



RAPPORT ANNUEL

D'ACTIVITE 2024

Année d'exercice 2023

CNR Entérovirus et parechovirus

	Organisme / Structure d'hébergement	Responsable
Laboratoire Coordonnateur	Laboratoire de Virologie, CHU de Clermont-Ferrand	Pr Cécile HENQUELL
Laboratoire Associé	Laboratoire de Virologie, CHU de Lyon	Dr Isabelle SCHUFFENECKER
Laboratoire Associé	Centre collaborateur Poliovirus OMS, Institut Pasteur Paris	Maël BESSAUD

Guide de remplissage	Erreur ! Signet non défini.
Résumé analytique	5
Faits marquants	5
Executive summary	6
Highlights	6
1. Missions et organisation du CNR	7
Organigramme	7
Mission et Organisation	7
Démarche Qualité	8
2. Activités d'expertise	10
2.1 Evolution des techniques	10
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et troussees	11
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	13
2.4 Collections de matériel biologique	13
2.5 Activités d'expertises	14
2.6 Activités de séquençage	22
2.7 Partage de séquences produites par les CNR	27
3. Activités de surveillance	29
3.1 Description du réseau de partenaires	29
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	32
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	Erreur ! Signet non défini.
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	63
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	64
4. Alertes	66
5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil	69
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	69
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	70
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	71
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	72
6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	72
6.2 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	76

7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux.....	78
8. Programme d'activité pour les années suivantes	79
1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	81
1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	81
1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.....	82
1.3 Locaux et équipements	86
1.4 Collections de matériel biologique	90
1.5 Démarche qualité du laboratoire	90
2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	93
2.1 Liste des techniques de référence.....	93
2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR	101
3. Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)	102

Résumé analytique

Faits marquants

Le CNR des entérovirus (EV) et parechovirus (HPeV) associe un laboratoire coordonnateur (Virologie, CHU Clermont-Ferrand), et deux laboratoires associés (Virologie, CHU Lyon et le Centre collaborateur polio OMS, Institut Pasteur).

En 2023, 36 laboratoires du Réseau de Surveillance des Entérovirus (RSE) et 65 laboratoires hors RSE ont participé à la surveillance hospitalière des infections à EV. Au total, 86830 échantillons cliniques ont été analysés en PCR EV/rhinovirus et 2339 infections à EV ont été déclarées, ce nombre se rapprochant des années pré-COVID-19. Le typage moléculaire a permis l'identification d'EV pour 70% des infections.

L'année 2023 a été marquée par 1/ l'investigation d'infections néonatales précoces à echovirus 11 (E11) survenues entre juillet 2022 et mi-2023, avec l'identification d'un nouveau variant d'E11 multirecombinant et le lancement d'une alerte nationale et européenne en lien avec la gravité exceptionnelle des cas, 2/ une épidémie de méningite d'ampleur modérée, 3/ une circulation accrue par rapport à 2022 d'entérovirus A71 (EV-A71) observée dans les surveillances hospitalière et ambulatoire, et 4/ des infections sévères dominées par des atteintes neurologiques à type de (rhomb)encéphalites, encéphalomyélites et atteintes cérébelleuses (EV-A71).

Une détection de poliovirus dérivé du vaccin de type 3 (iPVDV-3) a été faite chez un enfant immunodéprimé de 15 mois ayant reçu 4 doses de VPO dans son pays d'origine (Maroc). Il a présenté une encéphalopathie sévère sans paralysie. Aucun poliovirus n'a été détecté autour de ce cas, ni dans les eaux usées de la ville de Toulouse.

Concernant les HPeV, 60 infections ont été détectées, dont la majorité chez les enfants < 3 mois. Deux enfants ont présenté une infection sévère, aucune d'elles n'a été fatale.

Conformément à l'un des objectifs de ce nouveau mandat, des contacts ont été pris en 2023 dans tous les départements ultramarins pour renforcer la surveillance des EV hors métropole. Elle se met en place en 2024.

Executive summary

Highlights

The CNR of enteroviruses (EV) and parechovirus (HPeV) combines a coordinating laboratory (Virologie, CHU Clermont-Ferrand), and two associated laboratories (Virologie, CHU Lyon and the WHO Collaborating Centre for Polio, Institut Pasteur).

In 2023, 36 laboratories of the Enterovirus Surveillance Network (RSE) and 65 laboratories outside RSE participated in hospital surveillance of EV infections. A total of 86,830 clinical samples were analyzed in PCR EV/rhinovirus and 2,339 EV infections were reported, this number approaching pre-COVID-19 years. Molecular typing allowed the identification of EV for 70% of infections.

The year 2023 was marked by 1/ the investigation of early neonatal infections with echovirus 11 (E11) occurring between July 2022 and mid-term 2023, with the identification of a new variant of multirecombinant E11 and the launch of a national and European alert in relation to the exceptional severity of cases, 2/ a moderate meningitis epidemic, 3/ increased circulation compared to 2022 of enterovirus A71 (EV-A71) observed in hospital and outpatient surveillance, and 4/ severe infections dominated by neurological (rhomb)encephalitis, encephalomyelitis and cerebellar disorders (EV-A71).

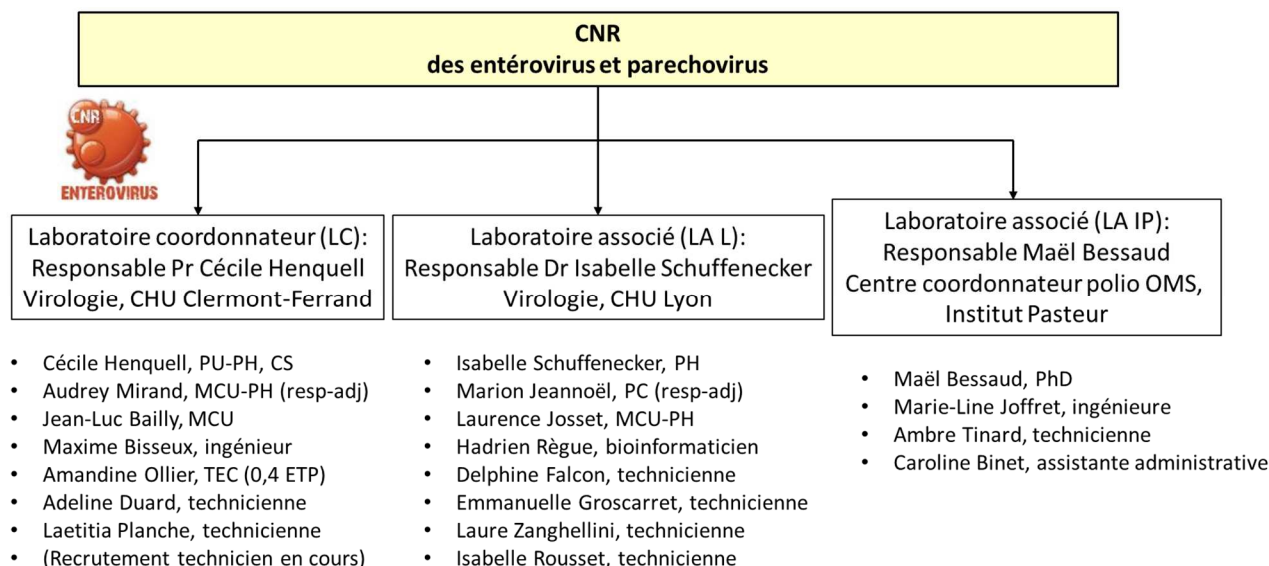
A detection of poliovirus derived from the type 3 vaccine (iPVDV-3) was made in a 15-month-old immunocompromised child who received 4 doses of OPV in his country of origin (Morocco). He presented with severe encephalopathy without paralysis. No poliovirus was detected around this case, nor in the wastewater of the city of Toulouse.

Concerning HPeV, 60 infections were detected, the majority in children < 3 months. Two children presented with a severe infection, none of them was fatal.

In line with one of the objectives of this new mandate, contacts were made in 2023 in all overseas departments to strengthen the surveillance of EVs outside Metropolitan France.

1. Missions et organisation du CNR

Organigramme



Les organigrammes des 3 laboratoires sont identiques à ceux présentés lors du dossier de candidature. Ils sont repris en Annexe 1, ainsi que les locaux et équipements.

Mission et Organisation

Pour le nouveau mandat 2023-2027 du CNR des entérovirus et parechovirus (CNR EV-PeV), **trois laboratoires sont associés** : les laboratoires de Clermont-Ferrand et de Lyon poursuivent une collaboration et un partage de l'activité depuis 2012, et le laboratoire Centre collaborateur polio OMS de l'Institut Pasteur apporte son expérience sur la recherche de poliovirus dans les eaux usées et son expertise spécifique sur l'analyse des souches de poliovirus.

1. Pour l'activité concernant les entérovirus non poliomyélitiques et les parechovirus

La surveillance est organisée depuis 1996 autour du **Réseau de Surveillance des entérovirus (RSE)**, qui regroupe une quarantaine de laboratoires de CHU et CH en France métropolitaine transmettant au CNR les échantillons biologiques testés positifs en ARN EV, ARN EV/rhinovirus et ARN HPeV pour identification moléculaire (génotypage) ainsi que les données cliniques associées *via* le site web dédié du CNR. Ce dispositif permet au CNR de fournir une épidémiologie précise des virus circulant en France métropolitaine, ainsi que des informations concernant la présentation clinique et la sévérité des infections associées.

Les deux laboratoires de Clermont-Ferrand et Lyon se partagent l'activité de génotypage, en ayant chacun des correspondants attitrés dans les CHU et CH participant au RSE. En fonction de la taille de chaque établissement et du nombre d'échantillons traités, la répartition de l'activité peut être rediscutée en cas d'arrêt de participation d'un centre, ou au contraire en cas de nouvelle participation. Une suppléance entre les deux laboratoires est possible pour les analyses d'expertise courante, avec une mise en commun d'approches techniques complémentaires en cas de difficulté technique ou de mise en place de nouveaux outils en cas d'émergence d'un type particulier (test PCR spécifique, fourniture de contrôles par exemple). En cas d'épidémie de grande ampleur, une collaboration et une répartition de l'activité serait envisagée de la même façon.

Pour le développement initié en 2023 de la surveillance dans les départements et régions d'Outre-Mer, une répartition de l'activité se fait également entre les deux laboratoires. Les contacts pris avec les biologistes des CHU ultramarins vont leur permettre d'intégrer la surveillance nationale en 2024 : Le laboratoire de Lyon est en charge de l'activité de Saint-Denis à la Réunion, de Papeete en Polynésie et de Nouméa en Nouvelle Calédonie, et le laboratoire de Clermont-Ferrand est en charge de Mayotte, de Fort-de-France en Martinique et de Pointe-à-Pitre en Guadeloupe. La Guyane pourrait également rejoindre le réseau.

Par ailleurs, le laboratoire de Clermont-Ferrand a mis en place en 2014 une **surveillance nationale communautaire des syndromes pied-main-bouche et de l'entérovirus A71 (EV-A71)** en s'appuyant sur le réseau de pédiatres libéraux de l'observatoire PARI. Les échantillons prélevés par les pédiatres sont tous envoyés et traités au CHU de Clermont-Ferrand.

2. Pour l'activité concernant spécifiquement les poliovirus

Les activités concernant les poliovirus nécessitent des autorisations MOT et sont réalisées par le LA L et le LA IP, qui sont membres du Réseau mondial des laboratoires polio. Ils sont accrédités pour différentes techniques de l'algorithme standard de détection de poliovirus :

Le LA L : isolement en culture cellulaire, différenciation intratypique ;

Le LA IP : isolement en culture cellulaire, différenciation intratypique, séquençage pour caractérisation génétique.

Les activités polio sont réparties comme suit au sein du CNR :

Le laboratoire de Lyon est en charge de la surveillance humaine de la poliomyélite en France Métropolitaine. Il réalise :

- Le suivi de l'immunité anti-polio chez les salariés exposés aux poliovirus (titrage des anticorps neutralisants par séroneutralisation) ;
- L'investigation de tout cas clinique évocateur de poliomyélite (paralysie chez un enfant de moins de 15 ans) survenant en France ou la confirmation de la détection d'un poliovirus dans un échantillon clinique humain, selon les recommandations de l'OMS : recherche de poliovirus dans les selles et, éventuellement d'autres prélèvements (écouvillonnages nasopharyngés par exemple) par isolement en cultures cellulaires, détection moléculaire et séquençage de la région génomique 1D.

Le laboratoire de l'Institut Pasteur est le laboratoire de référence pour le séquençage des poliovirus. Il réalise :

- La confirmation de la caractérisation génétique effectuée par le LA L en cas de détection de poliovirus ;
- La recherche de poliovirus dans les échantillons d'eaux usées selon l'algorithme de l'OMS (isolement en culture cellulaire, détection moléculaire et séquençage de la région génomique 1D).

Cette répartition permet une orientation sans ambiguïté des échantillons à traiter. Elle n'empêche pas le partage d'informations entre les deux laboratoires qui reste la règle, notamment lors d'événements exceptionnels. La concertation entre les deux laboratoires et le LC est importante pour consolider les résultats et garantir la clarté des résultats rendus aux autorités nationales de santé et à l'OMS.

La procédure d'alerte est détaillée dans la Figure 31, Annexe 1.

Démarche Qualité

Les programmes de qualité sont détaillés en Annexe 1, et les méthodes d'analyses en lien avec les activités du CNR sont indiquées dans les tableaux en Annexe 2.

1. Laboratoire de Virologie du CHU de Clermont-Ferrand

Le service de Virologie fait partie du Laboratoire de Biologie Médicale (LBM) du CHU de Clermont-Ferrand, qui est accrédité depuis le 1er août 2013 (N°8-3140) par le COFRAC selon la norme ISO15189. Les examens de détection des entérovirus (trousse Enterovirus R-gene™, bioMérieux) et des parechovirus (trousse Parechovirus r-gene™, bioMérieux) sont accrédités. L'accréditation du séquençage Sanger et NGS est prévu en 2024.

Le Service de Virologie et le CNR s'appuient sur les processus supports de management de la qualité mis en place de façon transversale par le LBM du CHU, la métrologie, la maintenance, la gestion des achats, l'hygiène et la sécurité, l'organisation et la communication, et la gestion du personnel et des compétences. Le suivi de la documentation, des stocks de réactifs, ainsi que des non-conformités éventuelles et actions d'amélioration mises en place sont gérés pour le CNR de la même manière que le reste des activités de virologie médicale, grâce au logiciel spécialisé Kalilab. Conformément à la norme ISO15189, des contrôles de qualité internes et externes, des audits internes et un suivi d'indicateurs sont réalisés.

2. Laboratoire de Virologie du CHU de Lyon

Le laboratoire de Virologie fait partie intégrante du laboratoire de biologie médicale multi-sites (LBMMS) des Hospices Civils de Lyon (HCL) et applique la politique de management de la qualité définie par la Direction de la Biologie. Depuis Décembre 2014, le LBMMS est accrédité (n°:8-3442) selon la norme NF EN ISO 15189.

La mise en œuvre de la politique qualité au Laboratoire de Virologie implique l'ensemble du personnel et se fait sous la responsabilité du chef de service, de la responsable qualité et de la cellule qualité des HCL.

Le LA L est accrédité par l'OMS pour l'isolement des poliovirus en culture cellulaire et le typage moléculaire des poliovirus par RT-PCR. La technique spécifique de détection de l'EV-D68 par RT-PCR en temps réel (technique 'maison') et la technique de titrage des anticorps anti-poliovirus par séroneutralisation (technique OMS) sont accréditées selon la norme ISO 15189 depuis mai 2022.

3. Centre collaborateur polio OMS de l'Institut Pasteur

Le LA IP n'étant pas un laboratoire de diagnostic, il n'est pas accrédité par le COFRAC. La démarche qualité s'appuie sur l'ensemble des procédures mises en place par l'Institut Pasteur et notamment le Service qualité, le Service de préventions des risques et la Direction des systèmes d'informations. Il bénéficie en outre de l'appui du Centre de recherche clinique pour les démarches réglementaires concernant les projets impliquant du matériel humain (démarches éthiques et RGPD) et de la Direction juridique pour les aspects concernant le protocole de Nagoya.

Un système d'audits internes organisés régulièrement par le Service de prévention des risques permet de vérifier la conformité des pratiques du laboratoire avec la réglementation applicable au MOT.

Enfin, en tant que laboratoire expert du Réseau mondial des laboratoires polio de l'OMS, le LA IP est soumis à des tests de compétence annuels et à des audits annuels de la part des coordinateurs de ce réseau.

2. Activités d'expertise

Les activités d'expertise sont présentées en tenant compte de la configuration du CNR en 2023 :

- Laboratoire de Virologie du CHU de Clermont-Ferrand (laboratoire coordonnateur, LC)
- Laboratoire de Virologie du CHU de Lyon (laboratoire associé, LA L)
- Centre Collaborateur OMS Polio de l'institut Pasteur (laboratoire associé, LA IP)

Éléments clefs 2023

1. Méthodes de typage : implémentation en routine du NGS (amplicons 1D^{VP1} et 1A/1B) à Lyon, et développement de séquençage rapide (MinION) à Clermont-Ferrand
2. Activité de génotypage en hausse de 20 % pour les entérovirus, retour à l'activité avant pandémie de COVID-19
3. Identification d'un iVDPV chez un nourrisson de 15 mois : mélange complexe de plusieurs souches de VDPV-3

2.1 Evolution des techniques

2.1.1 Laboratoire de Clermont-Ferrand

✓ Développement du séquençage sur amplicon de génomes complets par la méthode Oxford Nanopore pour séquençage rapide en cas d'alerte

Notre méthode d'amplification des génomes complets des Entérovirus A à D a été développée au laboratoire il y a plusieurs années, et était suivi par un séquençage PacBio long reads (en sous-traitance) jusque 2018, puis par séquençage Illumina short reads (en interne). Ces techniques sont des solutions de séquençage peu adaptées à l'identification rapide de souches en cas d'alerte.

En 2023 nous avons mis en place le séquençage Oxford Nanopore long reads qui est un séquençage en temps réel, permettant de répondre à l'urgence, et à un prix compétitif. En cas d'épidémie, ou de tableaux cliniques sévères nécessitant l'obtention du génome complet, l'amplification du génome complet et le séquençage de celui-ci peut être obtenu en 48h. Cette solution a été testée avec succès en condition réelle afin de valider la possibilité de rendu en urgence de données génomiques sur une souche nouvellement identifiée.

✓ Mise au point du séquençage du génome complet des rhinovirus par la technique Illumina

La diversité et les phénomènes de recombinaison complexes au sein des 167 types de rhinovirus nous ont conduits à développer le séquençage génomique complet, permettant une identification et des analyses moléculaires plus fiables. Cette approche complète celle utilisée couramment au laboratoire (séquençage Sanger sur la région 1A-1B codant les protéines VP4-VP2).

2.1.2 Laboratoire de Lyon

En septembre 2022, Le LC avait mis en place en routine le séquençage Illumina sur amplicons poolés des régions 1D (codant pour la protéine VP1) et 1A-1B (codant pour les protéines VP4-VP2) pour le typage de routine des EV après une phase d'évaluation comparative avec la méthode Sanger. Cette évolution technologique a montré sa robustesse organisationnelle en 2023 avec réalisation d'un run hebdomadaire et interprétation des résultats du pipeline automatisé par les biologistes du LA L. Une formation/habilitation des personnels techniques à l'interprétation et la validation des résultats est en cours. En parallèle, des développements bio-informatiques sont en cours pour l'import automatisé des résultats d'identification du pipeline dans les dossiers patients.

2.1.3 Centre collaborateur polio OMS de l'Institut Pasteur

Une méthode de traitement et de concentration des eaux usées en vue de détecter les poliovirus selon l'algorithme du Réseau mondial de laboratoires polio de l'OMS a été mise en place après le séjour d'une ingénieure du laboratoire dans le laboratoire polio du NIBSC (Potters Bar, UK). C'est cette technique qui a été utilisée pour la surveillance des poliovirus à Mayotte (cf. Chapitre 4).

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

2.2.1 Evaluation de la performance des techniques de détection moléculaire des entérovirus utilisés par les laboratoires du RSE

Depuis 2008, le LA L prend en charge financièrement le contrôle de qualité externe (CQE) Entérovirus distribué aux laboratoires du RSE par la société QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics, Glasgow) et assure un suivi global des résultats. Chaque laboratoire reçoit un rapport individuel de la société QCMD et un rapport global est réalisé par le LA L et présenté dans le rapport d'activités annuel du CNR. Les problèmes de non-détection ou de défaut de sensibilité occasionnellement mis en évidence vis-à-vis de certains types d'EV font l'objet de signalements de réactovigilance ou sont discutés au cas par cas avec les laboratoires du RSE et/ou les industriels concernés.

En 2023, le panel d'échantillons (Tableau 1) a été distribué à 33 laboratoires : 35 jeux de données complets ont été transmis par 29 laboratoires. Trente-trois jeux de données ont été obtenus avec des trousse de RT-PCR temps réel commercialisées : Enterovirus R-GENE® (bioMérieux) : n=13; Cepheid® Xpert EV (Cepheid) : n=7; RealStar® Enterovirus (Altona Diagnostics) : n=6 ; Enterovirus ELITE MGB® (ELItech) : n=3 ; RealCycler® Enterovirus (Progenie Molecular) : n=1 ; RIDA®GENE Enterovirus (R-BioPharm) : n=1 ; Allplex® Meningitidis (Seegene) : n=1. Deux jeux de données ont été obtenus avec des techniques de RT-PCR temps réel maison.

Tableau 1 - Contrôle de qualité externe QCMD EV : composition du panel EV 2023 et résultats obtenus par le RSE comparativement aux résultats globaux tous pays confondus

Sample code	Sample content	Detection frequency	Sample Status	Percentage correct (All participating labs)		Percentage correct (French labs)	
				(%)	(n)	(%)	(n)
EVRNA22S-01	Negative		Core	96,2	130	100	35
EVRNA22S-02	Coxsackievirus A24	Freq detected	Core	98,5	130	97.1	35
EVRNA22S-03	Echovirus 6	Freq detected	Core	93,8	130	100	35
EVRNA22S-04	Echovirus 25	Freq detected	Core	100	130	100	35
EVRNA22S-05	Enterovirus D68/B3	Detected	Core	98,5	130	71.4	35
EVRNA22S-06	Coxsackievirus A9	Detected	Core	99,2	130	97.1	35
EVRNA22S-07	Enterovirus A71	Detected	Core	99,2	130	94.3	35
EVRNA22S-08	Enterovirus D68/B3	Freq detected	Core	98,5	130	100	35
EVRNA22S-09	Echovirus 30	Detected	Core	96,2	130	94.3	35
EVRNA22S-10	Echovirus 18	Freq detected	Core	95,4	130	100	35

Pour 70,6% (85,7% en 2022) des jeux de données, la réponse était correcte sur les 10 échantillons du « core » (Figure 1). Pour 91,4% des jeux de données, la réponse était exacte sur 9/10 échantillons (non prise en compte de l'échantillon contenant une faible charge virale d'EV-D68 B3). Le test Progenie a échoué à détecter le CV-A24, l'EV-D68 B3 avec faible charge virale, le CV-A9, l'EV-A71/c2 et l'E-30. La trousse Cepheid® Xpert EV a échoué à détecter l'EV-D68 B3 avec faible charge dans 7/7 jeux de donnée et l'E-30 dans 1/7 jeux de données. La trousse bioMérieux a échoué à détecter l'EV-D68 B3 avec faible charge virale dans 1/7 jeux de données et la trousse Altona l'EV-A71/c2 dans 1/1 jeu de données.

Pour rappel, le défaut de détection de l'EV-D68 génotype B3 par le test Cepheid® Xpert EV est observé depuis plusieurs années, et impacte les performances du RSE au QCMD en fonction du nombre d'utilisateurs de ce test. Ceci avait été remonté à la société Cepheid et partagé avec les partenaires du RSE.

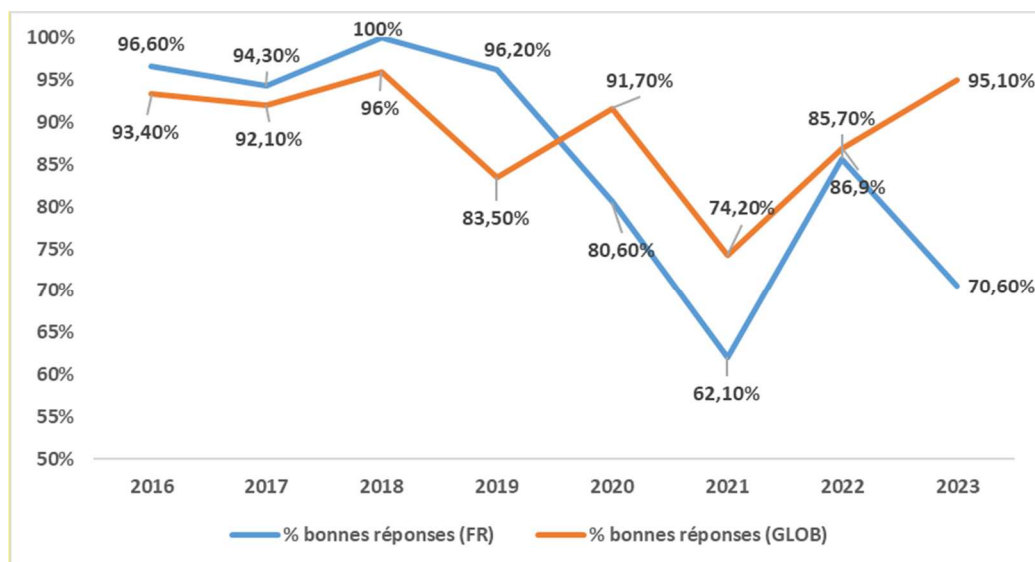


Figure 1. Performances obtenues par les laboratoires français et les laboratoires étrangers au contrôle de qualité externe QCMD Enterovirus, 2016-2023

(en % de jeux de données ayant attribué une réponse correcte pour les échantillons du « core »)

On regrettera que les panels QCMD soient constitués d'échantillons strictement identiques (dans leur composition) d'une année sur l'autre. Une demande a été faite auprès de QCMD pour le renouvellement des panels en 2023.

2.2.2 Evaluation inter-laboratoires pour la détection et le typage de l'entérovirus D68 (EV-D68)

Depuis 2019, une EIL a été mis en place entre les deux laboratoires du CNR (organisation alternée) pour l'évaluation comparative des techniques de détection et de typage de l'EV-D68 :

- Détection :
 - Trousse Rhinovirus/EV r-gene® (bioMérieux) sur Rotor-Gene (LA L)
 - Trousse Enterovirus R-gene® (bioMérieux) sur Rotor-Gene et sur ABI 7500 (LC et LA L)
 - RT-PCR spécifique maison EV-D68 sur ABI et QS (LC et LA L)
- Génotypage
 - Séquence 1D partielle (Nix et al., 2008, adaptée) (LC et LA L)
 - Séquence 1D complète (Mirand et al., 2014) (LC et LA L)
 - Séquence 1A-1B (Savolainen et al., 2002) (LC et LA L)
 - Séquence 1A-1B (Linsuwanon et al., 2009, adaptée) (LC et LA L)
 - NGS génome complet par séquençage sur amplicon (LA L) et séquençage direct sur ARN (LC)

Les performances des méthodes évaluées sont bonnes et concordantes entre les deux laboratoires du CNR.

2.2.3 Evaluation inter-laboratoires pour le titrage des anticorps anti-poliovirus

Un échange inter-laboratoires est organisé entre le LA L et le laboratoire Biomnis depuis 2018. Depuis 2020, le laboratoire Pasteur-Cerba participe également à cet échange. Il s'agit d'un échange bisannuel avec l'envoi d'un panel de 3 échantillons à tour de rôle par les 3 laboratoires participants. La méthode de titrage et l'interprétation des résultats sont réalisés selon les recommandations de l'OMS.

Les résultats de cet EIL montrent une concordance entre les trois laboratoires.

2.2.4 Evaluation de trousse

Pas d'évaluation de trousse commerciales en 2023.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Tableau 2 - Liste des techniques transférées en 2023

Techniques transférées	Destinataires
Laboratoire associé Lyon	
Méthodes de génotypage des rhinovirus et entérovirus par amplification/séquençage de la région VP4-VP2 (modes opératoires RT-PCR)	Thibault Guinoiseau Unité Emergences Laboratoire de Virologie du CHU de Tours

2.4 Collections de matériel biologique

L'organisation, les conditions de stockage et de mise à disposition des collections de matériel biologique du CNR sont décrites pour chaque laboratoire dans l'Annexe 1.

La collection biologique est constituée de tous les échantillons biologiques contenant de l'ARN EV ou EV/rhinovirus ou HPeV transmis par les centres participant au RSE et des échantillons biologiques des deux laboratoires de CHU. Tous les acides nucléiques issus de la détection par PCR sont également conservés.

Depuis le début du mandat actuel (2023-2027), les collections de matériel biologique se sont enrichies d'échantillons cliniques prélevés en 2023-2024, positifs pour la recherche d'entérovirus, de parechovirus et de rhinovirus typés, et des concentrats des eaux usées collectées dans le cadre de la surveillance environnementale mise en place à Mayotte.

Les échantillons de matériel biologique (nombre et nature) distribués par les laboratoires du CNR sont indiqués dans le Tableau 3.

Tableau 3 - Souches et échantillons cliniques distribués en 2023

Laboratoire coordonnateur				
Echantillons cliniques	Pr Jacques Izopet, CHU Toulouse	Echantillons positifs en HPeV	28/11/2023	Evaluation d'une trousse de RT-PCR multiplex EV et HPeV (Altona)
Laboratoire associé				
Echantillons cliniques et échantillons QCMD	Pr Sylvie Larrat, Virologie, CHU Grenoble	3 échantillons cliniques positifs en HPeV-3 et 5 échantillons QCMD (HHPEV-2, 3, 4 et 6)	16/02/2023	Evaluation technique diagnostique multiplex Meningitis Viral 2 ELITE MGB® panel
Souche de référence	Dr Sébastien Wurtzer, Eau de Paris	1 ml de souche PV1 Sabin produite sur L20B	12/04/2023	Témoin positif pour la détection de poliovirus dans les eaux usées (GT Poliovirus)
Echantillons cliniques	Jennifer Servanin, Eurofins, Lyon 07 ; Bénédicte Roquebert, Pasteur-Cerba, St Ouen	3 serums avec titre connu en Ac anti-PV1	20/07/2023	EIL (Sérologie polio)

2.5 Activités d'expertises

2.5.1 Recherche et identification des entérovirus

Génotypage des entérovirus

Le typage moléculaire des EV a été réalisé par le LC et le LA L du CNR selon une répartition des tâches prédéfinie (attribution à chacun d'un réseau de laboratoires correspondants) et selon des méthodes applicables à des échantillons cliniques ou à des souches isolées en culture cellulaire.

Tableau 4 - Activité de génotypage et répartition entre les deux laboratoires du CNR

	Echantillons reçus	Echantillons testés	Patients testés ¹	Patients avec EV et/ou HRV ²	Patients avec EV typé	Patients avec RV typé	Délai médian rendu résultat (jours)
Total CNR 2023	2690	2498	2196	1935	1639	352	
LC Clermont-Fd	1119	1042	922	814 (88%)	725	96	7,1
LA Lyon	1571	1456	1274	1121 (88%)	914	256	

¹ Lorsque des échantillons sont reçus pour un même patient, le génotypage est tenté en priorité sur les échantillons de LCS et de sang, ce qui peut expliquer la différence entre le nombre d'échantillons reçus et testés.

² Le génotypage peut conduire à l'identification d'un EV, d'un RV ou d'une co-infection.

Tableau 5a - Echantillons analysés par le LC – 2023

Dpt	Origine géographique	Echantillons reçus	Echantillons testés	Patients testés	Patients avec EV/RV typés	Patients typés EV	Patients typés RV
3	CH MONTLUCON	1	1	1	1 (100%)	1	0
3	CH MOULINS	4	4	4	4 (100%)	4	0
3	CH VICHY	18	15	11	10 (91%)	9	1
6	CH ANTIBES JUAN LES PINS	7	7	7	7 (100%)	7	0
10	CH TROYES	4	4	4	4 (100%)	4	0
12	CH RODEZ	7	6	3	3 (100%)	3	0
13	CH AIX EN PROVENCE	24	24	24	23 (96%)	23	0
15	CH AURILLAC	10	8	8	7 (88%)	7	0
25	HOPITAL ST JACQUES - BESANCON	14	14	9	8 (89%)	8	0
28	CH CHARTRES	1	1	1	1 (100%)	1	0
31	HOPITAL PURPAN - TOULOUSE	289	252	210	162 (77%)	117	52
33	CH LIBOURNE	1	1	1	1 (100%)	1	0
35	HOPITAL PONCHAILLOU - RENNES	53	47	39	38 (97%)	33	5
37	HOPITAL BRETON- TOURS	2	2	2	1 (50%)	1	0
43	CH LE PUY EN VELAY	7	7	7	6 (86%)	6	0
45	CH AMILLY - MONTARGIS	1	1	1	1 (100%)	1	0
45	HOPITAL DE LA SOURCE - ORLEANS	31	31	21	16 (76%)	16	0
54	HOPITAL BRABOIS - NANCY	5	3	3	3 (100%)	2	1
56	CH VANNES	14	14	14	13 (93%)	13	0
58	CH NEVERS	3	3	3	3 (100%)	3	0
59	CH VALENCIENNES	4	4	4	3 (75%)	3	0
63	CHU CLERMONT FERRAND	167	146	119	98 (82%)	84	14
64	CH COTE BASQUE - BAYONNE	34	34	31	31 (100%)	31	0
68	HOPITAUX CIVILS – COLMAR	1	1	1	1 (100%)	1	0
68	HOPITAL MULLER - MULHOUSE	4	3	2	2 (100%)	2	0
69	HOPITAL LA CROIX ROUSSE - LYON	1	1	1	1 (100%)	0	1
75	HOPITAL COCHIN - PARIS	87	85	76	68 (89%)	59	9
75	HOPITAL NECKER - PARIS	5	5	5	4 (80%)	4	0
78	CH VERSAILLES	48	48	48	47 (98%)	47	0
78	CH MANTES LA JOLIE	17	17	17	17 (100%)	17	1
80	HOPITAL SUD - AMIENS	25	24	21	20 (95%)	20	0
83	CH ST RAPHAEL - FREJUS	4	4	4	4 (100%)	4	0
86	CHU POITIERS	1	1	1	1 (100%)	1	0
88	CH EDURKHEIM - EPINAL	1	1	1	0 (0%)	0	0
90	HOPITAL NORD FRANCHE COMTE	1	1	1	1 (100%)	1	0
92	HOPITAL AMERICAIN - PARIS	2	2	1	1 (100%)	1	0
93	HOPITAL AVICENNE - BOBIGNY	21	21	21	19 (90%)	13	6
95	CH VICTOR DUPOUY - ARGENTEUIL	1	1	2	0 (0%)	0	0
95	CERBA –CERGY PONTOISE	3	3	3	3 (100%)	3	0
95	CH GONESSE	25	25	25	25 (100%)	25	0
97	CHU POINTE A PITRE	6	5	3	3 (100%)	3	0
	CROATIE	3	3	1	1 (100%)	1	0

Tableau 5a - Echantillons analysés par le LC – 2023 (suite)

Dpt	Origine géographique	Echantillons reçus	Echantillons testés	Patients testés	Patients avec EV/RV typés	Patients typés EV	Patients typés RV
Sous Total		957	880	761	662 (87%)	580	90
Réseau Ambulatoire PMB		162	162	161	152 (94%)	145	6
Total LC – Clermont-Fd		1119	1042	922	814 (88%)	725	96

Tableau 5b - Echantillons analysés par le LA L – 2023

Dpt	Origine géographique	Echantillons reçus	Echantillons testés	Patients testés	Patients avec EV/RV typés	Patients typés EV	Patients typés RV
6	CH ANTIBES	4					
6	CHU NICE	2	1	1	1 (100%)		1
8	LABM CHARLEVILLE	1	1	1	1 (100%)	1	
12	CH RODEZ	3	3	1	1 (100%)	1	
14	CHU CAEN	116	106	81	75 (93%)	73	9
17	CH LA ROCHELLE	2	2	1			
21	CHU DIJON	41	41	36	32 (89%)	20	13
25	CH BESANCON	2	2	2	2 (100%)	1	1
26	CH ROMANS	4	4	4	4 (100%)	4	
26	CH VALENCE	7	6	5	5 (100%)	5	
27	CU EURE SEINE	1	1	1			
29	CHU BREST	177	175	125	120 (96%)	96	37
30	CH ALES	1	1	1	1 (100%)	1	
31	CHU TOULOUSE	17	8	1	8 (100%)	1	
33	CHU BORDEAUX	60	58	55	48 (87%)	47	2
34	CHU MONTPELLIER	8	6	5	5 (100%)	5	
36	LABM CHATEAUX	1	1	1	1 (100%)		
37	CHU TOURS	54	52	52	48 (92%)	40	11
38	CH BOURGOIN	6	5	5	4 (80%)	4	
38	CHU GRENOBLE	35	35	32	21 (66%)	12	11
38	CH VIENNE	12	10	10	10 (100%)	10	
42	CHU SAINT-ETIENNE	119	116	93	87 (94%)	78	
44	CHU NANTES	1	1	1	1 (100%)	1	
49	CHU ANGERS	48	46	44	35 (80%)	35	
51	CHU REIMS	1	1	1	1 (100%)	1	
52	CH SAINT DIZIER	7	4	4	3 (75%)	3	
56	LABO PLOEMEUR	1	1	1			
57	CHR METZ	1	1	1	1 (100%)	1	
57	CH THIONVILLE	1	1	1	1 (100%)	1	
59	CHU LILLE	111	111	105	91 (87%)	79	21
60	CH COMPIEGNE	4	2	1	1 (100%)	1	
62	CH BETHUNE	1	1	1	1 (100%)	1	
62	CH BOULOGNE	7	7	7	5 (71%)	5	1
62	CH CALAIS	4	4	4	4 (100%)	4	
62	CH LENS	3	3	3	3 (100%)	2	1
62	CH SAINT OMER	1	1	1	1 (100%)	1	

Tableau 5b - Echantillons analysés par le LA L – 2023 (suite)

Dpt	Origine géographique	Echantillons reçus	Echantillons testés	Patients testés	Patients avec EV/RV typés	Patients typés EV	Patients typés RV
67	CHU STRASBOURG	54	52	50	33 (66%)	30	3
68	CH COLMAR	1	1	1	1 (100%)	1	
69	CHU LYON	312	250	219	195 (89%)	145	59
69	TGI LYON	1	1	1	1 (100%)		1
69	CH VILLEFRANCHE	21	21	20	20 (100%)	20	
71	CH MACON	1					
74	CH ALPES LEMAN	1	1	1			
74	CH ANNECY	1	1	1	1 (100%)	1	
75	APHP NECKER	31	30	25	23 (92%)	13	11
75	APHP R DEBRE	7	7	5	5 (100%)	3	3
75	APHP SAINT LOUIS	1	1	1	1 (100%)	1	
75	APHP TROUSSEAU	34	34	31	31 (100%)	31	
76	CHU ROUEN	189	189	184	149 (81%)	98	57
79	NIORT	1	1	1			
83	CHI FREJUS	2	1	1			
83	CHI TOULON	29	29	29	26 (90%)	24	2
84	CHU AVIGNON	1	1	1	1 (100%)	1	
86	CHU POITIERS	4	3	3	2 (100%)	2	
88	CH REMIREMONT	1	1	1	1 (100%)	1	
88	CH SAINT DIE	3	3	1	1 (100%)	1	
89	CH AUXERRE	1	1	1	1 (100%)	1	
89	CH SENS	3	2	1	1 (100%)	1	1
93	APHP JEAN VERDIER	3	3	3	3 (100%)	3	
93	CH SAINT DENIS	1	1	1			
94	APHP PAUL BROUSSE	3	3	3	2 (67%)	2	
95	CH CERGY PONTOISE	1	1	1	1 (100%)	1	
Total LA - Lyon		1571	1456	1274	1121 (88%)	914	256

On peut noter un nombre d'échantillons reçus à Clermont-Ferrand inférieur à celui de Lyon, expliqué par l'arrêt d'envois de certains centres. La raison donnée est une surcharge de travail trop importante, et/ou une équipe de biologistes en sous-effectif ne permettant plus, au moins à titre provisoire, la participation au RSE. Les centres en difficulté ont été, ou vont être, contactés individuellement de façon à essayer de trouver des solutions pour pérenniser leur participation. Si ce n'est pas possible, une redistribution de l'activité sera envisagée entre le LC et le LA L.

