

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université SAAD DAHLAB – Blida

Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques

Département de Biologie

Mémoire de Fin d'Etudes en vue de l'Obtention du Diplôme

de Master en Biologie

Option : Génétique – Physiologie

Thème

**Détection phénotypique et génotypique de la résistance
du virus de la grippe A/H1N1 à l'Oseltamivir**

Présenté par

Assia AIT AISSA

Soutenu le 22/09/2013

Devant le jury composé de :

Présidente :	Mme BENAZZOUZ F.....	MAA.....	USDB
Examinatrice :	Mme GUESSAIBIA N.....	MCB.....	USDB
Examineur :	Mr OUMOUNA M.....	Prof.....	U-Médéa
Promoteur :	Mr DERRAR F.....	MAA.....	IPA
Co-promoteur :	Mr MOHAMED SAID R.....	MAA.....	USDB
Invité d'Honneur :	Mr BRAHIM ERRAHMANI M.....	MAA.....	USDB

Promotion 2012 – 2013

REMERCIEMENTS

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.

Je souhaite remercier en premier lieu **Mr DERRAR F.**, Médecin Maître Assistant en Microbiologie, Responsable du Laboratoire Grippe et Virus Respiratoires de l'Institut Pasteur d'Algérie, pour avoir proposé et dirigé ce travail. Grâce à son encadrement et sa disponibilité, il m'a été possible de mener ce mémoire à terme.

J'adresse mes sincères remerciements à **Mr MOHAMED SAID R.**, Maître Assistant au département de Biologie de l'Université de Blida, qui a co-dirigé ce mémoire, pour ces encouragements, ses idées et son sens pratique ainsi que pour le temps qu'il a bien voulu me consacrer.

Je voudrais remercier **Mme BENAZZOUC F.**, Maître Assistante au département de Biologie de l'Université de Blida, d'avoir accepté de présider le jury de cette soutenance.

Mes remerciements et mon profond respect vont à **Mme GUESSAIBIA N.**, Maître de Conférences au département de Biologie de l'Université de Blida, et **Mr OUMOUNA M.**, Professeur à l'Université de Médéa, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je suis honorée de compter parmi les membres du jury **Mr BRAHIM ERRAHMANI M.**, Maître Assistant au département de Biologie de l'Université de Blida, à qui j'exprime ma profonde reconnaissance pour sa précieuse aide dans l'analyse statistique des résultats. Une aide qui m'a été utile pour mieux accomplir ce travail.

Un grand merci à **Mme IDRI H.**, Chef de Produit chez Roche Diagnostics, qui a fait tout le nécessaire pour mettre à notre disposition, dans les meilleurs délais, les réactifs destinés à la partie génotypique.

Je remercie également le personnel du Laboratoire Grippe et Virus Respiratoires de l'Institut Pasteur d'Algérie, en particulier **Mme CHAFA M.**, **Mme CHEMKH N.** et **Mme SEMRI A.**

Merci à **Mme NEDIR S.** et **Mme BOUKOUAR H.** du Service Formation de l'Institut Pasteur d'Algérie.

Je remercie enfin toutes les personnes qui ont collaboré de près ou de loin à la finalisation de ce mémoire et qui se reconnaîtront.

Résumé

Le Centre National de Référence OMS pour la Grippe de l'Institut Pasteur d'Algérie a mis en place une unité de surveillance de la résistance du virus influenza aux inhibiteurs de la neuraminidase afin d'évaluer la possibilité d'émergence de souches mutantes après l'introduction de ces antiviraux dans la pratique clinique pour le traitement et la prévention de la grippe. L'oseltamivir étant l'antiviral recommandé par l'OMS au cours de la pandémie de grippe A(H1N1)2009, nous avons réalisé une étude en testant la sensibilité à cette molécule de souches algériennes isolées en cette année.

Un total de 70 souches virales a été testé. Ces souches ont été isolées au CNR Grippe Algérie lors de la pandémie A/H1N1 de 2009, durant une période allant de Juin à Décembre 2009. Cet échantillon a été choisi du fait de la circulation dans le monde à cette période, de souches résistantes à l'oseltamivir portant la mutation H275Y. Le travail a débuté par une analyse des caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée. A partir des renseignements relevés sur les malades nous avons réalisé une étude statistique pour déterminer le sex-ratio et les classes d'âge les plus touchées.

Afin d'évaluer le profil de sensibilité à l'oseltamivir des souches grippales isolées chez cette population, nous avons eu recours à deux techniques : Une technique phénotypique par inhibition de la neuraminidase virale (détermination des valeurs IC50) et une technique génotypique par RT-PCR en temps réel pour la discrimination allélique entre le type sauvage et le type résistant à l'oseltamivir portant la mutation H275Y.

Pour le besoin de validation de ces techniques, nous avons testé des souches de référence, sensibles et résistantes à l'oseltamivir, fournies par le NIMR – UK (National Institute for Medical Research-United Kingdom) et le CDC-USA (Centers for Disease Control-United States of America).

Les résultats obtenus par la technique phénotypique comparés à ceux obtenus par la technique génotypique montrent une bonne corrélation entre les valeurs des IC50 et le profil génétique des souches testées. Aucune résistance à l'oseltamivir n'a été détectée sur les 70 souches A/H1N1(2009) Algériennes.

La technique moléculaire pour la détection du virus influenza portant la mutation H275Y se révèle aussi sensible et spécifique que la technique phénotypique qui reste la technique de référence OMS pour la surveillance des résistances du virus grippal, avec un avantage d'être d'exécution plus rapide en cas de pandémie ou d'émergence de souche résistantes en Algérie.

Mots clés : Grippe, Résistance, Mutation, Neuraminidase, Oseltamivir, RT-PCR.

Abstract

The WHO National Influenza Center (NIC) - Pasteur Institute of Algeria, has set up a unit for monitoring the resistance of influenza viruses to neuraminidase inhibitors to assess the possibility of emergence of mutant strains after the introduction of these antiviral drugs in clinical practice for the treatment and prevention of influenza.

We conducted this study by testing the sensitivity of Algerian strains to oseltamivir knowing that this antiviral were recommended by WHO in pandemic influenza A (H1N1) 2009.

Seventy strains were tested . These strains were isolated in NIC Algeria during pandemic Influenza A/H1N1 of 2009, over a period from June to December 2009. This sample was chosen because of the traffic in the world at this time of strains resistant to oseltamivir with the H275Y mutation. This work began with an analysis of the epidemiological characteristics of the population studied. From the information recorded on the patients we performed a statistical analysis to determine the sex ratio and the most affected age groups.

To assess the profile of susceptibility to oseltamivir isolated influenza strains in this population , we used two methods : A phenotypic assay by inhibition of viral neuraminidase (determination of IC50 values) and a genotypic assay by Real-time RT-PCR allelic discrimination for detection of H275Y mutation conferring resistance to oseltamivir.

For the purpose of validation of these two methods, we tested reference strains sensitive and resistant to oseltamivir , provided by the NIMR - UK (National Institute for Medical Research, United Kingdom) and the CDC- USA (Centers for Disease Control- United States of America).

The results of the phenotypic assay compared to those obtained by genotypic assay show a good correlation between the values of IC50 and the genetic profile of the strains tested . No oseltamivir resistance was detected in all 70 Algerian A/H1N1 (2009) strains.

The molecular method for detection of the influenza H275Y mutation appears sensitive and specific than phenotypic method which is a WHO standard technique for monitoring the resistance of influenza virus, with an advantage of being faster and practice if there is pandemic or widespread influenza resistant strains in Algéria.

Keywords: Influenza, Resistance, Mutation, Neuraminidase, Oseltamivir.

ملخص

قام المركز الوطني المرجعي للأنفلونزا لمعهد باستور الجزائري بوضع وحدة لمراقبة مقاومة الفيروس للمثبطات النورامينيديناز لغرض تقييم إمكانية ظهور سلالات متحولة عن طريق الطفرة الجينية بعد استعمال هذه المضادات الفيروسية عمليا في العلاج والوقاية من الأنفلونزا. نصحت المنظمة العالمية لصحة (OMS) باستعمال الأوسيلتاميفير كمضاد لفيروس الأنفلونزا (H1N1) أثناء وباء 2009. لقد قمنا بدراسة حساسية عينة من 70 سلالة فيروسية للأوسيلتاميفير التي عزلت من مرضى الأنفلونزا في الجزائر في نفس السنة مابين شهر جوان إلي ديسمبر.

