du nouveau virus a également été constatée, elle a entraîné un nombre plus important de patients hospitalisés en services de soins et surtout en réanimation dans l'ensemble du pays. Cependant, la mortalité globale était relativement proche de celle des virus saisonniers des saisons antérieures. En effet, ce ne sont pas les mêmes populations qui sont atteintes dans les 2 cas. L'épidémie de 2009 a essentiellement touché des personnes jeunes, tout en épargnant les populations les plus âgées. Les gripes saisonnières quant à elles ont tendance à déstabiliser les états fragiles des personnes âgées conduisant ainsi au décès (Vicente *et al.* 2011).

L'épidémie a pris fin à la fin du mois de décembre 2009, quelques cas isolés survenant encore occasionnellement jusqu'en avril 2010 (Rousset *et al.* 2010). De même, sur la région nancéienne, elle a commencé à prendre fin vers mi-janvier (semaine 2/2010), des cas sporadiques étant présents jusqu'en mars.

3.2.2. Période hivernale 2010/2011

Lors de l'année 2010/2011, l'InVS a étudié les prélèvements effectués entre la semaine 36/2010 (6 septembre 2010) et la semaine 15/2011 (11 avril 2011).

L'épidémie a été d'une intensité plus modérée par rapport à celle de l'année précédente. Elle s'est déroulée de fin décembre 2010 à mi-février 2011 avec une circulation à parts égales

du virus influenza A(H1N1) pandémique et du virus influenza B, avec une très faible proportion du virus influenza A(H3N2) saisonnier (Belchior 2011).

Dans les prélèvements communautaires, la proportion des prélèvements positifs pour le virus influenza A(H1N1)2009 était de 15,4 % (840/5487), alors que lors de l'hiver nancéen elle était plus élevée, de l'ordre de 26,4 %.

Le virus influenza A(H1N1)2009 a circulé à parts égales avec le virus influenza B. Le pic de détection national du virus A(H1N1)2009 se situait lors de la semaine 1/2011 (3 janvier 2011), la grippe B a sévi plus tardivement avec un pic de détection lors de la semaine 4/2011 (24 janvier 2011) (figure 28). A Nancy, sur les prélèvements analysés, seuls les virus influenza A ont été détectés avec un pic plus tardif lors de la semaine 4/2011 (24 janvier 2011) ; les virus B n'ont pas été testés (le panel grippe A(M) & swl r-gene®, ARGENE® détecte uniquement les virus influenza de type A).

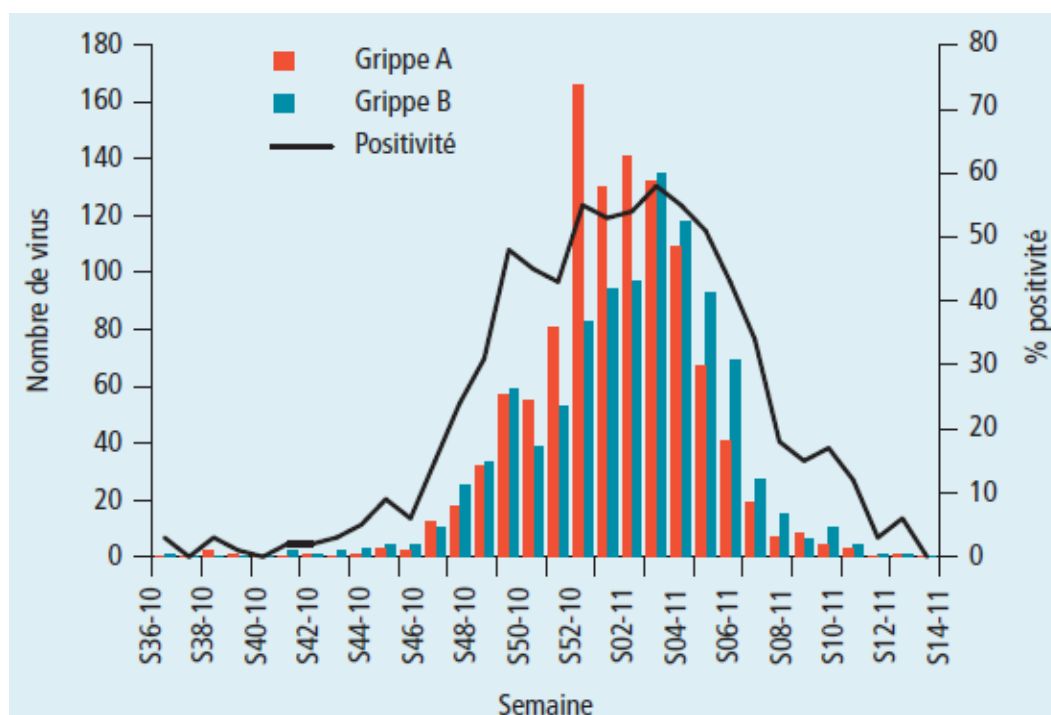


Figure 28 : Cinétique de détection des virus grippaux A et B dans les prélèvements des Réseaux des Grog et proportion de positivité, semaines 36/2010 à 15/2011

