



Étude du réassortiment génétique des virus influenza d'origines et de sous-types différents

Maude Duchamp Bouscambert-Duchamp

► To cite this version:

Maude Duchamp Bouscambert-Duchamp. Étude du réassortiment génétique des virus influenza d'origines et de sous-types différents. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10084 . tel-00733681

HAL Id: tel-00733681

<https://theses.hal.science/tel-00733681>

Submitted on 19 Sep 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Ecole Doctorale E2M2

Evolution, Ecosystème, Microbiologie et Modélisation

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

Présentée et soutenue publiquement le **14 juin 2010**

par

Maude BOUSCAMBERT-DUCHAMP

**ETUDE DU REASSORTIMENT GENETIQUE DES VIRUS
INFLUENZA D'ORIGINES ET DE SOUS-TYPES
DIFFERENTS**

Directeur de thèse : **Monsieur le Professeur Bruno LINA**
Co-directeur de thèse : **Madame le Professeur Florence MORFIN**

Jury : **Madame le Professeur Astrid VABRET (rapporteur)**
Monsieur le Professeur Jacques IZOPET (rapporteur)
Monsieur le Professeur Bruno POZZETO (président)
Monsieur le Professeur Christopher PAYAN
Monsieur le Professeur Bruno LINA
Madame le Professeur Florence MORFIN

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie
Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. Collet

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en
Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques
et Sportives

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur
de Lyon

Institut Universitaire de Technologie A

Institut Universitaire de Technologie B

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. Le Professeur F. Gieres

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur R. Lamartine

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M R. Bernard

REMERCIEMENTS

Je tiens, pour commencer, à remercier **Madame le Professeur Astrid Vabret** et **Monsieur le Professeur Jacques Izopet** qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et d'accomplir la lourde tâche d'en être les rapporteurs. Un grand merci à Monsieur le **Professeur Bruno Pozzeto** et Monsieur le **Professeur Christopher Payan** qui ont eu la gentillesse d'accepter de participer à ce jury. Je vous prie de trouver dans ces quelques lignes, l'expression de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

Un grand merci à **Monsieur le Professeur Bruno Lina**, qui m'a accueillie dans son laboratoire en 2003, m'a donnée la chance de m'impliquer dans l'univers « influenza » puis qui m'a encadrée dans ce long travail de Thèse (ainsi que dans mes premiers pas audiovisuels !). Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde estime et de ma grande admiration.

Je tiens à remercier chaleureusement **Madame le Professeur Florence Morfin**, qui a accepté de co-encadrer ce travail. Merci de l'avoir fait avec cette volonté de conseiller sans jamais rien imposer. J'ai beaucoup appris. J'espère vivement que nous continuerons à avoir des projets communs, le premier étant ce travail de Thèse, le deuxième, plus personnel, ayant une échéance estivale !

Je tiens également à remercier tous ceux qui ont contribué à l'élaboration de ce travail par leur participation, leur soutien et leur volonté de me libérer du temps :

A l'équipe *Café* : **Geneviève Billaud, Emilie Frobert,**

Yahia Mekki, Isabelle Schuffenecker

A l'équipe *Grippe* : **Martine Valette, Olivier Ferraris, Vanessa Escuret,**

Michelle Ottman, Vincent Moulès, Manuel Rosa-Calatrava

A l'équipe *technique* : Gwendolyne Burfin, Stéphanie Mundweiler, Nathalie Rivat

Ainsi qu'à l'ensemble du personnel du Laboratoire de Virologie et de la FRE 3011, pour leur disponibilité et surtout la gentillesse dont ils ont toujours fait preuve à mon égard pendant toutes ces années.

A Vincent, Léonard et Daphnée,

A mes parents.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	8
LISTE DES TABLEAUX.....	9
LISTE DES ANNEXES.....	10
INTRODUCTION.....	11
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	14
1. Virus.....	14
1.1. Description	14
1.1.1. Structure du virus influenza	14
1.1.2. Cycle de réplication du virus influenza.....	19
1.2. Mécanismes d'évolution des virus influenza	23
1.2.1. Dérive antigénique	23
1.2.2. Cassure antigénique.....	24
1.3. Facteurs de virulence et de restriction d'hôte du virus influenza.....	28
2. Epidémiologie : épidémies et pandémies	37
2.1. Epidémies saisonnières	37
2.2. Pandémies du XX ^{ème} siècle	37
2.3. Menaces pandémiques.....	40
2.4. Pandémie du XXI ^{ème} siècle	41
3. Infection grippale	44
3.1. Modes de transmission.....	44
3.2. Pathogenèse et clinique chez l'homme de l'infection grippale.....	45
3.2.1. Grippe saisonnière.....	47
3.2.2. Grippe aviaire.....	47
3.2.3. Grippe A(H1N1)2009	50
4. Diagnostic.....	51
5. Traitements antiviraux et résistances	55
5.1. Les inhibiteurs de la pompe à protons (amantadine et rimantadine).....	55
5.2. Les inhibiteurs de la neuraminidase (INA)	56
6. Prévention.....	56
TRAVAUX ORIGINAUX.....	57
A. Outils et protocoles développés.....	57
1. Quantification virale.....	57
1.1. Principe.....	57
1.2. Caractéristiques	58
1.3. Applications	58
1.3.1. Quantification virale dans les prélèvements et stratégie de suivi de l'excrétion virale.....	59

1.3.2. Développement d'un protocole de cinétique de croissance virale	61
2. Production de virus réassortants par génétique inverse	64
2.1. Principe de la génétique inverse	65
2.2. Souches virales étudiées	65
2.3. Production d'un clone de génétique inverse	66
2.4. Production de virus réassortants	71
3. Production de virus réassortants par co-infection virale	71
3.1. Principe de la co-infection virale	71
3.2. Développement d'un protocole de super-infection virale	72
3.3. Développement d'un protocole de co-infection virale simultanée	72
3.4. Sélection des clones de virus réassortants	72
B. Résultats : Partie I	74
1. Quantification virale	74
1.1. Grippe A(H1N1)2009 : intérêts de la mesure de l'excrétion virale nasale	74
1.1.1. Introduction	80
1.1.2. Performances de la RT-PCR M quantitative et optimisation	80
1.1.2.1. Performances de la technique	80
1.1.2.2. Optimisation de la technique	83
1.1.3. Correction des charges virales	84
1.1.4. Analyse des résultats et discussion	85
1.2. Grippe saisonnière : apport de la bithérapie Oseltamivir-Zanamivir	87
1.2.1. Introduction	87
1.2.2. Correction des charges virales	88
1.2.3. Analyse des résultats et discussion	88
2. Cinétique de croissance virale : caractérisation de virus influenza émergents	95
2.1. Caractérisation des virus influenza réassortants A(H1N1)2009 résistants à l'oseltamivir	95
2.2. Caractérisation des virus influenza A(H3N0)	95
2.2.1 Introduction	96
2.2.2. Analyse des résultats	96
2.3. Caractérisation de virus influenza A(H1N1) résistants à l'oseltamivir ayant circulé au cours de l'hiver 2007-2008	99
2.3.1. Introduction	100
2.3.2. Analyse des résultats	100
2.3.2.1. Paramètres de cinétique enzymatique de la NA	100
2.3.2.1. Cinétiques de croissance virale	101
C. Résultats : Partie II	103
1. Co-infections virales : étude du réassortiment génétique entre des virus d'origines et de sous-types différents	103
1.1. Etude du réassortiment génétique entre les virus influenza A(H1N1)2009 et A(H1N1) résistants à l'oseltamivir	103
1.1.1. Introduction	119
1.1.2. Protocole d'obtention de virus réassortants	120
1.1.3. Résultat du criblage des virus réassortants	120

1.1.4. Capacités répliquatives des virus réassortants.....	121
1.1.5. Résultats complémentaires : criblage complet des virus réassortants.....	122
1.2. Etude du réassortiment génétique entre les virus influenza A(H5N1) et A(H1N1)2009.....	124
1.2.1. Introduction	124
1.2.2. Obtention des virus réassortants et résultats du criblage.....	124
1.2.3. Séquençage complet du génome des virus réassortants	127
2. Génétique inverse : étude du réassortiment génétique entre des virus d'origines et de sous-types différents.....	131
2.1. Introduction	131
2.2. Etude du réassortiment génétique entre les virus influenza A(H5N2) aviaire et A(H3N2) humain.....	131
2.3. Etude du réassortiment génétique entre les virus influenza A(H5N1) aviaire et A(H3N2) humain.....	134
D. Discussion	137
Quantification virale.....	137
Cinétiques de croissance virale	140
Etude de l'émergence d'un virus A(H1N1)2009 résistant à l'oseltamivir.....	142
<i>Obtention de virus réassortants par co-infection virale</i>	<i>142</i>
<i>Caractérisation des virus influenza A(H1N1)2009 résistants à l'oseltamivir.</i>	<i>143</i>
Etude du réassortiment génétique entre des virus influenza d'origines différentes	144
<i>A(H5N1) et A(H3N2).....</i>	<i>144</i>
<i>A(H5N2) et A(H3N2).....</i>	<i>144</i>
<i>A(H5N1) et A(H1N1)2009.....</i>	<i>144</i>
<i>A(H5N1) et A(H1N1)2009 résistants à l'oseltamivir (R16).....</i>	<i>144</i>
<i>A(H1N1)2009 et A(H1N1) Brisbane-like résistants à l'oseltamivir</i>	<i>144</i>
<i>Choix des virus influenza étudiés</i>	<i>145</i>
<i>Obtention de virus réassortants par génétique inverse.....</i>	<i>146</i>
<i>Etude de la compatibilité entre des segments de gènes d'origines différentes. ...</i>	<i>147</i>
<i>Conséquences de l'émergence de nouveaux virus influenza.....</i>	<i>152</i>
E. Conclusions et perspectives	154
ANNEXES	157
ANNEXE 1	158
ANNEXE 2	159
ANNEXE 3	160
ANNEXE 4	161
ANNEXE 5	162
AUTRES PUBLICATIONS	170
COMMUNICATIONS ORALES	173
COMMUNICATIONS AFFICHEES	175
ENSEIGNEMENTS.....	176
BIBLIOGRAPHIE	163

LISTE DES FIGURES

Figure 1: représentation schématique d'une particule de virus influenza A	15
Figure 2 : modélisation de la structure et de la répartition de l'hémagglutinine et de la neuraminidase à la surface du virus influenza	18
Figure 3 : structure et fonctions de la HA et de la NA des virus influenza	18
Figure 4: représentation schématique du cycle de réplication virale du virus influenza A	21
Figure 5: modèles d'évolution des virus influenza du type A, B et C chez l'homme	24
Figure 6: mécanismes d'émergence d'un nouveau sous-type de virus influenza par réassortiment génétique (A) ou transmission directe (B)	27
Figure 7 : origines du virus A(H1N1)2009	43
Figure 8: répartition des récepteurs cellulaires du virus influenza de types $\alpha 2-3$ et $\alpha 2-6$	46
Figure 9: exemple de cinétique de croissance virale de deux virus influenza réalisées sur MDCK	63
Figure 10: représentation schématique du plasmide d'expression phw2000	68
Figure 11 : représentation schématique de la procédure permettant de produire un système de génétique inverse (A) et un virus influenza infectieux par génétique inverse (B)	70
Figure 12: constellation des gènes internes des virus réassortants produits par co-infection virale entre les virus A(H1N1)2009 et A(H1N1) Brisbane-like résistants à l'oseltamivir	123
Figure 13 : stratégie de criblage des virus réassortants obtenus par co-infections virales entre les virus A(H5N1) et A(H1N1)2009 sauvage et résistant à l'oseltamivir (H275Y)	125
Figure 14 : constellation des gènes internes des virus réassortants produits par co-infection virale entre les virus A(H5N1) et A(H1N1)2009 (série MV)	129
Figure 15 : constellation des gènes internes des virus réassortants produits par co-infection virale entre les virus A(H5N1) et le virus réassortant R16 [A(H1N1)2009 H275Y résistant à l'oseltamivir] (série MR)	130
Figure 16: étude de la compatibilité des gènes internes constituant des virus réassortants produits par génétique inverse entre le virus aviaire A(H5N2) et le virus humain A(H3N2)	133
Figure 17: étude de la compatibilité de différentes constellations de gènes internes de virus réassortants produits par génétique inverse entre les virus A(H5N1) et A(H3N2)	136

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : caractéristiques des segments de gène et des protéines qui constituent un virus influenza A [A/Puerto Rico/8/34]	16
Tableau 2 : diversité génétique des virus A(H5N1) : récapitulatif des différents clades et sous-clades définis dans la classification des virus influenza A(H5N1)	25
Tableau 3 : facteurs de virulence et de restriction d'hôte des virus influenza A	29
Tableau 4 : spécificité d'espèce de l'hémagglutinine	31
Tableau 5 : signatures génomiques en acides aminés définissant l'origine aviaire ou humaine des virus influenza	36
Tableau 6: caractéristiques comparées des trois pandémies grippales du XX ^{ème} siècle	38
Tableau 7: caractéristiques des souches de virus influenza utilisées pour la production des systèmes de génétique inverse utilisés dans notre étude	66
Tableau 8: panel de virus influenza A de sous-types variés détectés par la RT-PCR M	82
Tableau 9 : liste des souches de virus influenza A(H1N1) sensibles ou résistants à l'oseltamivir étudiées	101
Tableau 10: constellation de gènes des virus réassortants R16 et R28 produits par co-infection virale entre les virus A(H1N1)2009 et A(H1N1) résistant à l'oseltamivir	121
Tableau 11 : tableau récapitulatif des compatibilités et des incompatibilités entre segments de gènes issus de virus influenza d'origines différentes	149

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1

VIROLOGICAL EFFICACY AND SAFETY OF OSELTAMIVIR ZANAMIVIR COMBINATION
COMPARED TO EACH MONOTHERAPY FOR SEASONAL INFLUENZA: A RANDOMIZED TRIAL

*X. Duval, S. van der Werf, T. Blanchon, A. Mosnier, **M. Bouscambert - Duchamp**, Tibi, V.Enouf, C.Charlois –
Ou, C. Vincent, L. Andreoletti, F. Tubach, B. Lina, F. Mentré, C.Lepout*

Soumis dans PLoS Medecine, 26 avril 2010.

Annexe 2

IN VITRO CHARACTERIZATION OF NATURALLY OCCURRING INFLUENZA A(H3N0) VIRUSES
LACKING THE NA GENE SEGMENT: TOWARD A NEW MECHANISM OF VIRAL RESISTANCE

*V. Moules, O. Ferraris, O. Terrier, E. Guidice, M. Yver, J.P. Rolland, **M. Bouscambert-Duchamp**, C. Bergeron,
M. Ottmann, E. Fournier, A. Traversier, C. Boule, A. Rivoire, L. Yipu, A. Hay, M. Valette, R. Marquet, M. Rosa-
Calatrava, N. Naffakh, G. Schoehn, D. Thomas, B.Lina.*

Accepté dans Virology, 27 avril 2010.

Annexe 3

OSELTAMIVIR-RESISTANT INFLUENZA A(H1N1) VIRUSES IN SOUTH OF FRANCE, 2007-2009.

*J.S. Casalegno, **M. Bouscambert-Duchamp**, V. Caro, I. Schuffenecker, M. Sabatier, A. Traversier, M. Valette, B.
Lina, O. Ferraris, V. Escuret.*

Accepté dans Antiviral Research, 20 mai 2010.

Annexe 4

GRIPPE AVIAIRE CHEZ L'ENFANT.

***M. Bouscambert-Duchamp**, B. Lina, F. Morfin,*

Arch Ped.2009; 16: S101-107.

Annexe 5

INTERET DES INHIBITEURS DE LA NEURAMINIDASE DANS LA PRISE EN CHARGE DES
INFECTIONS DUES AUX VIRUS INFLUENZA.

*O. Ferraris, V. Escuret, **M. Bouscambert-Duchamp**, B. Lina, F. Morfin.*

Article en français

Pathol Biol 2010 ; 58(2) :e69-78. Epub 2010 Mar 19.

INTRODUCTION

Contexte

Notre unité de recherche, FRE CNRS 3011- Université Lyon 1, travaille sur l'étude des virus influenza et de l'infection grippale. Une des thématiques développée vise à déterminer les mécanismes de réassortiment génétique. En 2005, dans le contexte de l'extension rapide, depuis 1997, de l'épizootie due au virus A(H5N1) et de la menace pandémique qu'il représente, le projet « Grippe aviaire et grippe pandémique » s'est organisé avec différents partenaires académiques et industriels, au sein de LyonBiopôle. Ce projet avait pour objectif principal le développement d'un vaccin dirigé contre le virus A(H5N1) reposant, sur le plan virologique, sur la caractérisation du pouvoir pathogène du virus influenza A(H5N1).

A cette date, il avait été rapporté que ce virus présentait un comportement atypique : tropisme particulier pour les tissus pulmonaires immatures de l'enfant et pour le système nerveux central et détection de virus dans les selles des patients infectés. L'adaptation à l'homme d'un tel virus faisait craindre une situation pandémique catastrophique similaire à celle observée lors de la grippe espagnole de 1918. Un plan pandémique a donc été mis en place en France, en 2004, comme dans beaucoup d'autres pays afin de faire l'acquisition rapide d'un stock d'antiviraux (Oseltamivir) et de préparer un vaccin maquette anti-A(H5N1) (Sanofi-Pasteur). En 2005, une seule étude sur la pathogénèse des souches A(H5N1) chez le macaque avait été réalisée en utilisant des souches qui avaient été isolées de patients en 1997 ¹. Or il était clair, que le virus influenza A(H5N1) évoluait rapidement et que les souches circulant depuis 2003 montraient une virulence plus importante ². Aucune étude n'avait encore été réalisée chez le furet.

Outils développés

En 2000, le système de production de virus influenza *in vitro* par génétique inverse avait été mis au point. Il s'agit d'une technologie complexe de transfection d'une lignée cellulaire avec 8 plasmides comprenant chacun la séquence ADN d'un seul segment génomique du virus influenza ³. Grâce à ce système, il est possible de produire *in vitro* tous les virus influenza de type A, y compris des virus résultant d'un mélange de segments de gènes issus de souches virales d'origine humaines et animales, reproduisant ainsi les mécanismes de réassortiment génétique. Nous avons donc développé les systèmes de génétique inverse des souches de virus influenza (i) humain saisonnier A/Moscow/10/99 (H3N2), (ii) aviaires A/Finch/England/2051/02 (H5N2) et (iii) aviaires isolées chez l'homme A(H5N1)

A/Vietnam/1194/2004 et A/Turkey/582/2006. En utilisant ces systèmes, nous avons construit des virus réassortants sur le schéma suivant : le fond génétique du virus saisonnier A(H3N2) et un ou plusieurs segments de gène issus du virus A(H5N1) hautement pathogène ou du virus A(H5N2) faiblement pathogène. L'étude de leur pouvoir pathogène a été étudiée en réalisant des cinétiques de croissance sur système cellulaire afin de pouvoir comparer leurs capacités répliquatives. La détermination des quantités de virus de chacun des points de cinétique aurait pu être réalisée en titrage infectieux sur cellules, mais nous avons développé un outil de biologie moléculaire permettant la quantification des génomes viraux par RT-PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR M).

Déroulement de l'étude

Notre travail a été rythmé par les contraintes inhérentes au transfert et à la manipulation de souches hautement pathogènes. En effet, nous n'avons disposé des souches de virus A(H5N1) qu'à partir de juillet 2006 et la demande d'agrément pour la production d'organismes génétiquement modifiés en confinement de niveau 4 que nous avons demandée n'a été acceptée qu'en juin 2007. Notre projet sur l'étude du pouvoir pathogène des virus influenza A(H5N1) s'est construit donc sur deux approches : une étude du réassortiment forcé par génétique inverse et une étude du réassortiment naturel par co-infections virales.

La première approche d'étude par réassortiment forcé (génétique inverse) visait à réaliser une étude systématique de l'impact des segments de gène de virus aviaire isolé ou associé sur un fond génétique humain (souche de virus A(H3N2) circulante). En mai 2008, une étude comparable a été publiée. Chen *et al.* ont produit 63 virus par génétique inverse en étudiant l'impact de l'introduction d'un ou plusieurs segments aviaires sur un fond génétique humain A(H3N2) possédant les glycoprotéines de surface aviaires (H5 et N1) ⁴. Ils ont utilisé une souche A(H5N1) isolée en 2004 et appartenant au clade 1 et ont caractérisé les capacités répliquatives de ces virus en réalisant des essais de plages de lyse (nombre et diamètre des plages) ainsi que des titrages infectieux. Notre approche systématique a donc été remplacée par une approche ciblée sur l'étude d'un nombre plus restreint de constellations de gènes appartenant à des souches aviaires faiblement pathogènes A(H5N2) A/Finch/2051/2002 et hautement pathogène A(H5N1) A/Vietnam/1094/2004. Cette approche visait à étudier la compatibilité entre des segments de gènes d'origines aviaire ou humaine.

En parallèle de cette première approche par génétique inverse, nous avons entrepris d'évaluer, dans des conditions de réassortiment naturel (co-infection), quelles pouvaient être les combinaisons de gènes, aviaires et humains, des virus qui pourraient émerger spontanément et quel en serait l'impact sur leur capacités répliquatives et donc sur leur virulence.

Pour cette partie du projet, nous avons envisagé d'étudier le réassortiment naturel entre la souche A(H3N2) humaine et les souches A(H5N1) aviaires (niveau de sécurité BSL4) d'une part et A(H5N2) aviaire d'autre part (niveau de sécurité BSL3). Des co-infections ont été réalisées sur MDCK (cellules Madin Darby canine kidney) et les différentes populations virales, issues du réassortiment et présentes dans le surnageant de culture cellulaire, ont ensuite été isolées en réalisant des plages de lyse. Chaque clone viral a ensuite été séquencé pour déterminer l'origine de ses gènes (A(H3N2) ou A(H5N1)/A(H5N2)). A l'issue des premiers résultats, nous avons dû réévaluer notre protocole de co-infection afin de prendre en compte les propriétés hautement répliquatives du virus A(H5N1). Une stratégie de co-infection virale à des temps différés et en présence d'oseltamivir a été développée, ainsi que des RT-PCR spécifiques de criblage des clones avant séquençage.

En avril 2009, l'émergence du virus influenza A(H1N1)2009, notre accès facilité à ce virus et les conditions de co-infection déjà mises au point, nous ont permis d'envisager d'orienter rapidement notre travail sur le virus pandémique A(H1N1)2009 et d'essayer de répondre à certaines questions importantes sur le plan de la santé publique:

- peut-il acquérir, par réassortiment, la neuraminidase mutée des virus A(H1N1) saisonniers ayant circulé en 2008 et résistants à l'oseltamivir ?
- le réassortiment est-il possible entre ce virus et le virus A(H5N1) ? et si oui, quelles en seraient les constellations de gènes les plus fréquentes et quelle serait la virulence estimée de ce nouveau virus ?

L'objectif principal de ces travaux est de participer à l'estimation du risque de voir survenir l'émergence d'un virus pandémique résistant au principal antiviral disponible, d'une part, et de caractériser les différents virus à potentiel pandémique pouvant émerger, d'autre part. Une meilleure connaissance de ces éléments pourrait permettre de mieux anticiper les mesures à prendre en cas d'émergence réelle de ces virus.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Virus

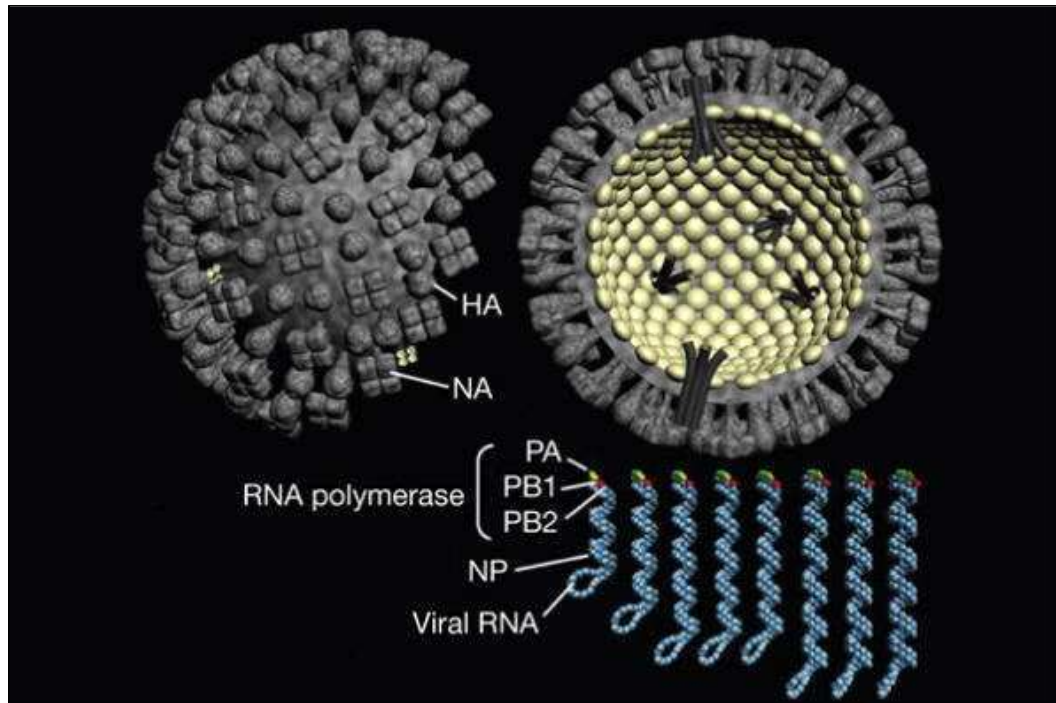
1.1. Description

Les virus influenza appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae* qui est une famille de virus enveloppés, dont le génome est constitué d'ARN segmenté de polarité négative. Elle comprend 5 genres : virus influenza A, B et C, Thogoto virus et Isavirus. La classification du genre *influenza virus* repose sur la nature de leurs protéines de matrice, de leurs glycoprotéines de surface et sur la taille de leur génome ⁵. Au sein du type A, les virus influenza sont classés en fonction de la nature de leur glycoprotéines des surface : hémagglutinine (HA) et neuraminidase (NA). Seize sous-types de HA et 9 de NA ont été identifiés sur la base de leur séquence nucléotidique et de leurs propriétés antigéniques ⁶. La nomenclature des virus influenza est la suivante : le type, l'hôte d'origine (sauf pour les virus humains), le lieu d'isolement, le numéro de la souche, l'année d'isolement suivie de la description du sous-type antigénique (ex : A/Finch/England/2051/2002 (H5N2)).

1.1.1. Structure du virus influenza

Les particules de virus influenza A sont enveloppées et ont un diamètre de 80 à 120 nm (Figure 1). Leur génome, constitué d'un ARN simple brin de polarité négative est divisé en 8 segments de gène qui codent 11 protéines différentes (Figure 1 et tableau 1). L'enveloppe virale est constituée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont insérées 3 protéines transmembranaires : la HA, la NA et la protéine M2 comportant un canal à protons. La bicouche lipidique est constituée d'une mosaïque de radeaux lipidiques enrichis en cholestérol et de lipides non intégrés dans des radeaux, issus de la membrane plasmique de la cellule-hôte⁷. La HA et la NA sont ancrées dans les radeaux lipidiques alors que la protéine M2 est liée à des molécules de cholestérol indépendantes des radeaux lipidiques ⁸ (Figure 2).

Figure 1: représentation schématique d'une particule de virus influenza A (d'après ⁹)



Une particule de virus influenza A possède deux types de glycoprotéines de surface, HA (hémagglutinine) et NA (neuraminidase). Le génome est constitué de 8 segments d'ARN simple brin de polarité négative qui interagissent avec la protéine NP (nucléoprotéine) et le complexe polymérase (PB2, PB1 et PA) (Neumann et al., Nature 2009).

Tableau 1 : caractéristiques des segments de gène et des protéines qui constituent un virus influenza A [A/Puerto Rico/8/34] (d'après⁵).

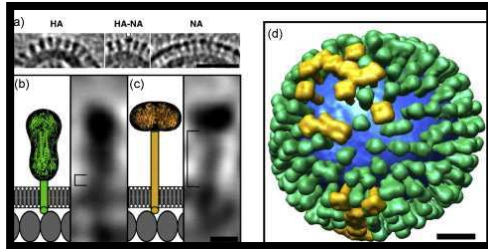
Gène			Protéine				
Nomenclature		Taille (pb)	Nomenclature		Taille (aa)	Fonctions de la protéine	Nombre de protéines par virions
1	PB2	2341	PB2	759	Composante de l'ARN polymérase		30-60
2	PB1	2341	PB1	757	Composante de l'ARN polymérase, endonucléase		30-60
			PB1-F2	87	Activité pro-apoptotique (virulence)		/
3	PA	2233	PA	716	Composante de l'ARN polymérase, protéase		30-60
4	HA	1778	HA	550	Gp de surface, liaison au récepteur cellulaire, activité de fusion membranaire, Ag majeur		500
5	NP	1565	NP	498	Liaison, synthèse et export nucléaire de l'ARN		1000
6	NA	1413	NA	454	Gp de surface, activité neuraminidase, Ag		100
7	M	1027	M1	252	Protéine de matrice, interaction entre RNPv et gp de surface, export nucléaire des RNPv et bourgeonnement		3000
			M2	97	Protéine membranaire, canal ionique, assemblage du virion		20-60
8	NS	890	NS1	230	Activités diverses, antagoniste de l'IFN		/
			NEP/NS2	121	Export nucléaire des RNPv		130-200

Gp : glycoprotéine ; Ag : antigène ; RNPv : ribonucléoprotéine virale ; IFN : interféron ; pb : paire de base ; aa : acides aminés.

La HA est la glycoprotéine de surface la plus abondante (environ 80% des glycoprotéines de surface soit 500 protéines/virion) (Tableau 1) et forme une spicule trimérique possédant le RBS (« receptor binding site ») qui est le site de reconnaissance du récepteur cellulaire (Figure 2 et 3B). La HA est aussi l'antigène de surface majeur. Celle des virus H3 a été cristallisée et 5 domaines antigéniques (A à E) ont été identifiés sur la structure en 3 dimensions de la partie globulaire de chaque monomère (une HA complète est trimérique). Le clivage du précurseur de la HA (HA0) en HA1 (C-terminal) et HA2 (N-terminal) est une étape critique de l'infection virale de la cellule-hôte (Figure 3B).

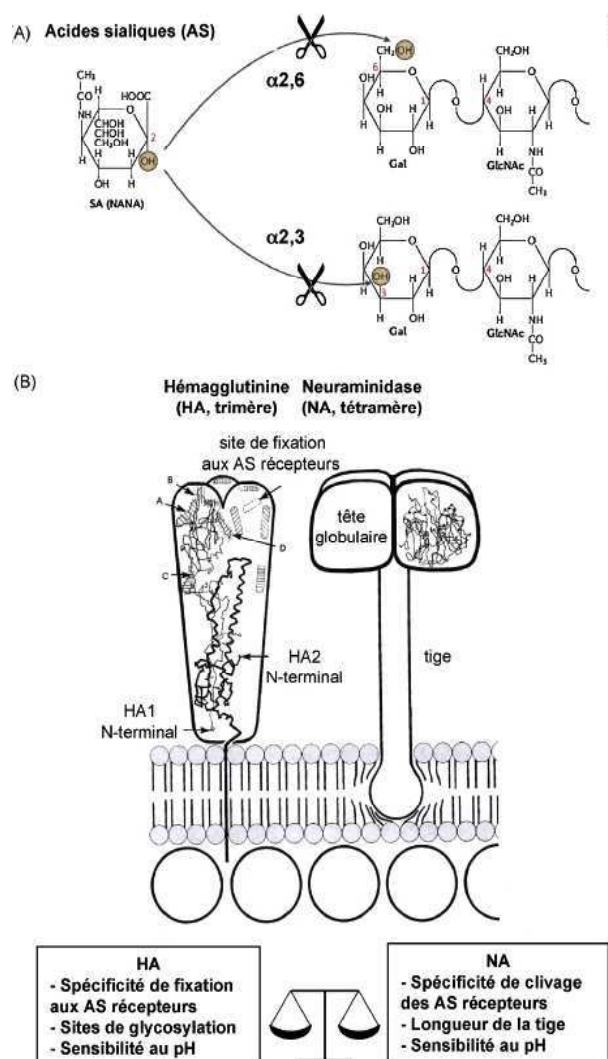
La NA est la seconde protéine de surface la plus abondante (environ 20% des glycoprotéines de surface soit 100 protéines/ virion) (Tableau 1) et forme un homo-tétramère (Figure 2 et 3B). Cette glycoprotéine membranaire de type II a une activité enzymatique de type N-acétyl-neuraminosyl-glycohydrolase. Il est consensuel d'attribuer trois rôles à la NA du virus influenza : (i) elle facilite la pénétration à travers les mucines riches en acides sialiques présentes dans le tractus respiratoire supérieur de l'homme et donc l'infectiosité du virus ¹⁰ (ii) elle hydrolyse les liaisons alpha cétosidiques, 2-3 ou 2-6, existant entre un acide sialique (acide N-acétylneuraminique) et l'hydrate de carbone adjacent d'une glycoprotéine de surface cellulaire auquel le virion nouvellement formé est joint ¹¹ (Figure 3A). Ce clivage libère le virus nouvellement formé de la cellule et lui permet d'envahir de nouvelles cellules ¹⁰ (iii) enfin, elle empêche également l'agrégation des virions nouvellement formés, augmentant leurs chances d'infecter de nouvelles cellules ¹².

Figure 2 : modélisation de la structure et de la répartition de l'hémagglutinine et de la neuraminidase à la surface du virus influenza (d'après ¹³).



Modèle présentant la morphologie d'une hémagglutinine et d'une neuraminidase, par cryo-électro-tomographie du virus influenza, ainsi que leur représentation schématique (b et c, respectivement). (a) image d'un cluster de HA à gauche, d'une NA dans un cluster de HA au milieu et d'un cluster de NA à droite. (d) Modèle de distribution des HA (vert), NA (jaune) et la bicouche lipidique (bleu) dans un seul virion (échelle 20 nm) (d'après ¹¹).

Figure 3 : structure et fonctions de la HA et de la NA des virus influenza (d'après ¹⁴)



A.Exemples d'acides sialiques (AS) récepteurs. L'acide N-acétylneuraminique (NANA) est lié en $\alpha 2-6$ ou en $\alpha 2-3$ avec le galactose- $\beta 1,4$ -N-acétylglucosamine.

B.Représentation schématique de l'hémagglutinine (HA) et de la neuraminidase (NA).

La HA et la NA se présentent sous forme de trimères et de tétramères, respectivement, à la surface de la particule virale. La HA est clivée en deux sous-unités HA1 et HA2. Les sites antigéniques (A, B, C, D) et le site de fixation aux AS récepteurs sont situés au niveau de la partie distale de la protéine.

La NA est constituée d'une tige surmontée d'une tête globulaire qui porte l'activité sialidase. Lors de l'adaptation à un nouvel hôte, la HA et la NA co-évoluent de telle sorte que l'équilibre fonctionnel entre les deux protéines (dont les paramètres majeurs sont indiqués dans les encadrés) soit préservé.

La troisième protéine d'enveloppe est la protéine M2, un composant mineur (environ 20 à 60 molécules/ virion) qui possède une activité de canal ionique^{15,16}. Le core viral est constitué par les ribonucléoprotéines virales (RNPv) qui se composent d'une molécule d'ARN viral de polarité négative associée aux nucléoprotéines (NP) disposées le long de l'ARN ainsi qu'à des protéines telles que NEP (« nuclear export protein »), anciennement appelée NS2 (protéine non structurale). Les RNPv sont associées aux trois polymérases : PB1, PB2 et PA qui forment le complexe polymérasique. Les protéines PB1-F2 et NS1 sont présentes uniquement dans les cellules infectées et ne sont pas incorporées dans le virion (Tableau 1).

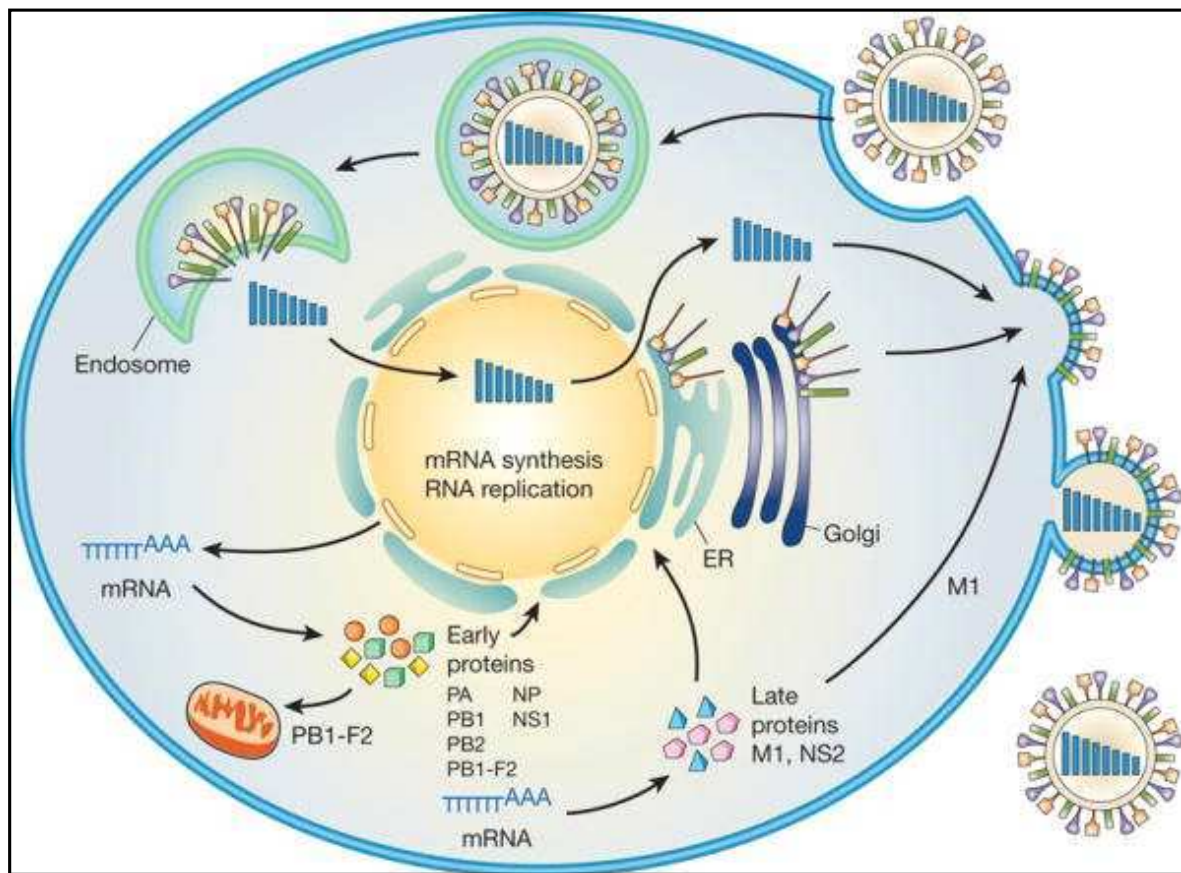
1.1.2. Cycle de réplication du virus influenza

Le virus influenza s'attache à la cellule cible par liaison de son HA à un récepteur présent sur la membrane de celle-ci (Figure 4). Ce récepteur est constitué d'une glycoprotéine ou d'un glycolipide possédant à son extrémité un résidu galactose, lui-même lié à une molécule d'acide N-acetyl neuraminique (acide sialique). La liaison galactose-acide sialique peut être de type $\alpha 2-3$ ou $\alpha 2-6$ (Figure 3A). La région de la HA responsable de l'interaction HA-récepteur s'appelle le RBS (« receptor binding site »). Selon la nature du RBS et donc du sous-type de HA, le virus peut se lier à des récepteurs de type $\alpha 2-3$ ou $\alpha 2-6$. Les virus humains reconnaissent préférentiellement les récepteurs de type $\alpha 2-6$ tandis que les récepteurs de type $\alpha 2-3$ sont la cible préférentielle des virus d'origine aviaire. Les virus porcins sont capables de se fixer aux deux types de récepteurs $\alpha 2-3$ et $\alpha 2-6$. Après fixation au récepteur cellulaire, le virus entre dans la cellule par endocytose. La fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire n'est possible qu'après clivage du précurseur HA0 de l'hémagglutinine. Ce clivage peut être extra-cellulaire, à la surface de la cellule ou après libération des nouveaux virions en fin de cycle de réplication. Il est alors réalisé par des enzymes sécrétées, extra-cellulaires, telles que les sérines protéases ou trypsine-like. Ces enzymes sont capables de cliver les sites de clivage monobasiques des virus influenza de différents sous-types. En revanche, les sous-types de virus influenza H5 et H7, dont la HA a acquis un site de clivage multi-basique, sont alors clivés par des enzymes de type furine ou subtilisine-like, qui sont intra-cellulaires. Le clivage a donc lieu dans l'endosome après endocytose¹⁷.

Après endocytose, le faible pH de l'endosome provoque : (i) un changement conformationnel de la HA et donc l'exposition du peptide de fusion localisé au niveau de l'extrémité N-terminale de la HA2, induisant la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane de

l'endosome et (ii) l'activation du canal à protons M2 permettant la diminution de pH dans le virion, provoquant ainsi le détachement des ribonucléoprotéines virales (RNPv) qui étaient liées à la protéine M1. Les RNPv ainsi libérées peuvent être transportées dans le noyau sous le contrôle des signaux NLS (« nuclear localization signals ») par les protéines NP qui jouent le rôle de protéines chaperonnes.

Figure 4: représentation schématique du cycle de réplication virale du virus influenza A.



Après attachement du virus à son récepteur cellulaire (acides sialiques) et endocytose, les RNPv sont relarguées dans le cytoplasme et transportées vers le noyau, site de réplication et de transcription. Les ARNm sont exportés vers le cytoplasme pour être traduits. Les protéines précoces, nécessaires pour la réplication et la transcription sont transportées vers le noyau. Plus tard, dans le cycle d'infection, les protéines M1 et NS2 facilitent l'export nucléaire des RNPv néo-synthétisées. L'assemblage pour le bourgeonnement des nouveaux virions se déroule au niveau de la membrane plasmique.

Les ribonucléoprotéines RNPv sont associées sous la forme d'un complexe hétérotrimérique avec des ARN polymérases ARN-dépendantes que sont les protéines PA, PB1 et PB2. La première étape de la réplication du génome viral est la transcription de l'ARNv de polarité négative en ARN messager (ARNm) de polarité positive, cappé en 5' et possédant une queue polyA en 3'. Ces ARNm seront ensuite traduits en protéines par la machinerie cellulaire. L'ARNv est répliqué sous la forme d'une copie d'ARN de polarité positive (ARNc) qui sert de matrice pour la synthèse d'un grand nombre de copies d'ARNv (-) qui constitueront ensuite le génome des nouveaux virions. Après la formation des RNPv dans le noyau, M1, NEP et NP, catalysent leur transport dans le cytoplasme vers le site d'assemblage du virus, au niveau apical de la cellule, là où se sont accumulées HA et NA.

Les protéines de membrane, HA, NA et M2, sont produites par les ribosomes fixés à la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Par conséquent, elles entrent dans le RE pour subir des modifications post-traductionnelles et sont ensuite transportées vers l'appareil de Golgi où ont lieu d'autres modifications. De là, la HA et la NA, qui utilisent les radeaux lipidiques pour leur transport ainsi que la protéine M2 sont dirigées vers la membrane plasmique apicale où l'assemblage final du virus aura lieu ¹⁸.

La protéine M1 interagit avec les domaines sous-membranaires des glycoprotéines permettant l'assemblage et le bourgeonnement des virions. La membrane cellulaire bourgeonne vers l'extérieur, en partie à cause d'une accumulation de protéine M1 sous la bicouche lipidique, jusqu'à ce que la membrane cellulaire fusionne à la base du virion. La libération des virions de la surface de la cellule est possible grâce à l'activité sialidase de la NA, qui catalyse le clivage de la liaison de la HA du virion à l'acide sialique et prévient le risque de liaison des nouveaux virions à la membrane cellulaire ⁵. Chaque virus influenza infectieux comporte 8 segments donc 8 RNPv et ces 8 segments sont nécessaires pour que le virus soit infectieux et transmissible. Les mécanismes d'assemblage des nouveaux virions aboutissent à la libération de 90% de particules virales ne possédant pas 8 segments. Ces virions défectifs, non infectieux, sont appelés « particules von Magnus » ¹⁹.

1.2. Mécanismes d'évolution des virus influenza

Les virus influenza sont des virus respiratoires qui connaissent une évolution génétique et antigénique rapide. En effet, sous la pression de sélection immunitaire de la population humaine principalement, les glycoprotéines de surface HA et NA évoluent selon deux mécanismes : la dérive antigénique ou « shift » et la cassure antigénique ou « drift ».

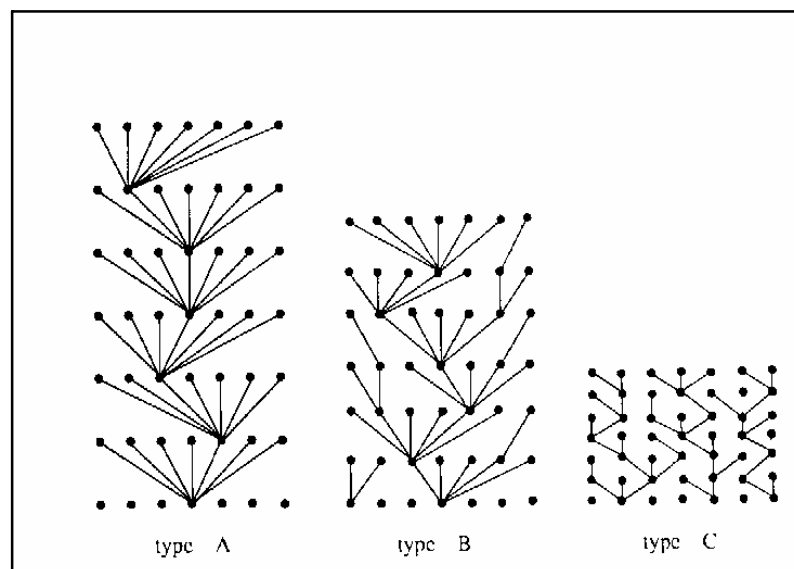
1.2.1. Dérive antigénique

La dérive antigénique s'explique par des modifications mineures ou majeures de la HA et/ou de la NA qui peuvent être détectées par une technique d'inhibition d'hémagglutination : en utilisant des sérums de furet spécifiques de différentes souches, une moins bonne reconnaissance antigène-anticorps peut être mise en évidence. Les variations antigéniques mineures sont dues à des substitutions d'acides aminés au niveau des sites antigéniques qui s'expliquent par l'accumulation de mutations survenant du fait des erreurs aléatoires (1/10000 nucléotides) de l'ARN polymérase ARN-dépendante du virus influenza qui n'a pas de fonction de correction.

Les HA humaines évoluent bien plus rapidement que les segments internes (PB2, PB1, PA, NP et M1) car la pression de sélection exercée par le système immunitaire de l'hôte est plus importante vis à vis des épitopes viraux de surface. Les taux de mutation et la pression évolutive sont nettement moins importants pour les virus influenza de l'oiseau, en particulier de l'oiseau aquatique qui représente le réservoir des virus influenza, probablement parce qu'il existerait une adaptation optimale de ces virus à ces hôtes aviaires ⁵.

Chez l'homme, une dérive antigénique est observée pour les trois types de virus mais elle se présente selon des modèles différents. Les virus influenza du type A évoluent rapidement au sein du même lignage. Le virus circulant durant un hiver est différent du virus responsable de l'épidémie de l'hiver précédent et, parce qu'il n'est pas totalement neutralisé par les anticorps de la population, il peut provoquer une nouvelle épidémie. Les virus du type B et du type C évoluent lentement selon plusieurs lignages (Figure 5) suggérant une adaptabilité à l'homme de ces virus influenza que les virus du type A n'ont pas atteint, probablement parce qu'ils circulent depuis moins longtemps chez l'homme ²⁰.

Figure 5: modèles d'évolution des virus influenza du type A, B et C chez l'homme (d'après ²⁰).



Parmi les virus influenza de type A, les virus A(H5N1) présentent une très forte dérive antigénique. A partir d'un ancêtre commun isolé en 1996, A/goose/Guangdong/1/96, en 2008, 10 clades (0-9) et 10 sous-clades au sein du clade 2 ont été définis pour représenter la diversité de ces virus (Tableau 2) ²¹. Ces variations génétiques importantes pourraient s'expliquer par une forte circulation inter-espèce chez l'oiseau et les mammifères, à l'origine d'une forte pression de sélection ²². En ce qui concerne le virus A(H1N1)2009, après 9 mois de circulation, toutes les souches analysées restent apparentées à la souche vaccinale A/California/07/2009 ²³.

1.2.2. Cassure antigénique

Depuis le premier isolement du virus influenza en 1933, des cassures antigéniques sont survenues et ont été responsables des pandémies du XX^{ème} siècle (1957 et 1968) et de la pandémie actuelle. On parle de cassure antigénique quand le changement observé modifie le sous-type de l'HA ou de la NA du virus. Généralement elle est le résultat d'un phénomène de

Tableau 2 : diversité génétique des virus A(H5N1) : récapitulatif des différents clades et sous-clades définis dans la classification des virus influenza A(H5N1) (d'après ²¹).

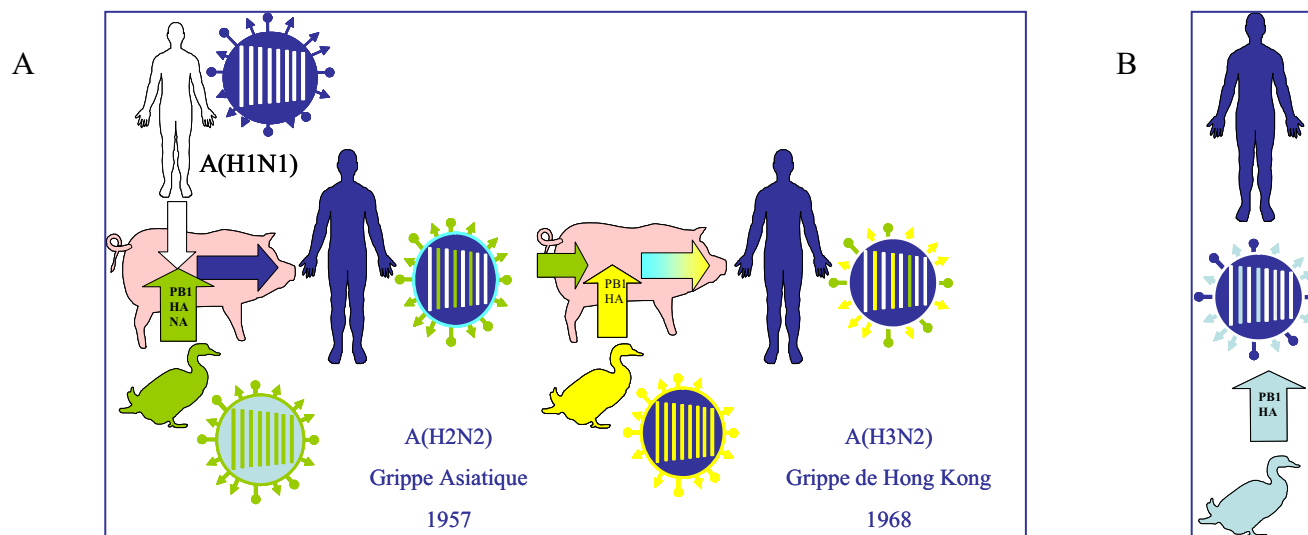
Clade	Année	Lieu d'isolement	Hôte	Nom de la souche de référence
0	1996-2002	Chine, Hong Kong	Aviaire/ humain	Gs/Guangdong/1/96
3	2000-2001	Chine, Hong Kong, Vietnam	Aviaire	Ck/Hong Kong/YU562/2001
4	2002-2003	Chine, Hong Kong,	Aviaire	Gs/Guiyang/337/2006
	2005/2006	Guiyang, Chine		
5	2000-2003	Chine, Vietnam	Aviaire	Gs/Guangxi/914/2004
	2004	Guangxi, Chine		
6	2002/2004	Chine	Aviaire	Ck/Hunan/01/2004
7	2002/2004	Chine	Aviaire/ humain	Ck/Shanxi/2/2006
	2005/2006	Yunnan, Hubei, Shanxi, Chine	Aviaire	
8	2001-2004	Hong Kong, Chine	Aviaire	Ck/Hong Kong/YU777/2002
9	2003-2005	Chine	Aviaire	DK/Guangxi/2775/2005
1	2002/2003	Hong Kong, Chine, Vietnam, Cambodge, Thaïland, Laos, Malaisie	Aviaire/ humain	Vietnam/1203/2004
2.1.1	2003-2005	Indonésie de l'Est	Aviaire	Ck/Indonesia/BL/2003
2.1.2	2005-2006	Indonésie de l'Ouest	Aviaire/humain	Indonesia/538H/2006
2.1.3	2004-2007	Indonésie de l'Est et de l'Ouest	Aviaire/humain	Indonesia/5/2005
2.2	2005	Qinghai Lake, Jiangxi, Chine	Aviaire	BHGs/Qinghai/1A/2005
	2005-2007	Mongolie, Europe, Moyen Orient, Afrique	Aviaire/humain	
2.3.1	2003-2005	Hunan et Guangdong, Chine	Aviaire	DK/Hunan/303/2004
2.3.2	2004-2006	Hong Kong, Chine du Sud,	Aviaire	CK/Guangxi/2461/2004
	2005	Vietnam		
2.3.3	2004	Hunan, Chine	Aviaire	Ck/Guiyang/3055/2005
	2005	Guiyang, Chine	Aviaire	
2.3.4	2005-2006	Hong Kong, Chine, Thaïland, Laos, Malaysia	Aviaire/humain	Dk/Fujian/1734/2005
2.4	2002-2005	Chine, Yunnan, Guangxi	Aviaire	Ck/Yunnan/115/2004
2.5	2003/2004	Shantou, Chine	Aviaire	CK/Korea/ES/2003
	2006			

réassortiment génétique suite à l'échange de segments de gène lors de la co-infection d'une même cellule donc d'un même hôte par deux virus influenza A (Figure 6). Des réassortiments génétiques ont été observés en 1957 (Grippe asiatique) et en 1968 (Grippe de Hong Kong) quand les sous-types A(H2N2) et A(H3N2), respectivement, sont apparus et plus récemment en 2009, avec l'émergence d'un sous-type A(H1N1) d'origine multiple (porcine, aviaire et humaine).

Lors de la co-infection d'une même cellule par deux virus influenza A, les deux génomes sont répliqués puis transcrits. C'est lors de l'assemblage, par des mécanismes d'interactions non encore élucidés, que certains segments de gènes s'associent pour donner un nouveau virion dont le génome est un mélange de segments d'origines différentes. Lorsque ce nouveau virus arbore une glycoprotéine différente des virus circulant dans la population humaine, il s'agit d'un nouveau sous-type viral potentiellement pandémique.

Hormis le réassortiment génétique, il est possible d'observer des changements majeurs au niveau des HA ou NA d'un virus influenza A, par accumulation de mutations, pouvant induire un changement de sous-type. C'est l'hypothèse de l'introduction, par transmission directe, d'un virus A(H1N1) d'origine aviaire, dans la population humaine, provoquant la pandémie de 1918 (Figure 6). L'analyse des séquences de ce virus a montré en effet, qu'il s'agissait d'un virus aviaire ayant accumulé des mutations d'adaptation à l'homme²⁴.

Figure 6: mécanismes d'émergence d'un nouveau sous-type de virus influenza par réassortiment génétique (A) ou transmission directe (B).



- (A) Le réassortiment génétique s'explique par l'échange de segments de gène entre deux virus influenza A, lors de la co-infection d'une même cellule donc d'un même hôte (aviaire, porcin ou humain). Ce mécanisme est l'hypothèse expliquant l'émergence des virus responsables des pandémies de 1957 (Grippe Asiatique) et de 1968 (Grippe de Hong Kong). En 1957, le virus émergent A(H2N2) est le résultat de l'acquisition sur le fond génétique du virus A(H1N1) humain circulant depuis 1918, des segments HA, NA et PB1 d'un virus aviaire A(H2N2). En 1968, après acquisition par ce virus A(H2N2) d'une HA et du segment PB1 d'un virus aviaire A(H3N2), émergea le virus A(H3N2) circulant encore aujourd'hui.
- (B) L'hypothèse de l'émergence du virus A(H1N1), responsable de la pandémie de 1918, serait celle de l'adaptation à l'homme d'un virus d'origine aviaire par accumulation de mutations, principalement au niveau des segments de gène HA et PB1. Cette hypothèse est controversée.

1.3. Facteurs de virulence et de restriction d'hôte du virus influenza

L'identification des facteurs de virulence et de restriction d'hôte a été possible par l'étude de deux virus en particulier, le virus A(H1N1) de 1918 et le virus A(H5N1) circulant depuis 1997.

La virulence chez l'animal, du virus A(H1N1) de 1918 a été étudiée après sa reconstruction par génétique inverse²⁵ et a mis en évidence le développement chez la souris, ainsi que chez le primate, d'une réponse immunitaire innée aberrante²⁶. Ces caractéristiques ont aussi été observées lors de l'infection par le virus A(H5N1)²⁷. Des études ultérieures ont montré certains segments de gène seraient impliqués dans une augmentation de la virulence de ces virus : la HA^{28, 29}, le complexe de réplication^{30,25,31,32} et la protéine PB2³⁰ en particulier, la protéine NS1³³ et la protéine PB1-F2³⁴. Les segments de gènes HA et PB2³² pourraient jouer un rôle dans leur transmissibilité (Tableau 3).

Tableau 3 : facteurs de virulence et de restriction d'hôte des virus influenza A.

Comparaison entre les virus humains saisonniers, les virus aviaires faiblement pathogènes (FP) et hautement pathogènes (HP) A(H5N1), le virus A(H1N1) de 1918 et le virus A(H1N1) de 2009 (d'après ¹⁴).

	Position(s)	Virus humains saisonniers	Virus aviaires FP A(H5N2)	Virus aviaires HP A(H5N1)	A(H1N1) 1918	A(H1N1) 2009	Références
HA	Clivage	Monobasique	Monobasique	Multibasique	Monobasique	Monobasique	Horimoto <i>et al.</i> , 2005 ²⁸
	HA1/HA2	IQSR↓ G ^a	RETR↓ G	RRRKKR↓ G	IQSR↓ G	IQSR↓ G	
PB2	627	Lys	Glu	Lys / Glu	Lys	Glu	Hatta <i>et al.</i> 2001 ³⁰
	701	Asp	Asn	Asn ^b	/	Asp	Gabriel <i>et al.</i> , 2008 ³⁵
	591	Gln	Gln	Lys ^c	/	Asn	Kawaoka <i>et al.</i> , 2010 ³⁶
NS1	92	Asp	Asp	Glu ^a	Asp	Asp	Seo <i>et al.</i> , 2002 ³³
	227-223	RSKV/RSEV	ESEV/EPEV	ESEV/EPEV	KSEV	del., stop (219) ^d	
PB1-F2	66	Asn ^e del., stop (57) ^{d,f}	Asn	Ser	Ser	del., stop (11) ^d	Conenello <i>et al.</i> , 2007 ³⁷

^a Caractéristique des virus A(H5N1) responsables de cas humains en 1997.

^b Une asparagine en position PB2 701 augmente la réplication d'un virus aviaire dans une cellule de mammifère (adaptation)

^c Une lysine en position PB2 591 augmente la réplication et la virulence du virus A(H5N1) chez la souris.

^d del. : délétion et apparition d'un codon de terminaison à la position indiquée entre parenthèses.

^e Caractéristique des virus A(H3N2) humains saisonniers

^f Caractéristique des virus A(H1N1) humains saisonniers

Rôles de l'hémagglutinine

Un des facteurs de virulence le mieux caractérisé est l'acquisition, par certains sous-types de virus aviaires, d'un site de clivage polybasique au niveau de la HA. En effet, en fonction de la composition en acides aminés du site de clivage, il peut être coupé par des enzymes différentes, localisées en différents sites de l'organisme hôte. Dans l'exemple que constituent les virus aviaires A(H5N1), les virus faiblement pathogènes, dont le site de clivage possède un seul résidu arginine (Tableau 3) ne peuvent être clivés que par des enzymes de type protéases, trypsine-like¹⁷. Ces enzymes sont extra-cellulaire et présentes au niveau des muqueuses respiratoires et digestives. La réplication de ces virus n'est alors possible qu'au niveau de ces deux sites et ils sont généralement responsables d'infections asymptomatiques ou modérées chez l'oiseau. Par ailleurs, lorsque les virus A(H5N1) présentent un site de clivage riche en résidus basiques (site de clivage multibasique, Tableau 3) leur HA peut être clivé par des protéases de type furines, subtilisine-like¹⁷. Ces enzymes intra-cellulaires sont ubiquitaires et présentes dans de nombreux sites chez l'hôte³⁸. Ces virus hautement pathogènes sont à l'origine d'une infection systémique, chez l'oiseau comme chez l'homme, le plus souvent mortelle. Ces sites de clivage multibasique ont été observés sur des HA de sous-types H5 et H7¹⁷.

La spécificité de liaison du virus influenza à son récepteur cellulaire et la distribution des récepteurs dans l'organisme-hôte sont déterminantes dans la définition de la restriction d'hôte du virus influenza. Les virus humains se lient préférentiellement aux acides sialiques de type α 2-6 (Figure 3A) présents au niveau des cellules épithéliales de l'arbre respiratoire supérieur chez l'homme³⁹ (*cf section ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE 3.2 : Pathogenèse et clinique de l'infection grippale*). À l'opposé, les virus aviaires reconnaissent préférentiellement les acides sialiques de type α 2-3 qui se trouvent au niveau des cellules épithéliales du tractus intestinal des oiseaux (le site principal de réplication chez l'oiseau)⁴⁰. La spécificité de liaison au récepteur des virus humains ou aviaires est déterminée par certains acides aminés présents dans la poche de liaison ou RBS (« receptor binding site ») (Tableau 4). Ces positions particulières sont sous-types-dépendantes. Sur les HA de type H2 et H3, les acides aminés en positions 226 et 228 déterminent la spécificité aviaire/humaine : Gln/Leu en 226 et Gly/Ser 228. Pour les HA de type H1, ce sont les positions 190 et 225 (numérotation H3) : Glu/Asp en 190 et Gly/Asp en 225⁴¹. Le virus A(H1N1)2009 possède une HA arborant une signature humaine en position 190 et 225, expliquant probablement la très bonne transmissibilité de ce

virus chez l'homme ⁴². En ce qui concerne les virus A(H5N1), les acides aminés en position 133, 138, 186, 192 et 227 (numérotation H3) ont été identifiés dans des souches isolées chez l'homme et confèrent une reconnaissance des récepteurs de type humain ^{43,44,45}. Des modifications expérimentales des positions 226 et 228 (Gln226Leu et Gly228Ser) entraînent une reconnaissance des récepteurs des deux types, humains et aviaires, l'introduction de la mutation Glu190Asp ne modifie pas la spécificité du récepteur⁴⁶ (Tableau 4).

Cette restriction d'hôte liée au récepteur peut être levée par une exposition à de très fortes quantités de virus aviaires A(H5N1), induisant une pénétration du virus dans l'arbre respiratoire inférieur et une possible infection des cellules humaines alvéolaires exprimant des récepteurs $\alpha 2-3$ ⁴⁷.

Tableau 4 : spécificité d'espèce de l'hémagglutinine.

Positions des acides-aminés définissant la spécificité aviaire/humaine de reconnaissance du récepteur cellulaire par sous-type de HA ou par virus.

Sous-type de HA ou virus	Position ^a (aa)	Nature de l'acide aminé et spécificité		Référence
		Aviaire	Humaine	
H1	190	Glu	Asp	41
	225	Gly	Asp	41
H2 et H3	226	Gln	Leu	41
	228	Gly	Ser	41
A(H1N1)2009	190	/	Asp	42
	225	/	Asp	42
A(H5N1)	226 ^b	Gln ou Leu	Gln ou Leu	46
	228 ^c	Gly ou Ser	Gly ou Ser	46
	190 ^d	Glu ou Asp	/	46

aa : acides aminés

^a numérotation H3.

^b si modification par mutagenèse dirigée de l'acide aminé en position 226 du virus A(H5N1) Gln ou Leu : reconnaissance des 2 types de récepteurs aviaire et humain.

^c si modification par mutagenèse dirigée de l'acide aminé en position 228 du virus A(H5N1) Gly ou Ser : reconnaissance des 2 types de récepteurs aviaire et humain.

^d si modification par mutagenèse dirigée de l'acide aminé en position 190 du virus A(H5N1) Glu ou Asp : reconnaissance spécifique du récepteur aviaire.

Rôle de PB1, PB1-F2 et PB2 dans la virulence et la spécificité d'hôte

Le complexe polymérasique et principalement les protéines PB1 et PB2 ont été identifiés comme ayant un rôle central dans la pathogénicité des virus influenza, probablement en influant sur la réplication virale et sur la spécificité d'espèce.

Le rôle du gène **PB1** est évoqué depuis l'analyse de la constellation de gènes des virus responsables des pandémies de 1957 et 1968. En effet, sur un fond génétique humain, ces deux virus possédaient un gène PB1 d'origine aviaire qui devait probablement jouer un rôle dans l'augmentation des capacités de réplication de ces virus ⁴⁸. Salomon *et al.* rapportent le rôle clé du segment PB1 dans la virulence d'une souche de virus A(H5N1) en comparant la virulence chez la souris et le furet de deux souches, une isolée chez l'homme VN1203 et l'autre chez le poulet CH58. Ils ont montré que la souche humaine hautement pathogène tuait souris et furets en induisant une infection disséminée, alors que la souche aviaire les infectait mais ne les tuait pas. Puis, ils ont produit, par génétique inverse, une souche aviaire (CH58) qui possédait le complexe polymérase du virus humain (VN1203) avec un segment PB2 possédant la mutation Glu627Lys (Tableau 3). Ils ont montré qu'avec ce complexe polymérase, ce virus récupérait la capacité de tuer les souris et les furets ⁴⁹.

Le gène PB1 de la plupart des virus aviaires et humains code une seconde protéine **PB1-F2** qui s'exprime après traduction d'un second cadre de lecture ⁵⁰ (Tableau 3). La phase ouverte de lecture PB1-F2, généralement présente chez les virus aviaires et humains, code une protéine de taille variable, de 57 à 90 acides-aminés. Elle est absente chez les virus appartenant à certains lignages porcins et chez le virus A(H1N1)2009 ¹⁴. Cette protéine a plusieurs fonctions et contribue à la sévérité de l'infection de manière directe, en augmentant l'inflammation et en retardant l'élimination du virus des poumons ⁵¹ ou de manière indirecte, en augmentant la fréquence et la sévérité des pneumonies bactériennes secondaires ³⁴. Récemment, Conenello *et al.*, ont montré, par mutagenèse dirigée, que la présence d'un résidu Serine (Ser) en position 66 (Asn 66 Ser) de PB1-F2 contribuait à la pathogénicité accrue des virus A(H5N1) récents et du virus de 1918 chez la souris ³⁷ (Tableau 3). Les rôles de PB1-F2 sont méconnus mais elle semblerait induire l'apoptose de certains types cellulaires comme les monocytes ⁵⁰, probablement en interagissant avec des protéines mitochondriales ^{52,53}. Enfin PB1-F2 doit jouer un rôle dans la virulence, en retenant la protéine PB1 dans le noyau

ce qui favoriserait la réplication virale ⁵⁴. Cette propriété ne semble pas être en lien avec une plus grande pathogénicité *in vivo* ⁵⁵.

Concernant la protéine **PB2**, des études réalisées en culture cellulaire, ont montré que l'acide aminé en position 627 était déterminant pour la définition de la spécificité d'espèce ⁵⁶ mais aussi pour le pouvoir pathogène des virus A(H5N1) chez la souris ³⁰ (Tableau 3). Les virus aviaires faiblement pathogènes possèdent un acide glutamique (Glu) en position 627 et ils induisent peu de symptômes chez la souris, alors que les virus humains saisonniers et les virus aviaires hautement pathogènes, qui présentent une lysine (Lys), sont responsables d'une infection sévère chez la souris ³⁰. Ce facteur de virulence (Glu627lys) a aussi été mis en évidence en 2003 sur les souches de virus A(H7N7) responsables de cas humains de pneumonies fatales aux Pays Bas, alors que les souches isolées chez le poulet ou dans des formes cliniques modérées d'infections humaines à la même période, possédaient un acide glutamique ⁵⁷. La présence d'une lysine en 627 améliorerait la capacité de réplication du virus dans les cellules de mammifères à 37°C, plutôt qu'à 41°C, température optimale de croissance chez le poulet ⁵⁸. Plus récemment, Li *et al.* ont décrit une meilleure activité du complexe polymérase à 33°C plutôt qu'à 37°C, si il possédait un segment PB2 porteur d'une lysine en position 627 ⁵⁹. L'acquisition par un virus aviaire d'un résidu lysine en position 627 améliorerait donc sa réplication à 33°C, qui est la température des voies aériennes supérieures chez l'homme, ce qui favoriserait son infectiosité et sa transmission ⁵⁹.

L'acide aminé Asparagine (Asn) en position 701, remplaçant un acide aspartique (Asp) (Asn701Asp) a aussi été mis en évidence comme ayant un rôle dans la virulence des virus influenza mais aussi la spécificité d'espèce ³⁵. En effet, en présence d'un résidu Asn, l'interaction entre la protéine PB2 et l'importine α des cellules de mammifère serait renforcée ce qui favoriserait son importation nucléaire et donc le recrutement des sous-unités du complexe polymérase dans le noyau. Une plus grande disponibilité de la sous-unité PB2 dans le noyau augmenterait les activités de transcription et de réplication virale dans les cellules de mammifères. La mutation Asn701Asp n'a pas d'impact dans les cellules aviaires ce qui indique que cette mutation favoriserait l'adaptation d'un virus influenza aviaire chez les mammifères ³⁵ (Tableau 3).

Le virus A(H1N1)2009 présente les déterminants de virulence des virus faiblement pathogènes : PB2-Glu 627 et PB2-Asp 701. Très récemment, Yoshiro Kawaoka a présenté

l'impact de l'acide aminé en position 591 du segment PB2 sur la réplication et la transmissibilité du virus influenza ³⁶. L'acquisition d'un résidu lysine (Lys) en position 591 à la place d'une glutamine (Gln) augmente les capacités réplcatives et la virulence chez la souris, d'un virus aviaire A(H5N1) faiblement pathogène. Chez le virus A(H1N1)2009, Y. Kawaoka a observé qu'un résidu asparagine (Asn) à cette position du segment PB2 augmentait la réplication de ce virus d'une part, mais aussi sa transmissibilité chez le furet ³⁶ (Tableau 3).

Rôle de la protéine NS1 dans la virulence des virus influenza

La protéine NS1 est un facteur de virulence qui bloque la réponse interféron de la cellule infectée. En effet, le premier niveau de réponse de la cellule, lors de l'introduction d'une molécule d'ARN double brin, est l'activation de facteurs de transcription qui induisent la production d'interféron β . NS1 interfère avec l'activation de nombreuses autres protéines aux propriétés antivirales telles que PKR (protéine kinase de l'ARN double brin) ou la protéine Mx et bloque ainsi la mise en place d'un état antiviral dans la cellule infectée ^{60,61}. En fonction des virus, NS1 semble posséder diverses propriétés supplémentaires. La protéine NS1 des virus A(H5N1) de 1997 induit, en plus d'un blocage de la voie interféron β , une très forte production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α (« tumor necrosis factor »)⁵. L'étude du rôle du gène NS1 du virus A(H1N1) de 1918 a montré qu'il pouvait interagir aussi avec des gènes régulés par l'interféron⁶². L'activation de cytokines et de chimiokines est régulée par des voies de signalisation cellulaire telle que la voie des MAPK (« Mitogen-activated protein kinase »). Les virus A(H5N1), à la différence des virus A(H1N1), activent très fortement p38MAPK ⁶³. Au final, NS1 doit participer à la dysrégulation des cytokines qui est observée dans les formes sévères d'infection humaine par le virus A(H5N1). Quelques acides aminés ont été identifiés comme étant une signature d'un virus faiblement ou hautement pathogène, en particulier l'acide aminé en position 92 : Asp92Glu ³³ (Tableau 3). L'impact des mutations observées sur NS1 sur la virulence est sous-type dépendant alors que les facteurs de virulence tels que le site de clivage multibasique ou la mutation PB2-Lys 627 sont des déterminants universels. Les 4 acides aminés C-terminaux de NS1 forme un domaine liant PDZ qui, s'il provient d'un virus A(H5N1) ou du virus A(H1N1) de 1918 et qu'il est introduit dans un virus humain, augmente la virulence chez la

souris, sans augmentation de la production d'interféron ⁶⁴. Le virus A(H1N1)2009 ne possède pas de domaine ligand PDZ.

Autres facteurs impliqués dans la restriction d'hôte

Dès 1985, le rôle de la protéine **NP** et du segment **M** dans la restriction d'hôte est évoqué suite aux observations faites sur les capacités répliquatives de virus réassortants aviaires-humains chez le primate ⁶⁵. Tian *et al.* ont remarqué qu'un virus réassortant possédant les 6 segments internes d'un aviaire de sous-type A(H2N2) et les glycoprotéines de surface d'un virus humain A(H3N2) se répliquait aussi mal dans les voies aériennes du singe que le virus aviaire parental. En étudiant des virus réassortants possédant toujours les glycoprotéines d'origine humaine et un ou plusieurs segments internes aviaires, ils ont noté que cette réplication altérée était liée à la présence du segment NP ou du segment M d'origine aviaire sur un fond génétique humain ⁶⁵. Plus récemment, l'étude de virus réassortants produits par génétique inverse ont montré que les virus possédant un segment NP d'origine humaine sur un fond génétique d'origine aviaire avait une réplication très faible alors que, si NP était associé aux segments M et NS d'origine humaine, le virus retrouvait une réplication efficace ⁴. Ceci traduit la complexité des interactions entre segments de gènes d'origines différentes et le rôle clé du segment NP dans ces éventuelles incompatibilités.

L'adaptation à l'homme des virus aviaires hautement pathogènes et donc plus virulents est possible, par l'acquisition de mutations ou signatures spécifiquement humaines. Chen *et al.*, ont défini un certain nombre de positions clés définissant des signatures génomiques sur les 8 segments de gène du virus influenza. La nature de l'acide aminé au niveau de ces positions définit leur appartenance aux virus humains ou aviaires ⁶⁶. La surveillance de ces positions particulières permet d'anticiper l'adaptation des virus influenza aviaires à l'homme. Sur chaque gène, un certain nombre de positions sont décrites (15 sur NP, 10 sur PA, 8 sur PB2, 5 sur PB1-F2, 4 sur M2, 2 sur HA, PB1, NS2, 1 sur NS1 mais aucune sur NA) (Tableau 5) ⁶⁶.

Tableau 5 : signatures génomiques en acides aminés définissant l'origine aviaire ou humaine des virus influenza (d'après ⁶⁶).

Gene	Position	Avian residues	Human residues	Associated functional domains
PB2	44	A (208),S(7)	S (831),A(10),L(2)	PB1-1, NP-1 (9), MLS (10)
	199	A (210),S(5)	S (842),A(3)	NP-1 (9)
	271	T (210),A(3),I(1),M(1)	A (836),T(6),S(1)	Cap-N (11)
	475	L (214),M(1)	M (839),L(3)	NLS (12)
	588	A (203),T(6),V(6)	I (835),V(3),A(2)	PB1-2, NP-2 (9)
	613	V (212),A(3)	T (816),I(16),A(8),V(1)	PB1-2, NP-2 (9)
	627	E (196),K(19)	K (838),R(2),E(1)	PB1-2, NP-2 (9)
	674	A (204),S(6),T(2),G(2),E(1)	T (836),A(2),I(2),P(1)	PB1-2, NP-2 (9)
PB1	327	R (147),K(3)	K (766),R(66)	cRNA (13)
	336	V (142),I(8)	I (773),V(59)	cRNA (13)
PB1-F2	73	K (397),R(6),I(1)	R (594),K(87),S(1)	ANT3, VDAC1 (14), mitochondrial localization (15), predicted amphipathic helix (16)
	76	V (401),A(3)	A (625),V(57)	ANT3, VADC1 (14), predicted amphipathic helix (16)
	79	R (369),Q(34),L(1)	Q (607),R(75)	ANT3, VADC1 (14), predicted amphipathic helix (16)
	82	L (382),S(22)	S (596),L(86)	ANT3, VADC1 (14), predicted amphipathic helix (16)
	87	E (389),G(14),K(1)	G (637),E(45)	ANT3, VADC1 (14)
PA	28	P (213),S(1)	L (831),P(9),R(2)	Proteolysis (17)
	55	D (214)	N (836),D(5)	Proteolysis (17)
	57	R (210),Q(4)	Q (829),R(6),L(4),K(2)	Proteolysis (17)
	225	S (213),C(1)	C (829),S(10)	Proteolysis (17), NLSII (18)
	268	L (214)	I (827),L(11), P(1)	
	356	K (212),X(1),R(1)	R (827),K(11)	
	382	E (208),D(5),V(1)	D (824),E(11),V(2),N(1)	
	404	A (214)	S (828),A(9),P(1)	
	409	S (189),N(24),I(1)	N (830),S(7),I(1)	
	552	T (213),N(1)	S (835),T(1),I(1)	
HA	237	N (582),R(49),D(2),H(1),S(1)	R (1209),N(12),S(2),D(1),K(1)	
	389	D (659),N(20),G(1),Y(1)	N (819),D(121)	
NP	16	G (356),S(9),D(6),T(2)	D (646),G(7)	RNA binding (19), BAT1/UAP56 (20), MxA (21), PB2-1 (22)
	33	V (355),I(18)	I (638),V(15)	RNA binding (19), MxA (21), PB2-1 (22)
	61	I (366),M(6),V(1)	L (642),I(8)	RNA binding (19), MxA (21), PB2-1 (22)
	100	R (360),K(11),V(2)	V (619),I(32),A(1),M(1)	RNA binding (19), MxA (21), PB2-1 (22)
	109	I (359),V(10),M(2),T(2)	V (614),I(34),T(3),A(2)	RNA binding (19), MxA (21), PB2-1 (22)
	214	R (352),K(20),L(1)	K (640),R(10)	NLS (23), CRM1 (24), NP-1 (25)
	283	L (372),P(1)	P (643),L(7)	NP-1 (25), PB2-2 (22)
	293	R (371),K(2)	K (622),R(28)	NP-1 (25), PB2-2 (22)
	305	R (369),K(4)	K (636),R(14)	NP-1 (25), PB2-2 (22)
	313	F (371),I(1),L(1)	Y (642),F(8)	NP-1 (25), PB2-2 (22)
	357	Q (368),K(4),T(1)	K (644),R(8),Q(1)	NAS (26), NP-1 (25), PB2-3 (22)
	372	E (357),D(15),K(1)	D (630),E(23)	NAS (26), NP-2 (25), PB2-3 (22)
	422	R (373)	K (630),R(23)	CTL epitope (27), NP-2 (25), PB2-3 (22)
	442	T (372),A(1)	A (629),T(23),R(1)	NP-2 (25), PB2-3 (22)
	455	D (373)	E (630),D(22),T(1)	NP-2 (25), PB2-3 (22)
M1	115	V (856),I(2),L(1),G(1)	I (981),V(9)	
	121	T (840),A(19),P(1)	A (988),T(2)	
	137	T (859),A(1),P(1)	A (974),T(12)	
M2	11	T (434),I(11),S(2)	I (911),T(44)	Host restriction specificities (28), ectodomain (29)
	20	S (471),N(13)	N (926),S(29)	Host restriction specificities (28), ectodomain (29)
	57	Y (481),C(1),H(1)	H (913),Y(33),R(2),Q(1)	CRAC (30), endodomain (29)
	86	V (378)	A (924),V(10),T(4),D(1)	Endodomain (29)
NS1	227	E (692),G(9),K(1),S(1)	R (897),G(5),K(1),E(1)	
NS2	70	S (453),G(21),D(1)	G (903),S(2)	M1, NEP dimerization domain (31)
	107	L (468),S(2),F(1)	F (777),L(16),S(1)	M1, NEP dimerization domain (31)

*Numbers in parentheses in residue columns are the number of sequences yielding the specific amino acid residue; **bold** indicates dominant amino acid residue type.