Nature des échantillons analysés

Les échantillons reçus et analysés pour typage moléculaire par le CNR étaient des échantillons biologiques ou des extraits d'acides nucléiques (Figure 2).

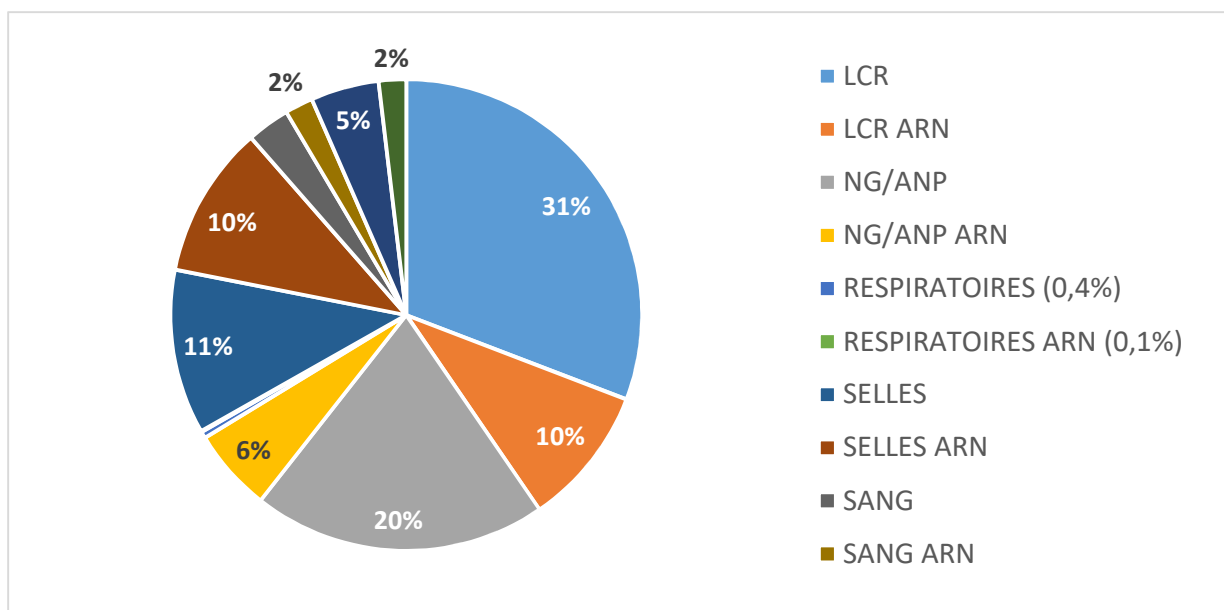


Figure 2. Nature des échantillons analysés par le CNR EV-PeV en 2023 (n=2498)

Performance du typage

En 2023, 2498 échantillons cliniques, correspondant à 2196 dossiers patients, ont été analysés. Cette activité est équivalente à celles observées en 2018 et 2019 avant la pandémie de COVID-19.

La performance globale du génotypage des EV, soit la proportion de dossiers patients analysés avec identification, est restée stable par rapport aux années antérieures avec **88% de dossiers patients avec identification**. Elle est identique dans les 2 laboratoires du CNR.

Diagnostic des infections à EV-D68

Modalités du diagnostic des infections à EV-D68 en 2023

- Au CHU Clermont-Fd : recherche par génotypage de tous les prélèvements respiratoires détectés positifs en EV/rhinovirus, toute l'année
- Au CHU Lyon : recherche ciblée par PCR EV-D68 spécifique sur des prélèvements respiratoires détectés positifs en EV/rhinovirus chez des patients hospitalisés pour infection respiratoire ou neurologique sévère et recherche systématique par PCR EV-D68 spécifique chez les enfants de moins de 5 ans entre septembre et novembre
- Recherche ciblée sur des prélèvements respiratoires détectés positifs en EV ou EV/rhinovirus chez des patients hospitalisés pour infection respiratoire ou neurologique sévère et transmis pour typage au CNR **par les partenaires du RSE**
- Identification de cas dans le cadre de l'activité de **typage moléculaire non ciblée des infections à EV**.

Tableau 6 - Echantillons analysés pour le diagnostic des infections à EV-D68 en 2023

	Echantillons reçus	Patients testés	Infection à EV-D68
Total CNR 2023	1727	1447	38
LC Clermont-Fd	521	496	10
LA Lyon	1206	951	28

Tableau 7 - Provenance des échantillons analysés pour le diagnostic des infections à EV-D68

Dpt	Origine géographique	Echantillons testés	Patients testés	Infection à EV-D68
LC Clermont-Fd				
31	CHU TOULOUSE	2	2	0
35	CHU RENNES	2	2	0
37	CHU TOURS	1	1	0
54	CHU NANCY	1	1	0
63	CHU CLERMONT-FERRAND	473	450	7
75	APHP COCHIN	25	24	3
75	APHP NECKER	1	1	0
80	CHU AMIENS	5	4	0
93	APHP AVICENNE	8	8	0
93	CH JEAN VERDIER	3	3	0
Total		521	496	10
LA Lyon				
14	CHU CAEN	2	2	1
29	CHU BREST	1	1	0
33	CHU BORDEAUX	4	4	3
37	CHU TOURS	5	5	2
42	CHU SAINT-ETIENNE	3	3	0
59	CHU LILLE	18	18	11
62	CH LENS	1	1	1
69	CHU LYON	1152	898	9
69	CH VILLEFRANCHE	1	1	1
75	APHP NECKER	2	2	0
76	CHU ROUEN	16	15	0
79	CH NIORT	1	1	0
Total		1206	951	28

2.5.2 Recherche et identification des parechovirus

Diagnostic des infections à parechovirus

En 2023, le CNR EV-PeV a analysé 3483 échantillons prélevés chez 3237 patients (Tableaux 8 et 9), selon les modalités suivantes :

- **Pour les patients du CHU de Lyon** : recherche systématique sur tous les LCS reçus à l'Institut des Agents infectieux par la technique FilmArray® (bioMérieux) (depuis Octobre 2020).
- **Pour les patients du CHU de Clermont-Ferrand** : bilan de fièvre et suspicion d'infection neuro-méningée chez les enfants de moins de 1 an (LCS et sang), bilan d'atteinte neurologique sévère quel que soit l'âge (LCS). Le test Parechovirus R-Gene® (bioMérieux) est utilisé.
- Pour tous les patients dont les échantillons ont été adressés au CNR par les laboratoires du **RSE ou d'autres laboratoires ne réalisant pas ce diagnostic.**

Tableau 8 - Activité de diagnostic des infections à parechovirus, 2023

	Echantillons testés	Patients testés	Echantillons positifs	Patients avec infection HPeV	Délai médian rendu résultat (jours)
Total CNR 2023	3482	3237	10	10	
LC Clermont-Fd	303	248	4	4	4 (0-12)
LA Lyon	3179	2989	6	6	4 (0-10)

Tableau 9 - Provenance des échantillons analysés pour le diagnostic des infections à parechovirus, 2023

Dpt	Origine géographique	Echantillons testés	Patients testés	Echantillons positifs	Patients avec infection PeV
LC Clermont-Fd					
3	CH MONTLUCON	3	3	0	0
15	CH AURILLAC	1	1	0	0
25	CHU BESANCON	1	1	0	0
43	CH LE PUY EN VELAY	14	12	0	0
45	CHU ORLEANS	3	3	0	0
63	CHU CLERMONT FERRAND	271	221	2	2
75	HOPITAL COCHIN - PARIS	3	3	0	0
80	CHU AMIENS	3	2	1	1
83	CH FREJUS	1	1	1	1
90	HOPITAL NORD FRANCHE COMTE	3	1	0	0
Total		303	248	4	4
LA Lyon					
1	CH AMBERIEU	2	2	0	0
1	CH BOURG EN BRESSE	27	27	0	0
1	CH OYONNAX	3	3	0	0
1	CH ANNONAY	1	1	0	0
17	LABM CHARENTE MARITIME	1	1	0	0
26	CH ROMANS	12	11	0	0
26	CH VALENCE	47	47	0	0
28	CH DREUX	1	1	0	0
38	CHU BOURGOIN	91	85	0	0
38	TGI GRENOBLE	1	1	0	0
38	CH VIENNE	88	86	0	0
38	TGI VIENNE	1	1	0	0
42	LABM FEURS	1	1	0	0
45	CH AMILLY	1	1	0	0
64	CH MONTARGIS	1	1	0	0
67	CH METZ	1	1	1	1
63	CHU CLERMONT FERRAND	1	1	0	0
69	CHU LYON	2803	2625	5	5
69	TGI LYON	3	3	0	0
69	CH VILLEFRANCHE SUR SAONE	48	48	0	0
71	CH MACON	43	40	0	0
83	CH FREJUS	1	1	0	0
97	CHU ST DENIS LA REUNION	1	1	0	0
Total		3179	2989	6	6

Génotypage des parechovirus

En 2023, le génotypage des parechovirus, réalisé par le LC et le LA L, a été possible pour 64 % (27/42) des dossiers analysés (Tableaux 10 et 11).

Les échecs de typage correspondaient à des LCS détectés positifs en PCR multiplex avec le test FilmArray® (bioMérieux), avec une charge virale probablement faible.

Tableau 10 - Activité de génotypage des parechovirus, 2023

	Echantillons testés	Patients testés	Patients avec PeV typé	Délai médian rendu résultat (jours)
Total CNR 2023	44	42	27	
LC Clermont-Fd	13	12	9 (75%)	11 (6-18)
LA Lyon	31	30	18 (60%)	15 (6-32)

Tableau 11 - Provenance des échantillons analysés pour le génotypage des parechovirus, 2023

Dpt	Origine géographique	Echantillons testés	Patients testés	Patients avec PeV typé	Types PeV (n)
LC Clermont-Fd					
25	CHU BESANCON	1	1	1	HPeV-3 (1)
45	CHU ORLEANS	2	2	0	non typable
63	CHU CLERMONT FERRAND	2	2	2	HPeV-1 (1), HPeV-3 (1)
64	CH BAYONNE	1	1	1	HPeV-3 (1)
74	HOPITAL PAYS DU MONT-BLANC	1	1	1	HPeV-3 (1)
78	CH VERSAILLES	1	1	1	HPeV-3 (1)
80	CHU AMIENS	4	3	2	HPeV-5 (2)
83	CH FREJUS	1	1	1	HPeV-3
Total		13	12	9 (75%)	
LA Lyon					
14	CHU CAEN	8	6	3	HPeV-3 (3), non typable (5)
21	CHU DIJON	3	3	3	HPeV-1 (2), HPeV-4 (1)
29	CHU BREST	2	1	1	HPeV-4 (1)
42	CHU SAINT ETIENNE	3	3	2	HPeV-1 (1), HPeV-4 (1), non typable (1)
56	LABM PLOEMEUR	1	1	1	HPeV-4 (1)
57	CH METZ	1	1	0	non typable
59	CHU LILLE	2	2	2	HPeV-1 (1), HPeV-3 (1)
65	CH TARBES	1	1	1	HPeV-3 (1)
69	CHU LYON	4	4	0	non typable (4)
75	APHP TROUSSEAU	2	2	2	HPeV-1 (1), HPeV-3 (1)
76	CHU ROUEN	3	3	2	HPeV-3 (2), non typable (1)
83	CH FREJUS	1	1	1	HPeV-3 (1)
Total		31	30	18 (60%)	

2.6 Activités de séquençage

Aucune sélection des isolats n'est réalisée *a priori* par le CNR et le degré d'exhaustivité est de 65-75% des infections à EV déclarées par le RSE.

Séquençage CNR EV-HPeV

- Le séquençage des isolats d'EV, HPeV et rhinovirus issu de la surveillance humaine est réalisé par le LC et le LA L. Le LA IP réalise le séquençage des PV et EV issus de la surveillance environnementale, et apporte son expertise dans l'analyse des mélanges complexes de souches de PV.
- Tous les échantillons (cliniques ou acides nucléiques) reçus au CNR pour des cas cliniques sévères sont séquencés pour identification de la souche EV ou HPeV détectée par PCR dans l'échantillon clinique. Pour les cas non sévères, le typage est ciblé sur le LCS et le sang et/ou échantillons à forte charge virale.
- Echantillons séquencés en 2023 par séquençage Sanger : n=2063 ; par NGS (génomome partiel) : n=759 ; par NGS (génomome complet) : n=878.
- Les résultats du génotypage et les séquences produites à partir des échantillons cliniques sont mis à disposition des biologistes qui les ont envoyés. Une partie des séquences est également mise à disposition de la communauté scientifique en les publiant sur GenBank.
- Equipement : plateformes de séquençage NGS (génomome partiel ou génomome complet) sur les 3 sites ; séquençage rapide (réponse en 48-72h) par séquençage génomique partiel en technique Sanger ou complet en technique Nanopore (MinION)
- Analyse bioinformatique et capacité de stockage des données produites sur chacun des 3 sites
- Expertise d'analyses moléculaires dans les 3 laboratoires (bases de données de séquences, analyses phylogénétiques).

2.6.1 Laboratoire de Clermont-Ferrand

Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Accès interne et externe disponibles. L'ingénieur du CNR et un bio-informaticien en support (plateforme de séquençage du CHU) permettent l'analyse des données. Ressources : en interne, serveur d'analyse 8 cœurs pour la pratique courante ; et si besoin, accès à 720 cœurs physiques, 6 To de RAM répartis sur 42 nœuds de calcul (Mésocentre de l'université Clermont-Auvergne). Script d'analyses utilisant des outils open source (Flye, Medaka, Porechop, Filtlong, samtools, SPAdes, bwa mem, bcftools, GATK)

Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	1/ Interne au CNR (équipement de séquençage du laboratoire de Virologie) ; 2/ Et plateforme de séquençage NGS du CHU de Clermont-Ferrand 1/ Interne au CNR : Séquençage Sanger (séquenceur Dx) et Séquençage Nanopore (1 automate d'extraction MGI 2*96 puits, 1 Mk1C Nanopore, 1 Viaflow automate de pipetage 96 puits) 2/ Plateforme NGS du CHU : Séquençage Illumina (3 MiSeq, 1 NextSeq, 2 Qubit) et séquençage Nanopore dans le CNR

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

<input type="checkbox"/> NON	Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Une surveillance moléculaire des virus épidémiques EV-A71 et EV-D68 est réalisée en continu afin d'étudier leur évolution génétique.

Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrivez ci-dessous les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, serogroupe/serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...) et précisez si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquez alors lesquelles)

Les analyses bio-informatiques conduites dépendent de la souche considérée et de la problématique explorée. Dans tous les cas, une analyse des mutations sur le génome complet (wgMLST), une prédiction du genotype et du sous-genotype (MegaX), une analyse phylogénétique (MegaX) et une analyse de recombinaison (SimPlot) sont menées. En cas de recombinaison, une recherche des souches parentales (SimPlot, par séquençage de souches de la même espèce en co-circulation), une datation des événements de recombinaison (Beast, réalisé pour l'EV-A71 en 2023) et une prédiction des structures secondaires des régions non codantes (RNAstructure réalisé pour l'E11 en 2023) sont menées. Une analyse phylogéographique peut être menée de façon à analyser la diffusion de souches en France, en Europe et dans le monde, et de identifier leur origine.

Séquençage utilisé à des fins d'investigations d'épidémies :

- Infections néonatales à E11 : n=34 génomes
- Infections à CVB4 avec séquence VP4-VP2 atypique a été observée en 2023 : 40 génomes complets ont été séquencés, montrant qu'il ne s'agissait pas d'une épidémie d'origine unique, mais de la co-circulation en France de multiples souches chacune multirecombinante. Leur circulation s'est arrêtée à l'été.
- Epidémie de conjonctivite hémorragique à CVA24 à Mayotte depuis décembre 2023 (échantillons reçus en janvier 2024, non comptabilisés dans l'activité 2023)

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

En 2023, Sanger : n= 1385 (931 entérovirus, 10 parechovirus et 444 rhinovirus); NGS GC = 202 EV-A, 22 EV-B et 6 EV-D68

Séquençage Sanger : aucune sélection (toutes les souches sont séquencées) ;

Séquençage NGS : sélection selon le type de virus (types rares par exemple), le contexte épidémiologique (épidémie) ou selon études en cours sur l'évolution génétique et la diffusion des souches en France et/ou en Europe. En 2023 : Dans le cadre de la surveillance de l'EV-A71, toutes les souches d'EV-A71 identifiées entre 2016 et 2023 et 10% des souches des autres EV-A ont été séquencées en génomes complets. Pour les EV-B, les souches ayant circulé en même temps et dans la même zone géographique que l'E11 ont été séquencées afin de rechercher les souches donneuses des fragments génomiques étrangers dans le génome recombinant du nouveau variant d'E11 identifié. Toutes les souches EV-D68 ont fait l'objet de séquençage génome complet.

Séquençage utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences :génomés assemblés ou séquences brutes (fastQ files) ?

Dans les bases de données fermées : Les séquences partielles issues du séquençage Sanger sont stockées en interne et disponibles sur demande. Elles sont partagées systématiquement avec les biologistes de chaque centre ayant envoyé les échantillons à génotyper. En fonction de leur intérêt (type rare, épidémie, ...), elles peuvent être déposées dans Genbank. Elles le sont systématiquement en cas de publication scientifique.

Dans des bases de données publiques : Les génomes complets assemblés sont déposés dans la base de données publiques Genbank et disponibles pour tous, avec les métadonnées associées.

2.6.2 Laboratoire de Lyon

Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
* OUI	- Sanger : accès à une plateforme externe (Microsynth, Vaulx-en-Velin) - Séquençage à haut débit : accès à une plateforme interne (GenEPII, Centre de Biologie Nord (CBN), Hôpital de la Croix-Rousse)
	Externe : ABI 3730XL Interne : 3 Mosquito® (SPTLabtech), 2 Dragonfly® (SPTLabtech), 1 DREAMPREP® (Tecan), 1 epMotion® (Ependorf) pour la préparation des banques de séquençage ; 2 séquenceurs Illumina (NextSeq 550 et NovaSeq 6000) et 4 séquenceurs ONT (GridION (=1) ; Minion (n=3))

Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
* OUI	- Accès interne : séquences analysées par les techniciens et biologistes du CNR avec le support des 3 ingénieurs bio-informaticiens de la plateforme GenEPII pour l'analyse des données. - Accès externe : L'expertise externe du Pr Thierry Wirth (Laboratoire Biologie Intégrative des Populations, EPHE) est sollicitée pour certaines études liées à l'évolution moléculaire des EV
	Outils disponibles pour l'analyse : SeqMet (pipeline développé en interne pour l'analyse des données NGS) ; Lasergene (v17), BLAST (open source), MEGA 11, Simplot Capacité stockage avec sauvegarde quotidienne : 500 To Capacité d'analyse (serveurs GenEPII) : 2x36 cœurs pour l'analyse des données NGS de routine par le pipeline SeqMet; 193 cœurs pour des analyses spécialisées (caractérisation de variants, phylodynamie, etc...)

Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?
* OUI	Le génotypage des entérovirus s'inscrit dans le cadre de la surveillance de l'éradication de la poliomyélite et de la surveillance renforcée de certains types d'EV tels que l'EV-A71 ou l'EV-D68, voire d'autres types d'entérovirus émergents et responsables d'infections sévères (suivi de l'évolution moléculaire).
	Sanger : Le séquençage Sanger est réalisé pour le typage des cas sévères car il permet d'obtenir des résultats avec un délai de réponse court (délai d'obtention de séquences post-PCR : 24 heures) Séquençage à haut débit : Depuis 2023, le séquençage haut débit est utilisé en première intention au CHU de Lyon pour le typage de routine des EV, HHPeV et Rhinovirus (séquençage partiel de régions génomiques ciblées). Réalisation d'une série par semaine (3 PCR de typage ciblant les régions codant pour les protéines VP1 et VP4-VP2 sont réalisées systématiquement sur les prélèvements et poolées avant séquençage).

Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrivez ci-dessous les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, serogroupe/serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...) et précisez si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquez alors lesquelles)

Sanger : L'analyse bio-informatique des séquences utilise : 1/ Le programme Lasergene (v17) pour l'assemblage et la vérification des séquences ; 2/ Le programme BLAST pour la comparaison des séquences obtenues aux séquences déposées dans GenBank ; 3/ Le programme MEGA 11 pour l'analyse phylogénétique simple des séquences
L'analyse BLAST est systématiquement réalisée. Les analyses phylogénétiques sont réalisées : 1/ pour les séquences de rhinovirus ; 2/ sur les souches d'EV et de HPEV présentant une homologie inférieure à 80% avec les séquences antérieures ; 3/ sur les souches associées aux épidémies ou des types d'EV particuliers faisant l'objet d'une surveillance spécifique (EV-D68, EV-A71)

Séquençage à haut débit : Le traitement des séquences NGS Illumina fait appel au pipeline SeqMet développé en interne. L'identification des EV, HPeV et Rhinovirus est réalisée par analyse Blast des séquences consensus versus la base de séquences RVDB. Les analyses phylogénétiques sont réalisées : 1/ pour les séquences de rhinovirus ; 2/ sur les souches d'EV et de HPEV présentant une homologie inférieure à 80% avec les séquences antérieures ; 3/ sur les souches associées aux épidémies ou des types d'EV particuliers faisant l'objet d'une surveillance spécifique (EV-D68, EV-A71).

Des analyses phylogénétiques Bayésiennes sont occasionnellement réalisées avec l'appui de ressources extérieures

Séquençage utilisé à des fins d'investigations d'épidémies :

Pour les investigations d'épidémies, le séquençage en Sanger a été utilisé en première intention afin d'identifier le type d'EV responsable et éventuellement de réaliser une analyse phylogénétique des séquences 1D permettant la sélection, si nécessaire (ex : très grand nombre d'échantillons) des échantillons pour lesquels l'obtention du génome complet est indispensable (divergence observée par rapport aux séquences des souches antérieures, identification de différents lignages, par exemple).

En 2023, les génomes complets de 12 souches d'E11 de 2022 et 2023 ont été séquencés dans le cadre de l'investigation de cas groupés d'infection néonatale grave

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

Sanger :
N=433 souches (263 entérovirus, 148 rhinovirus, 22 parechovirus)

Séquençage à haut débit, gène 1D :
N= 759 souches (651 entérovirus, 108 rhinovirus)

Génome complet :
A des fins de surveillance, le séquençage du génome complet d'EV a été réalisé pour 15 souches EV associées à des atteintes sévères

Sanger/NGS :
dans le cadre de l'investigation des infections à EV associées à des tableaux cliniques sévères, tous les prélèvements détectés positifs en EV ou en EV/HRV sont analysés. Pour les cas non sévères, sont privilégiés les échantillons de LCS et sang et les échantillons ayant la plus forte charge virale.
Génomes complets : sélection de souches associées à des infections sévères et/ou de types rares

Séquençage utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences :génomés assemblés ou séquences brutes (fastQ files) ?

Dans les bases de données fermées : Toutes les séquences brutes et les génomes assemblés sont stockés chronologiquement sur un espace informatique sécurisé et sauvegardé quotidiennement. Elles constituent une banque de séquences utilisables pour des analyses ciblées en lien avec la survenue d'épidémies ou l'émergence de nouveaux variants. Depuis 2018, les séquences générées dans la cadre de la surveillance des infections à EV et HPEV peuvent être mises à disposition des laboratoires collaborateurs sur le site Web du CNR et permettent de relier séquences et données clinico-virologiques des patients. En 2023, le LA a mis les séquences d'EV-D68 et d'EV-A71 à disposition sur ce site web. A partir de 2024, toutes les séquences générées par le LA seront mises à disposition sur ce site web.

Dans des bases de données publiques (European Nucleotide Archive (ENA) par exemple) avec ou sans métadata associées : Certaines séquences sont rendues publiques (GenBank) lorsqu'elles ont fait l'objet de publications (nombre de séquences d'E11 déposées dans GenBank dans le cadre de l'investigation des infections néonatales graves : 1D (VP1) : n=65 ; génomes complets : n=8)

2.6.3 Centre coordonnateur polio OMS de l'Institut Pasteur

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

<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	<p>1/ Sanger : -- Accès à une plateforme interne détenant les autorisations MOT pour le poliovirus Accès à une plateforme externe (Eurofins, Cologne).</p> <p>2/ Séquençage à haut-débit : Accès à la plateforme interne P2M dédiée aux activités de santé publique autorisée à séquencer du matériel génétique de poliovirus Accès à la plateforme interne OMICS disposant d'une batterie d'appareils divers.</p> <p>Sanger : ABI 3500 XL Genetic Analyzer Séquençage à haut-débit : Illumina, Minion, PacBio, IonTorrent</p>

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

<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	<p>Equipe de bio-informaticiens de l'Institut Pasteur qui peuvent être sollicités pour des besoins ponctuels ou des projets. Pas de sollicitation en 2023.</p> <p>CodonCode Aligner, CLC Main WorkBench, CLC Genomics, MEGA X, SimPlot</p>

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

<input type="checkbox"/> NON	Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	<p>Identification d'entérovirus dans des échantillons cliniques et environnementaux. Caractérisation de poliovirus issus de la surveillance coordonnée par l'OMS</p>

Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrivez ci-dessous les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, serogroupe/serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...) et précisez si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquez alors lesquelles)

Typage basé sur la séquence de la capsidie
Recherche de marqueurs de réversion phénotypique dans les génomes de poliovirus
Recherche de liens génétiques entre les souches de poliovirus
Analyses phyogénétiques sur les entérovirus séquencés
Analyses des évènements de recombinaison entre entérovirus.

Séquençage utilisé à des fins d'investigations d'épidémies :

Caractérisation de souches de poliovirus basée sur la séquence VP1, selon l'algorithme de l'OMS et recherche de liens génétiques entre les souches par identification de mutatiösn communes.

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

245 isolats de poliovirus séquencés dans la VP1 (Sanger)
111 isolats de poliovirus dérivés de la nouvelle souche vaccinale de type 2 (Illumina, génome complet)
10 EV-G (Illumina, génome complet)
Environ 500 génomes d'entérovirus A, B et C provenant d'échantillons humains (Guyane française, République Centrafricaine) et d'échantillons environnementaux (Mayotte).

Aucune sélection

Séquençage utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences :génomés assemblés ou séquences brutes (fastQ files) ?

Dans les bases de données fermées : Les données brutes sont stockées sur des lecteurs dédiés du cluster de l'Institut Pasteur.

Les séquences de poliovirus issues de la surveillance sont transmises au Réseau mondial des laboratoires polio et intégrées à sa base de séquences.

Dans des bases de données publiques (European Nucleotide Archive (ENA) par exemple) avec ou sans métadata associées : GenBank

2.7 Partage de séquences produites par les CNR

Le partage national / international des séquences produites par le CNR EV-PeV se fait aujourd'hui *via* Genbank, base de référence pour les virus étudiés (130 000 séquences génomiques partielles ou complètes, et 11 000 génomes complets issus de NGS, en mars 2024). Il concerne notamment des séquences faisant l'objet de publications ou de séquences d'EV-A71 et EV-D68 faisant l'objet d'une surveillance longitudinale.

A ce jour, d'autres bases de données internationales ne sont pas ouvertes au dépôt des séquences génomiques des virus des genres *Enterovirus* et *Parechovirus*. Si à l'avenir par exemple la base GISAID élargie s'ouvrait aux entérovirus, le CNR participerait au partage des séquences *via* cette plateforme.

Les séquences génomiques déposées en 2023 ont les numéros d'accès suivants :

2.7.1. Laboratoire de Clermont-Ferrand

- PP548243 - PP548281 : séquences EV-A et EV-D (Nanopore, Génome complet)
- PP585328 – PP585471 : séquences EV-A, EV-B et EV-D (Illumina, Génome complet)
- OQ969158 - 177 et OQ927567.1 : séquences E11 (Illumina, Génome complet)
- OQ971926 - OQ971949 : séquences E11 (Sanger, gène 1D^{VP1})

2.7.2. Laboratoire de Lyon

- OQ923264 et OQ927998-OQ928004 : séquences d'E11 des patients atteints d'infection néonatale grave (Illumina, Génome complet)
- OQ927993-OQ927997 et OR029978-OR030028 : séquences d'E11, 2016-2023, infections sévères et non sévères (Illumina et Sanger, gène 1D^{VP1})

2.7.3. Laboratoire de l'Institut Pasteur

- OR129531 - OR129534 : séquences de souches de poliovirus des années 1950 (Illumina, génome complet) ; origine : collection du laboratoire.
- OR096669 - OR096687 : séquences EV-C et EV-G de République centrafricaine (Illumina, génome partiel ou génome complet) ; origine : selles d'animaux de ferme
- OR129535 - OR129655 : séquences EV-A, EV-B et EV-C de République centrafricaine (Illumina, séquence allant de la région 5'UTR à la région 2C) ; origine : selles d'enfants de moins de 5 ans.
- PP236911 - PP236915 : séquences EV-A, EV-B et EV-C de République centrafricaine (Illumina, séquence allant de la région 5'UTR à la région 2C) ; origine : selles d'enfants de moins de 5 ans.

3. Activités de surveillance

Éléments clefs 2023

Bilan global

- 2339 infections à EV diagnostiquées contre 1726 en 2022
- Epidémie estivale de méningites d'ampleur modérée par rapport à la période pré-COVID
- Prédominance de l'E18, de l'E9 et de l'EV-A71 représentant 45,6% des EV identifiés
- Circulation significative de l'EV-A71 (3^{ème} type le plus fréquent ; 6,8%)

Infections neuro-méningées

- Epidémie de méningites d'ampleur modérée, en augmentation par rapport à 2022
- Types les plus fréquemment identifiés : E9 (31%), E18 (30%) et CVB5 (7%)

Infections néonatales

- 442 infections néonatales, soit 18,9% des infections déclarées à EV, dont 11 sévères
- Détection d'infections néonatales précoces sévères avec défaillance hépatique majeure en lien avec un nouveau variant recombinant d'E11 entre 07/2022 et 07/2023 (1 décès en 2023)
- Prédominance des E18 (25%) et E9 (19%) ; l'E11 est retrouvé dans 8% des infections néonatales

Maladies pieds-mains-bouche / herpangine

- 282 infections dont 166 rapportées *via* la surveillance virologique ambulatoire
- Prédominance du CVA6 (61%) et de l'EV-A71 (12%).

Infections sévères

- 105 (126 en 2022) tableaux cliniques sévères hors infections néonatales associés à une infection dont 97 (5,1% des infections à EV hors nouveau-nés contre 9,4% en 2022) pour lesquels l'imputabilité des EV était probable (n=48) ou possible (n=49)
- 74% des infections sévères sont survenues chez des enfants de moins de 5 ans (76% en 2022)
- 69 atteintes neurologiques sévères chez les enfants en rapport avec l'augmentation de circulation de l'EV-A71
- Proportion d'infections respiratoires sévères moins importante qu'en 2022 en lien avec la faible circulation de l'EV-D68
- 14 décès (14,4% des infections à EV hors période néonatale)

Infections à EV-A71

- 130 infections rapportées (22 en 2022), dont 113 par le RSE et 17 par le réseau ambulatoire PARI
- Parmi les patients hospitalisés : 71/95 (74,7%) infections étaient associées à des signes neurologiques, dont (rhomb)encéphalite (n=5), atteinte cérébelleuse (n=4), myélite/PFA (n=8)

Infections à EV-D68

- Faible circulation de l'EV-D68 en 2023 (0,7% des échantillons respiratoires positifs en EV-D68 chez les moins de 5 ans au CHU de Lyon vs 4,4% en 2022 et 4,3% en 2021)
- 67 infections rapportées (171 en 2021 et 139 en 2022)
- Co-circulation des clades B3 (majoritaire chez l'enfant) et D1 (majoritaire chez l'adulte)

Poliovirus

- Un mélange complexe d'iDPV3 détecté en 2023 chez un patient âgé de 15 mois d'origine Marocaine hospitalisé pour encéphalite sans paralysie et porteur d'un déficit immunitaire congénital

Infections à parechovirus

- 60 infections rapportées, contre 117 en 2022 et 60 en 2021
- Tableaux fébriles du nourrisson associés ou non à des signes neurologiques
- Point particulier sur les infections à HPeV chez l'adulte questionnant sur la sensibilité/spécificité du test FilmArray®

3.1 Description du réseau de partenaires

3.1.1. Surveillance hospitalière : le RSE

En 2023, 36 laboratoires du RSE (Figure 3, Tableau 12) ont participé à la surveillance nationale des infections à EV en transmettant :

- Le nombre, la nature des prélèvements et le profil des patients analysés

- Les résultats du diagnostic virologique et les données démographiques et cliniques pour les patients avec infection à EV confirmée
- Les échantillons cliniques positifs à EV pour typage ou les résultats de typage obtenus *in situ*, 5 laboratoires assurant le génotypage en plus des deux laboratoires du CNR.

A noter le retrait du dispositif de surveillance des Laboratoires de Virologie du CH de Roanne (depuis septembre 2023), et du CHU de Nancy (depuis janvier 2023).

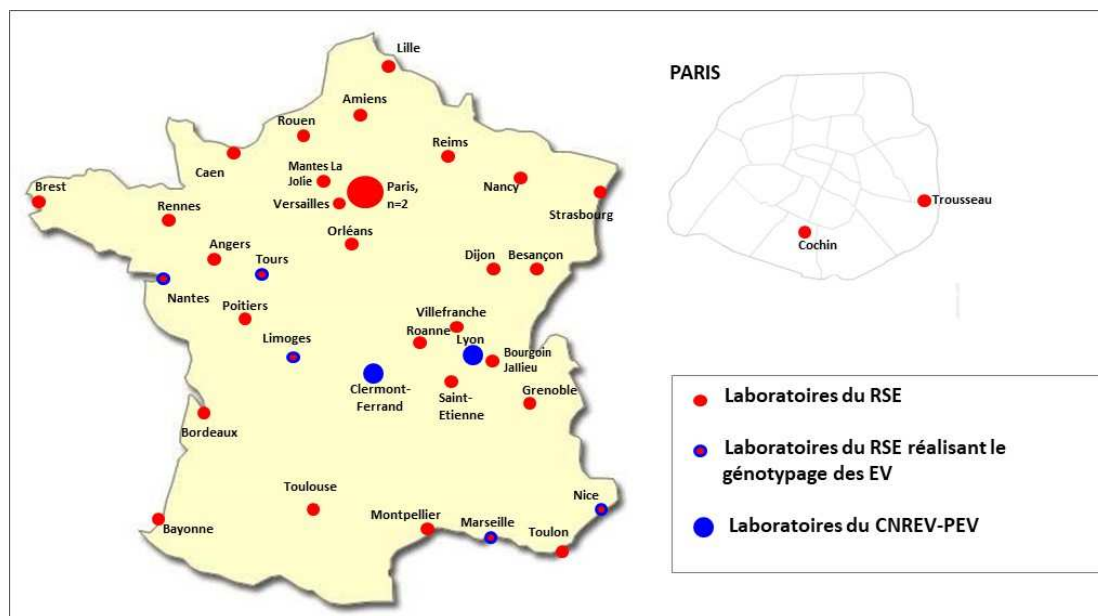


Figure 3. Laboratoires participants du RSE, 2023

Parallèlement, 65 laboratoires hors RSE, dont 7 laboratoires de 4 départements et régions d'outre-mer (DROM), ont participé à la surveillance en transmettant des échantillons cliniques pour génotypage à l'un des laboratoires du CNR.