D'après (Belchior 2011)

La surveillance des cas graves hospitalisés en réanimation a été maintenue lors de cette saison (Bonmarin *et al.* 2011). Les taux d'admission ont été divisés par 2 par rapport à l'année précédente en raison de la baisse équivalente du virus A(H1N1) pandémique dans la communauté. La réduction était la plus forte chez les patients âgés de 5 à 14 ans en réponse à leur immunité acquise lors de la saison précédente. Pour les autres tranches d'âge, les patients

étaient encore réceptifs au virus. Lors de l'étude nancéienne, une quantité plus importante de prélèvements positifs ont été détectés chez les patients fragilisés hospitalisés en réanimation.

Il est intéressant de noter que de plus en plus de prélèvements sont retrouvés positifs par rapport aux années antérieures à l'année 2011 du fait de l'amélioration de la sensibilité des techniques employées telle que la RT-PCR par rapport aux techniques classiques effectuées par IF ou culture cellulaire (Belchior 2011).

L'efficacité du vaccin n'a pas été remise en cause en 2010 en raison de la bonne concordance entre les souches vaccinales et les virus caractérisés par le Centre National de Référence (CNR) de la grippe.

3.3. Etude prospective des virus influenza et des autres virus respiratoires au cours de l'hiver 2011/2012

3.3.1. Populations étudiées

L'étude réalisée au CHU de Nancy sur l'année 2011/2012 concernait essentiellement les prélèvements respiratoires de patients âgés hospitalisés dans les services de réanimation. Les patients souffraient majoritairement d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë fébrile (SDRA) avec signes radiologiques à l'appui. Leur état était souvent associé à une immunodépression.

3.3.2. Services cliniques

Les services cliniques prescripteurs étaient majoritairement les services de réanimation. Ils ont été prioritairement ciblés par l'étude afin de les aider à prendre en charge leurs patients souvent fragilisés avec une présentation clinique sévère et/ou atypique.

3.3.3. Epidémiologie

L'épidémie de 2011/2012 s'est manifestée plus tardivement et plus brièvement au mois de janvier 2012 dans la plupart des pays du monde.

La souche A(H3N2) a circulé majoritairement cette année, contrairement aux 2 années précédentes. Les souches A(H1N1) pandémique et B ont eu une activité faible à l'exception du Mexique et de quelques pays asiatiques (WHO 2012). Au laboratoire de virologie du CHU de Nancy, la totalité des prélèvements positifs étudiés étaient de type influenza A. Lorsque la

technique Luminex était réalisée, elle révélait à chaque fois le sous-type A(H3N2), aucun sous-type A(H1N1) n'a été détecté. Les résultats obtenus corroborent ainsi les données publiées par l'OMS et les réseaux des GROG.

D'autres virus respiratoires ont pu être mis en évidence chez les patients présentant une forme respiratoire grave ou atypique. Cependant, de la même manière aux conclusions trouvées dans la littérature, dans près de 50 % des prélèvements négatifs avec la technique Luminex, l'étiologie des syndromes respiratoires n'a pas pu être documentée (Polverino & Torres Marti 2011).

Tous les virus A(H1N1) détectés dans le monde entre septembre 2011 et février 2012 étaient issus de la souche pandémique, étroitement liée à la souche vaccinale A/California/7/2009 (H1N1) précédentes (WHO 2012).

Les données récentes ont mis en évidence une hétérogénéité antigénique des virus A(H3N2). En effet, la plupart des virus sont étroitement liés à la souche vaccinale A/Perth/16/2009 (H3N2), cependant une proportion croissante de virus a des titres plus élevés avec les immuns sérums dirigés contre la souche A/Victoria/361/2011 (H3N2). Ces souches appartiennent à 2 groupes phylogénétiquement différents.