2. Epidémiologie : épidémies et pandémies

2.1. Epidémies saisonnières

La grippe saisonnière est due à la circulation chaque hiver d'un ou plusieurs virus influenza humains, de type A ou B, à l'origine d'une épidémie pouvant être associée à 250 000 décès par an dans le monde. Chaque année approximativement, 5 à 10% de la population humaine est infectée par un virus influenza appartenant aux sous-types A(H1N1), A(H3N2) ou B, c'est-à-dire environ 3 à 5 millions de personnes. Selon les données du GROG (Groupes régionaux d'observation de la grippe) collectées entre 1992 et 2010, le nombre maximum de cas rapportés, avant la pandémie de 2009, était de 4 605 000 lors de l'épidémie A(H3N2) de l'hiver 2003-2004 et le nombre minimum était de 2 252 000 lors de l'épidémie A(H1N1) de 2007-2008 (données du bulletin GROG n°35 2009-2010 du 28 avril 2010). Les épidémies surviennent l'hiver dans l'hémisphère nord. La durée moyenne d'une épidémie saisonnière est de 8 semaines [5 semaines en 1993-1994 et 2006-2007 - 12 semaines en 1996-1997]. Généralement, l'épidémie démarre au cours des mois de décembre ou janvier mais, par exemple, au cours de l'hiver 1994-1995, l'épidémie, due à un virus influenza B, a démarré fin mars. Les virus responsables émergent généralement de l'Est et du Sud Est de l'Asie. Étant donné les mécanismes de glissement antigénique, les virus émergents sont différents des virus ayant circulé l'hiver précédent ce qui impose la réactualisation annuelle de la composition vaccinale.

2.2. Pandémies du XX^{ème} siècle

Une pandémie est une épidémie mondiale touchant approximativement 30% de la population. Elle survient lorsqu'est introduit, dans la population humaine, un virus influenza contre lequel la population ne possède pas d'immunité. Sur le plan virologique, il s'agit généralement de l'émergence d'un virus appartenant à un sous-type différent des virus ayant circulé les années précédentes (une HA et/ou une NA différentes) ou à un virus du même sous-type mais d'origine différente (aviaire ou porcine). Ceci est arrivé 3 fois au cours du XX^{ème} siècle : en 1918, 1957 et 1968 (Tableau 6).

Tableau 6: caractéristiques comparées des trois pandémies grippales du XX^{ème} siècle
(d'après ⁶⁷).

Date et nom de la pandémie	Région d'émergence	Sous-type du virus influenza pandémique	Taux de reproduction estimé	Taux de mortalité estimé	Sur-mortalité estimée dans le monde	Groupe d'âge principalement touché
1918-1919 « Grippe Espagnole »	Indéterminée	A(H1N1)	1,5 – 1,8	2 – 3%	20 – 50 millions	< 40 ans
1957-1958 « Grippe Asiatique »	Asie du sud	A(H2N2)	1,5	< 0,2%	1-4 millions	Enfants
1968-1969 « Grippe de Hong Kong »	Asie du sud	A(H3N2)	1,5	< 0,2%	1-4 millions	Tous les groupes d'âge

En 1918, un virus influenza A(H1N1) tua, en 2 hivers consécutifs, 50 millions de personnes, c'est-à-dire plus que la 1^{ère} Guerre Mondiale en 4 ans. La grippe espagnole reste la pandémie la plus meurtrière à ce jour. En Europe, la mortalité observée fut plus élevée dans le nord que dans le sud et globalement 1% de la population fut tuée (2,6 millions de décès) selon une courbe de mortalité dite en « W » c'est à dire avec un excès de mortalité rapporté pour les 20-40 ans par rapport au reste de la population. La première vague modérée, survenue au printemps 1918, fut suivie d'une seconde vague de septembre à novembre 1918. La mortalité observée fut de 2,5%, c'est-à-dire 25 fois plus élevée que la mortalité mesurée lors d'une épidémie saisonnière (0,1%). Enfin, une troisième vague aussi meurtrière, submergea la planète au cours de l'année 1919. La mortalité particulièrement importante associée à cette pandémie et touchant principalement les sujets jeunes reste inexpliquée. La morbidité fut comparable à ce qui a été observé lors des pandémies suivantes, à l'exception d'un taux d'attaque plus important chez les sujets de moins de 15 ans. L'étude de la pathogenèse de ce virus, chez le primate, en utilisant un virus influenza A(H1N1) 1918 reconstitué par génétique inverse, a montré une infection du tractus respiratoire sans dissémination systémique ⁶⁸. La mortalité semble avoir été liée à la survenue de pneumonies virales vraies mais aussi de surinfections bactériennes dont les conséquences ont été lourdes, du fait de l'absence d'antibiotiques à cette époque ⁶⁹.

Le virus influenza responsable de cette épidémie n'a pas été isolé en 1918, mais son ARN a pu être extrait de cadavres infectés par ce virus et conservés dans le permafrost ⁷⁰. Le séquençage de cet ARN, a montré, sur la base d'analyses phylogénétiques, qu'il semblait être un virus d'origine aviaire introduit dans la population humaine ⁷¹. Des signatures humaines ont été observées au niveau de son HA ²⁴, sa NA ⁷² et son complexe polymérasique ⁷¹. Des résultats contradictoires ont été obtenus et la discussion sur l'origine exacte de ce virus est toujours en cours ⁷³.

Quarante ans après la grippe espagnole, en 1957, un nouveau virus émergea. Ce virus, responsable de la Grippe Asiatique circula dans le sud de la Chine en février 1957. Puis il fut détecté à Singapour (mars 1957), à Hong Kong (avril 1957), au Japon (mai 1957) puis aux Etats-Unis et en Grande-Bretagne (octobre 1957). La deuxième vague eut lieu en janvier 1958. Aux Etats-Unis, la mortalité a été estimée à 70 000 individus. Cette pandémie fut provoquée par l'introduction d'un virus influenza A réassortant, possédant trois segments de gène d'origine aviaire: une HA de sous-type H2, une NA de sous-type N2 et un gène PB1 ; les 5 autres gènes étaient d'origine humaine (Figure 6). L'introduction de ce nouveau sous-type A(H2N2) dans la population mondiale fut à l'origine d'un million de morts dans le monde.

Onze ans plus tard, ce virus A(H2N2) fut remplacé par un virus A(H3N2) résultant du réassortiment du virus « humain » A(H2N2) de 1957 et d'un virus aviaire qui céda son HA de sous-type H3 et son gène PB1 (Figure 6). Cette souche, détectée à Hong Kong en juillet 1968, se répandit sur la planète au cours des hivers 1968-1969 et 1969-1970. Aux Etats-Unis, 33 800 et dans le monde, entre 1 et 4 millions d'individus sont décédées de la Grippe de Hong-Kong.

En mai 1977, une épidémie de grippe fut rapportée en Chine affectant les jeunes adultes. Cette épidémie fut causée par un sous-type A(H1N1) particulièrement proche du sous-type A(H1N1) ayant circulé dans les années 50 ⁷⁴. Sa réintroduction, probablement accidentelle, dans la population humaine ne remplaça pas le sous-type A(H3N2) et les deux virus co-circulent encore aujourd'hui.

2.3. Menaces pandémiques

Depuis 1956, de nombreuses épizooties responsables d'infections massives dans des élevages de volailles ou de porcs ont été rapportées. Les virus concernés appartiennent à différents sous-types (H9N2, H7N7, H7N3, H10N7, H1N1, H5N1). Depuis 1968, des cas isolés ou des cas groupés, de faible ampleur, d'infections humaines dues à un virus aviaire ou porcin ont été rapportés. En 2003, une épizootie de grande ampleur due à un virus A(H7N7) aux Pays Bas fut à l'origine de 89 cas de transmission à l'homme et d'un décès^{57, 75}.

Depuis, le virus A(H5N1) est l'agent étiologique d'une épizootie sans précédent par son ampleur et sa durée. Il fut détecté chez des oies pour la première fois en 1996, en Chine. Personne n'y prêta vraiment attention jusqu'au mois de mai 1997 où des cas d'infection humaine par le virus influenza A(H5N1) furent rapportés à Hong Kong, associés à 6 décès^{76,77}. Cette épidémie fut contrôlée par l'abattage massif des élevages de volailles infectés ainsi que l'interdiction des marchés d'animaux vivants. Après une période de petites épidémies locales et de cas sporadiques, une nouvelle épidémie débuta en 2003. L'épizootie et les cas humains d'infection A(H5N1) furent confinés à l'Asie du Sud Est jusqu'en mai 2005, avant d'être observés chez des oiseaux d'espèces diverses en Europe, en Inde et en Afrique⁷⁸. Ces virus hautement pathogènes possèdent des caractéristiques remarquables. Ils ne sont pas seulement létaux pour les poulets ou volailles domestiques mais certains peuvent tuer les oiseaux aquatiques alors que ces oiseaux, qui constituent le réservoir naturel des virus influenza A, étaient jusque là porteurs sains.

Chez l'homme, environ 493 cas d'infection par le virus A(H5N1) ont été détectés à la date du 9 avril 2010 et 292 décès ont été rapportés sur 3 continents⁷⁹. Au final, ce virus se caractérise par un taux de mortalité très important mais une très mauvaise capacité de dissémination chez l'homme, contrairement au virus A(H1N1)2009 qui semble très bien diffuser chez l'homme mais n'entraîne un nombre limité d'infections fatales. La menace actuelle repose sur le risque de réassortiment entre ces deux virus.

2.4. Pandémie du XXI^{ème} siècle

Quarante et un ans après la dernière pandémie, en février 2009, l'introduction d'un nouveau virus A(H1N1)2009 d'origine porcine, déclencha une nouvelle épidémie mondiale.

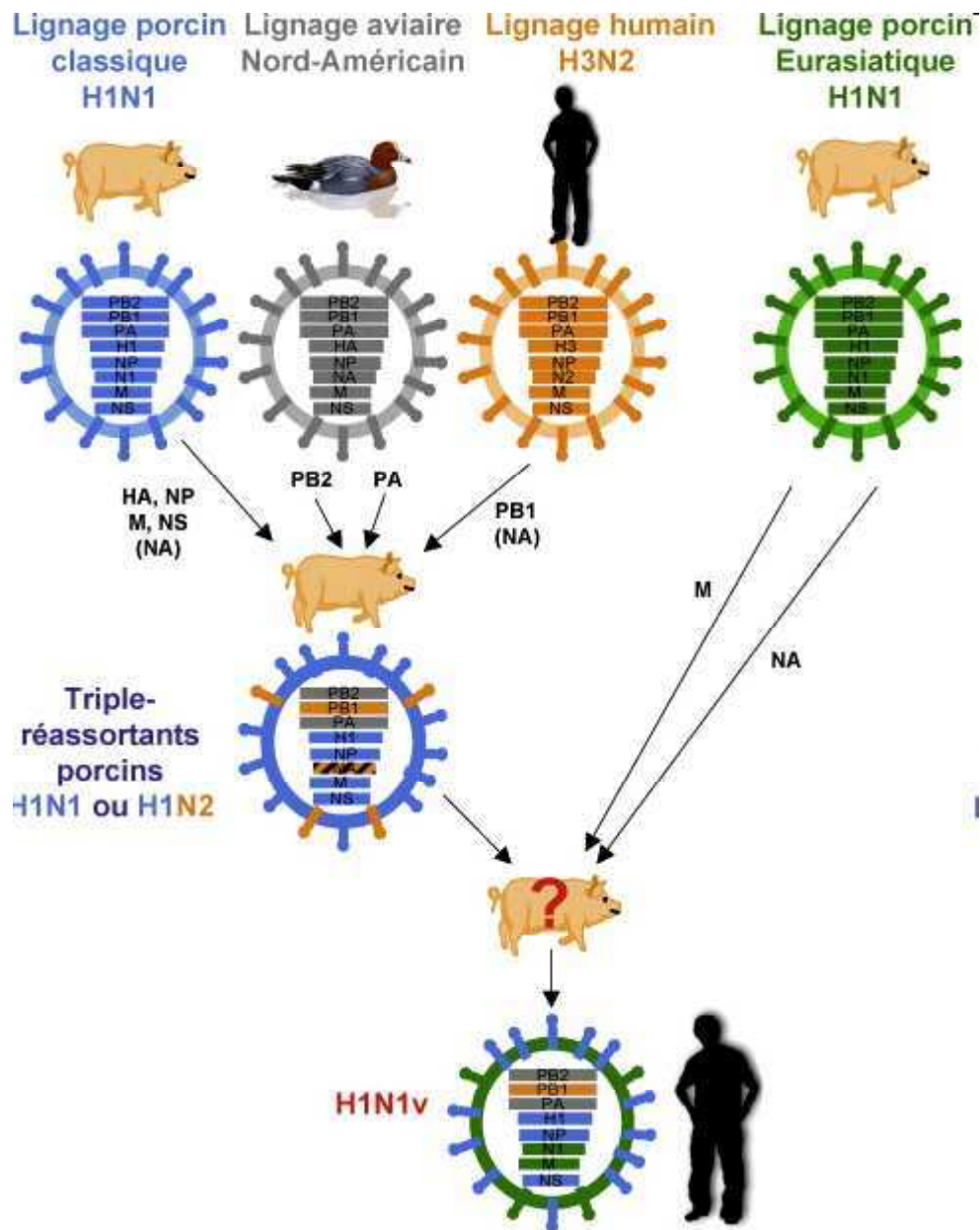
Les données épidémiologiques disponibles indiquent qu'une épidémie de syndromes respiratoires pseudo-grippaux commença dans la ville mexicaine de La Gloria, Veracruz, mi février 2009 ⁸⁰. Début avril les autorités de Mexico commencèrent des investigations concernant un grand nombre de pneumonies évoquant des syndromes grippaux et informèrent l'OMS et la PAHO (« Pan American Health Organization ») d'une probable épidémie. Aux Etats-Unis, le CDC (« Centers for Disease Control ») identifia le virus A(H1N1)2009 dans deux prélèvements, indépendamment collectés, dans le sud de la Californie, mi-avril. Le 23 avril, l'agence de Santé Publique du Canada détecta le virus A(H1N1)2009 dans des prélèvements reçus de Mexico. D'autres cas furent rapportés et les similitudes entre les virus isolés au Mexique et en Californie alertèrent le CDC et l'OMS le 24 avril 2009. Fin avril, la diffusion internationale et l'existence de cas groupés de transmission interhumaine imposa à l'OMS d'augmenter le niveau d'alerte pandémique de la phase 3, 4 puis rapidement à la phase 5 (dissémination interhumaine dans au moins deux pays, signe d'une pandémie imminente). A Mexico, des mesures sociales furent mises en place et des campagnes massives d'éducation de la population sur les mesures et précautions d'hygiène furent dispensées. Le 21 mai, 41 pays avaient rapporté 11 034 cas, incluant 85 décès. La plupart des cas survenus aux Etats-Unis furent importés par des voyageurs en provenance de Mexico. La plupart des infections rapportées furent modérées, ne nécessitant pas d'hospitalisation. Le bilan du 29 janvier 2010 montre que 209 pays ont rapporté des cas confirmés de grippe A(H1N1)2009 dont plus de 14 711 décès ²³.

Après 9 mois de circulation, plus de 23 000 virus ont été analysés, ils sont tous apparentés antigéniquement avec la souche vaccinale A/California/07/2009. Une surveillance attentive sera nécessaire pendant les mois à venir pour détecter la possible émergence de variants plus virulents, à l'image de ce qui a été observé avec le virus de 1918. Le virus A(H1N1)2009 est le résultat du réassortiment entre un virus porcin appelé « triple réassortant porcin » de sous-type H1N1 ou H1N2 et d'un autre virus porcin du lignage eurasiatique (Figure 7). Le « triple réassortant porcin » est un virus circulant chez le porc, aux USA, depuis les années 90. Il possède une constellation de segments de gènes internes comprenant des segments internes

porcins issus du lignage classique (HA,M, NP, NS), des segments aviaires (PB2, PA) et un segment humain (PB1)¹⁴ (Figure 7).

Ces virus ne possèdent pas de facteurs de virulence particuliers mais son HA semble phylogénétiquement proche de la HA du virus A(H1N1) de 1918 ayant circulé chez l'homme jusqu'en 1957. Cette observation permet d'envisager que les personnes ayant fait une infection grippale avant 1957 puissent garder une certaine immunité résiduelle.

Figure 7 : origines du virus A(H1N1)2009 (d'après ¹⁴)



Des analyses phylogénétiques ont permis d'établir l'origine de chacun des segments du virus pandémique A(H1N1)2009. Les segments NA et M dérivent d'un virus porcin du lignage eurasiatique. Les autres segments dérivent d'un virus porcin A(H1N1) ou A(H1N2) « triple réassortant porcin » qui sont constitué de segments d'origines aviaire (PB2 et PA), humaine (PB1 d'un virus A(H3N2)) et porcine (HA, NP, M, NS) dérivant d'un virus A(H1N1) du lignage classique. Selon que ces virus sont de sous-type H1N1 ou H1N2, le segment dérive d'un virus H1N1 « porcin classique » ou d'un virus H3N2 humain ¹⁴.

3. Infection grippale

3.1. Modes de transmission

Le virus influenza se multiplie principalement dans les cellules superficielles du tractus respiratoire *in vivo* chez l'homme. Les virus sont relargués au niveau apical de la cellule, ce qui limite la dissémination systémique mais facilite l'accumulation de virus dans la lumière du tractus respiratoire et donc sa transmission. Après une période d'incubation de 1 à 3 jours, l'excrétion virale peut commencer 24-48 heures avant le début des symptômes, atteindre son maximum entre 24 et 72 heures après le début des symptômes et se prolonger jusqu'à 8 jours (durée moyenne 4,8 jours) chez l'adulte ^{81,82}. Chez l'enfant, l'excrétion peut débuter plus précocément. Une étude a montré que chez 8% des enfants suivis, l'excrétion avait débuté entre 3 et 6 jours avant le début des symptômes ⁸³. Hall *et al.* ont rapporté que l'excrétion chez l'enfant durait entre 7 et 8 jours après le début des symptômes, et pouvait se prolonger jusqu'à 21 jours ⁸⁴. Ces auteurs ont observé une excrétion de 8-11 jours chez 10% des enfants et de 12-15 jours chez 5% d'entre eux⁸⁴.

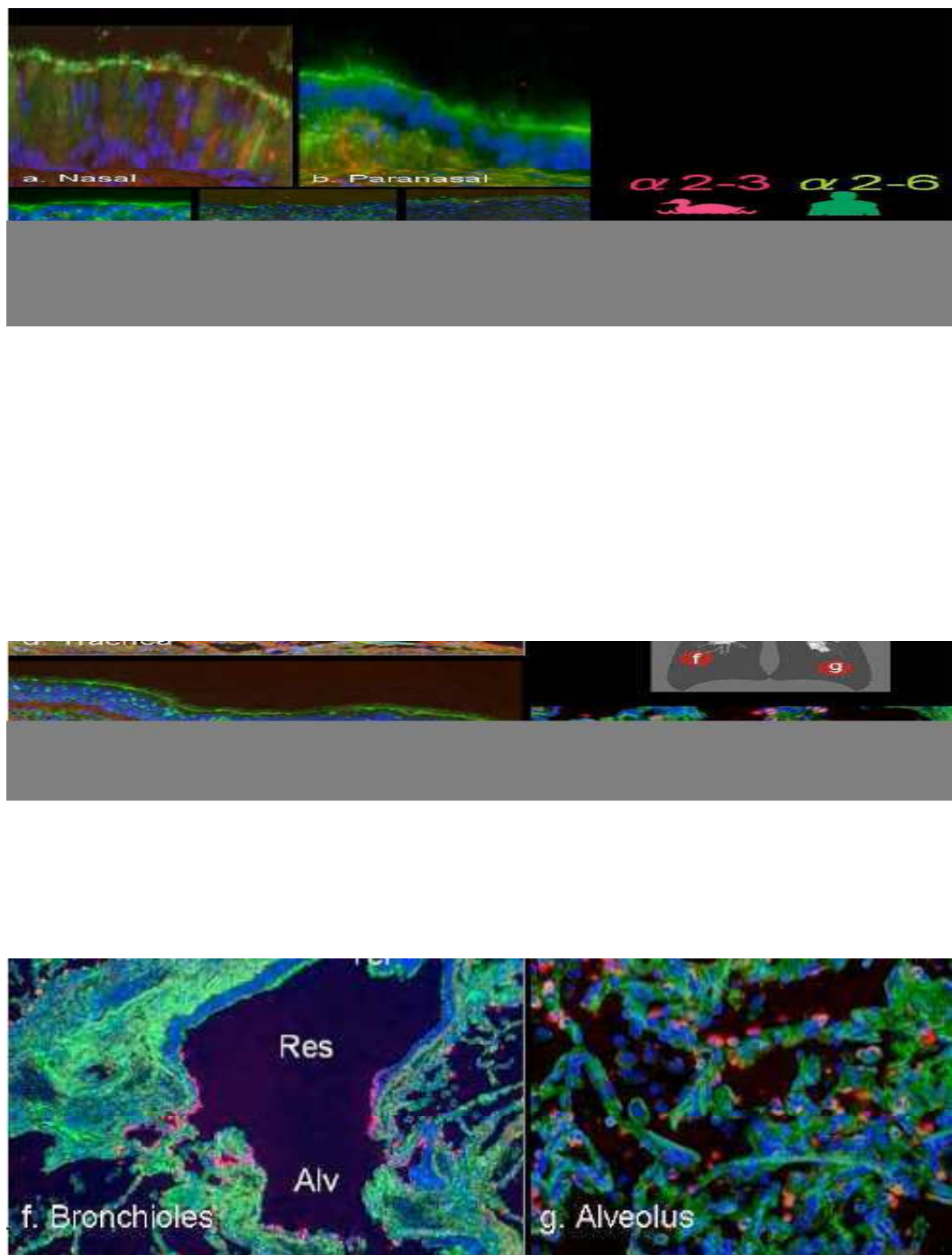
Le taux de reproduction R_0 des virus saisonniers, qui traduit le nombre d'individus infectés à partir d'un patient, est compris entre 1,8 et 2,5 ⁸⁵. Le R_0 observé lors des pandémies de 1918, 1957 et 1968, était compris entre 1,2 et 1,7 ^{86,87,88}. L'infection grippale est très contagieuse car il suffit d'inhaler 100 à 300 particules infectieuses pour être infecté alors qu'un individu symptomatique peut excréter dans ses sécrétions nasopharyngées de l'ordre de 10^3 à 10^7 DICT50/ml (doses infectieuses)⁵. La contamination se fait par voie respiratoire ou conjonctivale et les modes de transmission sont divers. Les modes principaux de contamination sont directs par inhalation de gouttelettes (« droplets ») de salive (postillons) ou de sécrétions rhinopharyngées (toux, éternuements) projetées par le malade mais il existe aussi une transmission indirecte par contact avec des surfaces contaminées ^{89,90}. La voie « manuportée » où l'individu se contamine après avoir touché une surface contaminée ou serré la main d'un sujet malade et porté ensuite sa main au niveau nasal ou conjonctival est certainement un mode de transmission très efficace. La contamination par l'inhalation de particules en suspension dans l'air (fines particules de moins de 5 microns de diamètre) est possible mais il est difficile d'en estimer l'importance. L'OMS a défini un certain nombre d'actes médico-chirurgicaux qui sont générateurs d'aérosols et qui peuvent donc représenter

un risque pour le manipulateur qui les réalise. Il s'agit de l'intubation, de la bronchoscopie et de l'autopsie, entre autres.

3.2. Pathogenèse et clinique chez l'homme de l'infection grippale

La pathogenèse de l'infection grippale chez l'homme repose aussi sur la répartition, dans l'arbre respiratoire, des récepteurs de type $\alpha 2-6$ ou $\alpha 2-3$ ⁹¹. En effet, chez l'homme, les récepteurs sont plutôt de type $\alpha 2-6$ et présents au niveau respiratoire supérieur (nez, pharynx, trachée, bronches) mais des récepteurs de type $\alpha 2-3$ ont récemment été décrits, au niveau respiratoire inférieur (bronchioles et alvéoles) (Figure 8)^{43,92}. Cette répartition conditionne le site d'infection par un virus reconnaissant spécifiquement l'un ou l'autre des récepteurs et explique qu'un virus humain soit à l'origine d'un tableau respiratoire supérieur alors qu'un virus aviaire provoque une infection respiratoire basse.

Figure 8 : répartition des récepteurs cellulaires du virus influenza de types $\alpha 2-3$ et $\alpha 2-6$ (d'après ⁹²).



Détection par marquage immuno-histochimique des récepteurs du virus influenza : $\alpha 2-6$ (vert) et $\alpha 2-3$ (rouge) au niveau des épithéliums de l'arbre respiratoire humain. (a) nez, (b) sinus paranasaux, (c) pharynx, (d) trachée, (e) bronches, (f) bronchioles, (g) alvéoles.

3.2.1. Grippe saisonnière

La grippe saisonnière est une infection virale évoluant sur un mode épidémique ou pandémique.

Le tableau clinique se traduit par une trachéo-bronchite simple, associant des signes locaux (rhinite, toux, maux de gorge) et des signes généraux (maux de tête, fièvre élevée d'apparition brutale, frissons, anorexie, myalgies, malaise). Chez des patients présentant des facteurs de risque respiratoire (Tableau I / Annexe 4, « Grippe aviaire chez l'enfant », Bouscambert-Duchamp *et al.*, 2009), le tableau initial simple peut se compliquer d'une pneumonie par extension distale de l'infection au niveau de l'épithélium alvéolaire (détresse respiratoire)^{93,94}. La question d'une multiplication virale dans des sites extra-respiratoires faisant suite à une virémie est évoquée sans preuve à ce jour. Des formes asymptomatiques existent puisque dans une étude réalisée chez des volontaires sains, seulement 66,9% (IC 95% : 58,3-74,5) d'entre eux ont présentés des signes de grippe sans différences significatives selon le sous-type viral ou la dose virale inoculée⁸¹.

3.2.2. Grippe aviaire

Les virus A(H5N1) hautement pathogènes, responsables de la plus grande épizootie jamais décrite ont une pathogénicité qui augmente progressivement. Ils peuvent désormais provoquer une infection chez différentes espèces de mammifères, dont les félins. Au niveau expérimental, ils peuvent induire une infection létale chez la souris sans aucune adaptation préalable ainsi que des infections de plus en plus sévères chez le furet. Enfin, ils continuent leur transmission chez l'homme, entraînant des infections respiratoires sévères avec des taux de mortalité très élevés de l'ordre de 60%, ce qui fait de ce virus l'un des agents infectieux associé au taux de mortalité le plus important^{27 95}.

Des infections bénignes ou asymptomatiques existent probablement, mais restent rares comme en témoignent les observations de Thorson *et al.* qui décrivent des syndrome grippaux modérés observés au Vietnam, dans une population exposée à des volailles contaminées⁹⁶. Schultz *et al.* ont réalisé des études sérodiagnostiques rétrospectives chez 500 individus

travaillant au contact de volailles infectés, et ils n'ont pu détecter la présence d'anticorps que dans 3 sérums ⁹⁷.

Aucune transmission interhumaine n'a été identifiée, mais dans un quart des cas, les infections surviennent au sein d'une même famille impliquant en général 2 ou 3 personnes ⁹⁸. Les patients infectés par un virus A(H5N1) présentent tous une pneumonie sévère entraînant la mort dans 60% des cas. Différents facteurs de risque de contracter une infection A(H5N1) ont été identifiés ⁹⁹. Ils sont étroitement liés aux pratiques culturelles, ce qui explique pourquoi les premiers cas d'infections sont survenus en Asie. La préparation des volailles infectées pour la cuisine, le plumage en particulier, expose l'individu à des quantités très importantes de virus, sous forme d'aérosols. Dans de nombreux villages, les oiseaux vivent sous les toits, aux contacts des hommes et les enfants jouent avec les oiseaux, y compris des oiseaux malades. Les combats de coqs ont aussi été reconnus comme une source d'exposition à des aérosols de virus, produits par des oiseaux agités dans de petits espaces confinés. Enfin, l'absence d'eau courante, et donc l'approvisionnement dans des points d'eau extérieurs souillés par les déjections d'oiseaux sauvages ou domestiques, qui viennent s'y abreuver, est le 2^{ème} facteur de risque identifié ¹⁰⁰.

Lorsqu'une infection par un virus aviaire survient chez l'homme, la pathogenèse de l'infection est différente de celle observée lors d'une infection par un virus humain. Ainsi, les virus A(H5N1) (aviaires) se fixent et infectent les cellules de l'épithélium des bronchioles et principalement les alvéoles ⁹¹. La faible abondance des récepteurs $\alpha 2-3$ au niveau des voies aériennes supérieures induit une faible réplication virale dans ces sites, et donc une faible excrétion. La transmission à l'entourage est donc moins importante que pour une grippe saisonnière et les signes d'infection trachéo-bronchique sont inconstants. En revanche, l'infection étant massive au niveau distal, l'atteinte alvéolaire est très importante, entraînant des dysfonctionnements respiratoires sévères. À la différence d'une grippe saisonnière, une virémie intense est observée. Elle permet la dissémination du virus vers différents sites extra-pulmonaires : cerveau, intestin, foie, ganglions, rate, moelle osseuse ²⁷. A l'image de ce qui est observé chez l'oiseau, l'épithélium intestinal humain est riche en récepteurs $\alpha 2-3$, ce qui explique que le virus A(H5N1) puisse s'y multiplier induisant des signes digestifs de type diarrhée ou vomissement. Des convulsions sont aussi été rapportées évoquant un neurotropisme peut être plus important pour le virus A(H5N1), que pour les autres sous-types de virus influenza.

La période d'incubation apparaît comme étant plus longue que pour un virus saisonnier, entre 2 et 7 jours et jusqu'à 9 jours dans certains clusters. L'excrétion aussi semble allongée car l'ARN viral est détectable jusqu'à 3 semaines après le début des symptômes au niveau du tractus respiratoire ⁹⁸.

Sur le plan clinique, tous les patients ont présenté un tableau initial d'infection grippale avec ou sans signes ORL ou digestifs, suivis d'une pneumonie d'évolution rapide avec détresse respiratoire et expectorations sanglantes. Dans les cas les plus sévères, l'évolution vers un syndrome de détresse respiratoire aigue (SDRA) est observée dans les 6 jours de la maladie, avec une défaillance multi viscérale entraînant la mort entre 4 et 32 jours (médiane de 9.5 jours). Les examens biologiques ont montré une lymphopénie associée à une thrombocytopénie, indicateur pronostic d'évolution vers un SDRA. Dans tous les cas, la radio thoracique est anormale ⁹⁸ (Tableau II / Annexe 4 : « Grippe aviaire chez l'enfant », Bouscambert-Duchamp *et al.*, 2009).

La gravité de l'infection induite par le virus A(H5N1) s'explique par une dissémination forte non contrôlée. Différentes hypothèses en rapport avec l'hôte ou le virus peuvent être avancées. L'absence d'immunité préalable vis-à-vis de ce sous-type viral peut être évoquée mais l'observation de cas familiaux, certes exposés aux mêmes facteurs de risque, permet d'envisager une possible susceptibilité génétique. Le comportement des virus A(H5N1) est atypique, probablement en rapport avec sa pathogenèse particulière, observée lorsque l'infection survient chez l'homme.

L'infection humaine par un virus aviaire n'est possible que si l'individu est exposé à des quantités très importantes de virus. En plus d'une forte virulence intrinsèque (site de clivage multibasique) (Tableau 3), le virus A(H5N1) est capable de provoquer une virémie ainsi qu'une activation des cascades de cytokines pro-inflammatoires médiée par un facteur de virulence porté par NS1 (Tableau 3). Il est, en effet, observé dans les cas sévères, une absence de régulation de l'inflammation associée à des dysfonctionnements respiratoires et circulatoires, aboutissant à une détresse multiorganique. Le décès est noté dans 60% des cas analysés ⁹⁵.

3.2.3. Grippe A(H1N1)2009

Les premières données mondiales ont rapporté que la majorité des patients hospitalisés étaient âgés de moins de 18 ans, et que très peu d'entre eux avaient plus de 65 ans ¹⁰¹. Dans 40 à 70% des cas, les patients ayant présenté des tableaux sévères présentaient des facteurs de risque, ¹⁰².

Début 2010, la France a connu la fin de sa première vague et compte à la date du 13 avril 2010, 312 décès qui, dans 66% des cas sont survenus chez les 15-64 ans ¹⁰³. Aucun facteur de risque n'a été identifié chez 11% des 15-64 ans et 16% de la population générale, toutes classes d'âge confondues. Lorsqu'un facteur de risque est identifié, il s'agit d'une pathologie respiratoire chronique (25%), d'un diabète (13%), d'une insuffisance cardiaque (13%) ou un déficit immunitaire acquis ou iatrogène (12%). Durant cette même période, 1 334 cas graves hospitalisés ont été recensés. Le nombre de cas, symptomatiques et asymptomatiques, estimé en France, durant cette période, est compris entre 7,7 et 14,7 millions soit entre 13 et 24% de la population de France métropolitaine ¹⁰³. A l'heure des premiers bilans, le nombre de décès attribuables à la grippe semble avoir été limité, mais le profil des patients atteints de formes graves et des personnes décédées de la grippe a été modifié, avec un impact plus important chez les personnes jeunes en comparaison de ce qui est observé lors des épidémies saisonnières.

La pathogenèse de l'infection est celle d'une grippe saisonnière, sans particularité. Ce virus ne possède aucun des facteurs de virulence précédemment décrits. La seule modification observée sur certaines souches est une mutation sur la HA en 222 (D222G). Elle a été détectée initialement dans certaines souches responsables de cas sévères (SDRA ou décès). Cette mutation confère au virus une plus grande affinité pour les récepteurs de type $\alpha 2-3$ et donc potentiellement un plus grand risque de développement d'une pneumonie sévère. En pratique, cette mutation est aussi retrouvée sur des souches responsables de tableaux de grippe tout à fait bénins. La mutation D222G ne modifie pas les propriétés antigéniques de ces souches qui restent apparentées à la souche vaccinale.

4. Diagnostic

Le diagnostic de certitude d'une grippe impose une confirmation virologique. Elle repose principalement sur la détection directe du virus dans un prélèvement respiratoire. Différents outils ont été développés pour une détection sensible et spécifique des virus influenza saisonniers mais aussi des virus A(H5N1) et du virus pandémique A(H1N1)2009.

Le prélèvement

La qualité du prélèvement conditionne les performances du diagnostic. En effet, le prélèvement doit être riche en cellules infectées si l'on veut avoir des charges de virus suffisamment importantes pour permettre leur détection. Les prélèvements de choix sont non invasifs tels que les aspirations nasopharyngées ou trachéobronchiques, les écouvillonnages nasopharyngés et les lavages nasaux ou bronchiques. Pour explorer une infection respiratoire basse, un liquide broncho-alvéolaire doit être réalisé. Pour la conservation du virus après un écouvillonnage, il est indispensable d'utiliser un dispositif comprenant un milieu de transport pour virus comme les systèmes Virocult® (ELitech) ou Flock swabs® (COPAN). Dès sa réalisation, le prélèvement doit être rapidement acheminé au laboratoire.

Diagnostic direct

Parmi les outils disponibles, il existe les techniques de référence permettant la détection du virus en culture cellulaire, les techniques utilisant des anticorps spécifiques permettant la détection des antigènes viraux et enfin les techniques de biologie moléculaire pour la détection du génome viral.

La culture cellulaire permet de détecter la multiplication du virus présent dans un prélèvement en le mettant en contact avec des cellules permissives à l'infection par le virus influenza. Les cellules utilisées peuvent être des cellules souches diploïdes, ou des cellules de lignées continues hétérodiploïdes d'origine tumorale, pouvant se diviser indéfiniment. Les cellules permettant la culture du plus grand nombre de sous-types viraux, d'origine humaine ou aviaire, sont les MDCK (« Madin-Darby Canin Kidney ») qui sont une lignée continue de cellules de reins de chien. D'autres lignées cellulaires continues sont utilisées, telles que les LLC-MK2 (cellules de rein de singe rhésus), les Vero (cellules de rein de singe), A549 (cellules de carcinome pulmonaire humain). La culture des virus influenza est possible en

présence de 5% de CO₂ et de trypsine dans le milieu d'infection, à une température comprise entre 33 et 35°C. L'effet cytopathique peut être visible entre 2 et 4 jours, en fonction des capacités de réplication et de la quantité de virus présente initialement dans le prélèvement. Une fois multipliée sur cellules, la souche virale peut être récoltée, titrée, puis des analyses complémentaires peuvent être réalisées telles que le séquençage de la souche ou l'étude de sa sensibilité aux antiviraux. La culture cellulaire n'est réalisée que dans des laboratoires de Virologie spécialisés et impose un personnel qualifié. Il s'agit de techniques longues imposant en plus de l'inoculation et du suivi de la culture, l'entretien des lignées cellulaires en parallèle. La culture sur œufs embryonnés reste la technique utilisée pour la production de souches vaccinales et la production de très grandes quantités de virus. La plupart des virus influenza, en particulier les virus aviaires, peuvent être isolés dans la cavité allantoïque ou amnotique des œufs embryonnés.

La détection de la présence de virus dans des prélèvements de patients est possible par la mise en évidence des antigènes viraux. Ces techniques reposent sur l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre les protéines M ou NP, lorsqu'il s'agit de détecter les virus influenza A ou B en général, ou contre la HA, lorsque l'on veut déterminer le sous-type viral précisément. Elles comprennent des tests immuno-enzymatiques (type ELISA), l'immunofluorescence et les tests de diagnostic rapide de type immuno-chromatographiques, qui permettent de déterminer en moins de 15 minutes la présence ou non de virus influenza A ou B. Ces tests sont spécifiques (90 et 95%) mais manquent de sensibilité. Elle est de l'ordre de 50 à 70% pour la détection des virus saisonniers mais elle chute à moins de 40% pour la détection du virus pandémique A(H1N1)2009 ¹⁰⁴. Dans tous les cas, si une décision thérapeutique doit être prise, une confirmation du diagnostic par RT-PCR ou culture cellulaire est recommandée.

La méthodologie de choix, pour une détection rapide (moins de 3-4 heures) et sensible des virus influenza est la biologie moléculaire. En pratique, une séquence cible du génome viral est amplifiée par un système de RT-PCR associant une enzyme de type polymérase, des amorces capables de s'hybrider spécifiquement et une sonde marquée, si il s'agit de PCR temps réel. Le facteur d'amplification est de l'ordre de 10⁵ à 10⁶ (si la PCR comprend 30 à 40 cycles). Actuellement la RT (« reverse transcription ») et la PCR (« polymerase chain reaction ») se font en une étape, en temps réel, à partir de l'ARN extrait du prélèvement. L'efficacité et les performances des RT-PCR développées reposent en partie sur le choix

pertinent des séquences d'amorces et de sondes. Des RT-PCR multiplex permettant de détecter différents virus respiratoires sont disponibles, mais peuvent manquer de sensibilité en comparaison des RT-PCR simplex. La biologie moléculaire a permis de nettement améliorer le diagnostic par sa rapidité et sa sensibilité mais nécessite une organisation particulière des locaux, un respect strict des modes opératoires, l'utilisation de contrôles divers : (i) positifs et négatifs pour s'assurer de l'absence de contaminations, (ii) internes pour détecter la présence d'inhibiteurs de PCR ainsi que (iii) cellulaires pour évaluer la qualité du prélèvement par sa richesse en cellules. L'interprétation des courbes d'amplification doit être attentive. Le résultat est sans appel lorsque les quantités de virus sont importantes mais lorsque la quantité de virus détecté est faible, le résultat doit être interprété avec pertinence en fonction de la qualité du prélèvement et du moment où il a été réalisé par rapport au début des symptômes cliniques.

Diagnostic indirect

Pour le diagnostic des infections respiratoires, le sérodiagnostic est moins pertinent. D'une part parce que l'immunité anti-influenza ne permet pas la production d'importants titres d'anticorps, et d'autre part, parce que les techniques utilisées en routine ne permettent pas de détecter la présence d'anticorps spécifiques dirigés contre les souches circulantes ou ayant circulé les mois précédant le diagnostic. Différentes techniques existent et sont plus ou moins faciles à mettre en œuvre (fixation du complément, ELISA, séroneutralisation, inhibition d'hémagglutination).

Le diagnostic spécifique d'une infection grippale est important étant donné qu'il existe un traitement antiviral adapté. Il doit être entrepris dès le début des symptômes et doit privilégier la mise en évidence directe du virus ou de l'un de ses constituants.

Activités spécialisées : surveillance de l'évolution des souches virales

Le Centre National de Référence (CNR) des virus influenza du sud de la France se trouve au sein du laboratoire de Virologie du Groupement Hospitalier Est, Lyon. Il fait partie du réseau mondial de surveillance du virus influenza. Ce réseau s'organise autour de 110 CNR dans 83 pays, coordonnés par 4 Centres Mondiaux de Référence (Londres, Melbourne, Tokyo, Atlanta). Chaque CNR collecte les prélèvements réalisés par des médecins sentinelles, en ambulatoire, qui leur envoient pendant toute la période épidémique des écouvillonnages de nez réalisés en systématique, ou devant un tableau clinique particulier ou une suspicion de

résistance aux antiviraux. Les médecins sentinelles appartiennent au réseau GROG (Groupes régionaux d'observation de la grippe) associant des cliniciens, des pharmaciens et des virologues, ou au réseau « Sentinelles » qui rassemble environ 500 médecins libéraux qui notifient plusieurs maladies infectieuses dont les syndrômes grippaux. Ces réseaux ont pour objectif principal de participer à la détection précoce de la circulation des virus grippaux en début d'épidémie.

Le CNR a plusieurs missions :

- il collecte et communique les informations cliniques et virologiques nécessaires au suivi de l'épidémie ;
- il donne l'alerte du début de l'épidémie ou de l'émergence d'un nouveau virus;
- il surveille l'évolution des caractéristiques antigéniques et de la sensibilité aux antiviraux des souches virales isolées ;
- il envoie au Centre Mondial dont il dépend les souches variantes et participe donc au choix des souches virales à introduire dans le vaccin saisonnier.

L'analyse des variations antigéniques est possible par la détermination de la capacité d'une souche virale à être reconnue par un sérum de furet spécifique de cette souche. La technique utilisée repose sur le principe de l'inhibition d'hémagglutination et permet de détecter une dérive antigénique, même mineure. L'étude de la sensibilité des virus influenza aux antiviraux, les inhibiteurs de la neuraminidase (INA), se fait par un test fluorimétrique qui mesure l'activité de la neuraminidase en présence ou non d'INA ¹⁰⁵. Il est possible, en complément, de détecter spécifiquement la mutation H274Y / H275Y par séquençage ou pyroséquençage mais aussi par RT-PCR spécifique ¹⁰⁶. Enfin, les CNR développent des outils de sous-typage des virus influenza, afin de pouvoir rapidement détecter un virus qui ne serait pas un virus saisonnier A(H1N1) ou A(H3N2).

Dans l'expérience française de la gestion de l'émergence du virus pandémique en avril 2009, ce sont les 2 CNR français, l'Institut Pasteur Paris pour le CNR nord et le Laboratoire de Virologie EST Lyon pour le CNR sud, qui ont développé et mis à la disposition de tous les laboratoires de Virologie hospitaliers les RT-PCR permettant de faire le diagnostic d'une infection due au virus A(H1N1)2009. Il s'agissait d'une part de détecter, avec une très grande sensibilité tous les sous-types de virus de type A (RT-PCR M) et d'autre part, de détecter spécifiquement le virus A(H1N1)2009 (RT-PCR H1 et N1) ¹⁰⁷. Les deux CNR ont animé le

« Réseau Grippe A » constitué de 32 laboratoires de Centres Hospitaliers Universitaires (26 en métropole et 6 outre-mer) qui ont développé ce diagnostic en urgence afin de prendre en charge leur patients rapidement. Les CNR ont ensuite collecté les prélèvements pour réaliser la culture cellulaire et isoler les souches virales. Enfin, ils les ont analysées sur le plan antigénique et moléculaire pour détecter une éventuelle dérive antigénique et l'apparition de mutations pouvant significativement modifier la virulence du virus A(H1N1)2009, sa pathogénicité ou l'efficacité vaccinale.

5. Traitements antiviraux et résistances

La prescription d'antiviraux a pour objectif de pallier une absence ou une inefficacité de la vaccination antigrippale et de prévenir les formes graves de grippe, dues aux virus influenza de type A ou B. Deux types d'antiviraux, spécifiquement actifs sur le virus influenza, existent : les inhibiteurs de la pompe à protons ou anti-M2 (amantadine et rimantadine) et les INA (oseltamivir et zanamivir).

5.1. Les inhibiteurs de la pompe à protons (amantadine et rimantadine)

Les inhibiteurs du canal à protons M2 sont des molécules plus anciennes que les INA et présentent aujourd'hui quelques limites, étant donné une résistance naturelle de nombreuses souches de virus influenza. Elles sont représentées par l'amantadine et la rimantadine. Ces molécules se fixent dans la lumière du canal ionique et bloquent de façon réversible le passage des protons. Ils empêchent l'acidification de l'endosome et donc la libération des RNPv mais provoque aussi une maturation incorrecte de la HA et des fusions anarchiques des organites intracellulaires. Les anti-M2 ne sont efficaces à doses thérapeutiques que sur les virus de type A, mais aujourd'hui 30% de ces souches sont résistantes^{108,109}. Leur efficacité semble limitée à une réduction de la durée des symptômes et leur contre-indication formelle lors de la grossesse font des anti-M2 des molécules qui ne sont pas recommandées en monothérapie. Elles peuvent néanmoins améliorer l'efficacité des INA lorsqu'elles leur sont associées.

5.2. Les inhibiteurs de la neuraminidase (INA)

Ce chapitre est entièrement repris dans la revue (**Annexe 5**):

INTERET DES INHIBITEURS DE LA NEURAMINIDASE DANS LA PRISE EN CHARGE DES INFECTIONS DUES AUX VIRUS INFLUENZA

*O. Ferraris, V. Escuret, **M. Bouscambert-Duchamp**, B. Lina, F. Morfin.*

Article en français

Pathol Biol 2010, 58 (2) :e69-78.

6. Prévention

Le meilleur moyen de lutter contre l'infection grippale reste la prévention et en particulier la vaccination. Les défis concernant la vaccination sont nombreux. D'une part, la réactualisation annuelle de la composition du vaccin est nécessaire et impose donc un délai pour la production de 6 mois entre le moment où les souches sont choisies et la mise sur le marché des premières doses. D'autre part, l'immunogénicité du virus étant moyenne, il est nécessaire pour les fabricants de produire de très grandes quantités de virus ce qui représente une vraie difficulté et repose sur la culture virale sur oeuf. Actuellement, de nombreux procédés de production sont en cours de développement pour améliorer la production d'antigène. Il ne faut pas pour autant négliger les mesures barrières et les traitements prophylactiques qui permettent, lors du démarrage d'une épidémie dans une collectivité par exemple, de prévenir l'infection.

TRAVAUX ORIGINAUX

A. Outils et protocoles développés

1. Quantification virale

1.1. Principe

Les techniques de quantification virale classiques reposent sur la mise en culture de la suspension virale que l'on veut titrer après plusieurs dilutions de 10 en 10. L'apparition d'un ECP ou le décompte du nombre de plages de lyse formées, permettent de déterminer le titre infectieux de la suspension virale. La première technique est réalisée en plaque 96 puits et permet de déterminer la DICT50 (Dose Infectieuse en culture de tissus 50%) qui est la dilution de la suspension correspondant au puit dans lequel, l'ECP concerne 50% de la surface de cellules inoculées. Il est d'usage de considérer une DICT50 comme une dose infectieuse. La seconde technique consiste à inoculer des cellules MDCK, puis à figer l'infection par de l'agar. Le décompte des plages de lyse ainsi formées permet d'exprimer la concentration en pfu/ml (« plaque forming unit »). Ces techniques présentent l'avantage de détecter les particules virales infectieuses mais sont longues et fastidieuses.

Pour déterminer les quantités de génomes viraux libérés dans le surnageant au cours des cinétiques virales, nous avons développé une technique rapide (1,5 heures) et plus facile à mettre en œuvre : une RT-PCR quantitative en temps réel ¹⁰⁷. Cette technique est capable de détecter le génome de tous les sous-types de virus influenza A car elle amplifie une séquence de 152 pb du gène de matrice (M) qui très est conservé parmi les virus influenza A. Elle détecte avec la même efficacité la séquence M des souches utilisées lors de notre étude.

Pour mesurer précisément la quantité de virus dans une suspension virale, nous avons produit un plasmide ADN contenant un insert de 421 pb possédant notre séquence cible et de concentration connue, exprimée en nombre de copies de génome par ml (ou par μ l). La quantification est alors possible si dans une série d'analyse, une gamme de dilution de

plasmide de 10 en 10 est ajoutée. Depuis 2009, dans le contexte de mise au point des outils de détection du virus A(H1N1)2009, un transcrit, ou ARN de synthèse, a été produit par le CNR nord (V. Enouf et S. van der Werf) et nous l'avons utilisé pour l'évaluation de notre RT-PCR. Nous avons développé cet outil sur deux types de plateformes d'amplification : ABI 7500 (Applied Biosystems) et LightCycler® 480 (Roche). Les courbes d'amplification sont lues et analysées par les logiciels des fournisseurs.

1.2. Caractéristiques

La caractérisation de la RT-PCR M quantitative repose sur la détermination de l'efficacité de l'amplification, de la limite de détection de la technique, de la spécificité, de la reproductibilité et de la répétabilité selon les recommandations MIQE (« minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments ») de Bustin *et al.*¹¹⁰ et les critères de validation d'essais de tests diagnostic en Virologie clinique de Rabenau *et al.*¹¹¹.

Les résultats de cette évaluation sont publiés dans l'article : [publication 1](#)

PANDEMIC A(H1N1)2009 INFLUENZA VIRUS DETECTION BY REAL TIME RT-PCR : IS VIRAL QUANTIFICATION INTERESTING?

M. Bouscambert Duchamp, J.S. Casalegno, Y. Gillet, E. Frobert, E. Bernard, V. Escuret, G. Billaud, M. Valette, E. Javouhey, B. Lina, D. Floret, F. Morfin.

Clin Microbiol Infect. 2010 Apr;16(4):317-21. Epub 2010 Jan 28.

1.3. Applications

La RT-PCR M quantitative temps réel a été utilisée pour la détermination des quantités de virus présentes dans différents types de matériels : suspensions virales (surnageants de culture cellulaire lors des cinétiques de croissance virale) mais aussi dans des échantillons cliniques.

1.3.1. Quantification virale dans les prélèvements et stratégie de suivi de l'excrétion virale

En utilisant la RT-PCR quantitative M il est possible de quantifier précisément les titres de virus influenza dans de nombreux types de prélèvements respiratoires ou autres (sang, biopsies, LCR...). Parce que cette RT-PCR permet une détection sensible de tous les sous-types de virus influenza A, et peut donc permettre la détection de virus influenza A variants, son protocole a été transmis, en mai 2009, à l'ensemble des laboratoires du réseau « Grippe A » par la Direction Générale de la Santé, pour le diagnostic des infections dues au virus pandémique A(H1N1)2009. Cette RT-PCR est désormais utilisée par plus de 32 laboratoires de Virologie en France.

Une stratégie de quantification de la charge virale dans les prélèvements respiratoires a été développée sur le principe de l'étude de la charge virale corrigée en fonction de la quantité de cellules présentes dans le prélèvement. La qualité du prélèvement, c'est à dire sa richesse en cellules, est estimée par la quantification précise par RT-PCR en temps réel du nombre de copies de gènes cellulaires « ménagers » dans le prélèvement. Nous disposons de deux RT-PCR capables de détecter la présence d'acides nucléiques humains : une RT-PCR quantitative de détection de la GAPDH (glycéraldéhyde 3-phosphate deshydrogénase) (A) et une RT-PCR semi-quantitative de détection de la RnaseP (ribonucléase P) (B).

A. RT-PCR quantitative GAPDH

Ce protocole a été développé par le CNR Grippe région nord, Institut Pasteur (V. Enouf, S. van der Werf) et utilise une gamme de transcrit GAPDH dilué de 10 en 10. Une gamme est ajoutée à chaque série de qRT-PCR GAPDH. La charge cellulaire GAPDH est mesurée pour chaque échantillon et elle est exprimée en nombre de copies/ml. La charge virale mesurée par qRT-PCR M est ensuite corrigée en fonction de la charge cellulaire GAPDH de la façon suivante :

$$\text{Charge virale corrigée (copies/ml)} = \text{Charge virale M} / \text{Charge GAPDH} \times (\text{moyenne charge GAPDH})$$

Cette stratégie a été retenue pour la détermination des quantités de virus excrétées dans le cadre de protocoles de recherche clinique nationaux tels que Bivir ou FluCo. Les résultats de l'étude Bivir sont publiés dans l'article :

Annexe 1

VIROLOGICAL EFFICACY AND SAFETY OF OSELTAMIVIR ZANAMIVIR COMBINATION COMPARED TO EACH MONOTHERAPY FOR SEASONAL INFLUENZA: A RANDOMIZED TRIAL

*X. Duval, S. van der Werf, T. Blanchon, A. Mosnier, **M. Bouscambert - Duchamp**, Tibi, V.Enouf, C.Charlois – Ou, C. Vincent, L. Andreoletti, F. Tubach, B. Lina, F. Mentré, C.Leport.*

Soumis dans PloS Pathogen, 26 avril 2010.

B. RT-PCR semi-quantitative RNaseP

Une stratégie de quantification similaire de l'excrétion virale corrigée en fonction de la qualité du prélèvement a été utilisée pour l'étude de la corrélation entre l'excrétion virale et la sévérité clinique, dans une cohorte d'enfants durant l'hiver 2009-2010 (pandémie A(H1N1)2009). La correction étant réalisée en fonction de la charge cellulaire Rnase P (**RT-PCR semi-quantitative RNaseP**).

Le protocole de la RT-PCR RnaseP est disponible sur demande auprès du CDC (cdcinfo@cdc.gov). Elle utilisée en mode semi-quantitatif. Aucune gamme de quantification n'est utilisée mais chaque essai est validé avec une ligne de base de fluorescence dRn de 0,02. La charge virale mesurée par qRT-PCR M est ensuite corrigée en calculant la valeur du Ct modifiée par le ratio du Ct en RT-PCR RNaseP de l'échantillon et de la moyenne des Ct en RT-PCR RNaseP de la façon suivante:

Valeur Ct influenza A (qRT-PCR M) échantillon x valeur Ct RNaseP / moyenne des valeurs Ct RNaseP

Les résultats de cette évaluation sont publiés dans l'article : [publication 1](#)

PANDEMIC A(H1N1)2009 INFLUENZA VIRUS DETECTION BY REAL TIME RT-PCR : IS VIRAL QUANTIFICATION INTERESTING?

M. Bouscambert Duchamp, J.S. Casalegno, Y. Gillet, E. Frobert, E. Bernard, V. Escuret, G. Billaud, M. Valette, E. Javouhey, B. Lina, D. Floret, F. Morfin.

Clin Microbiol Infect. 2010 Apr;16(4):317-21. Epub 2010 Jan 28.

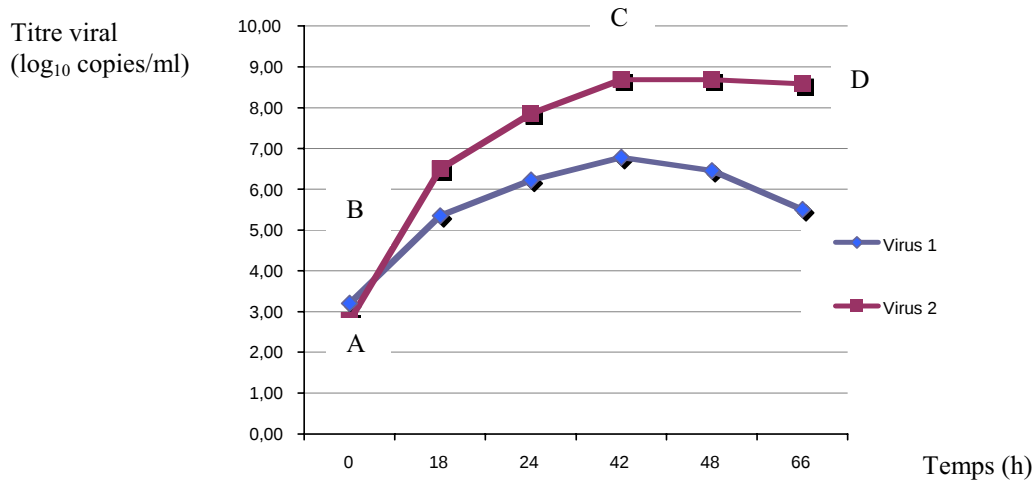
Ces outils peuvent donc être utilisés, dans le cadre d'études cliniques telles que Bivir et Fluco (Etude des formes sévères de grippe durant l'hiver 2009-2010), pour déterminer la charge virale dans des prélèvements respiratoires et sanguins (virémie) mais ils permettent aussi de valider la qualité du prélèvement. Ils permettent aussi de contrôler l'absence d'inhibition de PCR. En effet, en cas de Ct en RT-PCR RNaseP ou en GAPDH supérieur à 36, la présence d'un éventuel inhibiteur de PCR doit être suspecté et une recherche spécifique doit être réalisée avant de conclure à l'invalidité du prélèvement du fait de sa pauvreté en cellules. Le contrôle de la présence d'un inhibiteur peut se faire par l'ajout de 5µl de transcrit M à la concentration de 10^4 copies/5µl aux 5µl d'ARN de l'échantillon suspecté. L'analyse en qRT-PCR M des 10µl du mélange permet de détecter un problème d'inhibition si le Ct mesuré est supérieur à 33.

1.3.2. Développement d'un protocole de cinétique de croissance virale

Les capacités répliquatives d'un virus peuvent être évaluées par le suivi de sa cinétique de croissance virale sur système cellulaire. Des MDCK en plaque 6 puits sont inoculées avec une suspension virale diluée dans du milieu d'infection (MEM additionné de trypsine au $1/1000^{\text{ème}}$) de façon à mettre en contact 1 dose infectieuse pour 10 000 cellules (MOI 10^{-4}). Après un temps de contact, sous agitation à 37°C d'une heure, le milieu est enlevé et remplacé par 3 ml de milieu d'infection. La cinétique commence et se traduit par un prélèvement de surnageant réalisé à différents temps (0, 18h, 24h, 42h, 48h, 66h). Des temps supplémentaires peuvent être ajoutés si les cellules ne sont pas toutes lysées à 66 heures. Chaque prélèvement est réalisé après agitation (homogénéisation) puis il est centrifugé à 10 000trs/min pendant 10 min avant d'être décanté pour être extrait. L'extraction de l'ARN est ensuite réalisée à partir de 140µl de surnageant en colonne (QIAmp Viral RNA Minikit, Qiagen) et élué dans 60µl de

tampon d'élution. Les points de cinétiques des virus que l'on souhaite comparer sont ensuite analysés en qRT-PCR M dans la même série et le titre de chacun d'entre eux est exprimé en nb de copies/ml ou μ l ou en $\log_{10}$ de copies/ml ou μ l de surnageant (Figure 9). L'analyse des profils de cinétiques de croissance virale permet de mettre en évidence d'éventuelles différences de comportement, dans un système cellulaire définis, entre des virus que l'on veut comparer.

Figure 9: exemple de cinétique de croissance virale de deux virus influenza réalisées sur MDCK.



Après inoculation du virus à MOI précise, un prélèvement de surnageant cellulaire est réalisé à chaque temps, de t0 à t66 heures. Le titrage infectieux est réalisé par qRT-PCR M et exprimé en $\log_{10}$ copies/ml. Les temps précis à relever pour pouvoir comparer les profils de cinétiques de deux virus sont : (A) le temps à partir duquel la production virale commence à être détectable ; (B) la pente de croissance exponentielle ; (C) le temps à partir duquel la croissance se stabilise en plateau et (D) le titre infectieux atteint par le virus au plateau.

Applications

Nous avons réalisé des cinétiques de croissance virale dans différents projets dont les objectifs étaient de caractériser des virus influenza émergents :

- **Virus influenza réassortants A(H1N1)2009 résistants à l'oseltamivir**

Publication 2

NOVEL INFLUENZA A(H1N1)_v IN VITRO REASSORTANT VIRUSES WITH
OSELTAMIVIR RESISTANCE

*M. Bouscambert-Duchamp**, *M. Ottmann**, *J.S. Casalegno*, *E. Frobert*, *V. Moules*, *O. Ferraris*, *M. Valette*, *V. Escuret*, *B. Lina*. * co-auteurs

Accepté le 12/01/2010 : Antiviral Therapy

- **Virus influenza possédant un génome à 7 segments A(H3N0) (absence de la NA)**

Annexe 2

IN VITRO CHARACTERIZATION OF NATURALLY OCCURRING INFLUENZA
A(H3N0) VIRUSES LACKING THE NA GENE SEGMENT: TOWARD A NEW
MECHANISM OF VIRAL RESISTANCE

V. Moules, *O. Ferraris*, *O. Terrier*, *E. Guidice*, *M. Yver*, *J.P. Rolland*, *M. Bouscambert-Duchamp*, *C. Bergeron*, *M. Ottmann*, *E. Fournier*, *A. Traversier*, *C. Boule*, *A. Rivoire*, *L. Yipu*, *A. Hay*, *M. Valette*, *R. Marquet*, *M. Rosa-Calatrava*, *N. Naffakh*, *G. Schoehn*, *D. Thomas*, *B. Lina*.

Accepté dans Virology, 27 avril 2010.

- **Virus influenza A(H1N1) résistants à l'oseltamivir ayant circulé au cours de l'hiver 2007-2008**

Annexe 3

OSELTAMIVIR-RESISTANT INFLUENZA A(H1N1) VIRUSES IN SOUTH OF FRANCE,
2007-2009.

J.S. Casalegno, *M. Bouscambert-Duchamp*, *V. Caro*, *I. Schuffenecker*, *M. Sabatier*, *A. Traversier*, *M. Valette*, *B. Lina*, *O. Ferraris*, *V. Escuret*.

Accepté dans Antiviral Research, 20 mai 2010.

2. Production de virus réassortants par génétique inverse

2.1. Principe de la génétique inverse

En 2000, un système de production de virus influenza *in vitro* a été mis au point. Il s'agit d'un système complexe de transfection d'une lignée cellulaire avec 8 plasmides, comprenant chacun la séquence ADNc d'un seul segment génomique du virus influenza ³. Chaque plasmide possède deux promoteurs (PolI et PolII) permettant d'une part, la synthèse des ARNm qui seront traduits en protéines virales et d'autre part, l'obtention des 8 ARN génomiques viraux de polarité négative. Soixante douze heures après la transfection de ces 8 plasmides dans une suspension de cellules 293T et passage sur MDCK de cette suspension cellulaire, il est possible d'obtenir des titres infectieux de l'ordre de $2 \cdot 10^5$ à $2 \cdot 10^7$ DICT50/ml, en fonction des propriétés répliquatives du virus produit. Grâce à ce système dit de « génétique inverse », il est possible de produire *in vitro*, à façon, des virus influenza de type A, y compris des virus réassortants, mélange de souches humaines et animales. Il est aussi possible de modifier les séquences de chacun des segments par mutagenèse dirigée et de produire ainsi des virus réassortants présentant des mutations leur conférant un pouvoir pathogène particulier (virulence, sensibilité ou résistance aux molécules antivirales...).

2.2. Souches virales étudiées

Les systèmes de génétique inverse complets de 3 souches de virus influenza ont été synthétisés : un virus saisonnier humain A(H3N2), un virus aviaire hautement pathogène A(H5N1) et un virus aviaire faiblement pathogène A(H5N2). Un système de génétique inverse est en cours de synthèse pour le virus A(H5N1) hautement pathogène A/Turkey/16/2006 (Tableau 7).

Tableau 7: caractéristiques des souches de virus influenza utilisées pour la production des systèmes de génétique inverse utilisés dans notre étude.

	A(H3N2)	A(H5N1)	A(H5N1)	A(H5N2)
Nature du virus	Virus humain saisonnier	Virus aviaire hautement pathogène (clade 1)	Virus aviaire hautement pathogène (clade 2.2)	Virus aviaire faiblement pathogène
Nom complet de la souche	A/ Moscow/10/99	A/ Vietnam/ 1194/2004	A/ Turkey/ 16/2006	A/ Finch/ England/ 2051/91
Classe de l'organisme	2	4	4	2
Origine	Souche prototype humaine parfaitement caractérisée, ayant fait partie de la composition vaccinale de 2000 à 2005	Souche isolée d'un cas humain au Vietnam	Souche isolée d'un cas humain en Turquie	Souche isolée chez l'oiseau en Angleterre

2.3. Production d'un clone de génétique inverse

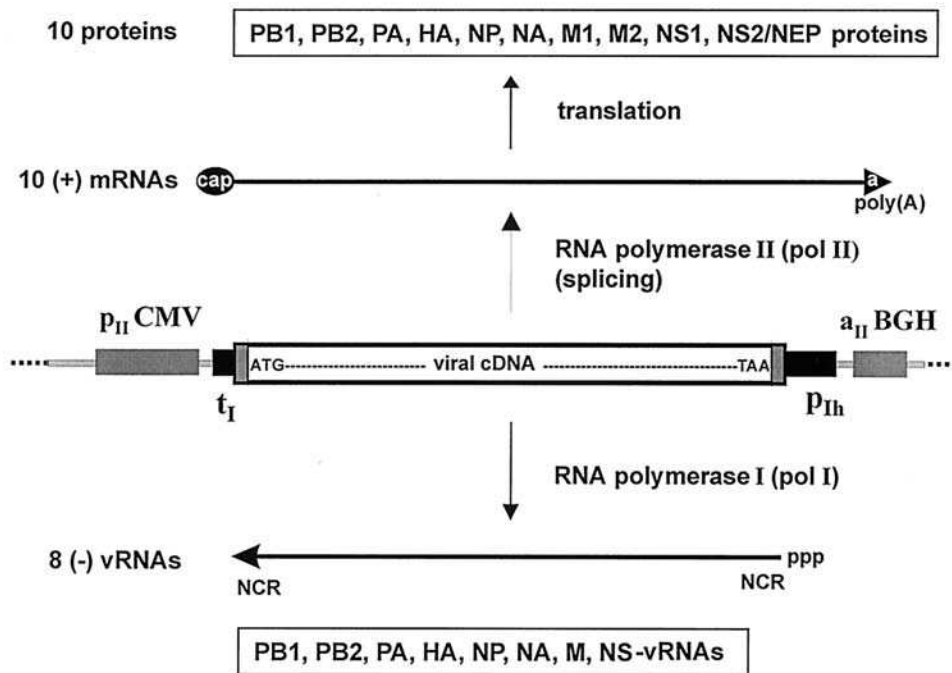
Chacun des 8 segments de gène de ces quatre virus a été amplifié avec les amorces publiées par Hoffmann *et al* ³ puis cloné dans le vecteur phW2000. Il possède une origine de réplication (« colEI-origin of replication ») et les différentes cassettes suivantes (Figure 10) :

- un gène de résistance à l'ampicilline (béta-lactamase) permettant la sélection, sur milieu supplémenté en antibiotiques, des plasmides ayant inséré la séquence cible et devenus Amp^r.
- le promoteur de la polymérase humaine, « PI_h » ou « polI », qui induit la réplication par l'ARN-polymérase I cellulaire humaine des ARN viraux de polarité négative, non coiffés.
- Le site terminateur murin « tI » qui stoppe l'ARN-polymérase I

- Le promoteur de la polymérase II humaine « polII CMV », qui induit la transcription, par l'ARN-polymérase II cellulaire humaine, de l'ADNc inséré en ARNm codant, coiffé et terminé par une queue polyA. Ces ARNm pourront passer dans le cytoplasme sans être dégradés et être traduits en protéines virales. Ce promoteur est celui du cytomégalo virus qui peut être reconnu par l'ARN-polymérase II.
- Un site de polyadénylation « aIIBGH » qui ajoute une queue polyA à l'ADNc placé en aval de cette séquence. C'est le signal de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine qui est reconnue par l'ARN-polymérase II humaine.

Le promoteur pol I et le terminateur tI sont séparés par deux sites de restriction *BsmBI*.

Figure 10: représentation schématique du plasmide d'expression phw2000 (d'après ³)



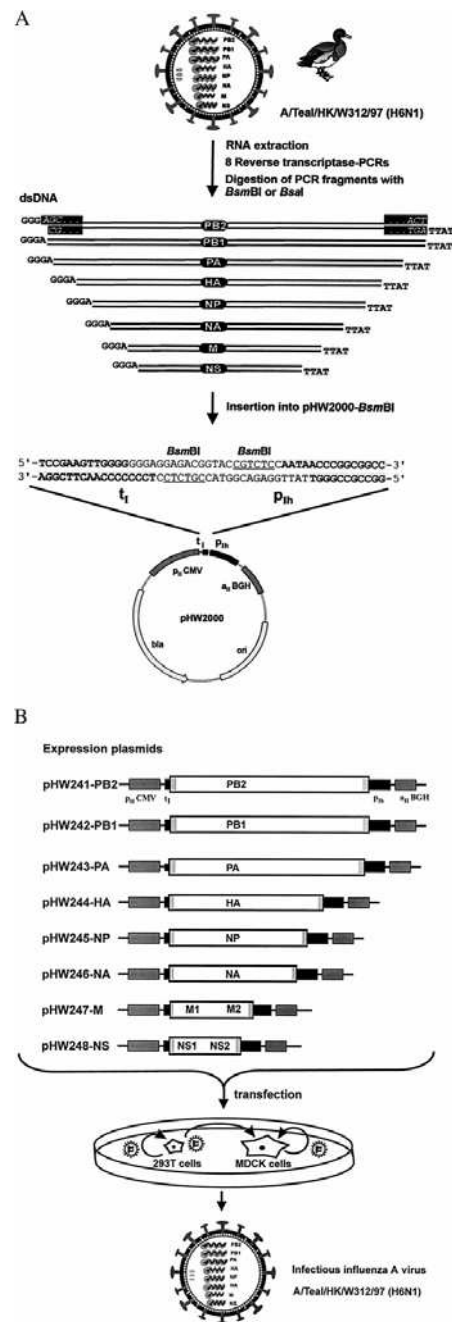
Représentation schématique du plasmide d'expression de génétique inverse phw2000. Ce plasmide possède deux promoteurs, P_{Ih} de la polymérase I (pol I) et P_{II} CMV de la polymérase II (pol II), qui permettent la synthèse d'une copie d'ARNv et d'une copie d'ARNm à partir de l'ADNc de chacun des 8 segments. Le promoteur pol I (P_{Ih}) et le terminateur pol I (t_I) constituent l'unité de transcription pol I qui est entourée par le promoteur pol II (P_{II} CMV) du cytomegalovirus humain et par un signal de polyadénylation (a_{II} BGH) du gène de l'hormone de croissance bovine. Après transfection des 8 plasmides d'expression, deux types de molécules sont synthétisés. Un ARNv de polarité négative synthétisé par la pol I cellulaire à partir du promoteur P_{Ih} . L'ARNv synthétisé contient une région non codante (NCR « non coding region ») en 3' et 5'. La transcription par pol II produit un ARNm, capé en 5' et possédant une queue polyA en 3'. Les ARNm sont traduits en protéines virales. L'ATG du cDNA viral est le premier ATG situé après le site promoteur de transcription P_{II} CMV.

Pour chaque système, les 8 plasmides ont été construits de la façon suivante (Figure 11). Cent quarante microlitres de souche virale ont été extraits sur colonne, selon les recommandations du fournisseur (QIAmp viral RNA minikit, Qiagen) et élué dans 60µl. A partir de l'ARN purifié, l'ADNc a été obtenu par transcription inverse en utilisant une amorce universel (Uni12primer « 3'-AGCAAAAGCAGG-5' », Eurogentec), selon le protocole d'utilisation de l'enzyme AMV Reverse Transcriptase (Promega).

Les amorces utilisées pour l'amplification spécifique de chaque segment de gène possèdent une séquence spécifique en 3' du gène à amplifier et un site de restriction *BsmBI* en 5'. Chaque PCR est réalisée en utilisant le kit Expand high fidelity PCR system (Roche). Cinq µl d'ADNc sont ajoutés, 5 µl de tampon 10X, 2 µl de dNTP (40 nM), 0,75 µl d'amorce sens et 0,30 µl d'amorce antisens et 0,75 µl d'enzyme pour un volume réactionnel final de 50 µl. Après une étape de dénaturation de 3 min à 94°C, 39 cycles d'amplification sont réalisés comprenant une étape de dénaturation de 30 s à 94°C, une étape d'hybridation de 30 s à 58°C et une étape d'élongation de 7 min à 72°C. Enfin une étape d'élongation finale est programmée à 72°C pendant 7 min. Le produit de PCR est ensuite digéré par *BsmBI* puis cloné dans phw2000.

Chaque plasmide a été produit en quantité suffisante pour les études envisagées et stocké en glycérol. Leurs séquences exactes ont été déterminées afin de s'assurer qu'aucune modification n'était survenue sur la séquence clonée par rapport à la séquence du virus. Enfin, la fonctionnalité de chaque plasmide a été testée individuellement, par la production par génétique inverse, d'un virus infectieux contenant le plasmide à tester sur un fond génétique déjà validé.

Figure 11 : représentation schématique de la procédure permettant de produire un système de génétique inverse (A) et un virus influenza infectieux par génétique inverse (B).



- A. Représentation schématique de la procédure permettant de construire le système de génétique inverse d'un virus influenza. Ce système est constitué de 8 plasmides d'expression, produits à partir de l'ARN du virus parental. Une transcription inverse puis 8 PCR sont réalisées avec des amorces comprenant une séquence spécifique de chaque segment à amplifier et un site de restriction *BsmBI*. Après amplification, les 8 segments sont digérés puis clonés dans le plasmide d'expression phw2000. Les 8 plasmides possèdent une copie d'ADNc de la séquence de chacun des 8 segments du génome viral, ainsi que les promoteurs pol I et pol II. Ces promoteurs permettent de produire à partir de l'ADNc, une copie d'ARN viral ainsi qu'une copie d'ARN de polarité positive qui sera ensuite traduit en protéine.
- B. Représentation schématique de la procédure permettant de produire un virus influenza infectieux par génétique inverse. Les 8 plasmides sont transfectés dans des cellules 293T et le virus influenza produit est ensuite amplifié sur MDCK.

2.4. Production de virus réassortants

Les virus réassortants sont obtenus par transfection des 8 plasmides d'expression dans des cellules 293T (Figure 11). Une préparation d'1 µg de chaque plasmide est additionnée de 60 µl Superfect (Qiagen) puis de 280 µl de milieu Opti-MEM (GIBCO-BRL). Après une incubation de 10 min, le mélange est ajouté à 2,6 ml d'Opti-MEM qui sont ensuite mis en contact avec les cellules 293T en plaques 6-puits. Après un temps de contact de 3 h à 37°C, les cellules sont lavées et 4 ml d'Opti-MEM/BSA 0,3% sont ajoutés. Les cellules sont incubées à 37°C pendant 24 h puis de la trypsine au 1/1000 est ajoutée. Quarante-huit heures post-transfection, les virus présents dans le surnageant sont récoltés, centrifugés et inoculés sur MDCK pour permettre leur amplification. Les virus sont ensuite récoltés avant que l'ECP lu soit à 100%, puis les surnageants sont centrifugés et congelés à -80°C.

3. Production de virus réassortants par co-infection virale

3.1. Principe de la co-infection virale

Le principe des co-infections virales repose sur l'infection de MDCK (ATCC, CCL34) par deux souches de virus influenza afin de reproduire les conditions d'un réassortiment naturel. Les cellules sont entretenues dans le milieu Ultra-MDCK (Lonza, Levallois Perret, France) supplémenté par un mélange pénicilline-streptomycine (100 U/ml et 100 g/ml, respectivement, Lonza) et 2 mM de L-Glutamine (Lonza). Toutes les infections sont réalisées en milieu EMEM (Eagle's Minimum Essentiel Medium, Lonza) supplémenté avec 100 u/ml de pénicilline, 100 g/ml de streptomycine, 2 mM de L-Glutamine, 1 g/ml de trypsine acétylée (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France).

Le protocole de co-infection prévoit d'ajouter au milieu d'infection du carboxylate d'oseltamivir (aimablement fourni par N. Robert, Roche Products LTD, Hertfordshire) à 1 M pour réduire l'activité des NA exprimées à la surface des cellules infectées ce qui favorise la sur-infection de la cellule par une autre souche virale^{112,113}. Enfin l'oseltamivir empêche la multiplication des virus sensibles et permet donc la sélection des clones de virus résistants à l'oseltamivir.

Deux protocoles de co-infections ont été développés : super-infection et co-infection. Ils sont présentés dans la section « Matériels et Méthodes » de l'article : [publication 2](#).

NOVEL INFLUENZA A(H1N1)_v IN VITRO REASSORTANT VIRUSES WITH OSELTAMIVIR RESISTANCE

*M. Bouscambert-Duchamp**, *M. Ottmann**, *J.S. Casalegno*, *E. Frobert*, *V. Moules*, *O. Ferraris*, *M. Valette*, *V. Escuret*, *B. Lina*. * *co-auteurs*

Accepté le 12/01/2010: Antiviral Therapy

3.2. Développement d'un protocole de super-infection virale

Dans le protocole de super-infection, une des deux souches est inoculée sur MDCK à une MOI forte de 0,5 (1 dose infectieuse pour 2 cellules) à 34°C. Après 1h, le surnageant est remplacé par du milieu d'infection supplémenté en oseltamivir et incubé 3 h à 34°C. Les cellules sont ensuite sur-infectées par la deuxième souche à une MOI de 0,5. Après 1h d'incubation, les cellules sont lavées et de nouveau incubées 18 h en milieu d'infection supplémenté en oseltamivir.

3.3. Développement d'un protocole de co-infection virale simultanée

Dans le protocole de co-infection, les MDCK sont simultanément infectées par les deux virus, dilués dans du milieu d'infection sans oseltamivir, à une MOI de 0,1 (1 dose infectieuse pour 10 cellules) pendant 1 h à 34°C. Après ce temps de contact, le milieu est jeté et remplacé par du milieu d'infection supplémenté en oseltamivir et les cellules sont incubées pendant 18 h à 34°C.

3.4. Sélection des clones de virus réassortants

Dans les deux protocoles, après 18 h post-infection, les surnageants de culture sont récoltés et dilués 10 fois, en milieu d'infection supplémenté par 1g/ml de trypsine. Afin d'isoler les clones des virus réassortants issus des protocoles de co-infection, des plages de lyse sont réalisées. Pour cela, des MDCK confluentes sont inoculées par ces dilutions et après une

incubation de 1 h à 34°C, les cellules sont recouvertes par un mélange d'EMEM contenant 0,55% d'agarose, 1 g/mL de trypsine et 50 M de carboxylate d'oseltamivir. Après 48 h à 34°C, les plages de lyse sont repérées et les clones suffisamment isolés et de tailles différentes sont récupérés. Les clones ainsi isolés sont récupérés puis dilués, afin d'être inoculés sur MDCK. Après 48 h à 34°C, les surnageants sont récoltés et congelés à -80°C.

B. Résultats : Partie I

1. Quantification virale

1.1. Grippe A(H1N1)2009 : intérêts de la mesure de l'excrétion virale nasale

Publication 1

PANDEMIC A(H1N1)2009 INFLUENZA VIRUS DETECTION BY REAL TIME RT-PCR : IS VIRAL QUANTIFICATION INTERESTING?

M. Bouscambert Duchamp, J.S. Casalegno, Y. Gillet, E. Frobert, E. Bernard, V. Escuret, G. Billaud, M. Valette, E. Javouhey, B. Lina, D. Floret, F. Morfin.

Clin Microbiol Infect. 2010 Apr;16(4):317-21. Epub 2010 Jan 28.

Pandemic A(H1N1)2009 influenza virus detection by real time RT-PCR : is viral quantification useful?

M. Bouscambert Duchamp^{1,2}, J. S. Casalegno^{1,2}, Y. Gillet³, E. Frobert^{1,2}, E. Bernard¹, V. Escuret^{1,2}, G. Billaud¹, M. Valette^{1,2}, E. Javouhey³, B. Lina^{1,2}, D. Floret³ and F. Morfin^{1,2}

1) Hospices Civils de Lyon, National Influenza Centre (South of France), Laboratory of Virology, Bron, 2) Université de Lyon, Université Lyon 1 Virologie et Pathologie Humaine, CNRS FRE 3011, Lyon Cedex and 3) Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Est, Hôpital femme-mère-enfant, Paediatric units, Bron, France

Abstract

The emergence of the influenza A(H1N1) 2009 virus prompted the development of sensitive RT-PCR detection methods. Most are real time RT-PCRs which can provide viral quantification. In this manuscript, we describe a universal influenza A RT-PCR targeting the matrix (M) gene, combined with an RNaseP RT-PCR. These PCRs allow the detection of all influenza A virus subtypes, including A(H1N1)2009, together with a real-time assessment of the quality of the specimens tested. These PCR procedures were evaluated on 209 samples collected from paediatric patients. Viral loads determined through Ct values were corrected according to the RNaseP Ct value. The mean viral load in the collected samples was estimated to be 6.84 log RNA copies/mL. For poor quality samples (RNaseP Ct > 27), corrections resulted in +3 to +8 Ct values for the M gene RT-PCR. Corrected influenza Ct values were lower in late samples. No correlation was established between viral loads and clinical severity or duration of disease. This study shows that real time RT-PCR targeting the matrix gene is a reliable tool for quantification of type A influenza virus but emphasises the need for sample quality control assessment through cellular gene quantification for reliable estimation of the viral load. This method would be useful for disease management when repeated specimens are collected from an infected individual.