قمنا باختيار هذه العينة علي أساس أنه في تلك الفترة ظهرت في العالم سلالات متحولة مقاومة للأوسيلتاميفير تحمل الطفرة H275Y. اهتمت الخطوة الأولية لهذا العمل بدراسة الخصائص الوبائية لمرضى الأنفلونزا. ابتداء من المعلومات المسجلة على المرضى، أجرينا تحليلا إحصائيا لتحديد نسبة الجنس والفئات العمرية الأكثر تضررا.

لغرض تقييم حساسية السلالات الفيروسية المعزولة من مرضى الأنفلونزا في الجزائر، قمنا باستعمال تقنيتين: تقنية النمط المظهري التي تعتمد علي تثبيط النورامينيداز الفيروسية (تحديد قيم IC50) و تقنية النمط الجيني التي تعتمد علي RT-PCR في الوقت الحقيقي للتمييز الأليلي بين النمط الطبيعي و النمط المتحول المقاوم للأوسيلتاميفير الذي يحتوي علي طفرة H275Y.

لغرض التحقق من الصحة هذه التقنيات، قمنا باختبار سلالات مرجعية، حساسة ومقاومة للأوسيلتاميفير التي تم الحصول عليها من المعهد الوطني البريطاني للأبحاث الطبية (UK-NIMR) و المركز الأمريكي لمكافحة الأمراض (CDC-USA).

عند مقارنة نتائج تقنية النمط المظهري بنتائج تقنية النمط الجيني نلاحظ وجود علاقة جيدة بين قيم IC50 والجوانب الوراثية للسلالات المختبرة. لم يتم الكشف عن أية مقاومة للأوسيلتاميفير عند سلالات A/H1N1 المعزولة من مرضى الأنفلونزا في الجزائر سنة 2009.

يبدو أن تقنية النمط الجيني للكشف عن فيروس الأنفلونزا الذي يحتوي علي الطفرة H275Y هي تقنية دقيقة و محددة مثلما هو الحال بالنسبة للتقنية النمط المظهري. هذه الأخيرة هي التقنية المرجعية لمنظمة الصحة العالمية (OMS) لرصد مقاومة فيروس الأنفلونزا كونها تتميز بالتطبيق السريع في حالة الوباء أو الظهور لسلالة متحولة مقاومة في الجزائر.

كلمات البحث: الطفرة، المقاومة، الأنفلونزا، النورامينيداز، أوسيلتاميفير.

ABREVIATIONS

Å : Angström
ADN : Acide Désoxyribo- Nucléique
ADNc : Acide Désoxyribo- Nucléique complémentaire
ANOVA : Analysis Of VAriance
ARNv : Acide Ribo-Nucléique viral
AS : Acide Sialique
CDC - USA : Centers for Disease Control – United States of America
CNR: Centre National de Référence
dNTP : désoxyribo-Nucléotides Tri Phosphates
HA (H) : Hémagglutinine
HI : Acide chlorhydrique
HEF : Hémagglutinine Estérase Fusion
IFD : Immunofluorescence Directe
IFI : Immunofluorescence Indirecte
IPA : Institut Pasteur d'Algérie
Kb : Kilo bases
LGVR : Laboratoire Grippe et Virus Respiratoires
M1/M2 : protéines matricielles 1 et 2
MDCK: Madin-Darby Canine Kidney
MEM: Milieu Essentiel Minimum
NA (N) : Neuraminidase
NANA : Acide N-Acétyl-Neuraminique
NEP : Protéine d'Export Nucléaire
NIMR-UK : National Institute for Medical Research-United Kingdom
NP : Nucléoprotéine
NS1/NS2 : protéines Non Structurales 1 et 2
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PA : Protéine Acide
PB1/PB2 : Protéines Basiques 1 et 2
PBS : tampon Phosphate Buffered Saline
pdm : pandémie
RE : Réticulum endoplasmique
RLU : Relative Luminescence Unit
RNPv: Ribo-Nucléo-Proteiques virale
RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SMAD: Standard Median Absolute Deviation
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
Taq: Thermus aquaticus
Tris: Trishydroxyméthylaminométhane
WHO: World Health Organisation
°C : degré Celsius
h : heure
kD : kilo Dalton
min : minute
mt: mutant
pb : paires de bases
sec : seconde
tpm: tours par minute
wt: wild type

GLOSSAIRE

ARN entraîneur (RNA carrier) : Petit fragment poly-A synthétique utilisé en biologie moléculaire pour précipiter les ARN lors de l'extraction.

Amplicon : fragment d'ADN amplifié par PCR

Arthralgie : douleurs articulaires.

Dérivée : C'est la pente de la tangente au graphe au point de coordonnées [x , f(x)].

Myalgie : douleur musculaire.

Protéinase K : Enzyme utilisée en biologie moléculaire pour digérer les protéines et enlever les contaminants de préparation d'acides nucléiques

Rhinorrhée : écoulement provenant de la muqueuse nasale, qui se déclenche lors d'un rhume

SD (Standard Deviation = Ecart type) : mesure de la dispersion d'une variable aléatoire réelle (mesure de dispersion de données)

SMAD: C'est l'écart absolu moyen qui est une mesure d'une dispersion statistique. Le SMAD est un meilleur estimateur de la variance d'un échantillon que l'écart type, il permet de déterminer les valeurs extrêmes (outliers).

Statistique descriptive : Branche des statistiques qui regroupe les nombreuses techniques utilisées pour décrire un ensemble relativement important de données.

Taq polymérase : La Taq polymérase est une ADN polymérase qui agit dans une certaine gamme de température. Elle est utilisée pour faire des réactions de PCR. Elle a été isolée à partir de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus*.

Température de fusion Tm (melting temperature) : Température à laquelle se produit le passage de l'état bicaténaire à l'état monocaténaire de l'ADN. Elle dépend du pourcentage de (G + C) de l'ADN et des mésappariements.

Tris : abréviation de Tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane. Il est largement utilisé comme tampon en biochimie, particulièrement pour travailler avec des acides nucléiques avec un intervalle de pH entre 6.5 et 9.7. Le Tris possède des protons labiles.

Triton X-100 : Détergent utilisé en biologie cellulaire et moléculaire pour perméabiliser les membranes cytoplasmique, nucléaire...etc.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure des virus grippaux A, B, et C.....	2
Figure 2 : Virus grippal de type A en microscopie électronique.....	3
Figure 3 : Représentation schématique du virus de la grippe de type A.....	4
Figure 4 : Représentation schématique d'une RNPv montrant l'encapsidation de l'ARNv.....	5
Figure 5 : Structure de HA, faisceau de trois sous-unités semblables.....	6
Figure 6 : Attachement du virus grippal à la cellule hôte.....	6
Figure 7 : Acides sialiques en branchement α 2-3 et α 2-6.....	7
Figure 8 : Structure de la neuraminidase.....	7
Figure 9 : La transcription coiffe-dépendante.....	11
Figure 10 : Cycle répliatif du virus grippal.....	12
Figure 11 : Organisation phylogénétique et structure cristalline de NA.....	14
Figure 12 : Images de microscopie électronique. Surfaces de cellules MDCK infectées.....	15
Figure 13 : Structures chimiques de l'Oseltamivir et de l'Acide sialique.....	16
Figure 14 : Structure cristalline de l'oseltamivir lié au site actif de la neuraminidase du virus grippal (sous-type N9).....	16
Figure 15 : Structure de la neuraminidase N1 portant la mutation H275Y en complexe avec l'oseltamivir.....	18
Figure 16 : Schéma du réassortiment génétique du nouveau virus A(H1N1)2009.....	21
Figure 17 : La culture cellulaire. Nappe de cellules MDCK.....	23
Figure 18-a : Modèle graphique de la PCR en temps réel.....	25
Figure 18-b : PCR en temps réel. Mesure de la fluorescence des échantillons.....	25
Figure 19 : Température de fusion des amplicons (T_m) représentée par un pic.....	26
Figure 20 : Dilutions en série de $\frac{1}{2}$ des virus à tester et des souches de référence.....	33
Figure 21 : Concentrations finales d'oseltamivir (nM) dans chaque puits d'une plaque à 96 cupules.....	34
Figure 22 : Distribution dans les classes d'âges.....	39
Figure 23 : Provenance des cas confirmés du virus pandémique A/H1N1 entre Juin et Décembre 2009.....	40
Figure 24 : Notion de voyage récent. Cas confirmés de virus A/H1N1 pandémique par pays de provenance, entre Juin et Décembre 2009.....	40
Figure 25 : Répartition des cas autochtones par Wilaya.....	41
Figure 26 : Logiciel Wallac 1420 Manager (capture d'écran).....	42
Figure 27 : Programme « Point to Point » (NIMR-UK).....	42
Figure 28 : Comparaison des valeurs des IC50 basée sur la moyenne et les écart-types.....	44
Figure 29 : Dispersion des valeurs des IC50 des 70 souches LGVR-IPA, avec 2 « Minor outliers ».....	45
Figure 30 : Cinétique enzymatique des souches de référence A/H1N1 saisonnières.....	46
Figure 31 : Cinétique enzymatique des souches de référence A/H1N1 pandémiques.....	46
Figure 32 : Amplification par RT-PCR en temps réel. Cinétique de fusion de la sonde calculée en unités de fluorescence en fonction de la température.....	48
Figure 33 : Pics de fusion de la sonde fluorescente au niveau des allèles : sauvage H275 (sensible) et muté Y275 (résistant).....	49
Figure 34 : Titrage et Identification des virus grippaux par le test d'Hémagglutination.....	64
Figure 35 : Test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA).....	65
Figure 36 : Inhibition de l'Hémagglutination (IHA).....	66