Enfin, les virus influenza B appartiennent à 2 lignées différentes (B/Victoria/2/87 et B/Yamagata/16/88) et circulent de manière équivalente dans plusieurs pays avec une augmentation de la prévalence de la lignée Yamagata. Ces virus sont donc différents de la souche vaccinale actuelle dérivant de la lignée Victoria et sont plus proches de la souche B/Wisconsin/1/2010 dérivant de la lignée Yamagata.

De ce fait, l'OMS a prévu de changer la composition du vaccin trivalent pour la saison 2012/2013, notamment les souches influenza A(H3N2) et B :

- A/California/7/2009 (H1N1) - souche conservée
- A/Victoria/361/2011 (H3N2) - précédemment A/Perth/16/2009 (H3N2)
- B/Wisconsin/1/2010 (Victoria) - précédemment B/Brisbane/60/2008 (Yamagata)

Le changement des souches virales influenza A(H3N2) circulantes a vraisemblablement été à l'origine de l'épidémie hivernale et à la circulation très minoritaire de la souche pandémique influenza A(H1N1).

Au total, un peu plus de 6,1 millions de personnes ont été touchées en France avec un pic de détection en semaine 8/2012 (20 février 2012) (données du bulletin des GROG n°26, émis le 14 mars 2012). Cependant, les disparités régionales ont été importantes expliquant ainsi le décalage par rapport à l'étude nancéienne, le pic de détection survenant en semaine 5/2012 (30 janvier 2012).

3.3.4. Techniques : sensibilité, spécificité, temps technique

Les techniques « nouvelles » de type PCR ou RT-PCR en temps réel ont un gain énorme en sensibilité ainsi qu'en spécificité par rapport aux techniques plus communes de culture cellulaire, IF et autres tests rapides.

Les techniques par PCR multiplex sont en revanche un peu moins sensibles que les PCR monoplex, ces dernières ne ciblant qu'un seul virus à la fois. En effet, la présence d'un nombre important d'amorces et de sondes dans un seul et même tube abaisse la sensibilité de la technique. Cependant, les PCR multiplex permettent un gain considérable de temps, ce qui n'est pas négligeable pour une rapidité de réponse auprès des services cliniques prescripteurs (notamment les services de réanimation) permettant ainsi une prise en charge adéquate des patients. De plus, elles sont d'une grande aide pour détecter certains virus (bocavirus, coronavirus,...) qui ne sont pas recherchés en pratique courante ainsi que pour mettre en évidence les infections multiples.

3.3.5. Coût

Les techniques les plus récentes basées sur les principes de la biologie moléculaire ont un coût élevé comparativement aux techniques conventionnelles relativement peu chères, comme représenté dans le tableau XXIV. Ainsi, de telles techniques sont majoritairement réalisées dans des centres spécialisés ou en milieu hospitalier.

Dans certain cas, notamment pour les patients fragilisés, il est préférable de privilégier la technique Luminex, détectant plusieurs virus à la fois, pour un coût certes supérieur mais qui permet de tester un panel plus important de virus et notamment de sous-typer les virus influenza A.

Tableau XXIV : Coût des différentes techniques disponibles pour le diagnostic viral

Techniques	Coût (hors taxes)
Luminex xTAG RVP Fast	60 €
Seeplex RV15 ACE Detection	45,60 €
Grippe A/B r-gene	11,30 €
Grippe A(M) & swl r-gene	11,30 €
IF	non renseigné
TDR	8,6 €

3.4. Apport des nouvelles technologies au laboratoire de virologie du CHU de Nancy

La mise en place du Luminex au laboratoire de virologie du CHU de Nancy n'a pas été aisée. En effet, l'épidémie de grippe de 2011/2012 a été relativement brève et faible en terme de quantité de prélèvements et surtout de prélèvements positifs pour les virus respiratoires. De plus, seuls certains services avaient été sensibilisés à cette nouvelle technologie, limitant ainsi la quantité de prélèvements reçus. La technique était donc souvent réalisée pour 1 à 2 patients maximum par série, mobilisant ainsi une technicienne pour quelques heures.

Le Luminex reste toutefois très intéressant d'un point de vue technologique et en termes de gain de temps. Sa perte en sensibilité du fait du multiplexage joue malheureusement en sa défaveur. Son avenir reste tout de même prometteur pour les années à venir.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Depuis 2009, la survenue du virus influenza A(H1N1)2009 a changé la donne des épidémies grippales. Ce nouveau variant est apparu en France lors de la semaine 18/2009 avec une incidence de l'ordre de 23,5 % au niveau national. Il a globalement atteint une population jeune et s'est révélé particulièrement agressif sur des patients sans facteurs de risque associés. Une mortalité proche de celle des gripes saisonnières lui a été attribuée et a concerné essentiellement une population d'âge moyen. Ainsi, la réalité s'est révélée en dessous des estimations produites au début de la pandémie.