Keywords: Clinical features, influenza A(H1N1)2009, matrix gene, paediatric, real time RT-PCR, RNaseP gene, viral load

Invited article

Editor: X. de Lamballerie

Article published online: 28 January 2010

Clin Microbiol Infect 2010; 16: 317–321

Corresponding author and reprint requests: M. Bouscambert Duchamp, Hospices Civils de Lyon, National Influenza Centre (South of France), Laboratory of Virology – Bât A3, 59 Boulevard Pinel, F-69677 Bron Cedex, France
E-mail: maude.bouscambert-duchamp@chu-lyon.fr

Introduction

The new variant A(H1N1) influenza virus was originally detected in April 2009 in Mexico and the USA. Subsequently, it disseminated worldwide. In France, this virus was first detected in May 2009 and the first epidemic was reported in October, with the proportion of severe cases and deaths increasing rapidly (http://www.invs.sante.fr/surveillance/grippe_dossier/index_H1N1.htm).

The RNA genome of A(H1N1)2009 virus comprises a specific combination of gene segments that had never previ-

ously been detected [1–3]. Moreover, specific clinical features have been reported for infections associated with the A(H1N1)2009 virus. Most hospitalized patients are under the age of 18 and very few are over 65 years [4]. Pneumonia is detected in 40% of cases [4]. Between 40% and 70% of patients with severe symptoms have an underlying medical history [2,4].

Since May 2009, the two French National Influenza Centres (NICs) have worked together to develop rapid and sensitive methods to detect the A(H1N1)2009 virus. The strategy chosen included two real-time RT-PCRs: one targeting the M gene (M RT-PCR) for sensitive detection of all subtypes of type-A influenza virus and the second, targeting the HA gene, for specific detection of A(H1N1)2009 virus. The M RT-PCR described here was actually developed for influenza A virus quantification before the emergence of the A(H1N1)2009 virus. This PCR strategy was supported by a ribonuclease P (RNase P) RT-PCR for assessment of the quality of the samples. In addition to real time evaluation of

the quality of specimens, we also looked for evidence of a relationship between Ct value (viral load) and disease severity during the A(H1N1)2009 pandemic.

Materials and Methods

Patients

Overall, 209 patients positive for A(H1N1)2009 were included in the study between the 1st of October 2009 and the 4th of November 2009. Clinical data were collected retrospectively. The mean age of the patients was 5.9 years (± 3.8); 12.5% of the patients were below 1 year of age. The M:F sex ratio was 1.06. There was no health risk factor in 63.5% of the patients; reported health risk factors were asthma (24.5%), chronic cardiac disease (4.8%), prematurity (3.8%) and other (3.4%). The mean delay between onset of clinical symptoms and consultation was 2.07 days (± 2 days). The most frequently reported symptoms were cough (87.9%), fever (86.2%), rhinitis (36.2%) and myalgia (22.2%). Nine per cent of the patients were hospitalized, only one of whom required admission to the intensive care unit. Neuraminidase inhibitors were prescribed in 41.6% of the cases, with oseltamivir or zanamivir in 92.6% and 6.2% of the treated cases, respectively.

Samples

Nasal swabs were sent to the laboratory in <12 h after sampling. Upon arrival, they were placed in 3 mL of transport medium for viral culture; 200 μ L of this medium was used for RNA purification on NucleiSens easyMAG instrument (bioMérieux). After extraction, RNA was eluted in 70 μ L and stored at +4 $^{\circ}$ C until RT-PCRs were performed the same day. Longer storage was carried out at -80° C.

To determine the specificity of the RT-PCRs, 16 samples from patients positive for different respiratory viruses were tested in M RT-PCR and H1 RT-PCR (developed by NIC, North of France, Institut Pasteur, Paris). These samples were known to be positive for seasonal influenza A(H1N1), A(H3N2), B viruses, respiratory syncytial virus A or B, bocavirus, parainfluenza 1–3, metapneumovirus, rhinovirus, enterovirus, adenovirus, cytomegalovirus, herpes simplex virus or varicella-zoster virus.

To validate the wide spectrum of influenza A subtypes detected by M RT-PCR, we tested 18 avian, swine and

human A influenza viruses including A/Vietnam/1194/2004 (H5N1), A/Turkey/13/2006 (H5N1), A/Finch/England/2051/2002 (H5N2) and A/Swine/England/117316/86 (H1N1).

A calibrated synthetic RNA transcript was kindly provided by V. Enouf and S. van der Werf (NIC North of France, Institut Pasteur, Paris) and used for the assessment of the M RT-PCR. This transcript is the negative strand of the Open Reading Frame of the M gene (from the ATG to nucleotide 982). The transcript was diluted in distilled water to obtain a solution at a concentration of 10^9 copies/ μ L and stored at -80° C. Two dilutions were used in each assay: 10^4 copies/ μ L, corresponding to a Ct value of 30 and 10^5 copies/ μ L, corresponding to a Ct value of 26.

Influenza real time RT-PCR

The primers and probe targeting the haemagglutinin gene and designed for the specific detection of A(H1N1)2009 are available upon request (grippe@pasteur.fr). The primers targeting the matrix gene and designed for universal detection of influenza A viruses were previously described for a classical RT-PCR [5] and the probe was designed on Primer Express version 3 software (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) (Table 1). Specificity of oligonucleotides was assessed by performing a local alignment search (blastn; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Reactions were performed in duplicate in 25 μ L final volume reaction containing 5 μ L of purified nucleic acid template, 12.5 μ L of 2 $\times$ reaction mix (3 mM Mg^{2+}), 2 μ L of each 10 μ M primers (final concentration at 800 nM) and 1 μ L of 5 μ M probe (final concentration at 200 nM). Finally 0.5 μ L of Rox reference dye (10-fold pre-diluted) was added and 0.5 μ L of enzyme mix (Superscript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Thermocycling reaction conditions were: reverse transcription at 50 $^{\circ}$ C for 15 min; Taq activation and denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 2 min, followed by 50 PCR amplification cycles including one step at 95 $^{\circ}$ C for 15 s and one step at 60 $^{\circ}$ C for 40 s (hybridization-elongation). RT-PCR assays were performed on an ABI 7500 (Applied Biosystem).

Efficiency, reproducibility, repeatability, specificity and calculation of the limit of detection were determined according to guidelines proposed by Bustin et al. [6] and Rabenau et al. [7]. To validate the M RT-PCR as a quantitative RT-PCR for the determination of influenza A viral load, we prepared

Sequences		Viral target	PCR product size
M/Fw	CTTCTAACCGAGGTCGAAACGTA	Viral M gene	202 bp
M/Rv	GGTGACAGGATTGGTCTTGCTTTA		
M probe+	TCAGGCCCCCTCAAAGCCGAG [5]Fam [3]BHQ-1		

TABLE 1. M gene RT-PCR primers and probe

10-fold dilution series of the calibrated synthetic RNA transcript. Six dilutions (10 – 10^6 copies/5 l L of synthetic RNA transcript) were tested in duplicate within the same sample run and compared. Standard curves were produced with these six standard points.

RNaseP real time RT-PCR and Influenza Ct correction

The ribonuclease P (RNaseP) RT-PCR was an in-house multiplex method allowing the detection of rhinovirus and RNaseP gene, which is a human cellular gene. Primers and probe for RNaseP detection are available at the CDC (cdcinfo@cdc.gov). The detection of this gene was used both as an internal control and to check for the presence of human nucleic acids and indicates the presence of a sufficient amount of cells in the sample. RNaseP Ct values were all determined using the same fluorescence threshold (0.02 dRn). They were used to correct influenza A viral load for each sample, calculating a Ct value modified according to the ratio of sample RNaseP and mean RNaseP Ct values ([sample influenza A Ct value (M RT-PCR) $\times$ sample RNaseP Ct value/mean RNaseP Ct value]).

Statistical analysis

Student's t-test and Pearson chi square-test were used to assess intergroup differences. Statistical analyses were performed on EpiInfo software (V 3.5.1 CDC). A test was considered as significant when p-value was below 0.05.

Results

Influenza A M gene RT-PCR assay performance

Data on M RT-PCR performance were calculated from 28 assays (Table 2). The M RT-PCR quantification using 10-fold dilution series of the calibrated synthetic RNA transcript showed a strong correlation between viral load of the sample and Ct value (mean $R^2 = 0.99 \pm 0.01$). PCR reaction efficiency was between 86.6% and 98.6%. The detection limit was between 10^1 and 10^2 copies of synthetic RNA transcript. The lowest concentrations of the RNA transcript (10^1 , 10^2 and 10^3 copies/5 l L) were individually tested 20 times. The probability of detecting 10^3 and 10^2 copies was

TABLE 2. M gene RT-PCR performance

M gene RT-PCR	
Number of replicates	28
Slope (mean $\pm$ SD)	-3.359 ± 0.13
Coefficient of determination (R^2)	0.99 ± 0.01
Efficiency (%)	91.86 ± 3.44

100% compared with 35% for a concentration of ten copies. According to the RNA purification protocol used, a limit of detection between 10 and 10^2 copies/5 l L ensures detection of 700–7000 copies/mL of initial sample (Table 3).

The repeatability of the M RT-PCR, tested on six positive samples with a mean Ct value of 28.18 and three low positive samples (mean Ct value = 37.11), showed a standard deviation of Ct values of 0.07 ± 0.04 for positive samples and 0.79 ± 0.19 for low positive samples (Table 4).

For reproducibility, two positive samples with a mean Ct value of 29.92 and one low positive sample (Ct value = 36.43) tested three times within three different assays performed on a 3-days period, showed a standard deviation of Ct values at fluorescence threshold 0.2 dRn of 0.16 ± 0.02 for positive samples and 0.39 for the low positive sample (Table 4).

Ct normalisation according to the quality of the samples

The mean Ct value for influenza A was 26.4 ± 5.2 [16.4–39.9]. This is the same Ct value as the 10^5 copies/5 l L RNA transcript standard point, corresponding approximately to a viral load of 6.84 log/mL of sample in viral transport medium. For RNaseP, the mean Ct value was 24.7 ± 1.9 [19.9–31.8]. Among the specimens tested, 52% had RNaseP Ct values below 25%, 21% between 25 and 27, and 9.6% over 27. This last group with high RNaseP Ct values represents swabs containing very few cells, as confirmed by immunofluorescence assays (data not shown). These correspond to virologically poor quality samples. According to the detection limit of our technique, 20% of samples with influenza A Ct values >35 had RNaseP Ct values >27 , corresponding to poor quality specimens.

TABLE 3. M gene RT-PCR detection limit

	No. of positive tests out of 20 tests (%)	Mean Ct $\pm$ SD
1000 copies/5 l L	20 (100)	33.35 ± 0.40
100 copies/5 l L	20 (100)	36.70 ± 1.36
10 copies/5 l L	7 (35)	39.30 ± 1.09

TABLE 4. M gene RT-PCR repeatability and reproducibility

	No. of samples tested	Mean Ct	SD (mean $\pm$ SD)
Repeatability			
Positive	6	28.18	0.07 ± 0.04
Low positive	3	37.11	0.79 ± 0.19
Reproducibility			
Positive	3	29.92	0.16 ± 0.02
Low positive	1	36.43	0.39

Influenza A Ct values were normalized according to RNaseP Ct values in order to adjust the quantity of virus detected for the quality of the samples. This correction resulted in an increase of influenza Ct up to 6.5 for low quality samples (with high RNaseP Ct values) or a decrease of influenza Ct up to 8.4 for high quality samples (with low RNaseP Ct values). After correction, the influenza A mean Ct value was 26.3 ± 3 [16.7–43.4] and 31% of the samples had corrected influenza A Ct values below 23, 25% between 23 and 29, and 44% over 29, this last group corresponding to low viral loads.

Ct value according to sampling time

Corrected influenza A Ct values were analysed according to the period between the onset of the disease and sampling time. The mean value was 25.7 for a period <1 day, 27.1 between 2 and 3 days, and 28.7 over 3 days (differences were significant, $p = 0.024$). Most of the samples in this study were taken no more than 3 days after disease onset (Table 5); 26% were taken after this. Among this last group of late samples, 39% had high corrected influenza A Ct values >29. Nevertheless 46% of samples taken <1 day after disease onset also presented high influenza A Ct values, probably because of poor quality samples.

Ct value according to clinical severity

Corrected influenza A Ct values were analysed according to specific clinical features of influenza disease and to patient medical history (Table 6). Viral load, as estimated by corrected Ct values, never appeared to correlate with clinical history or specific clinical symptoms. However, we observed a trend for higher viral load in patients presenting with marked signs of upper respiratory infections, not related to severe cases.

Discussion

Here we report a real time RT-PCR protocol developed 2 years ago for research applications. This one-step RT-PCR targeting the matrix gene is able to detect all subtypes of

TABLE 6. Corrected influenza A mean Ct values according to clinical features

Clinical features	Mean Ct value with this feature	Mean Ct value without this feature	p-Value
Cardiac or respiratory disease (including asthma) medical history	26.5	26.0	0.52
Asthma	25.9	26.5	0.49
Myalgia	25.9	26.6	0.46
Digestive symptoms	26.6	26.3	0.76
Upper respiratory infection	26.9	26.1	0.27
Lower respiratory infection	25.2	25.4	0.46

influenza A viruses including A(H1N1)2009. This M RT-PCR is rapid (<1.5 h), specific and sensitive, with a limit of detection between 10 and 100 copies/reaction. Viral loads of 700 copies/mL of sample were frequently detected; this value is in accordance with other reports of detection limits between 570 and 900 copies/mL [8,9]. For the detection of A(H1N1)2009, this M RT-PCR was associated with a specific RT-PCR targeting the haemagglutinin gene. This strategy is pertinent in the context of a pandemic as the new virus may drift, mainly due to mutation in haemagglutinin and/or neuraminidase genes, but variants will still be detected by this universal M RT-PCR.

The relationship between viral quantification and clinical severity in viral respiratory diseases is an important issue. It has previously been reported for seasonal influenza that patients hospitalized with severe diseases have more active and prolonged viral replication [10]. Recent reports described a median of A(H1N1)2009 viral load of 4.6 log RNA copies/mL in respiratory samples [9]. The value reported here is higher (6.84 log RNA copies/mL), probably because it was measured in a paediatric population comprising mostly (91) non-hospitalized children presenting with mild influenza symptoms. However, a recent study reported even higher viral loads, reaching 8.26 log/mL [8]. In addition to developing a reliable quantification tool such as the one described here, the main difficulty in viral load measurement is that the usual nasal swab sample is often of poor quality. In this study, 10% of the samples received were associated with high RNaseP Ct value (>27). This reflects poor quality specimens with very few cells, as confirmed by immunofluorescence assays. The impact of the quality of the sample on influenza quantification may be very high as, for poor quality samples (RNaseP Ct > 27), the correction of influenza Ct is over 3 Ct (1 log) and may be up to 6–8 Ct (2–3 log). In order to attempt to establish influenza viral load for disease management or clinical severity correlation, it is very important to assess the quality of the sample and to correct viral load accordingly.

TABLE 5. Corrected influenza A Ct values according to sampling time post symptom onset

	<23	23–29	>29	Number of samples
Period below 1 day	34 (34%)	20 (20%)	45 (46%)	99
Period from 2 to 3 days	15 (26%)	27 (46%)	16 (28%)	58
Period over 3 days	4 (15%)	12 (46%)	10 (39%)	26

In addition to poor quality samples, we showed that sample delay resulted in an increase of Ct values. This has also been recently reported by To et al. [8] who described a 1 log decrease for samples taken 3 days after disease onset.

Finally, even though our study failed to correlate any specific clinical features with influenza viral load, probably because the cases were mostly non-hospitalized children with mild symptoms, we consider that this normalized technique is of interest for disease management. Our results provide a standard reference viral load method that can be used in similar studies analysing severe cases.

Acknowledgements

The authors wish to thank D Thouvenot, for helpful review of the manuscript, as well as G Burfin for excellent technical assistance and, finally, D Souzy and A Lecoanet for the collection of clinical data.

Transparency Declaration

The authors declare no conflict of interest of any nature.

References

1. Garten RJ, Davis CT, Russell CA et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 2009; 325: 197–201.
2. Domínguez-Cherit G, Lapinsky SE, Macies AE et al. Critically ill patients with 2009 influenza A(H1N1) in Mexico. *JAMA* 2009; 302: 1880–1887.
3. Cullen G, Martin J, O'Donnell J et al. Surveillance of the first 205 confirmed hospitalised cases of pandemic H1N1 influenza in Ireland, 28 April – 3 October 2009. *Euro Surveill* 2009; 14: 1–7.
4. Jain S et al. Hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in the United States, April–June 2009. *N Engl J Med* 2009; 361: 1935–1944.
5. Whitley DM, Sloots TP. A 5'-nuclease real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the detection of a broad range of influenza A subtypes, including H5N1. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 53: 335–337.
6. Bustin SA, Benes V, Garson JA et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55: 611–622.
7. Rabenau HF et al. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. *J Clin Virol* 2007; 40: 93–98.
8. To KK, Chan KH, Li IW et al. Viral load in patients infected with pandemic H1N1 2009 influenza A virus. *J Med Virol* 2010; 82: 1–7.
9. Panning M, Eickmann M, Landt O et al. Detection of influenza A(H1N1)v virus by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2009; 14(46): 1–6.
10. Lee N, Chan PK, Hui DS et al. Viral loads and duration of viral shedding in adult patients hospitalized with influenza. *J Infect Dis* 2009; 200: 492–500.

1.1.1. Introduction

La qRT-PCR M a été choisie pour ses performances et en particulier pour sa sensibilité. Elle permet la réalisation du diagnostic rapide des infections dues aux virus influenza A quelque soit le sous-type. La définition de critères précis de validation, l'utilisation d'un transcrit ARN quantifié et le développement d'une RT-PCR RNaseP nous ont permis de développer une approche semi-quantitative, pour la détermination de la relation entre charge virale, donc quantité de virus excrétée au niveau respiratoire et gravité des signes cliniques. Ce papier présente les caractéristiques de la qRT-PCR ainsi que les résultats de notre étude réalisée chez 209 enfants hospitalisés ou vus en consultation en Pédiatrie à l'Hôpital Femme-Mère-Enfant à Lyon.

1.1.2. Performances de la RT-PCR M quantitative et optimisation

1.1.2.1. Performances de la technique

L'efficacité de l'amplification traduit la proportion de séquences amplifiées doublant à chaque cycle et se calcule à partir de la pente de la courbe d'étalonnage [$\log(\text{charge virale}) = f(\text{Ct})$] selon la formule suivante :

$$\text{Efficacité de PCR} = 10^{(-1/\text{pente})} - 1$$

Ella a été déterminée à partir de 28 essais. Dans chaque essai, une gamme de transcrit M de 6 points (10 - 10^6 copies/ $5\mu\text{l}$) a été ajoutée en duplicate. Nous avons montré une forte corrélation entre le Ct et la charge virale (R^2 moyen = 0.99 ± 0.01) et une efficacité de PCR comprise entre 86,6 et 98,6% (*publication 1, tableau 2, page 319*).

La limite de détection a été déterminée en testant 20 fois les trois points de gamme les plus bas (10^1 , 10^2 and 10^3 copies/ $5\mu\text{l}$) (*publication 1, tableau 3, page 319*). La probabilité de détecter 10^3 et 10^2 copies était de 100% alors que celle de détecter 10 copies était de 35%. En fonction du facteur de concentration de l'étape de purification de l'ARN, une limite de

détection comprise entre 10 et 10^2 copies/5 μ l correspond à la détection de 700 à 7000 copies/ml de génome viral dans le prélèvement de départ.

La répétabilité ou précision intra-essai a été calculée en testant 6 échantillons positifs (Ct moyen = 28,18) et 3 échantillons faiblement positives (Ct moyen = 37,11). La déviation standard calculée était de $0,07 \pm 0,04$ pour les échantillons positifs et de $0,79 \pm 0,19$ pour les échantillons faiblement positifs (*publication 1, tableau 4, page 319*).

La reproductibilité ou précision inter-essais a été évaluée en testant deux échantillons positifs (Ct moyen = 29,92) et un échantillon faiblement positif (Ct moyen = 36,43) trois fois, dans trois essais, réalisés trois jours différents. La déviation standard calculée était de $0,16 \pm 0,02$ pour les positifs et de 0,39 pour les faiblement positifs (ligne de base de fluorescence dRn 0,2) (*publication 1, tableau 4, page 319*).

La spécificité de la qRT-PCR M a été déterminée vis à vis de nombreux virus respiratoires ou présents dans la sphère nasopharyngée : virus influenza saisonniers A(H1N1) et A(H3N2), A(H1N1)2009, virus influenza aviaires A(H5N1) et A(H5N2), virus influenza B, virus influenza C, virus respiratoire syncytial (VRS), bocavirus (hBoV), parainfluenza virus 1 et 3 (hPIV), metapneumovirus (hMPV), rhinovirus (hRV), enterovirus, adenovirus, cytomegalovirus (CMV), herpes simplex virus (HSV) et virus de la varicelle et du zona (VZV). Seuls les virus influenza A [A(H1N1), A(H3N2), A(H1N1)2009, A(H5N1) et A(H5N2)] ont été détectés mais aucun signal n'a été observé pour les autres virus testés. Nous avons aussi vérifié qu'il n'y avait pas de signal positif avec les cellules utilisées pour la culture du virus influenza (MDCK) (données non publiées) et que la RT-PCR M pouvait détecter un large panel de virus aviaires de type A et de sous-types variés (Tableau 8).

Tableau 8: panel de virus influenza A de sous-types variés détectés par la RT-PCR M

Origine du virus	Sous-type viral	Nom de la souche testée
Aviaire	H2N3	A/Duck/Germany/1215/73
	H3N8	A/Duck/Ukraine/1/63
	H4N6	A/Duck/Czech/1/56
	H5N1	A/Turkey/16/2006
	H5N2	A/Finch/England/2051/2002
	H6N1	A/Duck/Germany/1868/68
	H7N1	A/Chicken/2676/99
	H7N3	A/Turkey/England/1239/63
	H8N4	A/turkey/Ontario/6118/68
	H9N2	A/Chicken/Hong Kong/69/97
	H10N8	A/Quail/Italy/1117/65
	H11N6	A/Duck/England/1120/56
	H12N5	A/Duck/Alberta/60/76
	H13N6	A/Gull/Maryland/704/77
	H15N8	A/Duck/Australia/348/83
Equine	H7N7	A/Equine/Prague/56
humaine	H1N1	A/New Caledonia/20/99
		A/Solomon Islands/03/2006
		A/Brisbane/59/2007
	H3N2	A/Moscow/10/99
		A/California/07/2004
		A/Wisconsin/67/2005
		A/Brisbane/10/2007
		A/Uruguay/716/2007
		A/Perth/16/2009
	H5N1	A/Vietnam/1194/2004

1.1.2.2. Optimisation de la technique

Développement des plasmides qNC et qH5

L'utilisation en mode quantitatif de la RT-PCR proposée par Whiley *et al*¹¹⁴ nous imposa de produire un plasmide contenant la séquence cible de la RT-PCR. Pour les applications que nous avons, nous avons développé en parallèle deux plasmides qNC et qH5 contenant, respectivement, les séquences cibles, reconnues par la RT-PCR M, d'un virus humain A(H1N1) : A/New Caledonia/20/99 et du virus aviaire A(H5N2) A/Finch/England/2051/02.

Les plasmides qNC et qH5 ont été produit par clonage, dans un vecteur pBluescript SK (+/-) « Multiple Cloning Site Region » (Stratagène), des séquences partielles du segment M ayant pour taille, respectivement 574 pb et 1100 pb. Après linéarisation, dosage spectrométrique et calcul du poids moléculaire, nous avons obtenus deux stocks de plasmide qui avaient pour concentrations, 10^9 copies/ 5µl pour qNC et 10^{11} copies/5µl pour qH5.

Composition du mélange réactionnel

Le développement de la RT-PCR M quantitative s'est fait en plusieurs étapes. Nous avons évalué la RT-PCR publiée par Whiley *et al*¹¹⁴ dans les conditions du kit SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen), en testant différents mélanges réactionnels contenant des quantités variables d'amorces (800 nM ou 900 nM) et de sonde (200 nM ou 300 nM). Nous avons déterminé les conditions permettant d'obtenir la meilleure efficacité (plus petit Ct et plus grande intensité de fluorescence (dRn) pour une quantité déterminée de cible) et une sensibilité satisfaisante (meilleure capacité à détecter la plus petite concentration de plasmide). Cette évaluation nous a permis de choisir le protocole utilisant 800 nM de chaque amorce et 200nM de sonde. Nous avons complété le panel de virus influenza A qui avait été testé par Whiley *et al*.¹¹⁴ (H1N1, H3N2, H5N1, H5N3, H7N7 et H9N2) et nous avons montré que la RT-PCR M détectait un large éventail de virus influenza A aviaires et équins (Tableau 8).

Adaptation de la qRT-PCR M sur LC480 et SmartCycler

Dans le cadre du protocole national BIVIR dans un premier temps, et du début de la pandémie ensuite, les deux CNR (sud et nord) ont souhaité uniformiser leur techniques de détection et de quantification du virus influenza. Après évaluation des outils à disposition, les CNR ont

fait le choix de la RT-PCR M quantitative que nous avons développé et de l'utilisation du transcrit ARN que le CNR nord avait produit comme matériel quantifié, pour la réalisation de la gamme. Le transcrit ARN présente comme intérêt majeur, par rapport au plasmide ADN que nous avons développé, de permettre par sa nature ARN d'évaluer aussi l'étape de transcription inverse en plus de celle de PCR. Le transcrit est un ARN de polarité négative produit *in vitro* à partir de la souche A/Paris/650/06 (H1N1). Il contient le début de la séquence codante du gène M, de l'ATG au nucléotide 982.

Dans un second temps nous avons adapté la technique sur les plateformes d'amplification du LC480 (Roche Diagnostic) et du SmartCycler (Cepheid). Nous avons testé différentes concentrations d'amorces et de magnésium ($MgSO_4^{2-}$) et évalué le mélange réactionnel le plus performant pour obtenir les mêmes Ct/Cp sur LC480 (Roche Diagnostic) et SmartCycler (Cepheid) que sur la plateforme sur laquelle nous avons travaillé : ABI7500 (Applied Biosystem), pour chacun des points de gamme de transcrit ARN.

1.1.3. Correction des charges virales

Pour cette étude, les charges virales M ont été corrigées par rapport à la quantité de cellules présentes dans le prélèvement estimée par la RT-PCR semi-quantitative RNase P.

L'analyse des résultats de RT-PCR RNase P sur 209 écouvillonnages de nez a montré un Ct moyen de $24,7 \pm 1,9$ [19,9-31,8]. Cinquante deux pourcents des prélèvements testés avaient un Ct inférieur à 25, 21% compris entre 25 et 27 et 9,6% supérieur à 27. Autrement dit, 10% environ des prélèvements étaient pauvres en cellules. Si l'on regarde les prélèvements possédant une charge virale faible, c'est-à-dire un Ct en RT-PCR M supérieur à 35, 20% d'entre eux avaient un Ct en RT-PCR RNase P supérieur à 27 ce qui met en évidence l'impact de la qualité du prélèvement sur la justesse de la détermination de la charge virale dans le prélèvement.

La correction de la charge virale en fonction de la qualité du prélèvement a permis de répartir les échantillons selon les 3 groupes suivants : 31% des prélèvements avait un Ct en M inférieur à 23, 25% entre 23 et 29 et 44% supérieur à 29. Le Ct moyen des RT-PCR M était de $26,3 \pm 3$ [16,7-43,4]. Lorsque l'on compare les fourchettes de Ct avant et après correction, la correction des Ct de RT-PCR M a permis de rétablir un plus large éventail de valeurs,

meilleur reflet de la diversité du niveau d'excrétion virale qu'il paraît normal d'observer *in vivo*.

1.1.4. Analyse des résultats et discussion

Dans la cohorte de 209 enfants hospitalisés, ou vus en consultation, en Pédiatrie à l'Hôpital Femme-Mère-Enfant à Lyon, nous avons, précisément, analysé l'impact du délai entre la réalisation du prélèvement et le début des symptômes sur la charge virale (Ct en RT-PCR M) et l'éventuelle corrélation entre la charge virale et la sévérité des symptômes.

Lorsque le prélèvement était réalisé entre 2 jours ou plus de 3 jours après le début des symptômes, le Ct corrigé en M était compris entre 23 et 29 dans 46% des cas. Lorsqu'il était réalisé moins de 1 jour après le début des symptômes, il était inférieur à 23 dans 34% des cas et supérieur à 29 dans 46% des cas (*publication 1, tableau 5, page 320*). La forte proportion de charges virales faibles, 1 jour après le début des symptômes, est en relation avec la pathogenèse de l'infection et le pic d'excrétion virale, généralement observé 2 jours après le début des symptômes. Mais dans notre étude, il peut être rapporté à des prélèvements de qualité insuffisante, pauvres en cellules. Nous montrons que le délai idéal pour permettre de réaliser le diagnostic est de 2 à 3 jours après le début des symptômes. L'impact du délai de prélèvement a été récemment mis en évidence par To *et al.* qui rapportent une diminution de charge virale influenza d'un log pour des prélèvements réalisés 3 jours après les premiers symptômes ¹¹⁵.

Les Ct corrigés en M ont été analysés en fonction des symptômes cliniques et des antécédents médicaux des patients afin de montrer si il existait une corrélation entre l'intensité de l'excrétion virale du virus influenza et sévérité du tableau clinique. La charge virale moyenne mesurée est de 6,84 log RNA copies/ml alors que des études récentes réalisées chez des patients infectés par le virus A(H1N1)2009 ont rapporté une charge virale moyenne de 4,6 log RNA copies/ml ¹¹⁶ et 8,26 log RNA copies/ml ¹¹⁵.

Chaque paramètre clinique a été analysé séparément : antécédents (maladie cardiaque ou respiratoire, asthme sous-jacent), symptômes à l'admission (présence de myalgies ou de signes digestifs) et nature du tableau respiratoire (supérieur ou inférieur). Précédemment Lee *et al.* avaient décrit une excrétion virale plus importante et prolongée chez des patients

hospitalisés souffrant de tableaux sévères d'infection grippale saisonnière ¹¹⁷. Dans notre étude aucune corrélation n'a pu être mise en évidence mais une tendance à observer une plus forte charge virale chez les patients souffrant d'infection respiratoire basse a pu être montrée (*publication 1, tableau 6, page 320*). Ceci s'explique probablement par le fait que notre cohorte, constituée rétrospectivement sur la première période de la pandémie (octobre à novembre 2009), ne présentait pas suffisamment de formes sévères. La majorité des enfants prélevés n'avaient pas de facteurs de risque (63,5%), seulement 9% d'entre eux avaient été hospitalisés (dont 1 sur 209 en unité de soins intensifs).

Nous avons mis en évidence que 10% des prélèvements avaient un Ct en RT-PCR RNaseP supérieur à 27 ce qui correspond à des prélèvements pauvres en cellules, donc mal réalisés. Nous avons fixé ce seuil à 27 en déterminant le Ct en RT-PCR RNaseP de prélèvements testés en immunofluorescence et considérés comme pauvres en cellules, c'est-à-dire ayant moins de 10 cellules par champ (données non publiées). Ces prélèvements pauvres en cellules peuvent compromettre le diagnostic, soit par le fait que le virus reste indétectable (faux négatif), soit par une sous-estimation de la charge virale. En effet, un signal faible peut induire en erreur le clinicien sur l'étiologie de l'épisode aigu en cours, car il peut évoquer une détection résiduelle d'un virus responsable d'un épisode grippal s'étant produit plusieurs semaines auparavant, en particulier chez l'immunodéprimé.

Ce travail a permis de développer une approche fiable et reproductible du suivi des charges virales chez des patients souffrant d'infection due au virus influenza et de constituer une population-témoin qui pourra nous permettre de mieux analyser les résultats obtenus sur une cohorte d'enfants présentant des formes cliniques sévères. Enfin, en mettant en évidence que 10% des prélèvements étaient pauvres en cellules, nous insistons sur la nécessité de bien former les personnels de santé amenés à réaliser ces prélèvements et si possible, d'intégrer une RT-PCR RNase P dans la stratégie diagnostic afin de tester la qualité de chaque prélèvement analysés.

1.2. Grippe saisonnière : apport de la bithérapie Oseltamivir-Zanamivir

Annexe 1

VIROLOGICAL EFFICACY AND SAFETY OF OSELTAMIVIR ZANAMIVIR COMBINATION COMPARED TO EACH MONOTHERAPY FOR SEASONAL INFLUENZA: A RANDOMIZED TRIAL

X. Duval, S. van der Werf, T. Blanchon, A. Mosnier, M. Bouscambert - Duchamp, A. Tibi, V. Enouf, C. Charlois – Ou, C. Vincent, L. Andreoletti, F. Tubach, B. Lina, F. Mentré, C. Leport.

Soumis dans PloS Pathogen, 26 avril 2010.

1.2.1. Introduction

Dans le contexte de menace pandémique ayant précédé l'émergence du virus A(H1N1)2009, l'efficacité et la tolérance de l'association oseltamivir-zanamivir a été évaluée dans le cadre d'un protocole de recherche clinique national (Bivir). L'association d'antiviraux présente, si elle est bien tolérée, différents avantages : réduction de la sévérité et de la durée des symptômes et diminution du risque de survenue de résistances.

Chez des adultes présentant une grippe A diagnostiquée par test de diagnostic rapide (TDR), la réponse virologique (J2) et clinique de la bithérapie oseltamivir-zanamivir par rapport aux monothérapies oseltamivir-placebo et zanamivir-placebo, ont été comparées dans le cadre d'une étude randomisée, contrôlée contre placebo, en double insu, conduite pendant l'épidémie de grippe saisonnière 2008/2009 due au virus A(H3N2) (*Annexe 1*). Le succès virologique a été défini par une charge virale nasale (qRT-PCR M) à J2 inférieure à 200 copies/µl. Ce seuil a été déterminé à partir de l'étude de 62 prélèvements réalisés au cours de la même période, dans le cadre de la surveillance du GROG. La positivité en RT-PCR M et en culture cellulaire a été étudiée et une discordance a été évoquée devant les résultats suivants : [RT-PCR M + / culture -] ou [RT-PCR M - / culture +]. Dans la population étudiée, un seuil de RT-PCR M corrigée fixé à 200 copies/µl permettait d'avoir autant de résultats discordants des deux types (5%). La réponse clinique a été évaluée par la durée des symptômes.

1.2.2. Correction des charges virales

Pour ce projet, la qualité du prélèvement et la quantité de cellules ont été déterminées par RT-PCR quantitative GAPDH (CNR Grippe région Nord, Institut Pasteur, V. Enouf, S. van der Werf) et une gamme de transcrit GAPDH dilué a été ajoutée à chaque série de RT-PCR GAPDH. La charge cellulaire GAPDH a été mesurée pour chaque échantillon et exprimée en nombre de copies d'équivalent génome/ μ l (cgeq/ μ l). La charge virale mesurée par qRT-PCR M a ensuite été corrigée en fonction de la charge cellulaire GAPDH de la façon suivante :

Charge virale corrigée (cgeq/ μ l) = Charge virale M / charge GAPDH x (moyenne charge GAPDH)

1.2.3. Analyse des résultats et discussion

Les figures et tableaux de l'annexe 1 ont été extraits et ajoutés dans cette partie du manuscrit pour plus de lisibilité.

L'étude a été interrompue à la fin de la saison épidémique 2008/2009 et un comité indépendant a été consulté et a décidé d'analyser les résultats de cette première partie malgré le fait que seulement 541 patients avaient été inclus au lieu des 900 initialement prévus.

Parmi les 541 patients inclus (*Annexe 1, table 1*), 173 ont reçu une bithérapie oseltamivir-zanamivir (OZ, n = 173), 192 ont reçu une monothérapie oseltamivir (O, n = 192) et 176 zanamivir (Z, n = 176) (*Annexe 1, figure 1*). Soixante-trois pourcents des patients inclus avait une infection à A(H3N2) et ils ont présenté une durée moyenne des symptômes avant inclusion de 25 heures (± 10).

Parmi les 541 patients inclus avec un TDR positif, 447 patients avaient un prélèvement à J0 positif en RT-PCR M. Ce groupe de patients a été nommé «influenza A infected patients». Parmi ces 447 patients, la réponse virologique était de 46%, 59% et 34% respectivement pour les bras OZ, O et Z ($p = 0,025$, $p = 0,028$ pour les comparaisons OZ / O et OZ / Z) (*Annexe 1, table 2*).

La diminution moyenne de charge virale entre J0 et J2 était de 2,14, 2,49 et 1,68 log₁₀ cgeq / ml ($p = 0,060$, $p = 0,016$ pour OZ / O et OZ / Z). Les délais médians de disparition des symptômes étaient respectivement de 4,0, 3,0 et 4,0 jours ($p = 0,030$, $p = 0,77$ pour OZ/O et

OZ / Z). Les mêmes tendances ont été observées dans le groupe des patients ayant eu une confirmation virologique par RT-PCR à J0 (n=447) et celle ayant bénéficié des deux prélèvements J0 et J2 (n=414) (*Annexe 1, table 3*). L'association a été bien tolérée.

Cette étude est, à notre connaissance, l'essai le plus important visant à étudier l'association de deux INA en comparaison de chacune des monothérapies. Cette analyse repose principalement sur l'analyse de la réponse virologique, décroissance de la charge virale nasale, et dans un deuxième temps, de la réponse clinique au traitement.

Chez les adultes atteints de grippe A, l'association oseltamivir-zanamivir semblerait moins efficace qu'une monothérapie d'oseltamivir, mais plus efficace qu'une monothérapie de zanamivir. Ce résultat non attendu doit être pris en considération étant donné (i) qu'il a été obtenu dans le cadre d'un essai en double aveugle contre placebo, (ii) qu'il a été retrouvé dans les trois populations analysées (chez les 541 patients inclus, les 447 patients souffrant d'un grippe A confirmée par RT-PCR à J0 et les 414 patients virologiquement confirmés et compliants entre J0 et J2) et (iii) que l'on a observé une concordance entre les résultats virologiques et cliniques.

Cette supériorité virologique et clinique de la monothérapie oseltamivir par rapport à la bithérapie pourrait être expliquée par un antagonisme au niveau de la liaison de ces molécules dans la poche catalytique de la NA. Cette hypothèse doit être vérifiée *in vitro*. Des interactions pharmacocinétiques peuvent aussi être évoquées. En effet, l'oseltamivir doit être métabolisé avant d'être actif ce qui retarde la disponibilité de la molécule au niveau du site de l'infection ($t_{\max}=4$ heures) alors que le zanamivir, inhalé, est directement actif. Il n'est donc pas impossible qu'il occupe alors le site catalytique en priorité et empêche ainsi l'oseltamivir de se fixer.

Cette étude représente la première analyse complète, virologique et clinique, de l'efficacité comparée de l'oseltamivir versus le zanamivir et confirme la supériorité de l'oseltamivir dans la prise en charge des patients. Etant donné que l'épidémie de l'hiver 2008-2009 était exclusivement due à un sous-type A(H3N2), il serait intéressant de confirmer les résultats obtenus sur un autre sous-type et, en particulier, sur le virus A(H1N1)2009.

Ce travail présente quelques limites concernant :

- le nombre de patients inclus : 541 au lieu de 900 initialement prévus mais une répartition similaire des patients dans les 3 bras,

- une plus grande proportion de patients non prélevés à J2 dans le bras OZ mais les résultats sont confirmés aussi dans le groupe des 414 patients possédant un J0 et un J2,
- l'absence d'informations sur l'usage correct du diskhaler pour l'administration du zanamivir,
- une réponse virologique estimée au niveau d'un seul site et un seul jour (J2) mais une réponse globale disponible par les informations cliniques collectées.
- Enfin, il aurait été très intéressant d'introduire dans cette étude un bras exclusivement placebo afin de déterminer, avec la stratégie de mesure de la charge virale normalisée par RT-PCR, sur un grand nombre de patients, le niveau d'excrétion virale de patients faisant une grippe et de redéfinir précisément l'apport de l'oseltamivir dans le traitement de la grippe.

Au final, nous mettons en évidence la supériorité de l'oseltamivir par rapport à l'association oseltamivir-zanamivir dans la prise en charge des patients atteints de grippe A. Ces résultats confirment que l'oseltamivir doit être utilisé en première intention et peuvent contribuer à une bonne gestion des antiviraux dans le cadre de la pandémie en cours.

Table 1: characteristics of the 541 patients enrolled in the study and of the 447 influenza A infected patients

	Combined oseltamivir and zanamivir	Oseltamivir plus placebo	Zanamivir plus placebo
All patients included in the study N= 541 (%)	n=192 (35.5%)	n=176 (32.5%)	n=173 (32.0%)
Age (year) : mean (SD) [Range]	38.7 (13.2) [18.3 ; 73.2]	39.5 (13.1) [18.1 ; 76.3]	39.9 (13.8) [18.0 ; 84.2]
Male no- (%)	91 (47.6%)	92 (52.3%)	86 (49.7%)
Smoker no- (%)	34 (17.8%)	25 (14.2%)	26 (15.0%)
Comorbidities no- (%)	27 (14.1%)	27 (15.3%)	23 (13.3%)
Fever at enrollment $\geq 38^{\circ}\text{C}$ no- (%)	123 (69.9%)	118 (73.3%)	117 (75.5%)
Initiation of treatment ≤ 24 hrs after onset of symptoms no-(%)	92 (47.9%)	85 (48.3%)	101 (58.4%)
Symptoms score per patient * :			
mean (SD)	15.2 (2.8)	14.9 (3.2)	15.1 (3.2)
% of maximal score † : mean (SD)	72.4% (13.4)	71.0% (15.2)	72.1% (15.4)
Influenza A infected patients N=447 (%)	n=157 (35.1%)	n=141 (31.6%)	n=149 (33.3%)
Age (year) : mean (SD) [Range]	38.7 (13.2) [18.3 ; 73.2]	39.5 (13.0) [18.1 ; 76.3]	40.1 (14.1) [18.0 ; 84.2]
Male no- (%)	76 (48.7%)	73 (51.8%)	77 (51.7%)
Smoker no- (%)	22 (14.1%)	15 (10.7%)	20 (13.4%)
Comorbidities no- (%)	21 (13.4%)	20 (14.2%)	20 (13.4%)
Fever $\geq 38^{\circ}\text{C}$ at enrollment no- (%)	101 (67.8%)	95 (70.9%)	104 (75.9%)
Initiation of treatment ≤ 24 hrs after onset of symptoms no- (%)	72 (45.9%)	68 (48.2%)	86 (57.7%)
Symptoms score per patient *:			
mean (SD)	15.6 (2.7)	15.3 (3.2)	15.5 (3.1)
% of maximal score† : mean (SD)	74.2% (12.8)	72.7% (15.2)	73.8% (15.0)
Influenza virus subtype			

Note:

Sum of the severity of the seven day 0 influenza symptoms (feverishness, nasal stuffiness, sore throat, cough, muscle aches, tiredness-fatigue, and headache) using a 4-point scale 2, 12

† The score is expressed as a percentage of the maximal score of 21.

Figure 1: Trial flowchart

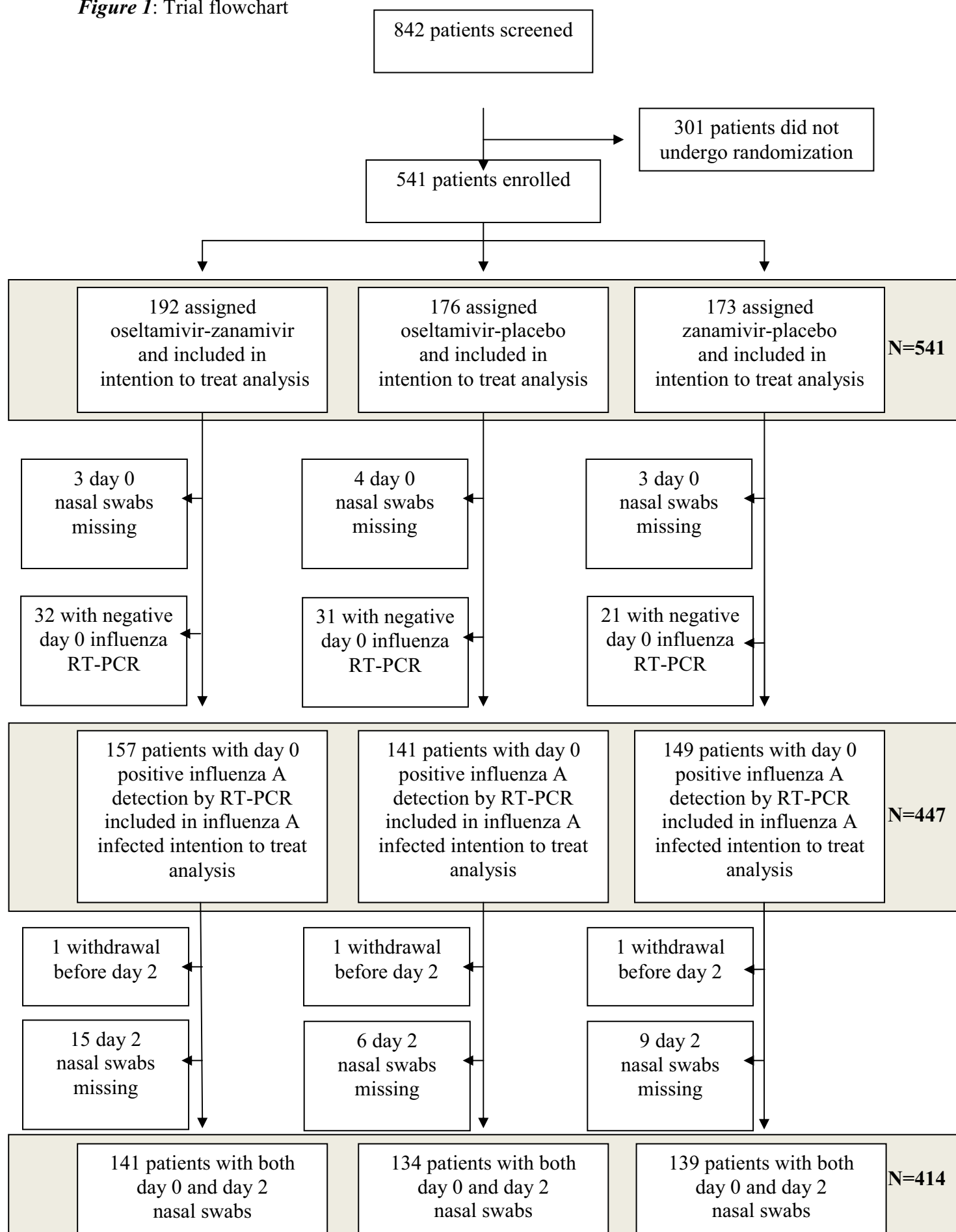


Table 2: Virological endpoints according to treatment arms in the 541 enrolled patients, in the 447 influenza A infected patients with infection, and in the 382 influenza A infected patients fully compliant between day 0 and day 2.

	Combined oseltamivir and zanamivir	Oseltamivir plus placebo	O+Z versus O P value Difference between groups [95% CI]	Zanamivir plus placebo	O+Z versus Z P value Difference between groups [95% CI]	O Versus Z* Difference between groups [95% CI]
Primary virological endpoint						
Intention to treat analysis (all enrolled patients) (N =541)	192	176		173		
2 influenza RT-PCR < 200 cgeq/μL (%)	52.6%	62.5%	0.055 -9.9% [-19.9 ; 0.2]	40.5%	0.020 +12.1% [2.02 ; 22.3]	+22.0% [12.1 ; 32.0]
Intention to treat analysis (influenza A infected patients) (N= 447)	157	141		149		
2 influenza RT-PCR < 200 cgeq/μL (%)	45.9%	58.9%	0.025 -13.0% [-23.1 ; -2.9]	33.6%	0.028 +12.3% [2.39 ; 22.2]	+25.3% [15.5 ; 35.2]
Intention to treat analysis (influenza A infected patients and fully compliant day 0 to day 2) (N=382)	131	124		127		
2 influenza RT-PCR < 200 cgeq/μL (%)	48.1%	62.9%	0.017 -14.8% [-24.9 ; -4.8]	37.0%	0.079 11.1% [1.0 ; 21.1]	25.9% [16.0 ; 35.8]
Secondary virological endpoints						
Influenza A infected patients with available day 0 and day 2 nasal swabs (N=447)	141	134		139		
n (SD) viral load at day 0 (log ₁₀ cgeq/μL)	4.36 (1.36)	4.57 (1.32)		4.34 (1.37)		
n (SD) viral load at day 2 (log ₁₀ cgeq/μL)	2.22 (1.12)	2.08 (1.17)		2.66 (1.35)		
n (SD) viral load decrease between day 0 and 2 (log ₁₀ cgeq/μL)	2.14 (1.54)	2.49 (1.52)	0.060 -0.35 [-0.8 ; 0.07]	1.68 (1.68)	0.016 0.46 [0.03 ; 0.9]	0.81 [0.4 ; 1.3]
Influenza A infected patients with available day 0 and day 2 nasal swabs and fully compliant from day 0 to day 2 (N=365)	123	121		121		
n (SD) viral load at day 0 (log ₁₀ cgeq/μL)	4.40 (1.28)	4.58 (1.31)		4.34 (1.37)		
n (SD) viral load at day 2 (log ₁₀ cgeq/μL)	2.22 (1.15)	2.02 (1.16)		2.59 (1.37)		
n (SD) viral load decrease between day 0 and 2 (log ₁₀ cgeq/μL)	2.17 (1.51)	2.56 (1.55)	0.051 -0.4 [-0.8 ; 0.1]	1.76 (1.71)	0.044 0.4 [0.0 ; 0.9]	0.8 [0.3 ; 1.3]

Note

CI: Confidence interval. O: oseltamivir, Z: zanamivir. ; * Exploratory analysis.

Table 3 Clinical response according to treatment arms in the 541 enrolled patients, in the 447 influenza A infected patients, and in the 382 influenza A infected patients and **fully** compliant between day 0 an day 2.

	Combined oseltamivir and zanamivir	Oseltamivir plus placebo	O+Z versus O P value Difference between groups [95% CI]	Zanamivir plus placebo	O+Z Versus Z P value Difference between groups [95% CI]	O Versus Z* Difference between groups [95% CI]
Intention to treat analysis (all enrolled patients) (N =541)	192	176		173		
Duration of symptoms in days (median, IQR)	3.5 [2.5-14]	3.0 [2-7]	0.015 +0.5 [0.0 ; 1.5]	4.0 [2.5-14]	0.78 -0.5 [-1.0 ; 0.5]	-1.0 [-1.5 ; -0.5]
Number (%) of patients with clinical event during treatment	26 (13.5%)	15 (8.5%)	0.14	23 (13.3%)	1.00	
- antibiotics	17 (8.9%)	10 (5.7%)	+5.0%	13 (7.5%)	+0.3%	-4.8%
- pneumonia	2 (1.0%)	1 (0.6%)	[-1.3 ; 11.4]	0 (0.0%)	[-6.7 ; 7.2]	[-11.2 ; 1.6]
- other	21 (10.9%)	14 (8.0%)		22 (12.7%)		
Number (%) of patients with alleviation of symptoms at end of treatment	111(57.8%)	122 (69.3%)	0.023 -11.5% [-21.3 ; -1.7]	100 (57.8%)	1.00 0.0% [-10.1 ; 10.1]	+11.5% [1.7 ; 21.3]
Score of symptoms at end of treatment (median, IQR)	3 [2-5]	2 [1-4]	0.0006 1.0 [0.0 ; 1.0]	3 [1-6]	0.79 0.0 [-1.0 ; 0.0]	-1.0 [-2.0 ; -1.0]
Intention to treat analysis (influenza A infected patients) (N= 447)	157	141		149		
Duration of symptoms in days (median, IQR)	4.0 [2.5-14]	3.0 [2-7]	0.018 +1.0 [0.0 ; 4.0]	4.0 [2.5-14]	0.96 0.0 [-3.0 ; 3.0]	-1.0 [-4.0 ; 0.0]
Number (%) of patients with clinical event during treatment	19 (12.1%)	10 (7.1%)	0.17	18 (12.1%)	1.00	
- antibiotics	14 (8.9%)	7 (5.0%)	+5.0%	10 (6.7%)	+0.02%	-5.0%
- pneumonia	2 (1.3%)	1 (0.7%)	[-1.0 ; 11.0]	0 (0.0%)	[-6.6 ; 6.7]	[-1.0 ; 11.0]
- other	15 (9.6%)	9 (6.4%)		17 (11.4%)		
Number (%) of patients with alleviation of symptoms at end of treatment	87 (55.4%)	95 (67.4%)	0.043 -12.0% [-21.8 ; -2.1]	84 (56.4%)	0.91 -1.0% [-11.1 ; 9.2]	+11.0% [1.1 ; 20.9]
Score of symptoms at end of treatment (median, IQR)	3 [2-5]	2 [1-4]	0.013 +1 [0.0 ; 1.0]	3 [1-6]	0.93 0 [-1.0 ; 0.0]	-1 [-2.0 ; -0.5]
Intention to treat analysis (influenza A infected patients and fully compliant from day 0 to day 2) (N=382)	131	124		127		
Duration of symptoms in days (median, IQR)	4.0 [2.5-14]	3.0 [2-7]	0.030 +1 [0.0 ; 1.5]	4.0 [2.5-14]	0.74 0 [-1.0 ; 1.0]	-1 [-1.5 ; -0.25]
Number (%) of patients with clinical event during treatment	15 (11.5%)	9 (7.3%)	0.29	14 (11.0%)	1.00	
- antibiotics	11 (8.4%)	6 (4.8%)	+4.2%	7 (5.5%)	+0.4%	-3.8%
- pneumonia	2 (1.5%)	1 (0.8%)	[-2.9 ; 11.3]	0 (0.0%)	[-7.3 ; 8.1]	[-10.9 ; 3.3]
- other	12 (9.2%)	8 (6.5%)		13 (10.2%)		

Note: O: oseltamivir, Z: zanamivir. CI: Confidence interval ; *

2. Cinétique de croissance virale : caractérisation de virus influenza émergents

Nous avons réalisé la détermination des profils de cinétiques de croissance virale dans différents projets dont les objectifs étaient de caractériser des nouveaux virus.

2.1. Caractérisation des virus influenza réassortants A(H1N1)2009 résistants à l'oseltamivir

Publication 2

NOVEL INFLUENZA A(H1N1)_v IN VITRO REASSORTANT VIRUSES WITH OSELTAMIVIR RESISTANCE

M. Bouscambert-Duchamp*, M. Ottmann*, J.S. Casalegno, E. Frobert, V. Moules, O. Ferraris, M. Valette, V. Escuret, B. Lina.* co-auteurs

Accepté le 12/01/2010: Antiviral Therapy

Ce travail est présenté et discuté dans la section C 1.1 « Etude du réassortiment génétique entre les virus A(H1N1)2009 et A(H1N1) saisonniers résistants à l'oseltamivir »

2.2. Caractérisation des virus influenza A(H3N0)

Annexe 2

IN VITRO CHARACTERIZATION OF NATURALLY OCCURING INFLUENZA A(H3N0) VIRUSES LACKING THE NA GENE SEGMENT: TOWARD A NEW MECHANISM OF VIRAL RESISTANCE

V. Moules, O. Ferraris, O. Terrier, E. Guidice, M. Yver, J.P. Rolland, **M. Bouscambert-Duchamp**, C. Bergeron, M. Ottmann, E. Fournier, A. Traversier, C. Boule, A. Rivoire, L. Yipu, A. Hay, M. Valette, R. Marquet, M. Rosa-Calatrava, N. Naffakh, G. Schoehn, D. Thomas, B. Lina.

Accepté dans Virology, 27 avril 2010.

2.2.1 Introduction

Au laboratoire, deux souches de virus influenza A(H3N2), isolées chez des patients symptomatiques, avaient montré un phénotype de résistance aux INA lié à une absence d'activité neuraminidasique¹¹⁸. Des travaux complémentaires ont objectivé que ces virus n'avaient pas de NA ou possédaient une NA tronquée. Cette étude avait pour objectifs de caractériser ces virus A(H3N0) à 7 segments sur le plan morphologique par cryo-EM (microscopie électronique), d'évaluer leurs capacités répliquatives ainsi que les bases moléculaires pouvant expliquer qu'ils puissent se répliquer malgré l'absence de NA. Nous avons pu comparer les caractéristiques des deux souches sauvages ainsi que du virus A(H3N0) A/Reunion/586/04 reconstitué par génétique inverse et du virus saisonnier A(H3N2).

Nous présentons dans ce manuscrit la deuxième partie de l'étude visant à évaluer les propriétés répliquatives de ces virus. Pour cela, deux approches ont été analysées : des cinétiques de croissance sur MDCK avec mesure de la production virale à chaque point en titrage infectieux et l'analyse comparée des cinétiques de croissance virale sur MDCK et sur MDCK-SIAT1 avec mesure de la production virale à chaque point en qRT-PCR M.

2.2.2. Analyse des résultats

Les premières données collectées sur les virus A(H3N0) ont montré que ces virus semblaient avoir les mêmes propriétés en culture cellulaire sur MDCK que les virus A(H3N2) saisonniers : agglutination des globules rouges de cochon d'inde mais pas de poulet, effet cytopathique modéré et production de grosses quantités de virus. Nous avons comparé les profils de croissance virale des virus A(H3N0) [A/Lyon-CHU/2643/03 et A/Réunion/586/04] et des virus A(H3N2) sauvages [A/California/07/04 et A/Moscow/10/99] sur MDCK et sur MDCK-SIAT1.

Nous avons montré que la production virale mesurée par titrage infectieux, au cours de l'infection de cellules MDCK, par les trois virus étudiés, augmentait de façon exponentielle pour atteindre un titre au plateau de $10^{7,3}$ DICT50/ml à 42 h post-infection (*Annexe 2, Figure 1*).

Figure 1 (annexe 2) : Cinétiques de croissance virale réalisées sur MDCK et MDCK-SIAT1.

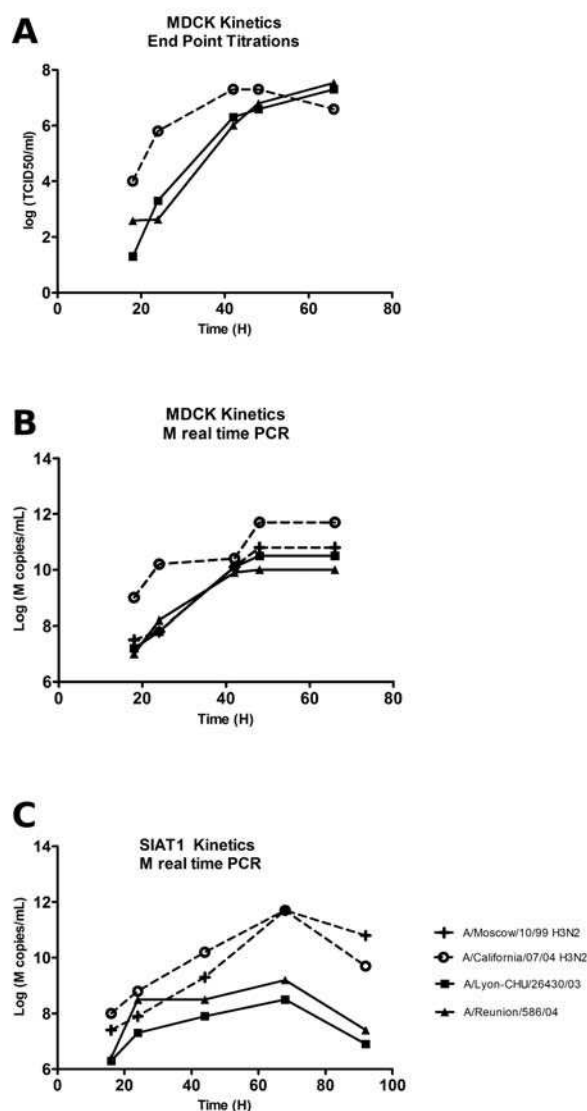


Figure 1

Figure 1 (A) Des MDCK sont inoculées par du virus influenza à une MOI de 0,0001 dans du milieu EMEM + 1µg/ml de trypsine. Les virus étudiés sont le virus A(H3N2) sauvage: A/California/07/04 et les virus A(H3N0): A/Lyon-CHU/26430/03 et A/Réunion/586/04. Après une heure à 34°C, le surnageant est jeté, les cellules sont lavées avec du PBS 1X et du milieu frais est ajouté. Des échantillons de surnageant sont récoltés à des temps définis. Le virus libéré dans le surnageant est quantifié en titrage infectieux en point final. **(B)** Des MDCK sont inoculées par les virus influenza à une MOI de 0,0001 dans du milieu EMEM + 1µg/ml de trypsine, et 50µM de carboxylate d'oseltamivir. Les virus étudiés sont les virus A(H3N2) sauvages: A/Moscow/10/99, A/California/07/04 et les virus A(H3N0): A/Lyon-CHU/26430/03 et A/Réunion/586/04. Après une heure à 34°C, le surnageant est jeté, les cellules sont lavées avec du PBS 1X et du milieu frais est ajouté. Des échantillons de surnageant sont récoltés à des temps précis. Le virus libéré dans le surnageant est quantifié par qRT-PCR M temps réel. **(C)** Des SIAT1 sont inoculées par les virus influenza à une MOI de 0,0001 dans du milieu EMEM + 1µg/ml de trypsine, et 50µM de carboxylate d'oseltamivir. Les virus étudiés sont les virus A(H3N2) sauvages: A/Moscow/10/99, A/California/07/04 et des virus A(H3N0): A/Lyon-CHU/26430/03 et A/Réunion/586/04. Après une heure à 34°C, le surnageant est jeté, les cellules sont lavées avec du PBS 1X et du milieu frais est ajouté. Des échantillons de surnageant sont récoltés à des temps précis. Le virus libéré dans le surnageant est quantifié par qRT-PCR M temps réel.

Les courbes de cinétiques de croissance virale des virus A(H3N0) sauvages semblaient être retardées. Les titres mesurés à 24 h post-infection étaient inférieurs de 2 log₁₀ par rapport à ceux du virus A/California/07/04, mais les titres maximum mesurés à 66 h post-infection étaient équivalents (environ 10^{7,4} DICT50/ml) pour les virus A(H3N0) et A(H3N2) (*Annexe 2, Figure 1*). Lorsque l'on étudie la phase exponentielle de croissance, l'efficacité de réplication est plus importante pour les virus A(H3N0) avec une pente de 2,1 comparée à 1,6 pour le virus A(H3N2) de référence (*Annexe 2, Figure 1*).

Dans un second temps nous avons voulu comparer les comportements de ces virus sur MDCK et sur MDCK-SIAT1. Les MDCK-SIAT1 sont des cellules MDCK sur-exprimant la (alpha)2-6 sialyltransférase humaine. Mastrosovich *et al.* ont prouvé que ce système cellulaire était plus adapté que les MDCK pour étudier le rôle de la NA pendant le processus de croissance, probablement, car la proportion de récepteurs (alpha)2-6 était plus importante ce qui augmentait donc l'impact d'une forte activité sialidase sur le virus¹¹⁹. Nous avons comparé les cinétiques des virus A(H3N0) étudiés, à celles de deux virus A(H3N2) sauvages [A/California/07/04 et A/Moscow/10/99].

Nous avons montré que la même tendance était observée pour les virus A(H3N0) et le virus sauvage A/California/07/04 (plateau atteint à 42 h post-infection) et que le virus A/Moscow/10/99 présentait un profil de croissance similaire à celui des virus A(H3N0) sur MDCK (*Annexe 2, Figure 1*).

Sur MDCK-SIAT1, les différences de cinétiques étaient plus marquées. Les virus étudiés atteignaient le plateau à 68 h post-infection et les virus A(H3N2) sauvages (10^{11,7} copies/ml) avaient des titres supérieurs de 2 à 3 log₁₀ environ par rapport aux virus A(H3N0) (A/Lyon-CHU/26430/03 et A/Reunion/586/04, 10^{8,5} et 10^{9,2} copies/ml respectivement) (*Annexe 2, Figure 1*).

Ces données ont confirmé que les virus A(H3N0) pouvaient se répliquer en l'absence de NA mais qu'ils avaient une réplication moins efficace que les virus A(H3N2) sauvages sur MDCK. La différence observée étant plus importante sur MDCK-SIAT1.

2.3. Caractérisation de virus influenza A(H1N1) résistants à l'oseltamivir ayant circulé au cours de l'hiver 2007-2008.

Annexe 3

OSELTAMIVIR-RESISTANT INFLUENZA A(H1N1) VIRUSES IN SOUTH OF FRANCE, 2007-2009.

J.S. Casalegno, M. Bouscambert-Duchamp, V. Caro, I. Schuffenecker, M. Sabatier, A. Traversier, M. Valette, B. Lina, O. Ferraris, V. Escuret.

Accepté dans Antiviral Research, 20 mai 2010.

2.3.1. Introduction

Des virus influenza A(H1N1) résistants à l'oseltamivir ont émergé au cours de l'hiver 2007-2008 sans pression de sélection due à l'antiviral. Ces virus étaient tous porteurs d'une mutation dans la NA en position 275, une tyrosine substituée par une histidine ou H275Y. Ces virus résistants ont rapidement eu une prévalence de 100% suggérant qu'ils avaient un meilleur « fitness » que leurs homologues sensibles. Pour mieux comprendre le rôle de l'affinité de la NA dans l'émergence de ces virus résistants à l'oseltamivir, nous avons comparé les propriétés des NA de souches de virus A(H1N1), isolées chez des patients entre 2005 et 2009, et des souches de référence de 1977 à 2007. Pour toutes ces souches, nous avons testé : (i) leur niveau de résistance aux INA (test d'inhibition de fluorescence), (ii) les paramètres de cinétique d'activité enzymatique de leur NA, (iii) les séquences nucléotidiques de leur NA et HA et (iv) leurs capacités répliquatives *in vitro* sur MDCK.

Dans ce manuscrit nous ne discuterons que les résultats des cinétiques de croissance virale.

2.3.2. Analyse des résultats

2.3.2.1. Paramètres de cinétique enzymatique de la NA

En 2007-2008, parmi 374 souches A(H1N1) isolées, 38% étaient résistantes à l'oseltamivir. La mesure du Km moyen (constante de Michaelis-Menten) définit l'affinité de la NA pour son substrat. Plus le Km est bas, plus l'affinité de l'enzyme est élevée. Nous avons montré que le Km moyen des NA des souches sensibles à l'oseltamivir [*souches 2007/2008 et souche de référence A/Brisbane/59/2007 H275*] était significativement inférieur au Km des souches sensibles à l'oseltamivir ayant circulé avant 2007 [*souches 2005-2006 apparentées à A/Caledonia/20/1999 et souches de référence 1977 -2006*] (*annexe 3, tableaux 2 et 3*).

La mutation H275Y, présentes sur la NA des souches résistantes à l'oseltamivir ayant circulé en 2007/2008 et 2008/2009 semble avoir participé à la restauration d'un Km similaire aux souches isolées avant 2007 (*annexe 3, tableaux 2 et 3*). D'autres mutations semblent participer à ces variations d'affinité, en particulier la D344N et la G249K, comme cela avait déjà été rapporté par Rameix-Welti *et al.*¹²⁰ et Collins *et al.*¹²¹.

2.3.2.1. Cinétiques de croissance virale

Les cinétiques de croissance virale sur MDCK ont été réalisées dans les mêmes conditions pour différents virus sensibles ou résistants à l'oseltamivir ainsi que les souches de référence (Tableau 9)

Tableau 9 : liste des souches de virus influenza A(H1N1) sensibles ou résistants à l'oseltamivir étudiées (Casalegno *et al.*, 2010, Antivir Res / annexe 3)

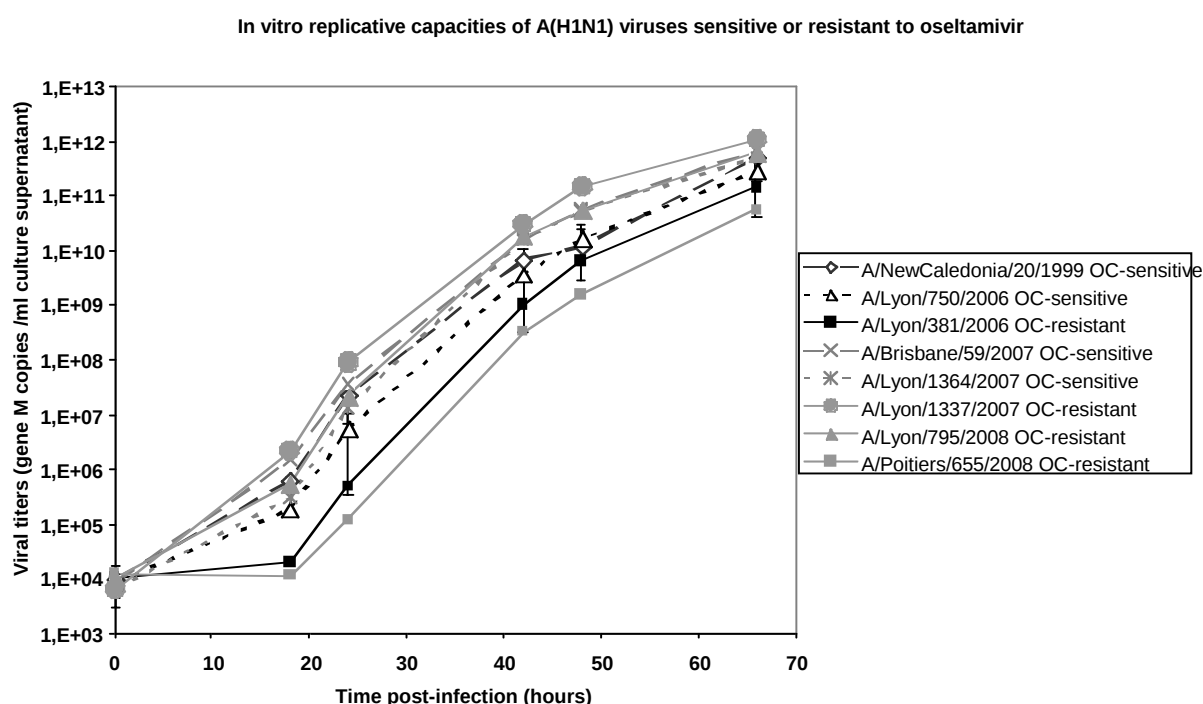
Nom de la souche	Année d'isolement	Sensibilité à l'oseltamivir
A/New Caledonia/20/1999	1999	Sensible
A/Lyon/381/2006	2006	Résistant
A/Lyon/750/2006	2006	Sensible
<i>A/Brisbane/59/2007</i>	<i>2007</i>	<i>Sensible</i>
<i>A/Lyon/1364/2007</i>	<i>2007</i>	<i>Sensible</i>
A/Poitiers/655/2008	2008	Résistant
A/Lyon/795/2008	2008	Résistant
A/Lyon/1337/2007	2007	Résistant

Globalement, nous n'avons pas observé de différences majeures de profils de répllication entre les virus sensibles et résistants apparentés à A/Caledonia/20/1999 ou A/Brisbane/59/2007 mais certaines tendances peuvent être observées.

Lorsque nous avons étudié indépendamment les profils de chaque virus, nous avons pu constaté que les virus sensibles avaient tous un profil comparable alors que les virus résistants présentaient des profils différents entre eux (Annexe 3, figure 2). Les virus résistants **A/Lyon/1337/2007** et **A/Lyon/795/2008** se répliquaient de la même façon que les virus sensibles, alors que le virus résistant **A/Poitiers/655/2008** semblait se répliquer moins efficacement avec des titres à 42 h ($p=0,038$) et 48 h post-infection ($p=0,032$) significativement inférieurs à ceux du virus résistant A/Lyon/1337/2007. A 18 h post-infection ($p= 0,03$) le virus A/Poitiers/655/2008 avait un titre significativement inférieur à celui du virus sensible A/Lyon/1364/2007.

Le virus résistant A/ **Lyon/381/2006** avait un profil similaire au virus résistant A/Poitiers/655/2008 et significativement moins réplcatif que le virus sensible de référence A/New Caledonia/20/99 à 18 h post-infection (p= 0,008) (Annexe 3, figure 2).

Figure 2 (annexe 3) : cinétiques de croissance virale des virus influenza sensibles ou résistants à l'oseltamivir.



Des MDCK sont inoculées avec les virus influenza à une MOI de 0,0001 (1 dose infectieuse/ 10 000 cellules) dans du milieu EMEM + 1µg/ml de trypsine. Après une heure à 34°C, le surnageant est jeté, les cellules sont lavées avec du PBS 1X et du milieu frais est ajouté. Des échantillons de surnageant sont récoltés à des temps précis. Le virus libéré dans le surnageant est quantifié par qRT-PCR M temps réel.

C. Résultats : Partie II

1. Co-infections virales : étude du réassortiment génétique entre des virus d'origines et de sous-types différents

1.1. Etude du réassortiment génétique entre les virus influenza A(H1N1)2009 et A(H1N1) résistants à l'oseltamivir

Publication 2

NOVEL INFLUENZA A(H1N1)_v IN VITRO REASSORTANT VIRUSES WITH
OSELTAMIVIR RESISTANCE

*M. Bouscambert-Duchamp**, *M. Ottmann**, *J.S. Casalegno*, *E. Frobert*, *V. Moules*, *O. Ferraris*, *M. Valette*, *V. Escuret*, *B. Lina*.

** co-auteurs*

Accepté le 12/01/2010: Antiviral Therapy

Novel influenza A(H1N1)v in vitro reassortant viruses with oseltamivir resistance

Journal:	<i>Antiviral Therapy</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	OTTMANN, Michele; Universite, Virologie BOUSCAMBERT, Maude; HCL, Virologie CASALEGNO, Jean-Sébastien; Universite, Virologie FROBERT, Emilie; HCL, Virologie MOULÈS, Vincent; Universite, Virologie FERRARIS, Olivier; Universite, Virologie VALETTE, Martine; HCL, Virologie ESCURET, Vanessa; HCL, Virologie LINA, Bruno; HCL, Virologie; Universite, Virologie
Keywords:	Antiviral therapy, Influenza, Infectious diseases, Viral infections, H1N1, oseltamivir resistance, pandemic influenza

Novel influenza A(H1N1)v *in vitro* reassortant viruses with Oseltamivir resistance

Michèle Ottmann¹ *, Maude Bouscambert-Duchamp^{1,2} *, Jean Sébastien Casalegno^{1,2}, Emilie Frobert^{1,2}, Vincent Moulès^{1,2}, Olivier Ferraris^{1,2}, Martine Valette^{1,2}, Vanessa Escuret^{1,2}, Bruno Lina^{1,2}.

¹ université de Lyon, F-69000 Lyon, France; université Lyon 1, CNRS, FRE 3011, Laboratoire de Virologie et Pathologie Humaine, Faculté de médecine RTH Laennec, F-69008 Lyon, France.

² CNR Influenza région Sud, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, 59 bvd Pinel, F-69677 Bron cedex, Lyon, France.

** these authors contributed equally to this work.*

Corresponding author:

Michèle Ottmann

CNRS FRE 3011, Laboratoire de Virologie et Pathologie Humaine

Faculté de médecine RTH Laennec

7-11 rue Guillaume Paradin

69372 Lyon cedex 08

Telephone: +33 478 77 10 85

Fax: +33 478 77 87 51

Email : michele.ottmann@univ-lyon1.fr

Keywords: H1N1, pandemic influenza, oseltamivir resistance

Word count Abstract: 243

Word count in Text: 1780

ABSTRACT

BACKGROUND: With the recent emergence of the novel A(H1N1)v virus in 2009, the main pandemic threat concerns the efficacy of available drugs such as neuraminidase inhibitors. Influenza viruses are known to be able to acquire resistance. In 2007, A(H1N1) viruses, related to A/Brisbane/59/2007 (H1N1), naturally resistant to oseltamivir emerged. Resistance to oseltamivir can be acquired either by mutation in the neuraminidase (NA) (H275Y in N1), or by reassortment with a mutated NA. It is therefore crucial to evaluate the possible risk of development of neuraminidase resistance in the novel A(H1N1)v virus. **METHODS:** We estimated the capacity of reassortment between the A(H1N1)v and a A(H1N1) Brisbane-like virus by *in vitro* co-infection of influenza-permissive cells using two different procedures. Genetic content of reassortant viruses were analysed by sequencing. **RESULTS:** Here we show that it was possible to obtain novel A(H1N1) viruses that acquired resistance to oseltamivir by reassortment. All the resistant viruses obtained had at least the NA segment originated from the A(H1N1) Brisbane-like virus. The replicating capacities of these viruses were measured, showing no difference as compared to the two parental strains, suggesting that genetic reassortment did not impair viral fitness. **CONCLUSIONS:** Our results suggest that the novel A(H1N1)v virus can acquire easily NA-inhibitor resistance by genetic reassortment with the A(H1N1) Brisbane-like virus. This finding emphasizes the need for

proper use of neuraminidase inhibitors and for an enhanced surveillance for such emergence especially in patients receiving NA inhibitors and presenting with clinical treatment failure.

INTRODUCTION

The emergence of the novel A(H1N1)v virus in Mexico triggered pandemic plans of both the WHO and individual countries [1,2]. Antiviral drugs (mainly oseltamivir) are a cornerstone for disease management until vaccines become available but there is concern that the new virus may become resistant to them. In 2007, an A(H1N1) virus naturally resistant to oseltamivir first emerged in Norway and then spread worldwide. This resistance was due to an H275Y mutation in the neuraminidase (NA) gene which has been detected in the human A/Brisbane/59/2007 (H1N1)-like viruses (abbreviated A(H1N1) Brisbane-like viruses) [3]. This naturally oseltamivir resistant virus, which can be seen today as a wild A(H1N1) strain was fitter than the corresponding non-resistant virus [4]. This was unexpected as similarly resistant A(H1N1) viruses circulating prior to the emergence of the Brisbane-like viruses were poorly fit [5,6]. Recent data suggest that the NA of the novel A(H1N1)v virus shares some common characteristics with the susceptible A(H1N1) Brisbane-like virus, including high substrate affinity [7].

As gene segment shuffle between viruses from the same subtype can occur frequently [8, 9], the co-circulation in some parts of the world of the novel A(H1N1) and the human A(H1N1) Brisbane-like virus may ultimately produce an oseltamivir-resistant virus by gene reassortment. However, reassortment between viruses of different lineage and/or origin may not be feasible, or eventually result in viruses of poor fitness and transmissibility [10]. Recently, this risk assessment was analysed with the avian A(H5N1) viruses. It demonstrated that, even when forced by using reverse genetics, this reassortment was not always possible [11]. Based on our experience, the reassortment using co-infection between A(H5N1) and

human A(H3N2) or A(H1N1) viruses was almost impossible to achieve (O Ferraris, B Lina, unpublished data), but here we can report that gene reassortment between the two A(H1N1) viruses is a frequent event during *in vitro* co-infections, and can lead to the emergence of fit resistant viruses.

METHODS

Viruses and Cells

The following A(H1N1) viruses were used: A/Lyon/969/2009 (H1N1)v, A/Lyon/1337/2007 (H1N1) Brisbane-like oseltamivir-resistant containing the H275Y mutation (Brisbane-like R), and A/Lyon/1364/2007 (H1N1) Brisbane-like oseltamivir sensitive (Brisbane-like S).

Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells (ATCC, CCL34) were maintained in Ultra-MDCK medium (Lonza, Levallois Perret, France) supplemented with penicillin/streptomycin (100 units/mL and 100 µg/mL respectively, Lonza), and 2 mM L-Glutamin (Lonza). Infections experiments were carried out in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, Lonza) supplemented with 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1 µg/mL acetylated trypsin (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and 1 µM oseltamivir carboxylate (kindly provided by Hoffmann-La Roche Ltd, Switzerland) defined as infection medium.

Co-infections assays

All experiments were carried out in duplicate. Two different procedures for infection were tested and are summarised in Figure 1.

- Procedure A: MDCK cells were first infected with A/Lyon/969/2009 (H1N1)v virus at multiplicity of infection (MOI) of 0.5 at 34°C. After 1 h, the supernatant was discarded and replaced by infection medium and cells were incubated at 34°C for 3 additional hours. The

cells were then infected with A/Lyon/1337/2007, at an MOI of 0.5 for 1 h, washed and incubated 18 h in infection medium.

- Procedure B: MDCK cells were simultaneously infected with the two viruses at a MOI of 0.1 for 1 h at 34°C in the infection medium without oseltamivir. After this infection period, the supernatant was discarded and replaced by a fresh infection medium and subsequently incubated at 34°C for 18 h.

For both procedures, after 18 h post infection, the supernatants were harvested and ten fold serially diluted in infection medium with 1 µg/mL of acetylated trypsin. Confluent MDCK cells were inoculated with these dilutions for 1 h at 34°C and then overlaid with EMEM containing 0.55% agarose, 1 µg/mL acetylated trypsin and 50 µM oseltamivir carboxylate. After 48 h at 34°C, the clones were harvested and diluted in order to infect confluent MDCK cells. The supernatant were harvested after 48 h of incubation at 34°C.

All recombinants experiments were conducted using biosafety Level 4 containment procedures (P4, Jean Merieux, INSERM, Lyon, France).

RT-PCR for HA and NA determination and M RT-qPCR

HA and NA gene screenings were carried out by using 3 RT-PCRs specifically targeting the HA of A(H1N1)v virus (A(H1N1)v RT-PCR), the HA of seasonal human A(H1N1) virus (A(H1N1)h RT-PCR) and a RT-PCR which specifically detects the H275Y mutation on the human NA segment [12].