L'ensemble des données sont collectées dans une base de données spécifique accessible aux membres du RSE depuis 2013.

Tableau 12 - Laboratoires et biologistes participant au RSE en 2023

Correspondants du LC – Clermont-Fd (n=14)			
CHU AMIENS	Marie Louchet-Ducoroy		
CH BAYONNE	D. Leyssene	A-C Jaouen	
CHU BESANCON	Q. Lepiller		
CHU CLERMONT FERRAND	A Mirand	C Henquell	
CH MANTES LA JOLIE	E Riverain		
CHU MARSEILLE	A Nouguairede	L Ninove	X. de Lamballerie
CHU ORLEANS	J Guinard	C Guillaume	
APHP - COCHIN	AS L'honneur	V Avettand-Fenoël	
CHU REIMS	L Andréoletti		
CHU RENNES	G Lagathu	V Thibaud	
CHU TOULOUSE	JM Mansuy	P Trémeaux	J Izopet
CH VERSAILLES	S Marque-Juillet		
CH FOCH	E Farfour		

CHU NANCY	V Vénard	E Schvoerer	
Correspondants du LA - Lyon (n=22)			
CHU ANGERS	C Lefeuvre	A Ducancelle	F Lunel-Fabiani
CHU BORDEAUX	ME Lafon	S Burrel	
CH BOURGOIN-JALLIEU	C Tellini	V Doat	
CHU BREST	L Pilorgé	C Payan	
CHU CAEN	C Schanen	A Vabret	
CHU DIJON	K Balay	C Auvray	A de Rougemont
CHU GRENOBLE	S Larrat	P Morand	
CHU LILLE	M Lazrek	D Hober	
CHU LIMOGES	S Rogez	S Alain	
CHU LYON	M Jeannoel	I Schuffenecker	B Lina
CHU MONTPELLIER	V Foulongne	P Van de Perre	
CHU NANTES	M Coste-Burel	BM Imbert	
CHU NICE	G Gonfrier	V Giordanengo	
APHP – TROUSSEAU*	K Saloum	A Schnuriger	V Calvez
CHU POITIERS	C Chessa	N Lévêque	
CH ROANNE	JB Murat		
CH VILLEFRANCHE	M Jourdain	L Mouly	
CHU ROUEN	V Lémée	JC Plantier	
CHU ST ETIENNE	S Pillet	B Pozzetto	T Bourlet
CHU STRASBOURG	F Gallais	S. Fafi-Kremer	
CHI TOULON	AL Toyer	C Poggi	
CHU TOURS	K Stefic	C Gaudy	F Barin

*Le laboratoire de Virologie de l'APHP Trousseau a déménagé à l'hôpital Saint Antoine en mars 2024

3.1.2. Surveillance ambulatoire de la maladie pied-main-bouche (PMB)

Une surveillance spécifique de la maladie PMB et de la circulation de l'EV-A71 a été mise en place en ambulatoire depuis 2014 au niveau national. Depuis 2017, la création du réseau PARI (pour *Panel Ambulatoire de Recherche en Infectiologie*) coordonnée par l'ACTIV (Association Clinique et Thérapeutique Infantile du Val de Marne) permet la surveillance syndromique de cette maladie. Elle s'accompagne, sur la base du volontariat (n=44 pédiatres en 2023), d'une surveillance virologique en prélevant au moins un échantillon de bouche ou de gorge pour recherche d'entérovirus, qui est envoyé au laboratoire du CNR à Clermont-Ferrand (Figure 4).

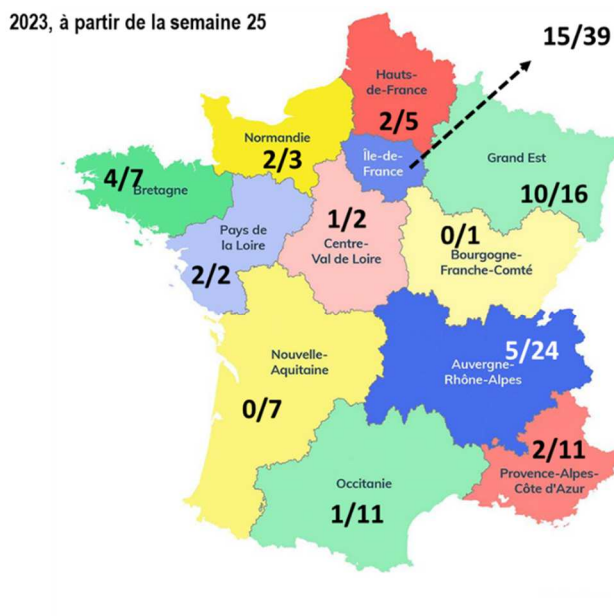


Figure 4. Pédiatres ayant participé à la surveillance virologique de la maladie PMB en 2023

Pour chaque région, le nombre de pédiatres ayant réalisé la surveillance virologique par rapport au nombre de pédiatres participant à la surveillance syndromique via PARI est indiqué.

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.2.1. Bilan épidémiologique et clinico-virologique

Le bilan clinico-virologique des infections porte sur les infections rapportées par le RSE dans le cadre de la surveillance hospitalière. Ce bilan a été établi à partir des données saisies en ligne par les laboratoires du RSE au 05 Mars 2024.

Echantillons biologiques analysés et répartition par classe d'âge

Le bilan annuel fait état de 86 830 échantillons biologiques analysés en 2023 (contre 92 165 en 2022) (LCS : idem ; selles : -12% ; sang : +8% ; gorge : -53% ; respiratoires : +7,5%). La répartition par nature et par classe d'âge des échantillons analysés et des échantillons positifs est présentée dans les tableaux 13 et 14 ci-contre.

Tableau 13 - Echantillons analysés en 2023 pour recherche d'EV au sein du RSE

	Nombre échantillons analysés	Nombre échantillons positifs
LCS	23827	1564
Selles	6332	575
Gorge	5601	186
Respiratoires	45049	321
Sang	3402	159
Autres	2619	93
Total	86830	2898

Tableau 14 - Répartition des échantillons de LCS et selles analysés par les laboratoires du RSE en 2023 par classe d'âge

	<1 an	1 an - 4 ans	5 - 14 ans	15 - 24 ans	25 - 49 ans	≥ 50 ans	Inconnue	Total
LCS	3888	1561	2006	1693	4781	9840	58	23827
	16,32%	6,55%	8,42%	7,10%	20,06%	41,30%	0,24%	
SELLES	2393	1039	778	320	554	1229	19	6332
	37,80%	16,40%	12,29%	5,05%	8,75%	19,41%	0,30%	

Distribution hebdomadaire des infections à EV

La distribution hebdomadaire des cas d'infections à EV rapportés par les laboratoires du RSE en 2023 (hors de la surveillance ambulatoire des syndromes PMB) est représentée en Figure 5 ci-dessous.

Au total, 2339 cas d'infections à EV ont été déclarés en 2023 avec une courbe épidémiologique montrant un niveau de circulation estivale des EV se rapprochant des années pré-COVID-19.

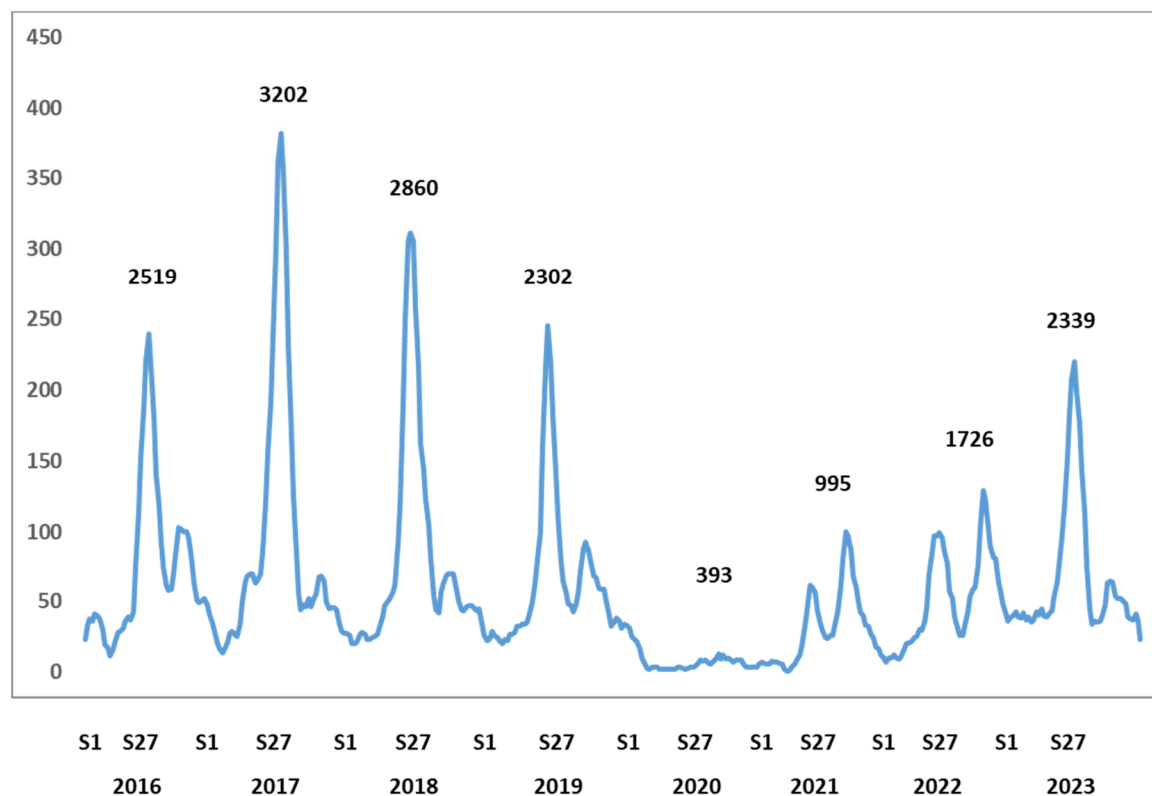


Figure 5. Distribution hebdomadaire des cas d'infections à EV, RSE, années 2016-2023

Caractéristiques démographiques

Le sexe ratio des patients était de 1,33 en 2023 (M/F : 1322/993 ; 24 dossiers non renseignés). La répartition des patients par classe d'âge est présentée dans la Figure 6.

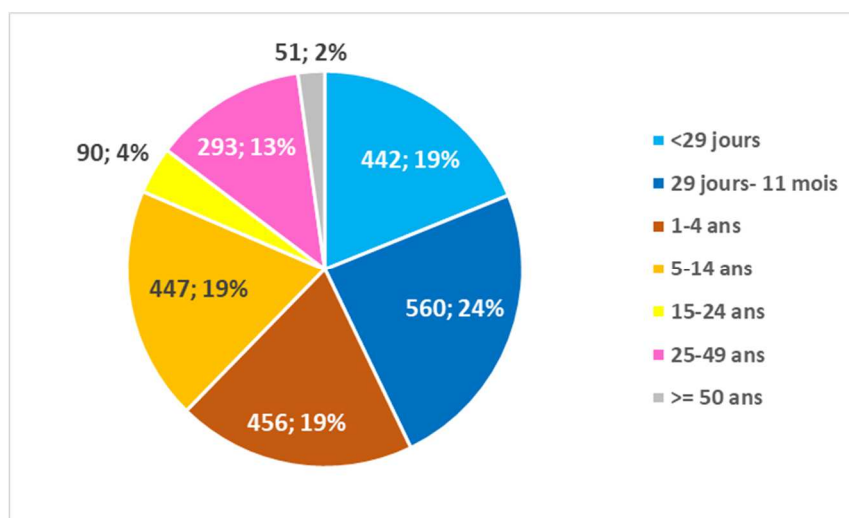


Figure 6. Répartition par tranche d'âge des patients avec une infection à EV en 2023

Données cliniques

Des informations cliniques étaient disponibles pour 76% (n=1779/2339) des dossiers patients rapportés en 2023 (contre 71% en 2022). La répartition des manifestations cliniques est présentée dans le Tableau 15.

Tableau 15 – Signes cliniques associés aux infections à EV diagnostiquées par le RSE en 2023 (n=1779)

Signes cliniques	Nombre de patients	%
Fièvre	1481	83,2%
Signes neurologiques	1127	63,3%
dont syndrome méningé	445	25,0%
Signes respiratoires	401	22,5%
Signes cardio-vasculaires / sepsis	41	2,3%
Signes cutanéomuqueux	245	13,8%
Signes digestifs	687	38,6%
Signes ophtalmologiques	15	0,8%

Typage moléculaire

Le génotypage est réalisé par les 2 laboratoires du CNR et 5 autres laboratoires : Limoges, Nantes, Nice, Tours et Marseille.

Au total, 78% (1825/2339) des dossiers d'infection à EV déclarés au RSE ont fait l'objet d'un génotypage au CNR, et parmi ces dossiers, un EV a été identifié dans 90% des cas (Tableau 16).

Tableau 16 – Performances du typage moléculaire (période 2020-2023)

	2020	2021	2022	2023
% de dossiers séquencés parmi les dossiers déclarés par le RSE	62,2%	53,6%	81,7%	78%
% de dossiers avec EV identifiés parmi les dossiers analysés	81,8%	89,1%	90,8%	90%
% de dossiers avec EV identifiés parmi les dossiers déclarés par le RSE	50,9%	47,7 %	74,2%	70,2%

Les 2 types d'EV prédominants en 2023, E18 et E9, représentaient 46% des EV identifiés. L'EV-A71 est le 3^{ème} type le plus fréquemment identifié en 2023 (7% des infections) (Figure 7).

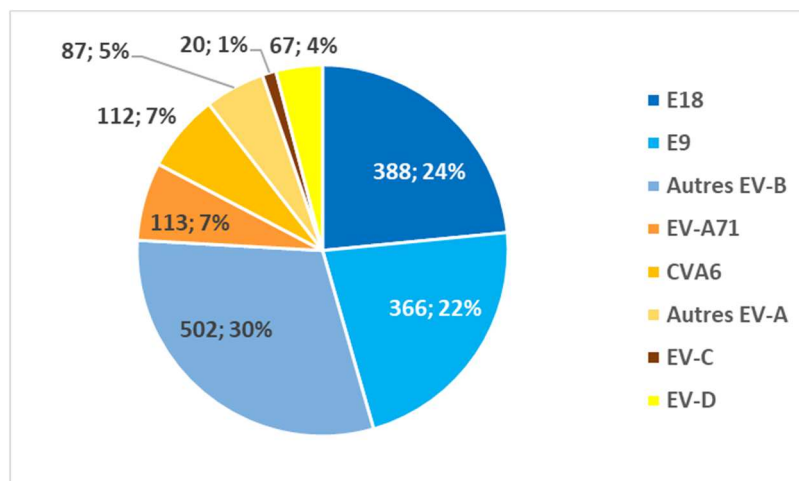


Figure 7. Distribution globale des types associés aux infections à EV déclarées par le RSE en 2023 (n= 1655 virus identifiés)

Tableau 17 – Fréquence des 47 types associés aux infections à EV diagnostiquées par le RSE en 2023 (n=1655)

Echovirus 18	388	23,44%	Coxsackievirus A19	5	0,30%
Echovirus 9	366	22,11%	Enterovirus C105	5	0,30%
Enterovirus 71	113	6,83%	Coxsackievirus A1	4	0,24%
Coxsackievirus A6	112	6,77%	Coxsackievirus A10	4	0,24%
Coxsackievirus B5	102	6,16%	Echovirus 4	4	0,24%
Coxsackievirus A9	85	5,14%	Echovirus 3	3	0,18%
Echovirus 6	74	4,47%	Echovirus 14	2	0,12%
Enterovirus 68	67	4,05%	Echovirus 33	2	0,12%
Echovirus 11	59	3,56%	Enterovirus C117	2	0,12%
Coxsackievirus B3	41	2,48%	Enterovirus 74	2	0,12%
Coxsackievirus A4	31	1,87%	Human enterovirus B	2	0,12%
Echovirus 21	23	1,39%	Coxsackievirus A11	1	0,06%
Coxsackievirus A2	22	1,33%	Coxsackievirus A24	1	0,06%
Coxsackievirus A5	17	1,03%	Coxsackievirus A7	1	0,06%
Echovirus 30	17	1,03%	Coxsackievirus A8	1	0,06%
Echovirus 5	16	0,97%	Echovirus 19	1	0,06%
Echovirus 16	14	0,85%	Echovirus 31	1	0,06%
Coxsackievirus B1	13	0,79%	Echovirus 32	1	0,06%
Coxsackievirus B2	13	0,79%	Enterovirus 119	1	0,06%
Echovirus 7	9	0,54%	Enterovirus 76	1	0,06%
Coxsackievirus A16	8	0,48%	Enterovirus C109	1	0,06%
Coxsackievirus B4	6	0,36%	Human enterovirus A	1	0,06%
Echovirus 20	6	0,36%	Poliovirus 3	1	0,06%
Echovirus 25	6	0,36%			
				EV-A	EV-B
				EV-C	EV-D

Pour 1 infection à EV-A et 2 infections à EV-B, il n'a pas été possible d'identifier précisément le type.

Pour 1 infection à EV-A et 2 infections à EV-B, il n'a pas été possible d'identifier précisément le type.

3.2.2. Bilan par syndrome

Infections neuro-méningées

En 2023, les 36 laboratoires du RSE ont rapporté un nombre total de LCS analysés de 23 827. Le nombre de LCS positifs à EV pour lequel les données démographiques et virologiques ont été déclarées était de 1555 (6,5%, contre 4,2% en 2022) (Tableau 18).

Tableau 18 - Nombre total de LCS analysés et positifs pour la recherche d'EV par laboratoire du RSE en 2023

Laboratoire participant	Nombre total de LCS analysés	Nombre total de LCS positifs EV	%
06_Virologie, CHU Nice	700	43	6,10%
13_Virologie, CHU Marseille ^(a)	2149	100	4,70%
14_Virologie, CHU Caen	900	59	6,60%
21_Virologie, CHU Dijon	35	16	45,70%
25_Virologie, CHU Besançon	Données non transmises	9	NA
29_Virologie, CHU Brest	483	57	11,80%
31_Virologie, CHU Toulouse	1313	109	8,30%
33_Virologie, CHU Bordeaux	782	50	6,40%
34_Virologie, CHU Montpellier	765	5	0,65%
35_Bactériologie-Virologie, CHU Rennes ^(b)	204	10	0,80%
37_Virologie, CHU Tours	703	40	5,70%
38_Biologie, CH Bourgoin-Jallieu	86	10	11,60%
38_Virologie, CHU Grenoble	541	13	2,40%
42_Bactériologie-Virologie, CHU Saint Etienne	586	64	10,90%
42_Biologie, CH Roanne	67	0	0%
44_Bactériologie-Virologie, CHU Nantes	984	73	7,40%
45_Microbiologie, CH Orléans	707	19	2,70%
49_Bactériologie-Virologie, CHU Angers	441	50	11,30%
51_Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU Reims	584	26	4,50%
54_Virologie, CHU Nancy	Données non transmises	1	NA
59_Virologie, CHU Lille	611	57	9,30%
63_Virologie, CHU Clermont-Ferrand	1345	166	12,30%
64_Biologie, CH Bayonne	89	21	23,60%
67_Virologie, CH Haguenau	Données non transmises	Données non transmises	NA
67_Virologie, CHU Strasbourg	1304	32	2,45%
69_Biologie_CH Villefranche	56	23	41%
69_Virologie, HFME, CHU Lyon	3053	151	4,95%
75_Bactériologie-Virologie, AP-HP Trousseau	406	42	10,30%
75_Virologie, AP-HP Cochin	550	35	6,00%
76_Virologie, CHU Rouen	1605	84	5,20%
78_Biologie, CH Mantes la Jolie	45	6	15,60%
78_Microbiologie, CH Versailles ^(c)	119	24	20,20%
80_Virologie, CHU Amiens	1195	50	4,20%

Tableau 18 - suite

Laboratoire participant	Nombre total de LCS analysés	Nombre total de LCS positifs EV	%
83_Biologie, CHI Toulon	297	27	9%
86_Microbiologie, CHU Poitiers	695	33	4,70%
87_Bactériologie-Virologie, CHU Limoges	413	22	5,33%
92_Biologie, Hôpital Foch	14	0	0%
	23827	1555	6,50%

(a) données de janvier à septembre 2023; (b) données de janvier à mars 2023; (c) données de janvier 2023

L'épidémie de méningites en 2023 s'est caractérisée par un pic estival dont l'ampleur est en nette augmentation par rapport à 2022 mais qui reste inférieure à 2018 et 2019, et un faible rebond automnal (Figure 8).

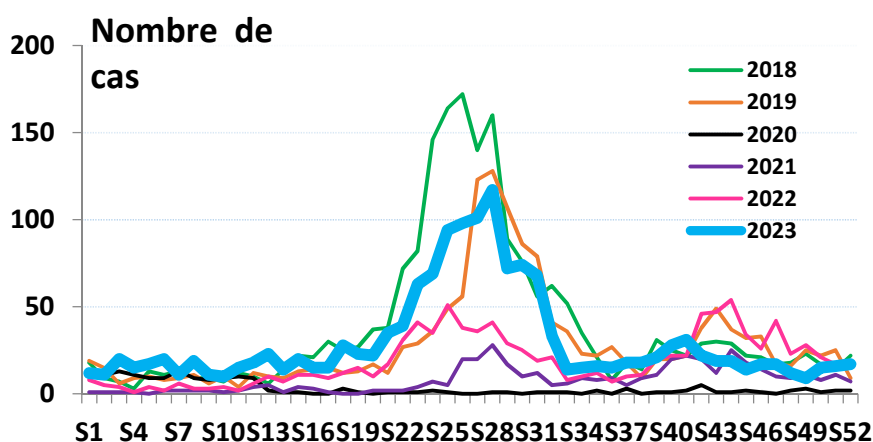


Figure 8. Distribution hebdomadaire des LCS positifs à EV, RSE, 2018-2023

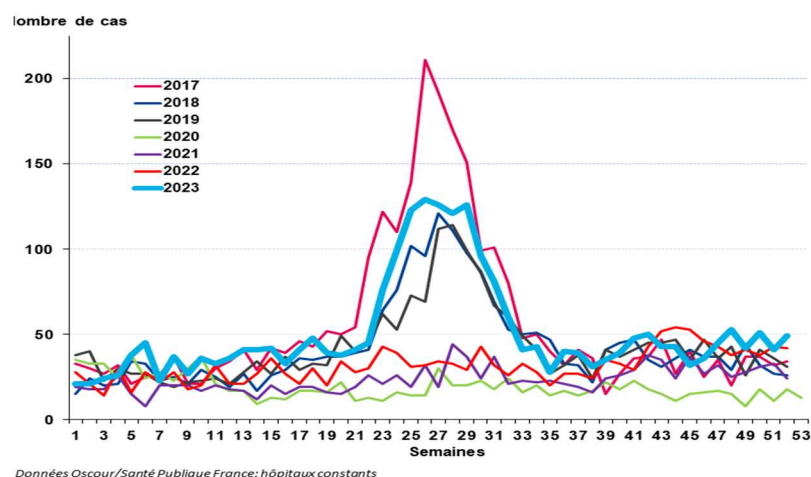


Figure 9. Distribution hebdomadaire des passages aux urgences pour syndrome méningé, 2017-2023, données OSCOUR/Santé publique France

Répartition par tranche d'âge

Les **données démographiques** étaient disponibles pour toutes les infections rapportées avec détection d'EV dans le LCS (Figure 10). Les enfants de moins de 1 an ont représenté 42% (660/1555) des patients, dont 357 (23%) nouveau-nés et 303 (19%) nourrissons de moins de 1 an. Par rapport à 2022, la proportion d'enfants de moins de 1 an était moindre, alors que la tranche d'âge des 5 - 14 ans était plus élevée (Figure 11).

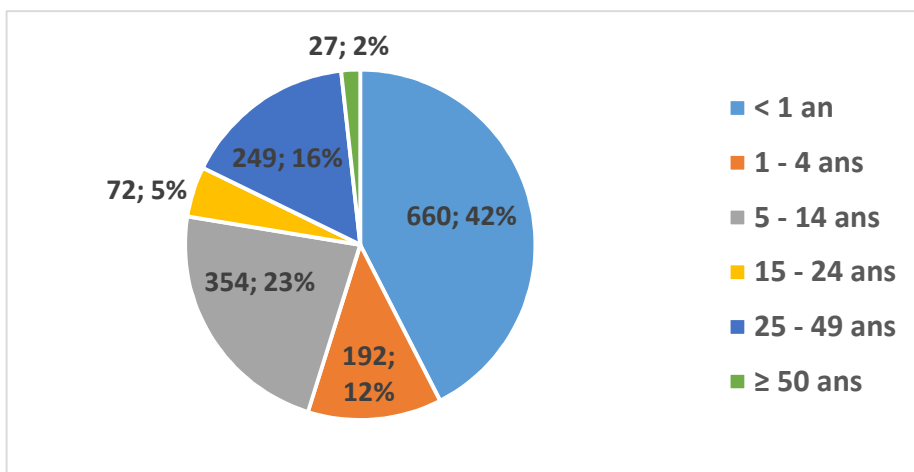


Figure 10. Répartition par tranche d'âge des patients ayant eu un LCS positif à EV en 2023 (n=1555)

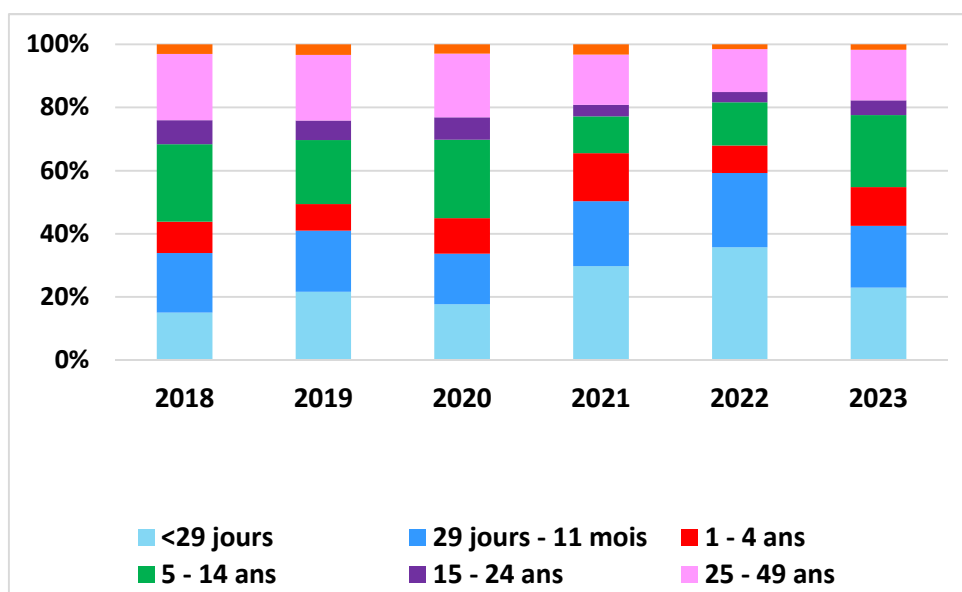


Figure 11. Evolution de la répartition par tranche d'âge des patients ayant eu une infection à LCS positif à EV, 2018-2023

Données cliniques

Les données cliniques étaient disponibles pour 1154/1555 (74,2%) des patients avec détection d'EV dans le LCS (Tableau 19).

Tableau 19 - Signes cliniques associés aux infections neuro-méningées avec détection d'EV dans le LCS en 2023 (n=1154)

Signes cliniques	Nombre de patients	%
Fièvre	1039	90,0%
dont fièvre isolée	117	10,1%
Signes neurologiques	911	78,9%
dont syndrome méningé	409	35,4%
dont irritabilité	224	19,4%
dont céphalées	444	38,5%
Méningite biologique	346	30,0%
Signes respiratoires	184	15,9%
Signes cardio-vasculaires / sepsis	17	1,5%
Signes cutanéomuqueux	108	9,4%
Signes digestifs	438	37,9%
Signes ophtalmologiques	6	0,5%

Typage moléculaire

Le génotypage réalisé pour 1181/1555 (75,9%) des dossiers patients ayant eu un LCS EV+ a permis d'identifier un EV pour 1045/1181 (88,5%) des dossiers analysés, dont 940/1045 (90%) directement à partir du LCS.

Les EV-B étaient prédominants et représentaient 94,9% des EV identifiés. L'E9, l'E18 et le CVB5 étaient les 3 types prédominants dans les infections neuro-méningées avec détection de l'EV dans le LCS (Figure 12).

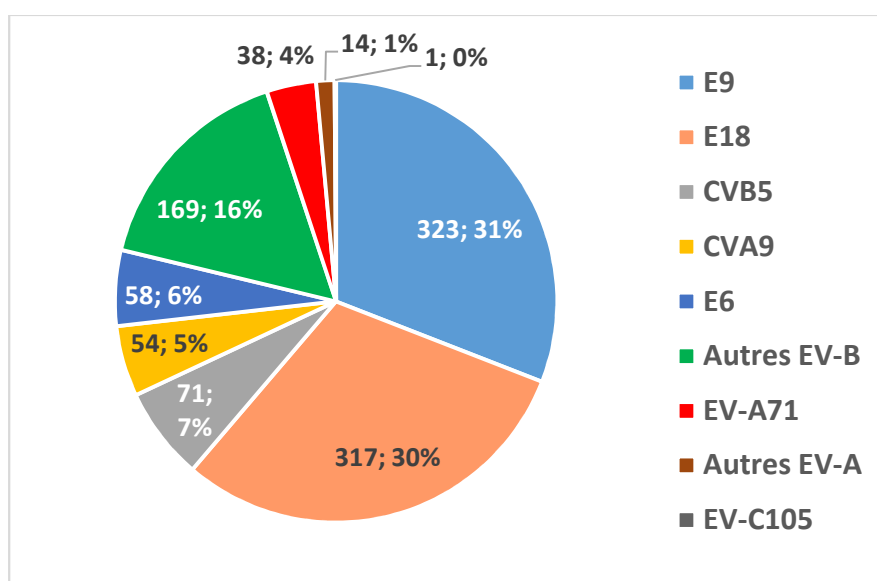


Figure 12. Distribution des types d'EV associés aux infections à LCS EV+ déclarés par le RSE en 2023 (n=1045)

L'E18 était prédominant chez les nourrissons (< 24 mois) (Tableau 20).

Tableau 20 - Top 5 des types d'EV identifiés chez les patients avec LCS EV+, 2023

Ayant présenté des signes neurologiques (avec typage, n=739)			Enfants de moins de 24 mois (avec typage, n=549)		
E18	210	28,4%	E18	142	25,9%
E9	207	28,0%	E9	87	15,8%
E6	49	6,6%	CVA9	38	6,9%
CVB5	38	5,1%	CVB5	36	6,6%
CVA9	28	3,8%	EV-A71	34	6,2%

Infections néonatales

Rappel : L'année 2022 avait été marquée par une augmentation des infections néonatales (25,7% des infections déclarées par le RSE, contre 12,8% pour la période 2016-2021), et par la survenue d'infections sévères à E11 associées à des défaillances hépatiques majeures ayant entraîné le décès de 6 nouveau-nés. Une alerte avait été lancée par Santé publique France en mai 2023, et avait fait l'objet d'une publication (Gravin et al., Eurosurveillance, 2023).

L'année 2023 montre un nombre stable d'infections néonatales déclarées par le RSE par rapport à 2022, avec **442 nouveau-nés atteints** (versus 444 en 2022), représentant **18,9%** des patients ayant présenté une infection à EV en 2023. Comme le montre la Figure 13, l'E11 est encore présent au 1^{er} semestre 2023 (dernières détections ponctuelles en octobre et novembre), mais le type le plus fréquemment identifié est l'E18, avec une fréquence similaire à celle observée chez les patients de plus de 28 jours.

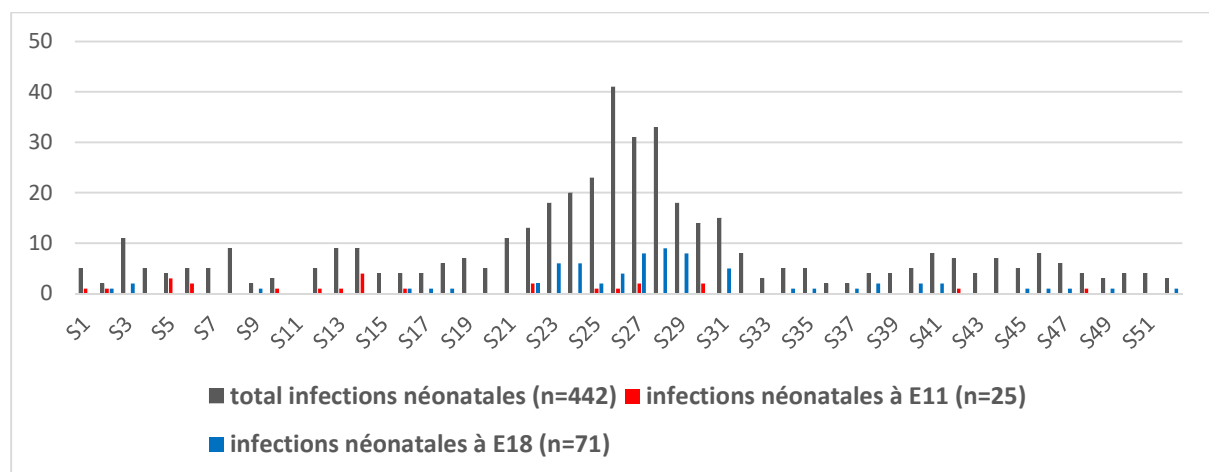


Figure 13. Distribution hebdomadaire des infections néonatales à EV en 2023 (n=442)

Pour 80,8% (357/442) des nouveau-nés, le génome a été détecté dans le LCS. Les signes cliniques, disponibles pour 76,7% (339/442) des patients, sont présentés dans le Tableau 21.

Tableau 21 - Signes cliniques associés aux infections néonatales rapportées en 2023 (n=339)

Signes cliniques	Nombre de patients	%
Fièvre	321	94,7%
Signes neurologiques	166	49,0%
dont irritabilité	113	33,0%
hypotonie	38	11,2%
Signes respiratoires	49	14,5%
Signes cardio-vasculaires / sepsis	9	2,6%
dont sepsis sévère	7	2,1%
dont défaillance hémodynamique	7	2,1%
dont myocardite	2	0,6%
Signes cutanéomuqueux	42	12,4%
Signes digestifs	63	18,6%
Signes ophtalmologiques	5	1,5%

La médiane d'âge des patients était de 16 jours (1–28 jours). Les infections chez les nouveau-nés de moins de 8 jours représentaient 15,2% (67/442) de la totalité des infections néonatales à EV. Onze (2,5%) patients ont présenté une infection sévère (contre 5,1 % en 2022) (Tableau 22). Quatre d'entre eux étaient infectés par un E11 (tous appartenant à la même lignée émergente recombinante retrouvée chez les enfants décédés en 2022) : un enfant est décédé à 34 jours de vie dans un tableau de défaillance multiviscérale, malgré un traitement par immunoglobulines polyvalentes à J5 et l'administration compassionnelle de pocapavir de J7 à J21. Les 3 autres ont survécu sans séquelles immédiates, malgré une défaillance multiviscérale très sévère.

Tableau 22 - Infections néonatales sévères rapportées en 2023 : données cliniques et virologiques (n=11)

Hôpital	Mois	Age (jours)	Sexe	Présentation clinique	Décès	Echantillons EV +	Type EV
APHP-Necker	1	5	M	Naissance à 39 SA. Méningite à EV avec insuffisance hépatique très sévère, CIVD et insuffisance rénale nécessitant la dialyse. Décès à J34 par défaillance multiviscérale et hémorragie intra-alvéolaire	OUI	LCS, sang, selles	E11
CH Orléans	4	8	M	Grossesse gémellaire : défaillance multiviscérale - Insuffisance hépatique très sévère, CIVD, insuffisance rénale et entérocolite	non	sang, écouvillon rectal, gorge, écouvillon	E11
CH Orléans	4	8	M	Grossesse gémellaire : défaillance multiviscérale - Insuffisance hépatique très sévère, CIVD et insuffisance rénale	non	sang, écouvillon rectal, gorge, écouvillon	E11
CH Saumur	6	14	M	Sepsis sévère, atteintes cardiaque et respiratoire	non	LCS	E-18
CHU Lyon	6	10	M	Syndrome brady-apnéique, oxygénothérapie haut débit pendant 72 heures	non	selles	EV-A71
CHU Toulouse	7	10	M	Défaillance multiviscérale, avec choc cardiovasculaire, hépatite, CIVD et atteinte neurologique.	non	sang, selles	E11

Tableau 22 - suite

Hôpital	Mois	Age (jours)	Sexe	Présentation clinique	Décès	Echantillons EV +	Type EV
CH Mulhouse	7	5	M	Méningo-encéphalite	non	LCS, sang	CV-B3
AP-HP-Trousseau	8	18	M	Choc cardiogénique néonatal en contexte de tachycardie supra ventriculaire récidivante ; 2 ACR récupérés, 12 jours de ventilation mécanique	non	sang	E-9
CHU Lyon	8	26	F	Méningite néonatale compliquée d'un sepsis avec défaillance hémodynamique et neurologique (convulsions, troubles de la conscience)	non	LCS, écouvillon nasopharyngé	E-18
CHU Caen	10	5	F	Détresse respiratoire, oxygénothérapie haut débit pendant 3 jours	non	LCS	E-18
CHU Nantes	11	12	M	Syndrome brady-apnéique et méningite biologique, intubation 36h sur dégradation neurologique	non	LCS	CV-B5

Abréviations : LCS, liquide cébrospinal ; CIVD, Coagulation intra vasculaire disséminée ; ACR, arrêt cardio respiratoire

Le génotypage, réalisé pour 76,7% (339/442) des cas d'infections néonatales, a permis l'identification de l'EV pour 86,4% (293/339) des dossiers analysés et 66,3% (293/442) des infections néonatales rapportées par le RSE. Les 6 types les plus fréquents sont présentés dans le Tableau 23.