Lors du dernier hiver 2011/2012, l'incidence du nouveau variant a été de 3 % selon les rapports de l'InVS et a de ce fait été moins détecté. Les épidémies ont ainsi repris une allure comparable aux hivers antérieurs à la pandémie avec une forte proportion des virus influenza A(H3N2). Ces derniers ont eu une incidence de 70 %, cependant 22 % des virus influenza A n'ont pas été sous-typés (Belchior 2012).

En raison de l'émergence du virus influenza aviaire A(H5N1) depuis 1997, un grand nombre de pays reste constamment en alerte dans la crainte que ce virus ne se recombine avec un autre virus à l'origine d'une transmission inter-humaine efficace. Ce cas de figure pourrait avoir des conséquences sanitaires importantes au niveau international. Si ce dernier est le virus le plus probable, il ne faut pas sous-estimer les autres virus hébergés par les espèces animales. L'incertitude qui règne au sujet du prochain virus pandémique signifie que la planification en cas de grippe pandémique ne devrait pas être exclusivement centrée sur le virus H5N1, mais reposer plutôt sur une surveillance active et solide et sur une évaluation scientifique des risques (OMS 2009b).

De nouvelles technologies innovantes de type « multiplex » sont apparues sur le marché depuis quelques années, notamment dans le domaine du diagnostic viral des infections respiratoires basses. La technologie Luminex (xTAG® RVP Fast Assay, ABBOTT®) est un outil très intéressant permettant d'établir un diagnostic rapide en moins de 24 heures dans le cadre de la prise en charge des patients « fragiles », c'est-à-dire présentant des co-morbidités ou une forme respiratoire sévère. Le Luminex reste un atout important, notamment pour les prochaines saisons hivernales dans le cas où la donne épidémiologique des virus respiratoires pourrait être modifiée. Pour les autres patients hospitalisés, les techniques conventionnelles ont encore une place de choix pour un diagnostic efficient.

De nombreux bénéfices de cette technologie sont attendus tels que l'utilisation plus rationnelle des différents agents anti-infectieux (antibiotiques, antiviraux, voire antifongiques),

l'ajustement des mesures d'isolement pour la prévention des infections nosocomiales, l'optimisation de la prise en charge visant à améliorer le pronostic, la réduction escomptée de la durée d'hospitalisation, la possibilité de diagnostiquer des infections multiples qui peuvent être cliniquement plus sévères et nécessiter parfois des associations d'anti-infectieux, et enfin l'apport de renseignements d'ordre épidémiologique sur les agents infectieux qui circulent à un moment donné.

Sous un angle plus « pratique », les procédures diagnostiques sont simplifiées pour les services prescripteurs. En effet, la plupart des tests peuvent être réalisés sur le même échantillon respiratoire et tous les résultats virologiques sont disponibles en même temps, permettant ainsi au clinicien de faire une réévaluation à 48 heures de la prise en charge et du traitement.

Enfin, cette stratégie pourrait conduire à faire des économies de santé significatives par le biais de la réduction des durées d'hospitalisation, malgré un surcoût engendré par ces nouvelles technologies (Mahony *et al.* 2009).