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Les segments du génome influenza A et les différentes protéines codées.....	4
Tableau II : Mutations des acides aminés catalytiques et structuraux et spécificité des antiviraux.....	17
Tableau III : contenu du Kit NA- <i>Star</i>	30
Tableau IV : Préparation des dilutions d'oseltamivir.....	34
Tableau V : contenu du Kit pour l'extraction de l'ARN viral.....	35
Tableau VI : contenu du Kit pour l'amplification.....	36
Tableau VII : Mix pour la détection de la mutation H275Y.....	38
Tableau VIII : Programmation de l'appareil Light Cycler 480 II (Roche).....	38
Tableau IX : Moyennes et intervalles des IC50 obtenues pour les 70 souches LGVR-IPA et les souches de référence.....	43
Tableau X : Calcul des seuils pour valeurs extrêmes « outliers ».....	44
Tableau XI : Renseignements relevés sur les 70 malades chez qui le virus A (H1N1)2009 a été isolé au LGVR – IPA.....	67

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : GENERALITES	
I.1. Le Virus de la Grippe	2
I.1.1 Le virus de la grippe de type A.....	3
I.1.1.1 - Structure de la particule virale de type A.....	3
I.1.1.1.1 - Génome du virus grippal de type A.....	3
I.1.1.1.2 - Les protéines de l'enveloppe.....	5
I.1.1.1.3 - Les protéines internes.....	8
I.1.2-Nomenclature des virus grippaux de type A.....	9
I.1.3-Cycle de réplication du virus influenza.....	9
I.1.3.1- Etapes précoces du cycle viral.....	9
I.1.3.2- Etapes tardives du cycle viral.....	11
I.2. Structure, Fonction et inhibition de la Neuraminidase du virus Influenza	13
I.2.1-Structure cristalline de la neuraminidase.....	13
I.2.2-Fonction de la Neuraminidase du virus influenza.....	14
I.2.3-Inhibition de la neuraminidase du virus Influenza.....	15
I.3-Epidémiologie de la grippe	18
I.3.1-Pathologie.....	18
I.3.2-Réservoir.....	19
I.3.3-Causes des épidémies et pandémies.....	19
I.3.4-La grippe A(H1N1)2009.....	20
I.4-Diagnostic de la grippe	21
I.4.1-Diagnostic clinique.....	21
I.4.2-Diagnostic biologique.....	22
I.4.2.1. Prélèvement.....	22

I.4.2.2. Méthodes de diagnostic.....	22
I.5-Traitement et prévention de la grippe : antiviraux et vaccination.....	27
I.5.1-Efficacité des inhibiteurs de neuraminidase.....	27
I.5.2-Oseltamivir dans le traitement de la grippe.....	28
I.5.3-Prévention de la grippe par la vaccination.....	28
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	
II.1.Technique phénotypique.....	29
II.1.1. Matériel et Equipement.....	29
II.1.2. Méthodes.....	31
II.1.2.1. Etude de l'activité de la neuraminidase et détermination du titre viral.....	31
II.1.2.2. Etude de l'inhibition de la neuraminidase : détermination de l'IC50.....	33
II.2. Technique génotypique.....	35
II.2.1. Matériel et Equipement.....	35
II.2.2. Méthodes.....	37
II.2.2.1. Extraction de l'ARN.....	37
II.2.2.2. Réalisation de la RT-PCR en Temps Réel.....	38
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....	39
III.1. RESULTATS.....	39
III.1.1. Caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée.....	39
III.1.2. Résultats de la technique phénotypique.....	41
III.1.3. Résultats de la technique génotypique.....	47
III.2. DISCUSSION.....	50
CONCLUSION.....	52
BIBLIOGRAPHIE.....	53
ANNEXES.....	59

INTRODUCTION

La grippe (ou influenza) est une infection virale courante et généralement bénigne qui touche principalement l'appareil respiratoire. Cette virose peut avoir des effets sévères chez les individus à la santé fragile, comme les personnes âgées et celles souffrant d'affections pulmonaires. Aux vues de son incidence et des complications qu'elle peut entraîner, cette maladie constitue un problème majeur de santé publique (**Gamblin, 2004**).

La vaccination est la principale mesure de prévention de la grippe ; la politique vaccinale vise à protéger ces personnes pour lesquelles la grippe peut être fatale.

Il existe trois types de virus grippaux, A, B et C. Les virus de type A sont responsables de la majorité des épidémies de grippe saisonnière et sont les seuls à sévir sous forme pandémique depuis la grippe espagnole de 1918 qui a tué plus de 20 millions de personnes (**Amiel, 2010**).

Les oiseaux sauvages aquatiques représente le grand réservoir du virus de la grippe A et de sa diversité. Le caractère segmenté du génome viral (8 segments d'ARN) et l'infidélité de son ARN polymérase sont à l'origine des phénomènes de réassortiments et de mutations qui ont permis au virus de franchir la barrière d'espèce, entraînant des pandémies chez l'homme.

Le traitement précoce de la grippe par utilisation de médicaments antiviraux réduit la capacité du virus à se multiplier. Administrés dès l'apparition des premiers symptômes, ils réduisent potentiellement les risques de complications (**Huraux et al., 2003**).

Les antiviraux visent à perturber une étape du cycle de réplication du virus. Dans le cas des virus grippaux de type A la cible la plus intéressante est une protéine située en surface du virus, la neuraminidase, qui intervient dans la libération et la propagation des virions après multiplication dans la cellule.

Le traitement par les inhibiteurs de la neuraminidase, oseltamivir et zanamivir, a été introduit dans la pratique clinique dans diverses régions du monde. L'oseltamivir est utilisé en première intention chez les malades à risque de complications sévère de la grippe.

Toutefois, l'utilisation excessive de l'oseltamivir a rapidement fait apparaître une résistance du virus grippal de type A. Cette résistance est associée à une mutation survenant au niveau d'un acide aminé impliqué dans la structure du site actif de la neuraminidase. Il s'agit d'une substitution d'une Histidine en position 275 par une Tyrosine (mutation H275Y) (**Hay et al., 2008**).

L'objectif de notre travail était de mettre au point des techniques de détection phénotypique et génotypique de la résistance du virus grippal en Algérie. Pour cela nous avons ciblé une population de malades de la pandémie A/H1N1 de 2009, période durant laquelle l'oseltamivir a été très utilisé dans le traitement et la prévention de cette infection.

CHAPITRE I : GENERALITES

I.1. Le Virus de la Grippe

Le virus grippal est un virus à ARN simple brin pourvu d'une grande plasticité génétique car il subit constamment des réassortiments génétiques. Ce processus évolutif, complémentaire des mutations que connaît ce virus, est en relation avec la nature segmentée du génome viral.

Le virus de la grippe appartient à la famille des *Orthomyxoviridae* et au genre *Influenzavirus*. Il existe 3 types : influenza A, influenza B et influenza C.

Les virus influenza de types A et B sont proches phylogénétiquement, ils sont composés d'un génome segmenté en huit parties, alors que l'Influenza C possède sept segments.

L'enveloppe virale des virus influenza types A et B est constituée de spicules appelées Hémagglutinine (HA) et neuraminidase (NA). Les virus de type C possèdent eux une hémagglutinine notée HEF (Hémagglutinine Estérase Fusion) plus longue que celle des deux autres virus grippaux et codée aussi par le segment 4 (figure 1). La HEF possède une fonction de plus qui n'est pas retrouvée dans la HA, c'est celle de destruction des récepteurs, jouée par la NA des virus A et B (Akarsu, 2005).