Tableau 23 - Types d'entérovirus les plus fréquemment identifiés dans les infections néonatales en 2023 (n=293)

Type EV	Nombre (%) de virus identifiés	
	chez les nouveau-nés (n=293)	chez les plus de 28 jours (n=1352)
E18	72 (24,6%)	315 (23,3%)
E9	56 (19,1%)	310 (22,9%)
CVA9	30 (10,2%)	55 (4%)
E11	25 (8,5%)	34 (2,5%)
EV-A71	24 (8,2%)	87 (6,4%)
CVB5	18 (6,1%)	82 (6%)

Maladie pieds-mains-bouche

En 2023, une infection à EV associée à une maladie pieds-mains-bouche (PMB), une herpangine ou une éruption vésiculeuse a été rapportée chez 282 patients, dont 166 issus de la surveillance ambulatoire (43 pédiatres du réseau PARI) et 116 de la surveillance hospitalière (laboratoires RSE). L'épidémie a été modérée, comparable à celle de 2022 (Figure 14).

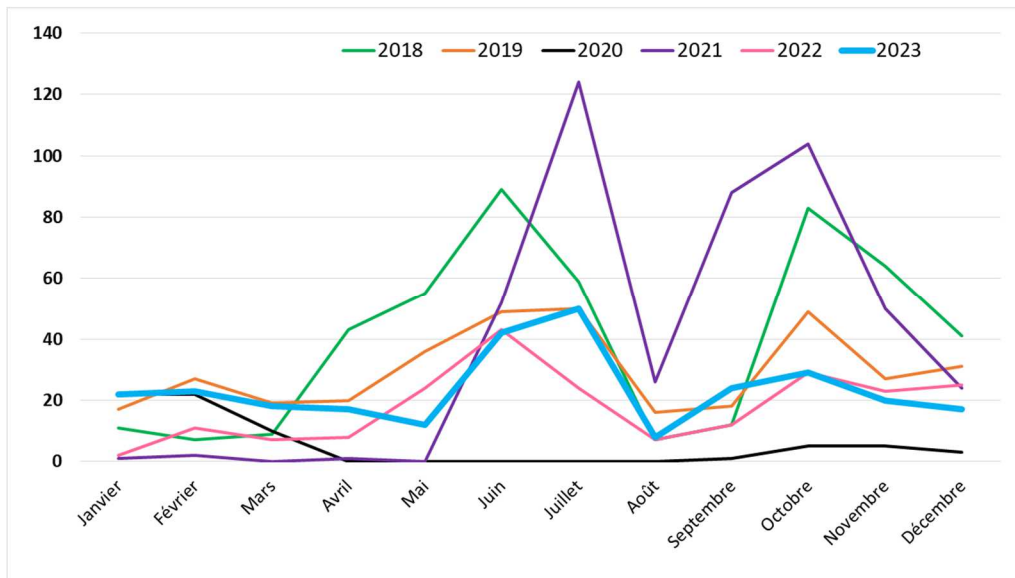


Figure 14. Répartition mensuelle des maladies PMB/herpangine, 20218-2023

La médiane d'âge était de 1,7 an (9 jours - 73 ans) avec une prédominance des enfants âgés de 1 à 4 ans (Figure 15).

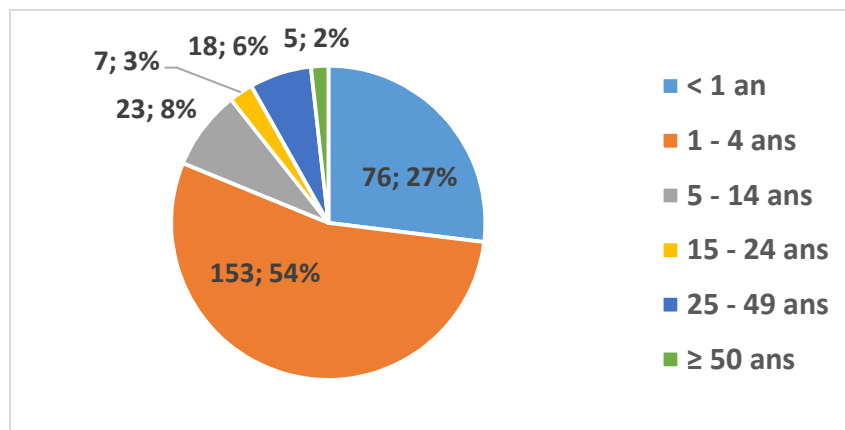


Figure 15. Répartition par classe d'âge des patients ayant présenté une maladie PMB/herpangine en 2023

Le génotypage réalisé pour 255/282 (89,8%) des patients a permis l'identification d'un EV chez 234 patients (94%), soit 83 % des infections associées à une maladie PMB/herpangine. Au total, 235 virus ont été identifiés, en raison d'une co-infection. Les entérovirus de l'espèce A représentaient 89,3% (209/234) des cas. Le CV-A6 était majoritaire (61%), suivi par l'EV-A71 (12,4%) (Figure 16).

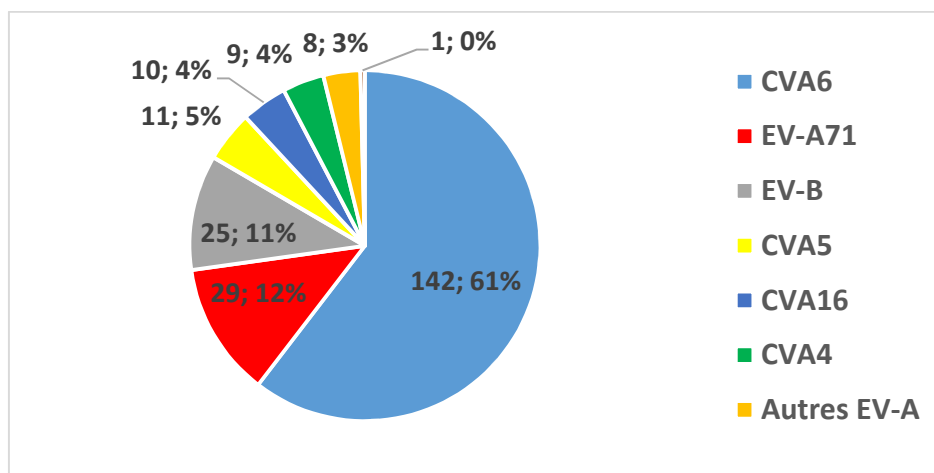


Figure 16. Distribution des types d'EV associées à des maladies PMB/herpangine en 2023 (n=235)

Parmi les 251 patients pour lesquels la donnée « hospitalisation » était renseignée, 50 (19,9%) ont été hospitalisés. Pour ces patients hospitalisés, l'âge médian était de 1,4 an (13 jours – 32 ans), et les signes neurologiques associés aux atteintes cutanéomuqueuses étaient dominés par l'irritabilité, des céphalées et des convulsions.

Parmi les virus typés (42/50), les plus fréquents étaient le CVA6 (21/42) et l'EV-A71 (9/42). Concernant les infections à EV-A71, elles ont été détectées chez 29 patients dont 9 hospitalisés, âgés de 10 jours à 10 ans, présentant des signes neurologiques de type hypotonie (pour les nouveau-nés) ou méningite. Le sous-génotype C1 variant 2015 était le sous-génotype détecté majoritairement (28/29).

Infections sévères à EV

Analyse globale

Globalement, les objectifs de la surveillance des tableaux cliniques sévères sont :

- De décrire tous les tableaux potentiellement imputables aux EV et de sensibiliser les cliniciens, les biologistes et les pouvoirs publics à cette problématique
- D'alerter sur toute augmentation anormale des cas et d'élaborer des recommandations sur le type de prélèvements à réaliser pour le diagnostic et le typage des cas.

En 2023, 116 (149 en 2022) tableaux cliniques sévères associés à une infection à EV ont été rapportés par le RSE, dont 105 (126 en 2022) chez des patients âgés de plus de 28 jours (Figure 17). Pour 8 (7,6%) des patients de plus de 28 jours, nous avons considéré l'implication de l'EV comme fortement improbable (autre étiologie prépondérante, détection de l'EV dans un échantillon sans rapport avec l'expression clinique). Pour 48 (45,7%) patients, l'EV a été considéré comme l'étiologie probable (détection de l'EV dans le LCS ou le sang +/- identification par typage, détection d'un EV-A71 y compris dans un prélèvement périphérique isolé et expression neurologique, détection d'un EV-D68 dans un prélèvement respiratoire et expression respiratoire ou neurologique de type myélite). Pour 49 (46,7%) patients, l'implication de l'EV dans la présentation clinique sévère a été considérée comme possible (détection +/- identification d'un EV - sauf EV-A71/ EV-D68- dans un prélèvement périphérique en association avec une symptomatologie compatible, cas de mort subite inexplicée du nourrisson avec ou sans données d'autopsie). Seuls les cas probables/possibles ont été retenus pour l'analyse viro-clinique ci-après (Figure 17 et Tableaux 24 et 25).

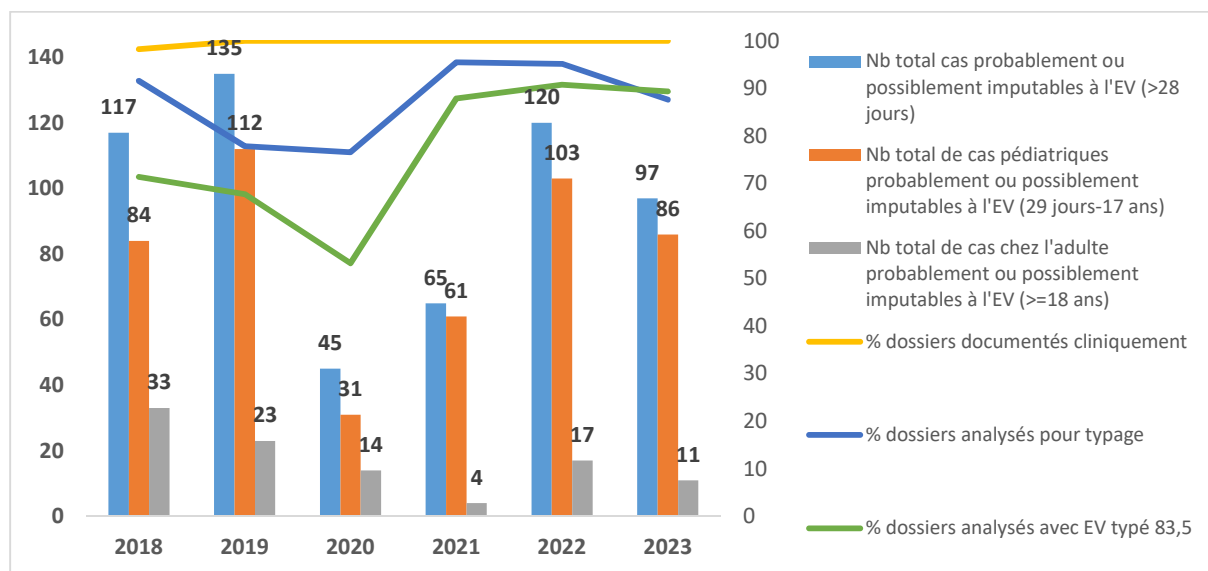


Figure 17. Nombre d'infections sévères à EV, 2018-2023

La répartition par classe d'âge ainsi que les motifs d'hospitalisation et les principaux signes cliniques associés aux infections sévères (probables ou possibles) chez les patients de plus de 28 jours étaient disponibles pour 100% des patients (Figure 18 et Tableaux 24 et 25).

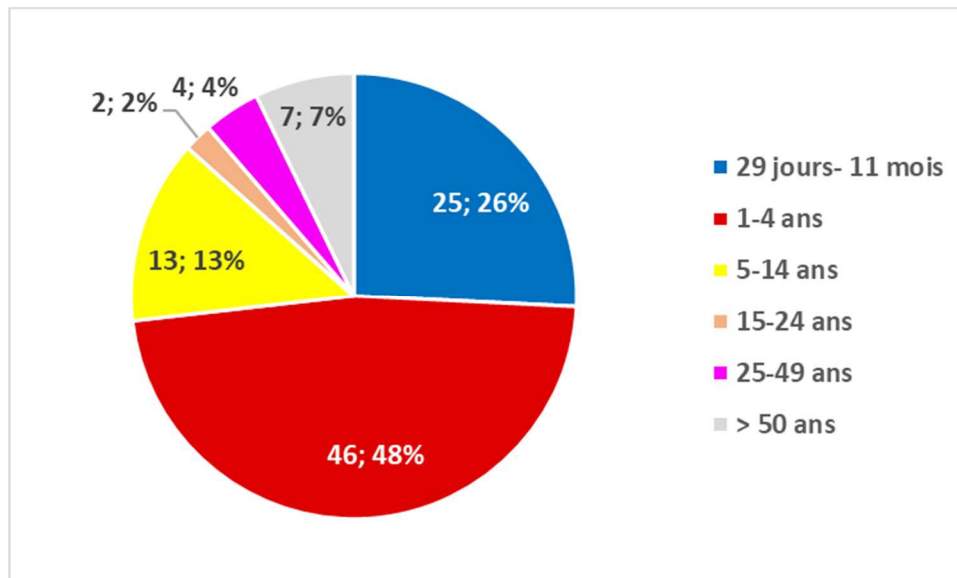


Figure 18. Répartition par tranches d'âge des cas d'infections sévères à EV (n=97)

Le génotypage a été réalisé pour 87,6% (85/97) des dossiers déclarés et une identification a pu être obtenue pour 89,4% (76/85) des dossiers analysés (Figure 17).

Sur la globalité de la période, les 3 types d'EV les plus fréquemment associés à des présentations cliniques sévères étaient l'EV-A71/c1 (26,1%), l'EV-D68 (25%) et le CV-A6 (7,9%). Tous les autres types ont été identifiés chez moins de 5,3% des patients. A noter que contrairement aux années 2016 et 2019, l'augmentation de la détection/circulation de l'EV-A71 n'a pas été associée à une augmentation jugée significative du nombre d'infections neurologiques sévères par les neuropédiatres.

Tableau 24 - Infections pédiatriques à EV associées à des tableaux cliniques sévères (29 jours -17 Ans)

Signes cliniques	2018 (N=84)		2019 (N=112)		2020 (N=31)		2021 (N=61)		2022 (N=103)		2023 (N=86)	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Signes neurologiques	57	67,9%	77	68,8%	18	58,1%	35	57,4%	41	39,8%	50	58,1%
<i>dont convulsions sévères isolées</i>	17	20,2%	24	21,4%	5	16,1%	16	26,2%	27	26,2%	20	23,3%
<i>Syndrome cérébelleux/cérébellite</i>	8	9,5%	16	14,3%	1	3,2%	5	8,2%	2	1,9%	7	8,1%
<i>Encéphalite/rhombencéphalite</i>	18	21,4%	20	17,9%	5	16,1%	8	13,1%	7	6,8%	12	13,9%
<i>ADEM/REM/myélites/polyradiculo-névrites/ Guillain-Barré / déficit moteur</i>	16	19,0%	15	13,4%	6	19,4%	5	8,2%	4	3,9%	9	10,5%
<i>Encéphalopathie</i>	1	1,2%	1	0,9%					2	1,9%		
<i>Paralysie faciale isolée</i>	1	1,2%	1	0,9%	1	3,2%	1	1,6%				
<i>Troubles conscience</i>											1	1,2%
<i>Syndrome méningé sévère</i>											1	1,2%
Signes respiratoires	15	17,9%	11	9,8%	8	25,8%	23	37,7%	48	46,6%	19	22,1%
<i>dont Asthme sévère</i>	6	7,1%	2	1,8%	4	12,9%	12	19,7%	25	24,3%	11	12,8%
<i>Bronchiolite sévère</i>	1	1,2%			2	6,5%	6	9,8%	5	4,9%	3	3,5%
<i>Syndrome brady-apnéique</i>	2	2,4%	4	3,6%			1	1,6%	5	4,9%	1	1,2%
<i>Pneumopathie hypoxémiante</i>			1	0,9%	1	3,2%	3	4,9%	4	3,9%	1	1,2%
<i>Autres détresses respiratoires aiguës</i>	6	7,1%	4	3,6%	1	3,2%	1	1,6%	10	9,7%	3	3,5%
Signes cardiaques ou cardio-vasculaires ou hémodynamiques	7	8,3%	16	14,3%	8	25,8%	4	6,6%	18	17,5%	12	14%
<i>dont Sepsis sévère/ choc cardio-vasculaire</i>	3	3,6%	10	8,9%	1	3,2%	2	3,3%	6	5,8%	7	8,1%
<i>Myocardite/ choc cardiogénique / péricardite / décompensation sur CMD</i>	2	2,4%	4	3,6%	4	12,9%	1	1,6%	6	5,8%	4	4,7%
<i>Défaillance multi-viscérale</i>			1	0,9%	1	3,2%			1	1,0%		

<i>Arrêt cardio-respiratoire</i>	2	2,4%	1	0,9%	1	3,2%	1	1,6%	6	5,8%		
<i>Purpura fébrile</i>											1	1,2%
Signes cutanéomuqueux	1	1,2%			1	3,2%						
<i>SPMB/érosions buccales sévères</i>					1	3,2%						
<i>Eczéma coxsackium</i>	1	1,2%										
Signes digestifs/hépatiques	1	1,2%	4	3,6%					1	1,0%		
<i>GEA sévère</i>			1	0,9%								
<i>Hépatite fulminante/défaillance hépatique</i>	1	1,2%	2	1,8%								
<i>Décompensation ascitique</i>			1	0,9%								
<i>Entérocolite</i>									1	1,0%		
<i>Pancréatite</i>												
Autres tableaux			3	2,7%					1	1,0%		
<i>Trismus</i>			1	0,9%								
<i>Décompensation surrénalienne</i>			1	0,9%								
<i>Décompensation acidémie propionique</i>									1	1,0%		
<i>Décompensation acidocétonique</i>			1	0,9%								
Décès	8	9,5%	8	7,1%	4	6,7%	2	3,3%	14	13,6%	9	10,5%
Mort subite du nourrisson (ou décès inexpliqué)	3	3,6%					1	1,6%	9	8,7%	8	9,3%
<i>Arrêt cardio-respiratoire</i>	3	3,6%			2	6,5%	1	1,6%	2	1,9%	1	1,2%
<i>Défaillance multi-viscérale</i>					2	6,5%						
<i>Encéphalite/encéphalopathie</i>	2	2,4%							3	2,9%		

Abréviations : ADEM : encéphalo-myélite aiguë disséminée ; REM : rhombencéphalomyélite.

Tableau 25 - Infections à EV associées à des tableaux cliniques sévères chez l'adulte (≥ 18 ans)

Signes cliniques	2018 (N=33)		2019 (N=23)		2020 (N=14)		2021 (N=4)		2022 (N=17)		2023 (N=11)	
	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%
Signes neurologiques	14	42,4%	16	69,6%	7	50,0%	2	50,0%	4	23,5%	7	63,6%
<i>dont Convulsions sévères isolées</i>	1	3,0%	1	4,3%							1	9,1%
<i>Syndrome cérébelleux/cérébellite</i>	1	3,0%									1*	9,1%
<i>Encéphalite/rhombencéphalite</i>	8	24,2%	10	43,5%	5	35,7%			1	5,9%	3	27,3%
<i>ADEM/REM/myélites/polyradiculonévrites/Guillain-Barré/déficit moteur</i>	5	15,2%	4	17,4%			1	25,0%	2	11,8%	1*	9,1%
<i>Encéphalopathie</i>									1	5,9%	1	9,1%
<i>Paralysie faciale isolée</i>					2	14,3%						
<i>Méningite chronique (Bruton)</i>			1	4,3%								
<i>Syndrome confusionnel</i>							1	25,0%			1	9,1%
Signes respiratoires	14	42,4%	3	13,0%	2	14,3%			7	46,4%	2	18,2%
<i>dont Asthme sévère</i>									3	17,6%		
<i>Exacerbation BPCO</i>	1	3,0%			1	7,1%			1	5,9%	1	9,1%
<i>Pneumopathie (hypoxémiante)</i>	8	24,2%	2	8,7%							1	9,1%
<i>Autres Détresses respiratoires aiguës</i>	5	15,2%	1	4,3%	1	7,1%			3	17,6%		
Signes cardiaques ou cardio-vasculaires	9	27,3%	4	17,4%	5	35,7%	1	25,0%	6	35,3%	2	18,2%
<i>Myocardite/choc cardiogénique</i>	2	6,1%	4	17,4%	1	7,1%	1	25,0%	4	23,5%		
<i>Péricardite</i>	1	3,0%							1	5,9%		
<i>Décompensation cardio-respiratoire/ choc cardio-vasculaire</i>	5	15,2%			3	21,4%			2	11,8%	1	9,1%
<i>Défaillance multi-viscérale</i>	2	6,1%			1	7,1%					1	9,1%

Signes cutanéomuqueux					2	14,3%						
PMB/érosions buccales sévères					2	14,3%						
Signes hépatiques												
Cytolyse hépatique sévère					1	7,1%						
Autres tableaux							1	25,0%	2	11,8%		
Décompensation surrénalienne							1	25,0%				
Mort fœtale in-utero									2	11,8%		
Décès	4	12,1%			1	7,1%	1	25,0%	2	11,8%	5	45,5%
Myocardite/choc cardiogénique	1	3,0%					1	25,0%	1	5,9%		
Défaillance multi-viscérale	1	3,0%									1	9,1%
Détresse respiratoire aiguë sur exacerbation BPCO											1	9,1%
Détresse respiratoire aiguë sur pneumopathie (hypoxémiante)	2	6,1%							1	5,9%		
Autre(s) DRA											1	9,1%
Dégradation neurologique sur encéphalite ou encéphalopathie											2	18,2%

Abréviations : ADEM : encéphalo-myélite aiguë disséminée ; BPCO : broncho-pneumopathie obstructive ; REM : rhombencéphalomyélite ;

*Dysarthrie cérébelleuse et déficit héli-corporel droit au décours syndrome méningé chez le même patient

Au total, 14/97 patients sont décédés, soit 14,4% des tableaux sévères (hors infections néonatales) avec imputabilité probable (n=2) ou possible (n=12) de l'EV (Tableau 26).

- Mort subite ou inexpiquée du nourrisson ou du jeune enfant (MSN, MSIN, MS) (n=9)
- Décompensation cardio-respiratoire au décours infection à EV-D68 chez des sujets âgés (n=2)
- Dégradation neurologique fatale avec détection de l'EV dans le LCS (n=2), dont un cas d'installation progressive chez une patiente traitée antérieurement par rituximab pour un lymphome
- Défaillance multi-viscérale chez un patient leucémique en aplasie fébrile (n=1)

Tableau 26 - Présentation clinique des infections à EV associées à des décès

Hôpital	Mois année	Age	Sexe	Présentation ou contexte clinique	Echantillons EV +	Type EV
Imputabilité probable						
CHU Clermont-Ferrand	11	55 ans	F	Décès au décours décompensation BPCO	ECNP	EV-D68/D1
CHU Nantes	12	92 ans	F	Décompensation cardio-respiratoire au décours infection ORL fébrile	ECNP	EV-D68/D1
Imputabilité possible						
CHU Caen	1	2 mois	M	MSN au décours infection ORL	ECNP, selles	EV-D68/D1
CHU Dijon	2	2 ans	M	MSIN	Gorge	E11/ Rhinovirus A
CHU Angers	2	8 mois	M	MSN au décours virose avec éruption cutanée et méningite biologique sur PL post-mortem	LCS	Non typé
CHU Caen	3	7 mois	M	MSN sans contexte clinique initial. Examen anatomo-pathologique normal	Sang, gorge, ANP, selles	CVA4
CH Cergy-Pontoise	3	17 mois	M	MSN au décours infection ORL	LCS	E9
CH Jean-Verdier	3	22 mois	M	Notion ACR au décours vomissements	ECNP	EV-A71/c1
CHU Nantes	4	5 mois	F	MSIN	LCS	E3
CHU Clermont-Ferrand	7	4 mois	M	MSIN sans contexte clinique initial	Selles	E9
CHU Besançon	11	3 ans	M	MS	LCS, ECNP, Ec rectal	CVA4
CHU Reims	9	58 ans	F	Dégradation neurologique progressive chez une patiente traitée antérieurement par rituximab pour un lymphome	LCS	Non typé
CHU Clermont-Ferrand	10	77 ans	M	Dégradation neurologique brutale chez un patient avec ATCD d'alcoolisme et tétraplégique depuis 15 jrs dans les suites d'une chirurgie sur spondylodiscite	LCS	Non typable
CHU Lille	10	67 ans	M	Défaillance multi-viscérale en contexte d'aplasie fébrile (LAL)	LCS	Non typé

Point spécifique sur les atteintes neurologiques sévères

En 2023, une atteinte neurologique sévère hors infection néonatale a été rapportée chez 63 patients. Selon les mêmes critères que décrits ci-dessus, l'imputabilité de l'infection à EV a été retenue comme probable ou possible pour 27 (47,4%) et 30 (52,3%) patients, soit 57/63 (90,5%). La proportion d'atteintes neurologiques sévères était de 3% (de 2,9 à 7 % entre 2016 et 2022).

Comme les années précédentes, elles ont majoritairement été rapportées chez des enfants (87,7%). La classe d'âge la plus touchée était les enfants de 1 à 4 ans (Figure 19).

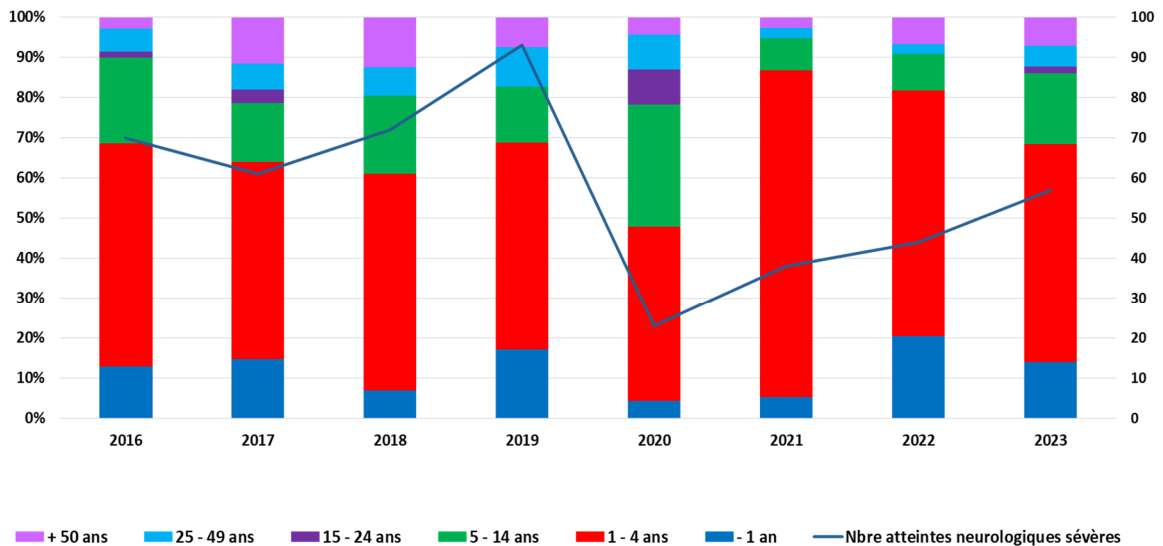


Figure 19. Nombre d'infections neurologiques sévères et distribution par classe d'âge, 2016-2023

Le génome des EV a été détecté dans le LCS (n=24/57, 42,1%) et/ou le sang (2/57, 3,5%) et/ou un prélèvement nasopharyngé (25/57, 50,9%) et/ou les selles (30/57, 57,9 %). Le typage moléculaire, réalisé pour 49/57 (86%) des dossiers patients, a permis d'identifier un EV pour 40/49 (81,6%) des dossiers avec atteinte neurologique sévère.

Alors qu'en 2022 les EV de l'espèce B étaient prédominants, **les EV de l'espèce A sont les plus fréquemment identifiés en 2023, et particulièrement l'EV-A71** (Figure 20).

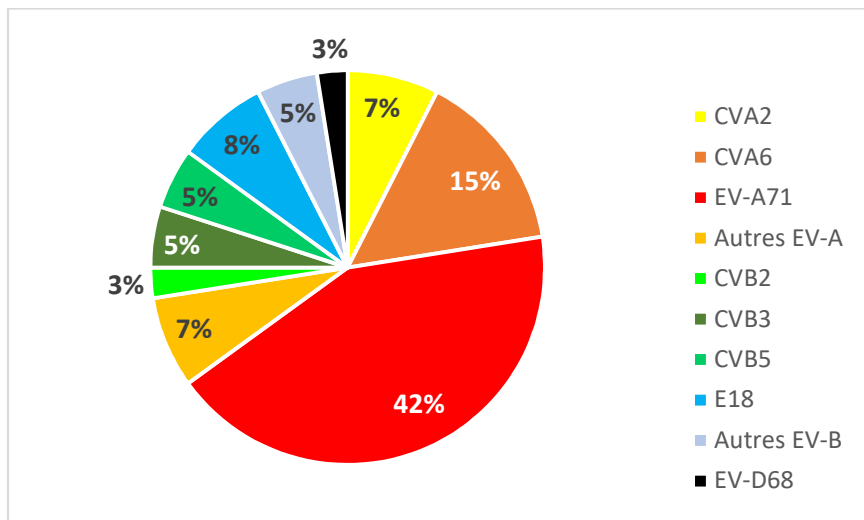


Figure 20. Types d'EV associés aux atteintes neurologiques sévères en 2023

Les atteintes neurologiques sévères ont été classées en 7 grands tableaux cliniques à partir des données cliniques disponibles et sans relecture systématique des dossiers par un clinicien spécialiste (Figure 20). Les crises convulsives complexes/état de mal étaient le tableau clinique prédominant (21/57, 36,8%), suivies des tableaux d'encéphalite (33,3%), sans doute à mettre en rapport avec le nombre d'infections à EV-A71.

En 2023, ont notamment été rapportés :

- Tableaux convulsifs : n=21 patients

- Méningoencéphalite, encéphalite et rhombencéphalite : n=15. Les patients étaient 12 enfants (1 mois à 6 ans), et 3 adultes (36 à 58 ans). Un enfant et un adulte ont présenté également une détresse respiratoire. Ces tableaux étaient associés à un

EV-A71 (n=5), un CVB3 (n=2), un CVA6 (n=2), un E18 (n=1), un CVB2 (n=1) et un CVA2 (n=1). Le typage était impossible (n=2) ou non fait (n=1) pour les autres cas.

- Cérébellite et ataxie cérébelleuse : n=7. Il s'agissait d'enfants âgés de 18 mois à 9 ans, 3 étaient associées à un EV-A71. Le typage était impossible pour les autres.

- Encéphalomyélite, rhombencéphalomyélite : n= 9. Il s'agissait de 9 enfants âgés de 5 mois à 4 ans. L'un d'entre eux a présenté également une détresse respiratoire et un tableau de sepsis sévère avec choc cardiovasculaire. Un EV-A71 a été identifié chez cet enfant, ainsi que chez 6 autres. Pour les 2 derniers, le typage a été impossible.

Infections à EV-A71

Le potentiel épidémique et la neurovirulence de l'EV-A71 justifient une surveillance particulière. En France, la surveillance des infections à EV-A71 repose sur :

- la détection et l'identification des EV chez les patients hospitalisés par les laboratoires du RSE
- la surveillance spécifique de la maladie PMB par un réseau national de pédiatres libéraux.

En 2023, les infections à EV-A71 rapportées au CNR sont en augmentation par rapport à 2022 : 130 infections (contre 22 en 2022), dont 113 et 17 à travers les surveillances hospitalière et ambulatoire, respectivement. Les cas ont été majoritairement rapportés entre avril et août 2023 (103/130, 79,2%). L'âge médian des patients était 9 mois (5 jours – 75 ans) (Figure 21).

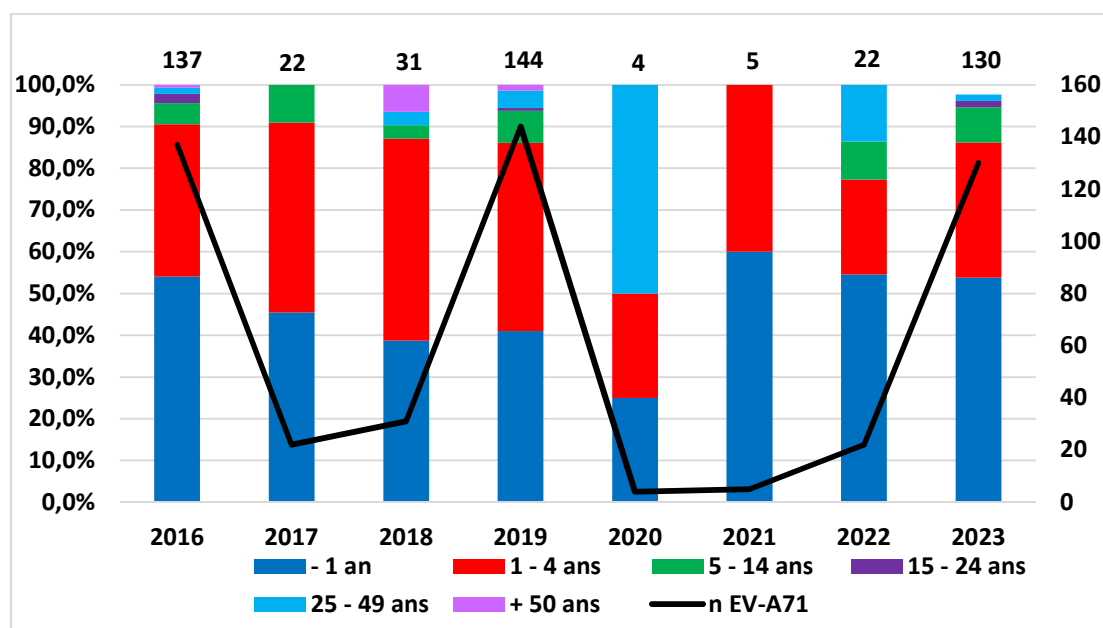


Figure 21. Nombre d'infections à EV-A71 et distribution par classe d'âge, 2016-2023

Des informations cliniques étaient disponibles pour 93,8% (106/113) des patients issus de la surveillance hospitalière ; 95/106 patients ont été hospitalisés. Les tableaux cliniques rapportés montrent l'importance de la **symptomatologie neurologique centrale caractérisant les infections à EV-A71** (Tableau 27). Les atteintes neurologiques sévères à EV-A71 sont décrites dans le paragraphe précédent *Infections sévères à entérovirus*. Deux décès ont été rapportés, chez un enfant de 2 ans avec acidose métabolique (diabète de type 1) avec un EV-A71 identifié dans le LCS, et chez un enfant de 22 mois avec un EV-A71 identifié dans un échantillon nasopharyngé dans un tableau de mort subite inexpiquée.

Tableau 27 - Caractéristiques cliniques des infections à EV-A71 chez les patients hospitalisés en 2023

Signes cliniques	nombre (%) de patients hospitalisés, n = 95	%
Fièvre	89	93,7%
Hypotonie	15	15,8%
Signes neurologiques, dont	71	74,7%
Méningite biologique isolée	8	8,4%
Syndrome méningé sans troubles sévères	14	14,7%
Convulsions, état de mal	4	4,2%
Encéphalite, rhombencéphalite	5	5,3%
ataxie cérébelleuse/cérébellite	4	4,2%
(Rhombencéphalo)myélite, paralysie flasque aiguë	8	8,4%
Signes cardiovasculaires	6	6,3%
Signes respiratoires, dont	31	32,6%
détresse respiratoire	5	5,3%
Signes cutanéomuqueux	20	21,1%
Signes digestifs	36	37,9%

A noter que le **génom**e de l'**EV-A71** a pu être identifié directement dans le LCS de 34 patients (1 adulte et 33 enfants).

Lignage d'EV-A71 : sous-génotype connu pour 129/130 (99,2%) : tous appartenait au sous-génotype C1, variant 2015.

Infections à EV-D68

Depuis 2014, l'EV-D68 a émergé comme un virus significatif à l'origine d'infections respiratoires sévères et de tableaux neurologiques graves. Une entité clinico-radiologique proche de la poliomyélite a été caractérisée, associant déficit moteur et/ou paralysie d'un ou plusieurs membres (affectant plus fréquemment les membres supérieurs) et lésions de myélite à l'IRM (affectant principalement la substance grise centrale au niveau cervical et/ou thoracique). La myélite peut être associée à une atteinte des centres bulbaires et/ou des nerfs crâniens. Des tableaux de rhombencéphalite sans myélite ou de Guillain-Barré ont également été décrits au décours d'infections à EV-D68.

Le potentiel épidémique et la gravité des tableaux neurologiques justifient une surveillance spécifique de l'EV-D68 reposant ou non sur la notification des cas selon les pays.

En 2016, suite au signalement par la Catalogne et l'hôpital Necker d'une recrudescence d'atteintes neurologiques sévères en pédiatrie, une surveillance renforcée de l'EV-D68 et de l'EV-A71 et la notification des cas neurologiques sévères avait été mise en place conjointement par le CNR et Santé publique France. La notification des cas neurologiques sévères n'a pas été reconduite les années suivantes, en l'absence de signalement clinique majeur.

Entre 2012 et 2018, une augmentation bisannuelle des cas était décrite. Celle-ci a été modifiée par la mise en place des mesures barrière anti-COVID-19. En effet, pour la première fois, une circulation accrue de l'EV-D68 a été observée deux années consécutives en 2021 et 2022, cette observation pouvant être liée à la mise en place d'une surveillance renforcée en réponse aux alertes européenne (2021) ou américaine (2022).