BIBLIOGRAPHIE

- AFSSAPS, 2010. Mise au point : antibiothérapie par voie générale dans les infections respiratoires basses de l'adulte. Disponible en ligne : www.infectiologie.com (Page consultée le 28/08/2012).
- Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé, 2000. Conférence de consensus : Prise en charge de la bronchiolite du nourrisson, 21 septembre 2000. URML Ile de France, Paris: ANAES.
- Andréoletti L, Renois F, Jacques J & Lévêque N, 2009. Human enteroviruses and respiratory infections. *Médecine Sciences*, 25(11):921-930.
- Belchior E, 2011. Surveillance épidémiologique et virologique de la grippe en France, saison 2010-2011. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 2011, 37-38:394-398. Disponible en ligne : www.invs.sante.fr/Publications-et-outils/BEH-Bulletin-epidemiologique-hebdomadaire/Derniers-numeros-et-archives/Archives/2011/BEH-n-37-38-2011 (Page consultée le 31/08/2012).
- Belchior E. Bulletin épidémiologique grippe. Point au 25 avril 2012. Disponible en ligne : www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-prevention-vaccinale/Grippe/Grippe-generalites/Donnees-de-surveillance/2011-2012/Bulletin-epidemiologique-grippe.-Point-au-25-avril-2012 (Page consultée le 30/08/2012).
- Belser JA, Jayaraman A, Raman R, *et al.*, 2011. Effect of D222G mutation in the hemagglutinin protein on receptor binding, pathogenesis and transmissibility of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *PloS one*, 6(9):e25091.
- Billaud G & Lina B, 2004. Rhinovirus : principal agent des infections des voies aériennes supérieures. *Virologie*, 8(4):271-280.
- Blanquer J & Sanz F, 2010. Community-acquired pneumonia. *Archivos De Bronconeumología*, 46 Suppl 7:26-30.
- Bonmarin I, Belchior E, Haeghebaert S, *et al.*, 2011. Cas graves de grippe admis en réanimation en France, saison 2010-2011. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 2011, 37-38:398-401. Disponible en ligne : www.invs.sante.fr/Publications-et-outils/BEH-Bulletin-epidemiologique-hebdomadaire/Derniers-numeros-et-archives/Archives/2011/BEH-n-37-38-2011 (Page consultée le 31/08/2012).
- Bouvier NM & Palese P, 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine*, 26(Suppl 4): 49-53.
- Buisson Y, Nicand É & Saliou P, 2007. La grippe en face. X. Montauban SA.
- Christian MD, Poutanen SM, Loutfy MR, Muller MP & Low DE, 2004. Severe acute respiratory syndrome. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 38(10):1420-1427.
- Chun J-Y, Kim K-J, Hwang I-T, *et al.*, 2007. Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene. *Nucleic Acids Research*, 35(6):1-6.
- CMIT, 2012. Item n°86 : Infections broncho-pulmonaires du nourrisson, de l'enfant et de l'adulte. In, E. PILLY. Vivactis Plus Ed.: p. 75-83.
- CMIT, 2008a. Pneumonies aiguës communautaires. In, E. PILLY. Vivactis Plus Ed.: p. 226-235.
- CMIT, 2008b. Bronchites infectieuses. In, E. PILLY. Vivactis Plus Ed.: p. 218-221.

- Cohuet S, Aït el-Belghiti F, Barboza P, *et al.*, 2009. Grippe A(H1N1)2009□: les principaux enseignements à l'échelle mondiale après les six premiers mois de la pandémie. *BEH Web 2009*, (3). Disponible en ligne : www.invs.sante.fr/behweb/2009/03/pdf/n3.pdf (Page consultée le 31/08/2012).
- Cox RJ, Brokstad KA & Ogra P, 2004. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scandinavian journal of immunology*, 59(1):1-15.
- Díaz A, Zaragoza R, Granada R & Salavert M, 2011. Acute viral infections in immunocompetent patients. *Medicina intensiva / Sociedad Española de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias*, 35(3):179-185.
- Enouf V, Bouscambert-Duchamp M, Valette M, *et al.*, 2009. Le point sur le virus de la nouvelle grippe A(H1N1)v. *BEH Web 2009*, (1). Disponible en ligne : www.invs.sante.fr/behweb/2009/01/pdf/n1.pdf (Page consultée le 31/08/2012).
- Foulongne V & Segondy M, 2009. Human bocavirus (HBoV). *Pathologie-Biologie*, 57(2):197-202.
- Freymuth F, Vabret A, Galateau F, *et al.*, 1998. Etiologie et diagnostic des bronchopneumopathies virales. *Annales de biologie clinique*, 56(1):29-40.
- Freymuth F, 2003. Paramyxoviridae. In, *Virologie médicale*, Huraux JM. Paris: ESTEM: p. 459-480.
- Freymuth F, Vabret A, Legrand L, *et al.*, 2009. Human metapneumovirus. *Pathologie-Biologie*, 57(2):133-141.
- Freymuth F, Vabret A, Dina J *et al.*, 2010. Bronchiolitis viruses. *Archives De Pédiatrie: Organe Officiel De La Société Française De Pédiatrie*, 17(8):1192-1201.
- Fuhrman C, Bonmarin I, Paty A-C, *et al.*, 2009. Bilan épidémiologique des premiers cas hospitalisés de grippe A(H1N1)2009 en France au 10 octobre 2009. *BEH Web 2009*, (3). Disponible en ligne : www.invs.sante.fr/behweb/2009/03/pdf/n3.pdf (Page consultée le 31/08/2012).
- Gadsby NJ, Hardie A, Claas ECJ & Templeton KE, 2010. Comparison of the Luminex Respiratory Virus Panel fast assay with in-house real-time PCR for respiratory viral infection diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(6):2213-2216.
- Gatherer D, 2009. The 2009 H1N1 influenza outbreak in its historical context. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 45(3):174-178.
- Georges H & Guery B, 2007. Prise en charge des pneumonies communautaires aux urgences. *EM-Consulte Urgences*, (24-110-A-10).
- Ginocchio CC, Zhang F, Manji R, *et al.*, 2009. Evaluation of multiple test methods for the detection of the novel 2009 influenza A (H1N1) during the New York City outbreak. *Journal of Clinical Virology*, 45(3):191-195.
- Girard MP, Tam JS, Assossou OM & Kieny MP, 2010. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. *Vaccine*, 28(31):4895-4902.
- Goffard A, 2010. Schéma d'un test d'immunochromatographie (ICT). Disponible en ligne : frontal.univ-angers.fr/unspf/2010_Lille_Goffard_Grippe/co/immunochromato_gif.html (Page consultée le 28/08/2012).
- Greenbaum JA, Kotturi MF, Kim Y, *et al.*, 2009. Pre-existing immunity against swine-origin H1N1 influenza viruses in the general human population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(48):20365-20370.