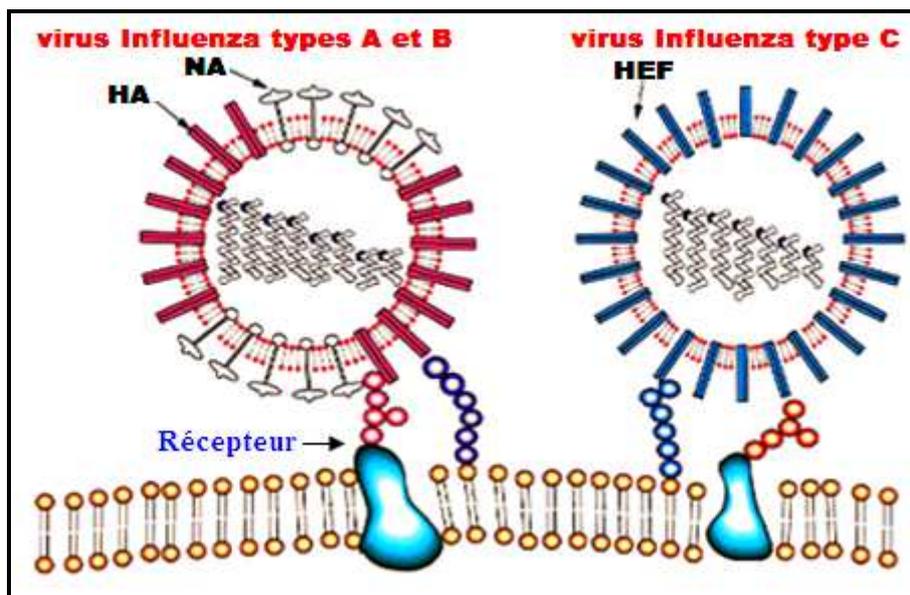


Figure 1 : Structure des virus grippaux A, B, et C (Gamblin, 2004).

La grippe que l'on connaît communément correspond aux genres A et B qui circulent en parallèle durant les épidémies. Les vaccins sont composés de virus de la grippe de types A et B inactivés ; les souches virales utilisées dans les vaccins sont modifiées en fonction des souches en circulation.

En ce qui concerne le virus de la grippe de type A, sa capacité de mutation élevée et les effets dévastateurs de ses pandémies (1918, 1957, 1968, 2009), le font classer parmi les virus potentiellement sévères. C'est pourquoi le virus de la grippe de type A est étudié de façon plus intensive (Huraux *et al.*, 2003).

La présente étude se limite au virus influenza A.

I.1.1. Le virus de la grippe de type A

I.1.1.1. Structure de la particule virale de type A

Le virus influenza A se présente sous la forme d'un virion ovoïde d'environ 120 nm de diamètre et recouvert de spicules qui sont les protéines Hémagglutinine (H ou HA) et Neuraminidase (N ou NA)

La figure 2 représente la particule virale en microscopie électronique.

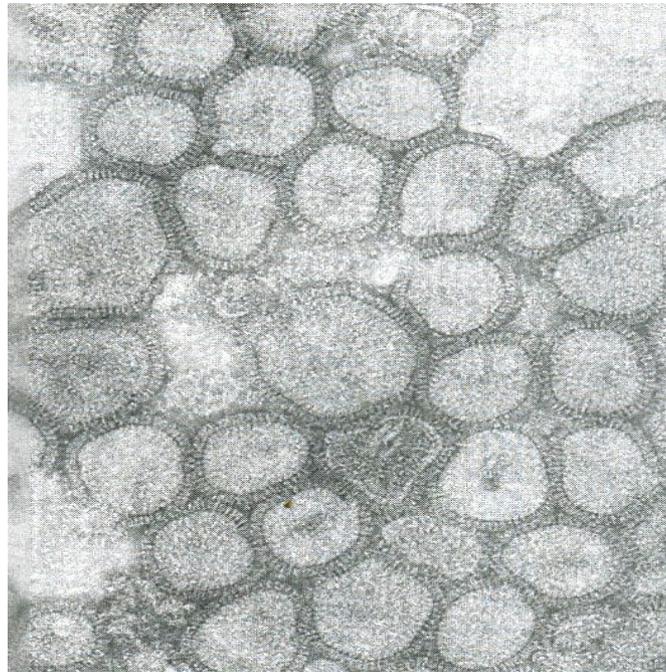


Figure 2 : Virus grippal de type A en microscopie électronique (Manuguerra et Hannoun, 1999)

Le virus influenza A est un virus enveloppé. Il possède une bicouche lipidique d'origine cellulaire, tapissée par la protéine de matrice (M1). Sur cette enveloppe sont insérées les protéines virales de surface (HA et NA) et les canaux à protons formés par la protéine M2 (figures 3).

I.1.1.1.1. Génome du virus grippal de type A

Le génome de l'influenza virus de type A est un ARN monocaténaire divisé en 8 segments qui se répliquent séparément et restent indépendants tout au long de la multiplication du génome. Chaque segment d'ARN correspond à un gène qui code pour une ou deux protéines (Tableau I et Figure 3).

Tableau I : Les segments du génome influenza A et les différentes protéines codées (Hannoun, 1995)

Segment d'ARN	Protéines codées
Segment 1	PB2: catalyse la synthèse de nouveaux ARNv
Segment 2	PB1: reconnaissance et liaison de la coiffe des ARNm cellulaires
Segment 3	PA: transcription, réplication
Segment 4	HA: code l'hémagglutinine HA
Segment 5	NP: code la protéine NP
Segment 6	NA: code la neuraminidase NA
Segment 7	M : code deux protéines M1 et M2 grâce à un mécanisme d'épissage alternatif
Segment 8	NS: code deux protéines NS1 et NS2 grâce à un mécanisme d'épissage alternatif

L'ARN viral est de polarité négative [ARN(-)]. Ce qui signifie qu'il ne peut pas être traduit directement tel quel en protéines virales ; un brin d'ARN complémentaire de polarité positive [ARN(+)] équivalent à l'ARN messager cellulaire doit être d'abord synthétisé par la polymérase virale (Neumann *et al.*, 2009). Le complexe polymérase (complexe transcriptase/réplicase) est constitué de l'association d'une polymérase acide PA et de deux polymérases basiques PB1 et PB2 (Figure 3).

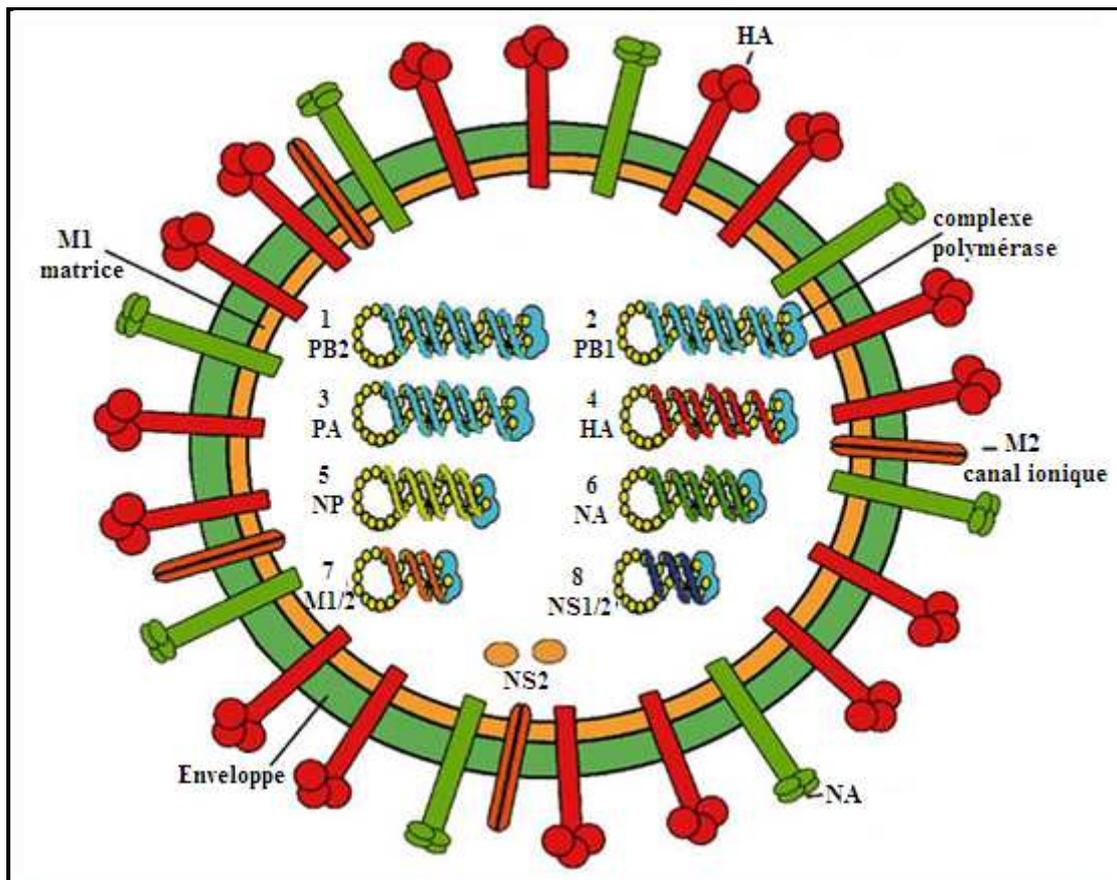


Figure 3 : Représentation schématique du virus de la grippe de type A (Lagathu et Colimon, 2010)