Viral RNA was extracted from 140 µL of MDCK cell culture supernatant with the QIAmp virus RNA mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. The RT-PCRs were all performed on ABI 7500 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) platform, using SuperScript™III Platinum®One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). RT-PCRs were optimized with 0.8 µM each primer, 0.2 µM probe and 0.5 µL enzyme mix (primers and probes sequences are

available on request). After a reverse transcription reaction at 50°C for 15 min and a denaturation step at 95°C for 2 min, a two-step amplification of 50 cycles was performed at 95°C for 15 s and 60°C for 40 s.

A calibration range of diluted transcript ranging from 10^5 to 10 copies/5 μ L was used for the quantitative real-time RT-PCR targeting the M gene (M RT-qPCR).

Growth kinetics of viruses

The viral growth kinetics were subsequently assessed in duplicate *in vitro*. MDCK cells were infected with viruses at a MOI of 0.0001. After 1 h at 34°C, the cells were washed once and then placed in a fresh infection medium. To determine the virus yield, we harvested fluids from cultures at different intervals post infection, centrifuged them and determined the RNA load by quantitative real-time RT-PCR targeting the M gene (M RT-qPCR).

Sequencing

For full length sequencing, viral RNA was prepared from cell-free supernatant and sent to the PF8 sequencing platform (Institut Pasteur, Paris).

RESULTS

We tested the *in vitro* ability for the novel A(H1N1) virus to become resistant to oseltamivir by reassortment with the human A(H1N1) Brisbane-like virus on MDCK cells by two ways (Figure 1). The aim of each co-infection experiments was to obtain reassortant viruses carrying the HA segment of A/Lyon/969/2009 (H1N1)v and the oseltamivir resistant NA segment (275Y) of A/Lyon/1337/2007 (H1N1). When the co-infections were performed, we observed that all experiments yielded virus growth. For the detection of reassortant viruses, 50 resistant clones were picked up for both experiments : 33 from Procedure A, and 17 from Procedure B. Positive RT-PCR signals for Brisbane-like viruses H275Y and novel A(H1N1)v HA segments were detected for 27 clones suggesting a mixed viral populations. Among the

23 remaining clones, 21 contained the HA segment from A(H1N1) Brisbane-like virus and were not selected. Two clones named R16 and R28 from co-infection procedure A were reassortant viruses harbouring the novel A(H1N1)v HA segment and the NA from the A(H1N1) Brisbane-like virus 275Y. Analysis of their segment contents by full sequencing of the viruses confirmed that clones R16 and R28 contained the NA originating from the A(H1N1) Brisbane-like H275Y parent strain. The R16 clone harboured a complete A(H1N1)v internal gene constellation whereas the R28 clone contained the internal gene of the nucleoprotein (NP) originated from the A(H1N1) Brisbane-like virus (Figure 1). No selection of a spontaneous H275Y mutant derived from the novel A(H1N1)v could be detected. The viral growth kinetics were performed on the two parental strains : A/Lyon/969/2009 (H1N1)v, A/Lyon/1337/2007 (H1N1) Brisbane-like oseltamivir-resistant containing the H275Y mutation (Brisbane-like R), on A/Lyon/1364/2007 (H1N1) Brisbane-like oseltamivir sensitive (Brisbane-like S), and on both reassortant viruses detected i.e. R16 and R28 clones. Overall, the *in vitro* viral fitness of the reassortant viruses was similar to the two parental strains and to the Brisbane-like virus strain sensitive to oseltamivir (Figure 2). Neither the incorporation of the NA gene from the A(H1N1) Brisbane-like H275Y , nor the Brisbane-like NP segment for the R28 clone impaired the replication capacity of the reassortant viruses.

DISCUSSION

Our results obtained by *in vitro* co-infection experiments confirm that genetic reassortment between circulating A(H1N1) viruses may result in the emergence of stable oseltamivir-resistant novel A(H1N1)v virus that contains the NA gene from an oseltamivir resistant A(H1N1) Brisbane-like H275Y virus. Moreover, we demonstrated that those oseltamivir resistant viruses were as fit as the wild-type parental strains *in vitro*. The incorporation of the Brisbane-like NP segment in the R28 reassortant clone did not impair its viral fitness

contrarily to what could be expected with a human NP in a genetic background from another species [11]. What is striking is that the gene shuffling between the two A(H1N1) viruses appeared much easier and therefore likely in the *in vitro* experiment than expected. If we compare our numerous attempts to obtain such genetic exchange between A(H5N1) and the human viruses, reassortment was detected in less than 1 % of the co-infection performed with similar conditions. On the other hand, no resistant virus by simple mutation has been detected. Our results emphasize the need for a reinforced surveillance of the emergence of such resistant strains. This surveillance should be carried out thoroughly, especially when suboptimal doses of oseltamivir are used. The two A(H1N1) viruses share some common features, like a high affinity and activity of their neuraminidases [7]. This characteristic may be a facilitating factor for gene exchange between the two strains despite it was not observed yet *in vivo*. The only published study [13] reported that in ferrets at least A(H1N1)v viruses seems to overcome A(H1N1) Brisbane like viruses despite some bias in the experiment (only two co-infected ferrets with, in addition, preexisting antibodies). Moreover this study was not designed specifically to observed the emergence of such recombinants viruses and therefore this event can not be rule out.

Overall, we demonstrated the capacity for the novel A(H1N1) virus to acquire oseltamivir resistance by genetic exchanges with the seasonal human A(H1N1). Hence, susceptibility of the novel A(H1N1)v to oseltamivir can be limited in time if the co-circulation of both A(H1N1) lineages is maintained, and if it results in genetic reassortment. This virus keeps on being detected by surveillance networks in both southern and northern hemisphere. Co-infections can therefore occur. The seasonal vaccine should have an interest, at first, by reducing the human co-infection probability and therefore emergence of recombinant viruses, second, this vaccine may limit the recombinant virus diffusion by immunological pressure on the Brisbane-like Neuraminidase. Therefore, oseltamivir should be used appropriately, and

197 alternative therapeutic strategies should be proposed, including combined antiviral therapy, or
198 prioritizing the use of other antivirals to keep the oseltamivir efficient until the complete
199 disappearance of the human A(H1N1) Brisbane like virus [14]. However, the genetic content
200 of the reassortant strains may have some impact on the *in vivo* fitness of the viruses this will
201 be further investigated on animal model and as it was studied for the parental A(H1N1)v virus
202 [13, 15, 16].

203

204

205 REFERENCES

- 206 1. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin
207 H1N1 influenza virus. *Nature* 2009; **459**:931-939.
- 208 2. Dawood FS, Jain S, Finelli L, *et al.* Emergence of a novel swine-origin influenza A
209 (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med* 2009; **360**:2605-2615.
- 210 3. Meijer A, Lackenby A, Hungnes O, *et al.* Oseltamivir-resistant influenza virus A
211 (H1N1), Europe, 2007-08 season. *Emerg Infect Dis* 2009; **15**:552-560.
- 212 4. Rameix-Welti M.A, Enouf V, Cuvelier F, Jeannin P, van der Werf S. Enzymatic
213 properties of the neuraminidase of seasonal H1N1 influenza viruses provide insights for the
214 emergence of natural resistance to oseltamivir. *PLoS Pathog* 2008; **4**:e1000103.
- 215 5. Ives JA, Carr JA, Mendel DB, *et al.* The H274Y mutation in the influenza A/H1N1
216 neuraminidase active site following oseltamivir phosphate treatment leave virus severely
217 compromised both in vitro and in vivo. *Antiviral Res* 2002; **55**:307-317.
- 218 6. Herlocher ML, Truscon R, Elias S , *et al.* Influenza viruses resistant to the antiviral
219 drug oseltamivir: transmission studies in ferrets. *J Infect Dis* 2004; **190**:1627-1630.
- 220 7. Casalegno JS, Escuret V, Ferraris O, Lina B. Enzymatic evolution of the
221 neuraminidase of influenza A(H1N1) viruses from 1977 to 2009: the edge of a new natural
222 resistance emergence? (Submitted).
- 223 8. Nelson MI, Viboud C, Simonsen L, *et al.* Multiple reassortment events in the
224 evolutionary history of H1N1 influenza A virus since 1918. *PLoS Pathog* 2008; **4**:e1000012.
- 225 9. Schweiger B, Bruns L, Meixenberger K. Reassortment between human A(H3N2)
226 viruses is an important evolutionary mechanism. *Vaccine* 2006; **24**:6683-6690.
- 227 10. Maines TR, Chen LM, Matsuoka Y, *et al.* Lack of transmission of H5N1 avian-human
228 reassortant influenza viruses in a ferret model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**:12121-
229 12126.

- 230 11. Chen LM, Davis CT, Zhou H, Cox NJ, Donis RO. Genetic compatibility and virulence
231 of reassortants derived from contemporary avian H5N1 and human H3N2 influenza A
232 viruses. *PLoS Pathog* 2008; **4**:e1000072.
- 233 12. Carr MJ, Sayre N, Duffy M, Connell J, Hall WW. Rapid molecular detection of the
234 H275Y oseltamivir resistance gene mutation in circulating influenza A (H1N1) viruses. *J*
235 *Virol Methods* 2008; **153**:257-262.
- 236 13. Perez D, Sorrell E, Angel M, , *et al.* Fitness of Pandemic H1N1 and Seasonal
237 influenza A viruses during Co-infection: Evidence of competitive advantage of pandemic
238 H1N1 influenza versus seasonal influenza. Version 2. *PLoS Currents: Influenza*. 2009; Aug
239 25 [revised 2009 Aug 27]:RRN1011.
- 240 14. Wu JT, Leung GM, Lipsitch M, Cooper BS, Riley S. Hedging against antiviral
241 resistance during the next influenza pandemic using small stockpiles of an alternative
242 chemotherapy. *PLoS Med* 2009; **6**:e1000085.
- 243 15. Munster VJ, de Wit E, van den Brand JM, *et al.* Pathogenesis and Transmission of
244 Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Virus in Ferrets. *Science* 2009; **325**:481-483.
- 245 16. Itoh Y, Shinya K, Kiso M, *et al.* In vitro and in vivo characterization of new swine-
246 origin H1N1 influenza viruses. *Nature*. 2009 Aug 20;460(7258):1021-5

247

248 **ACKNOWLEDGMENTS**

249 The authors want to thank David Mc Avoy for english proof-reading, Reda Ihsani (Hospices
250 Civils de Lyon) and Stéphane Mely (P4, Jean Mérieux, INSERM) for technical support and
251 the “Plateforme Génomique des Pathogènes et Santé Publique” (Institut Pasteur) for the
252 sequencing.

253 This work was supported by the FONDAVA program of the Institut de Microbiologie et des
254 Maladies Infectieuses.

255 **Conflicts of interest**

256 The authors have no conflicts of interest or competing financial interests with regards to
257 content of this manuscript.

258 **Author Contributions**

259 M.B.D., O.F., M.O. and B.L. designed, conducted the research and wrote the manuscript.
260 O.F., M.O. and E.F. performed BSL4 experiments. J.S.C. and V.E. performed enzymatic
261 experiments. V.E., E.F., V.M. and M.V. contributed to data interpretation. V.E., E.F., and
262 J.S.C. assisted with manuscript preparation.

263

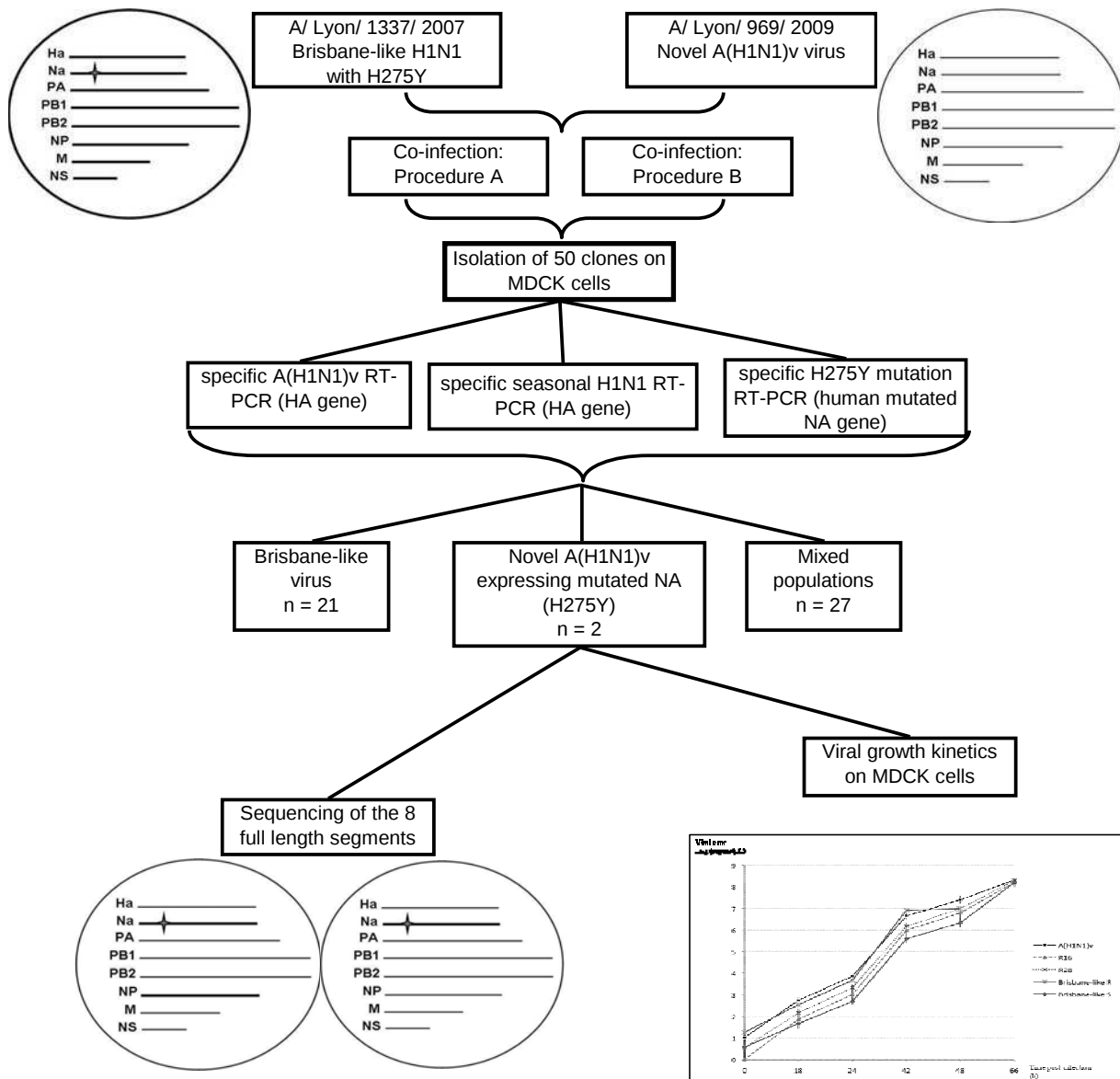
264

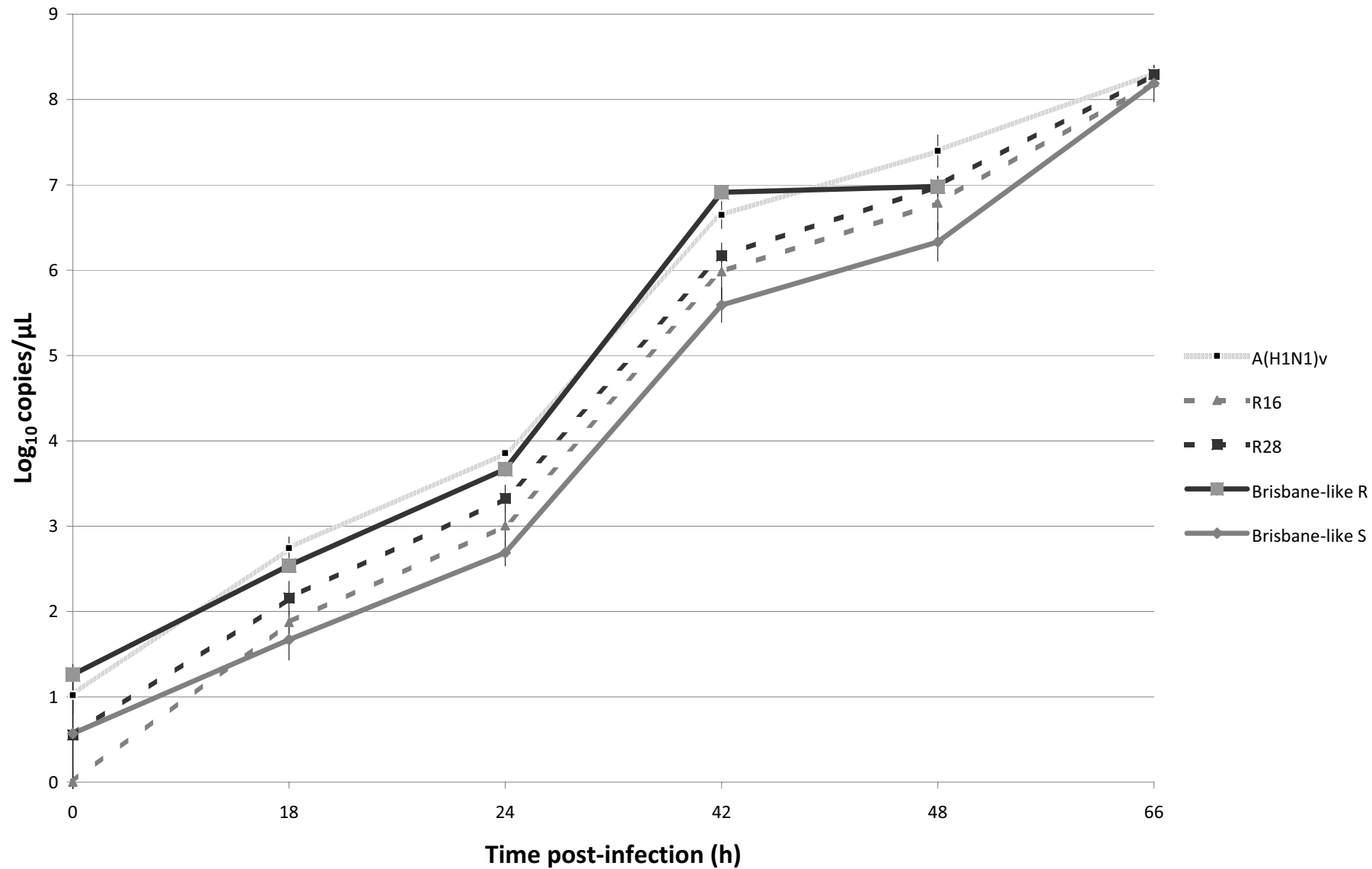
LEGEND OF FIGURES

Figure 1 : Study design and results of co-infection experiments. Procedures are detailed in Methods.

Figure 2 : Kinetics of viral growth in MDCK cells of parental A(H1N1) viruses and R16 and R28 clones harbouring the A(H1N1) Brisbane-like virus H275Y NA segment.

MDCK cells were infected with an oseltamivir-resistant A(H1N1) Brisbane-like virus (Brisbane-like R) : A/LYON/1337/2007, a novel A(H1N1)v virus: A/Lyon/969/2009, an oseltamivir-sensitive A(H1N1) Brisbane-like virus (Brisbane-like S) : A/LYON/1364/2007 and with the reassortant viruses R16 and R28 at a MOI of 0.0001. Culture cells supernatant were harvested at 5 indicated times and titrated by quantitative real-time RT-PCR (M RT-qPCR). Results are expressed as the mean of two kinetic experiments.





1.1.1. Introduction

Notre étude s'inscrit dans le contexte de l'émergence et de la diffusion dans le monde entier du virus A(H1N1)2009 et du problème de santé publique que représenterait l'émergence d'une résistance à l'oseltamivir chez ce virus pandémique. En 2007, il a été rapporté l'émergence d'un virus A(H1N1) humain, apparenté au virus A/Brisbane/59/2007 naturellement résistant à l'oseltamivir, en Norvège, dans un premier temps, puis sur toute la planète ensuite. Cette résistance a ensuite été associée à la mutation H275Y/ H274Y au niveau de la NA de ces virus. Le virus A(H1N1) H275Y résistant représentait, jusqu'en 2009, le sous-type A(H1N1) humain circulant. La diffusion extraordinaire de ce virus muté s'expliquerait par le fait que la mutation H275Y conférerait au virus un meilleur « fitness » par rapport au virus non muté ¹²⁰ en rétablissant une affinité normale de la NA pour son substrat (acide sialique). Cette mutation lui aurait donc apporté un avantage sélectif. Récemment, nous avons observé que la NA des virus A(H1N1)2009 avait quelques caractéristiques communes avec celle des virus apparentés à la souche Brisbane-like sensible à l'oseltamivir avec, entre autres, une affinité très forte pour son substrat (Casalegno J.S. Lina B., données non publiées). Les propriétés de la NA et la forte circulation potentielle de ces deux virus, nous a incité à nous poser la question de la possibilité de voir le virus pandémique acquérir, par réassortiment génétique, la NA mutée des virus résistants apparentés à la souche Brisbane.

Pour cela nous avons développé un protocole de co-infection virale sur MDCK permettant de provoquer le réassortiment génétique entre une souche de virus pandémique (A/Lyon/969/2009) et une souche de virus A(H1N1) apparenté Brisbane possédant la mutation H275Y (A/Lyon/1337/2007) donc résistante à l'oseltamivir. Puis nous avons mis en place une stratégie de criblage des clones viraux obtenus. Dans un second temps, nous avons essayé de caractériser les virus réassortants que nous avons obtenus en déterminant leur composition génétique et en comparant leur capacités répliquatives.

1.1.2. Protocole d'obtention de virus réassortants

Etant donné le risque associé à la réalisation d'un virus pandémique résistant à l'oseltamivir, toutes les manipulations ont été réalisées en laboratoire P4 (P4, Jean Mérieux, INSERM, Lyon). Nous avons développé deux protocoles différents de co-infection virale permettant l'infection simultanée ou différée d'une même cellule par deux souches de virus influenza différentes. La co-infection a été facilitée par la présence d'oseltamivir. En effet, l'infection de la cellule par un premier virus entraîne l'expression de ses NA à la surface cellulaire afin de cliver toute liaison HA-acide sialique appartenant à un second virus. Ce mécanisme permet d'empêcher toute infection par un second virus^{112,113}.

Chacune des deux procédures de co-infection virale a permis d'obtenir des virus réassortants dont 50 d'entre eux ont été analysés, afin de détecter les virus possédant la HA H1 du virus pandémique et la NA N1 mutée H275Y du virus A(H1N1) résistant à l'oseltamivir.

1.1.3. Résultat du criblage des virus réassortants

A l'issue des deux procédures de co-infection virale, les virus produits ont été isolés par plaque de lyse dans le but d'analyser des clones contenant une seule population de virus. Etant donné l'objectif principal de l'étude nous avons réalisé le criblage des 50 virus isolés en utilisant trois RT-PCR, l'une ciblant spécifiquement la HA H1 du virus pandémique A(H1N1)2009, l'autre la HA H1 du virus saisonnier A(H1N1) apparenté Brisbane et la troisième, la NA porteuse de la mutation H275Y.

Dans un premier temps nous avons réalisé les RT-PCR de criblage des HA et nous avons détecté 27 virus, isolés par plaque de lyse, positifs pour les deux RT-PCR suggérant qu'ils étaient constitués d'un mélange de deux populations virales. Parmi les 23 clones purs, 21 possédaient une HA de type H1 Brisbane-like et deux clones, R16 et R28, avaient aussi une NA mutée H275Y. Le génome de ces deux virus réassortants a ensuite été séquencé et nous avons confirmé qu'ils possédaient la HA du virus A(H1N1)2009, la NA mutée H275Y du virus Brisbane-like et une constellation de gènes internes issue du virus A(H1N1)2009 sauf R28 qui avait le segment NP du virus A(H1N1) apparenté Brisbane résistant (Tableau 10). Aucune mutation spontanée H275Y n'a été détectée chez les virus arborant une NA issue du virus A(H1N1)2009.

Tableau 10: constellation de gènes des virus réassortants R16 et R28 produits par co-infection virale entre les virus A(H1N1)2009 et A(H1N1) résistant à l'oseltamivir.

		Nom du virus réassortant	
		R16	R28
Origine virale des segments des virus réassortants	PB1	A(H1N1)2009	A(H1N1)2009
	PB2	A(H1N1)2009	A(H1N1)2009
	PA	A(H1N1)2009	A(H1N1)2009
	HA	A(H1N1)2009	A(H1N1)2009
	NP	A(H1N1)2009	Brisb-R
	NA	Brisb-R	Brisb-R
	M	A(H1N1)2009	A(H1N1)2009
	NS	A(H1N1)2009	A(H1N1)2009

Origine de chacun des 8 segments des virus R16 et R28, obtenus par réassortiment génétique après co-infection virale entre les virus A(H1N1)2009 pandémique [A(H1N1)2009] et le virus A/Lyon/1337/2007 apparenté au virus Brisbane, résistant à l'oseltamivir [Brisb-R] (Bouscambert et al, 2010). Ce virus possède une NA mutée en H275Y. L'origine de chaque segment de gène a été déterminée par séquençage complet du gène.

1.1.4. Capacités répliquatives des virus réassortants

Afin de vérifier si le fait d'acquérir une NA mutée modifiait le fitness *in vitro* des virus, les cinétiques de croissance virale des virus réassortants R16 et R28 et des virus parents, A/Lyon/969/2009 (virus pandémique) et A/Lyon/1337/2007 (virus apparenté Brisbane résistant à l'oseltamivir) ainsi que du virus A/Lyon/1364/2007 (virus apparenté Brisbane sensible à l'oseltamivir) ont été réalisées sur MDCK.

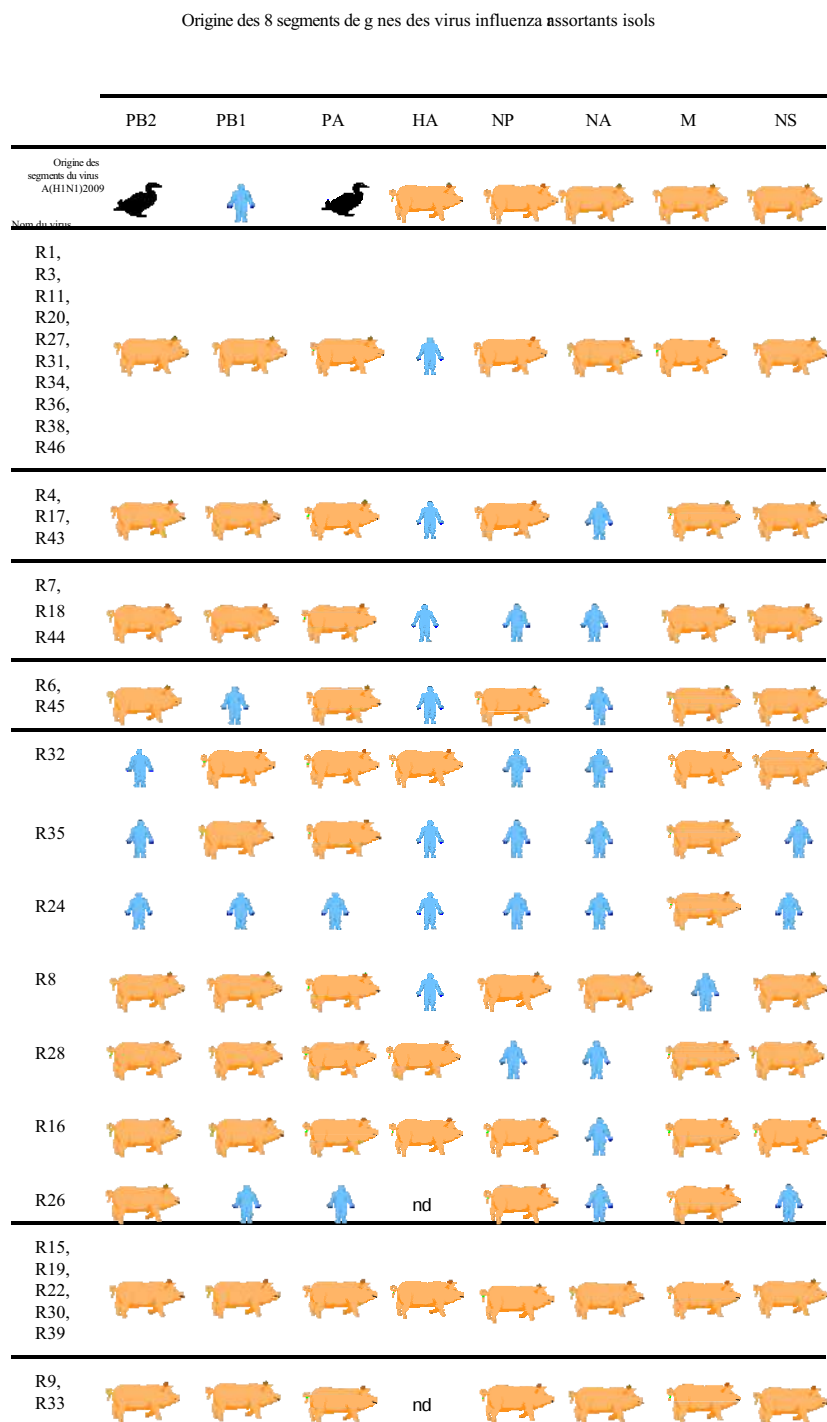
Nous avons montré que ni l'introduction d'une NA d'origine différente H275Y, ni celle d'un segment NP d'origine différente ne modifiaient les capacités répliquatives du virus A(H1N1)2009 (*publication 2, Figure 1*).

1.1.5. Résultats complémentaires : criblage complet des virus réassortants

A l'issue du premier criblage par RT-PCR, nous avons sélectionné les deux virus réassortants possédant la H1 du virus pandémique et la N1 H275Y (R16 et R28). Nous avons, dans un deuxième temps, séquencé le génome complet des autres virus obtenus par plaque de lyse, afin de déterminer si il existait une constellation préférentielle des gènes internes et de sélectionner des virus réassortants dont la composition suggérait une modification de virulence ou de capacités répliquatives (Figure 12). Le virus A(H1N1)2009 est un triple réassortant dont les segments sont d'origines diverses (humaine, aviaire et porcine) ¹⁴ mais pour plus de lisibilité nous avons fait le choix de le représenter par un porc.

Au total nous avons obtenu les séquences de 32 virus et 78% (25/32) de ces virus ont présenté une composition mixte issue des deux virus parentaux (Figure 12). Une constellation majoritaire a été identifiée car 40% de ces virus (10/25) possédaient un fond génétique issu du virus A(H1N1)2009 et une HA d'origine humaine alors que seul un virus possédaient une NA d'origine humaine isolée. Trois virus ont présenté un fond génétique « porcin » avec le couple HA-NA humain seul. Parmi les 8 virus possédant le couple HA-NA humain et un ou plusieurs autres gènes d'origine humaine, 2 virus avaient le segment PB1 humain seul associé, 1 virus avait le segment PB2 humain seul et 3 virus avaient le segment NP humain seul. Enfin, seul un virus possédait le fond génétique complet d'origine humaine avec le segment M d'origine porcine (R24). Ces résultats indiquent que le réassortiment entre ces deux virus est possible et le séquençage complet de 25 clones a mis en évidence une constellation préférentielle (fond génétique d'origine porcine exprimant une HA d'origine humaine).

Figure 12 : constellation des gènes internes des virus réassortants produits par co-infection virale entre les virus A(H1N1)2009 et A(H1N1) Brisbane résistants à l’oseltamivir.



L’origine de chaque segment interne a été déterminée par séquençage des 8 segments des clones de virus réassortants obtenus par co-infection virale entre les virus A(H1N1)2009 [A/Lyon/969/2009] () et un virus A(H1N1) apparenté au virus Brisbane résistant à l’oseltamivir [A/ Lyon/ 1337/ 2007] (). nd : séquence non déterminée.

1.2. Etude du réassortiment génétique entre les virus influenza A(H5N1) et A(H1N1)2009

1.2.1. Introduction

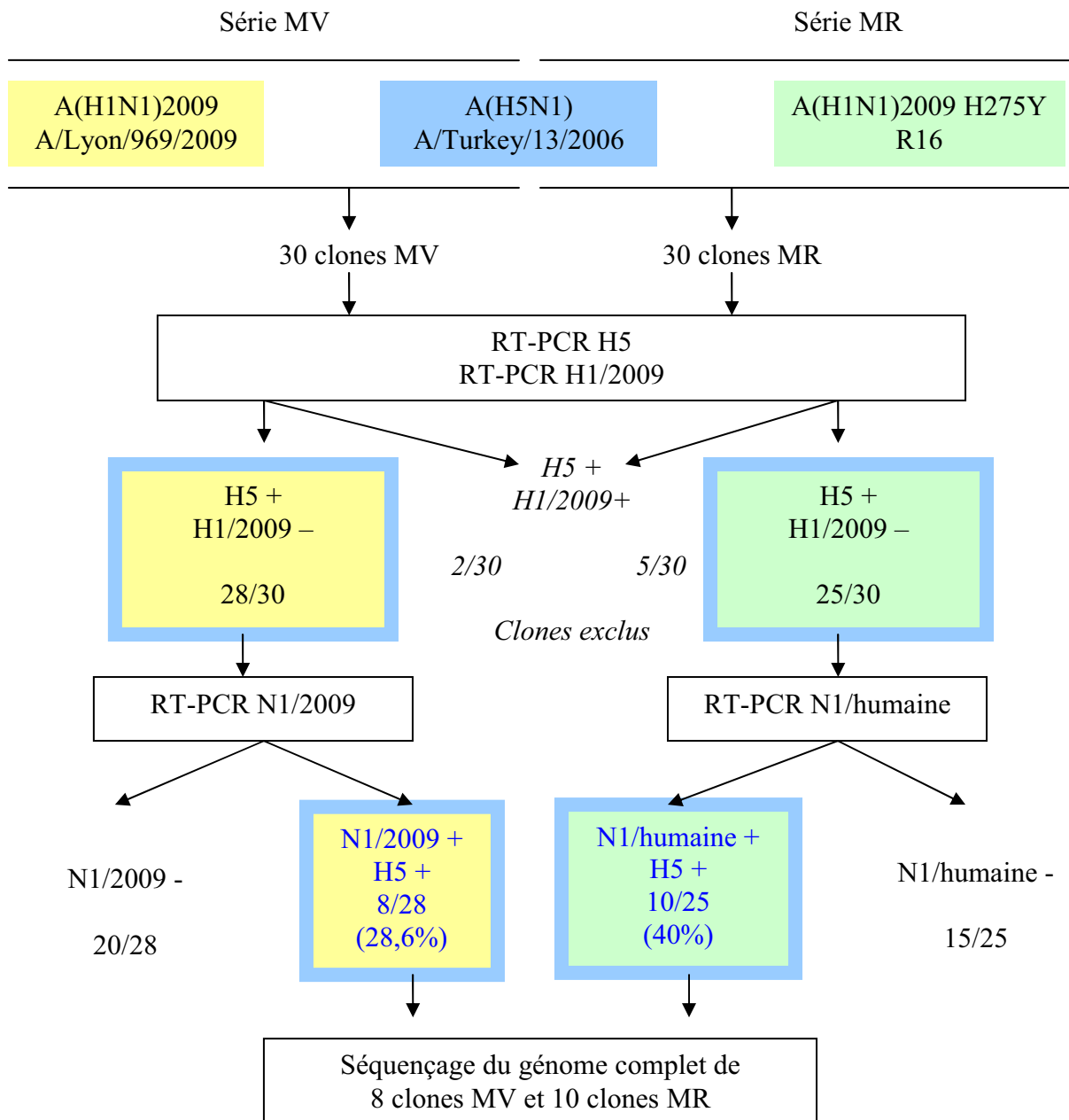
Dans le contexte pandémique associé à une très forte circulation du virus A(H1N1)2009, hautement transmissible, la menace d'un réassortiment avec le virus A(H5N1) est réelle puisque théoriquement ce virus réassortant pourrait avoir une virulence plus importante et deviendrait transmissible d'homme à homme. Nous savons que, pour des raisons non encore élucidées, toutes les combinaisons de gènes ne peuvent exister. Nous nous sommes donc demandés si des réassortiments entre le virus pandémique et le virus A(H5N1) d'une part et le virus A(H5N1) et un virus A(H1N1)2009 résistant à l'oseltamivir d'autre part était possible et qu'elles étaient les constellations de gènes observées.

1.2.2. Obtention des virus réassortants et résultats du criblage

Deux séries de co-infections virales ont été réalisées. La série MV correspond à la co-infection de MDCK par les virus A(H1N1)2009 [A/Lyon/969/2009] et A(H5N1) [A/Turkey/13/2006]. La série MR correspond à la co-infection de MDCK par le virus A(H5N1) [A/Turkey/13/2006] et le clone R16 [A(H1N1)2009 muté H275Y] obtenus dans l'étude précédente par co-infection virale A(H1N1)2009-A(H1N1) apparenté Brisbane muté H275Y (Bouscambert-Duchamp *et al.* Antivir Ther. 2010) (Figure 13).

A l'issu des essais de co-infections virales réalisées selon le protocole décrit précédemment, nous avons sélectionné 30 clones pour la série MV et 30 clones pour la série MR. Les 60 clones ont été analysés par RT-PCR H5, permettant la détection spécifique de la HA du virus A(H5N1) et par RT-PCR H1/2009, permettant la détection spécifique de la HA du virus A(H1N1)2009 (Figure 13).

Figure 13 : stratégie de criblage des virus réassortants obtenus par co-infections virales entre les virus A(H5N1) et A(H1N1)2009 sauvage et résistant à l'oseltamivir (H275Y).



Des cellules MDCK ont été inoculées selon la procédure précédemment décrite (Bouscambert-Duchamp *et al.* 2010) afin d'étudier le réassortiment génétique du virus influenza A(H5N1) et du virus pandémique A(H1N1)2009 (Série MV) ou du virus A(H1N1)2009 muté H275Y (résistant à l'oseltamivir) (Série MR). Trente clones par série ont été sélectionnés et analysés en RT-PCR spécifiques de détection des HA de sous-types H5 et H1/2009 puis de détection des NA de sous-types N1/2009 ou N1/humaine. A l'issue de ce criblage, le séquençage complet des 8 segments des virus réassortants MV (H5+ et N1/2009 +) ainsi que des virus MR (H5+ et N1/humaine +) a été réalisé.

Dans la série MV, 100% des clones étaient positifs en RT-PCR spécifique H5 et 28 sur 30 clones étaient négatifs en H1/2009. Ces clones ont été sélectionnés car ils ne possédaient qu'une seule population virale. Ils ont ensuite été analysés en RT-PCR N1/2009 de détection spécifique de la NA du virus A(H1N1)2009. Parmi ces clones, 28,6% possédaient une NA issue du virus A(H1N1)2009 (8/28) et ils ont été envoyés à l'Institut Pasteur (Plateforme de génotypage PF8) pour un séquençage complet des 8 segments de gènes.

Dans la série MR, la co-infection entre les virus A(H5N1) [A/Turkey/13/2006] et le virus influenza réassortant R16 [A(H1N1)2009 ayant une NA mutée H275Y] nous a permis d'obtenir 30 clones qui ont été analysés, selon le même schéma que la série MV (Figure 13). A l'issue du premier criblage, 25 clones positifs en RT-PCR H5 et négatifs en RT-PCR N1/2009 ont été analysés en RT-PCR spécifique de détection des NA de sous-type humain saisonnier afin de détecter la présence d'une NA apparentée au virus Brisbane. Au final, la co-infection virale a permis d'obtenir 40% (10/25) de virus influenza réassortants possédant une HA de sous-type H5 et une NA apparentée Brisbane mutée H275Y donc résistante à l'oseltamivir. Les 8 segments de ces 10 clones ont été séquencés. Les 35 clones positifs en RT-PCR H5 mais négatifs en RT-PCR N1/2009 (n=20) ou en RT-PCR N1/humaine (n=15) ont été exclus pour ce projet (Figure 13).

1.2.3. Séquençage complet du génome des virus réassortants

Le séquençage complet des 8 segments de gène des virus réassortants a été possible pour les 8 clones MV et pour 8 des 10 clones MR (Figure 13). Pour 2 des 10 clones MR le séquençage de la NA n'a pu être réalisé.

Suite à la co-infection virale de MDCK par un virus A(H5N1) et le virus pandémique A(H1N1)2009, nous avons sélectionné 30 clones dont la criblage par RT-PCR a fait apparaître 8 clones possédant une HA de sous-type H5 et une NA de sous-type N1/2009. Le séquençage des 8 segments de gène, dont celui des glycoprotéines de surface a, de façon surprenante, révélé que seul un virus réassortant MV15, avait la composition HA-NA souhaitée (Figure 14). Ce résultat met en avant un problème de réaction croisée de la RT-PCR N1/2009. En effet, il apparaît que cette RT-PCR était capable de détecter les N1 d'origine aviaire. L'analyse de la nature des gènes internes n'a pas fait apparaître de constellation majoritaire.

Hormis trois virus, qui sont des virus A(H5N1) sauvages (MV6, MV26 et MV27), les 5 autres ont un fond génétique majoritairement d'origine aviaire. Ces résultats montrent que les segments M, NS, PA et PB1 issus du virus A(H1N1)2009 peuvent s'intégrer sur un fond génétique aviaire (Figure 14). Le virus MV15 est un virus aviaire qui présente des segments NA et M porcins. Mis à part ces deux segments, ce virus possède donc les segments NS, PB2, PB1 et HA, c'est-à-dire, tous les facteurs de virulence identifiés du virus A(H5N1) : NS1, PB2, PB1-F2 et HA (Tableau 3).

Dans la série MR, co-infection virale de MDCK par un virus A(H5N1) et le virus pandémique A(H1N1)2009 possédant une NA mutée H275Y résistant à l'oseltamivir, nous avons sélectionné 30 clones dont la criblage par RT-PCR a fait apparaître 10 clones, possédant une HA de sous-type H5 et une NA de sous-type N1/humaine mutée. Le séquençage des 10 segments de gène, dont celui des glycoprotéines de surface, a comme précédemment révélé que seul un virus réassortant MR31, avait la composition HA-NA souhaitée (Figure 15). Aucune constellation majoritaire n'a été mise en évidence. Hormis trois virus qui sont des virus A(H5N1) sauvages (MR1, MR4 et MR11), les 5 autres ont un fond génétique majoritairement d'origine aviaire. Ces résultats confirment que les segments M, NS, PA et

PB1 mais aussi PB2, issus du virus A(H1N1)2009, peuvent s'intégrer sur un fond génétique aviaire (Figure 15).

Au final, après co-infection virale nous retrouvons du virus A(H5N1) sauvage dans 82% (23/28) des clones de la série MV et 72% (18/25) des clones de la série MR. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de lien entre la composition du génome des virus réassortants et la taille des plages de lyse qui traduisent les capacités répliquatives des virus.

Figure 14 : constellation des gènes internes des virus réassortants produits par co-infection virale entre les virus A(H5N1) et A(H1N1)2009 (série MV).

Virus réassortants	Origine des 8 segments de gène								Taille des plages de lyse
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	
MV15									G
MV18									G
MV19									G
MV25									P
MV3									P
MV6									P
MV26									P
MV27									P

L'origine de chaque segment interne a été déterminée par séquençage des 8 segments des clones de virus réassortants obtenus par co-infection virale entre les virus A(H1N1)2009 [A/Lyon/969/2009] () et un virus A(H5N1) [A/ Turkey/ 13/ 2006] (). Les tailles des plages de lyse ont été notées avant la récolte de chaque clone et sont rapportées : grande (G) ou petite (P).

Figure 15: constellation des gènes internes des virus réassortants produits par co-infection virale entre les virus A(H5N1) et le virus réassortant R16 [A(H1N1)2009 H275Y résistant à l'oseltamivir] (série MR).

Virus réassortants	Origine des 8 segments de gène								Taille des plages de lyse
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	
MR31									G
MR35									G
MR25									G
MR13									P
MR28									G
MR1,MR4,MR11									P
MR12						nd			P
MR2						nd			P

L'origine de chaque segment interne a été déterminée par séquençage des 8 segments des clones de virus réassortants obtenus par co-infection virale entre les virus A(H5N1) [A/Turkey/ 13/ 2006] () et le virus influenza réassortant R16 possédant une HA de sous-type H1/2009 () , une NA de sous-type N1/humaine H275Y () et des segments internes d'origine A(H1N1)2009 () . Les tailles des plages de lyse ont été notées avant la récolte de chaque clone et sont rapportées : grande (G) ou petite (P).

2. Génétique inverse : étude du réassortiment génétique entre des virus d'origines et de sous-types différents

2.1. Introduction

Notre étude sur le réassortiment génétique entre virus d'origines différentes, avait pour objectif principal de déterminer si un virus humain saisonnier, donc circulant dans la population humaine, pouvait acquérir par réassortiment génétique, un ou plusieurs segments de gènes appartenant à un virus A(H5N1). Les objectifs secondaires étaient d'évaluer s'il pouvait exister des constellations privilégiées d'une part, et quelle serait la virulence de ces virus, d'autre part. Parce que nous avons l'obligation de réaliser la production de virus réassortants A(H3N2)/A(H5N1) en laboratoire L4, après obtention d'un agrément pour la production d'Organisme Génétiquement Modifiés, nous avons réalisé un travail préliminaire sur le réassortiment génétique d'un virus aviaire faiblement pathogène A(H5N2) et d'un virus humain circulant A(H3N2) en laboratoire L3 (Figure 16).

Pour cela nous avons produit les 3 systèmes de génétique inverse suivants : A(H5N2) A/Finch/England/2051/2002, A(H3N2) A/Moscow/10/99 et A(H5N1) A/Vietnam/2051/2004. Dans un second temps, après l'analyse de l'étude de Chen *et al.*⁴, nous avons voulu étudier plus précisément la compatibilité de certains segments de gènes, entre virus humains et aviaires A(H5N1), et avons réalisé en laboratoire L4, un certain nombre de constructions (Figure 17). Les résultats sont présentés dans ce manuscrit et une publication est en cours de préparation.

2.2. Etude du réassortiment génétique entre les virus influenza A(H5N2) aviaire et A(H3N2) humain

Nous avons, dans un premier temps réalisé 9 constructions visant à introduire un ou plusieurs segments du virus aviaire faiblement pathogène A(H5N2) sur un fond génétique humain, A(H3N2). Après transfection des 8 clones de génétique inverse choisis, dans des cellules 293T, les virus produits étaient amplifiés sur MDCK et la présence de virus était détectée par la réalisation d'un test d'héماغglutination (Figure 16).

Nous montrons que les systèmes complets de génétique inverse pour les virus A(H5N2) et A(H3N2) étaient fonctionnels, et permettaient de reproduire *in vitro* les virus parentaux. Si l'on s'intéresse aux constellations de gènes compatibles, c'est-à-dire, permettant de produire un virus influenza capable de se répliquer, nous rapportons que l'introduction du couple H5-N2 d'origine aviaire et l'un des segments PA (construction A), PB1 (construction H) ou PB2 (construction C) du complexe polymérase sur fond humain sont possibles.

L'introduction du trio PA-PB1-PB2 seul, sans le couple HA-NA (construction F) de même origine, ne semble pas compatible et ne permet pas de produire, dans nos conditions, du virus infectieux. Par ailleurs, de façon intéressante, si le segment NP d'origine aviaire est associé au trio PA-PB1-PB2 aviaire (construction G) et reconstitue ainsi un complexe polymérase strictement aviaire, il est possible de produire du virus influenza, mettant en évidence l'importance de la compatibilité de gène au sein du complexe polymérase, pour la production d'un virus infectieux.

Enfin, nous avons observé qu'en présence du couple H5-N2 aviaire, le fond génétique humain acceptait le segment NS d'origine aviaire (construction E). Les résultats obtenus sur la compatibilité du couple H5-N2 aviaire sur fond génétique humain, lorsqu'il est associé respectivement aux segments PA (construction A), PB1 (construction H) et PB2 (construction C) et NP (construction D) sous-entend que l'introduction du couple H5-N2 d'origine aviaire seul (construction non testée) devrait être possible.

Figure 16 : étude de la compatibilité des gènes internes constituant des virus réassortants produits par génétique inverse entre le virus aviaire A(H5N2) et le virus humain A(H3N2).

Virus réassortants	Origine des 8 segments de gène								Production de virus
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	
B									+
I									+
A									+
H									+
C									+
D									+
F									-
G									+
E									-

L'origine de chaque segment interne a été déterminée par séquençage des 8 segments des clones de virus réassortants obtenus par génétique inverse en utilisant les systèmes A(H5N2) [A/Finch/ England/2051/2002] () et A(H3N2) [A/ Moscou/ 10/ 1999] (). Après transfection des 8 clones de génétique inverse choisis dans des cellules 293T, le virus produit est amplifié sur MDCK et la présence (+) ou l'absence (-) de virus est mise en évidence par un test d'hémagglutination.

2.3. Etude du réassortiment génétique entre les virus influenza A(H5N1) aviaire et A(H3N2) humain

A l'issu de ce travail préliminaire, une analyse systématique complète a été publiée par Chen *et al.*. Ils ont produit par génétique inverse, 63 combinaisons de virus réassortants à partir d'un virus A(H5N1) [A/Thailand/16/2004] et d'un virus A(H3N2) [A/Wyoming/3/2003]. L'analyse de cette étude nous a permis d'abandonner l'approche systématique que nous avions envisagée, pour réaliser les constructions pour lesquelles Chen *et al.* avaient mis en évidence certaines incompatibilités, ainsi leurs constructions-miroir. Pour cela, nous avons produit, en laboratoire L4, 33 constructions par génétique inverse. La présence de virus a été détectée après 4 jours de culture à 33°C par la réalisation d'un test d'hémagglutination. Les résultats sont rapportés dans la figure 17.

Rapidement nous avons constaté que toutes les constructions possédant un segment PB2 issu du virus A(H5N1) n'avait pas fonctionné et nous avons donc testé à nouveau la fonctionnalité du clone de génétique inverse PB2 du système A(H5N1). Nous avons confirmé qu'il n'était pas fonctionnel. Nous n'avons donc pas pu exploiter les résultats des constructions possédant ce segment (représentées en gris sur la figure 17)

Nous rapportons qu'un virus A(H3N2) saisonnier peut acquérir le couple **H5-N1** associé au segment **PB1** du virus A(H5N1), à l'image de la constellation des virus responsables des pandémies de 1957 et 1968 (HA-NA-PB1 aviaires sur un fond génétique humain). Ces résultats confirment les observations faites avec le virus aviaire A(H5N2).

De la même façon, le virus A(H3N2) peut acquérir le trio **HA-NA-NP** du virus A(H5N1), observations corrélées avec celles qui ont été faites avec le virus aviaire A(H5N2).

En revanche, l'introduction du segment **NS** d'origine A(H5N1), même en présence du couple HA-NA de même origine ne permet pas la production de virus alors que l'introduction du segment NS issu du virus A(H5N2) était possible. L'introduction d'un segment **NP** aviaire est possible en présence du couple HA-NA de même origine.

En ce qui concerne la compatibilité des glycoprotéines de surface, nous n'avons pas pu produire de virus exprimant les deux glycoprotéines aviaires H5 et N1 du virus A(H5N1) sur

un fond génétique d'origine humaine ni un virus exprimant uniquement la H5 d'origine aviaire. Par ailleurs, la construction d'un virus humain possédant une **HA** d'origine humaine (H3) et une NA d'origine aviaire (N1) est possible, indiquant que ces deux glycoprotéines sont compatibles. Ce résultat est confirmé par le fait qu'il est possible de produire un virus humain exprimant le trio HA-NA-PB1 aviaires alors que la même construction sans le segment NA (virus humain exprimant le couple HA-PB1 aviaire) devient impossible, dans nos conditions. Au final, nous montrons que sur un fond génétique majoritairement aviaire, il est possible d'introduire le ou les segments d'origine humaine suivants : PB2 (constructions RG10 et RG17), PB2-PA (construction RG18). Sur un fond génétique majoritairement humain, il est possible d'introduire le ou les segments d'origine aviaires suivants :

- HA-NA-PB1 (construction RG1), HA-NA-NP (construction RGF) à l'origine de virus potentiellement pandémiques et plus virulents,
- NA (construction RGI) à l'origine d'un virus potentiellement pandémique
- PB1 (construction RG5), NP-M-NS (construction RG6), NP-NS (construction RG9) à l'origine de virus potentiellement plus virulents
- PA (construction RG2), NP (construction RG7), NP-M (construction RG8)

Figure 17: détermination des constellations de virus réassortants A(H5N1) et A(H3N2) pouvant être produite par génétique inverse.

Virus réassortants	Origine des 8 segments de gène								Production de virus
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	
RG22									+
RG11, RG B									-
RG1									+
RG F									+
RG16									-
RG G									-
RG3, RGA									-
RG H									-
RG I									+
RG10, RG17									+
RG5									+
RG21									+
RG7									+
RG18									+
RG6									+
RG8									+
RG9									+
RG C									-
RG2									-
RG4									-
RG12									-
RG15									-
RG19									-
RG J									-
RG13									-
RG14									-
RG23									-
RG20									-
RG E									-

L'origine de chaque segment interne a été déterminée par séquençage des 8 segments des clones de virus réassortants obtenus par génétique inverse grâce aux systèmes A(H5N1) [A/Vietnam/1024/2004] () et A(H3N2) [A/Moscou/10/1999] (). En vert, les constructions pouvant permettre la production d'un virus influenza répliquatif, en gris les constructions n'ayant pas permis de produire un virus influenza du fait du clone de génétique inverse PB2 non fonctionnel.

D. Discussion

Quantification virale

La RT-PCR M est un outil de diagnostic rapide et sensible, qui donne, chaque année, de très bons résultats à l'occasion des contrôles de qualité européens (réseau de surveillance EISS) et mondiaux (OMS) auxquels nous participons en tant que CNR. Elle est facilement adaptable dans un laboratoire réalisant de la biologie moléculaire, comme nous l'avons montré dans le cadre de la prise en charge du diagnostic des infections grippales lors de la pandémie A(H1N1)2009.

Le choix d'un gène très conservé au sein des virus influenza A, tel que le gène de matrice (M), comme cible de cette RT-PCR, a pour avantages de permettre la détection d'un très grand nombre de sous-types de virus influenza A. Nous l'avons vérifié sur 26 virus influenza d'origine animale ou humaine, possédant une HA parmi 15 sous-types différents de HA (1 à 15 sur 16 sous-types décrits) et une NA parmi 8 sous-types différents de NA (1 à 8 sur les 9 sous-types décrits) (Tableau 8). Cette universalité permet d'envisager l'utilisation de cette RT-PCR pour des applications en santé humaine mais aussi dans le domaine de la santé animale aviaire et porcine en particulier. Un certain nombre d'autres équipes ont développé des outils de détection ciblant le gène M ou le gène NP, mais aucun n'a été, à notre connaissance, caractérisé comme nous l'avons fait dans ce travail.

Le développement d'une approche quantitative, a permis l'élargissement des applications vers la mesure de la charge virale influenza dans des prélèvements de patients, le développement d'un protocole de cinétique de croissance virale permettant la caractérisation du virus influenza ainsi que l'étude du pouvoir pathogène d'un virus influenza chez l'animal. L'utilisation d'un transcrit ARN en comparaison d'un plasmide ADN pour la réalisation de la gamme d'étalonnage présente comme avantage de contrôler l'efficacité de la transcription inverse en plus de l'amplification par PCR. Ce contrôle étant introduit au moment de la RT-PCR, il ne permet pas de contrôler l'efficacité de l'extraction pour chaque prélèvement, mais la réalisation d'une extraction automatisée EasyMag bioMérieux®, nous permet d'assurer une meilleure reproductibilité par rapport à une extraction manuelle et un contrôle automatique du bon déroulement de chacune des étapes de l'extraction.

Le choix d'une technique de mesure de la quantité de virus par biologie moléculaire, plutôt que par une technique classique de titrage infectieux sur cellules, présente de nombreux avantages. Hormis la rapidité de mise en œuvre (quelques heures contre plusieurs jours), l'avantage majeur repose sur le fait, qu'après l'étape de lyse au cours de l'extraction, seul de l'ARN est manipulé, or il s'agit de matériel non infectieux. Lorsque la quantification se fait par la détermination de DICT50/ml en culture cellulaire, le virus manipulé reste infectieux et les titres infectieux obtenus après plusieurs jours de culture peuvent être même très élevés. Ces manipulations sont ainsi à l'origine d'un risque important de contamination de l'essai mais aussi d'un risque infectieux pour le manipulateur. Ceci est bien sûr renforcé lorsqu'il s'agit de manipuler des virus influenza hautement pathogènes tels que le virus A(H5N1) ou des virus réassortants qui sont des organismes génétiquement modifiés de niveau 4 (BSL4).

A notre connaissance, il s'agit de la première description, dans le domaine de la santé humaine, d'un outil et d'une stratégie de quantification de la charge virale influenza dans des prélèvements permettant le suivi de l'excrétion virale d'un patient indépendamment de la qualité et de la variabilité du prélèvement qui est alors contrôlée par la quantification d'un gène de ménage. Récemment une RT-PCR de quantification de l'ARN A(H5N1) a été décrite pour des applications environnementales ¹²². Une autre équipe, vétérinaire, propose d'associer une RT-PCR de détection du virus influenza à une RT-PCR de détection d'un gène cellulaire d'oiseau « bird beta-actin » comme contrôle d'inhibition et de normalisation ¹²³. Ils ont ainsi développé des applications chez l'animal de quantification dans des écouvillons cloacaux, prélèvements particulièrement riches en inhibiteurs. Certains auteurs ont présenté une RT-PCR M permettant la quantification virale dans un prélèvement respiratoire mais sans contrôle de la qualité du prélèvement ¹²⁴. Récemment, la société Argène a mis sur le marché un kit de quantification cellulaire, *CELL Control r-gene* TM permettant la mesure par RT-PCR temps réel du nombre de cellules dans les prélèvements respiratoires. Le développement commercial de ce type d'outil indique l'importance croissante que l'on peut accorder au contrôle de la qualité du prélèvement pour la validation des résultats négatifs.

Cet outil et cette stratégie nous ont permis de proposer une approche fiable de quantification de l'excrétion virale pour le suivi des patients inclus dans la première étude visant à étudier l'association de deux inhibiteurs de la NA en comparaison de chacune des monothérapies (Bivir) (Duval *et al.* 2010, soumis / annexe 1). Au cours de l'hiver 2009-2010, nous l'avons aussi utilisé dans l'étude d'une cohorte d'enfants admis aux urgences pour un syndrome

respiratoire dû au virus A(H1N1)2009 (Bouscambert-Duchamp *et al.*, CMI, 2010 / publication 1) mais aussi pour deux autres protocoles qui ont été mis en place au laboratoire : Combina et Fluco. Le projet Combina était un projet complémentaire du projet Bivir mais qui étudiait l'association Oseltamivir-Zanamivir versus Oseltamivir en monothérapie et Oseltamivir-Amantadine. Le suivi des patients s'est fait par des lavages nasaux quotidiens, réalisés entre J0 et J4, et des écouvillonnages nasaux à J5 et J6. Le suivi de l'excrétion virale et donc de la réponse virologique au traitement a été réalisée par la détermination de la charge virale M corrigée en fonction de la charge GAPDH, selon la stratégie mise en place pour Bivir. Les résultats sont en cours d'analyse mais ils sembleraient confirmer la moins bonne efficacité de l'association oseltamivir-zanamivir par rapport à l'oseltamivir seul et une efficacité similaire entre l'association oseltamivir-amantadine par rapport à l'oseltamivir seul (données non publiées). Ce dernier résultat s'explique probablement par le fait que les virus A(H1N1)2009 sont tous résistants à l'amantadine.

Durant le même hiver, le projet Fluco visait à suivre les formes graves de grippe pandémique. Notre laboratoire a réalisé le suivi des enfants hospitalisés à l'HFME sur le plan virologique, en étudiant l'excrétion virale nasale avec la même stratégie (qRT-PCR M corrigée en fonction de la qRT-PCR GAPDH) ainsi que la mesure d'une éventuelle virémie par qRT-PCR M. Dans ce cadre, la quantification par qRT-PCR de la charge virale a été normalisée en fonction du volume de plasma extrait, sur le principe des charges virales sanguines d'autres virus (HIV, CMV, EBV...). Nous n'avons pas mis en évidence de virémie positive, y compris dans des formes cliniques sévères voire fatales (données non publiées).

Il est envisageable, grâce à cette RT-PCR sensible, de détecter la présence de virus dans différents sites ou organes, après infection expérimentale de souris ou de furets. Dans le cadre de l'étude de la pathogénicité du virus influenza, il est possible de développer des essais *in vivo* au cours desquels, la présence de virus peut être détectée par RT-PCR au niveau de différents organes : poumons, trachée, rate, foie, cerveau ou de prélèvements tels que des aspirations nasales, du sang ou des fèces. La preuve d'une réelle réplication dans ces sites devra ensuite être confirmée par des titrages infectieux sur cellules.

Cinétiques de croissance virale

L'observation *in vitro* des profils de réplication d'un virus influenza peut permettre de mettre en évidence des différences d'efficacité de réplication, en notant principalement le temps nécessaire au virus pour atteindre la phase exponentielle de croissance ainsi que la pente de cette phase exponentielle. Malgré les limites de cette approche relatives à l'utilisation d'un système *in vitro*, les observations faites peuvent généralement être corrélées à des observations réalisées ensuite *in vivo*.

Si l'utilisation d'un système cellulaire non humain (MDCK : cellules dérivées de reins de chien) peut être critiqué, actuellement les MDCK utilisées dans notre étude, restent la lignée sur laquelle il est le plus facile d'amplifier le virus influenza. La culture sur œuf, plus sensible, ne pourrait pas permettre de réaliser ces cinétiques de croissance virale. La culture sur MDCK permet d'obtenir une observation globale sur le comportement d'un virus et surtout de comparer ce comportement à celui d'autres virus. L'analyse englobe les différentes étapes du cycle de réplication depuis l'interaction du virus avec son récepteur jusqu'à sa capacité de libération de nouveaux virions. Cela permet donc d'apprécier le « fitness » des virus même si cette notion reste complexe. Il paraît raisonnable d'utiliser les informations que ces cinétiques apportent comme un moyen de caractériser des virus émergents ou présentant des caractéristiques particulières, de vérifier qu'ils sont capables de se répliquer et avec quelle intensité avant de déterminer *in vivo* leurs propriétés de transmissibilité et d'infectiosité.

La description des virus à sept segments A(H3N0) (annexe 2), imposait de répondre à la question du maintien, malgré l'absence de NA, de leur capacité à se multiplier *in vitro*. L'utilisation d'un deuxième système avec les MDCK-SIAT1 a permis d'accentuer les observations faites sur MDCK mettant en évidence une diminution des capacités réplcatives des virus A(H3N0) par rapport aux virus A(H3N2). L'absence d'activité sialidase ainsi qu'un assemblage des virions moins efficace ont dû contribuer à cette diminution de réplication¹²⁵. En effet, du fait de l'absence d'un segment, les interactions existant entre les 8 segments avant l'empaquetage et la libération des nouveaux virus doivent être modifiées. Cette hypothèse est renforcée par l'observation en cryo-électro-microscopie d'une augmentation du nombre de particules vides dans les surnageants de culture de virus A(H3N0), environ 25%, par rapport aux cultures de virus A(H3N2) qui est de l'ordre de 6% (Moulès and Ferraris *et al.*, accepté dans Virology, 2010 / annexe 2). L'importance du segment PB1 dans le maintien de la

réplication de ces virus semble déterminante et différentes hypothèses sont avancées. D'une part, l'augmentation de l'activité polymérase du complexe auquel appartient PB1, induit une augmentation de l'expression de la HA, ce qui favorise l'attachement du virus à la cellule cible malgré une faible affinité de la HA pour les acides sialiques. D'autre part, une augmentation de la production et de l'accumulation de ribonucléoprotéines au niveau du site d'assemblage, peut permettre l'incorporation d'un jeu de 7 segments dans des particules bourgeonnantes malgré une diminution de l'efficacité de l'assemblage liée à l'absence de NA. Les observations faites sur MDCK-SIAT1 indiquent qu'il est probable que ces virus se répliquent moins bien *in vivo*, ce qu'il serait intéressant de vérifier.

La corrélation entre les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* a été possible au cours de l'étude des virus A(H1N1) possédant une NA mutée H275Y. Nous avons montré que les virus influenza A(H1N1) sensibles ou résistants à l'oseltamivir avaient les mêmes capacités répliquatives. Si d'autres équipes ont décrit une diminution de réplication sur MDCK de virus A(H1N1) mutés H275Y [A/Texas/36/1999 et A/WSN/33]^{126,127}, *in vivo*, Herlocher *et al.* ont rapporté des résultats d'infection chez le furet, concordants avec les nôtres. Aucune différence de réplication n'avait été observée après infection de furets par des virus apparentés à A/New Caledonia/20/99 sensibles ou résistants à l'oseltamivir¹²⁸.

Des travaux ont été effectués sur le virus A(H5N1) et les résultats sont différents entre les équipes. Certains ont rapporté que la mutation H275Y pourrait compromettre la transmission du virus *in vivo*¹²⁹ alors que d'autres, sur des observations faites à partir de virus obtenus par génétique inverse, ont expliqué que les mutations H275Y et N295S ne modifiaient pas l'efficacité de réplication de ces virus mutés qui gardaient leur pouvoir pathogène¹³⁰. Sur la question de la transmissibilité des virus H275Y, Baz *et al.* ont rapporté des titres dans des prélèvements nasaux plus importants pour les virus apparentés à A/Brisbane/59/07 résistants que pour les virus sensibles à l'oseltamivir¹²⁷. Les essais *in vitro* ne peuvent qu'approcher l'étude du « fitness » du virus et doivent être complétés d'essais *in vivo*. Mais dans le cas de l'émergence de ce virus A(H1N1) muté H275Y, sa diffusion exceptionnelle dans la population mondiale semble indiquer que cette mutation n'altère pas sa transmissibilité.

Etude de l'émergence d'un virus A(H1N1)2009 résistant à l'oseltamivir

Obtention de virus réassortants par co-infection virale

Dans le contexte de l'émergence d'un virus pandémique et du problème de santé publique que représenterait l'acquisition d'une résistance à l'oseltamivir, antiviral de première ligne, nous avons voulu savoir si le virus pandémique A(H1N1)2009 pouvait acquérir, par réassortiment génétique, une NA mutée en H275Y provenant d'un virus A(H1N1) saisonnier, lui conférant alors cette résistance à l'oseltamivir (Bouscambert-Duchamp *et al.* Antivir Ther, 2010).

Nous avons évalué différentes conditions de co-infections (résultats non publiés) et nous avons développé un protocole dans lequel de l'oseltamivir était ajouté au milieu d'infection afin de favoriser la sur-infection d'une cellule déjà infectée par un virus influenza. En effet, après avoir été infectée par un premier virus, la cellule exprime à sa surface ses NA, qui empêchent, par clivage, l'interaction d'un deuxième virus influenza avec les récepteurs cellulaires. L'oseltamivir, en bloquant l'action des NA, contrarie l'état de résistance de la cellule et facilite son infection par un deuxième virus influenza ^{112,113}. Nous n'avons pas détecté de virus A(H1N1)2009 ayant acquis spontanément la mutation H275Y, ce qui montre que les concentrations utilisées d'oseltamivir dans nos conditions de co-infections virales ne permettaient pas l'émergence de cette mutation par pression de sélection ¹¹². En présence d'oseltamivir, nous avons choisi d'appliquer deux procédures différentes induisant les co-infections de façon différée (A) ou simultanée (B). Les deux virus réassortants A(H1N1)2009 possédant la NA mutée H275Y (mutants R16 et R28), ont été obtenus par la procédure A, c'est-à-dire par la co-infection différée : infection initiale par le virus A(H1N1)2009 puis, après une heure de contact, infection secondaire avec le virus A(H1N1) Brisbane-like résistant. Cette procédure semble être la plus efficace pour la génération de virus réassortants. En effet, 72% des virus issus du réassortiment génétique entre A(H1N1)2009 et A(H1N1) Brisbane-like résistants ainsi que tous les virus réassortants A(H5N1)-A(H1N1)2009 ont été obtenus par co-infection différée. Ceci peut s'expliquer d'une part, parce que l'inoculation différée, en présence d'oseltamivir, des deux virus diminue la compétition pour l'entrée du virus dans la cellule et d'autre part, parce que les quantités de virus inoculé sont plus importantes au cours de la co-infection différée (MOI 0,5 contre 0,1 pour respectivement les procédures A et B) par rapport à une co-infection simultanée.

Après avoir montré que des virus A(H1N1)2009 résistants à l'oseltamivir pouvaient émerger, nous avons regardé si l'acquisition d'une NA d'origine différente, porteuse de la mutation H275Y, qui semblerait diminuer l'affinité de la NA pour son substrat, pouvait modifier les capacités répliquatives de ces virus. Nous avons mis en évidence, qu'ils se multipliaient *in vitro* comme les virus parentaux ce qui sous-entend qu'ils auraient le même « fitness » que les virus A(H1N1)2009 et A(H1N1) Brisbane-like. Or ces virus ont montré qu'ils avaient une très bonne transmissibilité et qu'ils pouvaient diffuser rapidement sur toute la planète. En étudiant spécifiquement le comportement du virus réassortant R28 (*virus A(H1N1)2009 possédant les segments H1 et NP du virus A(H1N1) Brisbane-like*) (Figure 1 de Bouscambert-Duchamp *et al.* Antivir Ther, 2010 / publication 2), nous rapportons que le segment de gène NP issu du virus humain apparenté Brisbane pouvait s'intégrer dans un fond génétique d'une origine différente, celui du virus A(H1N1)2009, et que son introduction ne modifiait pas ses capacités de réplication.

L'analyse détaillée des résultats du criblage par RT-PCR des clones de virus influenza obtenus ont montré que les virus réassortants possédaient comme fond génétique les segments de gène du virus A(H1N1)2009 (Figure 12). Nos observations complètent celles de Bastien *et al.* qui avaient isolé un nouveau virus influenza, de type A(H1N1), chez 3 personnes travaillant dans la même exploitation porcine. Une analyse phylogénétique a indiqué qu'ils étaient issus du réassortiment entre le « triple réassortant porcin » de sous-type H1N2 et le virus A(H1N1) humain apparenté Brisbane H275Y¹³¹. Ce « triple réassortant porcin » est un virus circulant chez le porc, aux USA depuis les années 90. Il possède une constellation de segments de gènes internes composée d'une cassette TRIG « *triple reassortant internal gene* » décrite par Vincent *et al.* qui comprend des segments internes porcins issus du lignage classique (M, NP, NS), des segments aviaires (PB2, PA) et un segment humain (PB1) (Figure 5). Il est l'ancêtre du virus pandémique A(H1N1)2009 qui a pour composition la cassette TRIG associée à une H1 du lignage porcin classique et aux segments M et NA du lignage porcin eurasiatique (Figure 7). Le virus isolé par l'équipe de Bastien *et al.* est au final, un virus capable de transmission interhumaine et possédant les segments internes du « triple réassortant porcin » et le couple HA-NA du virus A(H1N1) apparenté Brisbane porteur de la mutation H275Y humain. Ces résultats montrent que ce type de virus réassortant pouvait émerger naturellement et se transmettre à l'homme¹³¹. L'analyse des constellations de gènes

des virus issus du réassortiment par co-infection virale que nous avons obtenus, entre les virus A(H1N1)2009 et A(H1N1) humain résistant, a montré que, dans nos conditions, trois virus possédaient ce fond génétique du « triple réassortant porcin » et le couple HA-NA humain. Ces observations confirment que le réassortiment génétique est possible entre ces deux souches et que la NA humaine mutée peut se substituer à la NA du virus pandémique A(H1N1)2009. Même si il n'a pas été observé de transmission communautaire, cette description renforce l'importance de surveiller l'émergence de nouveaux virus et en particulier depuis le réservoir porcin et parmi les personnes travaillant dans des élevages.

Etude du réassortiment génétique entre des virus influenza d'origines différentes

A(H5N1) et A(H3N2)

A(H5N2) et A(H3N2)

A(H5N1) et A(H1N1)2009

A(H5N1) et A(H1N1)2009 résistants à l'oseltamivir (R16)

A(H1N1)2009 et A(H1N1) Brisbane-like résistants à l'oseltamivir

Notre étude avait pour objectif principal de déterminer dans quelle proportion le réassortiment génétique entre virus influenza d'origines différentes serait possible, quels segments pourraient être introduits dans des virus circulants chez l'homme tels que les virus A(H3N2) ou A(H1N1)2009, quelles seraient les constellations privilégiées si l'évènement de co-infection se produisait et enfin de déterminer l'impact de la constellation de gènes du virus émergent sur sa virulence. Les réponses attendues devraient contribuer à anticiper rapidement les conséquences de l'émergence d'un virus influenza dès sa première détection dans la population humaine.

Choix des virus influenza étudiés

Pour cette étude, nous avons fait le choix, en 2005, d'utiliser, dans le cadre de notre approche par génétique inverse, un fond génétique issu d'un virus humain circulant et non issu de virus avirulents tels que le virus PR8 (A/Puerto Rico/8/34) ou WSN (A/WSN/33). Le virus A(H3N2) A/Moscow/10/99 a circulé chez l'homme de 1999 à 2004, faisant partie de la composition vaccinale pour l'hémisphère nord de 2000 à 2003.

Ce choix a aussi été celui de l'équipe de Chen *et al.* en 2008 et de Li *et al.* en 2009. En effet, Chen *et al.* ont publié une étude sur le réassortiment en produisant 63 combinaisons de virus réassortants par génétique inverse entre un virus A(H3N2) ayant circulé en 2003 (A/Wyoming/3/2003) et un virus A(H5N1) isolé en 2004 (A/Thaïland/16/2004)⁴. Li *et al.* ont réalisé en 2009, 254 combinaisons de virus réassortants entre une souche de virus A(H3N2) circulant chez l'homme en 2007 (A/Tokyo/Ut-Sk-1/07) et une souche de virus A(H5N1) (A/Chicken/South Kalimantan/UT6028/06) isolée chez l'oiseau en 2006⁵⁹.

Nous avons focalisé notre travail sur l'étude de l'émergence d'un virus potentiellement pandémique, c'est-à-dire arborant une ou deux glycoprotéines de surface n'ayant jamais circulé chez l'homme. C'est pourquoi la majorité des virus produits par génétique inverse possédaient une HA et/ou une NA d'origine aviaire. Pour mettre en évidence les incompatibilités éventuelles entre certains segments de gènes, des construction-miroir, c'est-à-dire l'introduction de segments d'origine humaine sur un fond génétique aviaire ont été réalisées (Figures 16 et 17). Pour les mêmes raisons, lors de l'étude du réassortiment génétique par co-infection virale, nous avons orienté le criblage des virus produits vers la sélection de virus possédant une HA d'origine aviaire A(H5N1) ou issue du virus A(H1N1)2009. Le potentiel pandémique est certain pour le virus A(H5N1) car il exprime deux glycoprotéines inconnues dans la population humaine et qui continue à circuler sur la planète. Quant au virus A(H1N1)2009, il devrait garder son potentiel pandémique probablement encore pendant une ou deux vagues de circulation.

En ce qui concerne les souches aviaires sélectionnées lors d'études antérieures, Chen *et al.* ont utilisé comme virus A(H5N1), un virus hautement pathogène isolé chez l'homme en 2004 en Thaïlande, appartenant donc au clade 1, comme le virus A/Vietnam/1194/2004 que nous avons choisis pour nos constructions de génétique inverse⁴ (Tableau 2). En revanche, l'équipe de Li *et al.* a fait le choix d'une souche A(H5N1) faiblement pathogène, isolée chez

le poulet et non chez l'homme, considérant que le risque de réassortiment venait plus probablement du contact d'un homme infecté par un virus humain saisonnier avec des volailles contaminées par un virus A(H5N1). Ils ont choisi une souche ayant circulé en Indonésie en 2006, qui appartient au clade 2.2 ⁵⁹ (Tableau 2). Dans nos essais de co-infections virales, nous avons trouvé pertinent d'utiliser un virus A(H5N1) A/Turkey/16/2006, isolé chez l'homme en Turquie en 2006 et appartenant aussi au clade 2.2. Les virus appartenant au clade 2.2, sont différents des autres virus A(H5N1) isolés avant 2006 par leur comportement particulier, dans la mesure où ils ont montré une plus grande virulence pour les oiseaux sauvages et se sont disséminés sur tous les continents à partir de 2005 ^{132,22} (Tableau 2).

Obtention de virus réassortants par génétique inverse.

La production de virus réassortants par génétique inverse entre des virus d'origines différentes a permis de déterminer quels étaient les segments de gènes compatibles pour permettre l'assemblage d'un virus influenza capable de se répliquer sur MDCK.

D'une façon générale, dans notre étude, les constructions qui ont permis la production de virus par génétique inverse entre les virus A(H5N1) et A(H3N2) ont été confirmées par Chen *et al.*⁴. Ces auteurs ont réalisé par génétique inverse, 63 constructions virales possédant toutes la HA et la NA du virus A(H5N1) et un ou plusieurs segments internes d'un virus A(H3N2) humain circulant. Ils ont ensuite évalué les capacités répliquatives de virus réassortants en réalisant des titrages sur MDCK en plages de lyse. Puis ils ont classé leurs constructions en 3 groupes.

Les virus réassortants que nous avons produits appartenaient tous au groupe 1, défini par ces auteurs, c'est-à-dire le groupe des virus possédant les capacités répliquatives les plus importantes. Par ailleurs, les constructions qui ne nous ont pas permis de détecter du virus, dans nos conditions, ont été tout de même décrites par ces auteurs mais, elles appartenaient toutes aux groupes 2 ou 3 qui regroupaient des virus aux capacités répliquatives diminuées de façon plus ou moins importante. Notre technique de détection de la présence de virus par test d'hémagglutination est probablement moins sensible que l'amplification suivie de la révélation par plages de lyse utilisées par Chen *et al.*, ce qui expliquerait qu'ils aient pu construire des virus qui sont apparus, avec notre système de détection, comme impossible à produire. Il serait intéressant de modifier notre protocole en ajoutant une étape d'amplification

sur cellule par un ou plusieurs passages sur MDCK. Li *et al.* ont aussi utilisé le même système d'amplification sur MDCK et révélation par plages de lyse après transfection de cellules 293T, mais ils ont utilisé le protocole de génétique inverse à 12 plasmides mis au point par leur équipe (Neumann *et al.*, PNAS, 1999)¹³³. Ce système repose sur la co-transfection de 8 plasmides contenant les 8 ADNc correspondant à chacun des segments de gène sous un promoteur de l'ARN polymérase I et 4 plasmides d'expression, codant pour les protéines PA, PB1, PB2 et NP du virus A/WSN/33. Le système à 12 plasmides a ensuite été simplifié par Hoffmann *et al.*, en un système à 8 plasmides où chaque ADNc est cloné sous deux promoteurs pour la polymérase I et II³. Nous avons, comme Chen *et al.* utilisé un système à 8 plasmides qui peut être considéré comme un peu moins efficace pour la production de virus aux capacités répliquatives altérées, comme le précise G. Neumann et Y. Kawaoka dans une revue sur la génétique inverse des virus influenza¹³⁴.

Etude de la compatibilité entre des segments de gènes d'origines différentes.

Chen *et al.* ont rapporté qu'un segment **NP** d'origine aviaire pouvait être introduit sur un fond génétique humain arborant des glycoprotéines aviaires, sans altérer les capacités répliquatives du virus réassortant (Tableau 11).

Nous confirmons cette compatibilité par nos constructions de génétique inverse introduisant le segment NP issu du virus A(H5N2) ou A(H5N1) sur un fond humain A(H3N2) (Figure 16 et 17). Par co-infection virale, nous avons identifié trois virus possédant un segment NP et le couple HA-NA d'origine humaine, indiquant que ce segment NP d'origine humaine était compatible avec un fond génétique d'origine porcine, or Chen *et al.* ont rapporté qu'il existait une incompatibilité entre le segment NP humain et un fond génétique aviaire, en l'absence des segments NS et M de la même origine⁴. Li *et al.* évoquent aussi une possible incompatibilité entre un segment NP humain et un segment NS aviaire car environ 50% des constructions non viables A(H5N1)-A(H3N2) possédaient cette association de segments de gène⁵⁹. L'ensemble de ces résultats semble indiquer que le fond génétique d'origine porcine doit être plus tolérant qu'un fond génétique d'origine aviaire, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que le virus d'origine porcine A(H1N1)2009 a lui-même un fond génétique d'origines diverses, porcine, aviaire et humaine (cassette TRIG)¹³⁵. Cette plus grande tolérance explique peut-être, comme le décrit Vincent *et al.*, que le réservoir porcin soit constitué de virus influenza évoluant très vite du fait de nombreux événements de réassortiment génétique entre des souches aviaires et

porcines issues de lignages divers ¹³⁵. L'étude du réassortiment, par génétique inverse, entre les virus A(H3N2) humain et A(H5N1) aviaire, a montré qu'il semblerait que le fond génétique humain soit, lui aussi, plus tolérant que le fond génétique aviaire, car un plus grand nombre de constructions introduisant un ou plusieurs segments de gènes d'origine A(H5N1) permettaient de produire du virus infectieux (Figure 17).