Bien qu'aucun signal d'appel n'ait été émis par les cliniciens ou les réseaux de surveillance internationaux, une surveillance renforcée de la circulation de l'EV-D68 a été mise en place au CHU de Lyon afin d'avoir une estimation comparative du taux de circulation de ce virus en 2023. Le CHU de Lyon a réalisé le screening de tous les échantillons respiratoires prélevés chez les enfants de moins de 5 ans du 01/09/2023 au 30/11/2023. En parallèle, le CHU de Clermont-Ferrand a réalisé toute l'année le typage de tous les échantillons détectés positifs en EV/rhino, permettant d'identifier l'EV-D68.

Au total, 67 cas d'infection à EV-D68 ont été détectés en 2023 (Figures 23-23). Au CHU de Lyon, la proportion de dossiers positifs en PCR EV-D68 chez les moins de 5 ans était de 0,7% (8/1147prélèvements du screening) vs 4,4% en 2022 et 4,3% en 2021. Elle était de 1,5% au CHU de Clermont-Fd, tout âge confondu, et de 2,3% (contre 1,6% en 2022) chez les moins de 5 ans. Ceci semble indiquer que la circulation a été faible dans la population en 2023.

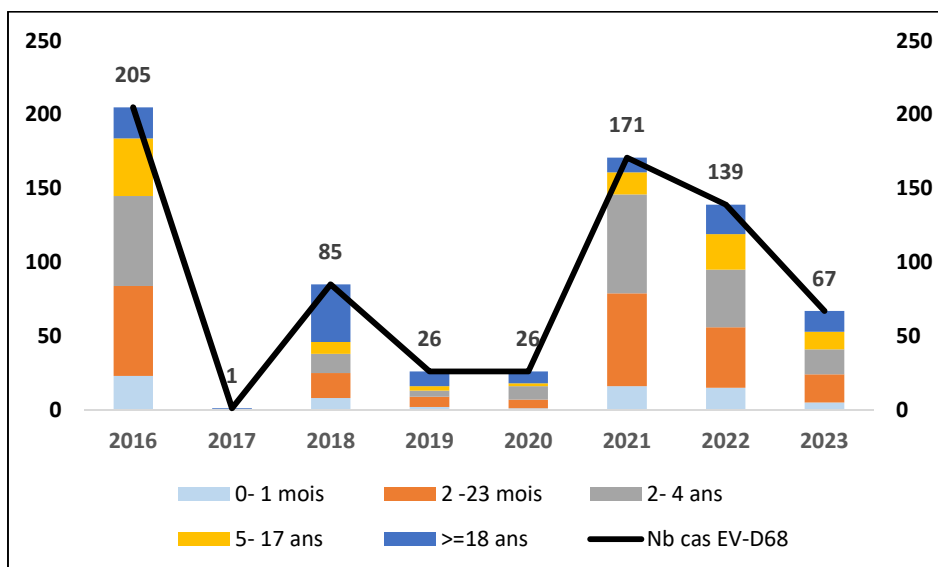


Figure 22. Répartition par tranche d'âge des infections à EV-D68, RSE, 2023

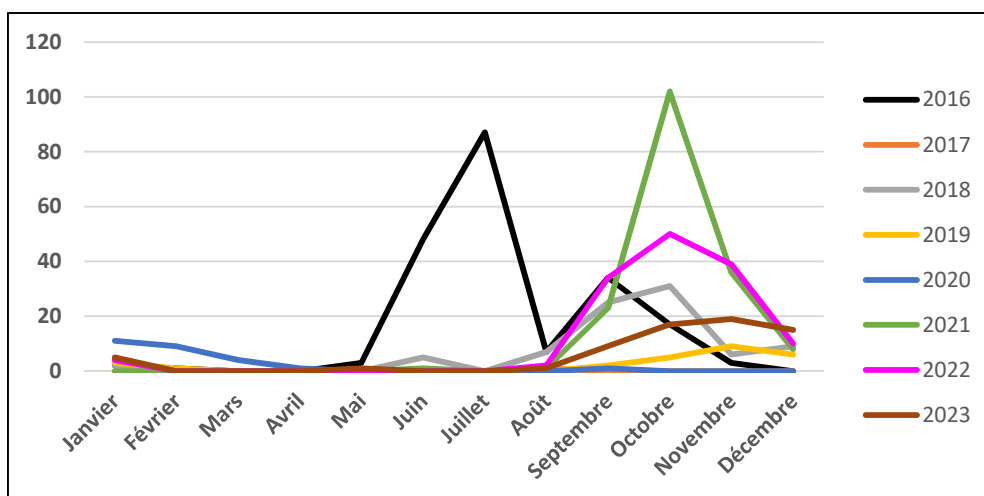


Figure 23. Distribution mensuelle des cas d'infections à EV-D68, RSE, 2106-2023

Le nombre de cas d'EV-D68 est d'une manière générale très largement sous-estimé dans le cadre de la surveillance hospitalière, étant donné que tous les échantillons détectés positifs en EV/rhinovirus ne peuvent pas être génotypés.

En 2023, 75% des EV-D68 (47/63) séquencés appartenait au sous-clade B3 (Tableau 28). Ce sous-clade est majoritaire depuis 2016 en France et en Europe. 56,3% des EV-D68 du clade D1 ont été génotypés chez des adultes.

Tableau 28 - Distribution des clades d'EV-D68, 2016-2023

Année	Nb de cas	% de souches séquencées	Clades identifiés
2016	205	Non déterminé	B3 (100%)
2017	1	100,0%	B3 (100%)
2018	85	96,5%	B3 (49%) - D1 (51%)
2019	26	88,5%	B3 (57%) - D1 (43%)
2020	26	76,9%	B3 (80%) - D1 (20%)
2021	171	85,4%	B3 (100%)
2022	139	89,9%	B3 (98%) - D1 (2%)
2023	67	94,0%	B3 (75%) - D1(25%)

Les signes cliniques disponibles pour 89,6% (60/67) des patients infectés par l'EV-D68 sont présentés dans le Tableau 29.

Parmi les cas pédiatriques, 48 (94,1%) présentaient un tableau respiratoire isolé. Les tableaux d'asthme, les signes ORL bénins et les bronchiolites étaient prépondérants. Un seul patient (2,0%) a présenté un tableau neurologique consistant en un état de mal épileptique chez un patient avec antécédent d'encéphalopathie convulsivante. Un EV-D68 a été identifié chez un enfant décédé d'une MSIN et son imputabilité dans le tableau clinique a été classée possible. Au total, 19,6% (10/51) des enfants avec dossiers documentés ont été hospitalisés en réanimation/soins intensifs.

Parmi les adultes, 7 (77,8%) présentaient un tableau respiratoire isolé. Parmi eux, 2 présentaient une détresse respiratoire sévère (l'un sur une pneumopathie, l'autre sur exacerbation de BPCO) ayant justifié une hospitalisation en réanimation ou en soins intensifs et conduit à un décès. Un deuxième décès a été rapporté chez une autre patiente ayant présenté un tableau de décompensation cardio-respiratoire.

Tableau 29 - Signes cliniques associés aux infections à EV-D68, RSE, 2023

Signes cliniques	Enfants		Adultes	
	(n=51/53)	%	(n=9/14)	%
Respiratoires	48	94,10%	7	77,80%
<i>Asthme</i>	24	47,10%	1	11,10%
<i>ORL</i>	13	25,50%	1	11,10%
<i>Bronchiolite</i>	7	13,70%		
<i>Pneumopathie</i>	2	3,90%	4	44,40%
<i>Syndrome brady-apnéique</i>	1	2,00%		
<i>Détresse respiratoire</i>	1	2,00%		
<i>Exacerbation BPCO</i>			1	11,10%
Neuro	1	2,00%		
<i>Convulsions, clonies</i>	1	2,00%		
Cardio			1	11,10%
<i>Décompensation cardio-respiratoire</i>			1	11,10%
Décès inexplicé	1	2,00%		
Découverte fortuite (sans signes cliniques)	1	2,00%		

3.2.3. Surveillance de la poliomyélite

Depuis le milieu du siècle dernier, la vaccination antipoliomyélitique a considérablement réduit l'incidence de la poliomyélite. Initié en 1988, le programme d'éradication de l'OMS est dans sa phase finale avec l'espoir de voir la maladie éradiquée en 2030. Les poliovirus sauvages de type 2 et 3 (WPV2 et WPV3) ont été déclarés éradiqués en 2016 et 2019. Deux pays seulement restent endémiques pour le WPV1 (Pakistan et Afghanistan) et le nombre de cas de poliomyélites dus à ce virus est extrêmement faible (12 en 2023). Depuis le milieu des années 2010, la majorité des cas de poliomyélites sont dus à des poliovirus dérivés des souches vaccinales et ayant recouvré un phénotype neurovirulent. Ces poliovirus, appelés VDPV (pour *vaccine-derived poliovirus*), émergent dans les zones où le vaccin polio oral (VPO) est utilisé mais où la couverture vaccinale n'est pas optimale. Les personnes vaccinées avec le VPO excrètent des poliovirus vaccinaux durant plusieurs semaines ; les virus excrétés peuvent alors infecter des personnes non-vaccinées et établir des chaînes de transmission suffisamment longues pour permettre aux virus de perdre les déterminants génétiques de l'atténuation. En 2023, les VDPV ont été responsables d'environ 500 cas de poliomyélite. L'utilisation du nouveau vaccin oral nOPV2 (constitué d'une souche Sabin 2 génétiquement stabilisée) en réponse aux épidémies (1 milliard de doses administrées dans 35 pays depuis début 2021) permet progressivement de diminuer le nombre de cas. Néanmoins, bien que ce vaccin soit génétiquement plus stable que le vaccin oral Sabin, quelques rares émergences de VDPV dérivés par double recombinaison du vaccin nOPV2 ont été détectées dans plusieurs pays d'Afrique centrale.

L'objectif d'éradication est mis en danger par l'extrême facilité avec laquelle les poliovirus diffusent. Leur diffusion est favorisée par de nombreux facteurs :

- la stabilité des particules infectieuses dans l'environnement ;
- le fait que les poliovirus sont transmis par l'eau : une personne peut être infectée par un poliovirus excrété à des dizaines de kilomètres du lieu de l'infection ;
- la longue durée d'excrétion des poliovirus, sauvages ou vaccinaux, par les personnes infectées (plusieurs semaines voire plusieurs mois) ;
- le fait que la majorité des infections à poliovirus sont a- ou pauci-symptomatiques.

Couplés à l'instabilité politique dans certains pays, aux phénomènes migratoires, à l'insuffisance de la surveillance et/ou de la couverture vaccinale dans certains pays, ces facteurs permettent l'importation de poliovirus, notamment dans les régions où la couverture vaccinale n'est pas optimale. Ainsi, un WPV1 a été importé du Pakistan au Malawi en 2021 et a circulé dans le pays en causant plusieurs cas de poliomyélite avant de s'étendre au Mozambique en 2022. Toute l'Afrique intertropicale est ainsi considérée comme à risque d'importation et de diffusion de poliovirus. Les pays utilisant le vaccin polio injectable (VPI) ne sont pas à l'abri d'une importation puisque ce vaccin n'induit pas d'immunité muco-sale au niveau de l'intestin à même d'empêcher l'infection des personnes vaccinées. Le faible impact du VPI sur la circulation des poliovirus a notamment été démontré lors de l'importation d'un WPV1 en Israël en 2014. Malgré une couverture vaccinale de plus de 98 % dans le pays, cette souche a pu circuler durant 12 mois et n'a été éliminée que grâce à la réintroduction du VPO qui a été utilisé pour revacciner les enfants déjà vaccinés avec le VPI. L'année 2022 avait été marquée par la détection d'un cas de poliomyélite à VDPV2 dans l'état de New York (avec détection rétrospective de VDPV2 similaires dans les eaux usées du comté de résidence du patient et de 3 comtés voisins) et la détection prolongée de cette même souche dans les eaux usées de Londres et de Tel Aviv. Ces 2 événements nous avaient rappelé que la réintroduction de poliovirus était possible dans des pays développés ayant éradiqué le virus depuis longtemps et présentant une bonne couverture vaccinale avec le VPI.

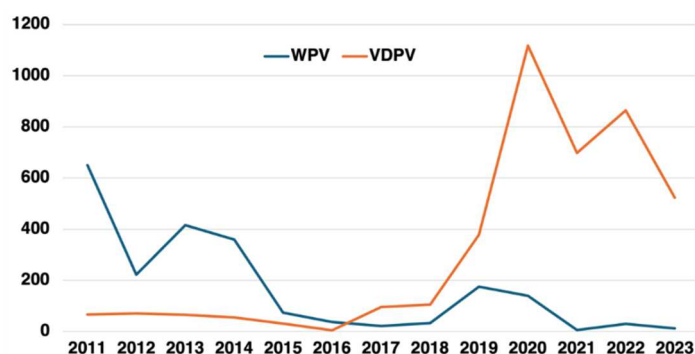


Figure 24. Nombre de cas de poliomyélite déclarés par l'OMS (2011-2023)

La surveillance humaine de la poliomyélite en France Métropolitaine est sous la responsabilité du laboratoire de Virologie du CHU de Lyon (LA du CNR), intégré au dispositif international de surveillance de la poliomyélite piloté par l'OMS. Dans l'hypothèse de la détection d'une souche potentiellement neurovirulente, l'expertise du LA IP vient en renfort pour la caractérisation virologique et phénotypique complète des souches et pour la recherche de liens génétiques avec des souches isolées dans d'autres pays.

L'objectif est de surveiller l'introduction et l'éventuelle diffusion de poliovirus potentiellement neurovirulents sur le territoire métropolitain à partir de pays où une circulation active existe. Cette surveillance viro-clinique s'appuie sur : 1/ le typage élargi des souches détectées dans le cadre de la surveillance globale des infections à EV (en particulier le typage des EV détectés dans les selles des enfants de moins de 15 ans et le typage des échantillons prélevés chez les patients avec tableau de paralysie flasque aiguë) ; 2) la recherche de poliovirus dans de rares tableaux de paralysie flasque aiguë avec éléments épidémiologiques pouvant faire suspecter une poliomyélite (1 à 3 par an) ou chez des enfants adoptés ou des réfugiés venant de pays à risque avéré ou potentiel pour la circulation de poliovirus ; 3) la détection de poliovirus en cas d'exposition accidentelle au poliovirus (personnels des laboratoires producteurs de vaccins polio essentiellement) (Figure 25).

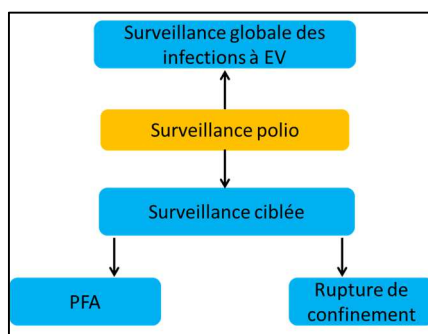


Figure 25. Organisation de la surveillance humaine de la poliomyélite en France Métropolitaine

En outre, depuis fin 2023, la surveillance virologique humaine a été étendue à certains Départements d'Outre-Mer, Mayotte et la Réunion, dont les liens avec Madagascar et les Comores peuvent faire craindre l'introduction de VDPV. Cette surveillance additionnelle repose sur l'analyse d'échantillons de selles prélevés chez des enfants de moins de 15 ans par le LC (pour Mayotte) et le LA (pour la Réunion).

La majorité des infections à poliovirus étant inapparentes, la surveillance clinique ne permet pas d'identifier rapidement l'introduction de poliovirus dans un territoire jusqu'alors indemne. C'est pourquoi l'OMS préconise la mise en place d'une surveillance environnementale de routine qui vise à rechercher des poliovirus dans les eaux usées.

Entre 1973 et fin 2018, une **surveillance environnementale** a été assurée par le Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris, s'appuyant sur l'analyse de prélèvements d'eaux usées et de boues résiduaires réalisés mensuellement dans les 6 principales stations d'épuration du Bassin parisien (bassin de population de 12 millions d'habitants). La technique mise en œuvre était proche de celle recommandée par l'OMS mais le laboratoire n'était pas accrédité par le Réseau mondial des laboratoires polio et il n'était pas évalué chaque année par un test de compétence. En octobre 2019, une commission du HCSP a estimé qu'il n'était pas opportun de maintenir cette surveillance environnementale du fait des contraintes techniques lourdes, du rendement faible et d'une balance coût/bénéfice défavorable. Néanmoins, suite à la détection de VDPV2 aux USA, au Royaume-Uni et en Israël, il a été décidé de développer les compétences nécessaires à la mise en place d'une surveillance environnementale. Un projet est à l'étude porté par l'ANRS MIE avec pour objectifs :

- d'identifier une méthode standardisée de détection des PV dans les eaux usées (en s'affranchissant si possible de la culture sur L20B et RD) ;
- de définir une stratégie d'échantillonnage à l'échelle nationale ;
- de définir une stratégie de surveillance renforcée en cas de détection de poliovirus.

Cette étude implique le LA IP et des laboratoires partenaires. A la phase opérationnelle, la surveillance environnementale des poliovirus ferait appel aux réseaux de collecte déjà établis (Obépine, SUM'Eau, Eaux de Paris, ...)

Il est à noter que le principal écueil à la mise en place de la surveillance environnementale des poliovirus est la nécessité de

recourir à l'isolement en cultures cellulaires, une étape qui ne peut pas être automatisée et qui demande un certain savoir-faire. Plusieurs laboratoires polio travaillent à développer des techniques alternatives mais celles-ci n'ont jamais démontré une sensibilité identique à la technique actuelle. Il paraît donc illusoire de pouvoir disposer à court-terme d'une technique pouvant être mise en œuvre rapidement par n'importe quel laboratoire de diagnostic ou de surveillance.

En France, le dernier cas de poliomyélite autochtone remonte à 1989 et le dernier cas importé remontait à 1995. **En 2023, un VDPV3 a été détecté via la surveillance humaine chez un patient d'origine Marocaine porteur d'un déficit immunitaire congénital** (Tableau 30).

Tableau 30 - Surveillance humaine de la poliomyélite, 2018-2023

	2018	2019	2020	2021	2022	2023
Nb LCS testés en PCREV	22282	22656	19385	22221	23960	23827
Nb LCS positifs en PCREV	2126	1538	177	411	1000	1564
Nb de dossiers patients avec EV identifié dans le LCS	1415	969	87	200	634	938
Nb selles testées en PCR EV	7119	7368	5683	6619	7226	6332
Nb selles positives en PCR EV	482	553	112	207	408	575
Nb de dossiers patients avec EV identifié dans les selles	281	332	45	125	304	369
Nb de dossiers patients avec PV identifié	0	0	1 ^a	0	0	1 ^b
Recherche de poliovirus chez des enfants adoptés ou réfugiés						
Nb total patients analysés	74	1	1	3	3	3
Nb patients détectés EV+	9	1	0	0	0	0
Nb patients EV+ typés	7	1	0	0	0	0
Nb patients PV+	0	0	0	0	0	0
Recherche de poliovirus chez des personnels exposés accidentellement au poliovirus						
Type de virus	WPV1 ^c /OPV3 ^d	WPV3	OPV2	WPV3/WPV1	RAS ^f	RAS ^f
Niveau d'exposition	Faible/ intermédiaire ^e	faible	intermédiaire	Faible/ intermédiaire ^e		
Nb personnels testés	2 /6	1	1	2/2		
Nb échantillons testés	6/17	3	6	2/25		
Nb personnels PV+	0/1	0	0	0/0		
Nb échantillons PV+ (PCR et/ou culture)	0/3	0	0	0/0		

^a Identification de poliovirus 1 vaccinal dans un échantillon naso-pharyngé; ^b : Identification d'un iVDPV3 dans des échantillons de selles d'un patient présentant un déficit immunitaire congénital ; ^c : WPV : wild-type poliovirus ; ^d : OPV: oral poliovirus vaccine ; ^e : survenue de 2 incidents en 2018 et 2021 ; ^f Aucun incident d'exposition en 2022 et 2023

3.2.4. Surveillance des infections à parechovirus en France métropolitaine

Tableau 31 - Diagnostic des infections à HPeV en 2023

Laboratoires réalisant le diagnostic HPEV en 2023	Nb total échantillons testés	Nb dossiers patients positifs	Technique(s) diagnostique(s) utilisées
06_CHU Nice	300	3	FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel, AltoStar® EV&RV1HPeV
13_CHU Marseille	2163	7	FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel, RT-PCR en temps réel maison®
14_CHU Caen	901	10	FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel
21_CHU Dijon	248	4 ^a	Parechovirus R-GENE®, FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel
25_CHU Besançon	612	3	FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel
29_CHU Brest	68	1	Parechovirus R-GENE®
33_CHU Bordeaux	331	1	FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel
34_CHU Montpellier	Données non transmises	Données non transmises	Progenie EV/HPEV
35_CHU Rennes	Données non transmises	Données non transmises	Parechovirus R-GENE®
37_CHU Tours	Données non transmises	Données non transmises	FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel
38_CHU Grenoble	Données non transmises	Données non transmises	FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel
42_CHU St Etienne	403	3	FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel
44_CHU Nantes	Données non transmises	6	RT-PCR temps réel EV/HHPeV maison, FTD Respiratory pathogens 21
45-CHU Orléans	710	1	FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel
49_CHU Angers	167	0	FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel
59_CHU Lille	141	2	Parechovirus R-GENE®
63_CHU Clermont-Ferrand	303	4 ^b	Parechovirus R-GENE®
64_CH Bayonne	37	1	FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel (depuis Août 2023)
69_CHU Lyon	3180	6 ^c	FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel Parechovirus r-GENE®
75_AP-HP Trousseau	Données non transmises	4	Parechovirus r-GENE®
75_AP-HP Necker	869	11	FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel, Parechovirus r-GENE®
76_CHU Rouen	1605	5	FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel
78_CH Versailles	126	1	Parechovirus r-GENE®
80_CHU Amiens	1194	4	FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel, Parechovirus r-GENE®
83_CHI Toulon	114	2	FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel, QIAstat-Dx meningitis/encephalitis panel
65_CH Bigorre	Données non transmises	1	FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel
TOTAL	13472	80	

^a dont 1 chez un patient non hospitalisé du Morbihan ; ^b dont 2 pour des patients de CH extérieurs (CH Alpes-Léman (74) et CH de Fréjus (83)) ; ^c dont 1 pour un patient du CH de Metz

Diagnostic

En 2023, 26 laboratoires du RSE ont réalisé le diagnostic des infections à HPeV (stable depuis 2021) (Tableau 31).

La généralisation de l'utilisation des techniques multiplex utilisées pour le diagnostic différentiel des méningites permet de rendre une réponse diagnostique rapide compatible avec la prise en charge des cas pédiatriques. Elle a pour corollaire l'élargissement du criblage des infections à HPeV à d'autres tranches d'âge, même si de nombreuses études ont montré que le diagnostic était indiqué principalement chez les nouveau-nés et nourrissons de moins de 3 mois. 23 laboratoires ne participant pas au RSE ont également transmis des échantillons pour le diagnostic des infections à HPeV aux laboratoires du CNR.

En 2023, d'après les données transmises, 13472 échantillons ont été analysés ; 80 infections à HPeV ont été diagnostiquées.

Données de la surveillance

En 2023, 60 infections à HPeV ont été rapportées (60/80, 75%, contre 92,1% en 2022) sur le site de la surveillance par les laboratoires du RSE, contre 117 en 2022 et 60 en 2021. La répartition mensuelle des cas est présentée en Figure 26 et met en évidence, en post-COVID des pics de circulation en été et en automne à l'instar de ce qui était habituellement observée avant 2020.

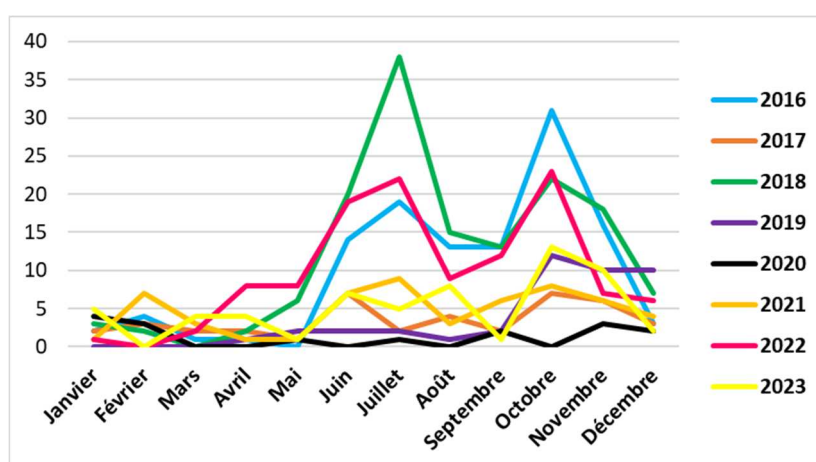


Figure 26. Distribution mensuelle des infections à parechovirus, 2016-2023

Les infections ont été diagnostiquées majoritairement en pédiatrie (50/60 ; 83%) et plus particulièrement chez les enfants de moins de 3 mois (40/60, 66,7%). Ceci malgré l'utilisation croissante du test FilmArray®. Au total, 75 % des infections à HPeV ont été diagnostiquées à partir du LCS, la majorité des trouses étant validées sur cette matrice. La recherche des HPeV dans des échantillons de selles ou respiratoires a permis le diagnostic de l'infection pour 15 enfants supplémentaires.

Les signes cliniques étaient disponibles pour 73,5 % (38/57) des dossiers pédiatriques. Hormis dans un dossier d'encéphalite auto-immune, l'imputabilité du HPeV a été jugée probable (détection dans le LCS ou le sang) ou possible (détection dans les selles et/ou des échantillons respiratoires). Les tableaux fébriles du nourrisson étaient les plus fréquents associés ou non à des signes neurologiques dominés par une irritabilité. Les enfants dont l'infection avait été diagnostiquée à partir d'un prélèvement périphérique présentaient plus de signes digestifs et moins de signes neurologiques que les enfants dont l'infection avait été diagnostiquée à partir du LCS ou du sang (Tableau 35). Deux enfants de 1 mois et 2 mois ont présenté des tableaux de sepsis sévère ou choc cardio-vasculaire avec détection du HPeV dans le LCS (n=1 ; HPeV-3 chez un enfant) ou les selles (n=1 ; LCS non prélevé ; HPeV non typé).

Tableau 32. Signes cliniques associés aux infections pédiatriques à parechovirus, 2023 (n=38)

Signes cliniques	Patients totaux, n=38 (%)	Patients avec diagnostic à partir du LCS ou sang, n=27 (%)	Patients avec diagnostic à partir d'autres échantillons n=11 (%)
Fièvre	32 (84,2%)	27 (100%)	5 (45,5%)
Signes neurologiques, dont	23 (60,5%)	21 (77,8%)	2 (18,2%)
<i>Irritabilité</i>	21 (55,3%)	20 (74,1%)	1 (9,1%)
<i>Méningite biologique</i>	3 (7,9%)	3 (11,1%)	0
<i>Hypotonie</i>	4 (10,5%)	3 (11,1%)	1 (9,1%)
Signes cardio-vasculaires	4 (10,5%)	3 (11,1%)	1 (9,1%)
<i>Choc cardiovasculaire/Sepsis sévère</i>	2 (5,3%)	1 (3,7%)	1 (9,1%)
Signes respiratoires	5 (13,1%)	4 (14,8%)	1 (9,1%)
<i>dont détresse respiratoire</i>	1 (2,6%)	0	1 (9,1%)
Signes cutané-muqueux	4 (10,5%)	3 (11,1%)	1 (9,1%)
Signes digestifs	11 (28,9%)	6 (22,2%)	5 (45,5%)

Point particulier sur les infections diagnostiquées chez l'adulte

En 2023, 10 infections à HPeV ont été détectées dans le LCS chez des adultes âgés de 28 à 72 ans présentant des tableaux neuro-méningés :

- Syndrome méningé (4 cas)
- Encéphalite (2 cas dont 1 associé à une infection à pneumocoque)
- Méningo-radiculite (1 cas)
- Hémiparésie associée à syndrome confusionnel, paralysie faciale et syndrome pyramidal droit (1 cas)
- Encéphalomyélite d'évolution progressive (1 cas)
- Choc septique sur pneumopathie d'inhalation probablement survenue au décours d'un état de mal épileptique (terrain connu) (1 cas).

Chez 7 patients, le typage s'est avéré impossible posant la question de la spécificité du FilmArray pour la détection du parechovirus ou de l'impact d'une très faible charge virale dans ces tableaux cliniques. Chez 3 de ces patients, la PCR Parechovirus-r gene® dans le LCS et dans un prélèvement respiratoire prélevé à la même date était négative, rendant l'implication d'un éventuel HPeV très peu probable.

Il serait à l'avenir recommandé de faire des prélèvements périphériques (nasopharyngé, selles) pour étayer l'imputabilité du HPeV dans les tableaux neurologiques de l'adulte.

Typage moléculaire

Le typage moléculaire a été réalisé pour 33/50 (66%) des dossiers pédiatriques déclarés (contre 61,5% en 2022) et a permis l'identification du HPeV pour 27/33 (81,8%) des dossiers analysés. Le HPeV-3 était prédominant (Figure 27).

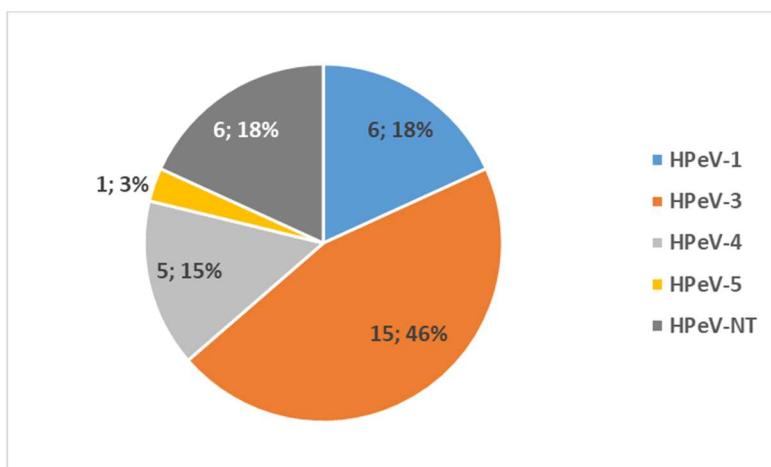


Figure 27. Distribution des génotypes de HPEV chez les cas pédiatriques en 2023 (n=33)

3.2.5. Surveillance des infections à EV, rhinovirus et parechovirus dans les DROM

En 2023, les laboratoires de microbiologie/biologie de 4 départements et territoires d'Outre-Mer ont contribué à la surveillance en transmettant des échantillons pour typage (Réunion, Polynésie et Nouvelle Calédonie au LA L, Guadeloupe au LC). En revanche, les données épidémiologiques globales (nombre et type d'échantillons testés pour la recherche d'EV, âge des patients au diagnostic) n'ont pas été recueillies.

La Réunion

Quarante-cinq LCS collectés entre Janvier et Décembre 2023 et détectés positifs en PCR EV aux CHU de St Denis et St Pierre ont été reçus pour typage. La médiane d'âge des patients était de 6,17 ans (5 jours ; 78 ans). Au total, 38/45 (84,4%) des échantillons ont pu être typés. L'E9 était majoritaire (N=20), le CVB3 était détecté dans 6 LCS et les autres types d'EV (E2, E6, E7, E11, E18, E21, EV-B73, CV-A6, CVB4,) étaient détectés dans 1 à 2 LCS seulement.

Un CVB4 a été identifié chez un bébé de 58 jours ancien prématuré hospitalisé pour malaise grave avec signes de choc septique et évolution vers un SDRA sévère. Une co-infection CVA6/RV-C43 a été mise en évidence chez un enfant de 3,5 ans hospitalisé pour GEA puis coma, convulsions sur hyponatrémie profonde et état de mort encéphalique.

Nouvelle Calédonie

Treize LCS collectés en 2023 ont été reçus pour typage. Au total, 12/13 (92,3%) LCS ont pu être typés. Sept infections à E9 ont été identifiées chez des patients âgés de 60 jours à 40 ans.

Polynésie

Vingt-deux échantillons de 16 dossiers collectés en 2023 ont été reçus pour typage. Au total, 19/22 échantillons et 15/16 dossiers ont pu être typés. L'E9 était majoritaire, identifié chez 6 patients dont un avec tableau de mort inexplicée du nourrisson et détection de l'E9 dans les selles. Un EV-71 c1 a été mis en évidence chez un enfant de 37 jours avec une détresse respiratoire et un E14 a été identifié chez un nouveau-né de 18 jours qui présentait une fièvre néonatale sévère.

Une analyse comparative des séquences d'E9 de France Métropolitaine et d'Outre-Mer sera réalisée dès que toutes les séquences seront disponibles.

Guadeloupe

Trois échantillons de LCS de 3 patients (7 jours, 4 ans et 33 ans), prélevés en mai et juin 2023, ont été analysés. Un E-18 a été identifié pour ces 3 patients.

Depuis 2024, un renforcement de la surveillance des infections à EV de certains territoires ultra-marins (Réunion, Polynésie, Nouvelle Calédonie, Mayotte, Guadeloupe et Martinique) a été mis en place avec envoi plus systématique des prélèvements positifs en EV pour typage et communication des données épidémiologiques globales pour la Réunion, la Polynésie, la Nouvelle Calédonie, Mayotte, la Guadeloupe et la Martinique. Par ailleurs, à partir de janvier 2024, un screening a été mis en place sur les selles d'enfants <5 ans de la Réunion avec un objectif d'environ 700 selles/an afin de renforcer la surveillance de la circulation des poliovirus. De la même façon, un criblage des selles d'enfants est mis en place à Mayotte, notamment en regard du risque d'importation de poliovirus.

3.3 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

3.3.1. Surveillance nationale

Echanges avec Santé publique France

Plusieurs échanges ont eu lieu en 2023, notamment avec Laura Zanetti qui est notre nouvelle interlocutrice à Santé publique France.

- **Partage de données** : Accès de Laura Zanetti au site web du CNR (données d'activité, données cliniques et virologiques)
- **Signalement le 27/01/2023 de cas néonataux sévères d'infection à E11** et mise à disposition d'une analyse des données épidémiologiques disponibles sur les infections néonatales pour la période 2016-2021 (nombre de cas, pourcentage formes sévères, % de décès, types d'EV associés)
- **Bulletin de rétro-information à destination des laboratoires du RSE et disponible sur le site de Santé publique France** : Ce bulletin, élaboré conjointement par le CNR et Santé publique France, permet à la fois de présenter des rappels épidémiologiques, cliniques et diagnostiques sur les infections à EV et de diffuser des informations actualisées. Suite à une réunion le 29/12/2023, il a été décidé d'un commun accord que 1/ un seul bulletin annuel serait maintenu avec un calendrier calqué sur celui du rapport du CNR, soit en avril/mai, à partir des données de l'année N-1, et 2/ un bilan supplémentaire en cas d'alerte spécifique ou de signal spécifique ou de focus sur un entéro ou sur la polio pourra être produit sur décision collégiale entre CNR/ Santé publique France.
- **Procédure en cas d'alerte devant un signal anormal** : en réponse à la dernière évaluation rendue par le Comité des CNR sur la gestion de l'alerte concernant les infections néonatales sévères à E11 en 2022-2023, une réunion a eu lieu le 28 mars 2024 entre les biologistes du CNR et leurs interlocuteurs de Santé publique France pour repréciser les attendus et la procédure à suivre pour remplir au mieux cette mission. **Cette procédure est présentée en Annexe 1 dans l'organisation du CNR.**

Réseau de surveillance des eaux usées

L'équipe EPIE (Jean-Luc Bailly) de l'UMR CNRS 6023 - LMGE a fait partie du réseau Obépine (Observatoire épidémiologique dans les eaux usées) et a mis en place la surveillance du coronavirus SARS-CoV-2 dans 8 stations d'épuration du Puy-de-Dôme à partir de 2020. Profitant de l'échantillonnage réalisé, le laboratoire a mis en place la surveillance des entérovirus depuis 2021. Une communication a été réalisée dans le cadre du Symposium européen ENPEN le 20/01/23 « Implementation of routine SARS-CoV-2 and enterovirus surveillance in wastewater ».

3.3.2. Surveillance internationale

ECDC

Les échanges avec l'ECDC se font par l'intermédiaire de Santé publique France suite à des alertes spécifiques (Early Warning and Response System), comme ce fut le cas début 2023 pour la recrudescence des infections néonatales sévères.

ENPEN

Depuis 2017, le CNR EV-PeV fait partie du réseau européen de surveillance des infections à EV non poliomyélitiques, ENPEN (*European Non Polio Network*). La participation aux études collaboratives proposées au niveau européen est discutée au coup par coup entre les membres du CNR et du réseau RSE. Il s'agit d'études clinico-virologiques (échanges de données agrégées) ou phylogénétiques (avec transfert de souches et/ou de séquences génomiques).

Groupe de travail sur les myélites flasques aiguës

Un groupe de travail sur les myélites flasques aiguës (AFM Working Group) a été créé en Amérique du Nord en septembre 2018 en réponse à l'émergence de la myélite flasque aiguë (MFA), entité clinico-radiologique proche de la poliomyélite, en lien avec les épidémies bisannuelles d'EV-D68 au cours desquelles une augmentation des MFA est observée. Dans le contexte d'une réflexion sur la mise en place d'une surveillance spécifique des MFA en France menée en concertation avec le Dr Aubart (neuropédiatre à l'Hôpital Necker), Isabelle Schuffenecker et Audrey Mirand participent régulièrement aux réunions périodiques de l'AFM working group.

Centre collaborateur Polio de l'OMS

Le laboratoire de Virologie de Lyon, en tant que Centre Collaborateur Polio de l'OMS, transmet depuis novembre 2019 les données agrégées et anonymisées de la surveillance des infections à EV (type et date échantillons testés, résultats typage, origine géographique des échantillons) sur un mode hebdomadaire au bureau Européen de l'OMS.