Le génome viral est d'environ 14Kb. Il est lié à la matrice M1 afin d'assurer une cohésion entre les RNPv (complexes Ribo-Nucléo-Proteiques viraux) et l'enveloppe. Ces RNP viraux sont composés des ARN viraux organisés autour de monomères de nucléoprotéine (NP) à raison d'une NP tous les 24 nucléotides assurant protection et conformation du génome et du complexe polymérase. Les extrémités 5' et 3' de l'ARN viral se rejoignent et sont liées par le complexe de l'ARN polymérase virale ARN-dépendante. La RNPv adopte ainsi une forme pseudo-hélicoïdale (Figure 4).

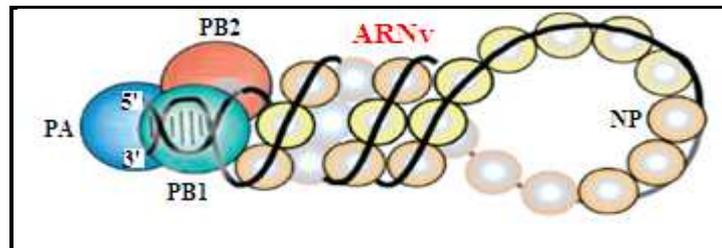


Figure 4 : Représentation schématique d'une RNPv montrant l'encapsidation de l'ARNv par NP (Naffakh *et al.*, 2008).

Chacune des huit RNP constitue une unité de transcription indépendante. Les séquences des 11-13 nucléotides de l'extrémité 5' et des 9-12 nucléotides de l'extrémité 3', parfaitement conservées pour chacun des segments, constituent les principaux signaux de transcription/réplication de l'ARNv.

L'induction de la transcription des ARNm viraux se fait par un mécanisme particulier de capture de coiffe : les extrémités 5' coiffées des ARNm cellulaires sont clivées au niveau d'une purine située à 10-13 nucléotides de l'extrémité et servent d'amorce à la transcription. La terminaison de la transcription et la poly-adénylation de l'extrémité 3' des ARNm se font par polymérisation itérative au niveau d'une séquence polyU située 15-22 nucléotides en amont de l'extrémité 5' de l'ARNv. La répllication des segments d'ARNv passe par la synthèse de molécules d'ARNc complémentaires et colinéaires des ARNv, qui servent à leur tour de matrice pour la synthèse d'ARNv (Area *et al.*, 2004).

I.1.1.1.2. Les protéines de l'enveloppe :

L'enveloppe virale du virus grippal de type A est constituée des spicules Hémagglutinine (HA) et Neuraminidase (NA), d'une bicouche lipidique, de canaux à protons M2 et de la protéine de matrice M1. Le virus de type A possède une grande variabilité, permettant de distinguer des sous types selon la nature de l'hémagglutinine et de la neuraminidase (H1N1, H3N2, H5N1,...etc).

L'hémagglutinine (HA)

Elle se présente sous la forme de structures angulaires mesurant de 10 à 40 nanomètres de longueur. Cette spicule est un trimère (faisceau de trois sous-unités semblables, Figure 5) possédant à son extrémité :

- des sites d'attache spécifique aux acides sialiques des récepteurs cellulaires, permettant au virus grippal de s'y fixer (ce mécanisme constitue la première phase de l'infection).
- des sites d'attache pour des anticorps anti-HA neutralisants et protecteurs lors d'une infection.

Chaque site de liaison au récepteur présente une structure en boucle-hélice-boucle, qui entoure l'acide sialique. Ce dernier est lié par des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes.

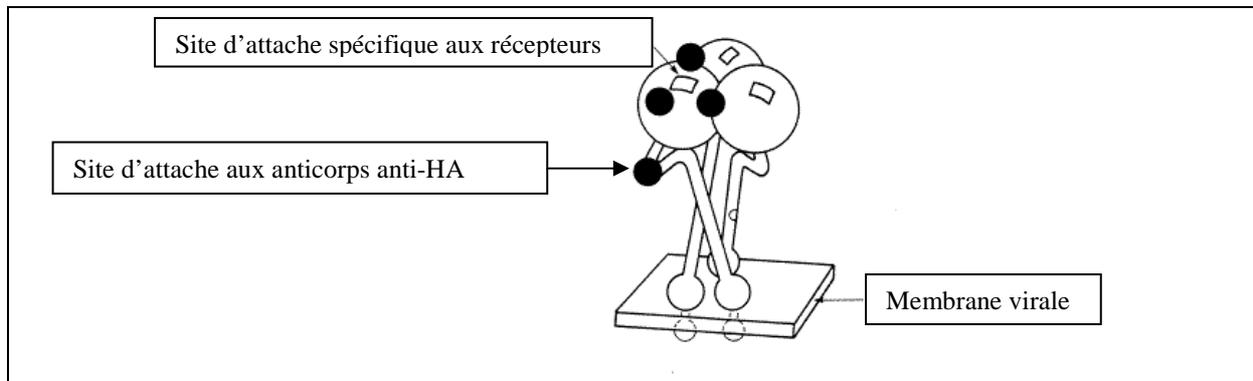


Figure 5 : Structure de HA, faisceau de trois sous-unités semblables (Hannoun, 1995).

Il existe 16 sous-types antigéniques hémagglutinine qui sont marqués H1 à H16.

L'hémagglutinine joue un rôle déterminant dans l'infection grippale : elle participe au tropisme du virus pour les cellules de l'arbre bronchique. Elle se fixe à l'acide sialique (Acide N-Acétyl-Neuraminique = NANA) des chaînes glucidiques des cellules ciliées de l'arbre respiratoire (Figure 6).

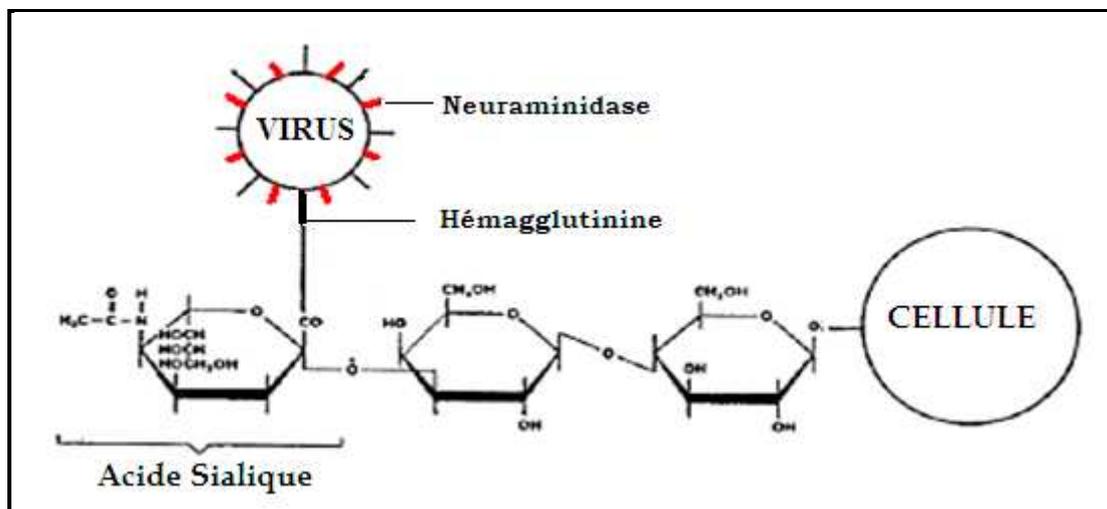


Figure 6 : Attachement du virus grippal à la cellule hôte (Hannoun, 1995)

L'hémagglutinine virale peut reconnaître soit des acides sialiques branchés en α 2-3 à une molécule de galactose voisine, soit des acides sialiques branchés en α 2-6 (figure 7). La nature du récepteur, à savoir la conformation de l'acide sialique, est à l'origine de la spécificité des hôtes des différents virus de la grippe (Rogers et Paulson, 1983).