En ce qui concerne le complexe polymérase (**PA, PB1, PB2 et NP**), nous avons observé que dans le cadre du réassortiment A(H5N2)-A(H3N2), l'introduction des polymérases PA, PB1 et PB2 aviaires sur le fond génétique humain ne permettait pas, dans nos conditions, de produire un virus suffisamment répliatif, alors qu'en présence du segment NP de même origine, le virus produit était capable de se répliquer efficacement. Cette observation suggère l'importance de l'interaction fonctionnelle entre le segment NP et les polymérases PA, PB1 et PB2. Li *et al.* ont comparé, par un essai utilisant un minigénome codant pour une luciférase, les activités de répliation et de transcription des complexes polymérases comprenant des segments d'origine humaine A(H3N2) ou aviaire A(H5N1) ⁵⁹. Ils ont montré, que l'activité luciférase d'un complexe comprenant les polymérases aviaires (PA, PB1 et PB2) et un segment NP humain était 2 fois inférieur à l'activité d'un complexe polymérasique complètement aviaire (PA, PB1, PB2 et NP) ⁵⁹. Comme nous, ces auteurs rappellent l'importance de la compatibilité entre les segments PA, PB1, PB2 et NP sur le niveau d'activité du complexe polymérasique et donc sur les capacités répliatives du virus d'une part et sur les mécanismes de réassortiment d'autre part ^{59,136}.

Dans notre étude nous n'avons pas pu mettre en évidence, de façon significative, l'augmentation de la virulence, observée par Li *et al.*, lors de l'introduction d'un segment **PB2** humain dans le fond génétique d'un virus A(H5N1) faiblement pathogène ⁵⁹. Nous observons que les constructions, réalisées par génétique inverse entre les virus A(H3N2) humain et le virus A(H5N2) faiblement pathogène, qui ont permis d'obtenir des virus à un titre suffisamment élevé pour permettre leur détection comportaient, dans 3 cas sur 5, un segment PB2 humain (Figure 16).

Tableau 11 : tableau récapitulatif des compatibilités et des incompatibilités entre segments de gènes issus de virus influenza d'origines différentes.

Segment de gène	Dans notre étude					Description dans la littérature					
	Nature du segment de gène		Fond génétique ou segment de gène		compatibilité	Nature du segment de gène		Fond génétique ou segment de gène		compatibilité	référence
	Origine	Sous-type viral	Origine	Sous-type viral		Origine	Sous-type viral	Origine	Sous-type viral		
NP	Aviaire	A(H5N2)	Humain	A(H3N2)	oui						
	Aviaire	A(H5N1)	Humain	A(H3N2)	oui	Aviaire	A(H5N1)	Humain	A(H3N2)	oui	Chen <i>et al.</i> ,2008
	Humain	A(H1N1)	Porcin	A(H1N1)2009	oui						
						Humain	A(H3N2)	Aviaire	A(H5N1)	Non	Chen <i>et al.</i> ,2008
PA, PB1, PB2	Aviaire	A(H5N1)	Humain	A(H3N2)	non	Aviaire	A(H5N1)	Humain	A(H3N2)	Non (1)	Li <i>et al.</i> ,2009
PA, PB1, PB2, NP	Aviaire	A(H5N1)	Humain	A(H3N2)	oui	Aviaire	A(H5N1)	Humain	A(H3N2)	Oui (2)	Li <i>et al.</i> ,2009
PB1	Aviaire	A(H5N1)	Humain	A(H3N2)	oui	Aviaire	A(H5N1)	Humain	A(H3N2)	oui	Chen <i>et al.</i> ,2008
	Humain	A(H3N2)	Aviaire	A(H5N2)	oui						
	Humain	A(H3N2)	Aviaire	A(H5N1)	oui	Humain	A(H3N2)	Aviaire	A(H5N1)	Oui (3)	Li <i>et al.</i> ,2009
HA	Humain	A(H1N1)	NA porcin	A(H1N1)2009	oui						
	Humain	A(H3N2)	NA Aviaire	A(H5N1)	oui	Aviaire	A(H5N1)	NA Humain	A(H3N2)	oui	Chen <i>et al.</i> ,2008
	Aviaire	A(H5N1)	NA porcine	A(H1N1)2009	oui						
	Aviaire	A(H5N1)	NA humaine	A(H1N1)	oui						

(1) Activité du complexe polymérase faible

(2) Activité du complexe polymérase normale

(3)Activité du complexe polymérase augmentée

Dans cette étude, nous avons mis en évidence par deux approches, que le fond génétique humain pouvait acquérir un segment **PB1** d'origine aviaire. En effet, nous avons montré qu'il était possible de produire, par *génétique inverse*, un virus humain A(H3N2) possédant un segment PB1 aviaire issu du virus A(H5N2) (Figure 16) ou du virus A(H5N1) (Figure 17). Ces résultats rappellent la composition des virus pandémiques de 1957 (Grippe Asiatique) et de 1968 (Grippe de Hong Kong) qui possédaient une HA et un segment PB1 d'origines aviaires sur un fond génétique humain ⁴⁸. Nous n'avons pas pu évaluer la virulence de ces virus réassortants par rapport au virus A(H3N2) mais Chen *et al.* ont rapporté que l'introduction d'un PB1 d'origine aviaire sur un fond génétique humain faisait partie des 3 constructions donnant les virus les plus virulents chez la souris ⁴. En revanche, Li *et al.*, par la mesure de l'activité du complexe polymérase constitué des segments PA, PB1, PB2 et NP ont rapporté, que l'introduction d'un segment PB1 aviaire dans un complexe humain présentait une activité relative luciférase de 55% donc supérieure à l'activité du complexe strictement aviaire (40%) mais inférieure à celle d'un complexe strictement humain (100%) ⁵⁹.

Dans nos essais de réassortiments A(H5N1)-A(H1N1)2009 (séries MV et MR), nous n'observons pas d'augmentation de la taille des plages de lyse des virus réassortants MV25 ou MR13 (virus A(H5N1) possédant un segment PB1 d'origine humaine, issu du virus A(H1N1)2009) par rapport au virus A(H5N1) parental, traduisant des capacités répliquatives similaires (Figure 14 et 15). Ces observations renforcent la notion que le niveau d'activité du complexe polymérase est lié principalement à la compatibilité des segments constituant ce complexe et non à l'activité polymérase intrinsèque du segment PB1 seul.

L'étude du réassortiment génétique entre les virus A(H1N1)2009 et A(H1N1) saisonnier résistant à l'oseltamivir a montré, après séquençage complet des clones obtenus, que parmi les 25 virus réassortants, une constellation privilégiée avait été identifiée chez 40% des virus réassortants qui présentaient un fond génétique porcin complet arborant une H1 d'origine humaine (Figure 12). Ce résultat met en évidence la compatibilité de la **H1** humaine avec spécifiquement la N1 d'origine porcine mais aussi avec le fond génétique du virus A(H1N1)2009 majoritairement d'origine porcine¹⁴. Il est intéressant de noter que le segment PB1 du virus A(H1N1)2009 est d'origine humaine ¹⁴ ce qui pourrait expliquer l'interaction forte entre la HA et le PB1 de même origine favorisant donc, au cours de la co-répliquation des génomes viraux dans une même cellule, l'assemblage de ce type de virus. En effet, l'interaction entre les segments HA et PB1 de même origine a déjà été observé, en particulier lors des réassortiments à l'origine de l'émergence des virus pandémiques de 1957 et 1968 ⁴⁸.

La question de la balance **HA-NA** et donc de la compatibilité d'une HA avec une NA d'origine différente a été explorée par *génétique inverse*. Nous n'avons pas produit le virus possédant une HA de sous-type aviaire H5 associée à une NA humaine de sous-type N2, alors que Chen *et al.*, ont rapporté, que le virus humain arborant une H5 issue du virus A(H5N1) et une N2 humaine était aussi virulent que le virus A(H5N1) parental chez la souris ⁴. Nos conditions de production par génétique inverse et d'amplification sur MDCK inverse ne nous ont peut-être pas permis d'amplifier suffisamment de virus ou de le détecter lorsqu'il s'agissait de virus ayant des capacités de réplication même légèrement diminuées par rapport aux virus parentaux. En revanche, nous avons produit un virus arborant une HA humaine (H3) et une NA aviaire (N1) prouvant que ces deux glycoprotéines étaient compatibles.

En ce qui concerne la constellation exprimant sur un fond humain uniquement le couple HA-NA aviaire, Chen *et al.*, ont rapporté que sur système cellulaire, il était possible de produire un virus humain possédant les deux glycoprotéines aviaires H5 et N1 mais que *in vivo*, il était nettement moins virulent que le virus A(H5N1) parental avec une augmentation de 1,3 log₁₀ de la DL₅₀ chez la souris ⁴. Par génétique inverse, nous n'avons pas réussi à produire un tel virus hormis si le couple HA-NA était associé au segment PB1, probablement parce qu'en présence d'un segment PB1 aviaire, le virus se répliquant mieux, sa détection en était facilitée par un simple test d'hémagglutination. Ce trio **HA-NA-PB1** du virus humain a été observé, lors de la co-infection virale A(H1N1)2009-A(H1N1) résistant à l'oseltamivir pour 3 virus sur 25 (Figure 12).

Enfin, la co-infection virale faisant intervenir le virus A(H5N1) indique que la H5 est compatible avec des NA de même sous-type mais d'origines différentes : N1 d'origine porcine lignage eurasiatique (Figure 14) ou N1 humaine du virus apparenté Brisbane (Figure 15) et que les virus réassortants obtenus sont majoritairement aviaires.

Une grande compatibilité entre virus humains et aviaires est rapportée par Chen *et al.* et Li *et al.* avec respectivement 80% et 72,4% de constructions, réalisées par génétique inverse, permettant de produire du virus ^{4,59}. En ce qui concerne les capacités réplcatives des virus réassortants humains-aviaires, 50% des constellations de gène semblent associées à des virus de pathogénicité inférieure à celle du virus A(H5N1) parental selon Chen *et al.*, 35% à des virus de pathogénicité similaire ou inférieure à celle du virus A(H5N1) parental selon Li *et al.* Seule l'équipe de Li *et al.*, rapportent le fait que 38% des virus réassortants ont une

constellation de gène leur conférant une plus grande pathogénicité que le virus parental A(H5N1)⁵⁹ et qu'ils possèdent, en particulier, un segment PB2 d'origine humaine⁵⁹.

Conséquences de l'émergence de nouveaux virus influenza

Au cours de notre étude, nous montrons que le réassortiment entre le virus A(H1N1)2009 et le virus A(H5N1) est possible et que l'on pourrait voir émerger un virus hautement pathogène transmissible à l'homme. Un des virus réassortants que nous avons obtenu est, en particulier un virus aviaire exprimant une NA et un segment M d'origines porcines (MV15, Figure 14). Ce virus aurait théoriquement une HA de sous-type H5, non reconnue immunologiquement par la population humaine, associée à une NA d'origine « porcine » qui a montré qu'elle pourrait favoriser la transmissibilité inter-humaine de ce virus et un fond génétique aviaire possédant les segments de gène, PB2, NS et PB1-F2, porteurs de facteurs de virulence. De la même façon, le virus A(H3N2) saisonnier semble pouvoir acquérir aussi un certains nombre de segments de gènes d'origine A(H5N1) lui conférant alors des facteurs de virulence tels que le site de clivage polybasique de la HA, NS1 et PB1-F2 (Tableau 3).

Dans nos différents essais de co-infections virales entre virus d'origines différentes, la seule constellation majoritaire que nous avons obtenue est un virus possédant un fond génétique A(H1N1)2009 avec une HA d'origine humaine issue du virus A(H1N1) saisonnier Brisbane-like. Ce virus, qui peut émerger en cas de co-infection virale, ne devrait pas présenter de risque particulier car son H1 issue d'un virus humain saisonnier (Brisbane-like) est connue de la population humaine et son fond génétique est actuellement celui d'un virus peu virulent.

Nous avons montré, par une approche de co-infection virale, que le virus A(H1N1)2009 pouvait acquérir une NA mutée lui conférant une résistance à l'oseltamivir. Actuellement, des cas de résistance du virus A(H1N1)2009 à l'oseltamivir ont été décrits par le CDC aux USA¹³⁷. Ces résistances ont été retrouvées principalement chez des patients traités par oseltamivir (52/64) mais pour trois patients, aucune exposition à l'oseltamivir, ni en prophylaxie, ni en thérapeutique n'a été rapportée. Ce phénomène reste pour autant sporadique. Cependant lorsque l'on estime l'affinité de la NA pour son substrat par la mesure du Km de la NA, nous observons des caractéristiques communes entre les NA des virus A(H1N1)2009 et celles des virus A(H1N1) apparentés Brisbane résistant (H275Y) (B. Lina,

JS. Casalegno, données non publiées), ce qui pourraient expliquer que le réassortiment soit possible d'une part et sans conséquences sur la réplication des virus d'autre part. Perez *et al.*, ont réalisé des co-infections virales chez le furet et ont conclu que le virus A(H1N1)2009 avait un avantage sélectif sur les virus saisonniers A(H1N1) et A(H3N2) circulants ¹³⁸. Cette étude présentait certains biais, en particulier ils ont co-infecté seulement deux furets qui possédaient des anticorps préexistants.

La probabilité de survenue de cet événement est difficile à estimer mais elle est étroitement liée à l'intensité de circulation de ces deux virus. Fergusson *et al.* ont évalué la probabilité du réassortiment génétique entre les virus A(H1N1)2009 et le virus A(H5N1) et rapportent que ce risque est faible mais non négligeable ¹³⁹. Or actuellement, le virus A(H5N1) n'est responsable que d'un nombre très faible de cas humains, 493 cas dont 292 décès ont été recensés entre janvier 2003 et avril 2010 ⁷⁹. Durant l'hiver 2009-2010, la première vague pandémique a été observée mais, au regard des pandémies du passé, une ou plusieurs nouvelles vagues sont attendues. Le taux d'attaque estimé lors d'une deuxième vague pandémique est de 15-20% ce qui représente un nombre de cas décrit nettement plus important que le nombre de cas rapportés d'infection A(H5N1). Le virus A(H1N1) apparenté Brisbane résistant à l'oseltamivir a, durant l'hiver 2007-2008 représenté 100% des virus circulant responsables de l'épidémie en cours. Il existe donc un risque de voir co-circuler ces deux virus lors de l'hiver prochain et l'on peut penser que la probabilité d'observer un réassortiment et l'acquisition d'une NA H275Y par le virus pandémique n'est donc pas négligeable.

E. Conclusions et perspectives

Le réassortiment génétique est un phénomène complexe qui dépend de la survenue de l'événement de co-infection d'une même cellule par deux virus influenza différents, de la réplication efficace de deux génomes avec des interférences, des compétitions au niveau des enzymes cellulaires et autres facteurs de l'hôte et de la production d'un virus capable de se répliquer. L'approche par génétique inverse n'évalue que les mécanismes d'interaction entre les segments de gène et de « packaging » mais pas l'influence des facteurs de l'hôte ni du tropisme des virus pour certains tissus.

Une grande compatibilité entre virus humains et aviaires a été rapportée par Chen *et al.* et Li *et al.* avec respectivement 80% et 72,4% de constructions, réalisées par génétique inverse, permettant de produire du virus ^{4,59}. Dans notre étude, la co-infection virale, semble être plus restrictive. En effet, à l'issu des protocoles de co-infections simultanées ou différées, nous avons obtenu moins de 35% de virus réassortants. Théoriquement, la co-infection virale d'un système cellulaire apparaît comme une approche plus fidèle du mécanisme naturel.

Certains auteurs rapportent une bonne corrélation entre les observations réalisées *in vitro* sur cellules et *in vivo*. Li *et al.* ont montré, par exemple, que tous les virus réassortants A(H3N2)-A(H5N1) produits par génétique inverse, ayant des titres infectieux supérieurs à 10⁷ pfu/ml sur MDCK, appartenaient au groupe des virus les plus pathogènes chez la souris avec des doses létales très faibles (DL₅₀ < 100 pfu) ⁵⁹. Malgré cela, nous pensons que les résultats obtenus *in vitro* dans des cellules animales non humaines (MDCK) doivent être confirmés *in vivo* et la caractérisation des capacités de réplication des virus réassortants isolés ne peut être complète sans une étude de la virulence chez l'animal. Notre approche d'étude de la cinétique de croissance virale sur MDCK apporte une vision globale et comparée du comportement des virus étudiés mais elle ne peut remplacer l'étude de la virulence et de la pathogenèse de l'infection chez la souris ou le furet.

C'est pourquoi, nous prévoyons de réaliser en laboratoire L4, une étude de la virulence des virus issus du réassortiment **A(H1N1)2009-A(H1N1) Brisbane-like résistant [R16, R28 et R43]** et des souches parentales [A/Lyon/969/2009 et A/Lyon/1337/2007 H275Y] chez la souris Balb/cByJ afin de déterminer la DL₅₀ (130 souris) d'un part et la MID₅₀ (96 souris). Pour cela, des infections intra-nasales à doses croissantes seront réalisées, puis des autopsies à J3 et J6

seront programmées pour analyser la réplication virale dans différents organes (poumons, foie, rate, cœur et cerveau) ainsi que la virémie. Récemment, le laboratoire P4 Jean Mérieux, a mis en place des structures adaptées à l'expérimentation animale sur modèle furet. Nous programmons donc aussi des essais, avec ce modèle pour étudier le pouvoir pathogène des virus issus du réassortiment génétique entre le virus pandémique A(H1N1)2009 sauvage [A/Lyon/969/2009] ou muté H275Y [R16] et le virus aviaire hautement pathogène A(H5N1) A/Turkey/16/2006 [MV15, MV18, MV19, MR2, MR28 et MR31]. Après infections intranasales de 4 furets par virus à dose fixe, un suivi journalier de la température corporelle, du poids, des signes cliniques (respiratoires, généraux, digestifs, neurologiques) et des prélèvements nasaux sera réalisé à J0, J2, J3, J4 et J7. A J3 et J7, puis 50% des animaux seront euthanasiés. Nous réaliserons ensuite la détection de la présence de virus influenza par qRT-PCR M puis titrage infectieux sur MDCK sur les différents organes prélevés (poumon, rate, foie, reins, cerveau, trachée) ainsi que dans le sang.

L'étude du réassortiment génétique entre les virus A(H1N1)2009 et A(H5N1) répond aux questions posées par la menace de l'émergence de tels virus. Notre première approche a été ciblée sur l'analyse des constellations de gènes des virus exprimant une HA de sous-type H5 et une NA humaine, mais nous n'avons pas encore analysé la totalité des clones obtenus par co-infection virale. Il serait maintenant intéressant de déterminer quelle pourrait être la composition en gène interne de virus réassortants exprimant les glycoprotéines aviaires mais un ou plusieurs gènes internes d'origine humaine, en particulier les segments PB2 et NP qui semblent jouer un rôle déterminant dans la spécificité d'espèce mais aussi dans la virulence⁵⁹. Il paraît pertinent de vérifier si ce type de virus réassortants ne serait pas mieux adapté à l'homme que le virus A(H5N1) actuel dans le cadre d'essais de transmissibilité chez le furet.

Le réassortiment génétique entre souches virales d'origines différentes a été responsable des pandémies de 1957 et de 1968. Celle que nous connaissons actuellement est due au réassortiment entre deux virus, circulant chez le porc mais transmissible à l'homme. Ces événements rappellent que ce mécanisme d'évolution des virus influenza ne doit pas être négligé car il permet l'émergence de virus influenza plus ou moins virulents. Actuellement deux virus sont à surveiller de près, le virus A(H1N1)2009 et le virus A(H5N1). Depuis son apparition en février 2009, le virus A(H1N1)2009 n'a circulé intensivement que 10 mois environ et n'a réalisé qu'une seule vague. Or, à l'image de ce qui a été observé lors des 3 pandémies du XX^{ème} siècle, deux ou trois vagues ont, à chaque fois, été décrites avant de

devenir le virus influenza circulant majoritaire. Il est donc fort probable que ce virus continue à circuler chez l'homme et donc à évoluer sous la pression immunitaire naissante de la population. Rien ne permet de déterminer s'il pourra acquérir des facteurs de virulence particuliers, mais nous montrons par cette étude qu'il peut devenir rapidement résistant à l'oseltamivir et qu'il peut accepter des segments de gènes issus du virus A(H5N1).

Le virus A(H5N1) représente une menace importante car il a une évolution génétique rapide, un pouvoir pathogène élevé et il peut acquérir des mutations d'adaptation à l'homme qui lui conférerait une possible transmissibilité interhumaine. D'autre part, nous rapportons dans cette étude que le réassortiment entre un virus humain et ce virus, malgré son origine aviaire et sa non transmissibilité à l'homme, est possible selon différentes combinaisons, pouvant donner naissance à des virus réassortants virulents et capables de transmissibilité interhumaine.

Ces hypothèses renforcent la nécessité de promouvoir la vaccination dirigée contre le virus pandémique d'une part, mais aussi contre le virus A(H5N1) d'autre part, dans les régions où il circule, afin de réduire le risque de co-infection par ces deux virus chez un même individu. De plus, il paraît indispensable de modifier notre utilisation des inhibiteurs de la neuraminidase en particulier en utilisant l'oseltamivir à doses thérapeutiques, y compris dans un protocole prophylactique, en évaluant l'efficacité d'associations d'antiviraux et de nouvelles molécules en cours de développement ¹⁴⁰.

ANNEXES

ANNEXE 1

VIROLOGICAL EFFICACY AND SAFETY OF OSELTAMIVIR ZANAMIVIR
COMBINATION COMPARED TO EACH MONOTHERAPY FOR SEASONAL
INFLUENZA: A RANDOMIZED TRIAL

*X. Duval, S. van der Werf, T. Blanchon, A. Mosnier, **M. Bouscambert - Duchamp**, A. Tibi, V.
Enouf, C;Charlois– Ou, C. Vincent, L. Andreoletti, F. Tubach, B. Lina, F. Mentré, C.Leport.*

Soumis dans PLoS Medecine, 26 avril 2010.

Efficacy and safety of oseltamivir-zanamivir combination compared to each monotherapy for seasonal influenza: A randomized, double-blinded, placebo-controlled trial.

Xavier Duval M.D., Ph.D.,^{1, 2, 3}
 Sylvie van der Werf Ph.D.,^{4, 5, 6}
 Thierry Blanchon M.D.,^{7, 8}
 Anne Mosnier M.D.,⁹
 Maude Bouscambert - Duchamp Pharm.D, M.sC.,^{10, 11}
 Annick Tibi Pharm.D., Ph.D.,¹³
 Vincent Enouf Ph.D.,⁴
 Cécile Charlois - Ou M.D.,¹⁴
 Corine Vincent M.sC.,^{15, 2, 3}
 Laurent Andreoletti, M.D., Ph.D.,^{16, 17}
 Florence Tubach M.D., Ph.D.,^{18, 2, 3}
 Bruno Lina M.D., Ph.D.,^{10, 11}
 France Mentré M.D., Ph.D.,^{15, 2, 3}
 Catherine Leport M.D. Ph.D.,^{14, 19}
 and the Bivir Study Group.

From the:

¹ Inserm CIC 007; AP-HP, Hôpital Bichat, Paris, France;

² Inserm U738, Paris, France;

³ Université Paris Diderot, Paris 7, UFR de Médecine, site Bichat, Paris, France.

⁴ Institut Pasteur, Centre National de Référence des virus influenzae (Région-Nord), Unité de Génétique Moléculaire des Virus à ARN, Paris, France;

⁵ CNRS URA3015, Paris, France;

⁶ Université Paris Diderot, Paris 7, UFR Sciences du Vivant, Paris, France

⁷ Inserm UPMC UMR-S 707, Faculté de médecine Pierre et Marie Curie, Paris, France ;

⁸ Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, UFR de Médecine, U707, Paris, France

⁹ Réseau des GROG, Coordination nationale, Paris, France

¹⁰ Hospices Civils de Lyon, Centre National de Référence des virus influenzae (Région-Sud), GHE, Bron, France;

¹¹ Université Lyon 1, VirPatH, CNRS FRE 3011, Lyon, France.

¹² APHP- Agence Générale des Equipements et Produits de Santé, Unité Essais Cliniques, Paris, France;

¹³ Université Paris Descartes, Paris 5, Faculté de Pharmacie, Paris, France

¹⁴ Université Paris Diderot, Paris7, UFR de Médecine, site Bichat, Laboratoire de Recherche en Pathologie Infectieuse, Paris, France

¹⁵ APHP, Hôpital Bichat, UF de Biostatistiques, Paris, France

¹⁶ Hôpital Robert Debré, Unité de Virologie médicale, Reims, France ;

¹⁷ Unité de Virologie Médicale et Moléculaire Faculté de Médecine Université Champagne-Ardenne IFR53/EA-4303, Reims France

¹⁸ APHP- Hôpital Bichat, Département d'Epidémiologie, Biostatistiques et Recherche Clinique, Paris, France

¹⁹ AP-HP, UF Coordination des Risques Epidémiques et Biologiques, Paris, France.

BIVIR Study Group (see appendix)

Running title: combined oseltamivir-zanamivir for seasonal influenza

Keywords: oseltamivir, zanamivir, combination, seasonal influenza

Word count

Abstract: 298 (< 300)

Text: 2978 (<3000)

Funding

This work was supported by a research grant from the French Ministry of Health. The sponsor was: Département à la Recherche Clinique et au Développement, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (Programme hospitalier de recherche clinique, AOM 06060 and AOM 08209).

Trial registration: Clinical Trials.gov Identifier is NCT00799760

IRB authorisation number : 0811813 (Comité Protection des Personnes Ile de France 1).

Corresponding author:

Pr Catherine Leport, Laboratoire de Recherche en Pathologie Infectieuse, UFR Médecine, site Bichat, Université Paris Diderot, Paris 7, 16 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France

Phone: (33)1 57 27 78 68

Fax: (33)1 57 27 76 91

Email: catherine.leport@univ-paris-diderot.fr and catherine.leport@bch.aphp.fr

Alternate corresponding author:

Dr Xavier Duval, Centre d'Investigation Clinique, Hôpital Bichat Claude Bernard, Université Paris Diderot, Paris 7, 46 rue Henri Huchard, 75877 Paris Cedex 18, France.

Phone: (33) 1 40 25 71 48

Fax: (33) 1 40 25 67 76

Email: xavier.duval@bch.aphp.fr

Author contributions:

Study concept and design: L. Andreoletti, T. Blanchon, C. Charlois - Ou, X. Duval, C. Leport, B.Lina, F. Mentré, A. Mosnier, S. van der Werf.

Acquisition of data: T. Blanchon, M. Bouscambert -Duchamp, C. Charlois - Ou, X. Duval, V. Enouf, C. Leport, B. Lina, F. Mentré, A. Mosnier, F.Tubach, S. van der Werf.

Analysis and interpretation of data: L. Andreoletti, T. Blanchon, X. Duval, C. Leport, B.Lina, F. Mentré, A. Mosnier, F.Tubach, S. van der Werf, C. Vincent.

Drafting of the manuscript: T. Blanchon, M. Bouscambert -Duchamp, X. Duval, V. Enouf, C. Leport, B. Lina, F. Mentré, A. Mosnier, S. van der Werf.

Critical revision of the manuscript for important intellectual content:

X. Duval, C. Leport, B. Lina, F. Mentré, A. Tibi, S. van der Werf.

Approval of final version of submitted manuscript: L. Andreoletti, T. Blanchon, M. Bouscambert -Duchamp, C. Charlois - Ou, X. Duval, V. Enouf, C. Leport, B. Lina, F. Mentré, A. Mosnier, A. Tibi, F.Tubach, S. van der Werf, C. Vincent.

Statistical analysis: X. Duval, F. Mentré, C. Vincent.

Obtain funding: C. Leport, F. Mentré.

Administrative, technical, or material support: L. Andreoletti, T. Blanchon, M. Bouscambert -Duchamp, C. Charlois - Ou, X. Duval, V. Enouf, C. Leport, B. Lina, F. Mentré, A. Mosnier, A. Tibi, F.Tubach, S. van der Werf.

Abstract

Context: Neuraminidase inhibitors have proved their efficacy in reducing time to alleviation of symptoms in patients with seasonal influenza infection. Evaluation of combination of neuraminidase inhibitors could be of interest in the context of a pandemic.

Objective: To evaluate oseltamivir-zanamivir combination efficacy and tolerance as compared to each monotherapy during the 2009 seasonal influenza epidemic.

Design: Randomized, double-blinded, placebo-controlled trial.

Setting: 145 general practitioners throughout France.

Patients: Adults presenting influenza-like illness for less than 36 hours and a positive influenza A rapid test diagnosis.

Intervention: Patients were randomized to oseltamivir 75 mg orally twice daily plus zanamivir 10 mg by inhalation twice daily (OZ), oseltamivir plus inhaled placebo (O) or zanamivir plus oral placebo (Z).

Main outcome measures: Treatment efficacy was assessed as the proportion of patients with nasal influenza RT-PCR below 200 copies genome equivalent (cgeq)/ μ L at day 2, and according to the time to alleviation of symptoms.

Results: Overall 541 patients (of the 900 planned) were included (OZ, n=192; O, n=176; Z, n=173), 49% male, mean age 39 years. In the intention-to-treat analysis conducted in the 447 patients with RT-PCR confirmed influenza A, 46%, 59%, and 34% in OZ (n=157), O (n=141) and Z (n=149) arms had RT-PCR < 200 cgeq/ μ L (p=0.025, p=0.028 for OZ/O and OZ/Z comparisons). Mean day 0-day 2 viral load decrease was 2.14, 2.49, and 1.68 log₁₀ cgeq / μ L (p=0.060, p=0.016 for OZ/O and OZ/Z). Median time to alleviation of symptoms was 4.0, 3.0 and 4.0 days (p=0.018, p=0.960 for OZ/O and OZ/Z). Four severe adverse events were observed with favourable outcome.

Conclusion: In adults with seasonal influenza A virus infection, oseltamivir monotherapy appeared more effective than oseltamivir-zanamivir combination and than zanamivir monotherapy.; oseltamivir should be the first line recommended anti influenza treatment.

Funding French Ministry of Health

Clinical Trials.gov Identifier is NCT00799760.

Introduction

Neuraminidase inhibitors (oseltamivir (O), zanamivir (Z)) have proved their efficacy in reducing clinical symptom duration in seasonal influenza patients¹⁻⁶. They are considered a main strategy to limit the impact of an influenza pandemic both individually, by reducing morbidity and mortality, and collectively, by slowing the virus' spread to buy time for vaccine production, the cornerstone of influenza control^{2-4, 7}. However, massive use of a single antiviral may result in the emergence of resistant strains whose subsequent spread could dramatically reduce the effectiveness of antiviral intervention. The combination of two antiviral agents, if well tolerated, and if producing at least additive antiviral activity, theoretically offers several advantages: reducing disease severity, viral shedding and viral excretion period and therefore the attack rate and risk of selection of resistant viruses^{8, 9}. Through mathematical modelling, this latter advantage has been suggested for optimal use of antivirals in early phases of a pandemic⁹. Among antivirals active against influenza virus, the combination of neuraminidase inhibitors may be convenient as both compounds are licensed for seasonal influenza.

We conducted in France, during the winter of 2008-2009, a double-blind double-placebo randomized controlled trial in patients presenting with seasonal influenza-like illness comparing the oseltamivir-zanamivir combination to each of the monotherapies plus placebo. Due to the emergence of the pandemic 2009 (H1N1) virus in humans, in April 2009 in Northern America, and its subsequent worldwide spread, we decided to suspend the trial and analyze the results earlier than planned, given the possible impact of the results on antiviral treatment management during the pandemic¹⁰.

Methods

Patients

From January 7th to March 15th 2009 (period of the winter 2008-2009 influenza epidemic in France), adults over 18 years old who consulted their general practitioner within 36 hours of influenza symptoms onset, with a temperature above 38°C, one or more respiratory symptoms (cough, sore throat), one or more general symptoms (headache, dizziness, myalgia, sweats and or chills, fatigue) and a positive nasal rapid test for influenza A (Clearview Exact Influenza A & B) were enrolled throughout France. Enrolment of women required a negative urine pregnancy test. Exclusion criteria were vaccination against influenza during the 2008-2009 season, recent exacerbations of COPD, asthma or severe chronic disease and previous history of depression. Prior to inclusion, patients gave informed written consent. The protocol was approved by the Ethics Committee of Ile de France 1.

Study procedures

At enrolment (day 0), a nasal swab for virological analysis was performed. Patients were allocated to treatment by a randomization list, with an arm ratio of 1 ; 1 ; 1, balanced by practitioner. A computer random number generator was used to select random permuted blocks of size 3. The three treatments were (1) oseltamivir capsule for oral use plus inhaled zanamivir, (2) oseltamivir plus inhaled placebo, (3) zanamivir plus oral placebo. Oseltamivir dosage was 75 mg orally twice daily; zanamivir dosage was 10 mg by oral inhalation using the commercialized GlaxoSmithKline Diskhaler®, twice daily. Active drugs and placebo were kindly provided by Roche and SmithKline laboratories. Each general practitioner received 6 identical treatment units to be given by order of inclusion. A visiting nurse performed a nasal swab for virological analysis on day 2. Patients returned to their general practitioner at day 7 for follow-up examination, and were contacted by phone on day 14. All study personnel and participants were blinded to treatment assignment throughout the study.

Only the study statisticians and the data monitoring committee saw unblinded data after the end of the trial.

Virological analysis

Nasal swabs placed into a transport medium (Virocult®, Elitech) were transported at 4°C by special courier to the nearest National Influenza Centre (NIC) (Hospices Civils de Lyon, Lyon, or Pasteur Institute, Paris, France). Upon arrival, the swab samples were eluted into 2 ml of transport medium, processed for real-time-RT-PCR analyses and inoculated onto MDCK cells for virus isolation and subsequent subtyping using a standard hemagglutination inhibition assay. For RT-PCR analyses, RNA extraction from 200µl of specimen was performed using the QIAmp virus RNA mini kit (Qiagen) with RNA elution into a final volume of 60 µl. All real time RT-PCR assays were performed in a final volume of 15 µL with 5µL RNA, 0.5µM of each primer, 0.2µM probe and 0.8µl enzyme mix (SuperScriptTMIII Platinum®One-Step Quantitative RT-PCR System; Invitrogen, Carlsbad, Cal). Type A influenza virus RNA was detected by a real time RT-PCR targeting the conserved matrix gene using GRAM/7Fw (5'- CTTCTAACCGAGGTCGAAACGTA-3') and GRAM/161Rv (5'-GGTGACAGGATTG GTCTTGCTTTA-3') primers and GRAM probe/52/+ (5'[Fam]-TCAGGCC CCTCAAAGCCGAG-[BHQ-1]3') probe. The quality of the specimens was assessed by real-time RT-PCR targeting the GAPDH cellular gene¹¹. Amplification was performed on a LightCycler 480 (Roche Diagnostics) (NIC, Pasteur Institute, Paris) or an ABI 7500 (Applied Biosystems) (NIC, Lyon). Cycling conditions are available upon request. Quantified synthetic RNA transcripts corresponding to the M and GAPDH genes were used in parallel.

For each specimen, the normalized influenza viral load was defined as the ratio of the M RT-PCR and GAPDH RT-PCR multiplied by the average GAPDH RT-PCR at day 0 to

express results in copies of genome equivalent/ μL (cgeq/ μL). The virological response was defined as a normalized viral load below 200 cgeq/ μL at day 2. This threshold was chosen (using results on specimens from patients with an positive influenza A rapid test from winter 2008-2009 GROG surveillance in France, analysed by the 2NICs) since it led to 5% of false positive and 5% false negative results with respect to virus isolation. It was validated by the independent committee prior to any analysis. Sensitivity of the qRT-PCR was assessed using serial dilutions of quantified synthetic transcripts corresponding to the target genes. To assess comparability of the data between the two NICs, specimens were exchanged showing excellent concordance. The threshold of the qRT-PCR used was set well above the limit of detection.

Clinical response and drug compliance assessment

Oral temperature was recorded and severity of 7 symptoms (nasal stuffiness, sore throat, cough, muscle aches, tiredness or fatigue, headache, and feverishness) was rated by the patient twice daily up to day 5 and then once daily on a seven-point scale (0, none; 1, mild; 2, moderate; 3, severe)^{2-4, 12}. Time to illness resolution was defined as time from study drug initiation to time to symptom alleviation. Symptom alleviation was defined as the first 24-hour period during which the above 7 symptoms were absent or only mild^{3, 4}. Influenza-related clinical events were defined as incidence of complication independent of any antibiotic initiation, and/or occurrence of a pre-existing chronic disease.

Patients reported treatment compliance using a self-administered questionnaire; full compliance during the day 0-day 2 period was when 100% planned drug intakes had been completed.

Endpoints, analyzed populations

The primary efficacy endpoint was the proportion of patients with RT-PCR < 200 cgeq/ μL on day 2 of treatment. The secondary endpoints were 1/ the decrease of $\log_{10}$ viral load between days 0 and 2 in the patients with confirmed influenza A on day 0 and available samples both at days 0 and 2; 2/ the time to resolution of illness, 3/ the number of patients with alleviation of symptoms at the end of treatment (day 5), 4/ the symptoms score at the end of treatment, 5/ the incidence of secondary complications of influenza such as otitis, bronchitis, sinusitis, pneumonia, and the use of antibiotics 6/ the occurrence of severe adverse events in all participants having received at least one dose.

According to the protocol, the intention-to-treat (ITT) analysis was performed on two populations: 1/ all enrolled patients (primary objective), 2/ enrolled patients with an influenza A virus infection confirmed by RT-PCR on day 0 (influenza A infected population). A per protocol analysis was performed in fully compliant influenza A infected patients.

Sample size and statistical analysis

Sample size evaluation assumed that virological response was obtained in 70% of patients in the oseltamivir-zanamivir arm, compared to 55% in each of monotherapy arms. Samples of 300 subjects per arm have 90% power to detect this difference, with a two-sided test and a type I error of 0.025 because of the two tests. Proportions of response at day 2 were compared between the combination therapy arm (OZ) and each monotherapy arm (O or Z) separately using χ^2 tests with a type I error of 0.025 because of the two tests. Patients without day 2 sample were considered as treatment failures. Mean decreases of $\log_{10}$ viral load were compared using a t test in patients who had both day 0 and day 2 samples assuming a value of 0.5 cgeq/ μL when RT-PCR was negative. For clinical endpoints non-parametric tests were used. Times to resolution of illness and scores of symptoms at end of treatment were compared using Wilcoxon tests; 95% confidence intervals (95%CI) of median differences

were estimated by bootstrap. Probability of symptom alleviation versus day of treatment was estimated using the Kaplan Meier method and was compared between groups with the log-rank test. Proportions of clinical events and of patients with alleviation of symptoms were compared using Fisher exact tests. As an exploratory analysis, 95% CI for differences of response between the two monotherapies were also estimated. All analyses were performed using SAS software, version 9.1 (SAS Institute, Cary, NC).

Early study termination

Recruitment was interrupted on March 15th 2009 at the end of the epidemic period in France. A second recruitment period was planned for the next winter (i.e. 2009-2010) to attain the number of patients required. However, due to the emerging H1N1 virus pandemic, the independent committee without any knowledge of the results recommended conducting an early analysis on May 6th 2009. This decision was based first on the will to rapidly provide results on efficacy and tolerance of combined oseltamivir-zanamivir therapy, and second, on the limited interest of pooling the results of the 2 winters, one with a seasonal virus (winter 2008-2009, mainly H3N2) and the other one with a novel pandemic virus of a different subtype (winter 2009-2010).

RESULTS

Patients

Out of the 900 patients initially planned, a total of 541 patients were enrolled by 145 investigators. They were randomly assigned to oseltamivir plus zanamivir (OZ, n=192), oseltamivir plus inhaled placebo (O, n=176), zanamivir plus oral placebo (Z, n=173) (Figure 1). Mean age was 39 years ($\pm$ 13), 49% were male, 14 % had pre-existing chronic diseases, mean fever was 38.2°C ($\pm$ 0.8). The mean duration of illness before enrolment was 25 hours

($\pm$ 10). Other characteristics of patients appeared well balanced in the 3 arms (Table 1). The rate of fully compliant patients was not significantly different among the 3 arms (84% for the OZ arm, 88% for the O arm and 85% for the Z arm).

Virological samples

Out of the 541 enrolled patients, 447 (83%) had a laboratory confirmation of influenza A virus infection on the day 0 specimen, with a mean viral load of 4.38 log₁₀ cgeq/ μ L (IQR 3.75-5.30). All the day 0 specimens were GAPDH RT-PCR positive with a mean value of 3.88 log₁₀ copies/ μ L.

Virological endpoints

Primary endpoint

In the intention-to-treat analysis, considering the 541 enrolled patients, the proportion of patients with a RT-PCR < 200 cgeq/ μ L on day 2 of treatment was 52.6% in the oseltamivir-zanamivir arm, 62.5% in the oseltamivir monotherapy arm (p = 0.055, for the OZ versus O comparison), and 40.5% in the zanamivir monotherapy arm (p = 0.020, for the OZ versus Z comparison) (Table 2).

In the intention-to-treat analysis, considering the 447 influenza-infected patients, the proportions were 45.9% in the oseltamivir-zanamivir arm, 58.9% in the oseltamivir monotherapy arm (p =0.025 for the OZ versus O comparison), and 33.6% in the zanamivir monotherapy arm (p =0.028 for the OZ versus Z comparison) (Table 2). The same trends were observed in the 382 fully compliant influenza A infected patients (Table 2).

Secondary virological endpoints

In the 414 influenza A infected patients with both day 0 and day 2 available specimens, the day 2 - day 0 decrease was $2.14 \log_{10}$ cgeq/ μ L in the oseltamivir-zanamivir arm, $2.49 \log_{10}$ cgeq/ μ L in the oseltamivir monotherapy arm, ($p=0.060$ for the OZ versus O comparison), and $1.68 \log_{10}$ cgeq/ μ L in the zanamivir monotherapy arm ($p=0.016$ for the OZ versus Z comparison) (Table 2).

Clinical endpoints

The median duration of symptoms in the 541 enrolled patients was 3.5 days in the oseltamivir-zanamivir arm, 3.0 days in the oseltamivir monotherapy arm ($p=0.015$ for the OZ versus O comparison), and 4.0 days in the zanamivir monotherapy arm ($p=0.78$ for the OZ versus Z comparison) (Table 3). In the 447 influenza A infected patients, this figure was 4.0 days in the oseltamivir-zanamivir arm, 3.0 days in the oseltamivir monotherapy arm ($p=0.018$ for the OZ versus O comparison), and 4.0 days in the zanamivir monotherapy arm ($p=0.96$ for the OZ versus Z comparison); the median score of symptoms at day 5 (end of treatment) was 3 in the oseltamivir-zanamivir arm, 2 in the oseltamivir monotherapy arm ($p=0.013$ for the OZ versus O comparison), and 3 in the zanamivir monotherapy arm ($p=0.93$ for the OZ versus Z comparison)(Table 3). Figure 2 presents the time to alleviation of symptoms in the 447 patients, the log-rank test also showing a significant shorter time in the oseltamivir monotherapy arm. Other clinical outcomes showed similar trends.

Tolerance

Four severe adverse events occurred during the study, one of which was considered unrelated to study drugs (acute bacterial pneumonia at day 3 in a patient receiving oseltamivir-zanamivir combination). Two adverse events also occurred in patients receiving the oseltamivir-zanamivir combination: severe cephalalgia leading to interruption of therapy;

facial oedema following the first administration, disappearing within 24 hours post-drug interruption. The remaining patient experienced repeated vomiting after oseltamivir monotherapy drug administration. All 4 patients completely recovered.

Discussion

This study is to our knowledge the largest clinical trial to examine the effect of combination neuraminidase inhibitor antiviral therapy in influenza as compared to each monotherapy and consequently to offer the possibility of comparing the two neuraminidase inhibitors.

Analysis of the different antiviral regimens' efficacy was based on a virological primary endpoint, which we hypothesized could be a sensitive indicator, but also on clinical endpoints as in previous studies ^{1, 5}. Unexpectedly, oseltamivir monotherapy appeared both virologically and clinically significantly superior to the oseltamivir-zanamivir combination. This result appears highly reliable since 1/ it was found using a double-blind placebo methodology 2/ it was confirmed over the three different populations of subjects (541 enrolled patients, 447 influenza A infected patients, 382 influenza A infected and fully compliant patients), 3/ there was overall concordance both within virological endpoints, and between virological and clinical endpoints. This lower clinical and virological response to the combination may suggest an antagonism between the two compounds, as in the absence of interactions the effect of the combination should at least be additive ¹³. An antagonism at the level of binding at the catalytic pocket of the neuraminidase is an explanation that should be further investigated *in vitro*. Contrary to oseltamivir, that upon digestive absorption needs to be metabolized, delaying arrival of the active drug at the infection site ($t_{max} = 4$ hours), inhaled zanamivir is delivered directly to the primary site of influenza virus replication. It can thus be hypothesised that zanamivir is more likely to occupy the catalytic pocket first, thus

preventing the action of oseltamivir; consequently, the combination is largely reduced to a zanamivir monotherapy.

Whereas the virological results indicate a trend towards superiority of the oseltamivir-zanamivir combination to zanamivir monotherapy, clinical results were not significantly different, suggesting that oseltamivir adds little to zanamivir monotherapy. This is concordant with the above hypothesis of the predominant catalytic site occupation by zanamivir when the combination is administered.

As an exploratory analysis, oseltamivir showed a significantly higher clinical and virological efficacy as compared to zanamivir, a comparison never previously performed. This could be the consequence of a suboptimal treatment regimen in the zanamivir arm, since the IC50 values for the A(H3N2) viruses of the 2008-2009 season were 2- to 3-fold higher for zanamivir as compared to oseltamivir, but remained within the range for susceptible strains (GROG surveillance; NICs, unpublished). The virological result is confirmed by the longer time to alleviation of the influenza symptoms in patients receiving zanamivir.

As the present study was conducted during an influenza season where A (H3N2) viruses predominated (about 95% when assuming a similar distribution between subtypes for the non subtyped viruses as for the subtyped viruses), impact on the results of seasonal A(H1N1) viruses oseltamivir resistant is expected to be negligible. We observed these same trends after excluding non-H3N2 infected patients from our population. It remains to be determined to what extent the present results can be extrapolated to susceptible viruses of other subtypes, e.g. H1N1, and in particular to the pandemic (H1N1) 2009 virus which display significant differences in the catalytic pocket of the neuraminidase¹⁴.

We must acknowledge several limitations to our study. First, this preliminary analysis was conducted on a partial set of data after enrolment of 541 patients instead of the 900 initially planned. However, it is highly unlikely that the lower response of the combination as

compared to oseltamivir would have been reversed if all originally-planned 900 patients had been enrolled. Second, the proportion of patients with unavailable viral swab on day 2 was higher in the combination arm. As the missing value equals failure, this may have biased the results in the combination arm. However, in the analysis of the 414 patients with available day 0 and day 2 nasal swabs, the same trends were observed. Third, even if the analysis in the fully adherent patients confirmed the results, it provides no information on the appropriate use of the diskhaler device. Finally, the virological response was assessed only in one site (nose) and at one time (day 2) which prevents extrapolation of the results to the entire virological response over time and throughout the respiratory tract. However, clinical endpoints completed the picture, giving information on the overall response.

During winter 2009, oseltamivir monotherapy appeared more effective than oseltamivir-zanamivir combination and than zanamivir monotherapy in adults with seasonal influenza A virus infection; oseltamivir should be the first line recommended anti influenza treatment.

Acknowledgments

We are grateful to Pr Antoine Flahault for active support during the conception phase, to the members of the independent committee for their highly contributive advices, to Dr. Marc Guerrier for his fruitful support in the ethical aspect of the research, to Pr Philippe Ravaud for stimulating discussion, and to Roche and GSK laboratories for providing oseltamivir, zanamivir and corresponding placebos. We are indebted to Mathilde Benassaya, David Briand, Frédérique Cuvelier, Sébastien Le Gal, Vanessa Roca (NIC Northern France) and to Réda Ihsani, Audrey Bonnetin (NIC Southern France) for excellent technical assistance.

We thank all members of the different teams and contributors who collaborate to the trial for excellent support, all investigators and patients for active participation in the study.

Conflicts of interest:

Xavier Duval	Conference invitation from Glaxo-Smith Kline-Beecham Lectures fees from Roche, Gilead
Sylvie van der Werf	None
Thierry Blanchon	None
Anne Mosnier	None
Maude Bouscambert - Duchamp	None
Annick Tibi	None
Vincent Enouf	None
Cécile Charlois - Ou	None
Corine Vincent	None
Laurent Andreoletti	None
Florence Tubach	None
Bruno Lina	Consulting fees from Roche and Novartis Lectures fees from Sanofi Pasteur
France Mentré	Fees from Roche, preclinical pharmacokinetic department for a course on MONOLIX in December 2008
Catherine Leport	None

APPENDIX

Bivir Study Group:

Scientific Committee:

Steering Committee: Leport C (principal investigator), Andreoletti L, Blanchon T, Carrat F, Duval X, Guimfack A, Lina L, Loubière S, Mentré F, Mosnier A, Tibi A, Tubach F, van der Werf S.

Clinical Study manager: Charlois - Ou C.

Others members: Bricaire F, Cohen JM, Flahault A, Moatti JP, Vogel JY.

Invited members: Eid Z (GSK), Peurichard C (GSK), Pecking M (Roche), Dantin S (Roche), Gysembergh-Houal A (AP-HP).

Independent committee: Chêne G, Hannoun C, Vittecoq D.

Monitoring and statistical analysis: Boucherit S, Dornic Q, Quintin C, Vincent C., and Atlanstat, Studypharm clinical research organisations.

Clinical investigators: Alea JR, Aleonard JL, Arditti L, Baranes C, Beaujard J, Beaurain C, Behar M, Beignot-Devalmont P, Biquet D, Blanchard M, Blot E, Bodin X, Bouaniche H, Boulet L, Bourgeois O, Bretillon F, Breton N, Broyer F, Buffler P, Camper E, Carissimo P, Carrera J, Causse P, Cayet JP, Cayron P, Cazard C, Chaix C, Chazerans D, Cheftel JA, Codron G, Cooren G, Coutrey L, Crappier JJ, Daugenet C, Dauzat C, Defreyne F, Delamare G, Delsart D, Demure P, Desmarchelier P, Domenech A, Dubois D, Laroy G, Dubrana E, Dumond P, Dumont A, Durel G, Ellé P, Evellin F, Eyraud P, Fhal G, Fournillou JC, Galesne Herceg G, Gastan G, Geoffray B, Giagnorio P, Goguel J, Granger JF, Guenee P, Haushalter B, Huber C, Hureau JP, Jacob L, Jami A, Jordan E, Jourde P, Journet L, Julien D, Jusserand JT, Korsec P, Laforest G, Lalanne G, Le Duff N, Le Guen-Naas A, Le Hir A, Lebois S, Leclerc S, Leclere V, Lejay D, Lejoly JM, Lemoine C, Lepine C, Lepoutre B, Leprince P, Lhoumeau P, Lognos B, Lustig G, Mannessier B, Marlier M, Marmor P, Martocq G, Massot J, Meme B, Mercier P, Mercier G, Mesnier PL, Meyrand G, Mongin G, Montavont J, Morlon P, Pantea D, Parisot J, Partouche H, Pertusa MC, Petot A, Peyrol Y, Piketty B, Poignant G, Pradere H, Rabaud D, Rachine L, Ragon B, Rambaud J, Richard P, Rigail P, Robinson D, Rosenberg S, Ruetsch M, Sacareau D, Saint Lannes M, Saugues M, Sauvage P, Schaupp T, Schmitt C, Sellam A, Severin JF, Simian B, Specht L, Szmuckler I, Tetaud D, Trehou P, Triantaphylides JC, Triot P, Uge P, Urbain F, Urbina JC, Vailler P, Vallez V, Varnier H, Venot N, Verhun R, Vogel JY, Zanuttini-Vogt C, Zeline V.

References

1. Burch J, Corbett M, Stock C, et al. Prescription of anti-influenza drugs for healthy adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* Sep 2009;9(9):537-545.
2. Hayden FG, Osterhaus AD, Treanor JJ, et al. Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenzavirus infections. GG167 Influenza Study Group. *N Engl J Med.* Sep 25 1997;337(13):874-880.
3. Nicholson KG, Aoki FY, Osterhaus AD, et al. Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomised controlled trial. Neuraminidase Inhibitor Flu Treatment Investigator Group. *Lancet.* May 27 2000;355(9218):1845-1850.
4. Treanor JJ, Hayden FG, Vrooman PS, et al. Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute influenza: a randomized controlled trial. US Oral Neuraminidase Study Group. *Jama.* Feb 23 2000;283(8):1016-1024.
5. Jefferson T, Jones M, Doshi P, Del Mar C. Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults: systematic review and meta-analysis. *Bmj.* 2009;339:b5106.
6. Puhakka T, Lehti H, Vainionpaa R, et al. Zanamivir: a significant reduction in viral load during treatment in military conscripts with influenza. *Scand J Infect Dis.* 2003;35(1):52-58.
7. Randomised trial of efficacy and safety of inhaled zanamivir in treatment of influenza A and B virus infections. The MIST (Management of Influenza in the Southern Hemisphere Trialists) Study Group. *Lancet.* Dec 12 1998;352(9144):1877-1881.
8. Poland GA, Jacobson RM, Ovsyannikova IG. Influenza virus resistance to antiviral agents: a plea for rational use. *Clin Infect Dis.* May 1 2009;48(9):1254-1256.
9. Wu JT, Leung GM, Lipsitch M, Cooper BS, Riley S. Hedging against antiviral resistance during the next influenza pandemic using small stockpiles of an alternative chemotherapy. *PLoS Med.* May 19 2009;6(5):e1000085.
10. Dawood FS, Jain S, Finelli L, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med.* Jun 18 2009;360(25):2605-2615.
11. Wong SC, Chan JK, Lee KC, Lo ES, Tsang DN. Development of a quantitative assay for SARS coronavirus and correlation of GAPDH mRNA with SARS coronavirus in clinical specimens. *J Clin Pathol.* Mar 2005;58(3):276-280.
12. Hayden FG, Treanor JJ, Fritz RS, et al. Use of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in experimental human influenza: randomized controlled trials for prevention and treatment. *Jama.* Oct 6 1999;282(13):1240-1246.
13. Gubareva LV, Kaiser L, Hayden FG. Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet.* Mar 4 2000;355(9206):827-835.
14. Russell RJ, Haire LF, Stevens DJ, et al. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature.* Sep 7 2006;443(7107):45-49.

Figure 1: Trial flowchart

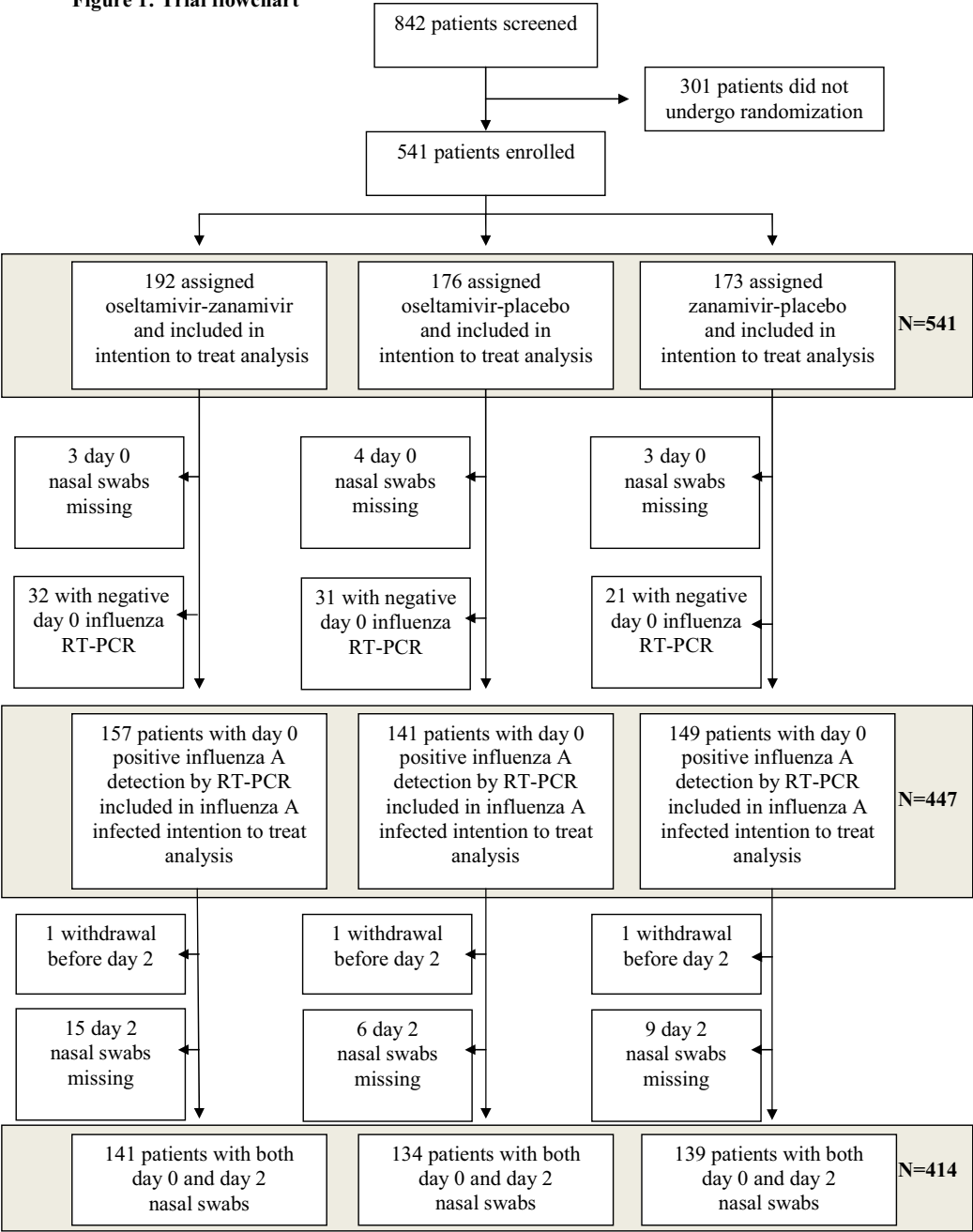


Figure 2:

Proportion of the 447 influenza A infected patients with alleviation of symptoms when treated with combined oseltamivir-zanamivir (plain line), oseltamivir plus placebo (dotted line) or zanamivir plus placebo (dashed line). Log rank test for oseltamivir - zanamivir versus oseltamivir- placebo: $p=0.025$ and for oseltamivir-zanamivir versus zanamivir- placebo: $p=0.036$). Alleviation of symptoms defined by the presence of no symptoms of nasal stuffiness, sore throat, cough, muscle aches, tiredness-fatigue, feverishness, and headache or only mild ones, for at least 24 hours

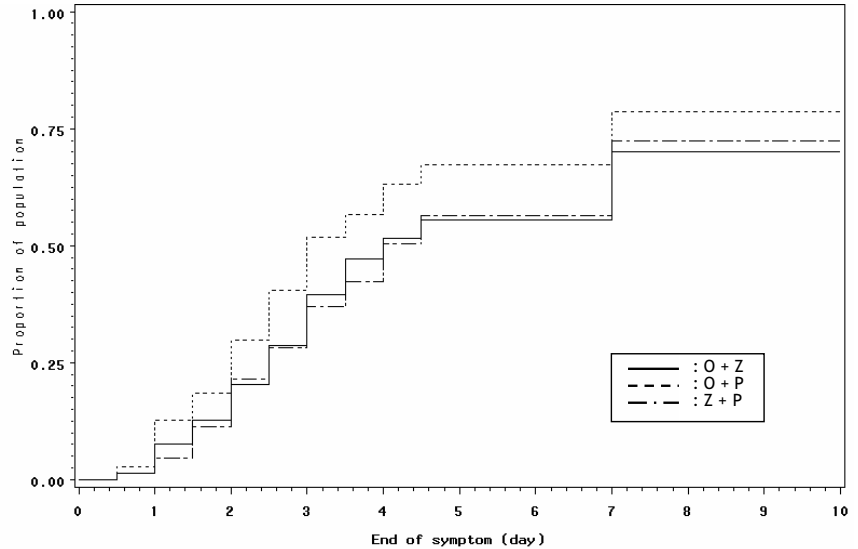


Table 1:

Characteristics of the 541 patients enrolled in the study and of the 447 influenza A infected patients according to treatment arms.

	Combined oseltamivir and zanamivir	Oseltamivir plus placebo	Zanamivir plus placebo
All patients included in the study N= 541 (%)	n=192 (35.5%)	n=176 (32.5%)	n=173 (32.0%)
Age (year) : mean (SD) [Range]	38.7 (13.2) [18.3 ; 73.2]	39.5 (13.1) [18.1 ; 76.3]	39.9 (13.8) [18.0 ; 84.2]
Male no- (%)	91 (47.6%)	92 (52.3%)	86 (49.7%)
Smoker no- (%)	34 (17.8%)	25 (14.2%)	26 (15.0%)
Comorbidities no- (%)	27 (14.1%)	27 (15.3%)	23 (13.3%)
Fever at enrollment ≥ 38°C no- (%)	123 (69.9%)	118 (73.3%)	117 (75.5%)
Initiation of treatment ≤ 24hrs after onset of symptoms no-(%)	92 (47.9%)	85 (48.3%)	101 (58.4%)
Symptoms score per patient * :			
mean (SD)	15.2 (2.8)	14.9 (3.2)	15.1 (3.2)
% of maximal score † : mean (SD)	72.4% (13.4)	71.0% (15.2)	72.1% (15.4)

Influenza A infected patients N=447 (%)n=157 (35.1%)n=141 (31.6%)n=149 (33.3%)

	Combined oseltamivir and zanamivir	Oseltamivir plus placebo	Zanamivir plus placebo
Age (year) : mean (SD) [Range]	38.7 (13.2) [18.3 ; 73.2]	39.5 (13.0) [18.1 ; 76.3]	40.1 (14.1) [18.0 ; 84.2]
Male no- (%)	76 (48.7%)	73 (51.8%)	77 (51.7%)
Smoker no- (%)	22 (14.1%)	15 (10.7%)	20 (13.4%)
Comorbidities no- (%)	21 (13.4%)	20 (14.2%)	20 (13.4%)
Fever ≥ 38°C at enrollment no- (%)	101 (67.8%)	95 (70.9%)	104 (75.9%)
Initiation of treatment ≤ 24hrs after onset of symptoms no- (%)	72 (45.9%)	68 (48.2%)	86 (57.7%)
Symptoms score per patient *:			
mean (SD)	15.6 (2.7)	15.3 (3.2)	15.5 (3.1)
% of maximal score† : mean (SD)	74.2% (12.8)	72.7% (15.2)	73.8% (15.0)
Influenza virus subtype			
H1N1	8 (5.1%)	4 (2.8%)	6 (4.0%)
H3N2	118 (75.2%)	116 (82.3%)	109 (73.2%)
Not determined	31 (19.8%)	21 (14.9%)	34 (22.8%)

Note:
* Sum of the severity of the seven day 0 influenza symptoms (feverishness, nasal stuffiness, sore throat, cough, muscle aches, tiredness-fatigue, and headache) using a 4-point scale^{2,12}
† The score is expressed as a percentage of the maximal score of 21.

Table 2:
Virological endpoints according to treatment arms in the 541 enrolled patients, in the 447 influenza A infected patients with infection, and in the 382 influenza A infected patients fully compliant between day 0 and day 2.

	Combined oseltamivir and zanamivir	Oseltamivir plus placebo	O+Z versus O P value Difference between groups [95% CI]	Zanamivir plus placebo	O+Z versus Z P value Difference between groups [95% CI]	O Versus Z* Difference between groups [95% CI]
Primary virological endpoint						
Intention to treat analysis (all enrolled patients) (N =541)	192	176		173		
Day 2 influenza RT-PCR < 200 cgeq/µL (%)	52.6%	62.5%	0.055 -9.9% [-19.9 ; 0.2]	40.5%	0.020 +12.1% [2.02 ; 22.3]	+22.0% [12.1 ; 32.0]
Intention to treat analysis (influenza A infected patients) (N= 447)	157	141		149		
Day 2 influenza RT-PCR < 200 cgeq/µL (%)	45.9%	58.9%	0.025 -13.0% [-23.1 ; -2.9]	33.6%	0.028 +12.3% [2.39 ; 22.2]	+25.3% [15.5 ; 35.2]
Intention to treat analysis (influenza A infected patients and fully compliant from day 0 to day 2) (N=382)	131	124		127		
Day 2 influenza RT-PCR < 200 cgeq/µL (%)	48.1%	62.9%	0.017 -14.8% [-24.9 ; -4.8]	37.0%	0.079 11.1% [1.0 ; 21.1]	25.9% [16.0 ; 35.8]
Secondary virological endpoints						
Influenza A infected patients with available day 0 and day 2 nasal swabs (N=414)	141	134		139		
Mean (SD) viral load at day 0 (log ₁₀ cgeq/µL)	4.36 (1.36)	4.57 (1.32)		4.34 (1.37)		

	Combined oseltamivir and zanamivir	Oseltamivir plus placebo	O+Z versus O P value Difference between groups [95% CI]	Zanamivir plus placebo	O+Z versus Z P value Difference between groups [95% CI]	O Versus Z* Difference between groups [95% CI]
Mean (SD) viral load at day 2 (log ₁₀ cgeq/µL)	2.22 (1.12)	2.08 (1.17)		2.66 (1.35)		
Mean (SD) viral load decrease between day 0 and 2 (log ₁₀ cgeq/µL)	2.14 (1.54)	2.49 (1.52)	0.060 -0.35 [-0.8 ; 0.07]	1.68 (1.68)	0.016 0.46 [0.03 ; 0.9]	0.81 [0.4 ; 1.3]
Influenza A infected patients with available day 0 and day 2 nasal swabs influenza A infected patients and fully compliant from day 0 to day 2 (N=365)	123	121		121		
Mean (SD) viral load at day 0 (log ₁₀ cgeq/µL)	4.40 (1.28)	4.58 (1.31)		4.34 (1.37)		
Mean (SD) viral load at day 2 (log ₁₀ cgeq/µL)	2.22 (1.15)	2.02 (1.16)		2.59 (1.37)		
Mean (SD) viral load decrease between day 0 and 2 (log ₁₀ cgeq/µL)	2.17 (1.51)	2.56 (1.55)	0.051 -0.4 [-0.8 ; 0.1]	1.76 (1.71)	0.044 0.4 [0.0 ; 0.9]	0.8 [0.3 ; 1.3]

Note
CI: Confidence interval. O: oseltamivir, Z: zanamivir.
* Exploratory analysis.

Table 3
Clinical response according to treatment arms in the 541 enrolled patients, in the 447 influenza A infected patients, and in the 382 influenza A infected patients and **fully** compliant between day 0 an day 2.

	Combined oseltamivir and zanamivir	Oseltamivir plus placebo	O+Z versus O P value Difference between groups [95% CI]	Zanamivir plus placebo	O+Z Versus Z P value Difference between groups [95% CI]	O Versus Z* Difference between groups [95% CI]
Intention to treat analysis (all enrolled patients) (N =541)	192	176		173		
Duration of symptoms in days (median, IQR)	3.5 [2.5-14]	3.0 [2-7]	0.015 +0.5 [0.0 ; 1.5]	4.0 [2.5-14]	0.78 -0.5 [-1.0 ; 0.5]	-1.0 -1.5 ; -0.5]
Number (%) of patients with clinical event during treatment	26 (13.5%)	15 (8.5%)	0.14 +5.0%	23 (13.3%)	1.00 +0.3%	-4.8%
- antibiotics	17 (8.9%)	10 (5.7%)		13 (7.5%)		
- pneumonia	2 (1.0%)	1 (0.6%)	[-1.3 ; 11.4]	0 (0.0%)	[-6.7 ; 7.2]	[-11.2 ; 1.6]
- other	21 (10.9%)	14 (8.0%)		22 (12.7%)		
Number (%) of patients with alleviation of symptoms at end of treatment	111(57.8%)	122 (69.3%)	0.023 -11.5% [-21.3 ; -1.7]	100 (57.8%)	1.00 0.0% [-10.1 ; 10.1]	+11.5% [1.7 ; 21.3]
Score of symptoms at end of treatment (median, IQR)	3 [2-5]	2 [1-4]	0.0006 1.0 [0.0 ; 1.0]	3 [1-6]	0.79 0.0 [-1.0 ; 0.0]	-1.0 -2.0 ; -1.0]
Intention to treat analysis (influenza A infected patients) (N= 447)	157	141		149		
Duration of symptoms in days (median, IQR)	4.0 [2.5-14]	3.0 [2-7]	0.018 +1.0 [0.0 ; 4.0]	4.0 [2.5-14]	0.96 0.0 [-3.0 ; 3.0]	-1.0 -4.0 ; 0.0]
Number (%) of patients with clinical event during treatment	19 (12.1%)	10 (7.1%)	0.17 +5.0%	18 (12.1%)	1.00 +0.02%	-5.0%
- antibiotics	14 (8.9%)	7 (5.0%)		10 (6.7%)		
- pneumonia	2 (1.3%)	1 (0.7%)	[-1.0 ; 11.0]	0 (0.0%)	[-6.6 ; 6.7]	[-1.0 ; 11.0]
- other	15 (9.6%)	9 (6.4%)		17 (11.4%)		

	Combined oseltamivir and zanamivir	Oseltamivir plus placebo	O+Z versus O P value Difference between groups [95% CI]	Zanamivir plus placebo	O+Z Versus Z P value Difference between groups [95% CI]	O Versus Z* Difference between groups [95% CI]
Number (%) of patients with alleviation of symptoms at end of treatment	87 (55.4%)	95 (67.4%)	0.043 -12.0% [-21.8 ; -2.1]	84 (56.4%)	0.91 -1.0% [-11.1 ; 9.2]	+11.0% [1.1 ; 20.9]
Score of symptoms at end of treatment (median, IQR)	3 [2-5]	2 [1-4]	0.013 +1 [0.0 ; 1.0]	3 [1-6]	0.93 0 [-1.0 ; 0.0]	-1 -2.0 ; -0.5]
Intention to treat analysis (influenza A infected patients and fully compliant from day 0 to day 2) (N=382)	131	124		127		
Duration of symptoms in days (median, IQR)	4.0 [2.5-14]	3.0 [2-7]	0.030 +1 [0.0 ; 1.5]	4.0 [2.5-14]	0.74 0 [-1.0 ; 1.0]	-1 -1.5 ; -0.25]
Number (%) of patients with clinical event during treatment	15 (11.5%)	9 (7.3%)	0.29 +4.2%	14 (11.0%)	1.00 +0.4%	-3.8%
- antibiotics	11 (8.4%)	6 (4.8%)		7 (5.5%)		
- pneumonia	2 (1.5%)	1 (0.8%)	[-2.9 ; 11.3]	0 (0.0%)	[-7.3 ; 8.1]	[-10.9 ; 3.3]
- other	12 (9.2%)	8 (6.5%)		13 (10.2%)		
Number (%) of patients with alleviation of symptoms at end of treatment	78 (59.5%)	89 (71.8%)	0.048 -12.2% [-23.8 ; -0.7]	76 (59.8%)	1.00 -0.3% [-12.3 ; 11.7]	+11.9% [0.3 ; 23.6]
Score of symptoms at end of treatment (median, IQR)	3 [2-5]	2 [1-4]	0.008 +1 [0.0 ; 1.0]	3 [1-5]	0.85 0 [-1.0 ; 1.0]	-1 -2.0 ; 0.0]

Note:
O: oseltamivir, Z: zanamivir. CI: Confidence interval.
* Exploratory analysis.

ANNEXE 2

IN VITRO CHARACTERIZATION OF NATURALLY OCCURING INFLUENZA
A(H3N0) VIRUSES LACKING THE NA GENE SEGMENT: TOWARD A NEW
MECHANISM OF VIRAL RESISTANCE.

*V. Moules, O. Ferraris, O. Terrier, E. Guidice, M. Yver, J.P. Rolland, **M. Bouscambert-Duchamp**, C. Bergeron, M. Ottmann, E. Fournier, A. Traversier, C. Boule, A. Rivoire, L. Yipu, A. Hay, M. Valette, R. Marquet, M. Rosa-Calatrava, N. Naffakh, G. Schoehn, D. Thomas, B.Lina.*

Accepté dans Virology, 27 avril 2010.

Manuscript Number:

Title: In vitro characterization of naturally occurring influenza A(H3N0) viruses lacking the NA gene segment: toward a new mechanism of viral resistance?

Article Type: Regular Article

Section/Category: 5 Emerging Viruses

Keywords: Orthomyxoviridae; influenza; hemagglutinin; neuraminidase; viral resistance; cryo-EM

Corresponding Author: Dr Vincent Moules, Ph.D

Corresponding Author's Institution: CNRS FRE3011

First Author: Vincent Moules, Ph.D

Order of Authors: Vincent Moules, Ph.D; Olivier Ferraris, Ph.D; Olivier Terrier, Ph.D; Emmanuel Giudice, Ph.D; Matthieu Yver, Master; Jean-Paul Rolland, Ingenior; Maude Bouscambert Duchamp, Ph.D; Corinne Bergeron, Ph.D; Michelle Ottmann, Ph.D; Emilie Fournier, Ph.D; Aurelien Traversier, Ingenior; Christelle Boule, Ingenior; Annie Rivoire, Ph.D; Lin Yipu, Ph.D; Alan Hay, Ph.D; Martine Valette, Pharm.D; Roland Marquet, Ph.D; Manuel Rosa-Calatrava, Ph.D; Nadia Naffakh, Ph.D; Guy Schoehn, Ph.D; Daniel Thomas, Ph.D; Bruno Lina, MD Ph.D

Abstract: Among a panel of 788 clinical influenza H3N2 isolates, two isolates were characterized by an oseltamivir-resistant phenotype linked to the absence of any detectable NA activity. Here, we established that the two H3N0 isolates lack any detectable full-length NA segment, and one of these could be rescue by reverse genetics in the absence of any NA segment sequence. We found that the absence of NA segment induced a moderate growth defect of the H3N0 viruses as on cultured cells. The glycoproteins density at the surface of H3N0 virions, was unchanged as compared to H3N2 virions. The HA protein as well as residues 188 and 617 of the PB1 protein were shown to be strong determinants of the ability of H3N0 viruses to grow in the absence of the NA segment. The significance of these findings about naturally occurring seven-segment influenza A viruses is discussed.



Laboratoire de Virologie et Pathologie Humaine – FRE CNRS 3011
Faculté de Médecine RTH Laennec
UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1
Lyon, FRANCE

Lyon, the 1th of March 2010

Dear Editor,

Please find attached a manuscript entitled “***In vitro* characterization of naturally occurring influenza A(H3N0) viruses lacking the NA gene segment: toward a new mechanism of viral resistance?**” by Vincent MOULES, Olivier FERRARIS *et al.* that we would like to submit for publication in Virology.

In a previous study, we found two influenza A H3 viruses isolated from clinical isolates, which were shown to lack NA activity and to present a resistant phenotype in cellular-based assay. Complementary analysis confirmed to absence of NA or truncated segment.

In the present study, we established that the two H3N0 isolates lack any detectable full-length NA segment and one of these could be rescue by reverse genetics in the absence of any NA segment sequence. We investigated the impact of the lack of the NA on the viral replication and viral morphology by Cryo-EM experiments of these newly discovered H3N0 viruses. Using reverse genetics and site-directed mutagenesis, the HA protein as well as the PB1 protein were shown to be strong determinants of the ability of H3N0 viruses to grow in the absence of the NA segment.

These results, beyond the first description and characterization of naturally occurring seven-segment H3 influenza A viruses, also raise the question of possible new resistance mechanisms. We believe that our results will be of interest to Virology readers, and we thank you in advance for having this manuscript reviewed.

Yours sincerely,

The authors

***In vitro* characterization of naturally occurring influenza A(H3N0) viruses lacking the NA gene segment: toward a new mechanism of viral resistance?**

V Moules^{1*}, O Ferraris^{1*}, O Terrier¹, E Giudice², M Yver¹, JP Rolland², M Bouscambert-Duchamp^{1,3}, C Bergeron¹, M Ottmann¹, E Fournier⁴, A Traversier¹, C. Boule⁵, A. Rivoire⁵, L Yipu⁶, A Hay⁴, M Valette^{1,3}, R Marquet⁴, M Rosa-Calatrava¹, N. Naffakh⁷, G. Schoehn⁸, D Thomas² and B Lina^{1,3}.

1 - Université de Lyon, F-69000, Lyon, France; Université Lyon 1, Faculté de médecine RTH Laennec; CNRS FRE 3011 VirPath, Virologie et Pathologie Humaine, F-69008, Lyon, France

2 - Université Rennes 1, CNRS Interactions Cellulaires et Moléculaires, UMR 6026, Campus de Beaulieu, bâtiment 13, F-35042 Rennes cedex, France

3 - Laboratoire de virologie, centre de Biologie et de Pathologie Est, Centre National de référence influenza région sud, WHO collaborating centre for influenza, Hospices Civils de Lyon, 59, boulevard Pinel, 69677 Bron cedex, France

4 - UPR9002 du CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue René Descartes, Strasbourg 67084 cedex, France

5 - Centre Technologique des Microstructures, EZUS LYON 1, UCBL, Villeurbanne, France

6 - MRC-National Institute for Medical Research and WHO reference center for influenza, Mill Hill, London NW7 1AA, United Kingdom

7- Institut Pasteur, Unité de Génétique Moléculaire des Virus à ARN, URA 3015 CNRS, Université Paris Diderot-Paris 7, 25 rue du Dr Roux 75015 Paris France

8 -Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, UMR 5075 CEA-CNRS-UJF, 41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 01, France

* VM and OF contributed equally to this work

Corresponding author: vincent.moules@recherche.univ-lyon1.fr; Phone: 33(0)478771037;

Fax: 33(0)478778751

Keywords: *Orthomyxoviridae*; influenza; hemagglutinin; neuraminidase; viral resistance; cryo-EM

Word count abstract: 149

Word count main text: 5918

***In vitro* characterization of naturally occurring influenza A(H3N0) viruses lacking the NA gene segment: toward a new mechanism of viral resistance?**

Abstract

Among a panel of 788 clinical influenza H3N2 isolates, two isolates were characterized by an oseltamivir-resistant phenotype linked to the absence of any detectable NA activity. Here, we established that the two H3N0 isolates lack any detectable full-length NA segment, and one of these could be rescue by reverse genetics in the absence of any NA segment sequence. We found that the absence of NA segment induced a moderate growth defect of the H3N0 viruses as on cultured cells. The glycoproteins density at the surface of H3N0 virions, was unchanged as compared to H3N2 virions. The HA protein as well as residues 188 and 617 of the PB1 protein were shown to be strong determinants of the ability of H3N0 viruses to grow in the absence of the NA segment. The significance of these findings about naturally occurring seven-segment influenza A viruses is discussed.

Introduction

Human influenza viruses are responsible for mild to severe respiratory tract infections. Influenza A viruses present two major surface glycoproteins, the hemagglutinin (HA) and the neuraminidase (NA). The HA is a trimeric type 1 membrane glycoprotein involved in the binding to cell surface sialoconjugate receptors and in the fusion between the viral envelope and cellular endosomal membranes. The NA removes sialic acids from the HA protein as well as from cellular glycolipids or glycoproteins, thereby preventing the aggregation of virus particles and allowing the release of virus from host cell receptors (Palese *et al.* 1974). The sialidase activity of the NA may also enable the virus to diffuse through the abundant mucin layer at the surface of the respiratory epithelium. An optimal balance between the sialic-acid binding activity of the HA and the sialidase activity of the NA appears critical for viral fitness (Mitnaul *et al.* 2000, Wagner *et al.* 2002).

The control of human seasonal influenza can be achieved by vaccination or by the use of specific antivirals. However, in the context of a pandemic, as illustrated by the current swine-origin H1N1 pandemic, vaccines are generally not available during the first phase and the use of antivirals is considered the best treatment option during this initial period. Since 1999, neuraminidase inhibitors (NAIs), zanamivir and oseltamivir, have been used in the treatment of seasonal influenza. The rate of emergence of resistant isolates after NAI treatment has been found to range from 0.4% in adults to up to 4% in children (Whitley *et al.* 2001, Abed and Boivin, 2006). Substitutions on catalytic or framework residues of the NA active site are responsible for the cases of resistance observed *in vivo* on NAI-resistant viruses recovered from both drug-treated and untreated patients as well as *in vitro* on viruses recovered from culture experiments in the presence of NAI selective pressure (for a review, Ferraris and Lina 2008). The implication of NA on replication ability is observed on variants with mutated

catalytic residues which showed reduced rates of replication and transmissibility, with the notable exception of H1N1 viruses naturally resistant to oseltamivir that emerged in 2007-08 (<http://www.who.int/csr/disease/influenza/2008-9nhemisummaryreport/en/index.html>) (Dharan *et al.* 2009). In contrast, variants with mutations on framework residues retained an efficient transmissibility (Gubareva *et al.* 1998). Moreover, selective pressure *in vitro* allowed the recovery of H1N1 viruses with a truncated NA gene segment lacking the region encoding the NA active site (Nedyalkova *et al.* 2002). Such variants with deletions were found to grow on cultured cells only in the presence of exogenous NA (Abed *et al.* 2006).