Réseau mondial des laboratoires polio coordonnés par l'OMS

Le LA IP est l'un des 7 laboratoires experts du Réseau mondial des laboratoires polio coordonnés par l'OMS. A ce titre, il a reçu en 2023 176 spécimens de poliovirus adressés par le laboratoire polio d'Algérie et 67 adressés par le laboratoire polio de République Centrafricaine pour caractérisation génétique. Les résultats ont été transmis aux autorités locales respectives et à l'OMS selon le schéma du Réseau mondial des laboratoires polio.

Maël Bessaud est membre du groupe de travail de l'OMS (Ad-hoc Small Working Group) chargé de définir la politique de détection et de caractérisation des poliovirus par les laboratoires du Réseau mondial des laboratoires polio. Il a participé à l'ensemble des réunions de ce groupe (une quinzaine par an).

3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

3.4.1 Détection d'un rhinovirus dans un LCS prélevé dans un contexte de mort subite du nourrisson (MSN)

Le LA L a été sollicité en juin 2023 pour le typage d'échantillons cliniques (LCS, nasopharyngé, selles) chez un enfant décédé à 20 jours au décours d'un tableau de rhinite. Le séquençage a mis en évidence un rhinovirus A10 dans les 3 échantillons cliniques. Les signes d'alvéolite découverts à l'autopsie suggéraient la possibilité d'une réponse immune en contexte infectieux ayant conduit à l'altération des cellules épithéliales. Il existait des facteurs de risque associés : jeune âge maternel et exposition au tabac. La description de ce premier cas de MSN avec détection de rhinovirus dans le LCS vient d'être acceptée dans la revue *Viruses*.

3.4.2 Suivi de l'immunité anti-polio chez les salariés exposés aux poliovirus (Tableau 33)

Dans le cadre de l'éradication de la poliomyélite, un plan d'action mondial (GAP III puis GAP IV) a été élaboré par l'OMS, visant à réduire au maximum le risque d'exposition aux poliovirus neuro-virulents notamment dans les établissements détenant ou produisant des quantités importantes de virus (laboratoires producteurs de vaccins, laboratoires de recherche). Pour les personnels risquant d'être exposés, il est recommandé de vérifier que les titres en anticorps anti-poliovirus sont protecteurs. Depuis janvier 2019, le LA L assure le suivi de l'immunité post-vaccinale des salariés du groupe SANOFI impliqués dans la production de vaccins polio (sites de Marcy l'Etoile et de Val de Reuil, France). Depuis octobre 2022, il assure également le suivi d'une partie des personnels du site de production de vaccin polio du groupe GSK (site de Rickensart, Belgique). Enfin, il contrôle les sérologies des personnels techniques et d'entretien en lien avec l'activité polio du site lyonnais du CNR EV ainsi que les sérologies des personnels du LA IP.

Tableau 33 - Bilan des sérologies polio réalisées de 2019 à 2023 dans le cadre des plans GAPIII et IV

	SANOFI	GSK	LA IP	LA LYON/IAI
2019	776		5	18
2020	739	55	1	1
2021	848		0	4
2022	729	48	0	18
2023	648	248	7	8

IAI : Institut des Agents Infectieux

3.4.3 Suivi de l'immunité anti-polio au CHU de Lyon

Comme les années précédentes, des sérologies poliovirus ont été réalisées principalement chez des patients hospitalisés en pédiatrie générale. L'immunité anti-poliovirus a également été investiguée chez des patients hospitalisés à l'Institut d'Hématologie et Oncologie Pédiatrique, dans le cadre de bilans de déficits immunitaires ou pour le suivi de la reprise d'immunité après greffe de moelle osseuse. Au total, 300 sérologies ont été réalisées en 2023.

Sur 193 patients pédiatriques (âge médian : 8,8 ans) non hospitalisés en hématologie, 22 patients présentaient un taux d'anticorps inférieur ou égal au seuil protecteur vis-à-vis des poliovirus 1 et 3. Pour ces enfants, le rappel a été conseillé.

3.4.4 Suivi de l'immunité anti-polio hors CHU de Lyon

Vingt-huit sérologies ont été réalisées pour d'autres CHU (Bourgoin : 1 ; Chambéry : 5 ; Strasbourg : 1 ; Toulouse : 3 ; Valence : 18) dans des contextes cliniques similaires à ceux précisés en 3.2.3.

3.4.5 Séquençage du génome complet de tout isolat issu de la nouvelle souche vaccinale de poliovirus

Dans le cadre du déploiement du nouveau vaccin polio oral de type 2 (nOPV2) sous protocole EUL (Emergency Use List), l'évolution de la nouvelle souche vaccinale devait être suivie grâce au séquençage de tout isolat quelle qu'en soit l'origine (selle humaine ou échantillon environnemental). En 2023, le LAIP a ainsi réalisé le séquençage de 110 génomes complets provenant de trois pays (Figure 28).

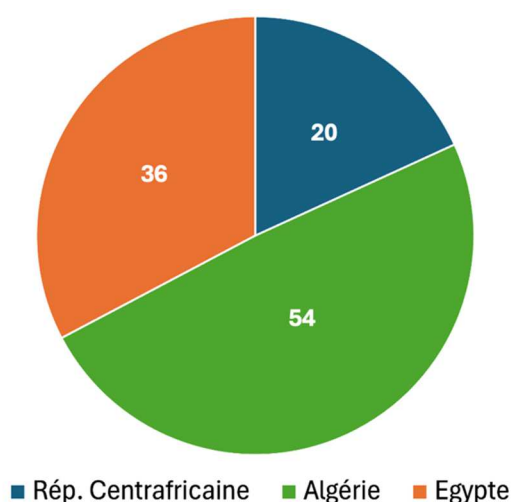


Figure 28. Nombre de génomes de nOPV2 séquencés par pays d'isolement

Le LAIP a ainsi été le premier laboratoire à identifier des isolats de nOPV2 dont tous les déterminants de l'atténuation avaient réverté par recombinaison.

4. Alertes

4.1 Infections néonatales précoces sévères à E11

Description des évènements et modalités d'alerte à Santé publique France

- 20/01/2023 : Nous avons été alertés par le Dr Marianne Leruez (AP-HP Necker) à propos de 5 cas d'infections néonatales sévères (décès) à E11 survenus en région parisienne entre le 27 octobre 2022 et le 12 janvier 2023.
- 27/01/2023 : Après avoir établi un état des lieux et analysé les données collectées en 2016-2021 et 2022, le CNR a relayé l'information auprès des biologistes du réseau de surveillance des entérovirus afin de consolider ces données préliminaires et de statuer sur la nécessité d'une éventuelle alerte nationale en lien avec Santé publique France.
- 03/02/2023 : Mail envoyé à Santé publique France pour l'informer de l'investigation du signal en cours. Ce mail n'a donné lieu à aucun retour.
- 07/04/2023 : Mail de l'Agence suite à une alerte européenne sur myocardites néonatales à entérovirus au Royaume-Uni dans lequel il était indiqué « la possibilité d'ouvrir une fiche alerte - nationale d'abord puis européenne ensuite- en lien avec l'augmentation des infections sévères à E11 », ce qui indique la prise en compte du signal en cours.
- 13/04/2023 : Décision conjointe avec les cliniciens de lancer une alerte à Santé publique France.
- 26/04/2023 : Envoi à Santé publique France, par le CNR, de la fiche d'alerte rédigée à destination des différents réseaux et sociétés savantes impliqués dans la prise en charge des nouveau-nés, et ce, avant sa diffusion. Ce message a été pris en compte le même jour par Laura Zanetti qui indiquait en prendre note et rédiger une fiche d'alerte au niveau national et en EWRS
- 24/05/2023 : Réunion organisée par Santé publique France, avec les pédiatres de Néonatalogie de Necker et le CNR, au cours de laquelle les pédiatres ont bien souligné sur le caractère inhabituel des formes néonatales sévères rapportées ; le CNR a présenté le RSE et le travail réalisé sur le séquençage des souches d'E11 liées à ces infections néonatales (séquences génomiques (génomome entier) des cas rapportés déposées dans GenBank et publiées en accès libre). Prévision d'une mise à jour de l'EWRS, et publication d'une Rapid Communication dans EuroSurveillance.

Sollicitations via Santé publique France

- Demande de Santé publique France pour l'ECDC d'uploader dans EpiPulse une séquence d'E11 issue d'une infection néonatale sévère
- Participation au groupe de travail sur les Infections Néonatales Sévères (n=3)
- Participation à des réunions de travail avec SPF et la DGS (=3)
- Participation à une réunion avec l'ECDC et l'OMS (n=1)
- Participation à la rédaction et relecture de documents de synthèse à destination des pouvoirs publics nationaux et internationaux (n=3)

Apport du CNR

- Consolidation du signal sur les infections néonatales (nombre, EV identifiés, sévérité) par analyse des données du CNR sur la période concernée, en comparaison de la période 2016-2021
- Séquençage de 44 génomes complets d'E11 (années 2022-2023 et années précédentes), démontrant que l'E11 responsable des cas sévères observés est un virus recombinant multiple ayant émergé en 2022. Dépôt des séquences en accès libre sur GenBank
- Publication dans Eurosurveillance le 01/06/23 des 1ers cas (survenus entre juillet 2022 et avril 2023).

4.2. Alerte Polio

4.2.1 Caractérisation de poliovirus chez un patient immunodéficient en 2023

En juin 2023, un VDPV3 a été détecté fortuitement chez un nourrisson de 15 mois présentant une encéphalopathie sévère, sans paralysie. L'enfant, avait reçu 4 doses de VPO selon le schéma en vigueur de son pays d'origine. Un déficit immunitaire combiné sévère a été diagnostiqué en juillet 2023 au cours de son hospitalisation et les analyses moléculaires approfondies ont montré qu'il excrétaient chroniquement un mélange complexe de plusieurs souches de VDPV3.

Le 28 juin 2023, le LA L a reçu du CHU de Toulouse un prélèvement de gorge et un prélèvement de selles pour confirmation de la présence de poliovirus (détecté par typage moléculaire sur ARN extrait de selles par le LC) et sous-typage. Un isolement de poliovirus par culture sur cellules RD et L20B a été obtenu les 3 et 4 juillet. Les PCR de typage ITD/VDPV ont été réalisées le 5 juillet selon les recommandations de l'OMS, en faveur de la présence d'une souche de VDPV3 dans les selles. Le séquençage de la VP1 complète réalisé sur Minion a montré la co-existence de 2 populations différentes de VDPV3 dans les échantillons de gorge et selles (>10 mutations) sur chaque population. Dès la confirmation de la détection d'un VDPV3, l'importance des mesures barrière a été rappelée au service de neuropédiatrie prenant en charge le patient.

Six surnageants de cultures issus de l'inoculation des deux échantillons cliniques (selles et écouvillonnage nasopharyngé) ont en parallèle été envoyés au LA IP pour caractérisation approfondie des souches. Les surnageants ont été reçus par le LA IP le 7 juillet. Le séquençage de la région VP1 des six échantillons confirmait la présence d'un mélange de plusieurs séquences génétiques proches. Le clonage a permis d'individualiser 4 séquences, 2 pour la gorge et 2 pour les selles (Figure 29). L'Agence Santé publique France a été prévenue le 13 juillet.

La confirmation de l'immunodéficiences du patient a permis de classer les virus dans la catégorie des iVDPV. Ces résultats ont été transmis à Santé publique France et à l'OMS le 18 juillet.

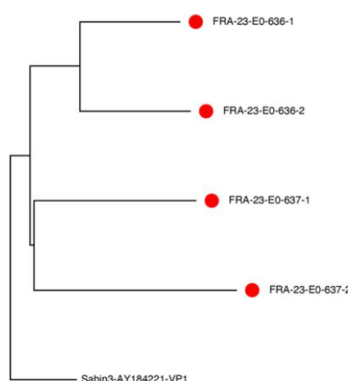


Figure 29. Relations phylogénétiques entre les séquences VP1 trouvées chez le patient et la souche vaccinale Sabin 3.

Le séquençage du génome complet réalisé par la technique Illumina montrait une réversion au niveau des déterminants génétiques de l'atténuation suggérant une réversion phénotypique extrêmement probable. Cette information a été transmise aux autorités compétentes afin de déterminer les mesures de confinement qui s'imposaient.

Le 19 juillet, 9 prélèvements additionnels du patient réalisés entre mai et juillet ont été envoyés au LA L et tous sauf un ont montré la présence du poliovirus. Une évaluation du risque a été réalisée par l'ARS conjointement avec l'équipe médicale du patient, les 2 LA du CNR, Santé publique France, l'ANSES. Une vérification du statut vaccinal du personnel soignant et des membres de la famille en contact avec l'enfant a été effectuée et un rappel a été fait si nécessaire. Des prélèvements de selles (tous négatifs) ont été réalisés chez les membres de la famille en contact avec l'enfant afin de vérifier l'absence de transmission à l'entourage. Le patient était en chambre seul depuis le début de son hospitalisation. Devant la mise en évidence d'une excréation chronique de VDPV3, outre les mesures barrière (port de masque, de gants, mesures complémentaires contact) déjà en place pour le personnel soignant et l'entourage familial, l'élimination des couches en DASRI a été organisée.

Surveillance environnementale autour du patient

Suite à l'identification du patient excrétaient de façon chronique des iVDPV de type 3, une surveillance a été mise en

place dans les eaux usées à Toulouse, ciblant un collecteur recevant les eaux usées du bâtiment hébergeant le patient et des stations de traitement de Toulouse.

Les prélèvements étaient d'abord adressés au Laboratoire d'hydrologie de l'ANSES à Nancy qui réalisait un criblage moléculaire pour détecter des entérovirus. Ce laboratoire ne disposant des autorisations MOT polio, les échantillons positifs étaient alors adressés au LA IP pour une recherche spécifique de poliovirus. Au total, 28 échantillons ont été reçus par le LA IP ; aucun poliovirus n'a été détecté. Il faut toutefois noter que l'algorithme utilisé n'était pas celui recommandé par l'OMS (qui implique une étape de criblage en cultures cellulaires) et que sa sensibilité n'est pas connue.

4.2.2 Surveillance environnementale à Mayotte (septembre-décembre 2023)

Dans un contexte de sécheresse importante entraînant un accès limité à l'eau potable à Mayotte, une collecte d'eaux usées a été mise en place au niveau des deux stations de traitement des eaux usées de l'île (Mamoudzou et Dembèni). Au total, 25 échantillons ont été collectés en 2023. Les échantillons reçus ont été concentrés par tamisage moléculaire et utilisés pour la recherche spécifique de poliovirus mais aussi pour la caractérisation des entérovirus non-polio circulant dans l'île.

Recherche de poliovirus

Les concentrats d'eaux usées ont été utilisés pour inoculer deux lignées cellulaires (RD et L20B) selon l'algorithme standard de l'OMS. En 2023, un seul poliovirus a été détecté (prélèvement du 11 décembre 2023 à Mamoudzou). Il s'agissait de la souche utilisée dans le nouveau vaccin oral (nOPV2) qui présentait peu de mutations et aucun signe de réversion phénotypique. Il est à noter que la majorité des échantillons (15/25) ont produit un effet cytopathogène sur les cellules L20B, un résultat évocateur de la présence de poliovirus. Pourtant, seul **un échantillon contenait du poliovirus**. Le séquençage des virus présents dans les autres surnageants de L20B positifs a révélé la présence d'un autre virus, le **cardiovirus A** (Famille *Picornaviridae*, genre *Cardiovirus*), un virus avec un large spectre d'hôte et capable d'infecter les cellules de souris (comme les L20B). Au total, 25 génomes de cardiovirus A ont été identifiés par séquençage de leur région VP1 ; 6 d'entre eux ont été entièrement séquencés.

Caractérisation des entérovirus non-polio

Les entérovirus non-polio présents dans les échantillons ont été caractérisés selon deux méthodologies :

- 1- L'amplification des génomes d'entérovirus présents dans les surnageants de cultures cellulaires ;
- 2- L'amplification des génomes d'entérovirus présents dans les concentrats d'eaux usées.

Plus de 200 spécimens d'entérovirus ont été détectés à ce jour. La quasi-totalité appartient aux espèces EV-B et EV-C (Figure 30) ; seuls quelques spécimens appartiennent à l'espèce EV-A (types CVA2, CVA6, CVA8). La prédominance des EV-B s'explique par l'utilisation des cellules RD qui amplifient préférentiellement ces virus. Les séquences d'EV-C sont d'ailleurs majoritairement trouvées après amplification directe depuis les concentrats, sans passage par l'étape de culture cellulaire.

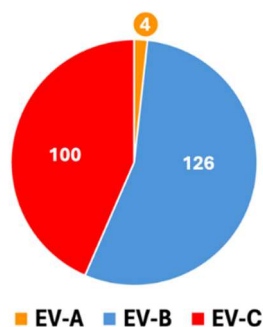


Figure 30. Répartition des entérovirus non-polio identifiés dans les eaux usées de Mayotte (données préliminaires)

L'analyse détaillée des types viraux et lignages ainsi détectés est encore en cours car les résultats de 2023 doivent être agrégés avec ceux obtenus en 2024, la surveillance s'étant poursuivie durant quelques semaines en janvier et février 2024.

5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

5.1.1 Conseils par mail et appels téléphoniques

Le LC et le LA L sont régulièrement sollicités par téléphone ou e-mail pour des activités de conseil ou d'expertise. Les demandes d'information spécifiques aux poliovirus ou à des suspicions de poliomyélite ou syndrome post-polio sont traitées spécifiquement par le LA L. Les demandes de conseil ou d'expertise portent principalement sur :

- Information sur le type de prélèvements à réaliser et les techniques recommandées pour le diagnostic et le typage moléculaire des infections à EV (médecins ou biologistes de CHU, CHR ou laboratoires privés ; médecins inspecteurs de DDASS)
- Evaluation des trousse diagnostiques
- Information sur les modalités d'envoi d'échantillons pour expertise
- Aide à l'interprétation des résultats de diagnostic et de typage dans les infections à EV et HPEV
- Conseils pour la mise en place du diagnostic des parechovirus (algorithme diagnostique, prélèvements à analyser et techniques recommandées, transmission d'échantillons contrôle positifs).
- Information sur les conditions d'intégration au RSE et transmission des documents afférents (fiches pour la transmission mensuelle des données de surveillance)
- Analyse d'observations cliniques et conseils sur les observations d'infections sévères
- Conseils aux cliniciens sur les modalités diagnostiques de tableaux cliniques sévères, sur le risque de transmission materno-fœtale.

5.1.2 Site web du CNR

A travers les différents onglets accessibles à tout public sans identification préalable, le site web du CNR EV-PeV permet :

- la communication d'alertes
- la diffusion des données épidémiologiques nationales de surveillance (bulletins d'information et rapports d'activité annuels)
- la diffusion des méthodes de génotypage des EV et HPeV
- la diffusion des bulletins épidémiologiques émis par l'OMS sur la circulation des poliovirus.

Sur la page d'accueil sont également visibles un compteur et un graphique indiquant le nombre de méningites diagnostiquées par l'ensemble des laboratoires du RSE du 1er janvier de l'année en cours à la date du jour. En cliquant sur les villes indiquées sur la carte, il est également possible de connaître le nombre de méningites à EV diagnostiquées dans chaque laboratoire participant à la surveillance.

Une attention particulière sera portée sur l'actualisation du site.

5.1.3 Bulletins épidémiologiques

CHU Clermont-Ferrand

Depuis 2015, le laboratoire transmet à la communauté médicale du CHU un bulletin hebdomadaire recensant le nombre d'infections virales à potentiel épidémique diagnostiquées au CHU.

Depuis 2013, le laboratoire transmet à l'ARS Auvergne un relevé épidémiologique hebdomadaire des maladies à potentiel épidémique dont les méningites à EV.

CHU Lyon

Depuis 2011, un bulletin hebdomadaire donnant la distribution des virus détectés par PCR dans les prélèvements respiratoires (notamment rhinovirus) est adressé aux cliniciens des HCL concernés par la prise en charge des patients (Dr Casalegno). Ponctuellement, des informations relatives à la circulation des EV-D68 sont communiquées.

5.1.4 Formations

✓ Le LA IP a reçu plusieurs collègues étrangers pour les former à différentes techniques de surveillance et de caractérisation des entérovirus.

- Dr Issifi KOLLO ABDULKADRI du laboratoire polio du CERMES, Niamey, Niger. Séjour de 2 mois pour se former à l'isolement des entérovirus en cultures cellulaires et au typage moléculaire.

- Dr Marie-Claire Endegue-Zanga du laboratoire polio du Centre Pasteur du Cameroun, Yaoundé. Séjour d'un mois pour se former à l'analyse phylogénétique des entérovirus non-polio.

✓ Organisation d'une formation à la demande du bureau AFRO de l'OMS (Brazzaville). Formation internationale en bio-informatique pour l'interprétation des données de séquençage du poliovirus assurée par deux membres du LA IP (Marie-Line Joffret et Maël Bessaud) au profit de membres de laboratoires du réseau polio de l'OMS venant de sept pays africains. Formation hébergée par l'Institut Pasteur d'Algérie, Alger, du 19 au 23 novembre 2023.

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

Surveillance polio

- Maël Bessaud (LA IP) et Isabelle Schuffenecker (LA L) sont membres de la Commission Nationale de Certification de l'Élimination de la Poliomyélite et à ce titre participent aux réunions organisées par la Commission et la DGS autour des problématiques d'éradication et de certification des labos polio

- Préparation par le LA L d'une synthèse des données de la surveillance des infections à EV pour le rapport annuel national des activités contribuant à l'éradication de la poliomyélite transmis par la DGS à l'OMS (transmis en juin 2023 pour l'année 2022).

- Participation du LA L et du LA IP à des réunions avec les autorités sanitaires (ARS, Santé Publique France) pour définir les analyses complémentaires à prévoir dans l'entourage familial et médical du patient excréteur chronique de VDPV3 ainsi que les mesures de prévention du risque de transmission

- Dans le contexte de crise d'approvisionnement en eau potable de Mayotte, participation des LA à la rédaction d'une fiche WIKI pour définir les prélèvements à réaliser pour la recherche de PV et le diagnostic étiologique différentiel en cas de suspicion de PFA.

- Le LA IP a participé à plusieurs réunions organisées par la DGS afin de concevoir et de déployer une surveillance environnementale d'urgence à Mayotte dans un contexte de grave sécheresse entraînant des difficultés d'accès à l'eau potable. Ces réunions ont permis la mise en place d'une surveillance ciblant plusieurs pathogènes transmis par l'eau dont les poliovirus.

- Octobre 2023 : Le CNR a été contacté par Santé publique France à la suite de l'annonce par l'Institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire (Sophia Antipolis) de la détection dans les eaux usées de Nice de séquences génétiques de poliovirus. Après transmission des données de séquençage par le laboratoire en question, le CNR a infirmé la présence de poliovirus car les séquences obtenues étaient des séquences d'entérovirus non polio.

5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)

- Réponse à des journalistes au sujet du programme d'éradication de la polio

<https://factuel.afp.com/doc.afp.com.338D8W4>

https://www.lemonde.fr/planete/article/2023/10/18/poliomyelite-les-derniers-defis-avant-une-eradication-complete_6195091_3244.html

<https://www.rfi.fr/fr/podcasts/le-conseil-santé/20230203-où-la-poliomyélite-est-elle-présente-dans-le-monde-aujourd-hui>

- Participation à une émission consacrée à la polio sur RFI

<https://www.rfi.fr/fr/podcasts/priorité-santé/20221024-journée-mondiale-de-lutte-contre-la-poliomyélite>

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

6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

6.1.1 Travaux de recherche communs au LC et LA Lyon

- Description clinique et investigations virologiques des cas d'infections néonatales graves associées à l'émergence et la circulation d'un nouveau variant de l'E11 en 2022-2023

Objectifs : Description détaillée des caractéristiques cliniques des cas graves et de la prise en charge thérapeutique et caractérisation viro-épidémiologique du nouveau variant d'E11 associé

Apport du CNR : préparation de données épidémiologiques globales sur les infections néonatales pour la période 2016-2023 (nombre de cas, mortalité, types associés aux cas sévères), séquençage de souches d'E11 issues de la surveillance globale des infections à EV et représentatives de l'épidémie de 2022-2023 (dont celles des cas sévères et leurs mères) et de la période 2016-2021 (au total, 79 séquences génomiques partielles et 37 séquences complètes déposées dans GenBank), participation à la conception, à l'écriture et la relecture du manuscrit

Résultats épidémiologique-virologiques :

- Tous les cas graves avec défaillance hépatique étaient causés par le même variant d'E11, détecté en France Métropolitaine depuis Avril 2022 ; l'analyse génomique révèle une origine multi-recombinante (pas de séquences parentales retrouvées dans les banques de séquences internationales et du CNR).
- Ce variant était la souche majoritairement détectée dans les infections néonatales et non-néonatales sévères et non sévères
- La mortalité observée sur la période était supérieure (1,7%) à celle observée sur la période 2016-2021 (0,4%)
- L'E11 était le type prédominant chez les nouveau-nés au cours de la période étudiée (31,1% des types d'EV identifiés)

Etat d'avancement : résultats publiés en Juin 2023 dans Eurosurveillance (doi: 0.2807/1560-7917.ES.2023.28.22.2300253).

Résumé : We report nine severe neonatal infections caused by a new variant of echovirus 11. All were male, eight were twins. At illness onset, they were 3-5 days-old and had severe sepsis and liver failure. This new variant, detected in France since April 2022, is still circulating and has caused more fatal neonatal enterovirus infections in 2022 and 2023 (8/496; 1.6%, seven associated with echovirus 11) compared with 2016 to 2021 (7/1,774; 0.4%). National and international alerts are warranted.

Messages clefs :

- Possibilité de défaillance hépatique grave chez les nouveau-nés dans le cadre de transmission materno-foetale de l'E11 en per-partum
- Rôle non élucidé de la gémellité dans la survenue de ces cas graves (susceptibilité génétique particulière aux infections à E11 en cours d'investigation dans l'équipe de JL Casanova)
- Penser au diagnostic d'infection à EV devant tout tableau néonatal de sepsis sévère, de choc cardio-vasculaire, de myocardite et d'insuffisance hépatocellulaire, en particulier en cas de signes infectieux chez la mère en pré- ou per-partum

- Epidémiologie clinique et moléculaire de la résurgence des infections à entérovirus D68 en Europe, 2021 – 2022 – Etude ENPEN

Type d'étude : Observationnelle, multicentrique, rétrospective

Objectifs : Décrire les cas cliniques d'infections consécutifs à la réémergence de l'EV-D68 pendant l'épidémie de COVID-19 et l'évolution moléculaire du virus pendant la période automnale/hivernale 2021 – 2022

Apport du CNR : Préparation de données épidémiologiques globales (nb de prélèvements analysés et positifs en PCR EV, PCR EV/RV et /RV et en PCR EV-D68), séquençage des 116 génomes (complets et partiels) dans les échantillons cliniques collectés au cours de la surveillance en France (10 centres), participation à la relecture du manuscrit.

Etat d'avancement : résultats publiés dans « *Journal of Infectious Diseases* ».

Résumé : L'étude des infections à EV-D681 en Europe est réalisée dans le cadre du réseau ENPEN. 58 laboratoires de 19 pays ont participé à l'étude ; le CNR est laboratoire participant. 1004 échantillons positifs pour l'EV-D68 ont été analysés et les données cliniques étaient disponibles pour 969 cas. 37,9% des cas ont été rapportés à l'hôpital. Les manifestations cliniques les plus fréquentes étaient : une détresse respiratoire aiguë (93,1%) et la fièvre (49,4%). Une atteinte neurologique a été rapportée dans 6,4 % des cas, parmi lesquels 6 ont présenté une myélite flasque aiguë. Une analyse phylogénétique réalisée avec 694 séquences montre que deux nouveaux lignages ont émergé et présentent une distribution géographique étendue.

Messages clés : Persistance du potentiel neurotrope de l'EV-D68 (6/669 cas d'AFM) et persistance du clade B3 en post-COVID avec émergence de 2 nouveaux lignages.

6.1.2 Travaux de recherche communs au LC et LA Institut Pasteur

- Etude d'évaluation de la séroneutralisation des entérovirus – Etude ENPEN

Type d'étude : Expérimentale, multicentrique

Objectifs : Décrire et harmoniser les pratiques de séroneutralisation des entérovirus

Apport du CNR : souches issues de prélèvements cliniques

Etat d'avancement : résultats soumis pour publication, manuscrit en révision

Résumé : Le laboratoire du CNR a participé à une étude collaborative pour homogénéiser et optimiser les méthodes de séroneutralisation au sein de laboratoires du réseau ENPEN. Une première phase visant à évaluer les méthodes utilisées dans chaque laboratoire a été réalisée et a mis en évidence une grande hétérogénéité. Une seconde phase a été effectuée en restreignant l'évaluation à une lignée cellulaire (RD fournie par le laboratoire investigateur principal) et à un virus donné (souche echovirus 30). Les résultats ont été soumis pour publication (*Journal of General Virology*, Manuscript number: JGV-D-24-00060 ; soumission 16/02/2024 ; en cours de révision 16/03/2024).

Manuscrit : Assessment of twelve echovirus virus-neutralisation assays in Europe: recommendations for harmonisation of non-polio enterovirus sero-surveillance studies. Karen Couderé; Kimberley S.M. Benschop; Gerrit Koen; Hetty van Eijk; Heli Harvala; **Jean-Luc Bailly**; **Maël Bessaud**; Evelyn Kamau; Isabelle Simon; **Marie-Line Joffret**; Lubomira Nikolaeva-Glomb; Irina Georgieva; Asya Stoyanova; Sabine Diedrich; Sindy Böttcher; Maria Cabrerizo; Irena Tabain; Željka Hruškar; Vladimir Stevanović; Petri Susi; Eero Hietanen; Paula Palminha; Petra Rainetová; Anda Baicus; Maartje Kristensen; Dasja Pajkrt; Jean-Luc Murk; Katja C. Wolthers.

6.1.3 Laboratoire de Clermont-Ferrand

- Epidémiologie des infections à entérovirus A71 en Europe

Type d'étude : Observationnelle, Multicentrique, Rétrospective

Objectifs : Décrire les cas cliniques d'infections à EV-A71 dans les pays participant à l'étude et l'évolution moléculaire du virus, Europe, 2016 – 2022

Apport du CNR : Séquençage NGS du génome complet dans les échantillons cliniques collectés au cours de la surveillance hospitalière et ambulatoire en France et les laboratoires participant qui ne disposent pas de la technique de séquençage

Etat d'avancement : en cours ; cette étude est réalisée dans le cadre de la thèse de doctorat de Bélélé Siméon Bakyono, début sept. 2023 ; direction J-L Bailly, co-encadrant M Bisseux).

Résumé : L'étude des infections à EV-A71 en Europe est réalisée dans le cadre du réseau ENPEN (le CNR est investigateur principal). Les 16 laboratoires participant à l'étude sont répartis dans 13 pays. Des conventions de recherche ont été établies avec tous les participants. Les cas rapportés sont en cours d'analyse. Les séquences génomiques issues du génotypage seront analysées et les génomes complets sont en cours d'obtention.

- Surveillance environnementale dans les eaux usées

Depuis 2020, l'équipe EPIE (Jean-Luc Bailly) de l'UMR CNRS 6023 - LMGE associée au LC fait partie du réseau Obépine (Observatoire épidémiologique dans les eaux usées). Depuis 2021, la surveillance des EV est réalisée dans les échantillons collectés initialement pour la surveillance du SARS-CoV-2. Dans ce contexte, plusieurs travaux destinés à l'amélioration et la standardisation de la détection et du génotypage des EV dans les eaux usées ont été réalisés.

Objectif 1 : Développement d'une approche semi-ciblée de séquençage NGS pour déterminer la diversité des entérovirus présents dans les eaux usées : technique de capture par sondes « Illumina RNA Prep with Enrichment Tagmentation ».

Apport du CNR : séquençage NGS / analyse des génomes viraux

Etat d'avancement : Avec cette technique, 29 échantillons d'eaux usées et 3 contrôles (négatif, positif à EV-A71, positif avec un mélange contenant un EV-A71, un EV-B, un EV-C99 et un EV-D68) ont été analysés. Les séquences obtenues ont été analysées par deux approches :

1. Analyse avec le logiciel « Dragen microbial enrichment »

Nous avons retrouvé dans les échantillons d'eaux usées quelques virus humains, pour lesquels des portions de génomes ont été reconstruites : astrovirus, polyomavirus. Les autres virus détectés sont les adénovirus, entérovirus, SARS-CoV-2, rotavirus et norovirus (séquences très partielles, voire non discriminantes pour certains). Pour le contrôle positif EV-A71, seul un fragment de génome de 2% a été reconstruit dans un échantillon. Pour le contrôle contenant 4 types différents, l'identification a été correcte pour 2 des 4 types. La base de données du logiciel ne permet pas la discrimination des types d'EV.

2. Identification des séquences par analyse contre la base de données du laboratoire

Nous avons analysé les données contre la base de données « entérovirus » du laboratoire. Les résultats montrent que les séquences attribuées aux EV représentent une très faible proportion des séquences totales (au mieux 6 séquences parmi plusieurs dizaines de milliers par échantillon). Concernant les contrôles positifs, nous avons détecté les entérovirus des espèces A et D, pas ceux des espèces B et C.

3. Conclusion

La technique de capture fonctionne bien sur les virus abondants (astrovirus) et les virus dont la diversité est modérée (adénovirus). La diversité totale des entérovirus (>100 types) n'a pas été prise en compte dans son intégralité dans la conception des sondes. De plus, l'analyse n'est pas en mesure de produire une discrimination fiable car l'identification virale se fait sur une partie de génome impactée par la recombinaison inter-typique.

Objectif 2 : Développement d'une approche ciblée de séquençage NGS pour déterminer la diversité des entérovirus présents dans les eaux usées

Apport du CNR : séquençage NGS / analyse des génomes viraux

Etat d'avancement :

1. Amplification du génome complet des EV de l'espèce C

Antérieurement (2014-2015), nous avons mis au point une méthode permettant d'obtenir le génome complet des EV de l'espèce C à partir d'échantillons d'eaux usées avec un taux de réussite proche de 60%. Nous avons testé cette méthode sur

20 échantillons d'eaux usées traités avec une nouvelle technique de concentration. Même en sélectionnant des échantillons à forte charge virale, l'approche n'a pas été poursuivie à cause du faible taux de réussite (10%). Cet essai souligne l'importance de l'étape de concentration des eaux usées.

2. Amplification ciblée du génome partiel des entérovirus (espèces A et D)

Nous avons analysé 11 échantillons d'eaux usées provenant de différentes stations d'épuration du Puy-de-Dôme à l'aide de deux techniques d'amplification des génomes partiels : l'une ciblant les EV A et l'autre, les EV D. Les 2 techniques ont été validées au préalable sur les virus en culture. Au total, une amplification a été obtenue pour 21/22 (95%) échantillons. Les séquences obtenues ont été analysées à l'aide de 3 pipelines différents : 1/ Par analyse métagénomique (Dragen), les résultats ont montré que les données contenaient 1 à 40% de séquences d'EV par échantillon, environ 60% de séquences non identifiables et très peu de séquences d'origine bactérienne. L'assignation des EV n'était pas satisfaisante ; 2/ Par analyse BLAST à partir de la base de données du laboratoire, 10 types d'EV ont été détectés, appartenant à l'espèce A (n=4), mais aussi l'espèce B (n=3) et l'espèce C (n=3), grâce à l'amplification ciblant les EV-A. Aucun EV-D n'a été détecté avec aucune des 2 techniques. La comparaison avec les types circulant localement a montré une très bonne corrélation entre EV détectés dans les eaux usées et ceux détectés par la surveillance hospitalière. Jusqu'à 3 types d'EV différents en mélange ont pu être détectés dans un même échantillon ; 3/ Par reconstruction de demi-génomomes viraux et en les comparant à notre base de données, 11 types d'EV ont été identifiés : espèce A (n=4), espèce B (n=3) et espèce C (n=4), grâce à l'amplification ciblant les EV-A. Aucun EV-D n'a été détecté. Jusqu'à 4 types d'EV différents en mélange ont pu être détectés dans un même échantillon ; l'abondance de chaque type variait selon la date et la station d'épuration considérée.

3. Conclusions

La méthode est fonctionnelle pour l'espèce A, et elle est capable d'amplifier de façon non spécifique des B et des C. La méthode fournit des séquences d'EV exploitables et permet la reconstruction génomique pour une identification fiable. L'absence de virus de l'espèce D dans les échantillons peut s'expliquer par le fait que ces virus n'ont pas circulé pendant la période, ou que la charge virale présente était insuffisante dans les échantillons testés. Une approche semblable est en développement pour les entérovirus de l'espèce B.

6.1.4 Laboratoire coordonnateur polio OMS de l'Institut Pasteur

- Recherche de transmission zoonotique d'entérovirus

Objectifs : Déterminer si des échanges d'entérovirus ont lieu entre des animaux de ferme et des enfants vivant à leur contact.

Contexte : Collaboration avec l'Institut Pasteur de Bangui, République centrafricaine

Résumé : 192 échantillons de selles d'animaux (porcs, bovins, chèvres, moutons) ont été collectés dans des fermes à Bangui et ses environs ainsi que les selles de 197 enfants de moins de 5 ans vivant dans ces fermes ; 256 selles d'enfants de moins de 5 ans n'ayant pas de contact avec des animaux ont aussi été collectés parmi les enfants consultant au Centre pédiatrique de Bangui. Le séquençage des génomes d'entérovirus présents dans ces échantillons a montré :

- La présence d'EV-G chez les porcs et les chèvres ;
- La présence d'EV-A, -B et -C chez les enfants, sans différence entre les deux groupes ;
- L'absence d'entérovirus animaux chez les enfants, suggérant que la transmission d'entérovirus G à l'Homme est rare voire inexistante ;
- La présence de deux entérovirus C dans des selles de porcs, suggérant la possibilité de passage de ces virus de l'Homme au porc.