- Guthmann J-P, Bone A, Nicolau J & Lévy-Bruhl D, 2010. Insuffisance de couverture vaccinale grippale A(H1N1)2009 en population générale et dans les groupes à risque durant la pandémie 2009-2010 en France. *BEH Web* 2010, (3). Disponible en ligne : www.invs.sante.fr/behweb/2010/03/pdf/n3.pdf (Page consultée le 31/08/2012).
- Hall CB, 2001. Respiratory Syncytial Virus and Parainfluenza Virus. *New England Journal of Medicine*, 344(25):1917-1928.
- Hancock K, Veguilla V, Lu X, *et al.*, 2009. Cross-Reactive Antibody Responses to the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus. *New England Journal of Medicine*, 361(20):1945-1952.
- Henrickson KJ, 2003. Parainfluenza viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2):242-264.
- Huraux J-M, 2008. Les virus respiratoires - 1ère partie. In, *Virologie*. Paris: ESTEM: p. 165-180.
- Josseran L, Caillère N, Goncalves N, *et al.*, 2010. Surveillance syndromique dans le cadre de la pandémie grippale A(H1N1)2009 : intérêts et limites. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire* 2010, 24-25-26:274-277. Disponible en ligne : www.invs.sante.fr/beh/2010/24_25_26/index.htm (Page consultée le 31/08/2012).
- Kim SR, Ki C-S & Lee NY, 2009. Rapid detection and identification of 12 respiratory viruses using a dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 156(1-2):111-116.
- Le Bâcle C, Duclovel-Pame N & Durand É, 2006. Influenza aviaire, grippe aviaire et menace de pandémie: un nouvel enjeu en santé au travail. *Documents pour le médecin du travail*, (106):139–168.
- Leophonte P, 1999. Prise en charge des infections respiratoires basses communautaires : Définitions, épidémiologie, facteurs de risque et prévention. In, *Revue des maladies respiratoires. Supplément*. Masson.
- Léophonte P, 2001. *Pneumonies*. Paris: J. Libbey Eurotext.
- Leruez-Ville M, 2007. Diagnosis of viral respiratory infections. *Archives De Pédiatrie: Organe Officiel De La Société Française De Pédiatrie*, 14(4):404-409.
- Leung AKC, Kellner JD & Davies HD, 2005. Respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Journal of the National Medical Association*, 97(12):1708-1713.
- Mahony J, 2008. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4):716-747.
- Mahony J, Chong S, Merante F, *et al.*, 2007. Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9):2965-2970.
- Mahony JB, Blackhouse G, Babwah J, *et al.*, 2009. Cost analysis of multiplex PCR testing for diagnosing respiratory virus infections. *Journal of clinical microbiology*, 47(9):2812-2817.
- Moalic V, Mercier B & Ferec C, 2004. Technologie LuminexTM : principe, applications, et perspectives. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 19(4):181-187.
- Nafakh N & Van der Werf S, 2003. Orthomyxoviridae. In, *Virologie médicale*, Huraux JM. Paris: ESTEM: p. 439-447.
- Nicand É, Aymard M, Hannoun C, Yazdanpanah Y & Lina B, 2011. 23 es Rencontres du Groupe d'expertise et d'information sur la grippe (GEIG). *Virologie*, 15(2):126–130.