In a previous study, we analyzed the susceptibility to NAIs of human influenza A and B viruses isolated in patients presenting with acute respiratory infection between 2002 and 2005 (Ferraris *et al.* 2006). Overall, 788 viruses were tested for their NA activity using a fluorometric assay. We detected two H3 viruses that did not show any detectable NA activity even in the absence of NAI the A/Lyon-CHU/26430/03 and A/Reunion/586/04 isolates, antigenically related to A/Wyoming/3/03 and A/Wellington/1/04, respectively (Ferraris *et al.* 2006). Attempts to amplify the NA gene and to detect the NA protein by western blot on the initial clinical samples as well as on amplified viruses both failed. (Ferraris *et al.* 2006).

In the present study, we further characterized the two H3N0 A/Lyon-CHU/26430/03 and A/Reunion/586/04 isolates. We established that they lack any detectable full-length or partial-length NA segment, and that a recombinant A/Reunion/586/04 virus can be produced by reverse genetics in the absence of the NA segment. We examined the impact of the absence of NA segment and NA protein on the growth properties and the morphology of the H3N0 viruses as compared to H3N2 counterparts, and we investigated the molecular basis of their ability to grow in the absence of the NA segment.

1 **Materials and Methods**

3 ***Cells and Viruses***

4 Viruses were isolated on Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells from clinical throat or
5 nasal swabs provided by the French national influenza monitoring network GROG (Groupes
6 Régionaux d'Observation de la Grippe, France) to the WHO Collaborating Center for
7 influenza (Southern France). They were subsequently amplified on MDCK cells (2 passages).
8 The reference strains A/Moscow/10/99 H3N2 and A/California/07/04 H3N2 (kindly provided
9 by Dr A. Hay, NIMR/MRC) were amplified in the same conditions. MDCK cells were
10 purchased from Lonza (ATCC, CCL34) and were passaged twice weekly in serum free Ultra-
11 MDCK medium (Lonza) supplemented with 2mM L-glutamine (Sigma Aldrich), penicillin
12 (225 units/mL) and streptomycin (225 µg/mL) (Lonza). MDCK cells over-expressing the 2,6-
13 sialyltransferase (MDCK-SIAT1 cells) (Matrosovich *et al.* 2003) were kindly provided by
14 Professor HD Klenk (Institute of Virology, Philipps University, Marburg, Germany). When
15 indicated, *Clostridium perfringens* NA (Sigma) was added to the infection medium at a final
16 concentration of 0.002 U/ml .

18 ***Cryo-electron microscopy (Cryo-EM), measurement of viral structure and statistical*** 19 ***analysis***

20 Influenza viruses were purified by centrifugation on a 20% sucrose cushion in phosphate-
21 buffered saline. A droplet of viral preparation was applied on holey carbon grids and vitrified
22 in liquid ethane. Electron micrographs were recorded under low-dose conditions at liquid
23 nitrogen temperature with a Technai Sphera LaB6 200KV microscope. Images were collected
24 at 30.000X magnification with a defocus range of 2µm. The virion diameter and the
25 glycoprotein (GP) spacing were determined on Cryo-EM micrographs using the ImageJ

1 software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). The GP spike surface density was calculated as described
2 previously (Yamaguchi *et al.* 2008). Surface density data were subjected to ANOVA
3 statistical analysis (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>).

5 ***Ultrathin section electron microscopy***

6 For ultrastructural analysis, infected cell cultures were fixed in a 0.1 M sodium cacodylate,
7 2% glutaraldehyde solution at room temperature. After 3 washes in 0.2 M sodium cacodylate
8 buffer, the samples were post-fixed in an osmium tetroxide solution, stained with an aqueous
9 solution of uranylacetate, dehydrated in a graded series of ethanol at room temperature and
10 embedded in epon. After polymerization, ultrathin sections (65 nm thick) were cut with a
11 diamond knife and picked up onto copper grids (300 mesh). Post-staining of the sections was
12 performed on a Leica Ultrastainer with a lead citrate solution. After air drying, grids were
13 examined on a Philips CM 120 transmission electron microscope at an acceleration voltage of
14 80 kV.

16 ***Viral growth kinetics, end point titration, and quantification of viral RNA***

17 MDCK cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 10⁻⁴ TCID50/cell. After a 1-
18 hour viral adsorption period, cells were overlaid with Eagle's minimum elementary medium
19 (EMEM, Cambrex Bioscience) supplemented with 1µg/mL TPCK-trypsin (Roche diagnostics)
20 and further incubated at 34°C. Harvested supernatants were centrifuged at 1500 g for 10 min
21 and stored at -70°C until analysis. End point-titration assays were performed on confluent
22 layers of MDCK cells in 96-well plates. Briefly, 50µl of 10-fold serial dilutions of each virus
23 were inoculated into four replicate wells. The 96-well microplates were incubated at 34°C and
24 the presence of cytopathic effects (CPE) was monitored 3 days later under the microscope.
25 The presence of virus in supernatants was also confirmed by hemagglutination tests using

1 guinea pig erythrocytes. The TCID₅₀ per ml values were determined using the Reed and
2 Muench statistical method. The amounts of M viral genomic segment (M-vRNA) were
3 determined by real-time RT-qPCR as described previously (Bouscambert Duchamp *et al.*
4 2010).

5 ***Reverse genetics***

7 A/Moscow/10/99 and A/Reunion/586/04 recombinant viruses were generated by reverse
8 genetics as previously described (Hoffmann *et al.* 2000). Briefly, viral RNA was extracted
9 from infected-MDCK cell culture supernatant using the QIAmp viral RNA minikit (Qiagen)
10 according to the manufacturer's instructions. Two-step RT-PCR was carried out for full-
11 length amplification of each viral RNA gene segment, using an influenza A universal RT
12 primer (Uni-12primer « 3'-AGCAAAAGCAGG-5' », Eurogentec, Belgium) and segment-
13 specific primers described by Hoffmann et al (Hoffmann *et al.* 2000). The resulting cDNAs
14 were cloned into the pHW2000 vector (Hoffmann *et al.* 2000). Sets of 8 recombinant
15 pHW2000 plasmids were mixed with the Superfect reagent (Qiagen) in Opti-MEM (GIBCO-
16 BRL), according to the manufacturer's instructions, and added to 293T cells in six-well tissue
17 culture plates. At 48 h post-transfection, viruses in the culture supernatant were harvested and
18 diluted 1/10 in EMEM medium supplemented with TPCK-trypsin (1 µg/ml) to infect
19 confluent layers of MDCK cells.

20

21 ***Fluorometric NA activity and inhibition tests***

22 The neuraminidase activity was determined by a fluorometric assay as described previously
23 (Ferraris *et al.* 2005). Twenty five µl of the viral stocks were serially diluted twofold and
24 incubated with 50µl of 200µM 2-(4-methylumbelliferyl)-alpha-D-N-acetylneuraminic acid (4-
25 MUNANA) substrate (Sigma) at 37°C for 1 h. The enzymatic reaction was stopped by the

1 addition of 150µl of 50mM glycine (pH 10.4). The fluorescence level of the released 4-
2 methylumbelliferone was determined at an excitation wavelength of 355nm and an emission
3 wavelength of 460nm with a BMG Labtek fluorometer.

4

5 ***Transfections and CAT assays***

6 The pPR-FluA-CAT and pPR-H3-CAT plasmids, which direct the expression of influenza NS
7 and H3 viral-like RNAs, respectively have been described earlier (Labadie *et al.* 2007).
8 Subconfluent monolayers of 293T cells in 12 well plates were transfected using the FUGENE
9 6 reagent (Roche) according to the manufacturer instructions. Briefly, mixes of the
10 pHW2000-PB1, -PB2, -PA, -NP (0.5, 0.5, 0.5, 1 µg) and the pPR-FluA-CAT or pPR-H3-
11 CAT plasmid (0.5 µg) were resuspended in 45 µL of OPTI-MEM medium (Invitrogen) with
12 5 µL of FUGENE 6 and were distributed onto cells. Following 24h of incubation at 37°C, cell
13 extracts were prepared in 250 µL of the lysis buffer provided with the CAT ELISA kit
14 (Roche), and tested for CAT levels. This procedure allows detection of 0.05 ng/mL CAT.

15

Results

Growth Kinetics of H3N0 viruses on cultured cells

Two influenza viruses, A/Lyon-CHU/26430/03 and A/Reunion/586/04, showed no detectable sialidase activity when tested out of 786 A(H3N2) viruses isolated during the 2002-2005 period of time (Ferraris *et al.* 2005). No amplification product could be detected after extraction of viral RNA and RT-PCR amplification using primers specific for the untranslated regions of the N2 segment (Hoffmann *et al.* 2000). To further characterize these two H3N0 viruses, plaque purification was performed and 30 plaque-purified viruses were analyzed. The absence of any detectable NA activity and any detectable full-length or partial-length NA segment was confirmed on all purified viruses (data not shown), strongly suggesting that the genome of the A/Lyon-CHU/26430/03 and A/Reunion/586/04 viruses consists of only 7 genomic segments.

Upon amplification on MDCK cells, the H3N0 viruses showed properties similar to contemporary H3N2 viruses, *i.e.* the ability to agglutinate guinea pig but not chicken erythrocytes, a mild cytopathic effect, and significant replication yields even in the absence of exogenous bacterial sialidase (data not shown). To compare the growth kinetics of H3N2 and H3N0 viruses, MDCK cells were inoculated at a multiplicity of infection (MOI) of 10^{-4} and the release of viral progeny into the supernatant was monitored up to 72 h post infection (p.i.) by determining the infectious titers or by quantifying the amounts of M genomic segment (M-vRNA) by real-time RT-PCR. As shown in **Figure 1A**, the infectious titers in the supernatant of MDCK cells infected with the H3N2 reference A/California/07/04 increased exponentially and reached a maximal titer of $10^{7.3}$ TCID₅₀/ml at 42 h pi. The growth curves of the two H3N0 viruses A/Lyon-CHU/26430/03 and A/Reunion/586/04 appeared delayed. Titers measured at 24 h pi for the H3N0 viruses were about 2 log lower compared to

A/California/07/04, but maximal titers measured at 66h pi were in the same range (about $10^{7.4}$ TCID₅₀/ml) as for the H3N2 strain. The curves corresponding to the accumulation of the M-vRNA in the supernatant of MDCK infected cells showed the same trend, although maximal concentrations were reached simultaneously at 42 h pi for the A/California/07/04 and for H3N0 viruses (**Figure 1B**). An additional H3N2 strain, A/Moscow/10/99, showed a growth curve very similar to the H3N0 viruses (**Figure 1C**).

MDCK cells that stably over-express the human (alpha)2-6 sialyltransferase (MDCK-SIAT1 cells), proved to be a more suitable system than MDCK cells to monitor the role of neuraminidase during the growth process (Matrosovich *et al.* 2003) probably due to the fact that the high amounts of sialyl- α 2,6-Galactose-containing receptors at the surface of MDCK-SIAT1 cells increase viral dependency on NA sialidase activity. The kinetics of M-vRNA accumulation in the supernatant of MDCK-SIAT cells infected with H3N2 and H3N0 viruses were compared. The maximal concentrations of M vRNA measured at 68 h pi were about two log higher for the H3N2 strains ($10^{11.7}$ copies/ml) as compared to the H3N0 viruses ($10^{8.5}$ and $10^{9.2}$ copies/ml for the A/Lyon-CHU/26430/03 and A/Reunion/586/04 viruses, respectively) (**Figure 1C**). Altogether, our data confirmed that the H3N0 viruses were able to replicate in the absence of NA activity, and showed only but a moderate growth defect on MDCK or MDCK-SIAT cells.

Morphological analysis of H3N0 virions by cryo-Electron Microscopy

To determine the impact of the lack of NA segment and NA protein on viral morphology, ice-embedded virions from purified A/California/07/04 H3N2, A/Reunion/586/04 H3N0 and A/Lyon-CHU/26430/03 H3N0 were observed by cryo-electron microscopy (cryo-EM). Two independent viral preparations of each strain were analyzed. Electron micrographs were recorded under low-dose conditions at liquid nitrogen temperature with a Technai Sphera

LaB6 200kV microscope. Images were collected at 30 000x magnification in a defocus range between 2 and 3 μm . All observed particles showed glycoprotein spikes protruding from the virion surface (**figure 2**). We decided against using the classification previously proposed by Harris and colleagues based on the observation of the viral matrix protein and internal organization by cryo-electron tomography (Harris *et al.* 2006), since these viral features were not clearly visible on cryo-EM samples. Instead, the virions were classified by shape into three groups based on the axial ratios. Viruses with an axial ratio ranging between 1.0 and 1.2, 1.2 and 1.6, or >1.6 were respectively classified as spherical, spheroidal or elongated. The three classes of particle shapes were equally represented for the A/California/07/04 H3N2 viruses, with 37.9% (n=22) spherical, 32.8% spheroidal (n=19) and 29.3% elongated (n=17) virions (**figure 2** and **table I**). In contrast, for the A/Reunion/586/04 H3N0 viruses, only spherical (50% n=14) and elongated particles (50% n=14) were observed (**figure 2** and **table I**). For the A/Lyon-CHU/26430/03 H3N0 viruses, 70.0% (n=21) of the virions were spherical and 30.0% (n=9) were spheroidal (**figure 2** and **table I**). The spherical A/California/07/04 particles had a reduced mean diameter (88.5 $\pm$ 9.3 nm) compared to the A/Reunion/586/04 and A/Lyon-CHU/26430/03 particles (96.6 $\pm$ 16.7 and 102.7 $\pm$ 10.5 nm, respectively) (**table I**) whereas no differences in diameter were observed among spheroidal and elongated virions. These observations were in agreement with previously published data on the variability in particle shape and size of influenza A viruses (Booy *et al.* 1985, Fujioshi *et al.* 1994 and Harris *et al.* 2006).

The stalks of the spike glycoproteins (GPs) were easily distinguishable (**figure 2D, arrow**) between the lipid bilayer and the electron opaque layer formed by the GP globular heads, allowing us to count the GPs and to measure the average spacing for a group of 4 GPs (4 GP-spacing). The average spacing measured for the A/California/07/04 H3N2 virus was 26.9 $\pm$ 8.8 nm (n=100, **table I**). From this data we could calculate the average surface corresponding

to 4x4 GPs, and an estimated number of 695 surface GPs for a spherical virion of 100 nm in diameter. Analysis of the A/Moscow/10/99 H3N2 strain led to similar findings (data not shown). The average 4 GP-spacing measured for the A/Reunion/586/04 and A/Lyon-CHU/26430/03 H3N0 viruses was 27.0 $\pm$ 1.7 nm (n=80) and 28.1 $\pm$ 1.4 nm (n=48), respectively, which corresponded to estimated numbers of 689 and 637 surface GPs per spherical virion of 100 nm in diameter, respectively (**table I**). The average 4 GP-spacing values showed no significant differences between the different shape classes for a given virion (**table I**), and between the A/California/07/04, A/Reunion/586/04 and A/Lyon-CHU/26430/03 viruses (p>0.01). Altogether, our data suggest that despite the lack of NA protein, H3N0 viruses display similar surface GP densities as compared to H3N2 viruses.

Ultrastructural analysis of H3N0 virions by Electron Microscopy

To investigate the internal organization of H3N0 viruses, electron microscopy ultrathin sections of A/Reunion/586/04, A/Lyon-CHU/26430/03 and A/California/07/04 virions budding from MDCK cells at 24 h following low-multiplicity infection were compared. Representative results are shown in **figure 3**. Transversal sections of budding virions appeared spherical in shape, with a diameter of 90-100nm, whereas longitudinal sections virion appeared elongated and presented different lengths (data not shown), in agreement with our cryo-EM data. The majority of A/California/07/04 transversal sections showed the same electron dense-dot organization, i.e. a central dot surrounded by seven other dots (**figure 3A**). Such an organization, each dot likely representing a viral ribonucleoprotein, has previously described by Noda and colleagues (Noda *et al.* 2006). In contrast, a significant proportion of A/Reunion/586/04 and A/Lyon-CHU/26430/03 transversally sectioned particles appeared empty, i.e. devoid of any electron-dense dot : 24% (n=410) and 27% (n=466) for A/Reunion/586/04 and A/Lyon-CHU/26430/03, respectively, compared to 6% (n=453) for

1 A/California/07/04 (**figure 3B** and **3C**). These observations were in agreement with the
2 absence of detectable NA segment in the A/Reunion/586/04 and A/Lyon-CHU/26430/03 viral
3 stocks, and with the model for selective packaging, according to which packaging of a full set
4 of genomic segments depends on cis-acting signals present on each of the 8 genomic
5 segments.

7 ***Reverse genetics analysis of the H3N0 viral phenotype***

8 To confirm the capacity of the A/Reunion/586/04 virus to replicate in the absence of the NA
9 segment, the cDNAs corresponding to the seven remaining genomic segments were cloned in
10 the bidirectional reverse genetics (RG) plasmid pHW2000 (Hoffmann *et al.* 2000). A set of 8
11 pHW2000-derived RG plasmids was constructed for the A/Moscow/10/99 H3N2 strain (MO).
12 The seven A/Reunion/586/04-derived RG plasmids, either or not supplemented with the
13 A/Moscow/10/99-derived NA plasmid, were co-transfected into 293T cells. Co-transfection
14 of eight (whole sets) or seven (whole sets minus the NA plasmid) A/Moscow/10/99-derived
15 RG plasmids was used as a control. Transfection supernatants were harvested at 72 h post-
16 transfection and diluted 1/10 to infect confluent monolayers of MDCK cells. The viral titers
17 and the amounts of M-vRNA in MDCK cells supernatants were evaluated at 72 h post-
18 infection by real-time RT-PCR. About 10^{11} copies of M-vRNA/ml were detected upon
19 transfection of the eight A/Moscow/10/99-derived RG plasmids (**figure 4**, MO, hatched bar).
20 In contrast, in the absence of the NA plasmid, no hemagglutinating activity and M-vRNA
21 concentrations lower than 10^5 copies/ml were detected (**figure 4**, MO, grey bar). Similar
22 results were obtained with the A/Wellington/1/04 H3N2 virus (data not shown). The low M-
23 vRNA levels detected in the absence of NA most likely corresponded to the detection of
24 residual pHW2000-M plasmid. In contrast, titers 10^{11} copies of M-vRNA/ml were detected
25 upon transfection of the seven A/Reunion/586/04-derived RG plasmids (**figure 4**, R2, grey

1 bar), and the addition of the A/Moscow/10/99-derived NA plasmid did not induce significant
2 changes (**figure 4**, R2, hatched bar).

3 These data suggested that some genetic features of the A/Reunion/586/04 genome accounted
4 for its unique ability to grow efficiently in the absence of the NA segment. In order to test for
5 the presence of such genetic determinants on the HA segment, we attempted to rescue
6 A/Moscow/10/99 x A/Reunion/586/04 (M0 x R2) 6:1 reassortant viruses carrying the HA
7 segment from MO in combination with the PB1, PB2, PA, NP, M, and NS segments from R2
8 (5 R2 : HA-MO), or the HA segment from R2 in combination with the PB1, PB2, PA, NP, M,
9 and NS segments from MO (5 MO : HA-R2). The reverse genetics protocol was as described
10 above. No hemagglutinating activity and M-vRNA concentrations lower than 10^6 copies/ml
11 were detected upon viral amplification on MDCK cells (**figure 4**, V1 and V2, grey bars).
12 When the A/Moscow/10/99-derived NA plasmid was added, viral titers for the 5-MO : R2-
13 HA virus increased significantly (**figure 4**, V1, hatched bar), whereas viral titers for the 5-R2
14 : MO-HA virus remained low (**figure 4**, V2, hatched bar). These data suggested that the HA
15 segment was necessary but not sufficient to restore the R2 phenotype.

16 To investigate further the genetic basis of the R2 phenotype, we attempted to rescue
17 additional 6 : 1 MO x R2 reassortant viruses, carrying the R2-HA segment together with
18 various combinations of MO and R2 segments (V3 to V7 in **figure 4**). Addition of the M and
19 NS segments of R2 to the R2-HA segment was not sufficient to restore the R2 phenotype, i.e.
20 a significant viral production in the absence of the NA segment (**figure 4**, V3, grey bar). In
21 contrast, addition of the PB1, PB2, PA and NS segments did restore the R2 phenotype (**figure**
22 **4**, V6, grey bar), suggesting that at least one of the segments encoding the polymerase
23 subunits was necessary. Combination of the R2-PB1 segment with the R2-HA segment and
24 the PB2, PA, NP, M and NS segments from MO led to a significant viral production in the
25 absence of the NA segment, at levels similar to those observed for the R2 virus (**figure 4**, V7,

grey bar). On the other hand, introduction of the MO-PB1 segment in the R2 background prevented viral production in the absence of the NA segment (**figure 4**, V4, grey bar), but not in the presence of the NA segment (**figure 4**, V4, hatched bar). Our data indicated that a strong determinant of R2 phenotype was present of the R2-PB1 segment. However, when tested alone in the MO background, the R2-PB1 segment did not restore the R2 phenotype (**figure 4**, V5, grey bar). Taken altogether, these data established that the combination of both the R2-HA and R2-PB1 segments was necessary and sufficient to confer an MO x R2 reassortant virus the ability to grow efficiently on MDCK cells in the absence of the NA segment.

Genetic analysis of PB1 determinants of the H3N0 strains

Four amino acids differ between the PB1 proteins from the A/Reunion/586/04 and A/Lyon-CHU/26430/03 H3N0 viruses on one hand, and the PB1 protein from the A/Moscow/10/99 H3N2 virus on the other hand. These amino acid substitutions could potentially contribute to the ability of H3N0 viruses to grow in the absence of the NA segment. The K/E (H3N0/H3N2) substitution at residue 188 is located within the nuclear localization signal of PB1 (Akkina *et al.* 1987, Fodor *et al.* 2004). The substitutions, D/N, N/D and Q/R (H3N0/H3N2) substitutions at residues 617, 619 and 621, respectively, are located within the interaction domain of PB1 with PB2 (Gonzalez *et al.* 1996).

In order to identify the residues determinant with respect to the H3N0 phenotype, we characterized a new series of recombinant 6:1 reassortants which harboured the MO-PB1 segment, either wild-type or mutated at one or several of residues 188, 617, 619 and 621, in the R2 background. As mentioned earlier, the reassortant virus harbouring the wild-type MO-PB1 segment in the R2 background did not replicate efficiently in the absence of the NA segment (**figure 5**, V4, grey bar), but it did so in the presence of the NA segment (**figure 5**,

V4, hatched bar). Introduction of the single K188E substitution or the three D617N, N619D and Q621R substitutions in MO-PB1 did not allow the recovery of a replication competent A(H3N0) virus (**figure 5**, V4.1 and V4.2, grey bars). When the NA segment was added, the K188E mutant virus was produced at high titers (about 10^{11} copies of M-vRNA / ml), whereas the triple 617-619-621 mutant was produced at low titers (about $10^{7.8}$ logs copies of M-vRNA / ml), suggesting that the triple mutation on its own was detrimental (**figure 5**, V4.1 and V4.2, hatched bars). Simultaneous introduction of the 188 and the triple 617-619-621 mutations on MO-PB1 led to an efficient viral production in the absence of the NA segment, both when combined with 6 R2-derived segments (**figure 5**, V4.3, grey bar) and when combined with the R2-HA segment and 5 MO-derived segments (**figure 5**, V4.4, grey bar). The effect of a unique substitution at residue 617, 619 or 621 of PB1 was tested, in the background of the MO-PB1 : R2 reassortant virus and in combination with the K188E substitution. All three mutant viruses grew efficiently when the NA segment was added (**figure 5**, V4.5 to V4.7, hatched bars), but the only virus which grew efficiently in the absence of the NA segment was the K188E + N617D double mutant.

To investigate further the functional differences between the PB1 proteins from A/Moscow/10/99 (MO) or A/Reunion/586/04 (R2), transient *in vivo* reconstitution of viral ribonucleoproteins was performed in the presence of an H3 or an NS viral-like CAT RNA. Transcription/replication of the viral-like reporter RNAs was determined by measuring CAT levels in extracts prepared from transfected 293T cells. As shown in **figure 6**, the levels of CAT measured with the R2 proteins were 1 to 2 log higher as compared to the MO proteins. When R2-PB1 was expressed in association with the MO-PB2, -PA and -NP proteins, or conversely when MO-PB1 was expressed in association with the R2-PB2, PA and NP proteins, intermediate levels of CAT were measured, indicating that the PB1 protein contributed to the difference observed between the activities of MO- and R2-derived RNPs.

Discussion

In the present study, two influenza isolates, A/Lyon-CHU/26430/03 and A/Reunion/586/04, which showed no detectable sialidase activity when tested along with 788 additional H3N2 isolates from the 2003-2005 period, as described previously (Ferraris *et al.* 2006), were further examined. Upon characterization of plaque-purified progeny viruses, we clearly established that the A/Lyon-CHU/26430/03 and A/Reunion/586/04 lacked the integrality of the NA segment and propagated a viral genome composed of 7 segments. This property is unique as compared to previously described NA-defective viruses, which retain a deleted NA segment throughout serial amplifications on cultured cells although they do not express a functional NA protein (Liu *et al.* 1993, 1995; Hughes *et al.* 2000). The ability of the A/Reunion/586/04 virus, but not the H3N2 reference strain A/Moscow/10/99, to replicate efficiently in the absence of any NA segment sequence was confirmed using reverse genetics.

The growth kinetics of the A/Lyon-CHU/26430/03 and A/Reunion/586/04 H3N0 viruses on MDCK and MDCK-SIAT1 cells were delayed as compared to H3N2 reference strains. The end-point viral yields were in the same range for H3N0 and H3N2 viruses on MDCK cells whereas they were about 2-log lower for H3N0 as compared to H3N2 viruses on MDCK-SIAT1 cells, in agreement with the fact that higher amounts of Sialyl- α 2,6-Galactose-containing receptors at the surface of MDCK-SIAT1 cells increase viral dependency on NA sialidase activity (Matrosovitch *et al.* 2003). In addition to the absence of sialidase activity, a reduced efficiency of genome packaging probably contributes to the moderate growth defect of H3N0 viruses. Indeed, upon cryo-EM analysis, an increased proportion of particles with no visible ribonucleoproteins was observed in H3N0 (about 25%) as compared to H3N2 viral stocks (about 6%). The NA segment sequences that are usually retained in the genome of NA-defective viruses correspond to the non-coding sequences and sequences encoding the

cytoplasmic tail and transmembrane region of the NA protein at the 3' end, and the non-coding sequences at the 5' end (Yang *et al.* 1997). These sequences were shown to be required for efficient incorporation of the viral genome in budding particles (Fujii *et al.* 2003), which is in favor of the existence of a selective mechanism underlying the concomitant packaging of a set of 8 genomic segments. The increased proportion of empty particles in the H3N0 viral stocks most probably corresponds to a packaging defect, due to the absence of NA packaging signals (Hutchinson *et al.* 2009).

Published data suggest that the sequences present at the extremities of influenza genomic segments might also be required for viral morphogenesis and stability (Yang *et al.* 1997, Hughes *et al.* 2000, Enami *et al.* 1996). We observed no major morphological defect of the H3N0 virions upon cryo-EM analysis as compared to H3N2 viruses. Both H3N0 and H3N2 viruses showed variable shapes and sizes, in agreement with previously published observations (Booy *et al.* 1985, Fujioshi *et al.* 1994 and Harris *et al.* 2006). Most authors agree that the NA/HA ratio at the surface of influenza A viruses is about 1/5 (Harris *et al.* 2006, Fujioshi *et al.* 1994). The high resolution of cryo-EM allowed us to measure the average spacing of surface glycoproteins stalks and to extrapolate the surface glycoproteins density, precisely enough to detect a ~20% reduction that could result from the absence of NA tetramers. Interestingly, our data revealed no marked difference in the surface glycoprotein density between H3N0 and H3N2 viruses, which suggested that the surface density of the H3 was up-regulated in H3N0 as compared to H3N2 viruses. This higher HA density could simply correspond to a steric compensation of the absence of NA but the existence of other underlying mechanisms cannot be excluded.

Using reverse genetics, we established that both the HA and the PB1 segments of the A/Reunion/586/04 H3N0 virus accounted for its ability to replicate efficiently in the absence

1 of the NA segment. Mutations on the HA that reduce viral binding to sialic acids, and thus
2 reduce viral dependence on NA activity, have been found to confer resistance to
3 neuraminidase inhibitors (Gubareva *et al.* 2001). Such mutations on the HA of H3N0 viruses
4 could also possibly provide a compensation for the absence of NA protein. Sequence
5 alignment revealed that the A/Reunion/586/04 and A/Lyon-CHU/26430/03 isolates differed
6 from the antigenically related H3N2 strains, A/Wellington/1/04 and A/Wyoming/3/03,
7 respectively, at four and seven positions, respectively (**table II, supplementary data figure 1**
8 **and 2**). Several substitutions (e.g. the K145N and K173E substitutions characteristic of the
9 A/Reunion/586/04 isolate, and the N126Q and V186G substitutions characteristic of the
10 A/Lyon-CHU/26430/03 isolate) are located on protruding loops in the vicinity of the receptor
11 binding site. In particular, the K173E and N126Q substitutions, which are predicted to
12 increase the negative charges at the distal end of the HA, might alter the electrostatic
13 interactions between viral particles and the cell surface. Notably, the K173E substitution also
14 differentiates the A/Reunion/586/04 from the A/Moscow/10/99 virus (**table II**), and may have
15 contributed to the phenotypic differences observed in our reverse genetics experiments. The
16 N126Q substitution leads to the loss of a potential glycosylation site, and has been shown to
17 reduce the affinity of an H5 protein for sialic acids (Nobusawa and Nakajima 1988, Simirnov
18 *et al.* 2004). The V186G substitution may reduce steric hindrance, increase the flexibility and
19 affect the conformation of the sialic acid binding pocket. The amino-acid substitutions
20 occurring at position 226 are also worthy of comment, especially since they occur at a
21 position previously described as influencing the binding of the sialic acid of HAs (Rogers *et*
22 *al.* 1983, Nobusawa and Nakajima 1988 and Bateman *et al.* 2008).
23 In addition to these amino acid substitutions, increased amounts of carbohydrates on the HA,
24 due to the absence of desialylation by the NA, may modulate the binding affinity of the HA to
25 the host receptors and thus may also contribute to the H3N0 phenotype. Indeed, previous

1 studies have shown that the removal of sialic acids from oligosaccharides adjacent to the
2 receptor binding site of the HA by the NA protein increases the hemadsorption activity of
3 influenza viruses (Brassard and Lamb 1997, Tong *et al.* 1998).
4
5 Here, we focused on the contribution of the PB1 segment of the A/Reunion/586/04 isolate to
6 the ability to grow in the absence of an NA segment. The PB1 segment encodes three viral
7 proteins. The PB1 protein is an RNA-dependent RNA polymerase and is the core subunit of
8 the heterotrimeric PB1-PB2-PA polymerase complex that ensures transcription and
9 replication of the viral genome in the nucleus of infected cells (Elton *et al.* 2006). The PB1-F2
10 protein, which is encoded in an alternative reading frame in the A/Reunion/586/04 virus but
11 not in all influenza viruses, was found to be a pro-apoptotic and a virulence factor (Chen *et al.*
12 2001), as well as as a regulator of the viral polymerase activity (Mazur *et al.* 2008). The
13 functions of the third most recently PB1-encoded protein, a truncated form of the PB1 protein
14 (N40) are largely unknown (Wise *et al.* 2009). Sequence alignment between PB1-F2 of
15 H3N0 and H3N2 revealed no amino acid substitutions (data not shown). Based on PB1
16 sequence alignments and on reverse genetics experiments, we established that the nature of
17 both residues 188 and 617 of the PB1 protein (corresponding to residues 148 and 577 of the
18 N40 protein) were determinant with respect to the ability of the A/Reunion/586/04 isolate to
19 replicate efficiently in the absence of the NA segment. The A/Reunion/586/04-derived PB1
20 protein was also found to increase the efficiency with which a viral-like RNA underwent
21 transcription/replication upon transient reconstitution of viral ribonucleoproteins, compared to
22 the A/Moscow/10/99-derived PB1 protein. The nature of residue 188, which is located within
23 a nuclear localization signal of PB1 (Akkina *et al.* 1987, Fodor *et al.* 2004), could potentially
24 have an impact on the nuclear accumulation of PB1, whereas the nature of residue 617, which
25 is located within the interaction domain of PB1 with PB2, could modulate the assembly

1 and/or stability of the polymerase complex. Interestingly, a synergistic effect of substitutions
2 at residues 188 and 617 was observed.

3 How does the observation of an increased polymerase activity conferred by the PB1 protein of
4 the R2 virus relate to its ability to grow in the absence of the NA segment remains to be
5 established. One hypothesis is that an enhanced polymerase activity could result in an
6 increased expression of the HA protein, which would allow viral attachment to the target cells
7 despite a lower affinity of the HA for sialic acids. Such an increased expression of the HA
8 could account for our observation that the density of glycoproteins at the surface of H3N0
9 virions was unchanged as compared to H3N2 virions. This hypothesis is also in agreement
10 with recent reports of an enhanced polymerase activity being correlated with an increased
11 accumulation of the NA (Wanitchang *et al.* 2010) or the HA protein (Marjuki H *et al.* 2007)
12 on the cell surface. A second hypothesis is that an increased polymerase activity could result
13 in an increased production and accumulation of viral ribonucleoproteins at the assembly site,
14 which would allow the incorporation of sets of 7 genomic segments in budding particles,
15 despite an overall decrease in the packaging efficiency due to the absence of the NA
16 packaging signals.

17 Although H3N0 viruses were isolated from nasal swabs in two patients, nasal swabs, the fact
18 that they did not diffuse in the human population, taken together with our observation of their
19 growth defect on MDCK-SIAT1 cells as compared to H3N2 viruses, suggest that these
20 viruses may replicate poorly *in vivo*. A bacterial co-infection, resulting in the expression of a
21 bacterial neuraminidase and favoring the multiplication of H3N0 variants, could not be
22 established from the analysis of nasal swabs, but cannot be excluded. Thus, it is still
23 uncertain whether or not the loss of the whole NA segment could represent a mechanism of
24 emergence of naturally NAI-resistant viruses able to diffuse in the human population. Most
25 interestingly, analysis of these H3N0 viruses suggests that molecular features of the PB1

1 segment could strongly modulate the HA/NA ratio at the cell surface and thus the HA/NA
2 balance. By doing so, the PB1 segment could have a significant impact on the virulence,
3 transmissibility and host-range of human and animal influenza viruses. The finding, by us and
4 by others, of an impact of the PB1 segment on the amount of glycoproteins expressed at the
5 virions surface may lead to some improvement in the design of influenza vaccines in the
6 future (Wanitchang *et al.* 2010). Finally our demonstration that H3N0 viruses can be grown *in*
7 *vitro* efficiently in the absence of exogenous NA could prove useful for the development of
8 influenza-based vectors expressing an heterologous gene, and complementary to already
9 existing approaches (Shinya *et al.* 2004).

12 Acknowledgments

13 We are grateful to HD Klenk and M Matrosovich (Institute Virology, Marburg, Germany) for
14 providing MDCK-SIAT1 cells. We also wish to thank J Skehel for his helpful discussion.

References

Abed Y, Boivin G. Treatment of respiratory virus infections. *Antiviral Research*. 2006a 70: 1-16. Review.

Abed Y, Baz M, Boivin G. Impact of neuraminidase mutations conferring influenza resistance to neuraminidase inhibitors in the N1 and N2 genetic backgrounds. *Antivir Ther*. 2006;11(8):971-6.

Akkina RK, Chambers TM, Londo DR, Nayak DP. Intracellular localization of the viral polymerase proteins in cells infected with influenza virus and cells expressing PB1 protein from cloned cDNA. *J Virol*. 1987 Jul;61(7):2217-24

Bouscambert Duchamp M, Casalegno J, Gillet Y, Frobert E, Bernard E, Escuret V, Billaud G, Valette M, Javouhey E, Lina B, Floret D, Morfin F. PANDEMIC A(H1N1)2009 INFLUENZA VIRUS DETECTION BY REAL TIME RT-PCR : IS VIRAL QUANTIFICATION INTERESTING? *Clin Microbiol Infect*. 2010 Jan 28.

Booy FP, Ruigrok RW, van Bruggen EF. Electron microscopy of influenza virus. A comparison of negatively stained and ice-embedded particles. *J Mol Biol*. 1985 Aug 20;184(4):667-76.

Bateman AC, Busch MG, Karasin AI, Bovin N, Olsen CW. Amino acid 226 in the hemagglutinin of H4N6 influenza virus determines binding affinity for alpha2,6-linked sialic acid and infectivity levels in primary swine and human respiratory epithelial cells. *J Virol*. 2008 Aug;82(16):8204-9.

Brassard DL, Lamb RA. Expression of influenza B virus hemagglutinin containing multibasic residue cleavage sites. *Virology*. 1997 Sep 29;236(2):234-48.

Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, Yewdell JW. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*. 2001 Dec;7(12):1306-12.

Dharan NJ, Gubareva LV, Meyer JJ, Okomo-Adhiambo M, McClinton RC, Marshall SA, St George K, Epperson S, Brammer L, Klimov AI, Bresee JS, Fry AM; Oseltamivir-Resistance Working Group. Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the United States. *JAMA*. 2009 Mar 11;301(10):1034-41.

Enami M, Enami K. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins stimulate the membrane association of the matrix protein. *J Virol*. 1996 Oct;70(10):6653-7.

Elton, D., P. Digard, L. Tiley, and J. Ortin. 2006. Structure and function of the influenza virus RNP, p. 1-36. *In* Influenza virology: current topics. Caister Academic Press, Wymondham, United Kingdom.

Ferraris O, Lina B. Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. *J Clin Virol*. 2008 Jan;41(1):13-9. Epub 2007 Dec 11.

Ferraris O, Kessler N, Valette M, Lina B. Evolution of the susceptibility to antiviral drugs of A/H3N2 influenza viruses isolated in France from 2002 to 2005. *Vaccine*. 2006 Nov 10;24(44-46):6656-9.

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

Fujiyoshi Y, Kume NP, Sakata K, Sato SB. Fine structure of influenza A virus observed by electron cryo-microscopy. *EMBO J*. 1994 Jan 15;13(2):318-26.

Fodor E, Smith M. The PA subunit is required for efficient nuclear accumulation of the PB1 subunit of the influenza A virus RNA polymerase complex. *J Virol*. 2004 Sep;78(17):9144-53.

Fujii Y, Goto H, Watanabe T, Yoshida T, Kawaoka Y. Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Feb 18;100(4):2002-7.

Gubareva LV, Matrosovich MN, Brenner MK, Bethell RC, Webster RG. Evidence for zanamivir resistance in an immunocompromised child infected with influenza B virus. *J Infect Dis*. 1998 Nov;178(5):1257-62.

Gonzalez S, Zurcher T, Ortin J. Identification of two separate domains in the influenza virus PB1 protein involved in the interaction with the PB2 and PA subunits: a model for the viral RNA polymerase structure. *Nucleic Acids Res*. 1996 Nov 15;24(22):4456-63.

Gubareva LV, Webster RG, Hayden FG. Comparison of the activities of zanamivir, oseltamivir, and RWJ-270201 against clinical isolates of influenza virus and neuraminidase inhibitor-resistant variants. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Dec;45(12):3403-8.

Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 May 23;97(11):6108-13.

Harris A, Cardone G, Winkler DC, Heymann JB, Brecher M, White JM, Steven AC. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Dec 12;103(50):19123-7.

Hutchinson EC, von Kirchbach JC, Gog JR, Digard P. Genome packaging in influenza A virus. *J Gen Virol*. 2010 Feb;91(Pt 2):313-28. Epub 2009 Dec 2. Review.

Hughes MT, Matrosovich M, Rodgers ME, McGregor M, Kawaoka Y. Influenza A viruses lacking sialidase activity can undergo multiple cycles of replication in cell culture, eggs, or mice. *J Virol*. 2000 Jun;74(11):5206-12.

Labadie K, Dos Santos Afonso E, Rameix-Welti MA, van der Werf S, Naffakh N. Host-range determinants on the PB2 protein of influenza A viruses control the interaction between the viral polymerase and nucleoprotein in human cells. *Virology*. 2007 Jun 5;362(2):271-82.

Liu C, Air GM. Selection and characterization of a neuraminidase-minus mutant of influenza virus and its rescue by cloned neuraminidase genes. *Virology*. 1993 May;194(1):403-7.

Mitnaul LJ, Matrosovich MN, Castrucci MR, Tuzikov AB, Bovin NV, Kobasa D, Kawaoka Y. Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus. *J Virol*. 2000 Jul;74(13):6015-20.

Matrosovich M, Matrosovich T, Carr J, Roberts NA, Klenk HD. Overexpression of the alpha-2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J Virol*. 2003 Aug;77(15):8418-25.

Mazur I, Anhlan D, Mitzner D, Wixler L, Schubert U, Ludwig S. The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell Microbiol*. 2008 May;10(5):1140-52.

Marjuki H, Yen HL, Franks J, Webster RG, Pleschka S, Hoffmann E. Higher polymerase activity of a human influenza virus enhances activation of the hemagglutinin-induced Raf/MEK/ERK signal cascade. *Virol J*. 2007 Dec 5;4:134.

Nedyalkova MS, Hayden FG, Webster RG, Gubareva LV. Accumulation of defective neuraminidase (NA) genes by influenza A viruses in the presence of NA inhibitors as a marker of reduced dependence on NA. *J Infect Dis*. 2002 Mar 1;185(5):591-8.

Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida H, Cheng RH, Kawaoka Y. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature*. 2006 Jan 26;439(7075):490-2.

Nobusawa E, Nakajima K. Amino acid substitution at position 226 of the hemagglutinin molecule of influenza (H1N1) virus affects receptor binding activity but not fusion activity. *Virology*. 1988 Nov;167(1):8-14.

Palese P, Tobita K, Ueda M, Compans RW. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology*. 1974 Oct;61(2):397-410.

Rogers GN, Paulson JC. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology*. 1983 Jun;127(2):361-73.

Smirnov YA, Gitelman AK, Govorkova EA, Lipatov AS, Kaverin NV. Influenza H5 virus escape mutants: immune protection and antibody production in mice. *Virus Res*. 2004 Feb;99(2):205-8.

Shinya K, Fujii Y, Ito H, Ito T, Kawaoka Y. Characterization of a neuraminidase-deficient influenza A virus as a potential gene delivery vector and a live vaccine. *J Virol*. 2004 Mar;78(6):3083-8.

Tong N, Nobusawa E, Morishita M, Nakajima S, Nakajima K. M protein correlates with the receptor-binding specificity of haemagglutinin protein of reassortant influenza A (H1N1) virus. *J Gen Virol*. 1998 Oct;79 (Pt 10):2425-34.

Wagner R, Matrosovich M, Klenk HD. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev Med Virol*. 2002 May-Jun;12(3):159-66.

Whitley RJ, Hayden FG, Reisinger KS, Young N, Dutkowski R, Ipe D, Mills RG, Ward P. Oral oseltamivir treatment of influenza in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2001 Feb;20(2):127-33. Erratum in: *Pediatr Infect Dis J* 2001 Apr;20(4):421.

Wise HM, Foeglein A, Sun J, Dalton RM, Patel S, Howard W, Anderson EC, Barclay WS, Digard P. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol*. 2009 Aug;83(16):8021-31.

Wanitchang A, Kramyu J, Jongkaewwattana A. Enhancement of reverse genetics-derived swine-origin H1N1 influenza virus seed vaccine growth by inclusion of indigenous polymerase PB1 protein. *Virus Res*. 2010 Jan;147(1):145-8.

Yamaguchi M, Danev R, Nishiyama K, Sugawara K, Nagayama K. Zernike phase contrast electron microscopy of ice-embedded influenza A virus. *J Struct Biol*. 2008 May;162(2):271-6.

Yang P, Bansal A, Liu C, Air GM. Hemagglutinin specificity and neuraminidase coding capacity of neuraminidase-deficient influenza viruses. *Virology*. 1997 Mar 3;229(1):155-65.

Tables and figures legends

Table I. Image analysis of viral particles in cryo-EM. Shapes, diameters, axis lengths and determination of GP spike number at the viral surface.

Table II. HA amino acid sequence alignment

HA sequence alignment between A/Reunion/586/04, A/Lyon-CHU/26430/03, A/Wellington/1/04, A/Wyoming/3/03 and A/Moscow/10/99 strains

Figure 1. Kinetics of replication *in vitro*

A. MDCK cells were inoculated with influenza virus at a MOI of 0,0001 in EMEM + 1µg/ml of trypsin, A/California/07/04 H3N2, A/Lyon-CHU/26430/03 H3N0, A/Reunion/586/04 H3N0. After one hour at 34°C, the supernatant was discarded, the cells were washed with PBS 1X and fresh medium were added. Samples of supernatants were harvested at predefined time points. The virus released was then quantified by end point titration. **B.** MDCK cells were inoculated with influenza virus at a MOI of 0,0001 in EMEM + 1µg/ml of trypsin, A/Moscow/10/99 H3N2, A/California/07/04 H3N2, A/Lyon-CHU/26430/03 H3N0, A/Reunion/586/04 H3N0. After one hour at 34°C, the supernatant was discarded, the cells were washed with PBS 1X and fresh medium were added. Samples of supernatants were harvested at predefined time points. The virus released was then quantified by M RNA quantification by Real time RTPCR. **C.** SIAT 1 cells were inoculated with influenza virus at a MOI of 0,0001 in EMEM + 1µg/ml of trypsin, A/Moscow/10/99 H3N2, A/California/07/04 H3N2, A/Lyon-CHU/26430/03 H3N0, A/Reunion/586/04 H3N0. After one hour at 34°C, the supernatant was discarded, the cells were washed with PBS 1X and fresh medium were added. Samples of supernatants were harvested at predefined time points. The virus released was then quantified by M RNA quantification by Real time RTPCR.

Figure 2. Ice-embedded A(H3N2) and A(H3N0) influenza virions observed in cryo-electron microscopy, produced and purified from MDCK cells. **A.** representative micrographs of H3N0 A/Reunion/586/04. **B., C, D** respectively zoom vignettes of H3N2 A/California/10/04, H3N0 A/Reunion/586/04, and A/Lyon-CHU/26430/03. Scale bars 100 nm. Arrows in **C** indicate the glycoprotein spikes.

Figure 3. Ultrathin section electron microscopy micrographs of budding influenza A(H3N2) and A(H3N0) viruses. **A.** A/California/07/04, **B.** A/Reunion/586/04, **C.** A/Lyon-CHU/26430/03. Black scale bar: 200 nm.

Figure 4. Viral titers of recombinant viruses R2/MO. Virus titers were expressed as mean log₁₀ M copies/ml, standard errors (SE) from two or more experiments. “MO” : gene of A/Moscow/10/99 H3N2, “R2” : gene of A/Reunion/586/04 H3N0, “CPE + or -” : respectively detectable or non detectable growth, and HA titer < or > 2UHA/50µl, “7+1” : gene composition identical to the 7 segments composition with the addition of the NA segment from A/Moscow/10/99 H3N2 (hatched bar). Error bars correspond to RTQPCR triplicates.

Figure 5. Viral titers of recombinant PB1 virus.es R2/MO Virus titers were expressed as mean log₁₀ M copies/ml, standard errors (SE) from two or more experiments. “MO” : gene of A/Moscow/10/99 H3N2, “R2” : gene of A/Reunion/586/04 H3N0, “CPE + or -” : respectively detectable or non detectable growth, and HA titer < or > 2UHA/50µl, “7+1” : gene composition identical to the 7 segments composition with the addition of the NA

segment from A/Moscow/10/99 H3N2 (hatched bar). Error bars correspond to RTQPCR triplicates. Numbers in the PB1 box correspond to mutations realized in the PB1 gene.

Figure 6. CAT assays. gray bars : NS viral-like RNA (MO = 100%) ; black bars : H3 viral-like RNA

Supplementary data 1. Structural comparison of the RBS of HA A/Wellington/1/04 with HA A/Reunion/586/04.

The HAs were modelled with the program Swiss-Pdb Viewer [Electrophoresis 1997 18:2714-2723] using the human H3 (PDB: 4hmg) structure as the template. The image rendering was done using VMD [Journal of Molecular Graphics 1996 14:33-38]. For clarity, only the RBS of the HA A/Wellington/1/04 is shown, and is represented as a grey cartoon diagram. The sialic acid appears in orange. The amino acid substitutions are numbered and represented in licorice, highlighted in royal blue for A/Wellington/1/04 and red for A/Reunion/586/04. The table describes the amino acid substitutions between HA A/Wellington/1/04 and HA A/Reunion/586/04. The same colour code is used to highlight the substitution. The last column is for residues in the HA2 domain which are not shown in the above figure.

Supplementary data 2. Structural comparison of the RBS of HA A/Wyoming/3/03 with HA A/Lyon-CHU/26430/03. The HAs were modelled with the program Swiss-Pdb Viewer [Electrophoresis 1997 18:2714-2723] using the human H3 (PDB: 4hmg) structure as the template. The image rendering was done using VMD [Journal of Molecular Graphics 1996 14:33-38]. For clarity, only the RBS of the HA A/Wyoming/3/03 is shown, and is represented as a grey cartoon diagram. The sialic acid appears in orange. The amino acid substitutions are numbered and represented in licorice, highlighted in royal blue for A/Wyoming/3/03 and red for A/Lyon-CHU/26430/03. The table describes the amino acid substitutions between HA A/Wyoming/3/03 and HA A/Lyon-CHU/26430/03. The same colour code is used to highlight the substitution. The last column is for residues in the HA2 domain which are not shown in the above figure.

Figure1

[Click here to download high resolution image](#)

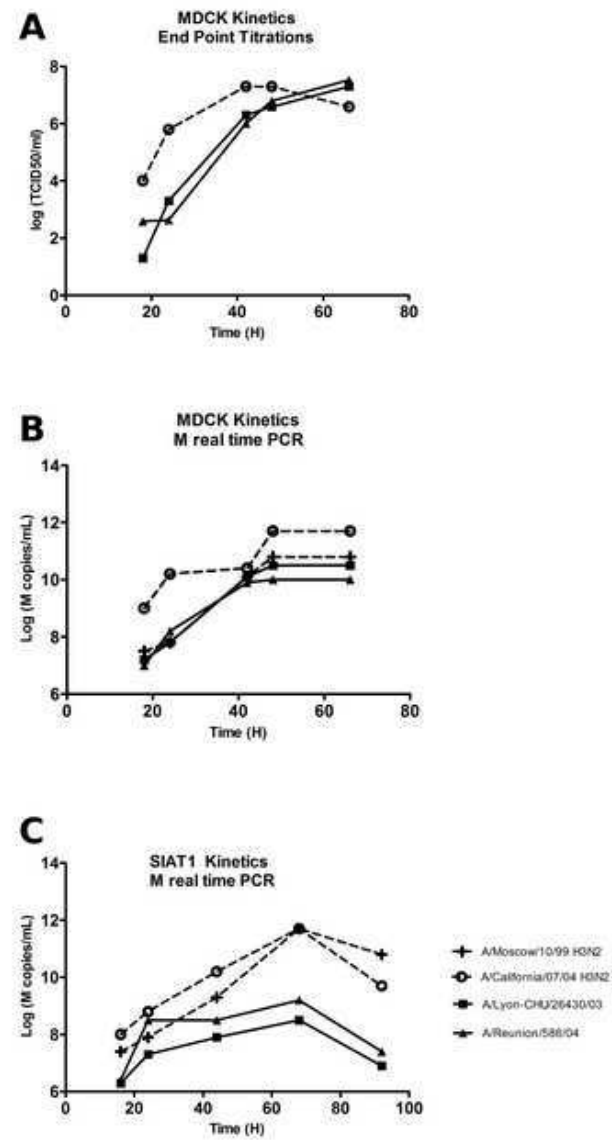


Figure 1

Figure2

[Click here to download high resolution image](#)

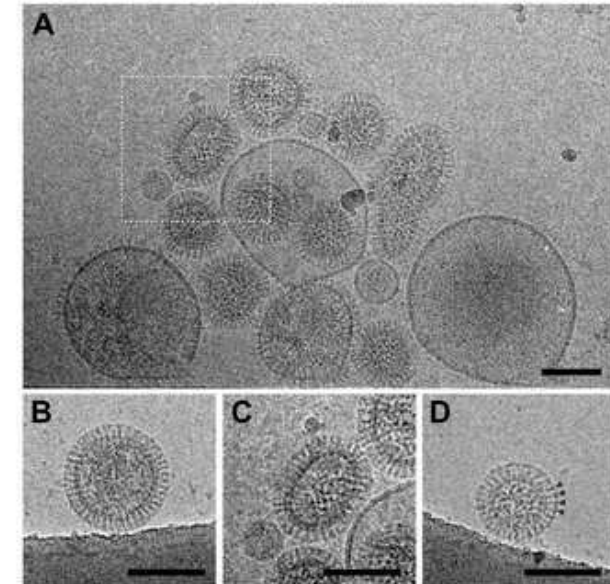


Figure 2

Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

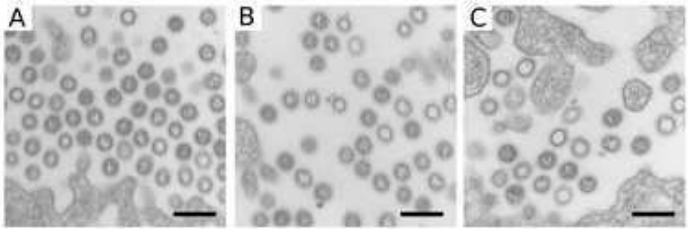


Figure 3

Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

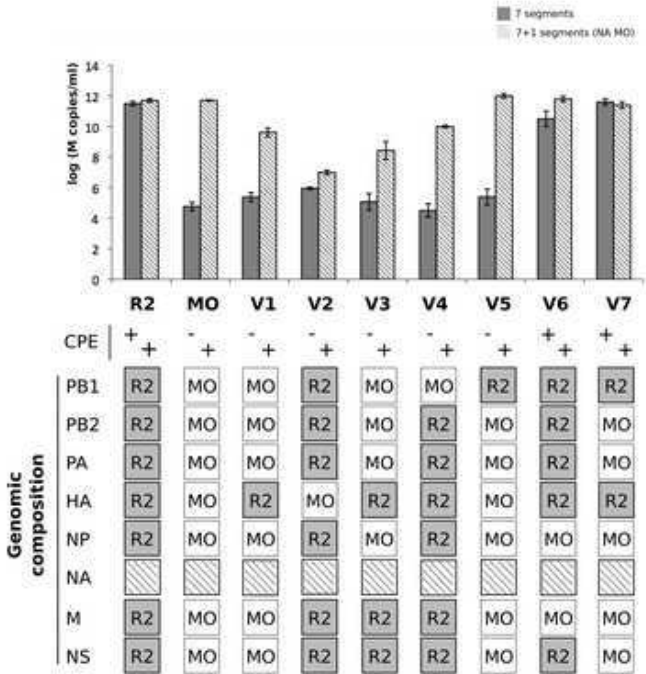


Figure 4

Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)

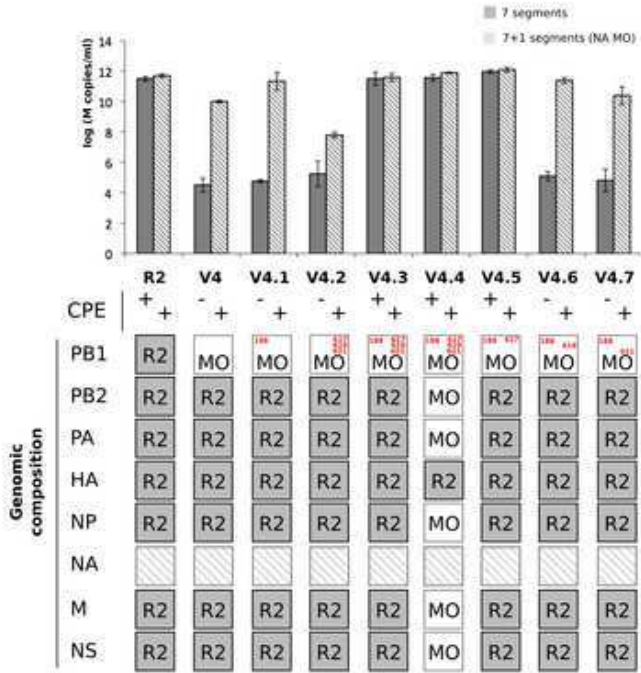


Figure 5

Figure 6
[Click here to download high resolution image](#)

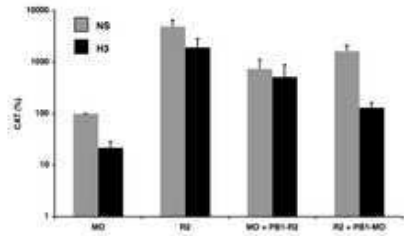


Figure 6

Table 1

Viruses	Shapes, diameters and axis lengths (average +/- SD, nm)			GP spikes	
	Spherical	Spheroidal	Elongated	4 GP spacing (average +/- SD, nm)	GP/ 100nm spherical virion
H3N2 A/California/07/04 (n=58)	37.9% (n=22) 88.5 +/- 9.3	32.8% (n=19) L: 101.4 +/- 11.0 I: 72.9+/- 6.0	29.3% (n=17) L: 126.3 +/- 19.5 I: 63.1+/- 7.8	26.9 +/- 8.8 (n=100)	695
H3N0 A/Reunion/586/04 (n=28)	50.0% (n=14) 96.6 +/- 16.7	0% (n=0) - -	50.0% (n=14) L: 129.1 +/- 17.8 I: 59.7 +/- 9.0	27.0 +/- 1.7 (n=80)	689
H3N0 A/Lyon-CHU/26430/03 (n=30)	70.0% (n=21) 102.7 +/- 10.5	30.0% (n=9) L: 109.8 +/- 11.7 I: 80.6 +/- 9.6	0% (n=0) - -	28.1 +/- 1.3 (n=48)	637

Table I

Table 2

Strains	Residue at amino acid position :														
	103	126	128	145	159	173	186	189	219	226	227	260	32	150	
A/Moscow/10/99	P	N	T	N	Y	K	S	S	S	I	S	I	T	G	
A/Wyoming/3/03	P	N	A	K	Y	K	V	S	Y	I	S	I	T	E	
A/Lyon-CHU/26430/03	P	D	T	K	Y	K	G	S	S	V	S	M	T	G	
A/Wellington/1/04	P	N	T	K	F	K	G	N	S	V	P	I	T	G	
A/Reunion/586/04	Q	N	T	N	F	E	G	N	S	I	P	I	I	G	

Table II

ANNEXE 3

OSELTAMIVIR-RESISTANT INFLUENZA A(H1N1) VIRUSES IN SOUTH OF FRANCE, 2007-2009.

*J.S. Casalegno, **M. Bouscambert-Duchamp**, V. Caro, I. Schuffenecker, M. Sabatier, A. Traversier, M. Valette, B. Lina, O. Ferraris, V. Escuret.*

Accepté dans Antiviral Research, 20 mai 2010.

Manuscript Number:

Title: Oseltamivir-resistant Influenza A(H1N1) viruses in South of France, 2007-2009

Article Type: Research Paper

Section/Category: Antivirals, preclinical & clinical development Influenza

Keywords: A(H1N1) influenza viruses; resistance to oseltamivir; H275Y mutation; in vitro replicative capacities; kinetic neuraminidase parameters

Corresponding Author: Dr Vanessa Escuret, Ph.D, P.D.

Corresponding Author's Institution: Hospices Civils de Lyon, Université de Lyon

First Author: Jean-Sébastien Casalegno

Order of Authors: Jean-Sébastien Casalegno; Maude Bouscambert-Duchamp, P.D.; Valérie Caro, Ph.D; Isabelle Schuffenecker, Ph.D, P.D.; Murielle Sabatier; Aurélien Traversier; Martine Valette, P.D.; Bruno Lina, Ph.D, M.D.; Olivier Ferraris, Ph.D; Vanessa Escuret, Ph.D, P.D.

Manuscript Region of Origin: FRANCE

Abstract: Influenza A(H1N1) viruses resistant to oseltamivir carboxylate (OC) emerged in 2007/2008 in the absence of antiviral pressure. These OC-resistant A(H1N1) viruses had a better fitness than the sensitive ones as they were 100% prevalent in 2008/2009.

To better understand the role of the neuraminidase (NA) affinity in the emergence of these OC-resistant A(H1N1) viruses we compared the NA properties among A(H1N1) clinical isolates in south of France between 2005 and 2009 and reference strains from 1977 to 2007, using NA inhibition assays, kinetic analyses of NA activities, and sequence analysis of viral NA and hemagglutinin (HA).

In 2007/2008, among 374 A(H1N1) isolates tested, 38% were resistant to OC with a mean IC50 of 564 ± 357 nM. We did not notice significant difference between the in vitro replication of OC-sensitive or resistant viruses related to A/Brisbane/59/2007 or A/New Caledonia/20/1999. The mean Km of OC-sensitive isolates (H275) was significantly lower (22.6 ± 4.7 μ M) than the Km of previous reference strains (44.9 ± 5 μ M) and the mean Km of the Y275 isolates (37.2 ± 7.7 μ M). The combination of different amino acid mutations in N1 particularly the N344G could explain the higher NA affinity of A/Brisbane/59/2007 related variants compared to the previous A(H1N1) strains and the Y275 mutation allowed to retrieve Km values near 40 μ M.

Suggested Reviewers: Laurent Kaiser MD, PhD

Pr, Laboratory of Virology, University Hospital Geneva

laurent.kaiser@hcuge.ch

Pr Laurent Kaiser is in charge with the laboratory of virology in University Hospital in Geneva. He is an expert for respiratory viruses and antiviral agents against influenza viruses.

Brunhilde Schweiger

Dr, National Influenza Center Germany, Robert Koch Institute

Dear Editor,

Please find enclosed a manuscript entitled “Oseltamivir-resistant Influenza A(H1N1) viruses in South of France, 2007-2009”

To better understand the role of the neuraminidase affinity in the natural emergence of oseltamivir-resistant isolates in 2007/2008 and 2008/2009, we present here NA enzymatic properties for A(H1N1) isolates from South of France from 2005 to 2009 and for the first time for reference A(H1N1) strains from 1977. The evolution of enzymatic neuraminidase properties was related to NA and HA sequences. Our results show that the A/Brisbane/59/2007 variants presented significant lower Km compared to previous A(H1N1) strains. The combination of different amino-acid in N1, particularly the N344G mutation could explain the lower Km of A/Brisbane/59/2007 related variants compared to previous A(H1N1) strains. The emergence of oseltamivir resistance could be explained by the fact that the H275Y mutation retrieved the Km to higher values.

All of the authors have seen and approved the content of the manuscript and have contributed significantly to the work.

We hope you will find it of interest and look forward to hearing from you.

Sincerely yours,

Dr Vanessa Escuret

Laboratoire de Virologie Est
Centre National de Référence de la Grippe France Sud
Institut de Microbiologie
Centre de Biologie et Pathologie Est – Bât A3
59 Boulevard Pinel
69677 BRON CEDEX

vanessa.escuret@chu-lyon.fr
Tél : (33) (0)4 72 12 96 50
Fax : (33) (0)4 72 12 95 00

Virologie et Pathologie Humaine
CNRS FRE 3011 – UCBL1
Faculté de Médecine RTH Laënnec
7 Rue Guillaume Paradin
69372 LYON CEDEX 08

vanessa.escuret@univ-lyon1.fr
Tél : (33) (0)4 78 77 10 85
Fax : (33) (0)4 78 77 87 51

1 Oseltamivir-resistant Influenza A(H1N1) viruses in South of France, 2007-2009

2

3 Jean-Sébastien Casalegno^{1,2}, Maude Bouscambert-Duchamp^{1,2}, Valérie Caro³, Isabelle
4 Schuffenecker^{1,2}, Murielle Sabatier², Aurélien Traversier², Martine Valette^{1,2}, Bruno Lina^{1,2}, Olivier
5 Ferraris^{1,2}, Vanessa Escuret^{1,2}

6

7 ¹ Hospices Civils de Lyon, National Influenza Centre (South of France), Laboratory of Virology -
8 Bât A3, 59 Boulevard Pinel, F-69677 Bron Cedex, France

9 ² Université de Lyon, Université Lyon 1, Virologie et Pathologie Humaine, CNRS FRE 3011, 7
10 rue Guillaume Paradin, F-69372 Lyon Cedex 08, France

11 ³ Pfl, Plateforme Génomique des Pathogènes et Santé Publique, Institut Pasteur, 25-28 rue du
12 Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, France

13

14 * Corresponding author

15 Vanessa Escuret at Hospices Civils de Lyon, National Influenza Centre (South of France),
16 Laboratory of Virology - Bât A3, 59 Boulevard Pinel, F-69677 Bron Cedex, , France

17 phone : +33 4 72 12 96 50

18 fax : +33 4 72 12 95 00

19 vanessa.escuret@chu-lyon.fr

20

21

Abstract

Influenza A(H1N1) viruses resistant to oseltamivir carboxylate (OC) emerged in 2007/2008 in the absence of antiviral pressure. These OC-resistant A(H1N1) viruses had a better fitness than the sensitive ones as they were 100% prevalent in 2008/2009.

To better understand the role of the neuraminidase (NA) affinity in the emergence of these OC-resistant A(H1N1) viruses we compared the NA properties among A(H1N1) clinical isolates in south of France between 2005 and 2009 and reference strains from 1977 to 2007, using NA inhibition assays, kinetic analyses of NA activities, and sequence analysis of viral NA and hemagglutinin (HA).

In 2007/2008, among 374 A(H1N1) isolates tested, 38% were resistant to OC with a mean IC_{50} of 564 ± 357 nM. We did not notice significant difference between the *in vitro* replication of OC-sensitive or resistant viruses related to A/Brisbane/59/2007 or A/New Caledonia/20/1999. The mean K_m of OC-sensitive isolates (H275) was significantly lower (22.6 ± 4.7 μ M) than the K_m of previous reference strains (44.9 ± 5 μ M) and the mean K_m of the Y275 isolates (37.2 ± 7.7 μ M). The combination of different amino acid mutations in N1 particularly the N344G could explain the higher NA affinity of A/Brisbane/59/2007 related variants compared to the previous A(H1N1) strains and the Y275 mutation allowed to retrieve K_m values near 40 μ M.

Key words:

A(H1N1) influenza viruses; resistance to oseltamivir; H275Y mutation; *in vitro* replicative capacities; kinetic neuraminidase parameters

1. Introduction

Influenza viruses epidemics cause important morbidity and mortality annually. Vaccination is the first line strategy to prevent influenza infection. However, antiviral drugs are essential to prevent and control the spread of influenza outbreaks. The surface glycoproteins hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) share the same target: the sialic acid (SA). HA allows the attachment of the virus to the cell by specific linkage between the receptor binding site and SA, whereas the NA cleaves the link between SA and HA to allow virus release from the infected cells. As a consequence, an optimal equilibrium between HA and NA activities is needed for an efficient viral multiplication (Wagner et al., 2002). The neuraminidase inhibitors (NAI) oseltamivir and zanamivir block the active site of the NA and subsequently prevent the release of new virions.

Until 2007, influenza viruses resistant to NAI were rare, representing less than 1% of the total circulating viruses (Monto et al., 2006, Escuret et al., 2008). It was postulated that resistant influenza viruses to NAI could not emerge because of a lower fitness (Ives et al., 2002, Herlocher et al., 2004). Unexpectedly, in 2007/2008 a significant proportion of influenza A(H1N1) viruses resistant to OC was detected in several countries. Norway gave the alert in december 2007 and at the end of winter 2007/2008 the mean percent of resistant isolates to OC were 25% in Europe (Lackenby et al., 2008, Meijer et al., 2009), 12,3% in USA (Dharan et al., 2009), 26% in Canada, 17% in China and only 3% in Japan (WHO 2008). In the southern hemisphere, the resistant variants continued to be transmitted and reached up to 100% in South Africa in July 2008. The following winter (2008/2009) in the USA and Canada 99% of A(H1N1) isolates were resistant to OC (Dharan et al., 2009; WHO 2009). The emergence of these OC-resistant strains was not related to any antiviral selective pressure. Indeed, these resistant viruses were detected mostly in non treated patients and only 3% were reported in Japan albeit it is the country where NAI are largely used (Kramarz et al., Euro Surveill 2009).

In a study published in 2008, Rameix-Welti et al. suggested that there could be a link between the higher NA affinity of A/Brisbane/59/2007 related viruses and the emergence of the related OC-resistant strains (Rameix-Welti et al., 2008).

The objective of our study was to better understand the role of the NA affinity in the emergence of these OC-resistant A(H1N1) viruses. We analysed isolates collected in the community or from hospitalized patients and reference strains. We examined the *in vitro* susceptibility to oseltamivir and zanamivir and sequence analysis of viral HA and NA genes were performed for some isolates for phylogenetic analysis. Ultimately neuraminidase affinity (Km) was performed for some OC-sensitive and resistant isolates and for the A(H1N1) vaccine reference strains from 1977 to 2007.

2. Material and Methods

2.1. Cells and viruses

The influenza A(H1N1) viruses described in this study were collected during winter seasons from 2005 to 2009, in the community (National Influenza Centre of the South of France) and also came from hospitalized patients with an influenza syndrome. Viruses were isolated on 3-day old confluent monolayers Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells. The A(H1N1) reference strains from 1977 studied are listed in Table 3. The A(H1N1) isolates from 2005/2006 were related to the A/New Caledonia/20/1999 and those from 2007/2008 and 2008/2009 were related to the A/Brisbane/59/2007 reference strain.

2.2. Compounds

Zanamivir and Oseltamivir carboxylate (abbreviated OC) (GS4071) were kindly provided by GlaxoSmithKline and Roche respectively and were stored at -20°C.

2.3. Fluorometric neuraminidase activity assay and IC₅₀ determination for OC and zanamivir

A fluorescent inhibition assay was performed as described in a previous study (Ferraris et al., Antiviral Research 2005). This assay was done in duplicate for each isolate. The IC₅₀ is the antiviral agent concentration able to inhibit 50% of the neuraminidase activity.

2.4. Kinetic analyses of neuraminidase activities

The Michaelis-Menten constant (Km) which reflects the affinity of NA for the substrate was evaluated on viral suspensions using the MUNANA substrate (reference M8639, Sigma) as already described (Rameix-Welti et al., AAC 2006). The substrate was used at concentrations: 5 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM, 70 µM, 100 µM. The 4-methylumbelliferone fluorescence was measured every minute during one hour with the FLUOstar OPTIMA fluorometer (BMG LABTECH) at 37°C (λ excitation = 330 nm, λ emission = 450 nm). Vi (initial velocity) were calculated for each substrate concentration and integrated in a non linear Michaelis and Menten equation by the MARS program (BMG) for Km calculation. Every isolate was tested at least in duplicate and each reference strain was tested in triplicate in different experiments each time. The results are mean of the values obtained for each experiment. The Km were determined for a selection of isolates sensitive or resistant to OC from 2005 until 2009 (Table 2) and for the reference vaccine strains from 1977 to 2007 (Table 3).

2.5. Phylogenetic analysis for the NA and the HA1 genes for a selection of isolates found sensitive or resistant to OC

Sequences of primers were kindly given by the WHO Collaborating Centre, MRC National Institute of Medical Research in London. Amplifications were done with the Isis DNA Polymerase (MB Biologicals).

The sequencing was performed by the “Plateforme Génomique des Pathogènes et Santé Publique” (Dr Valérie Caro), Institut Pasteur and by MWG/Eurofins.

The phylogenetic analysis of the N1 and HA1 sequences were performed on the alignment of sequences (numbering from ATG) from nucleotides 82 to 1330 (amino acids 28 to 443) for N1 and from nucleotides 76 to 1041 (amino acids 9 to 330 numbering after the signal peptide) for HA1. Comparison of sequences was performed with the BioEdit (7.1) program. The phylogenetic trees were constructed with Mega4 (4.0) by genetic distance matrix and calculated using the Kimura-2 parameters model with transition-to-transversion ratio of 2.0 and neighbor-joining analysis. Significant bootstrap values of 1,000 replicas are given as percentages at the nodes.

2.6. *In vitro* replicative capacities

We compared the *in vitro* replicative capacities in MDCK cells for A/New Caledonia/20/1999 and A/Brisbane/59/2007 and related OC-sensitive or resistant isolates (figure 2). Initial supernatants were quantified by real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (rt RT-PCR) in M gene (Bouscambert-Duchamp et al., 2010) in order to inoculate MDCK cells at a multiplicity of infection of 10^{-4} . Supernatants were then collected at 18, 24, 42, 48, 66 hours after infection and M gene was quantified by rt RT-PCR. Experiments were done in duplicate.

2.7. Statistical analysis

Statistical tests were performed with the Epi info V3.5.1 (CDC) program. The significance of differences between mean values was evaluated by the p-value of Student's t tests or by the non parametric Wilcoxon test. A p-value of <0.05 was regarded as statistically significant.

3. Results

3.1. Susceptibility of A(H1N1) isolates to NAI in NA inhibition assay (Table 1)

In 2005/2006 all 151 strains were sensitive to oseltamivir, but one, the A/Lyon/381/2006. In 2007/2008 among 374 A(H1N1) isolates, 38% were resistant to OC with a mean IC_{50} of 564 ± 357 nM. In the 2008/2009 season, most of the circulating influenza viruses were A(H3N2) related to A/Brisbane/10/2007(H3N2); we isolated 16 A(H1N1) viruses all related to A/Brisbane/59/2007(H1N1) and resistant to OC. All these A(H1N1) isolates remained sensitive to zanamivir.

3.2. Sequence and phylogenic analysis of viral N1 and HA1 proteins (Fig.1)

The analysis of N1 and HA1 sequences showed key positions that permit to distinguish the A(H1N1) viruses related to A/Brisbane/59/2007 (clade 2B) and those related to A/New Caledonia/20/99 (clade 1), or A/Solomon Islands/3/2006 (clade 2A). For N1, these mutations are H45N, K78E, E214G, R222Q, G249K, T287I, K329E, D344N. For HA1, only three key mutations D35N, R188K, E273K are responsible for the evolution from the clade 2A to 2B (Fig. 1).

The phylogenetic tree of N1 sequences showed that the mutation in position 275 in N1 is the only constant difference between sensitive (H275) and resistant (Y275) strains. Most of the 2008 OC-resistant isolates belonged to the same sub-clade (top of the N1 phylogenetic tree) except the A/Poitiers/655/2008 located in a different subclade. The A/Poitiers/655/2008 was D354 instead of a G354 for all the other resistant isolates. There was a marked tendency for a D354 for sensitive strains and a G354 for resistant strains. However A/New Caledonia/20/99 (clade 1) and A/Solomon Islands/3/2006 (clade 2A) sensitive to OC are G354.

The phylogenetic tree of HA1 sequences showed that sensitive and resistant viruses belonged to the same clade and were related to A/Brisbane/59/2007. However, 2008 isolates resistant or

sensitive to OC were not separated in two distinct groups like for the N1, but formed some little clusters. Notably, the isolates of the 2008/2009 season formed a particular cluster visible on the HA1 phylogenetic tree (Fig. 1). When analysing the HA1 sequences, we did not find any specific mutations that could distinguish sensitive or resistant strains to OC.

3.3. Kinetic analyses of neuraminidase activities for isolates and reference strains

The K_m were determined for a selection of isolates sensitive or resistant to OC from 2005 until 2009 (Table 2) and for the reference vaccine strains from 1977 to 2007 (Table 3).

The mean K_m for the A/New Caledonia/20/1999-like sensitive isolates (2005/2006) is $47.0 \pm 6.4 \mu M$. This K_m is similar to the mean K_m found for the reference strains from 1977 to 2006 ($44.9 \pm 5.0 \mu M$). On the contrary, the K_m for the A/Brisbane/59/2007 ($21.6 \mu M$) and for the 2007/2008 related isolates sensitive to OC ($22.6 \pm 4.7 \mu M$) are lower than the K_m of the previous strains ($p < 0.01$). The A/Lyon/381/2006 isolate resistant to OC and related to A/New Caledonia/20/1999 has a K_m ($89.3 \mu M$) higher than the K_m of the related isolates sensitive to OC ($47.0 \pm 6.4 \mu M$). Similarly but with lower absolute values, the mean K_m of A/Brisbane/59/2007-like isolates sensitive to OC ($22.6 \pm 4.7 \mu M$) is lower ($p < 0.01$) than the K_m of the related isolates resistant to OC in 2007/2008 ($33.0 \pm 7.0 \mu M$) and 2008/2009 ($38.9 \pm 9.2 \mu M$).

In order to better understand the impact of different key mutations on the NA affinity, we have correlated the K_m to the most important key positions for isolates and reference strains in Table 2 and Table 3. The presence of a Q in 222 does not seem to be responsible for the K_m diminution as the reference strains A/Urss/90/1977 and A/Brazil/11/1978 are Q222 and have relatively high K_m . The presence of a D or a G in position 354 does not seem to be related to the NA affinity as we did not find significant difference in the K_m of A/Lyon/795/2008 and A/Poitiers/655/2008. In our study, with the isolates and reference strains we used, the amino-acid K249 and N344 could be responsible for the increase in NA affinity.

198

3.4. Comparison of replicative capacities in MDCK cells (Fig. 2)

Globally, we did not notice significant difference between the *in vitro* replication of OC-sensitive or resistant viruses related to A/Brisbane/59/2007 or A/New Caledonia/20/1999. Indeed, differences were detected at 42 hours ($p = 0.038$) and 48 hours ($p = 0.032$) between the two OC-resistant strains A/Poitiers/655/2008 and A/Lyon/1337/2007 and at 18 hours ($p = 0.03$) between A/Poitiers/655/2008 and the OC-sensitive A/Lyon/1364/2007. We only noticed that the OC-resistant virus A/Lyon/381/2006 showed significant lower viral titer than A/New Caledonia/20/1999 at 18 hours ($p = 0.008$), but no difference was detected with the related OC-sensitive strain A/Lyon/750/2006.

4. Discussion :

The crystal structures of wild-type and mutant N1 from H5N1 viruses allowed a good visualisation of the molecular basis of resistance (Collins et al., 2008). As a consequence the H275Y mutation is able by itself to prevent the link of OC to the active site without disrupting the link of sialic acid and zanamivir. We did not find any other mutation neither in N1 nor in HA1 sequences that distinguished sensitive and resistant isolates to OC. However, there was a tendency for the presence of a D354 for sensitive isolates and a G354 for resistant isolates to OC as described by others (Meijer et al., 2009; Rameix-Welti et al., 2008). But sensitive reference strains are G354 and one resistant isolate (A/Poitiers/655/2008) was D354. This residue 354 is located on the external side of neuraminidase tetramer and would be too far from the active site to interfere with the active site linking (Rameix-Welti et al., 2008).

The K_m values obtained with the reference A(H1N1) strains from 1977 to 2006 were similar between them and to the ones of isolates from 2005/2006 season and tended to a mean of 45 and 47 μM respectively in our technical conditions (Tables 2 and 3). The OC-sensitive A(H1N1) variants related to A/Brisbane/59/2007 had a significantly lower K_m than the previous strains,

224 and the H275Y mutation responsible for the OC-resistance allowed to retrieve Km to higher
 225 values. These results and the Km values we obtained are in accordance with previous studies
 226 (Rameix-Welti et al., 2008; Collins et al., 2009). Our report enlarges these observations as it gives
 227 enzymatic characteristics for A(H1N1) reference strains from 1977. Km values are related to the
 228 NA affinity and this value should be correlated to the HA/NA balance and to the affinity of HA
 229 for the sialic acid substrate. It would be interesting to study the HA affinity of the different
 230 strains studied here to better understand the HA/NA balance and its potential impact in viral
 231 fitness and in the emergence of isolates resistant to OC. Regarding the impact of the different
 232 amino-acid that could explain the increase in the NA affinity, the K249 and N344 are the best
 233 candidates. These positions were suggested by previous studies (Rameix-Welti et al., 2008, Collins
 234 et al., 2009). However, the recent study of Collins et al., pointed the D344N substitution, located
 235 in the head of the molecule, to be responsible for this NA enhanced activity. Indeed, the K249
 236 could be excluded as some clade 2C variants bearing the amino-acids G249 and N344 presented
 237 low Km values (Collins et al., 2009).

238 In MDCK cells, replicative capacities were similar for A/Brisbane/59/2007, some related OC-
 239 sensitive or resistant viruses, A/New Caledonia/20/1999 and OC-sensitive related virus.
 240 Previous studies also found similar viral titers for sensitive or resistant viruses related to
 241 A/Brisbane/59/2007 (Rameix-Welti et al., 2008; Baz et al., 2010). In our study, the OC-resistant
 242 virus A/Lyon/381/2006 showed lower viral titer than the A/New Caledonia/20/1999 reference
 243 strain at 18 hours but no difference was detected with a related OC-sensitive strain (Fig. 2). We
 244 then could not demonstrate a clear difference in the replicative capacities of resistant *versus*
 245 sensitive isolates. Previous publications with A/Texas/36/1999(H1N1) and A/WSN/33(H1N1)
 246 showed a lower replication for mutated H275Y strains in MDCK cells (Ives et al., 2002; Baz et
 247 al., 2010). Results obtained after infection of ferrets with sensitive or resistant isolates related to
 248 A/New Caledonia/20/1999 are also in accordance with this observation (Herlocher et al., 2004).