Contribution du LA IP : séquençage des entérovirus détectés par l'Institut Pasteur de Bangui et analyses phylogénétiques.

- Étude du mécanisme d'entrée de l'entérovirus D111

Objectifs : Identifier les récepteurs cellulaires impliqués dans l'infection par l'entérovirus D111

Contexte : stage de M2 et thèse de Typhaine Filhol sous la direction de Maël Bessaud

Résumé : L'entérovirus D111 n'a été rapporté qu'en Afrique sub-saharienne et a été trouvé à la fois chez l'Homme et chez des

primates non-humains vivant dans la forêt camerounaise sans contact avec l'Homme. Il est probable que ces virus ont une origine zoonotique. Nous avons étudié le rôle des acides sialiques (Sia) dans l'infection par EV-D111 grâce à des traitements avec des sialidases et des expériences d'extinction de gènes dans des cellules humaines RD. Nous avons ciblé en particulier une enzyme essentielle au métabolisme des Sia, la CMAS. Des analyses de RT-qPCR et de titrage viral montrent que l'absence de Sia à la surface cellulaire diminue significativement l'infection par EV-D111 sans pour autant l'abolir. Ceci suggère que les Sia joueraient un rôle de facteur d'attachement mais ne seraient pas les récepteurs permettant l'entrée cellulaire des particules virales. Alors que les Sia ne sont pas utilisés par la plupart des EV infectant l'Homme, leur utilisation semble être la norme chez les EV-D. Il pourrait ainsi s'agir d'un caractère ancestral. La suite de ce travail sera d'identifier de façon plus précise les isoformes des Sia utilisés par EV-D111, une préférence pour les Sia $\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$ pouvant influencer le tropisme tissulaire du virus et sa transmissibilité.

6.2 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

6.2.1 Chapitres d'ouvrage

Les laboratoires du CNR EV-PeVont participé à la rédaction du chapitre entérovirus, parechovirus et rhinovirus dans la nouvelle version de l'ouvrage de référence en virologie : le Traité de Virologie Médicale. A paraître en 2024

Laboratoire coordonnateur

EMC Maladies infectieuses_ article_8-056-A-10, à paraître en 2024 : **Henquell C, Mirand A, JL Bailly**. Entérovirus et parechovirus.

6.2.2. Publications internationales

Publications communes

Grapin M*, **Mirand A***, Piquier D, Basset A, Bendavid **M**, **Bisseux M**, **Jeannoel M**, Kireche B, Kossorotoff M, L'Honneur AS, Robin L, Ville Y, Renolleau S, Lemee V, Jarreau PH, Desguerre I, Lacaille F, Lueriez-Ville M, Guillaume C, **Henquell C**, Lapillone A, **Schuffenecker I***, Aubart M*. Severe and fatal neonatal infections linked to a new variant of echovirus 11, France, July 2022 to April 2023. Euro Surveill 2023; 28 : 2300253.

Simoes MP, Hodcroft EB, Simmonds P, Albert J, Alidjinou EK, Ambert-Balay K, Andrés C, Antón A, Auvray C, **Bailly JL**, Baldanti F, Bastings C, Beard S, Pereira CB, Berginc N, Bloemen M, Blomqvist S, Bosma F, Böttcher S, Bubba L, Buderus S, Cabrerizo M, Calvo C, Celma C, Ceriotti F, Clark G, Costa I, Coste-Burel M, Couderé K, Cremer J, Del Cuerpo Casas M, Daehne T, de Beer J, de Ceano-Vivas M, De Gascun C, de Rougemont A, Dean J, Dembinski JL, Diedrich S, Diez-Domingo J, Dillner L, Dorenberg DH, Ducancelle A, Dudman S, Dyrdak R, Eis-Huebinger AM, Falces-Romero I, Farkas A, Feeney S, Fernandez-Garcia MD, Flipse J, Franck KT, Galli C, Garrigue I, Geeraedts F, Georgieva I, Giardina F, Guiomar R, Hauzenberger E, Heikens E, **Henquell C**, Hober D, Hönemann A, Howson-Wells H, Hruškar Ž, Ikonen N, Imbert B, Jansz AR, **Jeannoël M**, Jiřincová H, **Josset L**, Keeren K, Kramer-Lindhout N, Krokstad S, Lazrek M, Le Guillou-Guillemette H, Lefevre C, Lind A, Lunar MM, Maier M, Marque-Juillet S, McClure CP, McKenna J, Meijer A, Menasalvas Ruiz A, Mengual-Chuliá B, Midgley S, **Mirand A**, Molenkamp R, Montes M, Moreno-Docón A, Morley U, Murk JL, Navascués-Ortega A, Nijhuis R, Nikolaeva-Glomb L, Nordbø SA, Numanovic S, Oggioni M, Oñate Vergara E, Pacaud J, Pacreau ML, Panning M, Pariani E, Pekova L, Pellegrinelli L, Petrovec M, Pietsch C, Pilorge L, Piñeiro L, Piralla A, Poljak M, Prochazka B, Rabella N, Rahamat-Langendoen JC, Rainetova P, Reynders M, Riezebos-Brilman A, Roorda L, Savolainen-Kopra C, **Schuffenecker I**, Smeets LC, Stoyanova A, Stefic K, Swanink C, Tabain I, Tjhie J, Thouault L, Tumiotto C, Uceda Renteria S, Uršič T, Vallet S, Van Ranst M, Van Wunnik P, Verweij JJ, Vila J, Wintermans B, Wollants E, Wolthers KC, Xavier López-Labrado F, Fischer TK, Harvala H, Benschop KSM. Epidemiological and clinical insights into the enterovirus D68 upsurge in Europe 2021/22 and the emergence of novel B3-derived lineages, ENPEN multicentre study. J Infect Dis. 2024 Mar 28;jiae154. doi: 10.1093/infdis/jiae154.

Publications du laboratoire Coordonnateur

Bubba L, Benschop KSM, Blomqvist S, Duizer E, Martin J, Shaw AG, **Bailly JL**, Rasmussen LD, Baicus A, Fischer TK, Harvala H. Wastewater Surveillance in Europe for Non-Polio Enteroviruses and Beyond. *Microorganisms*. 2023 Oct 5;11(10):2496. doi: 10.3390/microorganisms11102496.

Bailly JL. Une origine zoonotique des entérovirus ? [Could enteroviruses be zoonotic?]. *Virologie (Montrouge)*. 2023 Jun 5. French. doi: 10.1684/vir.2023.0997.

Bisseux M, Mirand A, Colombet J, Bailly JL, Henquell C. Nearly Complete Genome Sequence of Enterovirus Type A119 from Sewage in France in 2015. *Microbiol Resour Announc*. 2023 Jun 20;12(6):e0032523. doi: 10.1128/mra.00325-23.

Bisseux M, Mirand A, Colombet J, Bailly JL, Henquell C. Complete Genome Sequence of an Enterovirus Type C116 Strain Recovered from Urban Sewage and Determined by Deep Sequencing. *Microbiol Resour Announc*. 2023 May 17;12(5):e0022623. doi: 10.1128/mra.00226-23.

Publications du laboratoire associé LA L

Auvray C, Perez-Martin S, **Schuffenecker I**, Pitoiset C, Tarris G, Ambert-Balay K, Martin L, Dullier-Taillefumier N, Bour J-B, Manoha C. Sudden infant death associated with rhinovirus infection. *Viruses* 2024. Accepted

Publications du laboratoire associé LA IP

Publications internationales

Fourgeaud J, Lecuit MM, Pérot P, Bruneau J, Regnault B, Da Rocha N, **Bessaud M**, Picard C, Jeziorski É, Fournier B, Levy R, Marçais A, Blanche S, Frange P, Fischer A, Cavazzana M, Ferroni A, Jamet A, Leruez-Ville M, Eloit M, Neven B. Chronic Aichi Virus Infection As a Cause of Long-Lasting Multiorgan Involvement in Patients With Primary Immune Deficiencies. *Clin Infect Dis*. 2023 Aug 22;77(4):620-628. doi: 10.1093/cid/ciad237.

Sadeuh-Mba S, Doté J, Joffret ML, Chesnais M, Filhol T, Gouandjika-Vasilache I, Jouvenet N, **Bessaud M**. Animal enteroviruses: a glimpse of a wide evolutionary landscape. *Virologie (Montrouge)*. 2023 Jun 1;27(3):22-34. doi: 10.1684/vir.2023.1000

Davlatantes E, Jorba J, Henderson E, Bullard K, Deka MA, Kfutwah A, Martin J, **Bessaud M**, Shulman LM, Hawes K, Diop OM, Bandyopadhyay AS, Zipursky S, Burns CC. Notes from the Field: Circulating Vaccine-Derived Poliovirus Type 2 Emergences Linked to Novel Oral Poliovirus Vaccine Type 2 Use - Six African Countries, 2021-2023. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2023 Sep 22;72(38):1041-1042. doi: 10.15585/mmwr.mm7238a4

Volle R, Luo L, Razafindratsimandresy R, Sadeuh-Mba SA, Gouandjika-Valisache I, Horwood P, Duong V, Buchy P, Joffret ML, Huang Z, Duizer E, Martin J, Chakrabarti LA, Dussart P, Jouvenet N, Delpeyroux F, **Bessaud M**. Neutralization of African enterovirus A71 genogroups by antibodies to canonical genogroups. *J Gen Virol*. 2023 Nov;104(11). doi: 10.1099/jgv.0.001911

Kamau E, **Bessaud M**, Majumdar M, Martin J, Simmonds P, Harvala H. Estimating prevalence of Enterovirus D111 in human and non-human primate populations using cross-sectional serology. *J Gen Virol*. 2023 Nov;104(11):001915. doi: 10.1099/jgv.0.001915

6.2.3. Communications

Conférences sur invitation

Recombinaison génétique chez les entérovirus : un puzzle aux innombrables pièces. **BESSAUD M.**, MAC KAIN A., DELPEYROUX F.

Journées francophones de virologie, Paris, 17-18 avril 2023

Écueils du programme d'éradication polio & déploiement d'un nouveau vaccin antipoliomyélitique oral pour endiguer les épidémies. **Bessaud M.**

Congrès de la Société française de microbiologie, Rennes, 4-6 octobre 2023

7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux

Projet de l'ANRS / MIE : « Proposition d'une préfiguration d'un système de surveillance environnementale des poliovirus et questions de recherche associées en contexte de résurgence »

Le LC et le LAIP sont impliqués dans une collaboration avec l'Institut Pasteur de la Guyane et le Service de biologie moléculaire et pathogènes émergents d'Eaux de Paris pour comparer et optimiser différentes techniques de détection et de caractérisation des poliovirus dans les eaux usées (financement ANRS / MIE).

8. Programme d'activité pour les années suivantes

8.1 Participation active à la surveillance des laboratoires des départements et régions d'Outre-Mer

La mise en place se fait en 2024, avec la répartition de l'activité répartie entre le LC et Le LA L (cf Chapitre 1, page 8).

Un contact a été pris avec la Guyane, et une réunion doit être programmée dès que possible (en avril 2024).

8.2 Enquêtes de séroprévalence poliovirus, EV-A71 et EV-D68

Le LC a pris contact en 2023 avec l'EFS de Bordeaux pour avoir accès à des sérums de donneurs de sang avant destruction, et avec le laboratoire CERBA pour des sérums d'enfants.

1- Etude de séroprévalence polio dans la population adulte française métropolitaine

- Objectif : Déterminer le taux de protection vis-à-vis des poliovirus chez les adultes en 2019
- Echantillonnage : Un échantillonnage de 1000 donneurs de sang a été réalisé d'après les données de l'Insee selon le sexe, l'âge (18-29 ans, 30-39 ans, 40-49 ans, 50-59 ans, 60-69 ans) et la région d'habitation, afin d'obtenir un échantillon représentatif. Ces sérums en provenance de l'EFS ont été reçus au CNR LC.
- Analyses : détection et titrage des anticorps neutralisants anti-PV1, PV2 et PV3 par séroneutralisation en culture cellulaire selon le protocole OMS utilisé en routine par le LA L pour le suivi en sérologie polio de certaines populations (reprise d'immunité post-greffe, statut vaccinal de salariés exposés au poliovirus) en laboratoire de confinement L3.
- **Ce travail sera réalisé par les 2 laboratoires associés du CNR** ayant les autorisations MOT nécessaires pour la manipulation des souches de poliovirus Sabin de types 1, 2 et 3.

2- Etude de séroprévalence dans la population pédiatrique française de l'EV-D68 et de l'EV-A71

- Objectif : Déterminer la prévalence des anticorps anti-EV-D68 et EV-A71 chez les enfants en 2022-2023
- Echantillonnage : Un échantillonnage de 500 patients a été réalisé d'après les données de l'Insee selon le sexe, l'âge (<1 an, 1-2 ans, 2-5 ans, 5-10 ans, 10-17 ans) et la région d'habitation, afin d'obtenir un échantillon représentatif. Le CNR est en attente des sérums (collaboration avec le laboratoire Cerba).
- Analyses : détection et titrage des anticorps neutralisants par séroneutralisation en culture cellulaire pour chacun des 2 virus. **Ce travail sera réalisé par le LC.**

8.3 Etude épidémiologique-viro-clinique rétrospective multicentrique sur les infections néonatales en France Métropolitaine (INFNEOEV)

Objectifs :

- Epidémiologie clinique : déterminer la proportion et les caractéristiques cliniques des infections néonatales pour la période 2016-2023 ; déterminer la proportion des cas sévères et les signes de gravité associés
- Epidémiologie moléculaire: décrire les types d'EV identifiés toutes formes cliniques confondues et chez les cas sévères

Organisation de l'étude et apport du CNR :

- Relecture homogène des dossiers cliniques sévères (déjà connus dans le cadre de la surveillance) ou potentiellement sévères (dossiers de réanimation/USC non renseignés dans le cadre de la surveillance et recueil des

informations sur une fiche standardisée validée par un pédiatre réanimateur et une pédiatre néonatalogiste

- 36 centres collaborateurs avec binômes clinicien/biologiste
- Le LAL est promoteur de l'étude et coordonnera la collecte des données, l'analyse globale (en collaboration avec le LC) et la rédaction de la publication afférente

Etat d'avancement :

- Etude reportée à 2024 suite à des délais administratifs pour l'établissement des conventions avec les centres collaborateurs
- Envoi des conventions réalisé fin Février 2024
- Délai souhaité pour le Recueil des données : Septembre 2024

1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Conformément au cahier des charges établi par le Ministère de la Santé, les missions principales du CNR EV-PeV en terme de santé publique sont : (1) de coordonner avec Santé publique France la surveillance épidémioclinique des infections à EV et HPeV ; (2) de surveiller l'introduction et l'éventuelle circulation de poliovirus potentiellement neurovirulents sur le territoire français ; (3) de promouvoir le diagnostic et de renforcer la surveillance des infections à HPeV ; (4) de développer les techniques d'identification et de caractérisation des souches d'EV et de HPEV, notamment en s'appuyant sur les nouvelles méthodes de séquençage (NGS, WGS).

La surveillance des infections humaines à EV s'appuie sur le Réseau de Surveillance des Entérovirus (RSE), réseau de 35 à 40 laboratoires de CHU (dont les laboratoires du CNR) et CH qui transmettent mensuellement *via* le site web du CNR le nombre de prélèvements analysés, les résultats de détection virologique et les informations épidémiocliniques pour les patients présentant une infection à EV. Les 3 laboratoires (hors LC et LA L) qui réalisent eux-mêmes le génotypage des EV renseignent également leurs résultats d'identification *via* le site web.

L'objectif de la surveillance est double : alerter précocement sur la survenue d'une épidémie estivale de grande ampleur ou l'émergence d'une forme clinique inhabituelle, et suivre les types d'EV associés aux différents syndromes cliniques. Outre le suivi épidémiologique des EV associés aux épidémies de méningites saisonnières, le typage moléculaire présente un intérêt particulier : (1) pour les tableaux d'infections neuro-méningées graves telles que les encéphalites ou les paralysies flasques aiguës (notamment pour documenter le rôle des EV non-poliomyélitiques et exclure les poliovirus), (2) pour toutes les infections à EV sévères (infections néonatales disséminées, infections associées à des morts subites, myocardites, détresses respiratoires...), (3) pour la surveillance spécifique de l'EV-A71 et l'EV-D68 à potentiel épidémique et associés à des tableaux neurologiques et respiratoires graves, (4) pour l'investigation de cas groupés (contexte nosocomial).

Les 2 laboratoires de CHU du CNR EV-PeV assurent au quotidien le diagnostic et le typage moléculaire des EV pour les CHU de Lyon et Clermont-Ferrand ainsi que les CH de France Métropolitaine, et bientôt ultra-marins, ne disposant pas de ces techniques. Ils assurent également l'animation du réseau, conjointement avec Santé publique France. Au cours de l'année de surveillance, un bulletin rédigé conjointement par le CNR EV-PeV et Santé publique France fait état de la situation épidémiologique et des données clinico-épidémiologiques et virologiques aux laboratoires du RSE. Si la situation le nécessite, des bulletins d'alerte peuvent être mis à disposition sur le site de Santé publique France, sur le site web du CNR EV-PeV ou diffusés aux cliniciens impliqués dans la prise en charge des patients.

Dans le cadre du programme international d'éradication de la poliomyélite, le LA de Lyon et le LA de l'Institut Pasteur ont pour mission de surveiller l'introduction et la circulation de poliovirus potentiellement neurovirulents, sachant que toute suspicion de poliomyélite clinique est à déclaration obligatoire sur le territoire français. La surveillance humaine s'appuie sur : 1/ le typage des souches détectées dans le cadre de la surveillance globale des infections à EV ; 2/ la recherche ciblée de poliovirus dans de rares tableaux de paralysie flasque aiguë (moins de 3 cas par an) ou chez des enfants adoptés ou des réfugiés venant de pays à risque avéré ou potentiel pour la circulation de poliovirus ; 3/ la détection de poliovirus en cas d'exposition accidentelle au poliovirus (personnel des laboratoires producteurs de vaccins polio essentiellement).

Le CNR EV-PeV a également pour mission de promouvoir le diagnostic et le typage des infections systémiques à HPeV chez les nouveau-nés et jeunes nourrissons, puisque des formes sévères peuvent être observées au cours de ces infections. Pour ce faire, le CNR EV-PeV s'appuie sur les laboratoires partenaires du RSE. Les objectifs sont de : (1) Connaître précisément l'épidémiologie des infections à HPeV en France métropolitaine (2) Offrir une possibilité diagnostique au clinicien, sachant que le diagnostic des infections à HPEV fait partie du diagnostic différentiel des infections à EV en période néonatale (3) Alerter sur la survenue d'une épidémie ou de formes cliniques inhabituelles et/ou sévères.

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

1.2.1 Répartition de l'activité

Elle est détaillée au Chapitre 1.

1.2.2 Procédure d'alerte élaborée conjointement par le CNR et Santé publique France

Suite à l'évaluation du comité des CNR de décembre 2022, le CNR et Santé publique France se sont réunis le 28 mars 2024. Le rendu de conclusions est le suivant :

1/ Le CNR et Santé publique France s'accordent sur l'importance du partage d'informations de manière réactive lors d'une alerte. L'information de Santé publique France peut avoir lieu à l'étape de validation/consolidation du signal (avant la qualification en alerte) pour bien anticiper la suite.

2/ En cas de remontée d'un signal jugé inhabituel, par exemple par des professionnels de santé, il convient d'informer sans délai Santé publique France et de prévoir rapidement un temps d'échange pour définir le cadre de l'investigation, les données disponibles et attendues, les communications prévues et les modalités d'information des partenaires et des sociétés savantes.

3/ Sachant que les publications scientifiques relatives à ces signaux/alertes peuvent donner lieu à des sollicitations du Ministère ou de Santé publique France (de la part des médias ou des agences sanitaires d'autres pays ou de la communauté scientifique), il est demandé au CNR d'informer Santé publique France et de transmettre les épreuves en amont de la publication pour anticiper ces sollicitations.

4/ Cette organisation s'applique à la fois aux signaux PV et EV non PV.

1.2.3 Procédure d'alerte polio

Le dispositif d'alerte polio est un dispositif d'alerte clinique et virologique répondant aux recommandations internationales de l'OMS.

CAT devant un cas cliniquement suspect de poliomyélite antérieure aiguë

Tout tableau de paralysie flasque aiguë en contexte fébrile et sans déficit sensitif associé doit faire évoquer le diagnostic de poliomyélite antérieure aiguë (PAA) (Figure 29). La pré-existence de douleurs dans le territoire paralysé, l'asymétrie du déficit moteur et la constitution rapide d'une amyotrophie renforcent la suspicion diagnostique, de même que l'existence d'arguments épidémiologiques associés (statut vaccinal non immunisé ou inconnu, notion de voyage en zone d'endémie dans les 30 jours, contact avec un cas confirmé). Cette éventualité est rare en France Métropolitaine.

Toute suspicion clinique doit immédiatement être signalée à l'ARS et SPF et doit faire l'objet d'investigations virologiques rapides.

Deux échantillons de selles prélevés à 24h d'intervalle devront être adressés au LA L (laboratoire national référent pour la prise en charge des prélèvements humains suspects de contenir du poliovirus) pour détection par RT-PCR (délai de réponse pour la PCR EV d'orientation : 4h minimum après réception des prélèvements) et typage par RT-PCR en temps réel (délai réponse : 4h minimum après isolement du virus en culture) et/ou séquençage du gène VP1 (délai de réponse : 24-48h après isolement du virus en culture). L'acheminement des échantillons devra respecter la norme UN3373. Un prélèvement nasopharyngé sera également prévu pour la recherche d'EV non poliomyélitique (EV-D68, EV-A71) pouvant également être à l'origine de tableaux de paralysies aiguës flasques. Des prélèvements additionnels seront prévus pour le diagnostic différentiel étiologique (plasma, sang total, serum). En cas de détection d'un poliovirus potentiellement neurovirulent (vDPV ou poliovirus sauvage), la caractérisation complète de la souche sera effectuée par le LA IP.

Toute détection ou isolement fortuit de poliovirus à partir de prélèvements humains doit également faire l'objet d'un typage moléculaire par le LA L afin de déterminer s'il s'agit d'un poliovirus vaccinal ou potentiellement neurovirulent (dérivé de vaccinal ou sauvage). En cas d'envoi de souches à caractériser, une autorisation devra être demandée à l'ANSM.

Toute confirmation biologique de poliomyélite par le CNR ou toute détection fortuite de poliovirus neurovirulent (WPV, VDPV) ou de souche Sabin 2 doit faire l'objet d'une notification sous 24h à l'ARS et Santé publique France. Les instances nationales

(DGS) ont la responsabilité de notifier le cas au bureau européen OMS de la poliomyélite (Copenhague). Dans tous les cas, un suivi de l'excrétion virale dans les selles devra être réalisé. Selon le contexte, une caractérisation moléculaire complète de la souche par le LA IP pourra s'avérer nécessaire de même que la réalisation de prélèvements systématiques chez l'entourage ou de prélèvements environnementaux autour de la résidence du cas.

CAT devant un cas d'exposition aux poliovirus

Cette situation s'applique principalement aux laboratoires fabriquant des vaccins anti-poliovirus. L'évaluation du risque d'exposition du personnel au PV devra se faire selon les critères définis par le guide de l'OMS en cas de rupture de confinement.

Le niveau de risque dépend en partie du type de virus (mais aussi du contexte d'exposition) et conditionne la mise en isolement/quarantaine des personnels exposés, les investigations virologiques à réaliser et les mesures à prendre autour des cas :

- ✓ Risque très élevé : WPV2
- ✓ Risque élevé : WPV1, WPV3
- ✓ Risque faible : SL2
- ✓ Risque minimal : SL1, SL3

Depuis 2018, le LA L assure les investigations virologiques en cas d'incidents/accidents d'exposition dans les sites de production de vaccin polio du groupe Sanofi (Marcy l'Etoile pour le vaccin IPV et Val de Reuil pour le vaccin OPV). Les investigations virologiques s'appuient sur les recommandations de l'OMS (type de prélèvements, calendrier des prélèvements).

Les mesures de prise en charge des personnels exposés et de leurs contacts sont identiques à celles présentées en Figure 31. Une étape de concertation est systématiquement prévue entre le médecin du travail, l'ARS, SPF et le CNR.

Les incidents avec risque d'exposition avéré doivent faire l'objet d'un signalement systématique au niveau de l'ARS. Les instances nationales (DGS) sont en charge de les déclarer à l'OMS (en cas d'exposition à une souche neurovirulente ou à toute souche de sérotype 2).

Par ailleurs, tout incident dans les laboratoires producteurs de vaccins doit être signalé au préfet (ICPE).

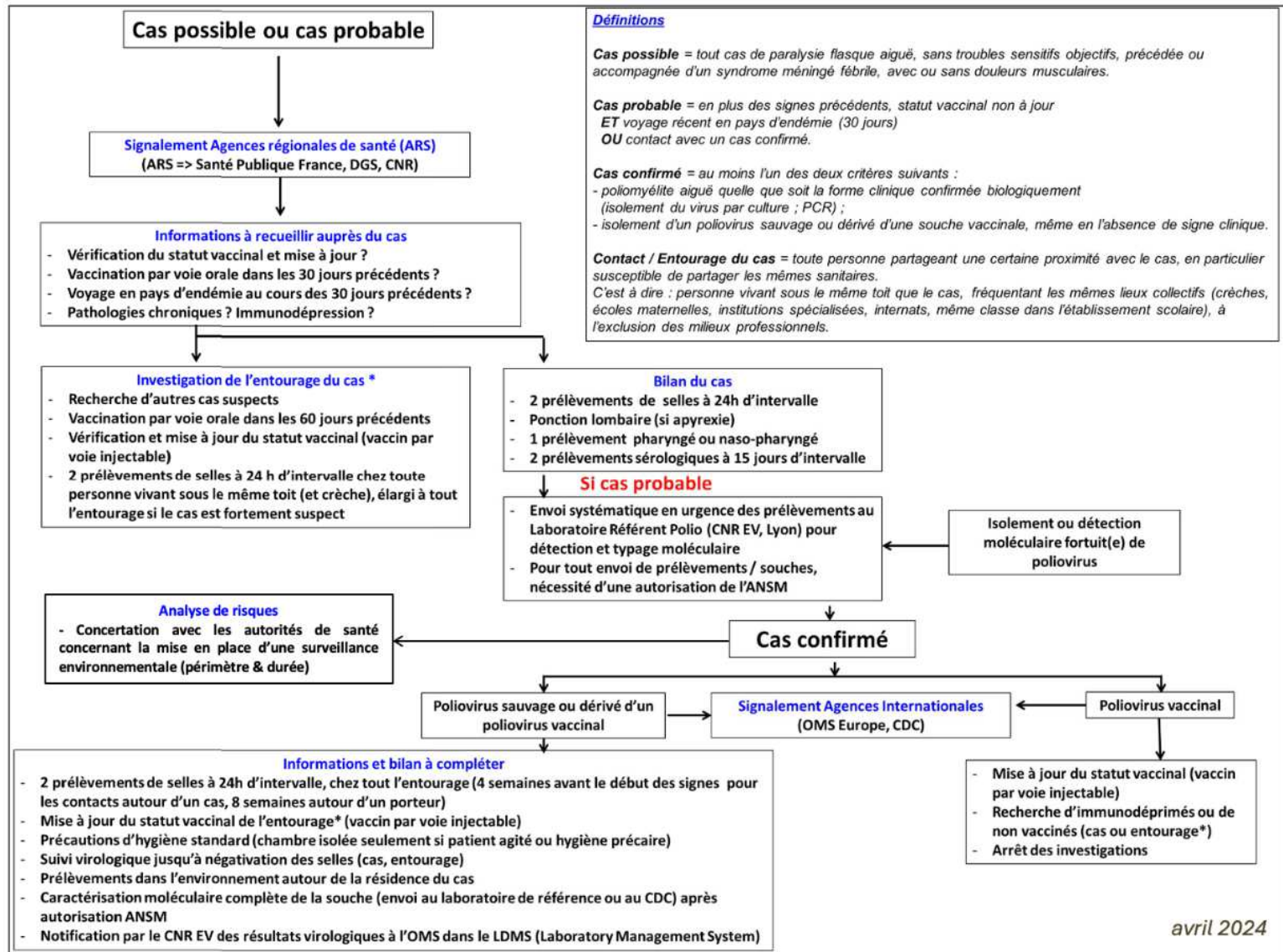
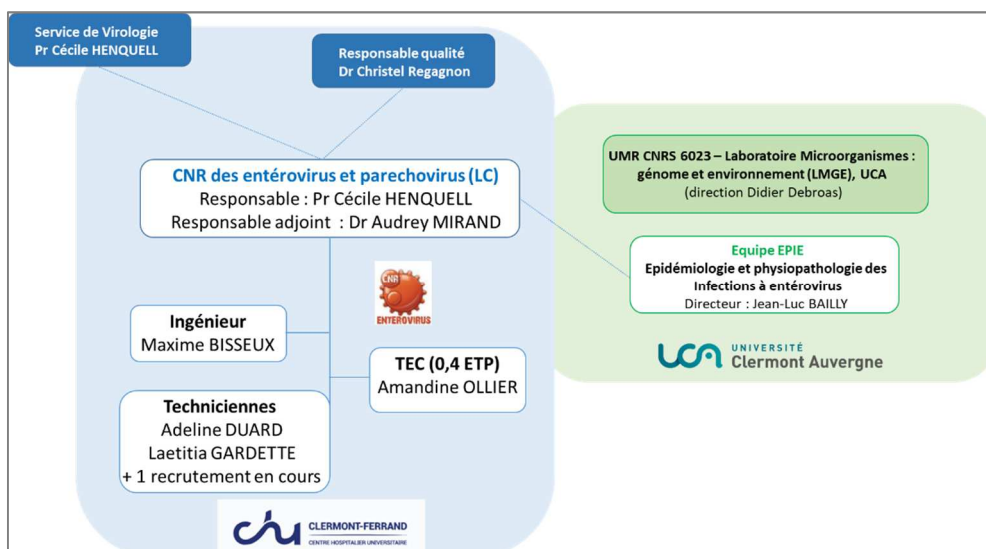


Figure 31. Conduite à tenir en cas de suspicion de poliomyélite ou de détection fortuite de poliovirus

1.2.4 Organisation du laboratoire coordonnateur CHU Clermont-Ferrand



Nom	Qualification	Fonction	Employeur	ETP
HENQUELL Cécile	Biologiste médicale	PU-PH Cheffe de service de Virologie, CHU CFD Responsable CNR	CHU CFD	0,2
MIRAND Audrey	Biologiste médicale	MCU-PH Responsable adjoint du CNR	CHU CFD	0,25
BAILLY Jean-Luc	PhD, HDR	Membre du CNR	Université Clermont Auvergne	0,1
BISSEUX Maxime	PhD	Ingénieur du CNR	CNR	1
OLLIER Amandine	Technicienne d'études cliniques	TEC	CNR	0,4
DUARD Adeline	TL	technicienne	CNR	1
GARDETTE Laetitia	TL	technicienne	CNR	1

RQ : une 3^{ème} technicienne vient d'être recrutée.

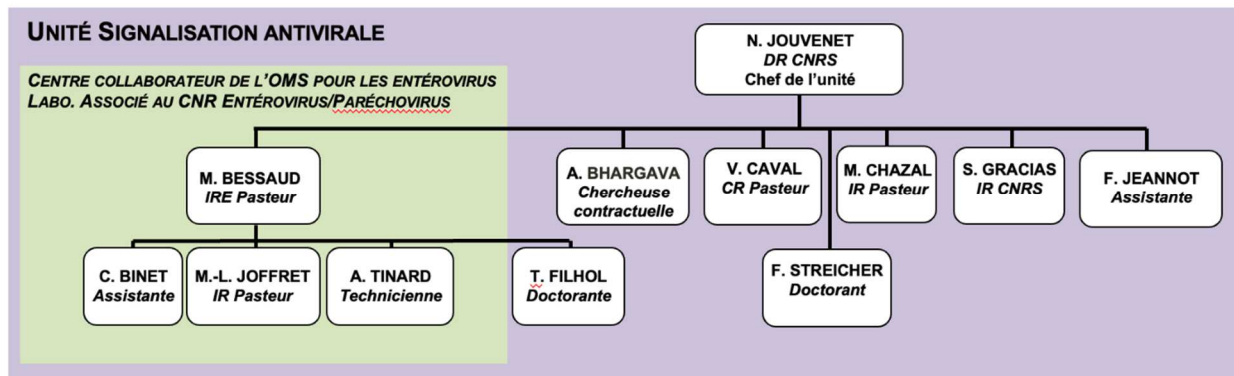
1.2.5 Laboratoire associé CHU de Lyon (LA L)

Nom	Qualification	Fonction	ETP
SCHUFFENECKER Isabelle	Biologiste médicale	PH <i>Responsable CNR</i>	0,75
JEANNOEL Marion	Biologiste médicale	PHC et RAQ <i>Responsable adjointe CNR</i>	0,75
JOSSET Laurence	Biologiste médicale	MCU-PH <i>Co-responsable plateforme GenEPII</i>	0,05
REGUE Hadrien	Master bio-informatique	Bio-informaticien	0,2
FALCON Delphine	Technicienne	Technicienne référente BM et culture polio	1
GROSCARRET Emmanuelle	Technicienne	Technicienne référente BM CQ Métrologie	1
ZANGHELLINI Laure	Technicienne	Technicienne référente sérologie polio et BM CQ SMQ et Hygiène et Sécurité	0,9
ROUSSET Isabelle ^a	Technicienne	Technicienne sérologie polio et BM	0,9
PEREZ Brigitte	Secrétaire Médicale		0,2

CQ : correspondante qualité ; RAQ : responsable assurance qualité ; SMQ : système de management de la qualité

^a Technicienne recrutée en Mars 2024 en remplacement de Pascale Bourret

1.2.6 Laboratoire associé Centre coordonnateur polio OMS de l'Institut Pasteur (LA IP)



Nom	Qualification	Fonction	Employeur	ETP
BESSAUD Maël	PhD, HDR	Responsable CNR	Institut Pasteur	0,25
JOFFRET Marie-Line	PhD	Ingénieure	Institut Pasteur	0,3
TINARD Ambre	Licence professionnelle	Technicienne	Institut Pasteur	0,5
BINET Caroline		Assistante administrative	Institut Pasteur	0,1

1.3 Locaux et équipements

1.3.1 Laboratoire coordonnateur CHU Clermont-Ferrand

Locaux

Le service de Virologie du CHU de Clermont-Ferrand fait partie du Laboratoire de Biologie Médicale du CHU, au sein du Pôle de Biologie et d'Anatomie Pathologique. Il est situé sur le site de l'hôpital Gabriel Montpied, dans le Centre de Biologie (5ème étage). L'activité du CNR est localisée au sein du laboratoire de Virologie médicale (Figure 30), avec un bureau dédié et des pièces techniques communes avec celles du service de Virologie médicale.

Surface parties techniques = 430 m²

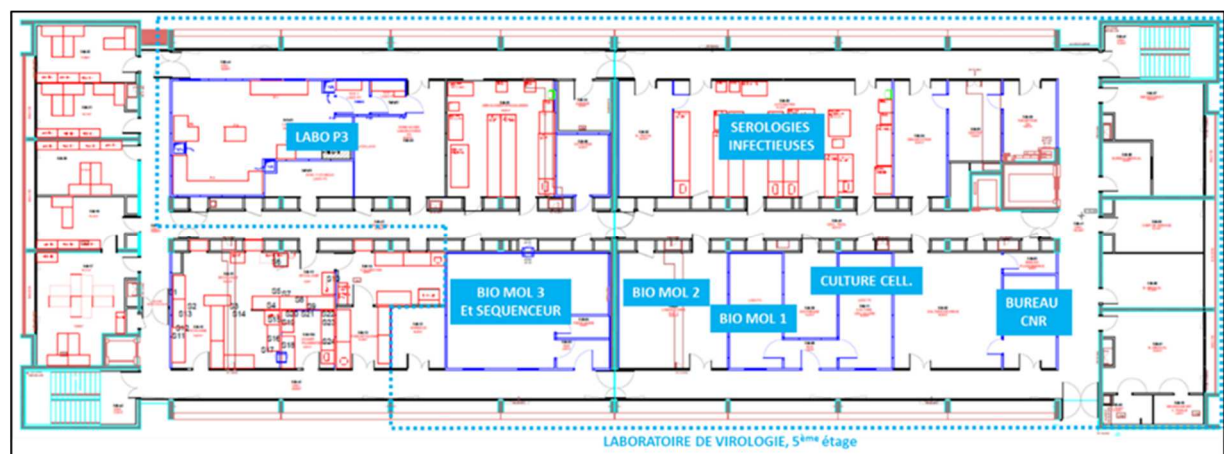


Figure 32. Implantation du CNR au sein du service de Virologie, Centre de Biologie, CHU de Clermont-Ferrand

Equipement

Les principaux matériels et équipements utilisés pour l'activité du CNR sont les suivants :

- 1 robot pipeteur / aliquoteur Hamilton
- 4 automates d'extraction des acides nucléiques : 3 EasyMag™ (bioMérieux), 1 MGI
- 4 thermocycleurs classiques (Applied Biosystems, ThermoFisher et Eppendorf)
- 9 thermocycleurs pour PCR en temps réel: 1 ABI7500™ (Applied Biosystems), 2 RotorGene™ (Qiagen), 4 QuantStudio™ 5 (ThermoFisher), 2 CFX96™ (Biorad)
- 1 séquenceur automatique (technique Sanger) : ABI 3500Dx (ThermoFisher) à 8 capillaires
- 1 séquenceur Mk1C de Oxford Nanopore
- 2 générateurs et cuves à électrophorèse
- PSM, étuves à CO2 et des microscopes à contraste de phase pour cultures cellulaires
- Réfrigérateurs et congélateurs à -20 °C de biothèque reliés à une centrale de surveillance de température (VigiTemp™) ; congélateurs à -80°C et cuve à azote liquide reliés à un système de gestion technique bâtiment (GTB) géré 24h/24 par les services techniques du CHU
- Laboratoire de sécurité NSB3, permettant l'isolement et l'extraction du génome de souches responsables d'une forme clinique inhabituelle ou sévère, ou de souches particulièrement virulentes.