- Neumann G, Noda T & Kawaoka Y, 2009. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, 459(7249):931-939.
- Olofsson S, Brittain-Long R, Andersson LM, Westin J & Lindh M, 2011. PCR for detection of respiratory viruses: seasonal variations of virus infections. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 9(8):615-626.
- OMS, 2009a. Grippe (saisonnière). Disponible en ligne : www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/fr/index.html (Page consultée le 30/08/2012).
- OMS, 2009b. Préparation et action en cas de grippe pandémique. Document d'orientation de l'OMS. Disponible en ligne : whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789242547689_fre.pdf (Page consultée le 01/09/2012).
- Ouarab H., Rangheard A-S & Bellin M-FF, 2009. Les pneumopathies communautaires. *Feuillets de radiologie*, 49(6):379-391.
- Pavia AT, 2011. Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 52 Suppl 4:284-289.
- Peigue-Lafeuille H, 2002. Génétique et évolution des virus Facteurs de virulence. In, *Virologie médicale*, Mammette A. Presses Universitaires Lyon: p. 51-68.
- Poitras E & Houde A, 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*, 2(2):2-11.
- Polverino E & Torres Marti A, 2011. Community-acquired pneumonia. *Minerva Anestesiologica*, 77(2):196-211.
- Pozzetto B, 2002. Méthodes de diagnostic en virologie. In, *Virologie médicale*, Mammette A. Presses Universitaires Lyon: p. 187-210.
- Réseau des GROG & CNR des virus Influenzae. Semaines de franchissement du seuil épidémique défini par le Réseau des GROG France, octobre 1992 – avril 2011. Disponible en ligne : www.grog.org/documents/Semaines_franchissement_seuil_epidémique.pdf (Page consultée le 28/08/2012).
- Rousset D, Bouscambert-Duchamp M, Enouf V, *et al.*, 2010. Epidémie de grippe A(H1N1)2009 en France : les paramètres virologiques. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire* 2010, 24-25-26:272-274. Disponible en ligne : www.invs.sante.fr/beh/2010/24_25_26/beh_24_25_26_2010.pdf (Page consultée le 31/08/2012)
- Schnitzler SU & Schnitzler P, 2009. An update on swine-origin influenza virus A/H1N1: a review. *Virus Genes*, 39(3):279-292.
- Seegene, 2012. DPO Technology Super Multiplex PCR. In, *Seplex Simultaneous Multiplex Detection*. v. 1.01: p.10-11.
- Société Française de Microbiologie, 2000. Détection d'antigènes viraux. In, *REVIR : Société Française de Microbiologie Ed.* 1^o ed.: p.21-24.
- SPILF, 2005. Prise en charge de la grippe en dehors d'une situation de pandémie en 2005. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 35:S245-S273.
- Sullivan SJ, Jacobson RM, Dowdle WR & Poland GA, 2010. 2009 H1N1 influenza. *Mayo Clinic Proceedings*. *Mayo Clinic*, 85(1):64-76.

- Swedish KA, Conenello G & Factor SH, 2010. First Season of 2009 H1N1 Influenza. *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York*, 77(1):103-113.
- Tarantola A, Aït el-Belghiti F, Barboza P, *et al.*, 2009. Grippe A(H1N1)v : naissance d'une pandémie - Bilan mondial au 5 juin 2009. *BEH Web 2009*, (1). Disponible en ligne : www.invs.sante.fr/behweb/2009/01/pdf/n1.pdf (Page consultée le 31/08/2012).
- Thouvenot D, Billaud G & Morfin F, 2004. Actualité de la culture cellulaire et de son application au diagnostic des infections virales. *Virologie*, 8(4):297-309.
- Trouillet J-L & Chastre J, 1997. Conduite à tenir devant une pneumonie aiguë communautaire. *EM-Consulte Urgences*, (24-111-A-10).
- Tse C, Capeau J & Others, 2003. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Annales de Biologie Clinique*, 61(3):279-293.
- Vabret A, Dina J, Brison E, Brouard J & Freymuth F, 2009. Human coronaviruses. *Pathologie-Biologie*, 57(2):149-160.
- Vabret A, Dina J, Cuvillon-Nimal D, *et al.*, 2010. Seasonal flu. *Pathologie-Biologie*, 58(2):51-57.
- Vandegrift KJ, Sokolow SH, Daszak P & Kilpatrick AM, 2010. Ecology of avian influenza viruses in a changing world. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1195:113-128.
- Vaux S, Brouard C, Fuhrman C, *et al.*, 2010. Dynamique et impact de l'épidémie A(H1N1)2009 en France métropolitaine, 2009-2010. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire 2010*, 24-25-26:259-264. Disponible en ligne : www.invs.sante.fr/beh/2010/24_25_26/beh_24_25_26_2010.pdf (Page consultée le 31/08/2012).
- Venard V, Bordigoni P & Le Faou A, 2001. Les infections à adénovirus en milieu hospitalier. *Virologie*, 5(4):245-53.
- Vicente P, Aouba A, Lévy-Bruhl D, Jouglu E & Rey G, 2011. Spécificité des caractéristiques de la mortalité liée à la grippe lors de la pandémie de grippe A(H1N1) en 2009-2010 en France. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire 2011*, 1:1-5. Disponible en ligne : www.invs.sante.fr/Publications-et-outils/BEH-Bulletin-epidemiologique-hebdomadaire/Derniers-numeros-et-archives/Archives/2011/BEH-n-01-2011 (Page consultée le 31/08/2012).
- Weil-Olivier C, 2010. First season of pandemic influenza A/H1N1. *La Revue du Praticien*, 60(10):1388-1391.
- WHO, 2012. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2012-2013 northern hemisphere influenza season. *Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations*, 87(10):83-95.
- XVe Conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse, 2006. Prise en charge des infections des voies respiratoires basses de l'adulte immunocompétent. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 36:235-244.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 9 octobre 2012