249 However, different results were obtained with other influenza strains. The E119V mutation in
 250 H3N2 was well tolerated and did not compromise the virus fitness (Herlocher et al., 2004).
 251 Concerning A(H5N1), a 275Y isolate seemed to be compromised for *in vivo* transmission in
 252 ferrets (Le et al., 2005). But a study based on reverse genetic showed that the H275Y and the
 253 N295S mutations did not compromise the replication efficiency of the mutated viruses that retain
 254 their high pathogenicity *in vitro* and *in vivo* (Yen et al., 2007). *In vitro* replicative assays cannot
 255 however represent the global viral fitness of viruses and the emergence of OC-resistant viruses is
 256 a complex phenomenon difficult to limit to laboratories assays. Both OC-sensitive and resistant
 257 A/Brisbane/59/2007-like isolates were transmitted efficiently in the population but the OC-
 258 resistant ones were finally predominant and *in vivo* models are better appropriate to understand
 259 that phenomenon. *In vivo* assays in ferrets showed higher nasal wash titers for OC-resistant than
 260 OC-sensitive A/Brisbane/59/2007-like variants (Baz et al., 2010). Assays in ferrets with the
 261 A/Lyon/381/2006 isolate should be interesting to complete these *in vitro* data.

262 Kinetic parameters of the neuraminidase could provide insights to explain the emergence of the
 263 2007/2008 isolates resistant to OC. However other factors had been studied.: the genetic
 264 background could be linked to the better fitness of OC-resistant isolates. In addition to the
 265 D354G mutation in N1, specific mutations in NS1 and in PB2 (P453S) were found to be
 266 preferentially correlated with the H275Y mutation in N1 (Eshaghi et al., 2009; Gerloff et al.,
 267 2009).

268 In conclusion, the combination of different amino acid mutations in N1 particularly the N344G
 269 could explain the higher NA affinity of A/Brisbane/59/2007 variants compared to the previous
 270 A(H1N1) strains and the Y275 mutation allowed to retrieve NA affinity near 40 μ M.. The
 271 emergence of the oseltamivir-resistant A(H1N1) variants argues with the fact that the monitoring
 272 of the susceptibility of influenza viruses to NAIs and the search for new antiviral strategies
 273 against influenza viruses must continue.

275 Acknowledgments

276 We are grateful to the technicians of the National Influenza Centre (South-France), Gwendolyne
 277 Burfin, Sylvaine Faure and Rémi Laganier for isolation and identification of the viruses.
 278 We thank very much Alan Hay, Rodney Daniels and Yi Pu Lin from the WHO Collaborating
 279 Center, MRC National Institute of Medical Research in London for the sequences of primers.
 280 We thank very much Marie-Anne Rameix-Welti and Nadia Nafack for sharing their procedure to
 281 determine neuraminidase enzymatic activities and affinity.

283 Conflict of Interest

284 BL declares conflict of interest with Biocryst, Merck and Roche.

285 **Funding.** This work was supported in part by a grant of the European Community and is part of
 286 the activities of the VIRGIL European of Excellence (contract LSHM-CT-2004-503359). None
 287 competing interest.

288 Ethical approval. None declared Ethical approval : not required.

289

290 References

291

292 Baz, M., Abed, Y., Simon, P., Hamelin, M.E., and Boivin, G., 2010. Effect of the Neuraminidase
 293 Mutation H274Y Conferring Resistance to Oseltamivir on the Replicative Capacity and
 294 Virulence of Old and Recent Human Influenza A(H1N1) Viruses. *J Infect Dis.* 201, 740-
 295 745.

296 Bouscambert Duchamp, M., Casalegno, J., Gillet, Y., Frobert, E., Bernard, E., Escuret, V.,
 297 Billaud, G., Valette, M., Javouhey, E., Lina, B., Floret, D., and Morfin, F., 2010. Pandemic
 298 a(H1n1)2009 Influenza Virus Detection by Real Time Rt-Pcr : Is Viral Quantification
 299 Interesting? *Clin Microbiol Infect.*

300 Collins, P.J., Haire, L.F., Lin, Y.P., Liu, J., Russell, R.J., Walker, P.A., Skehel, J.J., Martin, S.R.,
 301 Hay, A.J., and Gamblin, S.J., 2008. Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza
 302 virus neuraminidase mutants. *Nature.* 453, 1258-1261.

303 Collins, P.J., Haire, L.F., Lin, Y.P., Liu, J., Russell, R.J., Walker, P.A., Martin, S.R., Daniels, R.S.,
 304 Gregory, V., Skehel, J.J., Gamblin, S.J., and Hay, A.J., 2009. Structural basis for
 305 oseltamivir resistance of influenza viruses. *Vaccine.* 27, 6317-6323.

306 Dharan, N.J., Gubareva, L.V., Meyer, J.J., Okomo-Adhiambo, M., McClinton, R.C., Marshall,
 307 S.A., St George, K., Epperson, S., Brammer, L., Klimov, A.I., Bresee, J.S., and Fry, A.M.,
 308 2009. Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the United States.
 309 *Jama.* 301, 1034-1041.

310 Escuret, V., Frobert, E., Bouscambert-Duchamp, M., Sabatier, M., Grog, I., Valette, M., Lina, B.,
 311 Morfin, F., and Ferraris, O., 2008. Detection of human influenza A (H1N1) and B strains
 312 with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J Clin Virol.* 41, 25-28.

313 Eshaghi, A., Bolotin, S., Burton, L., Low, D.E., Mazzulli, T., and Drews, S.J., 2009. Genetic
 314 microheterogeneity of emerging H275Y influenza virus A (H1N1) in Toronto, Ontario,
 315 Canada from the 2007-2008 respiratory season. *J Clin Virol.* 45, 142-145.

316 Ferraris, O., Kessler, N., and Lina, B., 2005. Sensitivity of influenza viruses to zanamivir and
 317 oseltamivir: a study performed on viruses circulating in France prior to the introduction
 318 of neuraminidase inhibitors in clinical practice. *Antiviral Res.* 68, 43-48.
 319 Gerloff, N.A., Kremer, J.R., Mossong, J., Opp, M., and Muller, C.P., 2009. Genomic diversity of
 320 oseltamivir-resistant influenza virus A (H1N1), Luxembourg, 2007-08. *Emerg Infect Dis.*
 321 15, 1523-1524.
 322 Herlocher, M.L., Truscon, R., Elias, S., Yen, H.L., Roberts, N.A., Ohmit, S.E., and Monto, A.S.,
 323 2004. Influenza viruses resistant to the antiviral drug oseltamivir: transmission studies in
 324 ferrets. *J Infect Dis.* 190, 1627-1630.
 325 Ives, J.A., Carr, J.A., Mendel, D.B., Tai, C.Y., Lambkin, R., Kelly, L., Oxford, J.S., Hayden, F.G.,
 326 and Roberts, N.A., 2002. The H274Y mutation in the influenza A/H1N1 neuraminidase
 327 active site following oseltamivir phosphate treatment leave virus severely compromised
 328 both in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* 55, 307-317.
 329 Kramarz, P., Monnet, D., Nicoll, A., Yilmaz, C., and Ciancio, B., 2009. Use of oseltamivir in 12
 330 European countries between 2002 and 2007--lack of association with the appearance of
 331 oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses. *Euro Surveill.* 14,
 332 Lackenby, A., Hungnes, O., Dudman, S.G., Meijer, A., Paget, W.J., Hay, A.J., and Zambon, M.C.,
 333 2008. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A(H1N1) viruses in
 334 Europe. *Euro Surveill.* 13,
 335 Le, Q.M., Kiso, M., Someya, K., Sakai, Y.T., Nguyen, T.H., Nguyen, K.H., Pham, N.D., Ngyen,
 336 H.H., Yamada, S., Muramoto, Y., Horimoto, T., Takada, A., Goto, H., Suzuki, T., Suzuki,
 337 Y., and Kawaoka, Y., 2005. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature.*
 338 437, 1108.
 339 Meijer, A., Lackenby, A., Hungnes, O., Lina, B., van-der-Werf, S., Schweiger, B., Opp, M., Paget,
 340 J., van-de-Kasstele, J., Hay, A., and Zambon, M., 2009. Oseltamivir-resistant influenza
 341 virus A (H1N1), Europe, 2007-08 season. *Emerg Infect Dis.* 15, 552-560.

342 Monto, A.S., McKimm-Breschkin, J.L., Macken, C., Hampson, A.W., Hay, A., Klimov, A.,
 343 Tashiro, M., Webster, R.G., Aymard, M., Hayden, F.G., and Zambon, M., 2006.
 344 Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance
 345 during the first 3 years of their use. *Antimicrob Agents Chemother.* 50, 2395-2402.
 346 Rameix-Welti, M.A., Agou, F., Buchy, P., Mardy, S., Aubin, J.T., Veron, M., van der Werf, S., and
 347 Naffakh, N., 2006. Natural variation can significantly alter the sensitivity of influenza A
 348 (H5N1) viruses to oseltamivir. *Antimicrob Agents Chemother.* 50, 3809-3815.
 349 Rameix-Welti, M.A., Enouf, V., Cuvelier, F., Jeannin, P., and van der Werf, S., 2008. Enzymatic
 350 properties of the neuraminidase of seasonal H1N1 influenza viruses provide insights for
 351 the emergence of natural resistance to oseltamivir. *PLoS Pathog.* 4, e1000103.
 352 Wagner, R., Matrosovich, M., and Klenk, H.D., 2002. Functional balance between
 353 haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev Med Virol.* 12, 159-
 354 166.
 355 Yen, H.L., Ilyushina, N.A., Salomon, R., Hoffmann, E., Webster, R.G., and Govorkova, E.A.,
 356 2007. Neuraminidase inhibitor-resistant recombinant A/Vietnam/1203/04 (H5N1)
 357 influenza viruses retain their replication efficiency and pathogenicity in vitro and in vivo. *J*
 358 *Virol.* 81, 12418-12426.
 359 WHO 2008. <http://www.who.int/csr/disease/influenza/ResistanceTable200806013.pdf>
 360 (accessed 25 february 2010), website.
 361 WHO 2009. <http://www.who.int/csr/disease/influenza/2008-9NHemiResistanceTable2.pdf>
 362 (accessed 25 february 2010), website.
 363

1 Table 1

2 Global mean IC₅₀ for oseltamivir and zanamivir for the A(H1N1) isolates from 2005/2006,
 3 2007/2008 and 2008/2009.

4

A(H1N1) from seasons	N	IC ₅₀ (nM)			
		OC ^a		Zana ^b	
		Mean ± SD	Max	Mean ± SD	Max
2005/2006 sensitive to OC	150	1.7 ± 0.7	4.6	1.2 ± 0.5	3.2
2007/2008 sensitive to OC	232	1.4 ± 0.7	4.3	1.5 ± 0.7	5.1
2007/2008 resistant to OC	142	564 ± 357	2730	1.4 ± 1.2	11.9
2008/2009 resistant to OC	16	649 ± 269	1411	1.5 ± 0.9	2.7

5

6 ^aOC: oseltamivir carboxylate; ^bZana: zanamivir

7

8

9

10 Table 2

11 Correlation between Km, IC₅₀ for oseltamivir and zanamivir and the presence of different
 12 amino-acid in N1, for a selection of A(H1N1) isolates from 2005/2006, 2007/2008 and
 13 2008/2009.

Clade	A(H1N1) from seasons	IC ₅₀ (nM)		Mean Km (μM)	NA Amino Acid position				
		OC ^a	Zana ^b		222	249	275	344	354
1	2005/2006								
	A/Lyon/381/2006	524.0	0.7	89.3	R	G	Y	D	G
	A/Lyon/465/2006	2.1	0.7	50.6	nd ^c	nd	nd	nd	nd
	A/Lyon/538/2006	2.5	0.9	56.3	nd	nd	nd	nd	nd
	A/Lyon/750/2006	1.6	0.6	45.1	R	G	H	D	G
	A/Clermont Ferrand/27/2006	1.4	0.8	41.8	nd	nd	nd	nd	nd
	A/St Etienne/948/2006	1.1	0.9	41.3	nd	nd	nd	nd	nd
	Mean for isolates from 2005/2006 sensitive to OC	1.7 ± 0.7		47.0 ± 6.4					
2B	2007/2008								
	A/Lyon/1267/2007	1.1	1.5	21.9	Q	K	H	N	D
	A/Lyon/1364/2007	0.7	0.6	21.2	Q	K	H	N	D
	A/Lyon/106/2008	2.3	1.6	25.5	Q	K	H	N	D
	A/Lyon/129/2008	0.7	1.9	21.9	Q	K	H	N	D
	A/LyonChu/5.04/2008	0.9	0.3	15.5	Q	K	H	N	D
	A/Poitiers/177/2008	3.0	3.0	29.6	Q	K	H	N	D
	A/Limoges/378/2008	2.3	0.5	20.4	Q	K	H	N	D
	Mean for isolates from 2007/2008 sensitive to OC	1.4 ± 0.7		22.6 ± 4.7					
	A/Lyon/1337/2007	759.2	1.2	42.2	Q	K	Y	N	G
	A/Lyon/144/2008	832.0	1.0	29.9	Q	K	Y	N	G
	A/Lyon/268/2008	521.8	0.3	30.8	Q	K	Y	N	G
	A/Lyon/376/2008	367.9	1.8	41.6	Q	K	Y	N	G
	A/Lyon/449/2008	539.6	2.1	30.9	Q	K	Y	N	G
	A/Lyon/795/2008	424.4	0.9	33.2	Q	K	Y	N	G
	A/Poitiers/655/2008	405.1	0.7	35.9	Q	K	Y	N	D
	Mean for isolates from 2007/2008 resistant to OC	564 ± 357		33.0 ± 7.0					
2B	2008/2009								
	A/Lyon/1540/2008	549.5	0.5	33.4	Q	K	Y	N	G
	A/Lyon/1562/2008	598.6	2.7	43.1	Q	K	Y	N	G
	A/Lyon/80/2009	586.9	0.8	32.4	Q	K	Y	N	G
	A/Lyon/147/2009	572.5	1.8	33.9	Q	K	Y	N	G
	A/Lyon/226/2009	724.8	0.9	52.5	Q	K	Y	N	G
	A/Poitiers/1342/2008	799.2	1.0	30.9	Q	K	Y	N	G
	A/Bordeaux/1380/2008	441.7	0.8	31.0	Q	K	Y	N	G
	A/Toulon/228/2009	1411.2	2.1	54.6	Q	K	Y	N	G
	A/Limoges/474/2009	630.1	0.6	38.5	nd	nd	nd	nd	nd
	Mean for isolates from 2008/2009 resistant to OC	649 ± 269		38.9 ± 9.2					

14

15 ^aOC: oseltamivir carboxylate; ^bZana: zanamivir; ^cnd : not done

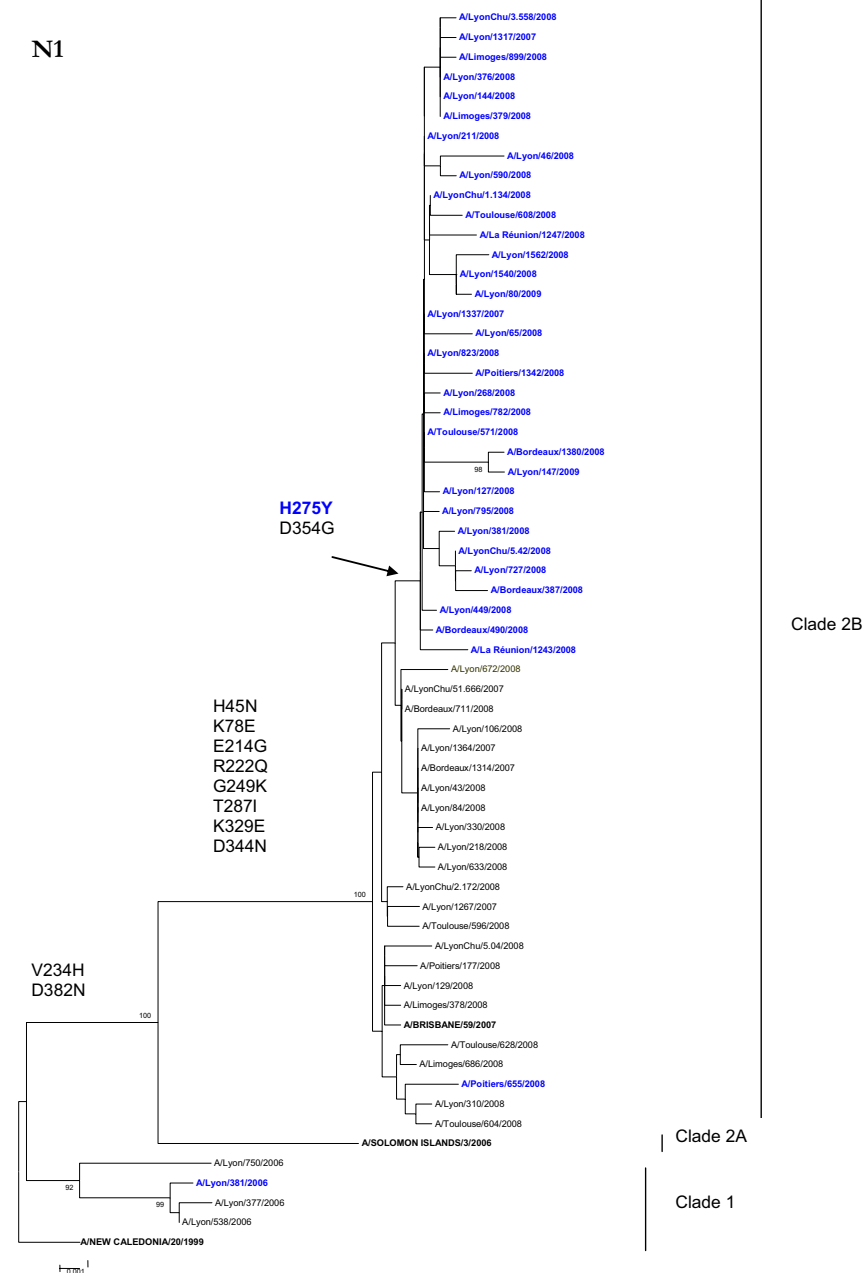
16

Table 3
 IC₅₀ for oseltamivir and zanamivir, kinetic neuraminidase affinity and the presence of
 different amino-acid in N1 for A(H1N1) reference vaccine strains from 1977.

Reference strains	IC ₅₀ (nM)		Mean Km (μM)	NA Amino Acid position				
	OC ^a	Zana ^b		222	249	275	344	354
A/Urss/90/1977	0.6	0.2	49.8	Q	G	H	D	G
A/Brazil/11/1978	0.7	0.2	52.7	Q	G	H	D	G
A/Chile/1/1983	0.3	0.7	39.8	R	G	H	D	G
A/Singapore/6/1986	2.0	0.8	46.2	R	G	H	D	G
A/Beijing/262/1995	1.0	0.5	45.4	R	G	H	D	G
A/Johannesburg/82/1996	1.0	0.4	37.4	R	G	H	D	G
A/New Caledonia/20/1999	0.6	0.5	44.7	R	G	H	D	G
A/Solomon Islands/3/2006	0.6	0.2	43.4	R	G	H	D	G
Mean for reference strains from 1977 to 2006			44.9 ± 5.0					
A/Brisbane/59/2007	0.3	0.7	21.6	Q	K	H	N	D

^aOC: oseltamivir carboxylate; ^bZana: zanamivir

N1



HA1

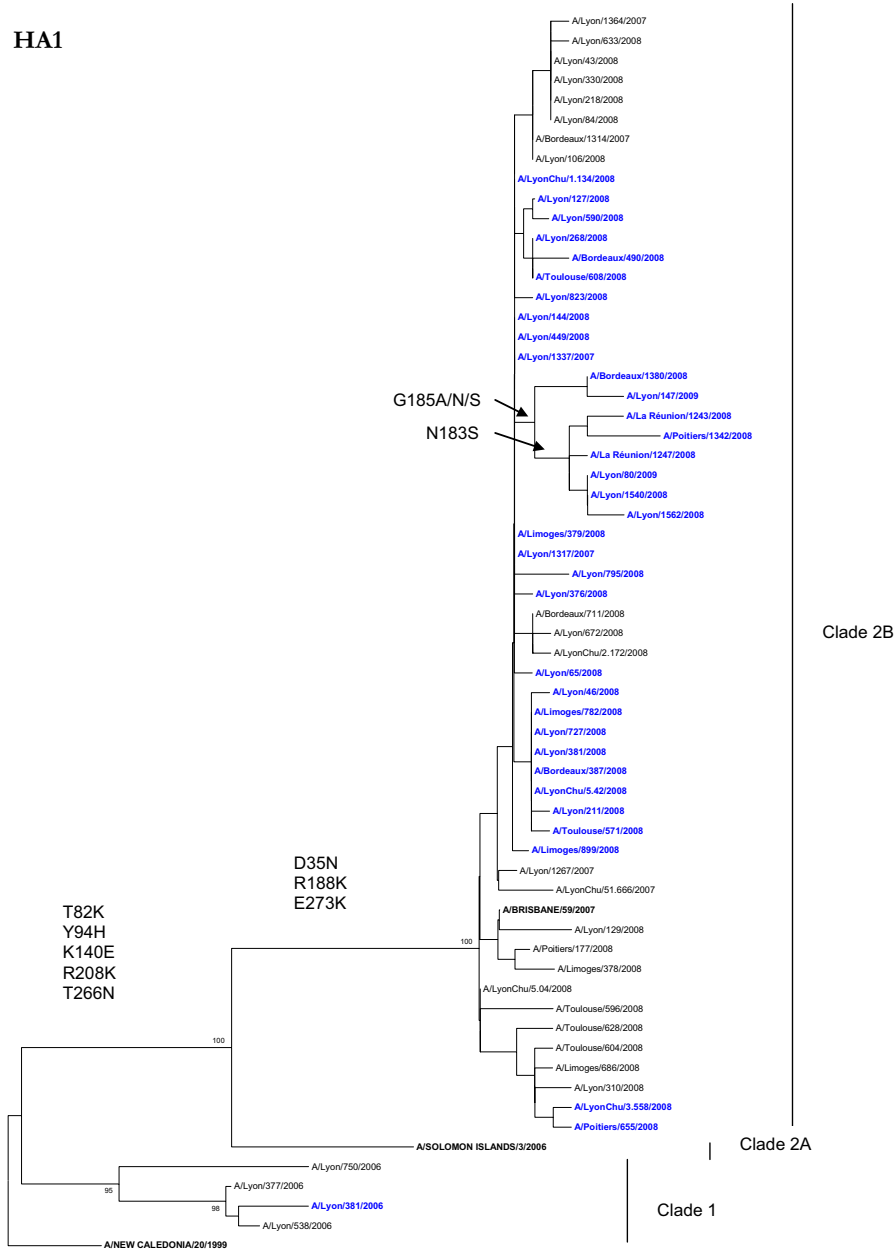
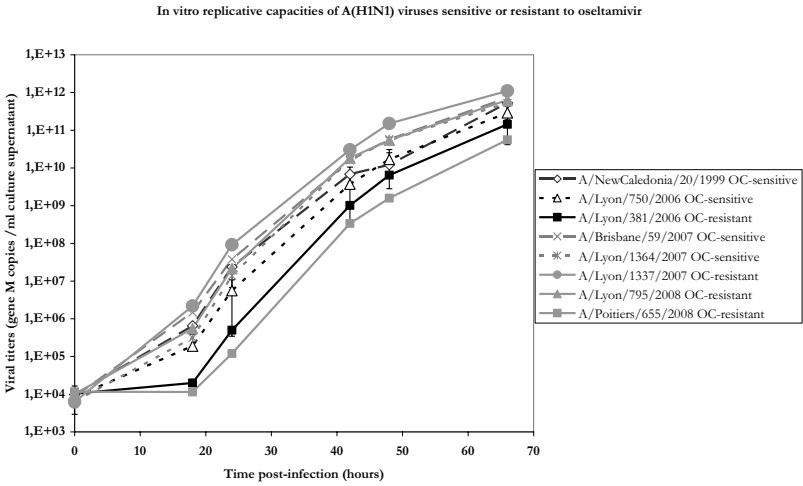


Fig. 1. Phylogenetic tree of the N1 and HA1 genes

The phylogenetic analysis was performed as explained in material and methods. Viruses mutated Y275 in N1 sequence are shown in bold and reference strains in capitals. The Genbank accession numbers for the reference strains are indicated for N1 (A/New Caledonia/20/1999 (**CY033624**), A/Solomon Islands/3/2006 (**EU124136**), A/Brisbane/59/2007 (**CY030231**)) and H1 (A/New Caledonia/20/1999 (**CY033622**), A/Solomon Islands/3/2006 (**EU124177**), A/Brisbane/59/2007 (**CY030230**)).

13



14

15

16 **Fig. 2. *In vitro* replicative capacities of A(H1N1) influenza viruses sensitive or resistant to**
17 **oseltamivir**

18 Viral titers were determined at 18, 24, 42, 48, 66 hours from supernatants of MDCK cells
19 infected at a multiplicity of infection (MOI) of 10^{-4} , with reference or viral isolates related to
20 A/New Caledonia/20/1999 or A/Brisbane/59/2007, sensitive or resistant to OC. Viral titers
21 were determined by gene M quantification with rt RT-PCR ([Bouscambert-Duchamp et al. 2010](#)).
22 Data are mean values for duplicate experiments.

23

24

ANNEXE 4

GRIPPE AVIAIRE CHEZ L'ENFANT.

M. Bouscambert-Duchamp, B. Lina, F. Morfin,

Arch Ped.2009; S101-107.

Grippe aviaire chez l'enfant

Avian influenza in children

M. Bouscambert-Duchamp^{1,2,3,*}, B. Lina^{1,2,3}, F. Morfin^{1,3}

Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
www.sciencedirect.com

¹Laboratoire de Virologie, Institut de Microbiologie, Centre de Biologie et de Pathologie EST, Groupement Hospitalier Est, 59 boulevard Pinel, 69677 Bron cedex, France
²CNR des virus influenza Région Sud. Laboratoire de Virologie, Centre de Biologie et de Pathologie EST, Groupement Hospitalier Est, 59 boulevard Pinel, 69677 Bron cedex, France
³Virologie et pathogenèse Humaine, UCBL-CNRS FRE 3011, Faculté de médecine RTH Laennec, Rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon cedex 08, France

Summary

The emerging A (H5N1) influenza virus is a clear pandemic threat. This avian virus is responsible for the largest epizootic event described so far. To date, 423 humans have been infected. In humans, this virus is responsible for a rapidly developing pneumonia, with an acute respiratory failure leading to death in 60 % of the infected cases. The multi-organ failure seems to result from the cytokine storm. A (H5N1) infections are mainly reported in children and young adults. Different hypotheses have been proposed to explain this specific feature, including the lack of control of cytokine release during infection, or the presence of alternative cellular receptors. The specific susceptibility of children is more likely to be related with exposure to infected birds than to specific immune or physiological factors. The proper and efficient management of A (H5N1) infection is possible nowadays. Today, the pandemic threat is real and may be imminent because of the circulation of new A (H1N1). However, an active surveillance of A (H5N1) virus remains very important to monitor the genetic evolution of this changing and virulent virus.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé

Les virus grippaux alimentent l'actualité, en particulier depuis l'émergence d'un sous-type potentiellement pandémique, le virus A (H5N1). Il s'agit d'un virus aviaire, responsable d'une épizootie sans précédent à l'origine, jusqu'en mai 2009, de 423 cas d'infections humaines. Ce virus est responsable d'une pneumonie d'évolution rapide vers un syndrome de détresse respiratoire aiguë, entraînant la mort dans 60 % des cas. Le tableau de défaillance multiorganique décrit, semble être dû à une dysrégulation de la production de cytokines. L'infection par le virus A (H5N1) touche principalement l'enfant et l'adulte jeune. Pour l'expliquer, différentes hypothèses sont évoquées concernant la capacité de ces patients à réguler leur production de cytokines ainsi qu'une variation dans la répartition des récepteurs cellulaires. En fait, cette susceptibilité particulière de l'enfant semble être liée à des comportements à risque plus qu'à une réalité physiologique. Aujourd'hui, il est possible de prendre en charge efficacement un cas d'infection humaine par le virus A (H5N1) et les protocoles thérapeutiques d'utilisation des inhibiteurs de la neuraminidase ont été adaptés à l'enfant. Si à l'heure actuelle, le risque de survenue d'une pandémie grippale semble être associé au nouveau virus influenza A (H1N1), il est indispensable de continuer à surveiller activement la circulation du virus A (H5N1) ainsi que l'évolution génétique de ce virus hautement pathogène.

© 2009 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Virus influenza, Grippe aviaire, A (H5N1).

*Auteur correspondant.
e-mail : maude.bouscambert-duchamp@chu-lyon.fr.

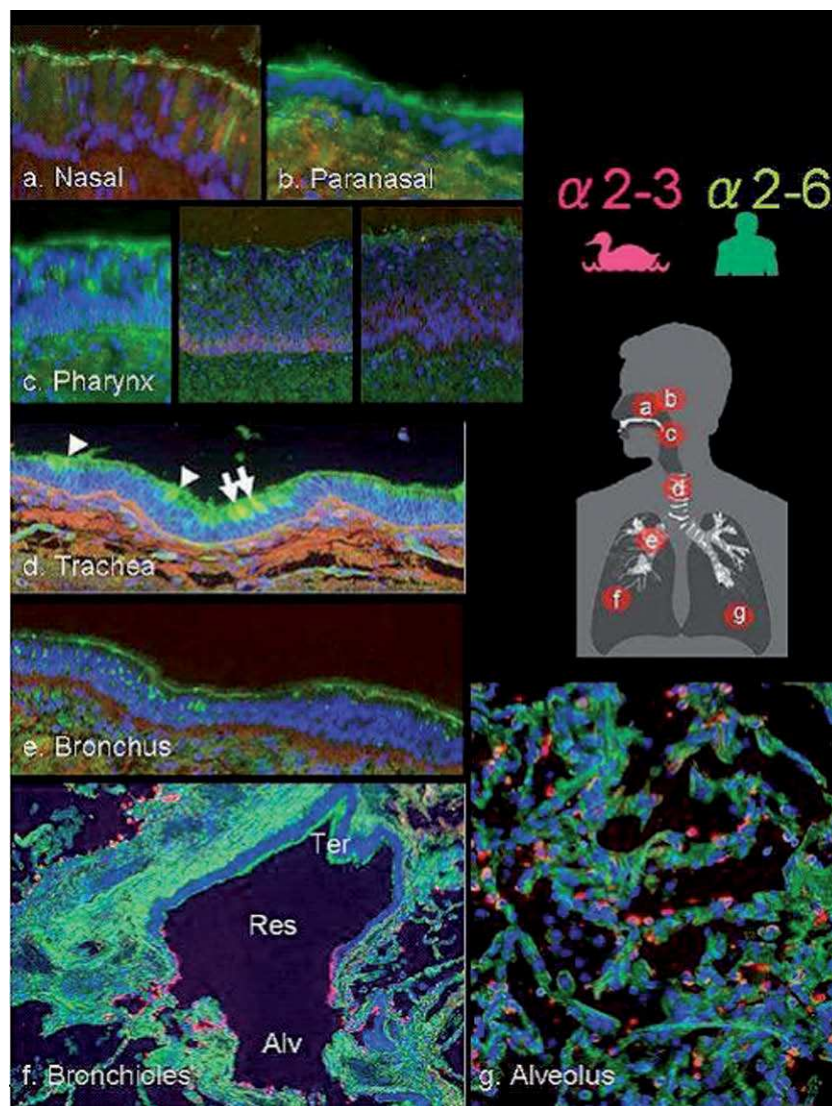


Figure 1. Répartition des récepteurs cellulaires reconnus par les virus influenza humains et aviaires [4]. La détection des récepteurs par immunohistochimie utilise des anticorps marqués spécifiques des $\alpha 2-6$ (vert) et $\alpha 2-3$ (rouge). Ces récepteurs se répartissent différemment au niveau des épithéliums de l'arbre respiratoire humain : (a) nez, (b) sinus paranasaux, (c) pharynx, (d) trachée, (e) bronches, (f) bronchioles, (g) alvéoles. Les $\alpha 2-6$ sont reconnus préférentiellement par les virus humains et les $\alpha 2-3$ par les virus aviaires.

Les virus grippaux ou virus influenza sont de vieux compagnons de l'Homme. Les premières descriptions de pandémie datent du 4^e siècle avant JC (Hippocrate) et ils continuent à alimenter l'actualité, en particulier depuis l'émergence d'un sous-type potentiellement pandémique, le virus A (H5N1).

La spécificité d'espèce des virus influenza ainsi que la pathogenèse de l'infection virale reposent sur la capacité des virus à reconnaître les récepteurs présents à la surface des cellules cibles. Il existe deux types de récepteurs : $\alpha 2-3$ et $\alpha 2-6$, présents chez l'homme et chez l'oiseau mais avec une proportion et une répartition le long de l'arbre

respiratoire différentes. Chez l'oiseau, sont présents majoritairement des $\alpha 2-3$ alors que chez l'homme, les récepteurs sont plutôt de type $\alpha 2-6$. Les bases de la spécificité d'espèce reposent sur le fait que les virus humains (H3N2, H1N1) reconnaissent préférentiellement les $\alpha 2-6$ alors que les virus aviaires, comme A (H5N1), reconnaissent les $\alpha 2-3$ [1]. La pathogenèse de l'infection virale s'explique en partie par la répartition de ces récepteurs cellulaires $\alpha 2-6$ et $\alpha 2-3$ le long de l'arbre respiratoire. Les récepteurs cellulaires $\alpha 2-6$ sont présents à la surface des cellules épithéliales des muqueuses respiratoires [2] mais ils sont beaucoup plus nombreux au niveau supérieur, site de multiplication active des virus influenza humains [3]. On retrouve chez l'homme des récepteurs de type $\alpha 2-3$, mais en moins grand nombre, et principalement au niveau de l'arbre respiratoire inférieur (fig. 1) [3].

L'ensemble des sous-types de virus influenza A circule chez l'oiseau aquatique. S'ils en constituent le réservoir, ils n'en sont pas les seuls hôtes. Certains sous-types : H7N7, H9N2, A (H5N1) et plus récemment le nouveau virus A (H1N1) [4], circulant chez l'oiseau ou le porc, ont pu occasionnellement infecter l'homme tout en gardant des caractéristiques de virus aviaires ou porcins. En franchissant la barrière d'espèces, certains d'entre eux pourraient acquérir des mutations d'adaptation à l'homme et devenir des virus « humains ». Dans ce cas, la transmissibilité inter-humaine devenant possible, le virus émergent pourrait être responsable d'une diffusion mondiale

(pandémie). En 1918, l'introduction d'un virus de sous-type H1N1 constitue l'exemple le plus marquant d'une pandémie dévastatrice (grippe « espagnole ») : 50 millions de personnes furent atteintes en seulement quelques mois.

1. Grippe saisonnière : épidémiologie et clinique

La grippe saisonnière est due à la circulation chaque hiver d'un ou plusieurs virus influenza humain de type A ou B à

Tableau I

Facteurs de risque prédisposant à une infection grippale sévère.**Personnes âgées de 65 ans et plus****Enfants de plus de 6 mois, adultes et femmes enceintes** souffrant de :

- Affections broncho-pulmonaires chroniques (asthme, dysplasie broncho-pulmonaire, mucoviscidose)
- Cardiopathies congénitales mal tolérées
- Insuffisances cardiaques graves et valvulopathies graves
- Néphropathies chroniques graves et syndromes néphrotiques purs et primitifs
- Drépanocytoses (homozygotes et doubles hétérozygotes S/C)
- Diabète insulino-dépendant et non insulino-dépendant non équilibrés par le seul régime
- Déficits immunitaires cellulaires
- Personnes séjournant dans un établissement de long ou de moyen séjour (quel que soit l'âge)
- Enfants et adolescents nécessitant un traitement prolongé par l'acide acétylsalicylique (syndrome de Kawasaki compliqué et arthrite chronique juvénile)

l'origine d'une épidémie pouvant faire jusqu'à 250 000 décès par an dans le monde.

La plus grande proportion de $R_{\alpha 2-6}$ au niveau respiratoire haut explique pourquoi lors d'une infection par un virus humain (H_3N_2 ou H_1N_1 saisonniers), le tableau clinique se traduit par une trachéo-bronchite simple associant des signes locaux (rhinite, toux, maux de gorge) et signes généraux (maux de tête, fièvre élevée d'apparition brutale, frissons, anorexie, myalgies, malaise) [5]. Chez des patients présentant des facteurs de risque respiratoires (*tableau I*), le tableau initial simple peut se compliquer d'une pneumonie par extension distale de l'infection au niveau de l'épithélium alvéolaire (détresse respiratoire) [6,7]. La question d'une multiplication virale dans des sites extra-respiratoires faisant suite à une virémie est évoquée sans preuves à ce jour.

2. Virus aviaires

Depuis 1956, de nombreuses épizooties (infection chez l'animal) responsables d'infections massives dans des élevages de volailles ou de porcs ont été recensées. Les virus concernés appartiennent à différents sous-types (H_9N_2 , H_7N_7 , H_7N_3 , $H_{10}N_7$, H_1N_1 , A (H_5N_1)). Le virus A (H_5N_1) est actuellement l'agent étiologique d'une épizootie sans précédent par son ampleur et sa durée.

Il fut détecté chez des oies pour la première fois en 1996, en Chine. Personne n'y prêta vraiment attention jusqu'au mois de mai 1997 où un premier cas d'infection humaine par le virus influenza A (H_5N_1) fut rapporté. L'épizootie et les cas humains d'infection A (H_5N_1) furent confinés à l'Asie du Sud Est jusqu'en mai 2005 avant d'être observée chez des oiseaux d'espèces diverses en Europe, en Inde et en Afrique [8].

3. Grippe aviaire : épidémiologie et clinique chez l'homme

Chez l'homme, environ 423 cas d'infection par le virus A (H_5N_1) ont été détectés à la date du 16 mai 2009 et 258 décès ont été rapportés sur 3 continents [9]. Aucune transmission interhumaine n'a été identifiée mais dans un quart des cas, l'infection survient au sein d'une même famille impliquant en général 2 ou 3 personnes [10].

Les patients infectés par un virus A (H_5N_1) présentent tous une pneumonie sévère entraînant la mort dans 60 % des cas [9]. Aucun cas d'infection bénigne ou asymptomatique n'a été rapporté probablement par absence de diagnostic ou de recherche systématique.

Différents facteurs de risque de contracter une infection A (H_5N_1) ont été identifiés [11]. Ils sont étroitement liés à certaines pratiques culturelles, ce qui explique pourquoi les premiers cas d'infections sont survenus en Asie. La préparation des volailles infectées pour la cuisine, le plumage en particulier, expose l'individu à des quantités très importantes de virus sous forme d'aérosols. Dans de nombreux villages, les oiseaux vivent sous les toits aux contacts des hommes, et les enfants jouent avec les oiseaux, mêmes malades. Les combats de coqs ont aussi été reconnus comme une source d'exposition à des aérosols de virus, produits par des oiseaux agités dans de petits espaces confinés. Enfin l'absence d'eau courante (et donc l'approvisionnement dans des points d'eau extérieurs souillés par les déjections d'oiseaux sauvages ou domestiques qui viennent s'y abreuver) est le 2^e facteur de risque identifié [11].

Lorsqu'une infection par un virus aviaire survient chez l'homme, la pathogenèse de l'infection est différente de celle observée lors d'une infection par un virus humain. Ainsi, les virus A (H_5N_1) (aviaires) se fixent et infectent les cellules de l'épithélium des bronchioles et surtout des alvéoles ($R_{\alpha 2-3}$) [2,3].

La faible abondance de $R_{0.2-3}$ au niveau des voies aériennes supérieures induit une faible réplication virale dans ces sites, et donc une faible excrétion. La transmission à l'entourage est donc moins importante que pour une grippe saisonnière et les signes d'infection trachéobronchique sont inconstants. Par contre, l'infection étant massive au niveau distal, l'atteinte

alvéolaire est très importante entraînant des dysfonctionnements respiratoires sévères.

À la différence d'une grippe saisonnière, une virémie intense est observée. Elle permet la dissémination du virus vers différents sites extra pulmonaires : cerveau, intestin, foie, ganglions, rate, moelle osseuse [12]. À l'image de ce qui est

Tableau II

Données clinico-biologiques des cas d'infection humaine H5N1 observées à l'admission à l'hôpital (d'après [14]).

Pays	Vietnam Thaïlande Cambodge	Indonésie	Chine	Égypte	Turquie Azerbaïdjan
Période	2004/2005	2005/2006	2005/2006	2006/2007	2006
Âge (années)					
médiane	14-22	18,5	30	12,5	16,-10
min-max	2-58	1,5-45	12-41	1-75	5-20
Contact avec des oiseaux dans les 2 semaines précédentes total (%)	86	76	100	82	100
Délai d'hospitalisation (jours) à partir des premiers signes cliniques					
médiane	6-8	5	6	3	5-6
min-max	3-8	1-14	3-11	0-14	1-12
Signes cliniques total (%)					
Fièvre	100	100	100	89	94
Dyspnée	89	94	50	37	44
Toux	98	93	88	71	80
Pneumonie	100	100	100	61	88
Rhinite	33	NR	NR	NR	14
Vomissement	16	11	NR	8	0
Diarrhée	52	11	NR	5	29
Altération de la conscience	NR	NR	NR	8	50
Convulsion	NR	2	NR	NR	29
Céphalée	36	13	NR	50	47
Myalgie	30	13	NR	45	27
Leucopénie	77	84	NR	27	73
Thrombocytopénie	54	64	NR	31	69
Augmentation des transaminases	71	NR	NR	56	75
Décès /total (%)	32/41 (78)	41/54 (76)	7/8 (88)	15/38 (39)	9/16 (56)
Délai entre le début des symptômes et le décès					
médiane	8-12	9	9	11,5	10-13
écart	4-30	5-19	8-19	6-32	9-17

NR = non renseigné

observé chez l'oiseau, l'épithélium intestinal est très riche en $\alpha 2-3$, ce qui explique que le virus A (H5N1) puisse s'y multiplier induisant des signes digestifs de type diarrhée ou vomissement. Des convulsions sont aussi rapportées évoquant un neurotropisme peut-être plus important pour le virus A (H5N1) que pour les autres sous-types. De façon générale, tous les patients ont présenté un tableau initial d'infection grippale avec ou sans signes ORL ou digestifs suivis d'une pneumonie d'évolution rapide avec détresse respiratoire et expectorations sanglantes. Dans les cas les plus sévères, l'évolution vers un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est observée dans les 6 jours de la maladie avec une défaillance multi viscérale entraînant la mort entre 4 et 32 jours (médiane de 9,5 jours) [10]. Les examens biologiques montrent une lymphopénie associée à une thrombocytopénie, indicateur pronostique d'évolution vers un SDRA (*tableau II*). Dans tous les cas, la radio thoracique est anormale [10]. La gravité de l'infection induite par le virus A (H5N1) s'explique par une dissémination forte non contrôlée. Différentes hypothèses en rapport avec l'hôte ou le virus peuvent être avancées. L'absence d'immunité préalable vis-à-vis de ce sous-type viral peut être évoquée mais l'observation de cas familiaux, certes exposés aux mêmes facteurs de risque, permet d'envisager une possible susceptibilité génétique. Le comportement des virus A (H5N1) est atypique probablement en rapport avec sa pathogenèse particulière observée lorsque l'infection survient chez l'homme. L'infection humaine par un virus aviaire n'est possible que si l'individu est exposé à des doses très importantes de virus. En plus d'une forte virulence intrinsèque (site de clivage polybasique), le virus A (H5N1) est capable de provoquer une virémie ainsi qu'une activation des cascades de cytokines pro-inflammatoires. Il est observé, dans les cas sévères, une absence de régulation de l'inflammation associée à des dysfonctionnements respiratoires et circulatoires aboutissant à une détresse multi-organique.

4. Grippe aviaire chez l'enfant

Différentes études cliniques réalisées en Asie (Vietnam, Thaïlande, Cambodge, Indonésie, Chine), en Egypte et en Turquie indiquent que l'âge moyen des patients est de 18 ans (*tableau II*), et que 25 % d'entre eux ont moins de 10 ans [10]. Les enfants jouent un rôle clé dans la diffusion de l'infection grippale classique. N'ayant pas d'immunité préalable dans leurs premières années de vie, ils font des infections productives faisant d'eux de « super excréteurs ». Ils produisent plus de virus et plus longtemps que l'adulte (supérieur à 8 jours), et constituent ainsi le réservoir communautaire du virus *influenza*.

De surcroît ils ne régulent pas efficacement leur production de cytokines. Chez l'enfant, lors d'une infection respiratoire virale (virus *influenza*, métapneumovirus humain et VRS), on peut observer une augmentation de la production d'IFN γ , d'IL4 et d'IL2 [13]. C'est le virus *influenza*, qui induit la plus forte augmentation de cytokines, ce qui le prédispose à une éventuelle dysrégulation. Cliniquement, l'infection grippale classique induit chez l'enfant de moins de 5 ans, un tableau souvent réduit à une rhinite associée à une fièvre et une toux. Parfois la rhinite est le seul signe observé. Mais dans certains cas, des manifestations neurologiques (encéphalites, syndrome de Reye, Syndrome de Guillain Barré) sont observées.

Ces particularités de l'infection grippale chez l'enfant n'expliquent pas pourquoi les cas d'infection par le virus A (H5N1) surviennent principalement chez eux. Différentes hypothèses peuvent être évoquées : (i) une moins bonne capacité à réguler leur production de cytokines [13] les prédispose à des défaillances multi organes ; (ii) une répartition des $\alpha 2-3$ différente par rapport à l'adulte. En effet, il a été constaté que chez le fœtus, la répartition des $\alpha 2-3$ dans l'arbre respiratoire était homogène aux niveaux supérieur et inférieur en début de gestation et que la proportion de $\alpha 2-6$ augmentait progressivement au cours de la grossesse [14]. On peut donc penser que la proportion de $\alpha 2-3$, au niveau du tractus respiratoire supérieur, soit plus importante chez l'enfant que chez l'adulte, augmentant alors sa susceptibilité à l'infection par un virus aviaire. Mais, en pratique, on n'observe pas plus d'infection chez l'enfant de moins de un an : ces observations ne permettent donc pas d'expliquer complètement pourquoi l'enfant est plus sensible à l'infection par le virus A (H5N1) que l'adulte. Des facteurs comportementaux jouent aussi un rôle important. Les enfants sont de façon générale plus exposés aux oiseaux malades que l'adulte. En effet, l'adulte est en contact avec des volailles lors de la préparation des repas et il exclut naturellement tout oiseau présentant des signes de maladie. Par contre l'enfant entretient une promiscuité importante avec les oiseaux domestiques potentiellement contaminés en dormant avec eux et surtout en jouant ou manipulant des oiseaux et ceci même si l'animal est malade ou mort. Ils seraient donc ainsi plus exposés que les adultes à l'infection A (H5N1).

Comme pour la grippe saisonnière, le traitement de l'infection A (H5N1) repose sur l'utilisation des antigrippaux à des posologies adaptées à l'enfant (*tableau III*). En 2007, l'OMS a émis des recommandations [15] qui préconisent d'utiliser en première intention, l'oseltamivir pendant plus de 5 jours, chez l'enfant de plus de un an. Notons qu'une équipe ayant administré de l'oseltamivir chez 47 enfants âgés de moins de un an n'a pas décrit d'effets indésirables particuliers [16]. En cas d'impossibilité à utiliser la voie orale, le zanamivir est

Tableau III

Traitement et prophylaxie de l'infection par le virus H5N1 chez l'enfant [14].

DCI	Oseltamivir				Zanamivir	Amantadine	
Spécialité	Tamiflu®				Relenza®	Mantadix®	
Forme pharmaceutique	Gélules de 30, 45 ou 75 mg ou poudre pour suspension buvable de 12 mg/ml				Poudre pour inhalation, 5 mg/inhalation	Capsules de 100 mg	
Mode d'administration	Voie orale				Inhalation	Voie orale	
AMM	Enfant > 1 an				Enfant de > 7 ans	Enfant > 1 an	
Traitement							
Poids ou âge de l'enfant	< 15 kg	15-23 kg	23-40 kg	> 40 kg		1-9 ans	9-12 ans
Posologie quotidienne	2 × 30 mg/j	2 × 45 mg/j	2 × 60 mg/j	2 × 75 mg/j	2 X 10 mg	5-8 mg/kg/j en 1 ou 2 doses	200 mg/j en 2 doses
Durée de traitement	5 j	5 j	5 j	5 j	5 j	1 à 2 j après la disparition des symptômes	
Prophylaxie							
Posologie quotidienne	30 mg/j	45 mg/j	60 mg/j	75 mg/j	Chez l'enfant de > 5ans	5-8 mg/kg/j en 1 ou 2 doses	200 mg/j en 2 doses

une solution alternative chez l'enfant de plus de 7 ans. Des résistances du virus A (H5N1) aux antiviraux ont été décrites : certaines souches A (H5N1) possèdent la mutation H274Y leur conférant une résistance à l'oseltamivir [17] sans entraîner pour autant d'impasse thérapeutique car aucune résistance croisée n'a été rapportée avec le zanamivir.

Un traitement prophylactique peut être proposé aux sujets contacts : les inhibiteurs de la neuraminidase à demi-doses. Un vaccin est en cours de développement mais l'immunogénicité de ce virus impose l'utilisation de doses plus importante d'adjuvant et d'antigènes d'une part et un schéma vaccinal à deux doses, d'autre part. La question de la souche prototype à utiliser pour produire un vaccin efficace contre un grand nombre de souches appartenant à des clades différents n'est pas résolue.

5. Conclusion

Les cas d'infection humaine par le virus A (H5N1) sont décrits principalement chez l'enfant et l'adulte jeune et toujours après des contacts étroits avec des oiseaux malades. Cette susceptibilité semble plutôt être liée à un comportement à risque qu'à une réalité physiologique. La prise en charge rapide du patient avec instauration d'un traitement antiviral

dans les 2 premiers jours de la maladie permet de réduire significativement la mortalité observée.

Malgré le fait que cette épidémie A (H5N1) soit sans précédent, aussi bien pour l'oiseau que pour l'homme, ce virus n'est pas, en 2009, prêt à déclencher une pandémie. En effet il n'est pas adapté à l'homme et ne peut pas être responsable d'une transmission inter humaine. Néanmoins il paraît indispensable de continuer les efforts entrepris sur le développement d'un vaccin efficace et la surveillance de son évolution.

L'émergence récente du nouveau virus A (H1N1) ne doit pas faire oublier le risque associé à la circulation persistante du virus A (H5N1) qui reste un virus particulièrement virulent.

Conflit d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts pour cet article.

Références

1. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T et al. Human and avian influenza (AI) target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Nat Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 4620-4.
2. Van Riel D, Munster VJ, de Wit E et al. Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals. *Am J Pathol* 2007 ; 171 : 1215-23.

3. Novel swine-origin influenza A (H1N1) virus investigation team. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *NEJM* 2009; 360 : 2605-15.
4. Shinya K, Ebina M, Yamada S et al. Avian flu : influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 2006; 440 : 435-6.
5. Hayden FG, Fritz RS, Lobo MC, et al. Local and systemic cytokine responses during experimental human influenza A virus infection : relation to symptom formation and host defense. *J Clin Invest* 1998; 101 : 643-9.
6. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000; 342 : 1334-49.
7. Dorinsky PM, Gadek JE. Multiple organ failure. *Clin Chest Med* 1990; 11 : 581-91.
8. Webster RG, Govorkova EA. A (H5N1) influenza-continuing evolution and spread. *N Engl J Med* 2006; 355 : 2174-7.
9. World Health Organization. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A/(A (H5N1)) reported to WHO (Accessed March 9, 2009, at http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2009_03_02/en/index.html).
10. Hayden F, editor. Update on avian influenza A (A (H5N1)) virus infection in humans. *N Engl J Med* 2008; 358 : 261-73.
11. Pham ND, Hoang TL, Nguyen TK, et al. Risk factors for human infection with avian influenza A A (H5N1), Vietnam 2004. *Emerg Infect Dis* 2006; 12 : 1841-7.
12. De Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, et al. Fatal outcome of human influenza A (A (H5N1)) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med* 2006; 12 : 1203-7.
13. Melendi GA, Laham FR, Monsalvo C, et al. Cytokine profiles in the respiratory tract during primary infection with human metapneumovirus, respiratory syncytial virus, or influenza virus in infants. *Pediatrics* 2007; 120 : e410-5.
14. Cerna A, Janega P, Martaovic P, et al. Changes in dialic acid expression in the lung during intrauterine development fo the human fetus. *Acta Histochem* 2002; 104 : 339-42.
15. World Health Organization. WHO Rapid Advice Guidelines on pharmacological management of humans infected with avian influenza A (A (H5N1)) virus. www.who.int/medicines/publications/WHO_PSM_PAR_2006.6.pdf.
16. Tamura D, Miura T, Kikuchi Y. Oseltamivir phosphate in infants under 1 year of age with influenza infection. *Pediatr Int* 2005; 47 : 484.
17. De Jong MD, Thanh TT, Khanh TH et al. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (A (H5N1)) infection. *N Engl J Med* 2005; 353 : 2667-72.

ANNEXE 5

INTERET DES INHIBITEURS DE LA NEURAMINIDASE DANS LA PRISE EN CHARGE DES INFECTIONS DUES AUX VIRUS INFLUENZA

*O. Ferraris, V. Escuret, **M. Bouscambert-Duchamp**, B. Lina, F. Morfin.*

Article en français

Pathol Biol. 2010 ; 58(2) : e69-78. Epub 2010 Mar 19.



Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
 EM|consulte
www.em-consulte.com



Intérêts des inhibiteurs de la neuraminidase dans la prise en charge des infections dues aux virus influenza

Role of neuraminidase inhibitors for the treatment of influenza A virus infections

O. Ferraris^a, V. Escuret^{a,b}, M. Bouscambert-Duchamp^{a,b}, B. Lina^{a,b}, F. Morfin^{a,*}

^a Virologie et pathologie humaine, CNRS FRE 3011, université de Lyon, université Lyon-1, 7, rue Guillaume-Paradin, 69372 Lyon cedex 08, France

^b Laboratory of Virology, National Influenza Centre (South of France), hospices civils de Lyon, 59, boulevard Pinel, 69677 Bron cedex, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Reçu le 21 janvier 2010

Accepté le 26 janvier 2010

Disponible sur Internet le xxx

Mots clés :

Influenza
Neuraminidase
Inhibiteurs
Oseltamivir
Zanamivir
H1N1
H5N1

Keywords:

Influenza
Neuraminidase
Inhibitors
Oseltamivir
Zanamivir
H1N1
H5N1

R É S U M É

L'oseltamivir et le zanamivir sont deux inhibiteurs de la neuraminidase (INA) actifs sur les virus influenza A et B. Ce sont des analogues qui ont été développés à partir de la structure de l'acide sialique, substrat naturel de la neuraminidase (NA). Il existe des résistances aux INA, principalement liées à des mutations survenant sur le gène codant la NA. Ces antiviraux étaient encore peu utilisés dans la grippe saisonnière même s'ils permettent de diminuer la durée du syndrome grippal d'environ un jour s'ils sont administrés dans les 48 heures qui suivent le début des signes cliniques. Utilisés en prophylaxie postexposition, ils présentent également un effet protecteur significatif. Des résistances à l'oseltamivir pouvaient être détectées mais sont restées très rares jusqu'à l'émergence naturelle d'un variant A(H1N1) saisonnier résistant au cours de l'hiver 2007–2008. Dans le cas de gripes sévères, en particulier lors d'infections par le virus A(H5N1), un traitement précoce par l'oseltamivir a été associé à une meilleure survie. Enfin, dans le contexte de la grippe pandémique A(H1N1)2009, l'utilisation des INA a très largement augmenté en prophylaxie et en curatif pour le traitement des formes sévères, mais aussi pour le traitement des formes classiques. Cette utilisation massive induit un risque d'augmentation de la survenue de virus résistants qui jusque-là, reste un phénomène isolé devant être étroitement surveillé.

© 2010 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

A B S T R A C T

Oseltamivir and zanamivir are two neuraminidase inhibitors (NAIs) active on A and B influenza viruses. These analogues have been developed from the structure of sialic acid, the neuraminidase (NA) substrate. Resistance to NAIs have been detected. They are mainly associated to mutations located on the NA gene. The use of these antiviral drugs remains low in the context of seasonal flu, even the duration of symptoms can be reduced of one day if an antiviral treatment is started within 48 hours after disease onset. NAIs also present a significant effect when used in postexposure prophylaxis. Resistance, mainly to oseltamivir, have been detected but remained rare until the spontaneous emergence in 2007–2008 winter of a seasonal A(H1N1) variant resistant to this drug. NAIs are also interesting for the treatment of severe flu infections, specially those associated to A(H5N1). Finally, because of the pandemic A(H1N1)2009 virus, NAIs use has largely increased for prophylactic and therapeutic treatment of severe and non severe infections. This large use may be associated to an increased risk of selection of resistant viruses. Up to now, this phenomenon remains fortunately limited but has to be closely monitored.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Les virus influenza sont des virus à ARN classés selon trois types A, B et C. Au sein du type A, de très nombreux sous-types différents ont été détectés mais actuellement seulement un nombre limité

intéressent le genre humain : les virus dits saisonniers A(H1N1) et A(H3N2) responsables d'épidémies hivernales, le virus pandémique A(H1N1)2009 qui, depuis avril 2009 circule sur toute la planète et un certain nombre de virus d'origine aviaire comme les virus A(H5N1), A(H7N7), A(H9N2) responsables d'infections humaines parfois sévères, principalement en Asie du Sud-Est. Les virus influenza sont des virus enveloppés qui possèdent deux glycoprotéines membranaires : l'hémagglutinine et la neuraminidase (NA). Ces deux glycoprotéines servent à la classification des virus

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : florence.morfin-sherpa@chu-lyon.fr (F. Morfin).

de type A, mais supportent aussi l'antigénicité virale et donc la variabilité génétique des virus influenza.

Les inhibiteurs de la neuraminidase (INA) ont été décrits dès les années 1970, mais ce sont les travaux de Von Itzstein et al. en 1993 qui ont permis le développement du zanamivir [1]. Ce produit est issu de la recherche sur une série d'analogues des acides sialiques destinée à obtenir des produits capables d'inhiber le fonctionnement de la NA. Les premières molécules développées présentaient une difficulté d'administration. En effet, la biodisponibilité du zanamivir par voie orale étant mauvaise, une formulation inhalée permettant d'apporter directement le médicament au site de l'infection a dû être développée. Le produit a été commercialisé en 1999 sous le nom de Relenza®. La zanamivir a servi de base pour le développement d'autres médicaments comme l'oseltamivir (Tamiflu®) qui obtint l'AMM en 2001 et le pérémivir. Actuellement, le zanamivir et l'oseltamivir ont une AMM pour le traitement de l'infection grippale ; le pérémivir qui peut être administré par voie intraveineuse ou intramusculaire est disponible en ATU. Ces antiviraux, complémentaires des vaccins pour la prise en charge de la grippe, ont pour objectif de mettre en place un traitement curatif chez les sujets non vaccinés ou de pallier une inefficacité de la vaccination antigrippale en cas d'inadéquation entre souche vaccinale et souche circulante. Ces molécules permettent également de traiter les formes graves de grippe dues aux virus influenza de type A ou B. Cet article fait une synthèse sur les données générales de structure, les mécanismes d'action de ces molécules et fait le point sur leur utilisation dans le cas des gripes saisonnières, de la grippe aviaire A(H5N1), ainsi que de la grippe pandémique A(H1N1)2009.

2. Inhibiteurs de neuraminidase : structures et mécanismes d'action

La NA des virus influenza de type A et B est une glycoprotéine membranaire de type II, avec une activité enzymatique de type N-acétyl-neuraminosyl-glycohydrolase (EC 3.2.1.18) [2]. La NA est un

homotétramère ancré à la membrane virale par une séquence hydrophobe unique de quelques 29 acides aminés près de l'extrémité N-terminale [3]. Des images de cette glycoprotéine, obtenues par coloration négative, montrent une morphologie de type « champignon » avec une partie supérieure globulaire reliée à une tige mince dont la partie distale est enchâssée dans la membrane virale [4]. La zone globulaire est composée de quatre structures identiques. Chaque structure ou monomère est majoritairement composée de structures secondaires en feuillet β ; cette zone a été subdivisée en six parties telle une hélice (nommées $\beta 1$ à $\beta 6$) (Fig. 1) [5]. Le site catalytique de la NA grippale, constitué de résidus d'acides aminés conservés, se situe au niveau des zones globulaires de chaque monomère [6].

Il est consensuel d'attribuer trois rôles à la NA du virus influenza. (i) La NA facilite la pénétration à travers les mucines riches en acides sialiques présentes dans le tractus respiratoire supérieur de l'homme et donc favorise l'infectiosité du virus [7]. (ii) La NA hydrolyse les liaisons alpha cétosidiques, 2-3 ou 2-6, existant entre un acide sialique (acide N-acétylneuraminique) et l'hydrate de carbone adjacent d'une glycoprotéine de surface cellulaire auquel le virion nouvellement formé est joint [8]. Ce clivage libère le virus nouvellement formé de la cellule et lui permet d'envahir de nouvelles cellules [7]. (iii) La NA empêche ainsi également l'agrégation des virions nouvellement formés maximisant leurs chances d'infecter de nouvelles cellules [9].

2.1. Conception des inhibiteurs de la neuraminidase

La NA a été choisie comme cible antivirale, en raison de son rôle majeur dans la propagation des virus influenza [7] et en raison de la conservation des résidus d'acides aminés du site actif qui interagissent directement ou indirectement avec le substrat dans les virus influenza de type A et B [10,11].

Les premiers INA ont été élaborés en fonction de l'état de transition du substrat durant l'hydrolyse de ce dernier [10,12]. Le

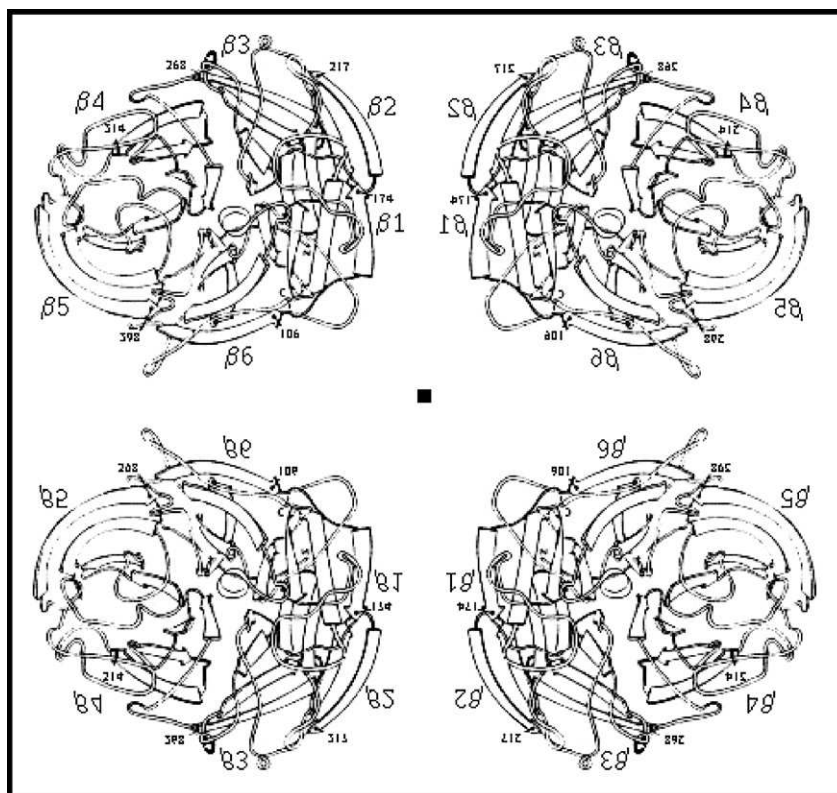


Fig. 1. Structure tridimensionnelle de la zone globulaire de la neuraminidase [5].

principal analogue obtenu fût l'acide 2-deoxy-2,3-dihydro-N-acetylneuraminique (DANA). Puis, à partir de la structure de la NA de virus influenza de type A et B déterminée par rayons X [5,13] et de son complexe avec l'acide sialique ou le DANA, deux nouvelles molécules efficaces ont été synthétisées, le zanamivir et l'oseltamivir carboxylate. Le zanamivir (GG167, 2,4-didéoxy-2,3-didéhydro-4-guanidine sialic acid) est un analogue synthétique de l'acide sialique, analogue à la structure du DANA, avec la substitution d'un groupement guanidinium sur la position 4 du cycle [12,14]. L'oseltamivir (GS4104 ester éthylique (prodrogue), GS4071 (médicament actif) ; éthyl-4-acétamido-5-amino-3-(1-éthylpropoxy)-1-cyclohexène-1-carboxylate) est, lui, analogue à un cyclohexène avec la substitution d'un groupement aminé en position 4 sur le cycle et un groupement hydrophobe pentyl éther qui remplace la chaîne latérale poly-hydroxylée en position 6 (Fig. 2) [15].

Comme la structure de ces inhibiteurs repose sur l'état de transition du substrat, la spécificité de liaison α 2,3 ou α 2,6 ne devrait pas influencer l'efficacité de l'inhibiteur. L'analogie de structure permet à ces inhibiteurs de conserver les mêmes sites d'interaction avec les résidus d'acides aminés composant le site actif de l'enzyme. Ainsi, pour une NA de sous-type N2, le groupement carboxylique en C2 forme des liaisons hydrogènes avec les résidus des acides aminés R118, R292, et R371 chargés positivement. La liaison formée entre le groupement guanidinium présent sur le carbone C4 et les résidus des acides aminés E227 et E119 chargés négativement s'observe également avec l'oseltamivir. Le groupement aminé interagit avec le résidu R152, tandis que le groupement poly-hydroxylé porté par le carbone 6 du cycle permet au zanamivir d'interagir avec les résidus R224 et E276 [8].

2.2. Mécanismes de résistances – études précliniques

La résistance du virus influenza aux INA peut émerger à travers des mutations localisées sur la NA ou l'hémagglutinine en raison de l'interrelation fonctionnelle de ces deux glycoprotéines. Dans cette revue, les mutations dans la NA sont localisées selon la numérotation dans N2 qui peut différer d'une position par rapport à une numérotation dans N1.

Les mutations observées sur la NA ont mis en évidence un taux plus élevé de mutation après traitement à l'oseltamivir par rapport au zanamivir [16]. Cinq mutations (E119 V, D198N, H274Y, R292K et N294S) ont ainsi été identifiées après traitement par l'oseltamivir [7], tandis que seulement deux (Q136K et R152K) l'ont été après traitement par le zanamivir [17,18]. D'un point de vue fonctionnel, les mutations R292K, H274Y et N294S semblent bloquer le changement conformationnel du site actif nécessaire à la fixation de l'oseltamivir dans ce dernier. Toutes ces mutations réduisent l'affinité de liaison entre l'oseltamivir et le site actif de l'enzyme sans pour autant bloquer la fixation et l'hydrolyse du substrat. In vitro, le passage successif de virus sur cellules MDCK en présence de concentrations croissantes d'inhibiteur a montré que l'émergence de mutations dépendait du sous-type [19,20]. Les mutations R292K et E119 V sont principalement observées sur les NAs de sous-type N2, la mutation H274Y principalement sur les NAs de sous-type N1. Bien que les résidus d'acides aminés entrant en interaction avec le substrat soient conservés, les NAs peuvent être organisées en trois groupes [21] : (i) le groupe structurellement proche de la N2 composé des NAs N9, N3, N6 et N7 ; (ii) le groupe analogue à la N1 composé des NAs N4, N5 et N8 et (iii) le groupe composé des NAs de type B. Les sites actifs des N1 et N2 diffèrent principalement par la présence d'une cavité adjacente au site actif observable uniquement dans le groupe N1 [21]. L'influence de cette variabilité structurelle sur la sensibilité aux inhibiteurs a été rapportée durant les programmes de surveillance de la sensibilité aux molécules antivirales [22,23,24]. Indépen-

damment du sous-type de l'hémagglutinine, les NAs de sous-type A N2 sont plus sensibles à l'oseltamivir qu'au zanamivir tandis que la situation inverse s'observe pour les NAs de sous-type A N1 et B. Govorkova et al. ont montré que les NAs N2, N3, N6, N7 et N9 étaient plus sensibles au zanamivir qu'à l'oseltamivir tandis que les NAs N1, N4, N5 et N8 étaient plus sensibles à l'oseltamivir qu'au zanamivir [25]. Ainsi, les résidus d'acides aminés impliqués dans la résistance aux INA dans un groupe pourraient ne pas être nécessairement liés à la résistance à ces inhibiteurs dans un autre groupe.

Plusieurs études par mutagenèse dirigée ont été menées sur les résidus conservés du site actif de la NA. Les mutations R118K, D151E, R152K, R224K, E227D, E276D et R371K correspondant à des résidus du site actif interagissant directement avec les inhibiteurs ont été générées sur la NA d'un virus de sous-type A (H3N2) [26]. Toutes ces mutations ont induit une diminution de l'activité enzymatique et une diminution de la capacité répliquative de ces virus. Les virus porteurs des mutations R118K et E227D ont une répliquaison trop faible pour permettre leur analyse. La mutation R152K ne confère pas de résistance contrairement à ce qui a été observé sur le sous-type B [20]. Les mutations E276D et D151E ont induit une faible résistance uniquement vis-à-vis de l'oseltamivir tandis que les mutations R371K et R224K ont induit une résistance vis-à-vis des deux inhibiteurs. Des mutations de résidus qui n'ont pas d'interaction directe avec l'inhibiteur peuvent également induire des résistances comme c'est le cas pour la mutation I222L [27]. Parmi les mutations les plus fréquemment isolées après des traitements in vivo, la mutation E119 V a été reproduite sur une NA de sous-type N2 et a induit une résistance vis-à-vis de l'oseltamivir seulement, tandis qu'elle induit une double résistance lorsqu'elle est réalisée sur une NA N9 [28]. La mutation R292K générée dans la NA de sous-type N2 confère une réduction de la sensibilité vis-à-vis de l'oseltamivir et du zanamivir dans une moindre mesure [26] ; cependant, cette diminution de sensibilité s'accompagne d'une diminution de l'activité enzymatique. Cette mutation induit subséquemment une baisse de la transmissibilité de ces virus [29]. Elle induit également une résistance vis-à-vis de l'oseltamivir lorsqu'elle est introduite sur une NA de type B. Cependant, elle conduit aussi à une diminution de l'activité et de la stabilité de l'enzyme [20] ; de plus, la capacité répliquative de ce virus est fortement réduite en culture de cellules et explique sans doute l'absence d'isolement de cette mutation après pression de sélection in vitro [30]. Des virus de sous-type H1N1 n'ont pas pu être produits en présence de cette mutation. La mutation H274Y qui induit une résistance vis-à-vis de l'oseltamivir pour le sous-type H1N1, n'induit pas de résistance lorsqu'elle est introduite sur une NA N2 [16].

L'émergence d'une mutation induisant une diminution de la sensibilité aux inhibiteurs dépend de l'inhibiteur et du groupe structurel auquel appartient la NA. L'incidence d'une mutation sur la sensibilité aux inhibiteurs ainsi que sur l'activité et la stabilité de l'enzyme dépend également du sous-type considéré. La réduction de l'activité neuraminidase et de la stabilité de l'enzyme, associée à une diminution de la capacité répliquative du virus muté démontre que la réduction de l'affinité de liaison aux inhibiteurs est le plus souvent associée à une diminution de la fonction enzymatique et donc du fitness du virus.

2.3. Méthodes de détection de la résistance

La mise en évidence du phénotype de résistance vis-à-vis d'INA tels que l'oseltamivir ou le zanamivir est principalement réalisée à l'aide d'un test enzymatique avec une détection fluorimétrique [31] ou en chimioluminescence [32]. L'activité enzymatique détectée dans les prélèvements pathologiques étant très faible, cela impose l'isolement viral en culture de cellules afin d'amplifier

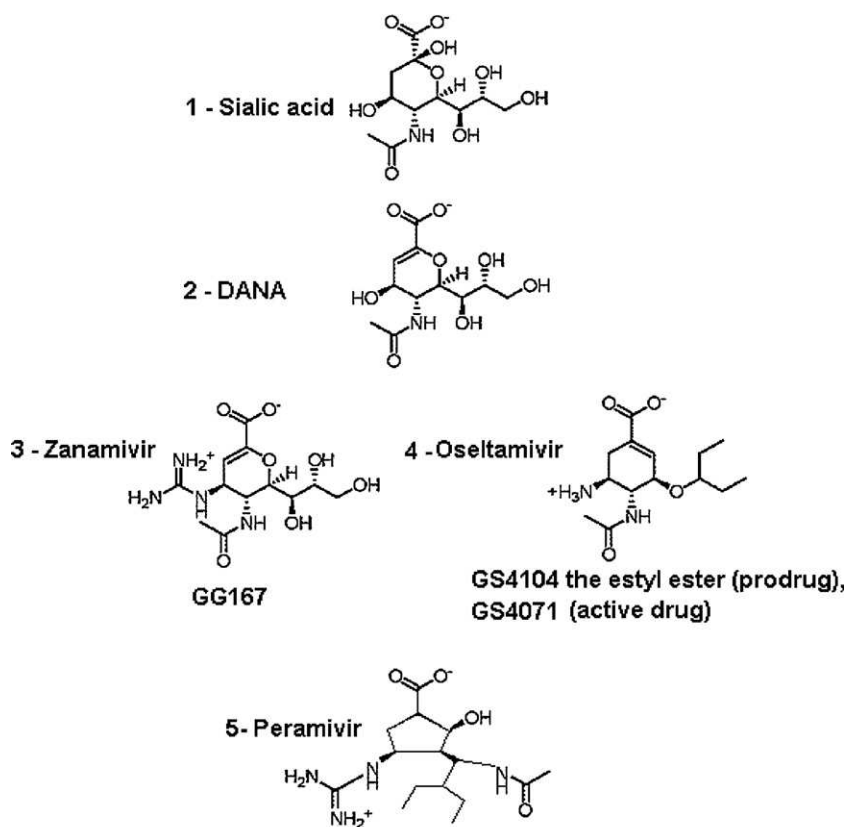


Fig. 2. Structures chimiques de l'acide sialique et des inhibiteurs de la neuraminidase. 1 : acide sialique, acide N-acétyl neuraminique (Neu5Ac) ; 2 : DANA, acide 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acétylneuraminique (Neu5Acen) ; 3 : Zanamivir, 4-guanidino-Neu5Ac2en ; 4 : oseltamivir, 4-N-acetyl-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxylic acid ; 5 : pérémivir.

le virus avant de pouvoir réaliser un test enzymatique. Cependant, un virus dit résistant peut voir sa capacité répliquative réduite en culture cellulaire [33]. Ce profil de résistance est aujourd'hui confirmé génétiquement par séquençage ou pyroséquençage à partir du prélèvement originel et/ou après passage en culture cellulaire.

3. Utilisation des inhibiteurs de neuraminidase dans la grippe saisonnière

L'oseltamivir se présente sous la forme de gélules administrables par voie orale. Il est utilisé à titre curatif, moins de 48 heures et de préférence dans les 12 premières heures après le début des symptômes, chez l'adulte et chez l'enfant à partir de l'âge d'un an ayant une grippe prouvée ou suspectée par le contexte épidémique. Avec le contexte pandémique, l'administration est désormais possible dès la naissance et non plus seulement à partir de l'âge d'un an (recommandations en cours de validation dans l'AMM par l'agence du médicament). En cas d'exposition à un cas clinique de grippe prouvée chez un adulte ou un enfant de plus d'un an, l'oseltamivir peut être utilisé à titre préventif, de préférence dans les 24 premières heures suivant le contact.

Le zanamivir est administrable par inhalation buccale. Il peut être utilisé à titre curatif ou préventif en cas de grippe prouvée ou suspectée chez l'adulte et l'enfant de plus de cinq ans. Le traitement doit être débuté au plus tard 48 heures après le début des signes cliniques.

Les posologies et durées d'administration sont détaillées dans le [Tableau 1](#) (recommandations du comité de lutte contre la grippe du 6 août 2009, susceptibles d'actualisation).

Concernant les précautions d'utilisation, l'oseltamivir et le zanamivir sont contre-indiqués en cas d'hypersensibilité à ces molécules et la posologie doit être adaptée à la clairance de la créatinine en cas d'insuffisance rénale. Du fait du mode d'administration, il faut être prudent avec la prescription de zanamivir en cas de bronchospasmes ou d'altération des fonctions respiratoires. Le zanamivir a peu d'effets secondaires. L'oseltamivir a des effets secondaires essentiellement digestifs, de type nausées transitoires et vomissements qui apparaissent dès le début du traitement et sont atténués par la prise au cours des repas [34,35].

De nombreuses revues reprennent les résultats des études et essais randomisés évaluant l'efficacité des INA utilisés au cours de gripes saisonnières à titre curatif ou préventif [34,35,36].

3.1. Efficacité des traitements curatifs

Une étude initiale réalisée en 1997 a montré que les cas confirmés de grippe pouvaient être traités par du zanamivir, permettant de réduire la durée des symptômes d'un jour environ. Les titres viraux dans les lavages de nez étaient significativement réduits pour les patients traités par zanamivir par rapport aux patients sous placebo [37].

L'efficacité de l'oseltamivir a été démontrée lors d'essais cliniques. Le premier essai a été réalisé chez des adultes volontaires sains infectés expérimentalement par inoculation intranasale de la souche A/Texas/36/1991(H1N1). L'administration d'oseltamivir était débutée à titre curatif 28 heures après l'inoculation du virus et administrée pendant cinq jours. Les titres viraux ont été déterminés par culture cellulaire dans les lavages de nez prélevés toutes les 12 heures pendant cinq jours. En considérant l'ensemble des patients traités par oseltamivir, les titres viraux médians

Tableau 1

Modes d'administration et posologies usuelles des INA.

	Curatif	Préventif
Osetamivir Voie orale	Adulte et enfant > 13 ans 75 mg × 2/jour pendant 5 jours 1–12 ans : pendant 5 jours ≤ 15 kg : 30 mg × 2/jour 15–22 kg : 45 mg × 2/jour 23–40 kg : 60 mg × 2/jour > 40 kg : 75 mg × 2/jour 6–11 mois : 3 mg/kg × 2/jour pendant 5 jours ^a 0–5 mois : 2 à 3 mg/kg × 2/jour pendant 5 jours ^b	Adulte et enfant > 13 ans 75 mg × 1/jour pendant 10 jours 1–12 ans : pendant 10 jours ≤ 15 kg : 30 mg × 1/jour 15–22 kg : 45 mg × 1/jour 23–40 kg : 60 mg × 1/jour > 40 kg : 75 mg × 1/jour
Zanamivir Voie inhalée	Adulte et enfant > 5 ans 2 inhalations (2 × 5 mg) × 2/jour pendant 5 jours	Adulte et enfant > 5 ans 2 inhalations (2 × 5 mg) × 1 / jour pendant 10 jours

^a En cours de validation dans l'AMM par l'Agence européenne du médicament.^b Recommandations du 8 mai 2009 par l'Agence européenne du médicament.

étaient réduits de 2,1 et 3,5 log₁₀ par rapport aux patients sous placebo, respectivement 24 heures et 36 heures après le début du traitement. La durée médiane d'excrétion virale était de 107 heures dans le groupe placebo contre 58 heures pour les patients traités par osetamivir [38]. L'efficacité de l'osetamivir au cours d'une infection grippale naturelle a été analysée par une étude randomisée en double insu. Des adultes sains non immunisés présentant un tableau respiratoire fébrile depuis moins de 36 heures étaient traités par osetamivir pendant cinq jours. La durée et la sévérité de la maladie étaient diminuées de plus de 30 % chez les patients traités par rapport aux patients sous placebo [39].

Chez l'adulte, l'analyse de plusieurs essais montrent que le zanamivir et l'osetamivir ont un effet bénéfique en cas de grippe virologiquement prouvée en permettant la diminution de la durée du syndrome grippal d'environ un jour s'ils sont administrés dans les 48 heures qui suivent le début des signes cliniques [34].

La précocité d'administration du traitement paraît être le déterminant le plus important de l'efficacité du traitement. Chez les adultes, un traitement commencé dans les 12 heures après le début des signes cliniques permet de réduire la durée de la maladie de plus de trois jours par rapport à un traitement débuté 48 heures après le début des signes cliniques [40,41].

Une méta-analyse a conclu que les INA permettent de diminuer la prescription d'antibiotiques, le risque d'hospitalisation et de décès [42]. Cependant, ces résultats sont discutés, la fiabilité de ces données ayant été remise en cause car provenant d'études le plus souvent non publiées [34]. En résumé, les INA diminuent modestement les symptômes liés à la grippe saisonnière et réduisent le risque de développer une grippe symptomatique en cas d'exposition à un patient infecté par une grippe virologiquement prouvée [34].