Nous disposons également de structures transversales au sein du CHU de Clermont-Ferrand :

- Plateforme de séquençage haut débit (Centre de Biologie, 3ème étage), équipée avec des robots d'extraction et de pipetage Beckman, 2 thermocycleurs et 3 séquenceurs haut débit MiSeq™ et 1 NextSeq550™ (Illumina), 2 Qubit et une TapeStation Agilent
- Centre de Ressources Biologiques.

En cas de défaillance de thermocycleurs (pour PCR) ou d'incubateurs à CO2 (pour culture cellulaire) par exemple, les locaux et l'équipement présent du Laboratoire de Virologie universitaire (situé à 50m du Centre de biologie) permettent de suppléer à l'activité du CNR pour la réalisation d'exams urgents.

1.3.2 Laboratoire associé du CHU Lyon (LA L)

Les activités diagnostiques et de typage du LA L sont réalisées dans des locaux dédiés et mutualisés du Centre de Biologie du Groupement Hospitalier Nord du CHU de Lyon (Figure 31).

Le LA dispose d'un laboratoire L2 dédié (28 m2) destiné au traitement pré-analytique des échantillons biologiques, à certaines étapes des activités de typage moléculaire, et à la mise en culture des prélèvements et souches. Par ailleurs, il dispose d'un box dédié au sein du laboratoire P3 pour la réalisation des sérologies poliovirus et la prise en charge d'échantillons potentiellement infectés par des poliovirus neurovirulents (personnels des laboratoires producteurs de vaccins polio essentiellement).

Il bénéficie de locaux et équipements mutualisés du Centre de Biologie (réception centralisée des échantillons 24h sur 24, plateau de Biologie Moléculaire, plateforme de Séquençage Haut Débit dédiée aux Pathogènes Infectieux, plateau de culture de virus, centre de ressources biologiques).

Les mesures de sûreté et de sécurité microbiologique ont été renforcées dans le cadre de la double législation MOT et GAPIV s'appliquant à la détention et à la mise en œuvre des poliovirus. Elles ont fait l'objet d'inspections de l'ANSM en 2015,2018, 2022 et 2023. Une nouvelle autorisation de détention et de mise en œuvre des poliovirus a été délivrée par l'ANSM, valable jusqu'en Juin 2026.

Locaux

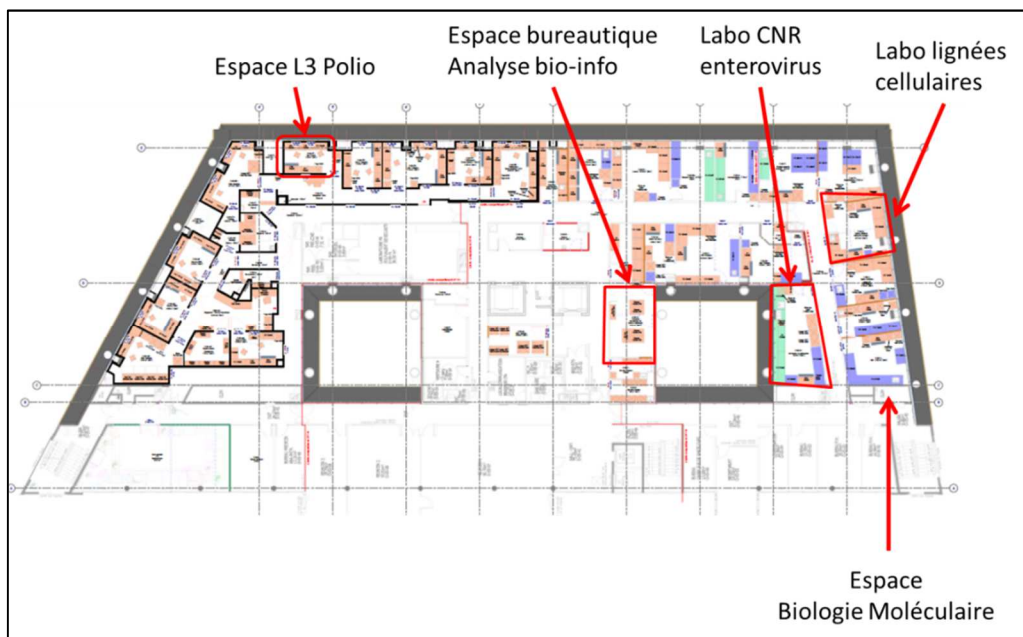


Figure 33. Plan des locaux du 5e étage de l'Institut des Agents Infectieux (Centre de Biologie, Groupement Hospitalier Nord, Hospices Civils de Lyon)

Equipements

L'équipement utilisé pour l'activité du LA L est en partie de l'équipement dédié et mutualisé. Une maintenance annuelle des hottes à flux laminaire, étuves, centrifugeuses, extracteurs d'acides nucléiques, thermocycleurs et pipettes est systématiquement réalisée. Tous les réfrigérateurs et congélateurs utilisés par le LA L sont équipés de sondes et enregistreurs de température reliés au système MySirius. Le stockage à long terme des souches et des prélèvements cliniques du LA se fait dans des congélateurs dédiés, situés dans les L2 et L3 dédiés au 5e étage du Centre de Biologie ou dans une zone de stockage mutualisée du Centre de Biologie. Un congélateur fermé à clef et sous surveillance caméra 24h sur 24 et 7 jours sur 7, accessible uniquement aux personnels habilités MOT, est dédié au stockage des poliovirus dans le L3, conformément à la demande de l'OMS et de l'ANSM.

Équipements dédiés

Postes de sécurité microbiologique (2), étuves (4), microscopes (2), hotte pour préparation mix (1), hotte pour distribution des acides nucléiques/cDNA (1), thermocycleurs Eppendorf pour PCR conventionnelle (3), poste informatique (4) dont deux équipés du package Lasergene pour l'analyse de séquences), réfrigérateurs (2), congélateurs -20° (6), congélateurs -80° (2).

Équipements mutualisés de l'IAI

- Equipements du plateau de Biologie Moléculaire du CNR des Virus Respiratoires ou de la plateforme GenEpii utilisés par le CNR: extracteurs acides nucléiques EMag (1), Maxwell (1), MGI (1), hotte pour PCR nested (1), thermocycleurs ABI7500 (2) et Quant Studio (3) (diagnostic générique enterovirus, rhinovirus, parechovirus).

- Equipement de culture cellulaire : poste de sécurité microbiologique (2), étuve à CO2 (1), microscope (1).

- Equipements de la plateforme de séquençage haut débit (genEpii) : robots pipeteurs utilisés pour la préparation des amplicons et des bibliothèques : Mosquito HV (SPT Labtech) (n=3) ; Dragonfly Discovery (SPT Labtech) (n=2) ; EpMotion (Eppendorf) (n=1) ; DreamPrep (Tecan) (n=1) ; séquenceurs haut débit : NovaSeq 6000 (Illumina) (n=1) ; NextSeq550 (Illumina) (N=1) ; Gridion (n=1) ; Minion (n=4)

- Centre de Ressources Biologiques

1.3.1 Laboratoire associé Pasteur (LA IP)

Le LA IP est rattaché à l'unité Signalisation antivirale du département de virologie de l'Institut Pasteur (Unité mixte de recherche 3596, Université de Paris Cité-CNRS). Il mène en parallèle des activités de recherche et des activités de santé publique. En plus de son mandat au sein du CNR, ce laboratoire est un centre collaborateur de l'OMS (Epidémiologie & macro-évolution des poliovirus & des entérovirus non-polio) et l'un des sept laboratoires experts du Réseau mondial des laboratoires polio de l'OMS.

Locaux

Le laboratoire dispose de ses propres locaux (Figure 32) dont notamment :

- Un P2 dédié à la culture cellulaire (pièce 08)
- Un P2 dédié à la culture d'entérovirus non-polio (pièce 09)
- Un P2 dédié à la culture de poliovirus (pièce 09A)
- Un P2 dédié aux cultures de bactéries et au traitement des échantillons d'eaux usées (pièce 04)
- Un laboratoire de biologie moléculaire (pièce 05).

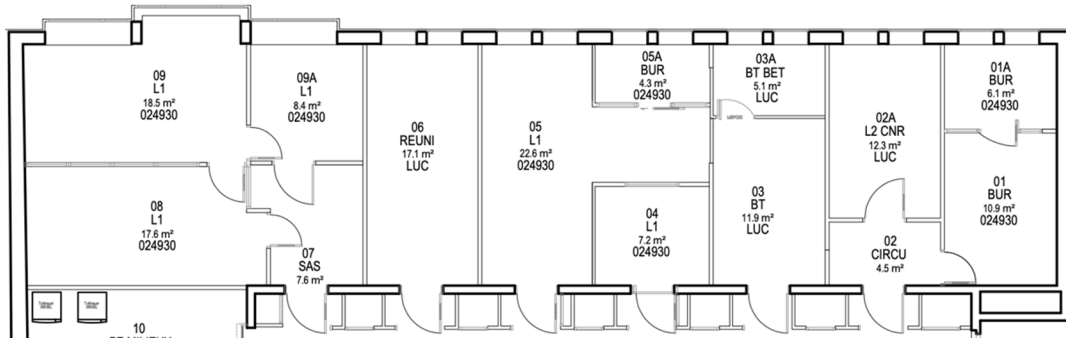


Figure 34. Implantation du LAIP dans le bâtiment Biotop sur le campus de l'Institut Pasteur

Il dispose de l'usage exclusif d'un box dans un des P3 du Centre François-Jacob (box 09E, Figure 33).

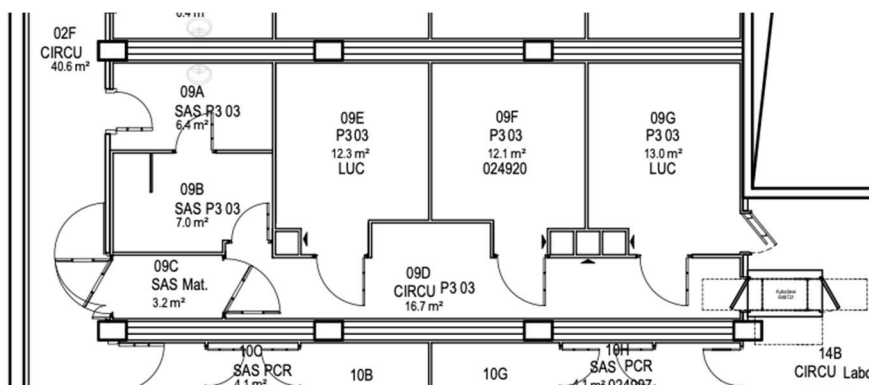


Figure 35. Box dédié au LAIP dans le bâtiment François-Jacob

Tous ces locaux sont déclarés dans le dossier technique MOT relatif au poliovirus.

Equipement

Les équipements utilisés ne sont pas mutualisés avec d'autres équipes. Il s'agit entre autres des appareils de PCR en temps réel (ABI StepOne et BioRad CFX96) et des quatre congélateurs à -80°C dont deux ont un accès nécessitant l'utilisation d'un badge personnel. Tous les congélateurs à -80 °C et les congélateurs à -30 °C dans lesquels sont stockés les échantillons et

les enzymes sont surveillés par des sondes avec un système d'alarme par téléphone et courriel en cas de dépassement des températures de consigne.

1.4 Collections de matériel biologique

1.4.1 Laboratoire coordonnateur

L'ensemble des échantillons biologiques, extraits d'ARN ou surnageants de culture positifs pour la recherche d'EV, de HPeV ou de rhinovirus est conservé à -80°C au sein du Centre de Biologie, dans le local sécurisé dédié aux congélateurs à -80°C et aux cuves d'azote liquide.

La collection du laboratoire est constituée

- d'échantillons cliniques et extraits d'acides nucléiques collectés dans le cadre de la surveillance
- de souches collectées à travers l'activité hospitalière depuis les années 70 dont une partie a été sérotypée (pools Melnick) et titrée. Les plus récentes sont identifiées par séquençage (génomique partielle, et de plus en plus génome complet).
- de souches prototypes.

Des échantillons cliniques ou des souches peuvent être transmises sur demande argumentée à l'ensemble des laboratoires qui le souhaitent. Pour les demandes relatives à un projet de recherche particulier, la mise en place d'une convention (Material Transfer Agreement) peut être nécessaire.

1.4.2. Laboratoire associé LYON

Le laboratoire associé du CNR EV-PeV possède une collection de souches prototypes d'EV, rhinovirus et HPeV ainsi que des souches cliniques isolées depuis 2000 et caractérisées génétiquement au cours de ses différents mandats de CNR.

Par ailleurs, le laboratoire associé possède une collection d'échantillons biologiques (LCS, selles, échantillons nasopharyngés) détectés positifs en EV, HPeV ou rhinovirus dans le cadre de sa mission de surveillance et dûment caractérisés par séquençage.

Souches et échantillons cliniques sont conservés dans des congélateurs. Ils pourront être transmis sur demande justifiée aux laboratoires partenaires du RSE, à des laboratoires industriels ou académiques via le Centre de Ressources Biologiques de l'IAI (certification NF S 96-900 depuis 2018 et certification ISO 20387 planifiée en 2023) et feront l'objet d'un MTA selon le contexte de la demande (un financement pourra être demandé pour la mise à disposition et le transport de ces souches).

1.4.3 Labo associé Pasteur

Les échantillons reçus dans le cadre des activités du CNR se font dans des congélateurs non-partagés avec d'autres équipes. Ils sont listés dans un espace dédié de l'outil utilisé pour gérer les collections (eLabJournal). Seuls les membres du LAIP ont accès à cet espace grâce à un système de mots de passe personnels géré par la DSI de l'Institut Pasteur. L'inventaire est stocké de façon crypté et sécurisé sur le cluster de l'Institut Pasteur.

1.5 Démarche qualité du laboratoire

1.5.1 Labo coordonnateur

La démarche qualité du CNR est la même que celle du service de Virologie et bénéficie des mêmes dispositions (cf Chapitre 1). Les méthodes d'analyses en lien avec les activités du CNR et accréditées sont indiquées dans les tableaux en Annexe 2.

Participation à des programmes d'évaluation externe de la qualité

1/ Participation aux programmes européens d'évaluation externe de la qualité – Quality Control for Molecular Diagnosis (QCMD)

- **Détection moléculaire des EV** depuis 2006 (2 programmes /an)
Méthodes évaluées : trousse Enterovirus-R GENE® (bioMérieux) sur deux automates différents de PCR en temps réel et la RT-PCR en temps réel quantitative développée par le laboratoire.
- **Détection et typage moléculaire des parechovirus** depuis 2011 (2 programmes /an)
Méthodes évaluées : trousse Parechovirus r-GENE® (bioMérieux) sur 2 automates différents, méthode de génotypage des HPeV
- **Détection et typage moléculaire des rhinovirus** depuis 2012 (1 programme /an)
Méthodes évaluées : trousse MWS Enterovirus-Rhinovirus/Cc R-GENE® (bioMérieux) sur 2 automates de PCR en temps réel et méthode de génotypage par RT-PCR décrite par Savolainen *et al.* (2002) et complétée par celle de Linsuwanon *et al.* (2009).
- **Génotypage des entérovirus** depuis 2016 (1 programme /an)
Méthodes évaluées : méthodes de génotypage spécifiques et génériques des EV

2/ Participation à un programme d'évaluation inter-laboratoires entre les laboratoires du CNR EV-HPEV. Ce programme organisé alternativement par l'un des deux laboratoires porte spécifiquement sur la **détection et le génotypage des entérovirus D68**.

1.5.2 Labo associé LYON

Le laboratoire de Virologie fait partie intégrante du laboratoire de biologie médicale multi-sites (LBMMS) des Hospices Civils de Lyon (HCL) et applique la politique de management de la qualité définie par la Direction de la Biologie. Depuis Décembre 2014, le LBMMS est accrédité (n°:8-3442) selon la norme NF EN ISO 15189.

La mise en œuvre de la politique qualité au Laboratoire de Virologie implique l'ensemble du personnel et se fait sous la responsabilité du chef de service, de la responsable qualité et de la cellule qualité des HCL.

Organisation de la démarche qualité au LA du CHU de Lyon

Le LA, comme les autres unités du laboratoire de Virologie, suit les exigences de la norme NF EN ISO 15189. La gestion des non-conformités, des habilitations du personnel, la rédaction documentaire et le suivi métrologique des équipements sont réalisés dans le logiciel qualité Kalilab. A réception des échantillons, sont tracées: la date de réception, la conformité de la température de transport, la conformité des examens demandés. L'enregistrement des prélèvements, des analyses et des dossiers patients destinés au LA se fait dans le système informatique commun (GLIMS) du LBMMS sur l'UF du LA. Toutes les étapes analytiques sont tracées (date extraction et volume d'éluion, date et résultats PCR, date et résultats des données de séquençage). Les étapes de saisie, validation et édition des résultats sont tracées par le SGL. Les résultats de typage moléculaire et les séquences associées sont saisis en temps réel sur le site Web dédié à la surveillance. Les échantillons reçus et ARN extraits sont conservés à -80° dans des bibliothèques dédiées (identification par numéro unique attribué lors de la création du dossier patient) dont la température est contrôlée par enregistreur de température.

Les méthodes d'analyses en lien avec les activités du CNR et accréditées sont indiquées dans les tableaux en Annexe 2.

Participation à des programmes d'évaluation externe de la qualité

Programmes internationaux d'évaluation externe de la qualité (OMS)

- Depuis 2001, participation annuelle au CQE international (distribué par le RIVM, Bilthoven) évaluant la capacité à isoler et identifier les poliovirus et EV non polio sur des échantillons de selles.
- Depuis 2018, participation annuelle au CQE international (distribué par l'IRR, USA) évaluant la capacité à sous-typer les poliovirus par la méthode ITD/VDPV développée par le CDC.

Programmes européens d'évaluation externe de la qualité (QCMD, Glasgow)

- Depuis 2006, participation au CQE européen pour l'évaluation des performances des techniques de détection moléculaire des EV (trousse Enterovirus R-gene® de bioMérieux ; 1 programme par an).
- Depuis 2011, participation au CQE européen pour l'évaluation des techniques de détection moléculaire des parechovirus (trousse Parechovirus R-gene® de bioMérieux ; 2 programmes par an ; ce CQE est utilisé en interne pour évaluer la technique de typage moléculaire des parechovirus).
- Depuis 2016, participation au CQE européen pour l'évaluation des techniques de typage moléculaire des entérovirus (séquençage Sanger et NGS régions 1DVP1 et 1A-1B ; 1 programme par an).

Echanges inter-laboratoires (EIL)

- Depuis 2018, un EIL a été mis en place avec les Laboratoires Biomnis et Pasteur-Cerba (organisation alternative par l'un des 3 laboratoires) pour l'évaluation comparative de la technique de sérologie poliovirus par séroneutralisation (technique de référence OMS).
- Depuis 2019, un EIL annuel a été mis en place entre le LC et le LA du CNR (organisation alternative) pour l'évaluation comparative des techniques de détection et de typage de l'EV-D68.

1.5.3 Labo associé Pasteur

En tant que membre du Réseau mondial des laboratoires polio de l'OMS, le laboratoire est soumis à des tests de compétence annuels pour chacune des techniques mises en œuvre pour la détection et la caractérisation de poliovirus. Il est également soumis à des audits réguliers par les coordinateurs du réseau qui vérifie l'existence de procédures écrites décrivant l'ensemble des activités réalisées au profit de l'OMS.

Le LA IP n'effectuant d'actes diagnostiques, il n'a pas d'accréditation COFRAC.

2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

2.1.1 Laboratoire coordonnateur

Les techniques de détection listées ci-dessous peuvent être réalisées directement à partir d'échantillons biologiques variés : LCS, gorge, prélèvement nasopharyngé, prélèvement de lésion cutanée ou muqueuse, selles, sang, biopsie, liquide amniotique et prélèvements environnementaux (eaux usées), ou de surnageant de culture.

Elles comprennent les **méthodes de diagnostic et de génotypage** des entérovirus, parechovirus et rhinovirus par des méthodes génériques ou spécifiques et par séquençage Sanger et haut débit (caractérisation précise des souches circulantes et/ou d'un type en particulier en cas d'épidémie). L'ensemble de ces méthodes peuvent être mis en œuvre en urgence. Les méthodes de **culture cellulaire et de titrage** sont également réalisables pour la constitution d'une souchothèque parfaitement définie, en y associant les données de séquençage. Des méthodes de **séroneutralisation** peuvent également être appliquées pour les études de séroprévalence.

Dans le tableau 34 ci-après, la capacité maximale par semaine est indiquée à titre indicatif et ne prend en compte que l'équipement actuel du laboratoire coordonnateur. Les méthodes accréditées sont indiquées par une astérisque.

Liste des techniques accréditées

Les examens ci-dessous sont accrédités depuis **mars 2016** :

- **Détection moléculaire des entérovirus** – Trousse Enterovirus R-gene™ (bioMérieux) sur ABI7500 (Applied Biosystems) et Rotorgene 6000 (Qiagen)
- **Détection moléculaire des parechovirus** – Trousse parechovirus r-gene™ (bioMérieux) sur Rotorgene 6000 (Qiagen) et Rotorgene Q (Qiagen).

Calendrier prévisionnel d'accréditation :

- Génotypage des souches d'EV, parechovirus et rhinovirus par séquençage Sanger : **2024**

Tableau 34 - Liste récapitulative des techniques disponibles au laboratoire coordonnateur – CHU Clermont

Virus	Méthodes	Trousses, méthodes et références	Séquence génomique	Rythmicité	Capacité maximum par semaine	Délai minimum à réception
Entérovirus	Diagnostic générique par RT-PCR en temps réel	RT-PCR en temps réel (Enterovirus R-GENE®, bioMérieux) *	5' non codante	5j /7 j	360 - 900	4h
		RT-PCR en temps réel (Rhino&EV/Cc r-GENE®, bioMérieux)				
		RT-PCR en temps réel multiplex (détection EV/HRV) (BIOFIRE® Respiratory 2.1 plus Panel)				
		Automates disponibles : ABI7500, RotorGene (n=2), CFX96 (n=2), QuantStudio5 (n=3)				
Entérovirus	Diagnostic spécifique par RT-PCR en temps réel	Spécifique EV-D68 (Poelman <i>et al.</i> , 2015)	1D (VP1)	Période de circulation (6 j/7 j)	1080	4h
		Automate : ABI7500				
Entérovirus	Quantification de l'ARN viral	RT-PCR en temps réel quantitative développée par le laboratoire (Volle <i>et al.</i> , 2012) - Automate : RotorGene (n=2)	5' non codante	A la demande	Non applicable	4h
Entérovirus	Identification par génotypage : RT-PCR nichée et séquençage Sanger	Génotypage spécifique d'espèce : RT-PCR semi-nichées ciblant la région VP1 (gène 1D complet) pour les 4 espèces d'entérovirus A à D et développées par le laboratoire - Mirand <i>et al.</i> , 2008 (espèce B); 2012 (espèce A) ; 2014 (espèce A) ; 2016 (espèce D) – Espèce C, méthode non publiée.	1D (VP1) ou 1A-1B (VP4-VP2)	5j /7 j	120	48h
		Génotypage générique :				
		- RT puis PCR nichée ciblant la région VP1 (gène 1D partiel) (Nix <i>et al.</i> , 2008). - RT-PCR ciblant la région VP4/VP2 (gène complet 1A et partiel 1B) à l'aide des amorces décrites par Savolainen <i>et al.</i> , 2002, adaptée par le CNR Laboratoire coordonnateur (Henquell <i>et al.</i> , 2012). Cette PCR peut être suivie en cas d'échec par une PCR nichée à l'aide des amorces décrites par Linsuwanon <i>et al.</i> (2009).				

Tableau 34 – suite

Virus	Méthodes	Trousses, méthodes et références	Séquence génomique	Rythmicité	Capacité maximum par semaine	Délai minimum à réception
Entérovirus	Caractérisation précise des souches par séquençage haut débit	RT-PCR permettant l'amplification d'un génome complet à l'aide d'amorces spécifiques développées par le laboratoire coordonnateur (Tomba <i>et al.</i> , 2022 (espèce A), Duval <i>et al.</i> , 2021 (espèce D), espèces B et C (non publiées) puis séquençage haut débit longs fragments (Sequel I PacBio, sous traitance) ou fragments courts (Illumina NextSeq 2x150 paired end, plateforme de séquençage du laboratoire)	Génome complet	A la demande	92	72h
Entérovirus	Culture cellulaire et titrage	Lignées continues : cellules RD (dérivées d'un rhabdomyosarcome), cellules Véro (dérivées de rein de singe) Cellules diploïdes humaines : fibroblastes embryonnaires humains (MRC5)	Souche virale	Par série	Non applicable	7-15 jours
Entérovirus	Séroneutralisation	Lignée continue : cellules RD	-	Par série	Non applicable	-
Parechovirus	Diagnostic générique par RT-PCR en temps réel	RT-PCR en temps réel (Parechovirus R-GENE®, bioMérieux) * Automates : RotorGene (n=2)	5' non codante	5 j/7 j	360 - 900	4h
Parechovirus	Identification par géotypage : RT-PCR nichée et séquençage Sanger	RT puis PCR nichée ciblant la région VP1 complète puis séquençage Sanger (Nix <i>et al.</i> , 2010, optimisée par le CNR Laboratoire associé)	1D (VP1)	5 j/7 j	60	48h
Rhinovirus	Diagnostic générique par RT-PCR en temps réel	RT-PCR en temps réel (Rhino&EV/Cc r-gene®, bioMérieux) RT-PCR en temps réel multiplex (détection EV/HRV) (BIOFIRE® Respiratory 2.1 plus Panel)	5' non codante	5 j/7 j	360 - 900	4h
Rhinovirus	Identification par géotypage : RT-PCR +/- nichée et séquençage Sanger	RT-PCR classique ciblant la région VP4/VP2 (Henquell <i>et al.</i> , 2012, d'après les amorces décrites par Savolainen <i>et al.</i> , 2002) suivie en cas d'échec par une PCR nichée à l'aide des amorces décrites par Linsuwanon <i>et al.</i> (2009).	1A-1B (VP4-VP2)	5 j/7 j	240	48h

2.1.2 Laboratoire associé Lyon

Le laboratoire associé dispose d'un ensemble de méthodes de détection et de typage moléculaire des EV, HPeV et rhinovirus applicables à tous les échantillons biologiques reçus au laboratoire dans le cadre de la surveillance (LCS, échantillons nasopharyngés et de gorge, bronchiques, sanguins, de selles, prélèvements de vésicules, biopsies, liquide péricardique, surnageants de culture) (Tableau 35). Le typage de routine repose sur le séquençage NGS hebdomadaire d'amplicons correspondant à des régions génomiques ciblées. Pour les échantillons urgents, le séquençage est réalisé par un prestataire externe (délai post-PCR de rendu des séquences : 24h). Le séquençage du génome complet de souches sélectionnées est réalisable sur un mode hebdomadaire par séquençage direct de l'ARN (approche métatranscriptomique).

Par ailleurs, le LA dispose de méthodes de culture et de titrage applicables aux poliovirus et EV non polio.

Concernant la surveillance de la poliomyélite, le CNR EV-PeV fait partie du réseau international des laboratoires polio et est accrédité par l'OMS pour l'isolement par culture des poliovirus et le typage moléculaire des poliovirus par RT-PCR temps réel.

Enfin, il est en capacité de réaliser des sérologies polio par séroneutralisation et l'unique laboratoire de biologie médicale français habilité pour la mise en œuvre des poliovirus vaccinaux 2 et 3 (souches Sabin) pour la réalisation des sérologies polio complètes notamment pour les salariés travaillant pour les sites industriels producteurs de vaccin.

Accréditation des analyses

Analyses déjà accréditées :

- Isolement poliovirus en culture et typage moléculaire des poliovirus par RT-PCR (accréditation OMS)
- Recherche et identification d'acides nucléiques viraux Entérovirus D68 -RT-PCR temps réel EV-D68 spécifique (technique maison) sur ABI7500 et QS5 (Mai 2022) (COFRAC, norme ISO 15189)
- Recherche, identification et détermination de la concentration d'anticorps anti-poliovirus par séroneutralisation (Mai 2022) (COFRAC, norme ISO 15189)

Analyses à accréditer :

- PCR EV et HPEV générique : calendrier prévisionnel : 2025 (norme ISO 15189)
- Géotypage des souches d'EV, parechovirus et rhinovirus par séquençage haut-débit : calendrier prévisionnel : 2025 (norme ISO 15189)

2.1.3 Laboratoire coordonnateur Pasteur (Tableau 36)

- Isolement de poliovirus en culture cellulaire à partir de selles selon l'algorithme de l'OMS
- Isolement de poliovirus en culture cellulaire à partir d'eaux usées selon l'algorithme de l'OMS
- Différentiation intratypique des poliovirus selon l'algorithme de l'OMS

Tableau 35 - Liste récapitulative des techniques disponibles au laboratoire associé – CHU Lyon

Virus	Méthodes	Trousses, méthodes et références	Séquence génomique	Fréquence	Capacité par semaine	Délai minimum (à réception de l'échantillon)
Détection						
EV	Diagnostic générique par RT-PCR en temps réel	Enterovirus-R gene®, bioMérieux (ABI 7500 ou QuantStudio)	5' NC	1 à 5/7*	90 - 540	6h
		BIOFIRE® FILMARRAY® Meningitis/Encephalitis (ME) Panel		5/7		1h (LCS)
EV	RT-PCR en temps réel spécifique EV-D68	Poelman <i>et al.</i> , J Clin Virol, 2015 (ABI 7500 ou MGI)	5' NC	1 à 5/7*	90 - 1080	6h
HPeV	Diagnostic générique par RT-PCR en temps réel	Parechovirus-R gene®, bioMérieux (ABI 7500 ou QuantStudio)	5' NC	1 à 5/7*	90-540	6h
		BIOFIRE® FILMARRAY® Meningitis/Encephalitis (ME) Panel		5/7		1h (LCS)
RV	Diagnostic générique par RT-PCR en temps réel	Panther Fusion® RV/ADV/MPV assay	5' NC	5/7	90-540	3h
Typage moléculaire par RT-PCR temps réel						
POLIO		rRT-PCR ITD 5.1 kit		1 à 5/7	50 en cas d'alerte	6h (après isolement virus en culture)
		rRT-PCR VDPV 5.0 kit				
Typage moléculaire par RT-PCR nichée et séquençage Sanger des amplicons (échantillons urgents)						
EV	Typage par RT-PCR et Séquençage Sanger	Génotypage spécifique d'espèce: RT-PCR semi-nichées ciblant la région VP1 (gène 1D complet) pour les espèces d'entérovirus A, B et D (amorces développées par le laboratoire coordonnateur) (Mirand <i>et al.</i> , 2008 ; Mirand <i>et al.</i> , 2012)	VP1	1 à 5/7	24-96	48-96h
		Génotypage générique :	VP4-VP2			
		- RT puis PCR nichée ciblant la région VP1 (gène 1D partiel) (Nix <i>et al.</i> , 2008) adaptée par le laboratoire associé du CNR.				
		- RT-PCR ciblant la région VP4/VP2 (gène complet 1A et partiel 1B) (Savolainen <i>et al.</i> , 2002) adaptée par le laboratoire coordonnateur du CNR et complétée en cas d'échec par une PCR nichée (Linsuwanon <i>et al.</i> 2009) adaptée par le laboratoire associé du CNR.				
		Séquençage Sanger sur ABI 3730XL				

Tableau 35 - suite

Virus	Méthodes	Trousses, méthodes et références	Séquence génomique	Fréquence	Capacité par semaine	Délai minimum (à réception de l'échantillon)
HPeV	Typage par RT-PCR et Séquençage haut-débit d'amplicons	RT puis PCR nichée ciblant la région VP1 complète (Nix <i>et al.</i> , 2010), optimisée par le CNR Laboratoire associé Séquençage Sanger sur ABI 3730XL	VP1	1 à 5/7*	24-96	48-96h
RV	Typage par RT-PCR et Séquençage haut-débit d'amplicons	- RT-PCR ciblant la région VP4/VP2 (gène complet 1A et partiel 1B) (Savolainen <i>et al.</i> , 2002) adaptée par le laboratoire coordonnateur du CNR et complétée en cas d'échec par une PCR nichée (Linsuwanon <i>et al.</i> (2009) adaptée par le laboratoire associé du CNR. Séquençage Sanger sur ABI 3730XL	VP4-VP2	1 à 5/7*	24-96	48-96h
Typage moléculaire par RT-PCR nichée et séquençage haut débit des amplicons (échantillons non urgents)						
EV	Typage par RT-PCR et Séquençage haut-débit d'amplicons	Même techniques de RT-PCR nichées Séquençage Illumina sur NovaSeq après poolage des amplicons	VP1 VP4-VP2	1 à 2/7*	90 - 380	10-15 jrs (un à 2 runs hebdomadaires selon besoins)
HPeV	Typage par RT-PCR et Séquençage haut-débit d'amplicons	Mêmes techniques de RT-PCR nichées Séquençage Illumina sur NovaSeq après poolage des amplicons	VP1	1 à 2/7*	90 - 380	10-15 jrs
RV	Typage par RT-PCR et Séquençage haut-débit d'amplicons	Mêmes techniques de RT-PCR Séquençage Illumina sur NovaSeq après poolage des amplicons	VP4-VP2	1 à 2/7*	90 - 380	10-15 jrs
Séquençage haut débit de génomes complets						
EV HPeV RV	Caractérisation des génomes complets par séquençage haut débit	- Approche métatranscriptomique sur TECAN DreamPrep™ NGS workstation (Revelo™ RNA-Seq high sensitivity library preparation kit) puis séquençage Illumina sur NavaSeq	Génome complet	Par séries hebdomadaires selon besoins	90	5-10 jrs

Tableau 35 – suite

Virus	Méthodes	Trousses, méthodes et références	Séquence génomique	Fréquence	Capacité par semaine	Délai minimum (à réception de l'échantillon)
Sérologies polio						
PV		Technique par séroneutralisation (durée : 6 jours) permettant le titrage des Ac anti-polio 1, 2 et 3	Non applicable	1 à 2/7	60	7-21 jours
Culture virus sur lignées cellulaires +/- titrage						
Poliovirus	Culture sur lignées cellulaires et titrage	Lignées continues : L20B et RD	Non applicable	A la demande	Non applicable	2-15 jours***
Entérovirus	Culture sur lignées cellulaires et titrage	Lignées continues : cellules HEP2, VERO, RD Cellules diploïdes humaines : MRC5	Non applicable	Par série ou à la demande	Non applicable	2-15 jours***

*Selon nombre de demandes ; **Pour les demandes de typage urgente, le typage par séquençage partiel des génomes est réalisé par un prestataire externe (délai de rendu des séquences post-PCR : 24h) ;

*** Selon la vitesse de réplication des virus \$ Techniques réalisées sur le plateau mutualisé de Biologie Moléculaire

Tableau 36 – Liste récapitulative des techniques disponibles au laboratoire associé – Institut Pasteur

Virus	Méthodes	Trousses, méthodes et références	Séquence génomique	Fréquence	Capacité par semaine	Délai minimum (à réception de l'échantillon)
Détection						
EV	Détection générique par RT-PCR en temps réel	Monpoeho <i>et al.</i> Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002 Jul;21(7):532-6. doi: 10.1007/s10096-002-0766-5.	5' NC	À la demande	120	5 h
Typage moléculaire par RT-PCR temps réel						
POLIO	Kits OMS	rRT-PCR ITD 6 kit rRT-PCR VDPV 5.2 kit		À la demande	960	5 h
Caractérisation génétique des poliovirus						
POLIO	Séquençage Sanger de la région VP1 après amplification par RT-PCR	Burns <i>et al.</i> (2016). Methods in Molecular Biology, vol 1387. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3292-4_9	VP1	À la demande	120	36-72 h
POLIO	Séquençage haut-débit d'amplicons	► RT-PCR avec une batterie d'oligonucléotides générant des fragments chevauchants (Joffret <i>et al.</i> Front Microbiol. 2018 Sep 28;9:2339. doi: 10.3389/fmicb.2018.02339 & Bessaud <i>et al.</i> Front Microbiol. 2016 Aug 26;7:1294. doi: 10.3389/fmicb.2016.01294) puis séquençage Illumina.	Génome complet	À la demande	50	4-8 j
Typage moléculaire par RT-PCR nichée et séquençage Sanger des amplicons						
EV	Typage par RT-PCR et Séquençage Sanger	► Génotypage générique : - RT puis PCR nichée ciblant la région VP1 (gène 1D partiel) (Nix <i>et al.</i> , 2008) adaptée par le laboratoire associé du CNR.	VP1	À la demande	128	48-72 h
Typage moléculaire par RT-PCR et séquençage haut débit des amplicons						
EV	Typage par RT-PCR et Séquençage haut-débit d'amplicons	► RT-PCR amplifiant toute la capsid (Joffret <i>et al.</i> Front Microbiol. 2018 Sep 28;9:2339. doi: 10.3389/fmicb.2018.02339.) puis séquençage Illumina.	5'NC-2C	À la demande	120	3-7 j

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

Il existe des trousse commerciales pour la détection moléculaire des EV et des HPeV dans différents échantillons biologiques. La performance de ces tests est évaluée régulièrement par le contrôle de qualité européen (QCMD) distribué annuellement par le CNR EV-HPeV. S'il apparaît un manque de sensibilité d'une trousse commerciale (pour un virus spécifique ou le genre entier), une information est faite auprès des membres du RSE.

De nouvelles trousse commerciales ou celles dont l'usage se répand sont testées régulièrement par le CNR (résultats partagés et/ou publiés).

3. Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)

L'Annexe 3 est disponible dans un document à part.