Dans le tractus respiratoire de l'homme, l'acide sialique a une conformation de type α -(2,6), alors que dans les cellules intestinales d'oiseaux, il possède une conformation de type α -(2,3).

Chez le porc, les deux types de conformation de l'acide sialique α -(2,3) et α -(2,6) coexistent, ce qui fait de cet animal un lieu de recombinaison possible entre des grippe aviaire et humaine pouvant déboucher sur des pandémies (Akarsu, 2005).

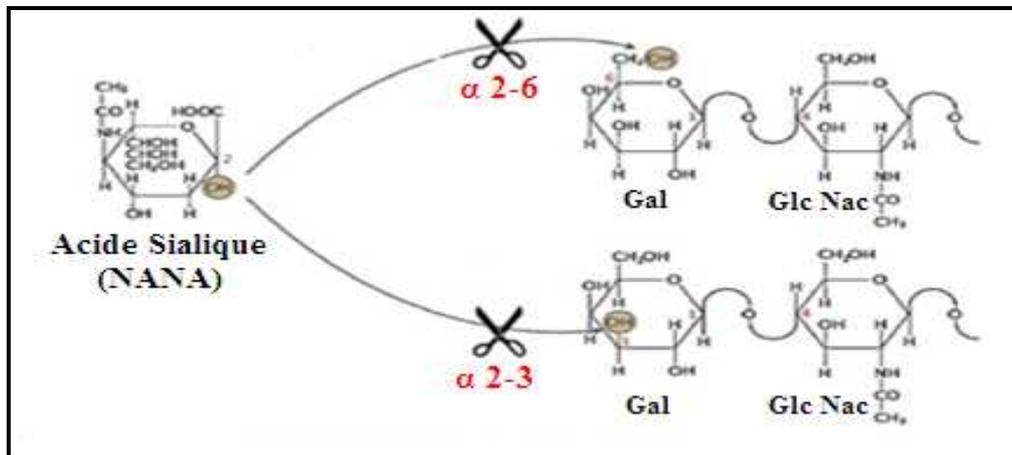


Figure 7 : Acides sialiques en branchement α 2-3 et α 2-6 (Munier *et al.*, 2010)

(✂) : Activité sialidase de la neuraminidase

La neuraminidase (NA)

La neuraminidase est une glycoprotéine présente à la surface de l'enveloppe des virus influenza. Après répllication du virus grippal dans la cellule infectée, la neuraminidase facilite la libération et la diffusion du virus, par hydrolyse des récepteurs membranaires (l'acide sialique) lors du bourgeonnement de la particule virale.

La neuraminidase est codée par le segment 6 du génome viral ; elle a un poids moléculaire de 200 kDa et se présente sous la forme d'un homotétramère (quartes sous unités identiques). Elle est constituée d'une tige surmontée d'une tête globulaire qui porte l'activité sialidase (clive l'acide sialique) (Figure 8).

La neuraminidase fait l'objet de ce travail, elle sera traitée en détail dans la partie « Structure, Fonction et inhibition de la Neuraminidase du virus Influenza ».

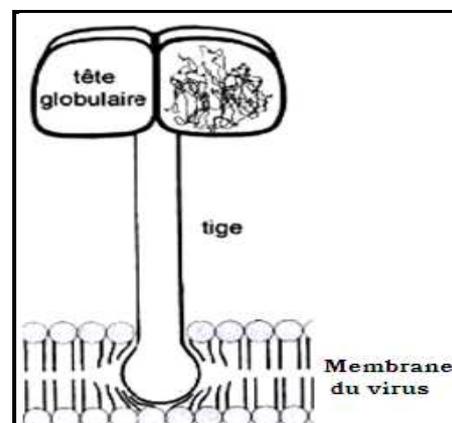


Figure 8 : Structure de la neuraminidase (Munier *et al.*, 2010)

Le canal à protons M2

Par épissage alternatif, le segment 7 code également la protéine M2 qui est le canal à proton de la particule virale (**Nichimura *et al.*, 2002**). Elle a un poids moléculaire de 11 kDa (97 résidus) et forme un homotétramère. La protéine M2 joue un rôle primordial lors de l'acidification de l'intérieur du virus en phase précoce d'infection.

La protéine matricielle M1

M1 est une protéine de 28 kDa (252 acides aminés) codée par le segment 7 du génome de la grippe (codant aussi pour la protéine canal M2). Elle se compose de résidus d'arginine et est chargée positivement (**Baudin *et al.*, 2001**). M1 interagit avec la membrane lipidique par des interactions électrostatiques, via son domaine N-terminal. Quant à son domaine C-terminal, il semble impliqué dans la liaison aux RNP viraux (**Ruigrok *et al.*, 2000**).

I.1.1.1.3. Les protéines internes

La protéine NP

C'est une protéine de 58 kDa (498 acides aminés) codée par le segment 5 et qui recouvre entièrement l'ARN viral pour former des particules, ou « capsides » : les Nucléocapsides (RNPv). La protéine NP joue donc un rôle structural pour le maintien de l'ARNv dans une conformation appropriée pour la transcription par la polymérase et pour l'empaquetage dans les virions (**Chenavas *et al.*, 2013**).

La protéine NS1 (Non Structurale 1)

Les protéines NS1 ne sont pas présentes dans la particule virale. Elles sont formées dans la cellule infectée. C'est une protéine de 27 kDa (230 résidus) codée par le plus petit segment du génome viral, le segment 8, grâce à un épissage alternatif du transcrit viral. NS1 a de nombreuses fonctions dans le cycle viral, plus particulièrement en ce qui concerne l'inhibition de la réponse antivirale cellulaire et l'inhibition de la maturation et de l'export nucléaire des ARNm cellulaires (**Wang *et al.*, 2000**).

La protéine NS2 (Non Structurale 2)

Aussi appelée NEP (Protéine d'Export Nucléaire), c'est une petite protéine de 14 kDa (121 acides aminés) produite, comme la NS1, par un épissage alternatif du segment 8 du génome viral. NS2 joue un rôle fondamental dans l'export nucléaire du génome viral : Dans le noyau, la protéine M1 se fixe aux RNP viraux qui viennent d'être assemblés et cette association se lie à NEP. NEP comportant un signal d'export nucléaire les RNP viraux sont alors conduits dans le cytoplasme (**Neumann *et al.*, 2000**).

Le complexe de la polymérase du virus influenza

L'ARN polymérase virale est formée de l'assemblage de trois sous-unités distinctes appelées PB1, PB2 (pour protéine basique 1 et 2) et PA (protéine acide). Ce complexe macromoléculaire est responsable à la fois de la réplication du génome viral mais aussi de sa transcription en ARN messagers (ARNm), deux processus moléculaires distincts se déroulant uniquement dans le noyau des cellules infectées (**Huang *et al.*, 1990**).

La sous-unité PB1, codée par le segment 2, porte le domaine polymérase, responsable de l'activité de synthèse de l'ARNm et l'ARNv (**Deleage, 2008**). La sous-unité PB2, codée par le segment 1, contient un signal de localisation nucléaire (NLS) et permet le transport dans le noyau du génome viral afin de permettre sa transcription et sa réplication dans la cellule infectée. PB2 joue un rôle majeur dans la capture de la coiffe des ARNm cellulaires nécessaires à l'initiation de la transcription, ce site étant au niveau de l'extrémité C terminal (**Chenavas et al., 2013**). La sous-unité PA, quant à elle, porte l'activité endonucléase impliquée dans le mécanisme de vol de coiffe (**Dias et al., 2009**).

I.1.2. Nomenclature des virus grippaux de type A

Il existe différents sous-types de forme « HxNy » de virus grippaux de type A qui sont définis selon l'origine de leurs protéines de surface (HA, NA) dont on connaît à l'heure actuelle 16 types pour la HA et 9 pour la NA. Afin de différencier ces sous-types, chaque souche de virus reçoit une désignation officielle qui indique divers renseignements permettant de connaître les principaux éléments de l'historique de la souche et de son identification. Cette nomenclature décrit la spécificité de chaque virus de la manière suivante (**Hannoun, 1995**) :

- A : pour indiquer qu'il fait partie du type influenza A
- L'hôte : Quel être vivant infecte-t-il ? (s'il s'agit de l'homme, l'indication n'est pas mentionnée)
- Le lieu de l'isolement : Où a-t-il été isolé pour la première fois ?
- Le numéro de la souche
- L'année d'isolement
- Les sous-types de HA et NA

Exemples :

- Le virus pandémique de 2009 a été désigné *A/California/04/2009 (H1N1)*
- La grippe aviaire de 2003 : *A/chicken/Shantou/423/2003(H5N1)*

I.1.3. Cycle de réplication du virus influenza

Le virus de la grippe, qui s'attaque à des cellules présentes dans le système respiratoire, utilise la voie aérienne en pénétrant dans l'organisme par aérosols. Une fois à l'intérieur il amorce son cycle de réplication dans une des cellules ciliées ou épithéliales de l'arbre respiratoire supérieur et crée ainsi de nouveaux virus infectieux.