Les enfants sont particulièrement vulnérables aux épidémies de grippe. Les essais de traitement curatif chez l'enfant montrent une réduction du temps médian de résolution des symptômes compris entre 0,5 et 1,5 jour. Cependant, l'utilisation des INA n'a pas permis de réduire de manière significative l'usage d'antibiotiques ni de réduire les exacerbations d'asthme et leur impact sur l'incidence de complications n'a pu être démontré [35].

3.2. Efficacité des traitements préventifs

Des études contrôlées ont montré que les INA permettent d'empêcher la survenue d'une grippe dans 80 % des cas environ quand ils sont utilisés à titre préventif. La rapidité de la reconnaissance d'un cas de grippe et la mise en place d'une prophylaxie précoce permettent d'accroître l'efficacité de ces prophylaxies [36].

Il n'y a pas de preuve de l'efficacité des INA utilisés en prophylaxie pour empêcher l'apparition d'un syndrome grippal ; cependant, la prise d'INA diminue le risque de grippe symptomatique prouvée virologiquement. Utilisés en prophylaxie postexposition avant le développement de symptômes cliniques chez le sujet contact, zanamivir [43,44] et osetamivir [45,46] permettent d'obtenir un effet protecteur significatif.

Par ailleurs, lors d'études cliniques sur l'efficacité de l'osetamivir administré à titre préventif au cours de grippe saisonnière, aucun variant résistant n'a été détecté [45,46].

3.3. Efficacité des INA dans les cas graves

Une étude réalisée chez des patients hospitalisés présentant une grippe confirmée indique qu'un traitement par osetamivir permet de réduire la mortalité même s'il est initié plus de 48 heures après le début des signes cliniques [47]. Le traitement par osetamivir permet de réduire la durée d'hospitalisation, elle-même associée à une excrétion virale prolongée [48]. L'instauration d'un traitement curatif par osetamivir dans les quatre premiers jours après l'apparition des symptômes permettait en effet une diminution plus rapide de la charge virale par rapport à celle des patients non traités. Une semaine après le début de la maladie, l'ARN viral n'était détectable que chez 26 % des patients traités contre 58 % des patients non traités [49].

3.4. Traitement aux INA et résistances

La surveillance de la sensibilité aux INA avant leur introduction dans les schémas thérapeutiques a montré qu'aucune résistance n'était détectée [24,50]. De 1999 à 2002, seuls 0,3 % des isolats testés présentaient une réduction de sensibilité à l'osetamivir d'un facteur 10 [22]. Parallèlement, des études sur des volontaires ont montré que l'incidence d'un traitement par l'osetamivir sur l'émergence de virus à sensibilité réduite était de 0,4 % pour les adultes et de 5,4 % pour les enfants [51,52]. Un taux de 18 % de résistance a été mis en évidence lors d'une étude menée chez des enfants japonais [53]. Pour ces études, la dose de 2 mg/kg utilisée paraît insuffisante au regard de l'excrétion virale prolongée chez les enfants. L'incidence d'un traitement à l'osetamivir sur l'émergence de résistance avec les nouvelles posologies recommandées est réduite à 0,2 % pour les adultes et 1,1 % pour les enfants [52]. Durant ces essais, les mutations observées ont corroboré celles observées in vitro. Ainsi, la mutation R292K a principalement été isolée sur des virus de sous-type A(H3N2) et la mutation H274Y a principalement été isolée sur des virus de sous-type A(H1N1). Outre les mutations H274Y sur des virus A(H1N1),

E119 V sur des virus A(H3N2), d'autres mutations ont été mises en évidence, comme les mutations R371K et H274Y pour les virus B et D151N pour les virus A(H3N2) [54]. Cette détection des marqueurs moléculaires de résistance a également été mise en évidence en France [55]. Au cours de la saison 2007–2008, une augmentation de la fréquence de la résistance à l'oseltamivir pour des virus A(H1N1) porteurs de la mutation H274Y a été détectée avec une fréquence de 25 % à la fin de l'hiver en Europe [56]. Cette émergence a été observée sur un plan mondial avec des proportions différentes selon les pays [57–59], la Norvège ayant atteint une proportion de virus résistant à l'oseltamivir de 67 % [60]. Cependant, la circulation de ces virus résistant à l'oseltamivir n'a pas été corrélée à l'utilisation du Tamiflu® [61]. Enfin, l'impact clinique et/ou épidémiologique de ces virus est comparable à celui des virus sensibles [62]. Les virus résistants ont continué à se transmettre et représentaient 100 % des virus circulant en Afrique du Sud en juillet 2008. L'hiver suivant (2008/2009), 99 % des virus A(H1N1) isolés notamment aux États-Unis et au Canada étaient résistants à l'oseltamivir [63,64].

4. Utilisation des inhibiteurs de neuraminidase dans la grippe aviaire A(H5N1)

Depuis 2003, seuls 447 cas d'infection par le virus A(H5N1) ont été rapportés dans le monde au 21 décembre 2009, mais la plupart des sujets infectés ont présenté des formes cliniques sévères. Au cours de l'infection par le virus A(H5N1), un très grand nombre de ces patients évoluent rapidement vers un syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA) et une défaillance multi-organe. La mortalité observée est de l'ordre de 60 % [65], ce qui fait du virus A(H5N1) un des agents infectieux les plus dangereux pour l'homme. Cette virulence et la gravité des formes cliniques observées imposent une étroite surveillance de la circulation et de l'évolution du virus A(H5N1) ainsi que la mise en œuvre de recommandations pour la prise en charge thérapeutique de ces patients. Actuellement, le faible nombre de cas observés n'a pas permis de réaliser des études cliniques contrôlées mais l'expérience accumulée des différentes équipes médicales ayant pris en charge ces patients, les données collectées concernant la grippe saisonnière et les informations obtenues sur les virus A(H5N1) circulant ont permis à l'Organisation mondiale de la santé (OMS) de proposer en 2007 des recommandations sur l'utilisation des antiviraux [66].

4.1. Traitement par oseltamivir

Des rapports récents en Égypte [67] et en Indonésie [68] suggèrent qu'un traitement précoce pourrait prévenir les formes graves. Dans une série de sept patients souffrant de formes sévères d'infection A(H5N1) traités par oseltamivir, la survie était liée à une instauration précoce d'un traitement [69]. L'OMS recommande l'utilisation en première intention de l'oseltamivir. Il est donc important que devant toute suspicion de grippe A(H5N1), un traitement par oseltamivir soit instauré immédiatement selon le schéma thérapeutique classique (75 mg deux fois par jour pendant cinq jours) avant même la confirmation virologique de l'infection. Parce que l'excrétion virale semble prolongée lors d'une infection par le virus A(H5N1) [70], ce traitement doit être instauré même lorsque le délai de 48 heures après le début des symptômes est dépassé. Face à la gravité des tableaux observés, différentes questions peuvent se poser concernant la bonne absorption de l'oseltamivir chez des patients dont les fonctions métaboliques sont perturbées, le bénéfice d'une augmentation des doses administrées, la durée du traitement sur l'évolution de l'infection et l'intérêt de l'association d'antiviraux.

La biodisponibilité de l'oseltamivir est incertaine chez des patients sévèrement atteints par une infection A(H5N1) car

beaucoup d'entre eux ont une stase gastrique et une diarrhée qui peuvent altérer la transformation de l'oseltamivir en carboxylate actif par les estérases hépatiques et intestinales. Taylor et al. rapportent que l'administration de bolus quotidiens de 150 mg d'oseltamivir par sonde nasogastrique a permis d'obtenir une bonne absorption de l'oseltamivir, des taux plasmatiques suffisants pour observer une diminution de la charge virale plasmatique, ainsi que de l'excrétion virale chez trois patients ventilés infectés par les virus A(H5N1) ou A(H3N2) [71]. En cas de stase gastrique, le médicament peut être administré par une sonde nasojéjunale mais cette technique reste invasive et d'un bénéfice incertain [66]. Par ailleurs, le carboxylate d'oseltamivir est excrété par voie rénale et la dose doit être diminuée chez des patients ayant une clairance de la créatinine inférieure à 30 ml/min [72]. Le dosage sanguin de l'oseltamivir peut permettre de contrôler l'absorption et l'excrétion de la molécule [66].

Étant donnée la gravité des tableaux cliniques observés, l'augmentation des doses ou de la durée du traitement peut être discutée. En effet, l'administration de doses d'oseltamivir plus élevées devrait théoriquement palier la mauvaise absorption de l'oseltamivir et la survenue de résistances. Une bonne tolérance a été rapportée lors de l'administration d'oseltamivir à des doses de 150 mg × 2/jour [39,73], voire supérieures à 1000 mg [74]. Chez l'animal, l'augmentation des doses d'oseltamivir et de la durée de traitement (huit à dix jours versus cinq jours) a été associée à un meilleur contrôle de la réplication virale et une diminution de la mortalité [75,76]. La durée du traitement doit être guidée par l'évolution clinique du patient, au cas par cas. La persistance de la fièvre et la détérioration clinique suggèrent un maintien de la réplication virale associée ou non à une surinfection bactérienne qui doit être explorée. Si aucune amélioration clinique n'est observée après un traitement de cinq jours, il devra être prolongé de cinq jours supplémentaires [66]. La tolérance n'a pas été évaluée chez l'enfant.

4.2. Traitement par zanamivir

Le zanamivir, administré uniquement par voie inhalée, montre une biodisponibilité faible (20 %) qui est diminuée en cas de pneumonie sévère [72]. Peu d'informations sont disponibles sur l'administration de zanamivir chez des patients présentant des atteintes respiratoires basses sévères lors d'une infection A(H5N1). Du zanamivir nébulisé a été utilisé chez un faible nombre de patients hospitalisés pour une infection grippale saisonnière et a montré une bonne tolérance mais un bénéfice incertain [66]. Des études animales évoquent le bénéfice apporté par le pérémivir intramusculaire [77], le zanamivir intraveineux [78] ou l'interféron de type I [79,80] mais aucune donnée n'est disponible sur l'utilisation de ces molécules chez des patients atteints d'infection A(H5N1). En revanche, les autorisations actuellement obtenues pour des formes injectables dans la prise en charge des infections dues au virus A(H1N1)2009 devraient désormais permettre leur utilisation dans le cas d'infections à virus A(H5N1).

4.3. Associations d'antiviraux

L'association d'antiviraux dans le cadre de l'infection par le virus A(H5N1) présente plusieurs intérêts : une plus grande efficacité sur la réduction de la réplication virale et de la dissémination de l'infection [81] et la diminution du risque d'émergence de mutants résistants. Certains auteurs préconisent d'utiliser des associations d'antiviraux, en particulier oseltamivir–amantadine, dans la prise en charge des cas d'infections A(H5N1) [82]. Par ailleurs, chez la souris, l'association oseltamivir–ribavirine a montré une meilleure efficacité que l'oseltamivir seul sur les virus A(H5N1) appartenant aux clades 1 et 2 [83].

4.4. Résistance du virus A(H5N1) aux antiviraux

Le risque d'émergence de mutations de résistance est très élevé pour le virus A(H5N1) qui présente une très forte variabilité génétique. Actuellement, dix clades différents ont été détectés chez l'oiseau [84] et des variations de sensibilité aux différents antiviraux ont déjà été rapportées. La plupart des virus A(H5N1) appartenant aux clades 1 (Cambodge, Thaïlande, Vietnam) et 2.1 (Indonésie) sont résistants à l'amantadine et la rimantadine. Chez l'homme, il a été rapporté des souches de virus A(H5N1) résistants aux INA chez 0,4 à 4 % des patients [85]. La résistance à l'oseltamivir observée pour les souches du clade 1 est associée à la mutation H274Y chez des patients ayant reçu de l'oseltamivir. Ces virus résistants à l'oseltamivir restent sensibles au zanamivir. Une diminution de sensibilité associée à d'autres mutations de la NA (N294S) ont été rapportées, avant ou après traitement par l'oseltamivir, chez des patients infectés par des souches du clade 1 [86] et du sous-clade 2.2 [86]. Chez l'oiseau, une sensibilité diminuée à l'oseltamivir a été détectée pour des souches virales appartenant aux sous-clades 2.3.4 et 2.2 [87,88]. Ces virus présentent une sensibilité réduite au zanamivir mais restent sensibles aux adamantanes [88].

Aujourd'hui, il est important d'évaluer l'impact des associations d'antiviraux, des adaptations de posologies et de l'utilisation des formes injectables sur l'évolution clinique des patients infectés par le virus A(H5N1).

5. Utilisation des inhibiteurs de neuraminidase dans la grippe pandémique A(H1N1)2009

Même si la majorité des infections dues au virus pandémique A(H1N1)2009 sont peu sévères, des formes graves ont néanmoins été observées chez les sujets jeunes, les patients présentant des facteurs de risques (pathologie cardiaque ou respiratoire, obésité, grossesse) et les sujets immunodéprimés [89]. Il a été confirmé très tôt par l'OMS que le virus pandémique était sensible aux deux INA, oseltamivir et zanamivir, et résistant à l'amantadine et la rimantadine [90]. Ainsi, les recommandations préconisent un traitement antiviral le plus précoce possible, même si l'efficacité de la prise en charge de ces infections sévères à virus A(H1N1)2009 par les antiviraux classiquement utilisés pour la grippe saisonnière reste à évaluer précisément.

5.1. Traitement des formes classiques

Le traitement curatif des formes classiques des infections à virus A(H1N1)2009 est indiqué dans les 48 heures qui suivent le début des signes cliniques. Il permet de diminuer la durée de l'excrétion virale. Une étude menée à Hong-Kong sur plus de 100 patients a mis en évidence que 74 % des patients traités par oseltamivir aux doses standards pendant cinq jours n'excrétaient plus de virus une semaine après le début des signes cliniques, contre 43 % des patients non traités [49].

La mise en place plus ou moins systématique d'un traitement prophylactique par les INA reste controversée [91]. Une large utilisation prophylactique des INA peut permettre de limiter la diffusion d'une épidémie en limitant les cas secondaires, comme cela a été mis en évidence dans un modèle de diffusion d'une épidémie à virus A(H5N1) [92]. Mais le risque principal de cette stratégie réside dans l'augmentation de la probabilité d'une sélection de virus résistants et de leur diffusion [91].

5.2. Traitement des formes sévères

La plupart des études rapportent un taux élevé de traitement par les INA dans le cas de formes sévères. Tous les patients

présentant une atteinte pulmonaire ont été traités par de l'oseltamivir à fortes doses en Argentine [93]. Dans une étude réalisée aux États-Unis, 75 % des patients hospitalisés ont été traités par oseltamivir (90 %), zanamivir (10 %) et pour quelques patients par des associations amantadine + oseltamivir ou rimantadine + oseltamivir [94]. De la même façon, 80 % des patients hospitalisés en Irlande ont été traités par de l'oseltamivir dans 98 % des cas [95]. Enfin, une étude réalisée au Mexique chez des patients présentant des formes sévères d'infection à virus A(H1N1)2009 (taux de mortalité dans cette population de 40 %) a montré que le traitement antiviral, l'oseltamivir dans la majorité des cas, était associé de façon significative à un meilleur taux de survie [96].

Les premières recommandations de l'OMS ont porté sur un traitement précoce et systématique de tous les patients présentant des formes sévères, incluant les enfants de moins d'un an et les femmes enceintes, ajoutant que le traitement pouvait passer à 150 mg deux fois par jour, soit deux fois la dose classiquement recommandée, et être prolongé jusqu'à dix jours en cas de réponse insuffisante. L'oseltamivir a été préconisé en première intention, en réservant le zanamivir aux cas de résistance à l'oseltamivir. Par ailleurs, la prise en charge des formes sévères peut également reposer sur l'utilisation des INA administrables par voie intraveineuse : zanamivir (600 mg deux fois par jour pendant cinq à dix jours, disponible par le biais d'une autorisation temporaire d'utilisation, laboratoire GSK) ou pérémivir (laboratoire BioCryst). Le zanamivir intraveineux n'étant disponible actuellement qu'en quantités très limitées, il est réservé aux patients présentant des formes graves ne répondant pas à un traitement par l'oseltamivir ou ne pouvant pas recevoir la forme orale de l'oseltamivir [97].

5.3. Traitement chez les patients immunodéprimés

Chez les patients immunodéprimés, en particulier chez les greffés de moelle osseuse, une excrétion virale prolongée, observée avec les virus saisonniers [98], peut justifier une durée de traitement supérieure aux cinq jours habituellement préconisés [99]. Cette donnée motive également un suivi ciblé de l'émergence de résistance aux INA ; le traitement antiviral étant prolongé, le risque de sélection d'une souche résistante est également accru dans cette population. La suspicion clinique d'une résistance à l'oseltamivir, confirmée éventuellement par une détection de la mutation H274Y et/ou un test phénotypique, peut conduire au changement de la thérapeutique au profit du zanamivir.

Du fait de ce risque accru de résistance, un traitement prophylactique ne doit être mis en place que dans des cas particuliers ; il apparaît ainsi préférable de s'orienter sur un traitement très précoce, dès l'apparition des signes cliniques [99].

5.4. Traitement chez les femmes enceintes

Une étude récente sur l'impact d'un traitement par un INA chez des femmes enceintes fait apparaître que l'oseltamivir est le traitement de choix, en particulier pour un traitement curatif, car il y a de nombreuses données disponibles sur cette molécule qui montrent toutes un effet tératogène très limité [100]. Peu de données existent sur l'utilisation du zanamivir, mais il reste indiqué, comme l'oseltamivir, dans le cadre d'un traitement prophylactique [101]. Les deux molécules peuvent être utilisées en cas d'allaitement, le traitement de la mère exposant l'enfant à des doses inférieures aux doses pédiatriques recommandées [100]. Il n'y a actuellement pas de données disponibles sur l'utilisation par voie intraveineuse du zanamivir ou du pérémivir chez la femme enceinte.

5.5. Résistance aux INA

Depuis le début de la pandémie, des cas sporadiques de virus A(H1N1)2009 étaient recensés. Fin novembre 2009, 52 cas étaient recensés [102]. Ces virus étaient tous résistants à l'oseltamivir et sensibles au zanamivir. Ils présentaient tous la mutation H274Y dans la neuraminidase N1. Un bilan réalisé sur 32 isolats résistants à l'oseltamivir montre que le plus souvent, ces virus ont été isolés chez des patients ayant reçu de l'oseltamivir en traitement curatif ou prophylactique [103]. Sept (22 %) virus résistants ont été isolés chez des patients immunodéprimés ayant reçu un traitement prolongé. Treize cas de résistance (41 %) étaient associés à un traitement préventif et les mutations H274Y et I222 V (numérotation dans N2) ont été détectées dans la NA de ces isolats.

Dans la plupart des cas, il n'y a pas eu de transmission interhumaine de ces virus résistants et ces virus ne présentaient pas une plus grande virulence. Cependant, des virus résistants à l'oseltamivir ont été détectés chez des patients non traités à Hong-Kong [104,105], au Danemark et au Japon [106], ce qui suggère que les virus A(H1N1)2009 résistants pourraient se transmettre. Aucun cas de virus résistant n'a été suivi de transmission communautaire identifiée, mais des cas groupés d'infection par un virus A(H1N1)2009 résistant à l'oseltamivir ont été décrits dans des services d'hématologie aux États-Unis (quatre cas groupés) et au Pays de Galles (six cas groupés) [102,107].

6. Conclusion

L'utilisation des INA a beaucoup augmenté dans notre pays dans le contexte de la grippe pandémique A(H1N1)2009, alors que certains pays comme le Japon et les États-Unis utilisent largement ces molécules depuis plusieurs années pour le traitement des grippes saisonnières. La principale crainte associée à cette large utilisation est le risque d'émergence de résistance, ce qui soulève la question de l'intérêt de leur utilisation systématique en prophylaxie. Ces résistances sont plus fréquentes avec l'oseltamivir, le plus utilisé, qu'avec le zanamivir. Les résistances acquises restent à un niveau bas et sont essentiellement décrites chez des patients immunodéprimés. Mais l'expérience de ces dernières années avec le virus A(H1N1) saisonnier montre également qu'il peut émerger des résistances naturelles.

Il est ainsi primordial de poursuivre le développement de molécules actives sur les virus influenza. Ainsi, de nouveaux INA sont en cours d'évaluation, tels que le péràmir, l'un des plus étudiés, administré par voie intramusculaire, ainsi que des dérivés cyclopentanes et des dérivés pyrrolidines [108]. Une meilleure connaissance de la réplication du virus influenza a aussi permis d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques. Des inhibiteurs de la polymérase virale ou de l'attachement viral sont en cours d'évaluation. Le T-705 (favipiravir) est un exemple d'un inhibiteur de la polymérase virale, efficace sur les virus influenza A, B et C mais aussi sur d'autres virus à ARN tels que les virus des fièvres hémorragiques [109,110]. Enfin, une molécule capable de cliver les récepteurs (α 2-3 et α 2-6) présents à la surface des cellules épithéliales et donc de prévenir l'attachement des virus influenza (DAS181) a été évaluée chez la souris et a montré une bonne efficacité en prophylaxie comme en curatif [111].

Des perspectives thérapeutiques existent donc, mais il reste la question du délai nécessaire pour que ces molécules soient disponibles pour la prise en charge des patients.

Conflit d'intérêt

BL déclare des conflits d'intérêts avec Argene, Biocryst, bioMérieux, GSK, MedImmune, Merck, Novartis, Plasmair, Roche, Sanofi-Pasteur, Wittycell.

Références

- [1] von Itzstein M, Wu WY, Kok GB, Pegg MS, Dyason JC, Jin B, et al. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* 1993;363:418–23.
- [2] Gottschalk A. Neuraminidase: the specific enzyme of influenza virus and *Vibrio cholerae*. *Biochim Biophys Acta* 1957;23:645–6.
- [3] Ward CW, Elleman TC, Azad AA. Amino acid sequence of the Pronase-released heads of neuraminidase subtype N2 from the Asian strain A/Tokyo/3/67 of influenza virus. *Biochem J* 1982;207:91–5.
- [4] Wrigley NG, Skehel JJ, Charlwood PA, Brand CM. The size and shape of influenza virus neuraminidase. *Virology* 1973;51:525–9.
- [5] Varghese JN, Laver WG, Colman PM. Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* 1983;303:35–40.
- [6] Air GM, Laver WG. The neuraminidase of influenza virus. *Proteins* 1989;6:341–56.
- [7] Moscona A. Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med* 2005;353:1363–73.
- [8] Colman PM. Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies, and inhibitors. *Protein Sci* 1994;3:1687–96.
- [9] Gubareva LV, Kaiser L, Hayden FG. Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet* 2000;355:827–35.
- [10] Burmeister WP, Baudin F, Cusack S, Ruigrok RW. Comparison of structure and sequence of influenza B/Yamagata and B/Beijing neuraminidases shows a conserved "head" but much greater variability in the "stalk" and NB protein. *Virology* 1993;192:683–6.
- [11] Varghese JN, Smith PW, Sollis SL, Blick TJ, Sahasrabudhe A, McKimm-Breschkin JL. Drug design against a shifting target: a structural basis for resistance to inhibitors in a variant of influenza virus neuraminidase. *Structure* 1998;6:735–46.
- [12] Taylor NR, von Itzstein M. Molecular modeling studies on ligand binding to sialidase from influenza virus and the mechanism of catalysis. *J Med Chem* 1994;37:616–24.
- [13] Burmeister WP, Ruigrok RW, Cusack S. The 2.2 Å resolution crystal structure of influenza B neuraminidase and its complex with sialic acid. *EMBO J* 1992;11:49–56.
- [14] Varghese JN, Epa VC, Colman PM. Three-dimensional structure of the complex of 4-guanidino-Neu5Ac2en and influenza virus neuraminidase. *Protein Sci* 1995;4:1081–7.
- [15] Kim CU, Lew W, Williams MA, Liu H, Zhang L, Swaminathan S, et al. Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. *J Am Chem Soc* 1997;119:681–90.
- [16] Wang MZ, Tai CY, Mendel DB. Mechanism by which mutations at his274 alter sensitivity of influenza A virus N1 neuraminidase to oseltamivir carboxylate and zanamivir. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3809–16.
- [17] Gubareva LV, Matrosovich MN, Brenner MK, Bethell RC, Webster RG. Evidence for zanamivir resistance in an immunocompromised child infected with influenza B virus. *J Infect Dis* 1998;178:1257–62.
- [18] Hurt AC, Holien JK, Parker M, Kelso A, Barr IG. Zanamivir-resistant influenza viruses with a novel neuraminidase mutation. *J Virol* 2009;83:10366–73.
- [19] Tai CY, Escarpe PA, Sidwell RW, Williams MA, Lew W, Wu H, et al. Characterization of human influenza virus variants selected in vitro in the presence of the neuraminidase inhibitor GS 4071. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:3234–41.
- [20] Jackson D, Barclay W, Zürcher T. Characterization of recombinant influenza B viruses with key neuraminidase inhibitor resistance mutations. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:162–9.
- [21] Russell RJ, Haire LF, Stevens DJ, Collins PJ, Lin YP, Blackburn GM, et al. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature* 2006;443:45–9.
- [22] Monto AS, Comanor L, Shay DK, Thompson WW. Epidemiology of pandemic influenza: use of surveillance and modeling for pandemic preparedness. *J Infect Dis* 2006;194(Suppl. 2):S92–7.
- [23] Hurt AC, Barr IG, Hartel G, Hampson AW. Susceptibility of human influenza viruses from Australasia and South East Asia to the neuraminidase inhibitors zanamivir and oseltamivir. *Antiviral Res* 2004;62:37–45.
- [24] Ferraris O, Kessler N, Lina B. Sensitivity of influenza viruses to zanamivir and oseltamivir: a study performed on viruses circulating in France prior to the introduction of neuraminidase inhibitors in clinical practice. *Antiviral Res* 2005;68:43–8.
- [25] Govorkova EA, Leneva IA, Golubeva OG, Bush K, Webster RG. Comparison of efficacies of RWJ-270201, zanamivir, and oseltamivir against H5N1, H9N2, and other avian influenza viruses. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2723–32.
- [26] Yen H, Hoffmann E, Taylor G, Scholtissek C, Monto AS, Webster RG, et al. Importance of neuraminidase active-site residues to the neuraminidase inhibitor resistance of influenza viruses. *J Virol* 2006;80:8787–95.
- [27] Richard M, Deléage C, Barthélémy M, Lin YP, Hay A, Lina B, et al. Impact of influenza A virus neuraminidase mutations on the stability, activity, and sensitivity of the neuraminidase to neuraminidase inhibitors. *J Clin Virol* 2008;41:20–4.

- [28] Molla A, Kati W, Carrick R, Steffy K, Shi Y, Montgomery D, et al. In vitro selection and characterization of influenza A (A/N9) virus variants resistant to a novel neuraminidase inhibitor, A-315675. *J Virol* 2002;76:5380–6.
- [29] Herlocher ML, Carr J, Ives J, Elias S, Truscon R, Roberts N, et al. Influenza virus carrying an R292K mutation in the neuraminidase gene is not transmitted in ferrets. *Antiviral Res* 2002;54:99–111.
- [30] Cheam AL, Barr IG, Hampson AW, Mosse J, Hurt AC. In vitro generation and characterisation of an influenza B variant with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res* 2004;63:177–81.
- [31] Potier M, Mameli L, B  lisle M, Dallaire L, Melan  on SB. Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl)-alpha-D-N-acetylneuraminate substrate. *Anal Biochem* 1979;94:287–96.
- [32] Barnett JM, Cadman A, Gor D, Dempsey M, Walters M, Candlin A, et al. Zanamivir susceptibility monitoring and characterization of influenza virus clinical isolates obtained during phase II clinical efficacy studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:78–87.
- [33] Blick TJ, Tiong T, Sahasrabudhe A, Varghese JN, Colman PM, Hart GJ, et al. Generation and characterization of an influenza virus neuraminidase variant with decreased sensitivity to the neuraminidase-specific inhibitor 4-guanidino-Neu5Ac2en. *Virology* 1995;214:475–84.
- [34] Jefferson T, Jones M, Doshi P, Del Mar C. Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2009;339:b5106.
- [35] Shun-Shin M, Thompson M, Heneghan C, Perera R, Harnden A, Mant D. Neuraminidase inhibitors for treatment and prophylaxis of influenza in children: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2009;339:b3172.
- [36] Moscona A. Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med* 2005;353:1363–73.
- [37] Hayden FG, et al. Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza virus infections. *GG167 Influenza Study Group. N Engl J Med* 1997;337:874–80.
- [38] Hayden FG, Osterhaus AD, Treanor JJ, Fleming DM, Aoki FY, Nicholson KG, et al. Use of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in experimental human influenza: randomized controlled trials for prevention and treatment. *JAMA* 1999;282:1240–6.
- [39] Treanor JJ, Hayden FG, Vrooman PS, Barbarash R, Bettis R, Riff D, et al. Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute influenza: a randomized controlled trial. *US Oral Neuraminidase Study Group. JAMA* 2000;283:1016–24.
- [40] Aoki FY, Macleod MD, Paggiaro P, Carewicz O, El Sawy A, Wat C, et al. Early administration of oral oseltamivir increases the benefits of influenza treatment. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:123–9.
- [41] Kawai N, Ikematsu H, Iwaki N, Satoh I, Kawashima T, Maeda T, et al. Factors influencing the effectiveness of oseltamivir and amantadine for the treatment of influenza: a multicenter study from Japan of the 2002–2003 influenza season. *Clin Infect Dis* 2005;40:1309–16.
- [42] Kaiser L, Wat C, Mills T, Mahoney P, Ward P, Hayden F. Impact of oseltamivir treatment on influenza-related lower respiratory tract complications and hospitalizations. *Arch Intern Med* 2003;163:1667–72.
- [43] Hayden FG, Gubareva LV, Monto AS, Klein TC, Elliott MJ, Hammond JM, et al. Inhaled zanamivir for the prevention of influenza in families. *Zanamivir Family Study Group. N Engl J Med* 2000;343:1282–9.
- [44] Monto AS, Robinson DP, Herlocher ML, Hinson Jr JM, Elliott MJ, Crisp A. Zanamivir in the prevention of influenza among healthy adults: a randomized controlled trial. *JAMA* 1999;282:31–5.
- [45] Welliver R, Monto AS, Carewicz O, Schattelman E, Hassman M, Hedrick J, et al. Effectiveness of oseltamivir in preventing influenza in household contacts: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001;285:748–54.
- [46] Hayden FG, Belshe R, Villanueva C, Lanno R, Hughes C, Small I, et al. Management of influenza in households: a prospective, randomized comparison of oseltamivir treatment with or without postexposure prophylaxis. *J Infect Dis* 2004;189:440–9.
- [47] McGeer A, Green KA, Plevneshi A, Shigayeva A, Siddiqi N, Raboud J, et al. Antiviral therapy and outcomes of influenza requiring hospitalization in Ontario. *Can Clin Infect Dis* 2007;45:1568–75.
- [48] Lee N, Chan PK, Choi KW, Lui G, Wong B, Cockram CS, et al. Factors associated with early hospital discharge of adult influenza patients. *Antivir Ther (Lond)* 2007;12:501–8.
- [49] Lee N, Chan PK, Hui DS, Rainer TH, Wong E, Choi KW, et al. Viral loads and duration of viral shedding in adult patients hospitalized with influenza. *J Infect Dis* 2009;200:492–500.
- [50] McKimm-Breschkin J, Trivedi T, Hampson A, Hay A, Klimov A, Tashiro M, et al. Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2264–72.
- [51] Nicholson KG, Aoki FY, Osterhaus AD, Trottier S, Carewicz O, Mercier CH, et al. Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomised controlled trial. *Neuraminidase Inhibitor Flu Treatment Investigator Group. Lancet* 2000;355:1845–50.
- [52] Whitley RJ, Hayden FG, Reisinger KS, Young N, Dutkowski R, Ipe D, et al. Oral oseltamivir treatment of influenza in children. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:127–33.
- [53] Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, Shiraishi K, Kawakami C, Kimura K, et al. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet* 2004;364:759–65.
- [54] Sheu TG, Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, Garten RJ, Xu X, Bright RA, et al. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:3284–92.
- [55] Escuret V, Frobert E, Bouscambert-Duchamp M, Sabatier M, Grog I, Valette M, et al. Detection of human influenza A (H1N1) and B strains with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J Clin Virol* 41 2008; 25–28.
- [56] Meijer A, Lackenby A, Hungnes O, Lina B, van-der-Werf S, Schweiger B, et al. Oseltamivir-resistant influenza A (H1N1). *Europe, 2007–08 season. Emerging Infect Dis* 2009;15:552–60.
- [57] Hurt AC, Ernest J, Deng YM, Iannello P, Besselaar TG, Birch C, et al. Emergence and spread of oseltamivir-resistant A(H1N1) influenza viruses in Oceania, South East Asia and South Africa. *Antiviral Res* 2009;83:90–3.
- [58] Tamura D, Mitamura K, Yamazaki M, Fujino M, Nirasawa M, Kimura K, et al. Oseltamivir-resistant influenza A viruses circulating in Japan. *J Clin Microbiol* 2009;47:1424–7.
- [59] Ciblak MA, Hasoksuz M, Escuret V, Valette M, Gul F, Yilmaz H, et al. Surveillance and oseltamivir resistance of human influenza A virus in Turkey during the 2007–2008 season. *J Med Virol* 2009;81:1645–51.
- [60] Hauge SH, Dudman S, Borgen K, Lackenby A, Hungnes O. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1). *Norway, 2007–08. Emerging Infect Dis* 2009;15:155–62.
- [61] Kramarz P, Monnet D, Nicoll A, Yilmaz C, Ciano C. Use of oseltamivir in 12 European countries between 2002 and 2007–lack of association with the appearance of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses. *Euro Surveill* 2009;14.
- [62] Ciano BC, Meerhoff TJ, Kramarz P, Bonmarin I, Borgen K, Boucher CA, et al. Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses detected in Europe during season 2007–8 had epidemiologic and clinical characteristics similar to co-circulating susceptible A(H1N1) viruses. *Euro Surveill* 2009;14.
- [63] World Health Organization. Seasonal influenza A(H1N1) virus resistant to oseltamivir. Available at <http://www.who.int/csr/disease/influenza/2008-9NHemiResistanceTable2.pdf>. Accessed on January 11, 2010.
- [64] Dharan NJ, Gubareva LV, Meyer JJ, Okomo-Adhiambo M, McClinton RC, Marshall SA, et al. Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the United States. *JAMA* 2009;301:1034–41.
- [65] World Health Organization. Avian influenza. Cumulative number of human cases of avian influenza. Available at: (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2009_12_21/en/index.html). Accessed December 21, 2009.
- [66] World Health Organization. Avian influenza. Clinical management of human infection with avian influenza A(H5N1) virus. Available at: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/ClinicalManagement07.pdf. (August 15, 2007). Accessed December 21, 2009.
- [67] Writing Committee of the Second World Health Organization Consultation on Clinical Aspects of Human Infection with Avian Influenza A (H5N1) Virus, Abdel-Ghaffer A., Chotpitayasonndh T, Gao Z, Hayden FG, Nguyen DH et al. Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans. *N. Engl J Med* 2008;358:261–73.
- [68] Kandun IN, Tresnaningsih E, Purba WH, Lee V, Samaan G, Harun S, et al. Factors associated with case fatality of human H5N1 virus infections in Indonesia: a case series. *Lancet* 2008;372:744–9.
- [69] Chotpitayasonndh T, Ungchusak K, Hanshaoworakul W, Chunsuthiwat S, Sawanpanyalert P, Kijphati R, et al. Human disease from influenza A (H5N1). Thailand, 2004. *Emerging Infect Dis* 2005;11:201–9.
- [70] de Jong MD, Tran TT, Truong HK, Vo MH, Smith GJ, Nguyen VC, et al. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. *N Engl J Med* 2005;353:2667–72.
- [71] Taylor WRJ, Thinh BN, Anh GT, Horby P, Wertheim H, Lindegardh N, et al. Oseltamivir is adequately absorbed following nasogastric administration to adult patients with severe H5N1 influenza. *PLoS ONE* 2008;3:e3410.
- [72] Arabi Y, Gomersall CD, Ahmed QA, Boynton BR, Memish ZA. The critically ill avian influenza A (H5N1) patient. *Crit Care Med* 2007;35:1397–403.
- [73] Nicholson K, Aoki FY, Osterhaus AD, Trottier S, Carewicz O, Mercier CH, et al. Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomised controlled trial. *The Lancet* 2000;355:1845–50.
- [74] Wattanagoon Y, Stepniewska K, Lindeg  rdh N, Pukrittayakamee S, Silachamr  on U, Piyaphanee W, et al. Pharmacokinetics of high-dose oseltamivir in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:945–52.
- [75] Govorkova EA, Ilyushina NA, Boltz DA, Douglas A, Yilmaz N, Webster RG. Efficacy of oseltamivir therapy in ferrets inoculated with different clades of H5N1 influenza virus. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1414–24.
- [76] Yen H, Monto AS, Webster RG, Govorkova EA. Virulence may determine the necessary duration and dosage of oseltamivir treatment for highly pathogenic A/Vietnam/1203/04 influenza virus in mice. *J Infect Dis* 2005; 192:665–72.
- [77] Boltz DA, et al. Intramuscularly administered neuraminidase inhibitor peramivir is effective against lethal H5N1 influenza virus in mice. *Antiviral Res* 2008;80:150–7.
- [78] Stittelaar KJ, Ilyushina NA, Arnold CS, Babu YS, Webster RG, Govorkova EA. Evaluation of intravenous zanamivir against experimental influenza A (H5N1) virus infection in cynomolgus macaques. *Antiviral Res* 2008; 80:225–8.
- [79] Van Hoeven N, Belser JA, Szretter KJ, Zeng H, Staeheli P, Swayne DE, et al. Pathogenesis of 1918 pandemic and H5N1 influenza virus infections in a

- guinea pig model: antiviral potential of exogenous alpha interferon to reduce virus shedding. *J Virol* 2009;83:2851–61.
- [80] Szretter KJ, Gangappa S, Belser JA, Zeng H, Chen H, Matsuoka Y, et al. Early control of H5N1 influenza virus replication by the type I interferon response in mice. *J Virol* 2009;83:5825–34.
- [81] Ilyushina NA, Hoffmann E, Salomon R, Webster RG, Govorkova EA. Amantadine-oseltamivir combination therapy for H5N1 influenza virus infection in mice. *Antivir Ther (Lond)* 2007;12:363–70.
- [82] White NJ, Webster RG, Govorkova EA, Uyeki TM. What is the optimal therapy for patients with H5N1 influenza? *PLoS Med* 2009;6:e1000091.
- [83] Ilyushina NA, Hay A, Yilmaz N, Boon AC, Webster RG, Govorkova EA. Oseltamivir–ribavirin combination therapy for highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:3889–97.
- [84] World Health Organization. Continuing progress towards a unified nomenclature system for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses. Available at: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/nomenclature/en/index.html. Accessed May 12, 2009.
- [85] Moscona A. Oseltamivir resistance–disabling our influenza defenses. *N Engl J Med* 2005;353:2633–6.
- [86] Le QM, Kiso M, Someya K, Sakai YT, Nguyen TH, Nguyen KH, et al. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature* 2005;437:1108.
- [87] Saad M, Boynton BR, Earhart KC, Mansour MM, Niman HL, Elsayed NM, et al. Detection of oseltamivir resistance mutation N294S in humans with influenza A H5N1. In: Options for the Control of Influenza VI June 17–23, 2007 Toronto; 2007.
- [88] Le MTQ, Wertheim HF, Nguyen HD, Taylor W, Hoang PV, Vuong CD, et al. Influenza A H5N1 clade 2. 3. 4 virus with a different antiviral susceptibility profile replaced clade 1 virus in humans in northern Vietnam. *PLoS ONE* 2008;3:e3339.
- [89] Vaillant L, La Ruche G, Tarantola A, Barboza P. epidemic intelligence team at InVS. Epidemiology of fatal cases associated with pandemic H1N1 influenza 2009. *Euro Surveill* 2009;14. pii: 19309.
- [90] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: drug susceptibility of swine-origin influenza A (H1N1) viruses, April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009;58:433–5.
- [91] Moghadas S, Bowman CS, Röst G, Fisman DN, Wu J. Postexposure prophylaxis during pandemic outbreaks. *BMC Med* 2009;7:73.
- [92] Longini IM, Nizam A, Xu S, Ungchusak K, Hanshaworakul W, Cummings DA, et al. Containing pandemic influenza at the source. *Science* 2005;309:1083–7.
- [93] Zala C, Gonzalez R. Respiratory disease in adults during pandemic (H1N1) 2009 outbreak, Argentina. *Emerging Infect Dis* 2009;15:2060–1.
- [94] Jain S, Kamimoto L, Bramley AM, Schmitz AM, Benoit SR, Louie J, et al. Hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in the United States, April–June 2009. *N Engl J Med* 2009;361:1935–44.
- [95] Cullen G, Martin J, O'Donnell J, Boland M, Canny M, Keane E, et al. Surveillance of the first 205 confirmed hospitalised cases of pandemic H1N1 influenza in Ireland, 28 April – 3 October 2009. *Euro Surveill* 2009;14. pii: 19389.
- [96] Domínguez-Cherit G, Lapinsky SE, Macias AE, Pinto R, Espinosa-Perez L, de la Torre A, et al. Critically ill patients with 2009 influenza A(H1N1) in Mexico. *JAMA* 2009;302:1880–7.
- [97] Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Cas graves de grippe A(H1N1)v. Available at [http://www.afssaps.fr/Dossiers-thematiques/Pandemie-grippale/Cas-graves-de-grippe-A-H1N1-v/\(offset\)/4](http://www.afssaps.fr/Dossiers-thematiques/Pandemie-grippale/Cas-graves-de-grippe-A-H1N1-v/(offset)/4). Accessed January 11, 2011.
- [98] Khanna N, Steffen I, Studt JD, Schreiber A, Lehmann T, Weisser M, et al. Outcome of influenza infections in outpatients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis* 2009;11:100–5.
- [99] Kumar D, Morris MI, Kotton CN, Fischer SA, Michaels MG, Allen U, et al. Guidance on novel influenza A/H1N1 in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009.
- [100] Tanaka T, Nakajima K, Murashima A, Garcia-Bournissen F, Koren G, Ito S. Safety of neuraminidase inhibitors against novel influenza A (H1N1) in pregnant and breastfeeding women. *CMAJ* 2009;181:55–8.
- [101] Satpathy HK, Lindsay M, Kawwass JF. Novel H1N1 virus infection and pregnancy. *Postgrad Med* 2009;121:106–12.
- [102] Institut national de veille sanitaire. Cas groupés de A(H1N1)2009 résistant à l'oseltamivir. Available at [http://www.invs.sante.fr/international/notes/cas_groupes_A\(H1N1\)2009_resistant_oseltamivir_251109.pdf](http://www.invs.sante.fr/international/notes/cas_groupes_A(H1N1)2009_resistant_oseltamivir_251109.pdf). Accessed January 11, 2010.
- [103] World Health Organization. Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 influenza virus, October 2009. *Weekly Epidemiol Rec* no. 44, 2009; 84:453–468. Available at <http://www.who.int/wer/2009/wer8444.pdf>. Accessed January 11, 2010.
- [104] Leung TWC, Tai AL, Cheng PK, Kong MS, Lim W. Detection of an oseltamivir-resistant pandemic influenza A/H1N1 virus in Hong Kong. *J Clin Virol* 2009;46:298–9.
- [105] Chen H, Cheung CL, Tai H, Zhao P, Chan JF, Cheng VC, et al. Oseltamivir-resistant influenza a pandemic (H1N1) 2009 virus, Hong Kong. *China Emerg Infect Dis* 2009;15:1970–2.
- [106] World Health Organization. Viruses resistant to oseltamivir (Tamiflu) identified. Available at http://www.who.int/csr/disease/swineflu/notes/h1n1_antiviral_resistance_20090708/en/. Accessed January 11, 2010.
- [107] Gulland A. First cases of spread of oseltamivir resistant swine flu between patients are reported in Wales. *BMJ* 2009;339:b4975.
- [108] Meunier I, Pillet S, Simonsen JN, von Messling V. Influenza pathogenesis: Lessons earned from animal studies with H5N1, H1N1 Spanish, and pandemic H1N1 2009 influenza. *Crit Care Med* 2009.
- [109] Furuta Y, Takahashi K, Fukuda Y, Kuno M, Kamiyama T, Kozaki K, et al. In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:977–81.
- [110] Furuta Y, Takahashi K, Kuno-Maekawa M, Sangawa H, Uehara S, Kozaki K, et al. Mechanism of action of T-705 against influenza virus. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:981–6.
- [111] Belser JA, Lu X, Szretter KJ, Jin X, Aschenbrenner LM, Lee A, et al. DAS181, a novel sialidase fusion protein, protects mice from lethal avian influenza H5N1 virus infection. *J Infect Dis* 2007;196:1493–9.

BIBLIOGRAPHIE

1. Rimmelzwaan, G.F. et al. Pathogenesis of influenza A (H5N1) virus infection in a primate model. *J. Virol* **75**, 6687-6691 (2001).
2. Chen, H. et al. The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **101**, 10452-10457 (2004).
3. Hoffmann, E., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hobom, G. & Webster, R.G. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97**, 6108-6113 (2000).
4. Chen, L., Davis, C.T., Zhou, H., Cox, N.J. & Donis, R.O. Genetic compatibility and virulence of reassortants derived from contemporary avian H5N1 and human H3N2 influenza A viruses. *PLoS Pathog* **4**, e1000072 (2008).
5. Wright, P., Neumann, G. & Kawaoka, Y. Orthomyxoviridae. *Fields Virology* (2009).
6. Fouchier, R.A.M. et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J. Virol* **79**, 2814-2822 (2005).
7. Scheiffele, P., Rietveld, A., Wilk, T. & Simons, K. Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *J. Biol. Chem* **274**, 2038-2044 (1999).
8. Schroeder, C., Heider, H., Möncke-Buchner, E. & Lin, T. The influenza virus ion channel and maturation cofactor M2 is a cholesterol-binding protein. *Eur. Biophys. J* **34**, 52-66 (2005).
9. Neumann, G., Noda, T. & Kawaoka, Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* **459**, 931-939 (2009).
10. Moscona, A. Oseltamivir resistance--disabling our influenza defenses. *N. Engl. J. Med* **353**, 2633-2636 (2005).
11. Colman, P.M. Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies, and inhibitors. *Protein Sci* **3**, 1687-1696 (1994).
12. Gubareva, L.V., Kaiser, L. & Hayden, F.G. Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet* **355**, 827-835 (2000).
13. Nayak, D.P., Balogun, R.A., Yamada, H., Zhou, Z.H. & Barman, S. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res* **143**, 147-161 (2009).
14. Munier, S., Moisy, D., Marc, D. & Naffakh, N. [Interspecies transmission, adaptation to humans and pathogenicity of animal influenza viruses.]. *Pathol Biol (Paris)* (2010).doi:10.1016/j.patbio.2010.01.012
15. Lear, J.D. Proton conduction through the M2 protein of the influenza A virus; a quantitative, mechanistic analysis of experimental data. *FEBS Lett* **552**, 17-22 (2003).
16. Wu, Y. & Voth, G.A. Computational studies of proton transport through the M2 channel. *FEBS Lett* **552**, 23-27 (2003).
17. Skehel, J.J. & Whitley, D.M. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* **69**, 531-569 (2000).
18. Pinto, L.H., Holsinger, L.J. & Lamb, R.A. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**, 517-528 (1992).
19. Nayak, D.P., Hui, E.K. & Barman, S. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res* **106**, 147-165 (2004).
20. Yamashita, M., Krystal, M., Fitch, W.M. & Palese, P. Influenza B virus evolution: co-circulating lineages and comparison of evolutionary pattern with those of influenza A and C viruses. *Virology* **163**, 112-122 (1988).
21. Donis, R.O. Toward a Unified Nomenclature System for Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1). *Emerg. Infect. Dis.* **14**, (2008).

22. Vijaykrishna, D. et al. Evolutionary dynamics and emergence of panzootic H5N1 influenza viruses. *PLoS Pathog* **4**, (2008).
23. WHO. Pandemic (H1N1)2009 update 85, at www.who.int/csr/don/2010_01_29/en/index.html.
24. Reid, A.H., Fanning, T.G., Hultin, J.V. & Taubenberger, J.K. Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**, 1651-1656 (1999).
25. Tumpey, T.M. et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* **310**, 77-80 (2005).
26. Kash, J.C. et al. Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus. *Nature* **443**, 578-581 (2006).
27. de Jong, M.D. et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat. Med* **12**, 1203-1207 (2006).
28. Horimoto, T. & Kawaoka, Y. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat. Rev. Microbiol* **3**, 591-600 (2005).
29. Kobasa, D. et al. Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature* **431**, 703-707 (2004).
30. Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P. & Kawaoka, Y. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* **293**, 1840-1842 (2001).
31. Watanabe, T. et al. Viral RNA polymerase complex promotes optimal growth of 1918 virus in the lower respiratory tract of ferrets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **106**, 588-592 (2009).
32. Van Hoeven, N. et al. Human HA and polymerase subunit PB2 proteins confer transmission of an avian influenza virus through the air. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **106**, 3366-3371 (2009).
33. Seo, S.H., Hoffmann, E. & Webster, R.G. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat. Med* **8**, 950-954 (2002).
34. McAuley, J.L. et al. Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell Host Microbe* **2**, 240-249 (2007).
35. Gabriel, G., Herwig, A. & Klenk, H. Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS Pathog* **4**, e11 (2008).
36. Kawaoka, Y. 2009 pandemic influenza. (2010).
37. Conenello, G.M., Zamarin, D., Perrone, L.A., Tumpey, T. & Palese, P. A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog* **3**, 1414-1421 (2007).
38. Kawaoka, Y. & Webster, R.G. Sequence requirements for cleavage activation of influenza virus hemagglutinin expressed in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **85**, 324-328 (1988).
39. Rogers, G.N. & Paulson, J.C. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* **127**, 361-373 (1983).
40. Vines, A. et al. The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. *J. Virol* **72**, 7626-7631 (1998).
41. Stevens, J. et al. Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. *Science* **303**, 1866-1870 (2004).
42. Chen, G. & Shih, S. Genomic signatures of influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerging Infect. Dis* **15**, 1897-1903 (2009).

43. Gambaryan, A. et al. Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses. *Virology* **344**, 432-438 (2006).
44. Yamada, S. et al. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* **444**, 378-382 (2006).
45. Auewarakul, P. et al. An avian influenza H5N1 virus that binds to a human-type receptor. *J. Virol* **81**, 9950-9955 (2007).
46. Stevens, J. et al. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* **312**, 404-410 (2006).
47. Nicholls, J.M. et al. Tropism of avian influenza A (H5N1) in the upper and lower respiratory tract. *Nat. Med* **13**, 147-149 (2007).
48. Kawaoka, Y., Krauss, S. & Webster, R.G. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J. Virol* **63**, 4603-4608 (1989).
49. Salomon, R. et al. The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04. *J. Exp. Med* **203**, 689-697 (2006).
50. Chen, W. et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat. Med* **7**, 1306-1312 (2001).
51. Zamarin, D., Ortigoza, M.B. & Palese, P. Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J. Virol* **80**, 7976-7983 (2006).
52. Gibbs, J.S., Malide, D., Hornung, F., Bennink, J.R. & Yewdell, J.W. The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *J. Virol* **77**, 7214-7224 (2003).
53. Zamarin, D., García-Sastre, A., Xiao, X., Wang, R. & Palese, P. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog* **1**, e4 (2005).
54. Mazur, I. et al. The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell. Microbiol* **10**, 1140-1152 (2008).
55. McAuley, J.L., Zhang, K. & McCullers, J.A. The effects of influenza A virus PB1-F2 protein on polymerase activity are strain specific and do not impact pathogenesis. *J. Virol* **84**, 558-564 (2010).
56. Subbarao, E.K., London, W. & Murphy, B.R. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J. Virol* **67**, 1761-1764 (1993).
57. Fouchier, R.A.M. et al. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **101**, 1356-1361 (2004).
58. Massin, P., van der Werf, S. & Naffakh, N. Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses. *J. Virol* **75**, 5398-5404 (2001).
59. Li, C. et al. Reassortment between avian H5N1 and human H3N2 influenza viruses creates hybrid viruses with substantial virulence. *PNAS* (2009).doi:10.1073
60. Bergmann, M. et al. Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication. *J. Virol* **74**, 6203-6206 (2000).
61. Lu, Y., Wambach, M., Katze, M.G. & Krug, R.M. Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology* **214**, 222-228 (1995).
62. Geiss, G.K. et al. Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: the role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **99**, 10736-10741 (2002).

63. Lee, D.C.W. et al. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent hyperinduction of tumor necrosis factor alpha expression in response to avian influenza virus H5N1. *J. Virol* **79**, 10147-10154 (2005).
64. Jackson, D., Hossain, M.J., Hickman, D., Perez, D.R. & Lamb, R.A. A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **105**, 4381-4386 (2008).
65. Tian, S.F. et al. Nucleoprotein and membrane protein genes are associated with restriction of replication of influenza A/Mallard/NY/78 virus and its reassortants in squirrel monkey respiratory tract. *J. Virol* **53**, 771-775 (1985).
66. Chen, G. et al. Genomic signatures of human versus avian influenza A viruses. *Emerging Infect. Dis* **12**, 1353-1360 (2006).
67. eCDC.Influenza Pandemic. (2008).à
<http://ecdc.europa.eu/Health_topics/Pandemic_Influenza/stats.aspx>
68. Kobasa, D. et al. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature* **445**, 319-323 (2007).
69. Morens, D.M., Taubenberger, J.K. & Fauci, A.S. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J. Infect. Dis* **198**, 962-970 (2008).
70. Taubenberger, J.K., Reid, A.H., Krafft, A.E., Bijwaard, K.E. & Fanning, T.G. Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science* **275**, 1793-1796 (1997).
71. Taubenberger, J.K. et al. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* **437**, 889-893 (2005).
72. Reid, A.H., Fanning, T.G., Janczewski, T.A. & Taubenberger, J.K. Characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus neuraminidase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97**, 6785-6790 (2000).
73. Gibbs, M.J. & Gibbs, A.J. Molecular virology: was the 1918 pandemic caused by a bird flu? *Nature* **440**, E8; discussion E9-10 (2006).
74. Nakajima, K., Desselberger, U. & Palese, P. Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950. *Nature* **274**, 334-339 (1978).
75. Koopmans, M. et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet* **363**, 587-593 (2004).
76. Subbarao, K. et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* **279**, 393-396 (1998).
77. Claas, E.C. et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* **351**, 472-477 (1998).
78. Webster, R.G. & Govorkova, E.A. H5N1 influenza--continuing evolution and spread. *N. Engl. J. Med* **355**, 2174-2177 (2006).
79. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO. (2010).à
<http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2010_04_09/en/index.html>
80. Fraser, C. et al. Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. *Science* **324**, 1557-1561 (2009).
81. Carrat, F. et al. Time lines of infection and disease in human influenza: a review of volunteer challenge studies. *Am. J. Epidemiol* **167**, 775-785 (2008).
82. World Health Organization Writing Group Nonpharmaceutical interventions for pandemic influenza, International measures. *Emerg Infect Dis* **12**, 81-87 (2006).

83. Frank, A.L., Taber, L.H., Wells, C.R., Glezen, W.P. & Paredes, A. Patterns of shedding of myxoviruses and paramyxoviruses in children. *J Infect Dis* 433-441 (1981).
84. Hall, C.B., Douglas, R.G.J., Greiman, J.M. & Meagher, M.P. Viral shedding patterns of children with influenza B infection. *J Infect Dis* 610-613 (1979).
85. Flahault, A. Modélisation mathématique des maladies transmissibles, exemple de la grippe. (2007) at [http://www.srlf.org/Data/upload/file/GrippeA/\(28\)-ModelisationGrippe-A_Flahault\(nov2007\).pdf](http://www.srlf.org/Data/upload/file/GrippeA/(28)-ModelisationGrippe-A_Flahault(nov2007).pdf)
86. Ferguson, N.M. et al. Strategies for containing an emerging influenza pandemic in Southeast Asia. *Nature* **437**, 209-214 (2005).
87. Ferguson, N.M. et al. Strategies for mitigating an influenza pandemic. *Nature* **442**, 448-452 (2006).
88. Vynnycky, E., Trindall, A. & Mangtani, P. Estimates of the reproduction numbers of Spanish influenza using morbidity data. *Int J Epidemiol* **36**, 881-889 (2007).
89. Brankston, G., Gitterman, L., Hirji, Z., Lemieux, C. & Gardam, M. Transmission of influenza A in human beings. *Lancet Infect Dis* **7**, 257-265 (2007).
90. Bridges, C.B., Kuehnert, M.J. & Hall, C.B. Transmission of influenza: implications for control in health care settings. *Clin. Infect. Dis* **37**, 1094-1101 (2003).
91. van Riel, D. et al. Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals. *Am. J. Pathol* **171**, 1215-1223 (2007).
92. Shinya, K. et al. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* **440**, 435-436 (2006).
93. Ware, L.B. & Matthay, M.A. The acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med* **342**, 1334-1349 (2000).
94. Dorinsky, P.M. & Gadek, J.E. Multiple organ failure. *Clin. Chest Med* **11**, 581-591 (1990).
95. World Health Organization. Avian influenza. Cumulative number of human cases of avian influenza. Available at: (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2009_12_21/en/index.html). Accessed December 21, 2009.
96. Thorson, A., Petzold, M., Nguyen, T.K.C. & Ekdahl, K. Is exposure to sick or dead poultry associated with flulike illness?: a population-based study from a rural area in Vietnam with outbreaks of highly pathogenic avian influenza. *Arch. Intern. Med* **166**, 119-123 (2006).
97. Schultsz, C. et al. Prevalence of antibodies against avian influenza A (H5N1) virus among Cullers and poultry workers in Ho Chi Minh City, 2005. *PLoS ONE* **4**, e7948 (2009).
98. Abdel-Ghafar, A. et al. Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans. *N. Engl. J. Med* **358**, 261-273 (2008).
99. Bouscambert-Duchamp, M., Lina, B. & Morfin, F. [Avian influenza in children]. *Arch Pediatr* **16 Suppl 2**, S101-107 (2009).
100. Dinh, P.N. et al. Risk factors for human infection with avian influenza A H5N1, Vietnam, 2004. *Emerging Infect. Dis* **12**, 1841-1847 (2006).
101. Jain, S. et al. Hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in the United States, April-June 2009. *N. Engl. J. Med* **361**, 1935-1944 (2009).
102. Domínguez-Cherit, G. et al. Critically Ill patients with 2009 influenza A(H1N1) in Mexico. *JAMA* **302**, 1880-1887 (2009).
103. Institut de Veille Sanitaire Bulletin épidémiologique grippe n°92. Point de Situation au 13 avril 2010. (2010), at <http://www.invs.sante.fr/surveillance/grippe_dossier/points_grippe/grippe_130410/Bulletin_grippe_130410.pdf>

104. CDC. Clinical Description & Lab Diagnosis of Influenza. Rapid Diagnostic Tests for Influenza. (2009). <www.cdc.gov/flu/professionals/labdiagnosis.htm>
105. Ferraris, O., Kessler, N. & Lina, B. Sensitivity of influenza viruses to zanamivir and oseltamivir: a study performed on viruses circulating in France prior to the introduction of neuraminidase inhibitors in clinical practice. *Antiviral Res* **68**, 43-48 (2005).
106. Carr, M.J., Sayre, N., Duffy, M., Connell, J. & Hall, W.W. Rapid molecular detection of the H275Y oseltamivir resistance gene mutation in circulating influenza A (H1N1) viruses. *J Virol Methods* **153**, 257-262 (2008).
107. Bouscambert Duchamp, M. et al. Pandemic A(H1N1)2009 Influenza virus detection by real time RT-PCR : is viral quantification interesting? *Clin Microbiol Infect* (2010).doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03169.
108. Hayden, F.G. & Pavia, A.T. Antiviral management of seasonal and pandemic influenza. *J. Infect. Dis* **194 Suppl 2**, S119-126 (2006).
109. Monto, A.S. Antivirals and influenza: frequency of resistance. *Pediatr. Infect. Dis. J* **27**, S110-112 (2008).
110. Bustin, S.A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem* **55**, 611-622 (2009).
111. Rabenau, H.F. et al. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. *J. Clin. Virol* **40**, 93-98 (2007).
112. Hurt, A.C., Holien, J.K. & Barr, I.G. In vitro generation of neuraminidase inhibitor resistance in A(H5N1) influenza viruses. *Antimicrob. Agents Chemother* **53**, 4433-4440 (2009).
113. Huang, I. et al. Influenza A virus neuraminidase limits viral superinfection. *J. Virol* **82**, 4834-4843 (2008).
114. Whiley, D.M. & Sloots, T.P. A 5'-nuclease real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the detection of a broad range of influenza A subtypes, including H5N1. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis* **53**, 335-337 (2005).
115. To, K.K.W. et al. Viral load in patients infected with pandemic H1N1 2009 influenza A virus. *J. Med. Virol* **82**, 1-7 (2010).
116. Panning, M. et al. Detection of influenza A(H1N1)v virus by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* **14**, (2009).
117. Lee, N. et al. Viral loads and duration of viral shedding in adult patients hospitalized with influenza. *J. Infect. Dis* **200**, 492-500 (2009).
118. Ferraris, O., Kessler, N., Valette, M. & Lina, B. Evolution of the susceptibility to antiviral drugs of A/H3N2 influenza viruses isolated in France from 2002 to 2005. *Vaccine* **44-46**, 6656-6659 (2006).
119. Matrosovich, M., Matrosovich, T., Carr, J., Roberts, N.A. & Klenk, H. Overexpression of the alpha-2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J. Virol* **77**, 8418-8425 (2003).
120. Rameix-Welti, M., Enouf, V., Cuvelier, F., Jeannin, P. & van der Werf, S. Enzymatic properties of the neuraminidase of seasonal H1N1 influenza viruses provide insights for the emergence of natural resistance to oseltamivir. *PLoS Pathog* **4**, e1000103 (2008).
121. Collins, P.J. et al. Structural basis for oseltamivir resistance of influenza viruses. *Vaccine* **27**, 6317-6323 (2009).
122. Dovas, C.I. et al. Detection and quantification of infectious avian influenza A (H5N1) virus in environmental water using real-time RT-PCR. *Appl Environ Microbiol* (2010).doi:10.1128/AEM.01929-09
123. Van Borm, S. et al. A universal avian endogenous real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction control and its application to avian influenza diagnosis and quantification. *Avian Dis* **51**, 213-220 (2007).

124. Percivalle, E. et al. Rapid typing, subtyping and RNA quantification of influenza virus type A strains in respiratory secretions. *New Microbiol* **31**, 319-327 (2008).
125. Hutchinson, E.C., von Kirchbach, J.C., Gog, J.R. & Digard, P. Genome packaging in influenza A virus. *J. Gen. Virol* **91**, 313-328 (2010).
126. Ives, J.A.L. et al. The H274Y mutation in the influenza A/H1N1 neuraminidase active site following oseltamivir phosphate treatment leave virus severely compromised both in vitro and in vivo. *Antiviral Res* **55**, 307-317 (2002).
127. Baz, M., Abed, Y., Simon, P., Hamelin, M. & Boivin, G. Effect of the neuraminidase mutation H274Y conferring resistance to oseltamivir on the replicative capacity and virulence of old and recent human influenza A(H1N1) viruses. *J. Infect. Dis* **201**, 740-745 (2010).
128. Herlocher, M.L. et al. Influenza viruses resistant to the antiviral drug oseltamivir: transmission studies in ferrets. *J. Infect. Dis* **190**, 1627-1630 (2004).
129. Le, Q.M. et al. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature* **437**, 1108 (2005).
130. Yen, H. et al. Neuraminidase inhibitor-resistant recombinant A/Vietnam/1203/04 (H5N1) influenza viruses retain their replication efficiency and pathogenicity in vitro and in vivo. *J. Virol* **81**, 12418-12426 (2007).
131. Bastien, N. et al. Human infection with a triple-reassortant swine influenza A(H1N1) virus containing the hemagglutinin and neuraminidase genes of seasonal influenza virus. *J. Infect. Dis* **201**, 1178-1182 (2010).
132. World Health Organization. Continuing progress towards a unified nomenclature system for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses. Available at: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/nomenclature/en/index.html. Accessed May12, 2009.
133. Neumann, G. et al. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**, 9345-9350 (1999).
134. Neumann, G. & Kawaoka, Y. Reverse genetics of influenza virus. *Virology* **287**, 243-250 (2001).
135. Vincent, A.L., Ma, W., Lager, K.M., Janke, B.H. & Richt, J.A. Swine influenza viruses a North American perspective. *Adv. Virus Res* **72**, 127-154 (2008).
136. Li, C., Hatta, M., Watanabe, S., Neumann, G. & Kawaoka, Y. Compatibility among polymerase subunit proteins is a restricting factor in reassortment between equine H7N7 and human H3N2 influenza viruses. *J Virol* **82**, 11880-11888 (2008).
137. CDC-Fluview-Influenza Season Week 12, ending March 27,2010. at <<http://www.cdc.gov/flu/weekly/>>
138. Perez, D.R. et al. Fitness of pandemic H1N1 and seasonal influenza A viruses during co-infection: evidence of competitive advantage of pandemic H1N1 influenza versus seasonal influenza. *PLoS Curr Influenza* RRN1011 (2009).
139. Ferguson, N.M., Fraser, C., Donnelly, C.A., Ghani, A.C. & Anderson, R.M. Public health. Public health risk from the avian H5N1 influenza epidemic. *Science* **304**, 968-969 (2004).
140. Ferraris, O., Escuret, V., Bouscambert-Duchamp, M., Lina, B. & Morfin, F. [Role of neuraminidase inhibitors for the treatment of influenza A virus infections.]. *Pathol Biol (Paris)* (2010).doi:10.1016/j.patbio.2010.01.011

AUTRES PUBLICATIONS

Publications internationales

SEROSURVEILLANCE STUDY ON TRANSMISSION OF H5N1 VIRUS DURING A 2006 AVIAN INFLUENZA EPIDEMIC.

*M. Ceyhan, I. Yildirim, O. Ferraris, **M. Bouscambert-Duchamp**, E. Frobert, N. Uyar, H. Tezer, A.F. Oner, T. Buzgan, M.A. Torunoglu, B. Ozkan, R. Yilmaz, M.G. Kurtoglu, Y. Laleli, S. Badur, B. Lina.*
Epidemiol Infect. **2010** Jan 22:1-7.

RHINOVIRUSES DELAYED THE CIRCULATION OF PANDEMIC INFLUENZA A(H1N1)2009 VIRUS IN FRANCE.

*J.S. Casalegno, M. Ottmann, **M. Bouscambert-Duchamp**, V. Escuret, G. Billaud, E. Frobert, F. Morfin., B. Lina.*
Clin Microbiol Infect **2010**; 16(4):326-9. Epub 2010 Jan 28.

IMPACT OF THE 2009 INFLUENZA A(H1N1) PANDEMIC WAVE ON THE PATTERN OF WINTERAL RESPIRATORY VIRUS EPIDEMICS, FRANCE, 2009.

*J.S. Casalegno, M. Ottmann, **M. Bouscambert-Duchamp**, M. Valette, F. Morfin., B. Lina.*
Euro Surveill **2010**. 15(6). pii: 19485.

RHINOVIRUSES, A(H1N1)virus, RSV : THE RACE FOR WINTERAL PANDEMICS, FRANCE 2009-2010.

*J.S. Casalegno, **M. Bouscambert-Duchamp**, F. Morfin., B. Lina., V. Escuret.*
Euro Surveill. **2009**;14(40). pii: 19354.

CAS DE PNEUMOPATHIE NECROSANTE COMMUNAUTAIRE SECONDAIRE A LA SURINFECTION D'UNE GRIPPE SAISONNIERE H1N1 PAR UN STREPTOCOQUE INVASIF DU GROUPE A.

*J.S. Casalegno, V. Escuret, M. Celard, **M. Bouscambert**, E. Frobert, Y. Mekki, G. Lina, B. Lina.*
Med Mal Inf, accepté Novembre **2009**, MEDMAL-3007

COLD OXYGEN PLASMA TECHNOLOGY EFFICIENCY AGAINST DIFFERENT AIRBORNE RESPIRATORY VIRUSES.

*O. Terrier., B. Essere, M. Yver, M. Barthélémy, **M. Bouscambert-Duchamp**, P. Kurtz, D. VanMechelen, F. Morfin., G. Billaud., O. Ferraris, B. Lina., M. Rosa-Calatrava, V. Moulès.*
J Clin Virol. **2009**; 45 (2): 119-124.

ANTI N1 CROSS-PROTECTING ANTIBODIES AGAINST H5N1 DETECTED IN H1N1 INFECTED PEOPLE.

*E. Frobert, **M. Bouscambert-Duchamp**, V. Escuret, S. Mundweiler, M. Barthélémy, F. Morfin, M. Valette, C. Gerdil, B. Lina, O. Ferraris.*
Current Microbiol. **2009** (25 décembre 2009).

DETECTION OF HUMAN INFLUENZA A(H1N1) AND B STRAINS WITH REDUCED SENSITIVITY TO NEURAMINIDASE INHIBITORS.

*V. Escuret, E. Frobert, **M. Bouscambert-Duchamp**, M. Sabatier, I. Grog, M. Valette, B. Lina, F. Morfin, O. Ferraris.*

J Clin Virol, **2008** Jan ; 41 (1) : 25-8.

ASSOCIATION OF RESPIRATORY PICORNAVIRUSES WITH ACUTE BRONCHIOLITIS IN FRENCH INFANTS

*J. Jacques, **M. Bouscambert-Duchamp**, H. Moret, J. Carquin, V. Brodard, B. Lina, J. Motte, L. Andreoletti.*

J Clin Virol. **2006**; 35: 463-466.

DETECTION OF HUMAN METAPNEUMOVIRUS RNA SEQUENCES IN NASOPHARYNGEAL ASPIRATES OF YOUNG FRENCH CHILDREN WITH ACUTE BRONCHIOLITIS BY REAL TIME REVERSE TRANSCRIPTASE PCR AND PHYLOGENETIC ANALYSIS

***M. Bouscambert-Duchamp**, B. Lina, A. Trompette, H. Moret, J. Motte, L. Andréoletti.*

J Clin Microbiol. **2005** ; 43. (3) : 1411-4.

NEW REVERSE TRANSCRIPTION-PCR ASSAY FOR RAPID AND SENSITIVE DETECTION OF ENTEROVIRUS GENOMES IN CEREBROSPINAL FLUID SPECIMENS OF PATIENTS WITH ASEPTIC MENINGITIS

*J. Jacques, J. Carquin, V. Brodard, H. Moret, D. Lebrun, M. **Bouscambert**, J. Motte, G. Remy, L. Andreoletti.*

J Clin Microbiol. **2003**; 41 (12):5726-8.

TARGETTED MOLECULAR DETECTION OF THE MOST FREQUENT RESPIRATORY VIRUSES.

***M. Bouscambert-Duchamp**, E. Javouhey, E. Frobert, G. Lazarian, Y. Gillet, V. Escuret, B. Lina, D. Floret D. Thouvenot, B. Lina, D. Floret, F. Morfin.*

Soumis J Clin Virol, Mars **2010**.

RESPIRATORY VIRUSES AMONG CHILDREN HOSPITALIZED IN INTENSIVE CARE UNIT: EVALUATION OF CLART® PNEUMOVIR DNA ARRAY.

E. Frobert, V. Escuret*, E. Javouhey, **M. Bouscambert-Duchamp**, C. Moulinier, Y. Gillet, B. Lina, D. Floret, F. Morfin. * co-auteurs*

Soumis J Clin Virol, Avril **2010**.

INFLUENZA VIRION MORPHOLOGIES EXPLAINED BY CELLULAR ORIGIN, SUB-TYPES AND GENETIC BACKGROUND: IMPLICATIONS FOR VACCINE DESIGN AND PATHOGENESIS STUDIES.

*V. Moulès, O. Terrier, M. Yver, M. Guidice, J.P. Roland, **M. Bouscambert-Duchamp**, O. Ferraris, E. Frobert, A. Hay, L. Yipu, D. Thomas, G. Schoehn, B. Lina.*

En préparation.

Publications nationales

FIRST CASES OF SECONDARY TRANSMISSION OF A NOVEL SWINE-ORIGIN INFLUENZA A(H1N1) VIRUS IN FRANCE.

*A.C. Jeannot, M. Hamoudi, N. Bourayou, C. Tabuteau, C. Garandeau, J.M. Trapateau, **M. Bouscambert**, B. Lina, H.J. Fleury.*

Med Mal Infect. **2010** ; 40(1):48-50.

CAS DE PNEUMOPATHIE NECROSANTE COMMUNAUTAIRE SECONDAIRE A LA SURINFECTION D'UNE GRIPPE SAISONNIERE H1N1 PAR UN STREPTOCOQUE INVASIF DU GROUPE A.

*J.S. Casalegno, V. Escuret, M. Celard, **M. Bouscambert**, E. Frobert, Y. Mekki, G. Lina, B. Lina.*

Med Mal Inf., (accepté, Novembre **2009**), MEDMAL-3007

UN CAS MORTEL DE MENINGOENCEPHALITE A HERPES SIMPLEX VIRUS CHEZ UN ADULTE IMMUNOCOMPETENT

*L. Andreoletti, M. **Bouscambert**, V. Pichenot, V. Brodard, J. Cousson, A. Leon.*

Ann Biol Clin (Paris). **2003**; 61 (5):585-8.

COMMUNICATIONS ORALES

EFFICACY AND SAFETY OF OSELTAMIVIR-ZANAMIVIR COMBINATION COMPARED TO EACH MONOTHERAPY FOR SEASONAL INFLUENZA : A RANDOMIZED, DOUBLE-BLINDED, PLACEBO-CONTROLLED TRIAL.

M. Bouscambert-Duchamp, T. Blanchon, F. Mentré, V. Enouf, F. Tubach, A. Mosnier, B. Lina, Q. Dornic, C. Leport, S. van der Werf.

Communication orale, 4th European Congress of Virology (European Society for Virology), 4-11 avril **2010**, Villa Erba Cernobbio, Côme, Italie.

EVALUATION OF SENSITIVITY OF COMMERCIAL KITS FOR THE DIAGNOSIS OF A(H1N1)v INFECTION IN COMPARISON WITH RT-PCRs DEVELOPED BY NATIONAL INFLUENZA CENTERS

M. Bouscambert-Duchamp, V. Enouf, G. Billaud, M. Valette, S. van der Werf, B. Lina.

Communication orale, ESCV (European Society for Clinical Virology), 27 septembre **2009**, Istanbul, Turkey.

DETECTION OF NEURAMINIDASE CROSS-PROTECTION ANTIBODIES AGAINST H5N1 INFECTED OR VACCINATED HUMANS.

E. Frobert, **M. Bouscambert-Duchamp**, V. Escuret, S. Mundweiller, M. Barthélémy, F. Morfin, M. Valette, C. Gerdil, B. Lina, O. Ferraris.

Communication orale, European Society for Clinical Virology, Amsterdam, 7-10 janvier **2009**.

DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES VIROSES RESPIRATOIRES: APPLICATION EN ROUTINE SUR 522 PRELEVEMENTS D'ENFANTS DE MOINS DE 2 ANS.

M. Bouscambert-Duchamp, G. Lazarian, V. Escuret, E. Frobert, B. Lina, F. Morfin-Sherpa.

Communication orale à la 28^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris, 4-5 décembre **2008**.

GRIPPE AVIAIRE CHEZ L'ENFANT.

M. Bouscambert-Duchamp.

Communication orale 24^{ème} Journées annuelles du Groupe de Pathologie Infectieuse Pédiatrique, 26-27 septembre **2008**, Nice.

DETECTION OF HUMAN INFLUENZA A AND B VIRUSES RESISTANT TO NEURAMINIDASE INHIBITORS.

V. Escuret, M. Sabatier, F. Morfin, E. Frobert, M. **Bouscambert-Duchamp**, I. GROG, M. Valette, B. Lina, O. Ferraris.

Communication orale, ESCV (European Society for Clinical Virology) Symposium on respiratory viruses, 24 mai **2007**, Lyon, France.

GRIPPE AVIAIRE.

M. Bouscambert-Duchamp

Communication orale, XVIIème Congrès National de la Société Française d'Hygiène Hospitalière, Nantes, 1^{er} et 2 Juin **2006**.

DIAGNOSTIC RAPIDE DES INFECTIONS RESPIRATOIRES A RHINOVIRUS, ENTEROVIRUS ET METAPNEUMOVIRUS HUMAIN PAR RT-PCR CHEZ DES NOURRISSONS ATTEINTS DE BRONCHIOLITE.

M. Bouscambert-Duchamp, B. Lina, H. Moret, J. Jacques, F. Najioullah, D. Thouvenot, M.P. Millon, J. Carquin, V. Brodard, J. Motte, L. Andréoletti.

Communication orale, 6èmes Journées Francophones de Virologie, Paris, 22-23 avril **2004**.

DIAGNOSTIC RAPIDE DES INFECTIONS RESPIRATOIRES A METAPNEUMOVIRUS HUMAIN PAR RT-PCR CHEZ DES NOURRISSONS ATTEINTS DE BRONCHIOLITE

M. Bouscambert, B. Lina, A. Trompette, F. Najioullah, M.P. Millon, J. Carquin, V. Brodard, J. Motte, L. Andréoletti.

Communication orale, 23^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris, 4-5 décembre **2003**.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

INFLUENZA A VIRUSES HOST ULTRASTRUCTURAL NUCLEAR MODIFICATIONS: SPECIFIC DIFFERENT PATTERNS BETWEEN AVIAN AND HUMAN STRAINS?

*E. Frobert, L. Josset, O. Ferraris, **M. Bouscambert-Duchamp**, G. Cartet, F. Morfin, B. Lina, M. Rosa-Calatrava.*

Poster, European Society for Clinical Virology, Amsterdam, 7-10 janvier **2009**.

CAS CLINIQUE : INFECTION NEONATALE A HERPES SIMPLEX DE TYPE 1 SUITE A UNE CONTAMINATION INTRA-UTERINE

*G. Billaud, V. Escuret, **M. Bouscambert-Duchamp**, Y. Mekki, R. Bouvier, C. Clamadieu, O. Claris, B. Lina.*

Poster, 28^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris, 4-5 décembre **2008**.

RESPIRATORY PICORNAVIRUSES AS CAUSATIVE AGENTS OF ACUTE BRONCHIOLITIS IN FRENCH YOUNG INFANTS.

*L. Andreoletti, **M. Bouscambert**, J. Jacques, B. Lina, J. Motte.*

Poster, 45th ICAAC, Washington DC, 16-19 Décembre **2005**.

DIFFERENTIAL DETECTION OF RHINOVIRUS AND ENTEROVIRUS RNA SEQUENCES FOR THE DIAGNOSIS OF RESPIRATORY TRACT INFECTION IN YOUNG INFANTS: ROLE OF PICORNAVIRUSES IN CHILDHOOD BRONCHIOLITIS.

***M. Bouscambert**, J. Jacques, H. Moret, V. Brodard, J. Carquin, J. Motte, L. Andréoletti.* Poster, 6th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology. Lyon, 24-27 août **2003**.

ENSEIGNEMENTS

Cours Magistraux

VIROLOGIE GENERALE (6,5h en 2007 et 4h en 2008)

Université Claude Bernard, Lyon 1

DCEM 1, UFR de Médecine Lyon Grange Blanche

« Evaluation des examens complémentaires » (2h en 2008 et 2h en 2009)

Intervention dans le cadre du module 1 : Apprentissage de l'exercice médical

Université Claude Bernard, Lyon 1

DCEM 2, UFR de Médecine Lyon Grange Blanche

VIROLOGIE GENERALE (6h en 2007 et 6h en 2008)

Université Claude Bernard, Lyon 1

DCEM 1, UFR de Médecine Lyon RTH Laënnec

"Bactéries et virus. Flores microbiennes chez l'homme. Généralités sur l'infection, lutte antimicrobienne. Film".

Intervention dans le cadre du diplôme technique de Thanatopraxie

Université Claude Bernard, Lyon 1

Institut de Médecine Légale, Professeur Malicier.

Travaux pratiques

BACTERIOLOGIE VIROLOGIE (40h en 2007 et 40h en 2008)

Université Claude Bernard, Lyon 1

DCEM 1, UFR de Médecine Lyon Grange Blanche

Formations dispensées

« Les virus grippaux : du fondamental au diagnostic »

Intervention dans le cadre des formations IFRRES*

**Institut de Formation et de Recherche des Risques Emergents de Santé*

Enseignement destiné aux professionnels de santé (médecins, infirmiers)

(21/09/2009)

« Agents infectieux et éducation : grippe aviaire » (2h)

Intervention dans le cadre des Journées de l'INRP* : veille sanitaire et agents infectieux.

Enseignement destiné aux professionnels de l'éducation (instituteurs, inspecteurs d'Académie)

(15/09/2006)

Institut National de Recherche Pédagogique

Membre de Jury de Thèse de diplôme de Doctorat en Pharmacie

« De la grippe d'Hippocrate à la grippe aviaire : histoire d'une maladie »

(23/06/2008)

« Grippe aviaire »

Formations du Personnel HCL (4h)

Enseignement destiné aux Personnels de laboratoires (biologistes, techniciens)

(2006)