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE

présenté par : Joséphine DORIN

Sujet : Etude épidémiologique des infections respiratoires
virales des hivers 2009 à 2012 en milieu hospitalier et apport
des nouvelles technologies au diagnostic viral

Jury :

Président : Mme Chantal FINANCE

Directeurs : Mme Véronique VENARD

Mme Sibylle BEVILACQUA

Juge : Mr Alain GERARD

Vu,

Nancy, le 30 Août 2012

Le Président du Jury

Directeurs de Thèse

Mme Chantal FINANCE

Mme Véronique VENARD

Mme Sibylle BEVILACQUA

Vu et approuvé,

Nancy, le 4.09.2012

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université de Lorraine,

Francine PAULUS

Vu,

Nancy, le

17 SEP. 2012

Le Président de l'Université de Lorraine,



Pierre MUTZENHARDT

N° d'enregistrement : 4084

N° d'identification :

TITRE

**Etude épidémiologique des infections respiratoires virales
des hivers 2009 à 2012 en milieu hospitalier
et apport des nouvelles technologies au diagnostic viral.**

Thèse soutenue le 9 octobre 2012

Par Joséphine DORIN

RESUME :

Les infections respiratoires basses sont des infections potentiellement graves, d'étiologies multiples. Les origines virales tiennent une place importante, notamment les virus influenza. La première partie de l'étude menée au CHU de Nancy a porté sur l'épidémiologie du virus influenza A(H1N1)2009 au cours des hivers 2009/2010 et 2010/2011. Ce « nouveau » virus a émergé au Mexique en février 2009 et s'est étendu rapidement au reste du monde. Il a modifié l'épidémiologie des virus influenza. En effet, il est apparu plus précocement et a touché une population préférentiellement plus jeune. Malgré une présentation clinique souvent modérée, certains patients ont développé des formes particulièrement sévères. La seconde partie de l'étude a permis d'évaluer sur l'année 2011/2012 une nouvelle technologie basée sur le principe de la PCR « multiplex », le Luminex. Depuis quelques années, ces technologies sont de plus en plus utilisées dans les laboratoires de biologie médicale avec leurs avantages et leurs inconvénients. Le Luminex et le kit xTAG® RVP Fast Assay commercialisés par la société ABBOTT® permettent de détecter plusieurs virus respiratoires au cours d'une même réaction d'amplification. La population testée était essentiellement des patients hospitalisés dans les services de réanimation présentant une forme respiratoire grave et/ou atypique. Le but de cette démarche est d'assurer un diagnostic viral rapide et ainsi de permettre une prise en charge plus adaptée des patients les plus fragiles.

MOTS CLES : Infections respiratoires, PAC, grippe, virus, H1N1, influenza, Luminex, PCR multiplex

Directeurs de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Dr Véronique VENARD	Laboratoire de Virologie, CHU Nancy	Expérimentale ☒
Dr Sibylle BEVILACQUA	Maladies infectieuses et tropicales, CHU Nancy	Bibliographique ☒
		Thème 5

Thèmes

1 – Sciences fondamentales

3 – Médicament

5 – Biologie

2 – Hygiène/Environnement

4 – Alimentation – Nutrition

6 – Pratique professionnelle