Le cycle viral comporte deux phases. La phase précoce regroupe les phases correspondant à l'entrée du virus dans la cellule hôte jusqu'à la réplication et la transcription de son génome. La phase tardive débute, quant à elle, par l'export nucléaire du génome viral néosynthétisé et s'achève par la libération des particules virales.

I.1.3.1. Etapes précoces du cycle viral

Fixation du virus sur la cellule hôte

Le virus influenza s'attache à la cellule cible par liaison de son HA à un récepteur spécifique (glycoprotéine, ganglioside, glycolipide) présent sur la membrane de celle-ci.

Ce récepteur possède à son extrémité un résidu galactose, lui-même lié à une molécule d'Acide N-Acetyl Neuraminique (NANA = acide sialique).

Endocytose de la particule virale

Après fixation au récepteur cellulaire, le virus entre dans la cellule par endocytose via des vésicules à clathrine (**Lazarovits et Roth, 1988**). L'abaissement du pH dans les endosomes, après la fusion avec des lysosomes, active le canal à protons M2 présent au sein de l'enveloppe virale, ce qui a pour effet d'acidifier le contenu de la particule virale et de dissocier la protéine de matrice M1 des RNPv (**Naffakh et al., 2006**). Par ailleurs, l'abaissement du pH induit un changement conformationnel de la HA, qui conduit à la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de l'endosome et entraîne la libération des RNPv dans le cytoplasme (**Chen et al., 1998**).

Import actif du génome viral dans le noyau cellulaire

Les RNPv ainsi libérées peuvent être transportées dans le noyau sous le contrôle d'un signal de localisation nucléaire NLS (Nuclear Localization Signals) porté par la protéine NP qui jouent le rôle de protéine chaperonne (**Boulo et al., 2007**). A l'intérieur du noyau les RNPv peuvent alors servir de matrice pour la réplication et la transcription du génome viral.

Transcription et réplication virales dans le noyau

La première étape de la réplication du génome viral est la transcription de l'ARNv de polarité négative en ARN messenger (ARNm) de polarité positive (**Kimura et al., 1992**).

Une particularité du virus de la grippe est la capture des extrémités coiffées des pré-ARNm cellulaires présents dans le noyau, servant d'amorce à la polymérase virale, ce mécanisme est appelé vol de coiffe (figure 9) : La sous unité PB2 reconnaît spécifiquement le 7-méthyl-guanosine (7mG) de la coiffe (7mGpppN), cette dernière est clivée par PA, grâce à son activité endonucléasique (19). Le site de clivage est situé à une distance de 10 à 13 nucléotides en aval de l'extrémité 5' préférentiellement au niveau d'une purine (**Tiley et al., 1994**).

L'addition des nucléotides au cours de l'élongation est catalysée par la protéine PB1. L'élongation de l'ARNm s'effectue par copie de la matrice ARNv jusqu'au signal de polyadénylation en 3' qui correspond à une séquence polyU (4 à 7 résidus) située de 15 à 22 nucléotides en amont de l'extrémité 5' de l'ARNv (**Luo et al., 1991**).

Les messagers viraux nouvellement synthétisés sont exportés vers le cytoplasme nucléaires. Ils subissent des étapes de maturation analogues à celles des messagers cellulaires, sont ensuite pris en charge dans le cytoplasme par les polysomes cellulaires qui synthétisent les protéines virales. Chaque segment donne ainsi une protéine, excepté M et NS qui, par un épissage, codent deux protéines, respectivement M1 et M2, NS1 et NS2 (**Pinto et al., 1992**).

L'ARNv est aussi répliqué sous la forme d'ARN complémentaire à l'ARNv, l'ARNc, qui sert de matrice pour la synthèse d'un grand nombre de copies d'ARNv (-). Ces derniers s'associent alors aux protéines NP formant le génome des nouveaux virions (les RNPv).

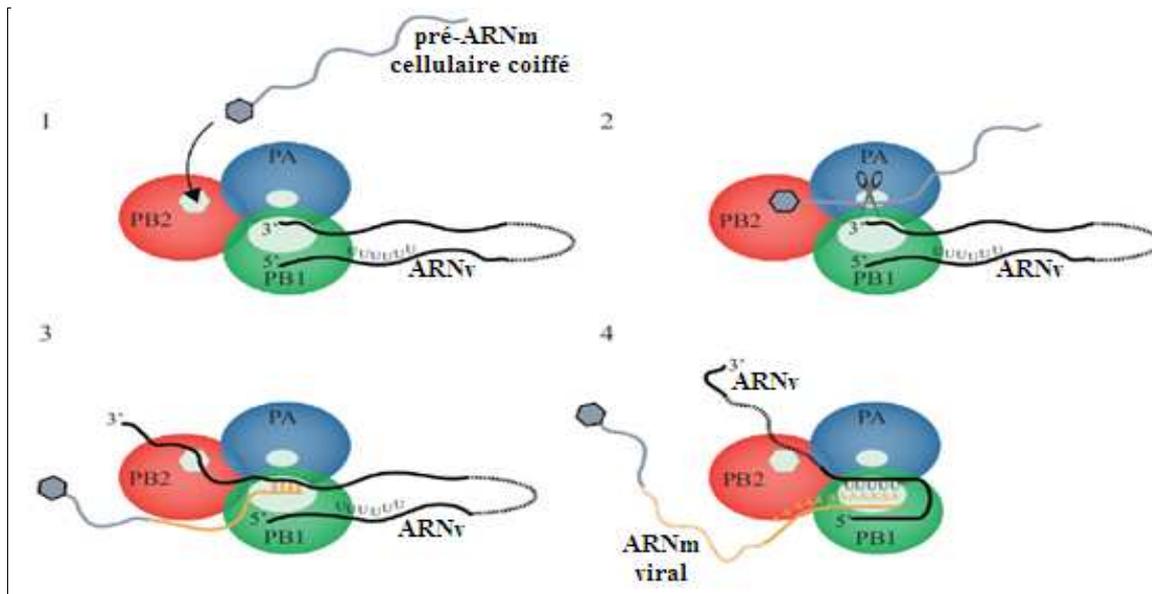


Figure 9 : La transcription coiffe-dépendante (Chenavas *et al.*, 2013).

- (1) Le pré-ARNm cellulaire est reconnu par le site de liaison à la coiffe porté par la sous-unité PB2,
- (2) puis coupé dix à 13 nucléotides après la coiffe par le site endonucléase porté par la sous-unité PA.
- (3) Le petit oligonucléotide d'ARN cellulaire coiffé sert alors d'amorce pour initier la transcription des ARNm viraux par la sous-unité PB1
- (4) Les ARNm viraux sont par la suite polyadénylés au niveau d'une séquence poly-U présente à l'extrémité 5' de l'ARNv.

I.1.3.2. Etapes tardives du cycle viral

Export nucléaire des RNP viraux dans le cytoplasme

Après la formation des RNPv dans le noyau, les protéines M1 et NS2 (aussi appelée NEP pour Nuclear Export Protein) 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, NA et M2 (Ruigrok *et al.*, 2000). M1 et NS2 sont des acteurs clés dans l'export nucléaire des RNPv nouvellement synthétisés. Une fois dans le cytoplasme, la protéine M1 inhibe le ré-import des RNPv dans le noyau en masquant les signaux de localisation nucléaire de la NP (Bui *et al.*, 1996).

Assemblage des RNPv au niveau de la membrane plasmique et bourgeonnement

Le bourgeonnement se fait au niveau de domaines bien particuliers : les radeaux lipidiques, composés principalement de glycosphingolipides et de cholestérol (Scheiffele *et al.*, 1999). Ce sont des zones de membrane plasmique cellulaire où sont assemblées les protéines de surfaces virales HA, NA et M2, et la protéine M1. HA, NA et M2 sont enchâssées dans la membrane plasmique, alors que M1 forme une couche protéique sur la face cytoplasmique de la bicouche lipidique (Ruigrok *et al.*, 2000).

M1 joue un rôle essentiel dans le bourgeonnement des virions dans le milieu extracellulaire. En effet, de par son intégration dans la membrane plasmique, elle crée une asymétrie dans la bicouche lipidique et permet l'initiation de la courbure initiant le bourgeonnement. M1 facilite

également l'exclusion des composants cellulaires et contrôle la forme et la taille des virions néosynthétisés.

Le relargage des particules virales dépend entièrement de la NA. En effet, par son activité sialidase (Figure 7), cette protéine de surface coupe les liaisons glycosidiques existant entre les résidus acides sialiques (AS) et les résidus Gal des glycoprotéines cellulaires (Deleage, 2008). Ces coupures permettent donc la libération des nouveaux virions.

Cette fonction cruciale de NA dans le cycle d'infection du virus de la grippe est la cible des antiviraux les plus utilisés actuellement dans le traitement des gripes A et B. La détermination de la structure cristalline de la NA a permis la mise au point d'inhibiteurs qui sont des analogues de l'acide sialique : l'oseltamivir (Tamiflu, Roche) et le zanamivir (Relenza, GlaxoSmithKline) (Steven *et al.*, 2010).

La figure 10 présente les différentes étapes du cycle de réplication du virus de la grippe.

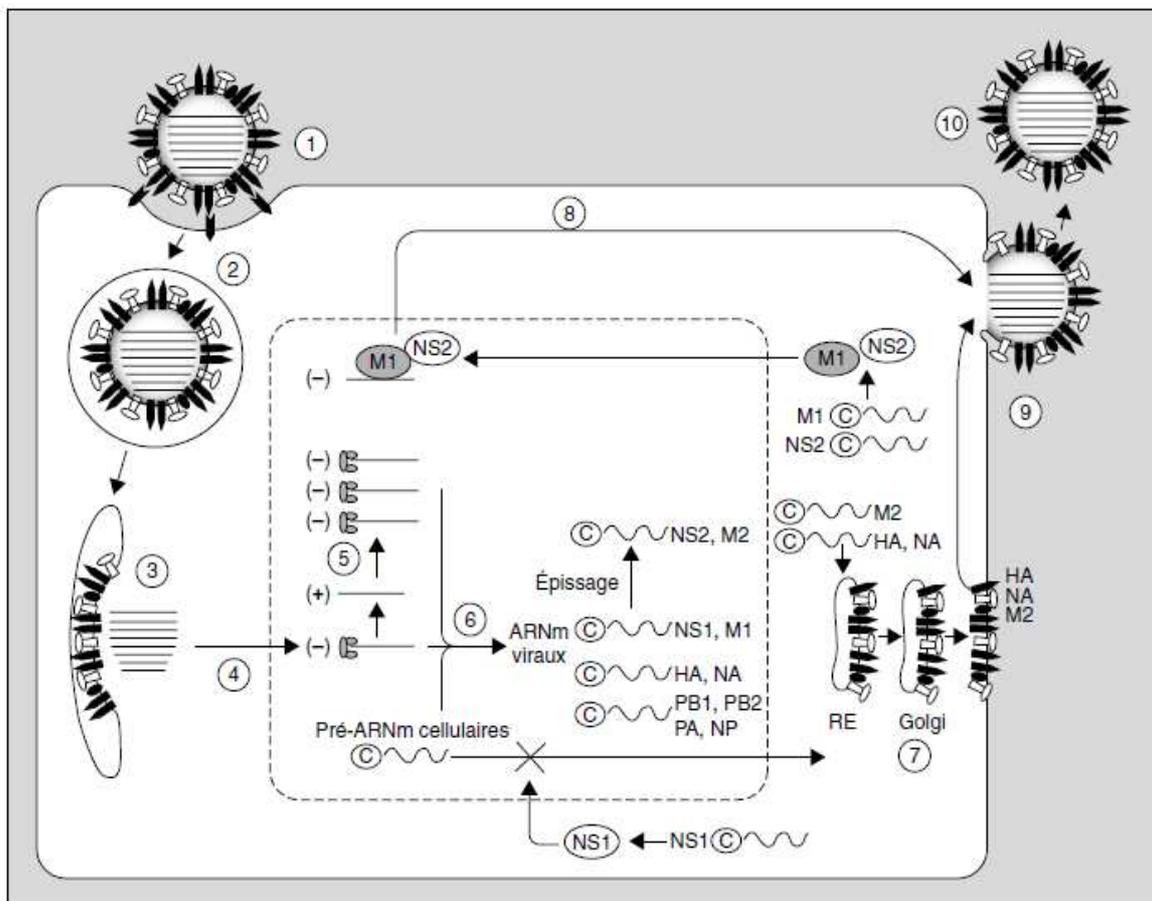


Figure 10: Cycle réplcatif du virus grippal (Naffakh *et al.*, 2006).

1) fixation de l'hémagglutinine virale sur les récepteurs cellulaires ; 2) pénétration du virus par endocytose ; 3) fusion entre membrane virale et membrane de l'endosome ; 4) translocation des RNP vers le noyau ; 5) réplication du génome viral ; 6) transcription des ARNm viraux ; 7) synthèse des protéines d'enveloppe et insertion dans la membrane plasmique ; 8) export des RNP néoformées vers le cytoplasme ; 9) assemblage et bourgeonnement des particules virales néoformées ; 10) libération des virions par action de la neuraminidase et clivage de l'hémagglutinine par action de protéases extracellulaires.

I.2. Structure, fonction et inhibition de la Neuraminidase du virus Influenza

Les propriétés antigéniques des neuraminidases des virus influenza de type A permettent de distinguer 9 espèces moléculaires notées de N1 à N9. Ces neuraminidases appartiennent à deux groupes phylogénétiques distincts : le groupe 1 comprend les neuraminidases N1, N4, N5 et N8, et le groupe 2 comprend les neuraminidases N2, N3, N6, N7 et N9 (Figure 11-a)

I.2.1. Structure cristalline de la neuraminidase

L'analyse cristallographique aux rayons X de complexes NA-acide sialique a montré que chaque monomère de l'enzyme tétramérique est composé de six feuillets bêta identiques disposés en hélice (figure 11- b). Le site actif de l'enzyme est situé au centre de chaque sous-unité, il contient des résidus d'acides aminés chargés et conservés : Arg 118, Glu 119, Asp151, Arg152, Asp198, Arg224, Glu227, Asp243, His274, Glu 276, Glu 277, Arg292, Asp330, Lys350, Arg371 et Glu425 (numérotation selon la séquence de la neuraminidase N2) (**Garman et Laver, 2005**).

L'examen des complexes NA-acide sialique a révélé en outre plusieurs interactions électrostatiques clés entre NA et son substrat (figure 11- c). Le groupement 2-OH de l'acide sialique (figure 13-b) présente de fortes interactions avec des chaînes latérales chargées positivement de trois Arginines : Arg 118, Arg 292, et en particulier, Arg 371. Le groupement N-acétyl de l'acide sialique, opposé au groupement carboxylate, interagit avec la NA par des liaisons polaires et hydrophobes. Ces deux interactions contribuent à ancrer l'acide sialique dans le site actif et pourraient jouer un rôle critique dans le succès des inhibiteurs de la NA dont la structure est analogue à celle de l'acide sialique (**Steven et al., 2010**).

Une équipe de chercheurs du National Institute for Medical Research de Londres (**Russel et al., 2006**) a analysé la structure cristalline de trois neuraminidases du groupe 1 (N1, N4 et N8) et la structure de leurs complexes avec les inhibiteurs Oseltamivir, Zanamivir, et Peramivir. Ils ont comparé les sites actifs de ces neuraminidases avec ceux des neuraminidases du groupe 2 (N2 et N9). Ces études cristallographiques ont montré (par comparaison N1/N9) que les positions des résidus du site actif sont très similaires. Cependant, il ya des différences notables entre le groupe 1 et le groupe 2 dans la conformation d'une boucle, la 150-loop (résidus 147-152), à proximité du site actif (figure 11-c). Dans le groupe 1, la position de Val-149 dans cette boucle est approximativement de 7Å éloignée de son résidu équivalent dans le groupe 2, l'Ile-149. De plus, la chaîne latérale hydrophobe du résidu 149 est dirigée vers l'extérieur du site actif dans le groupe 1, alors que dans le groupe 2, elle est plutôt orientée vers l'intérieur. Il existe également des différences significatives dans la position des résidus conservés Asp-151 et Glu-119 entre les deux groupes. La principale conséquence de ces différences est qu'il existe une grande cavité adjacente au site actif dans les NA du groupe 1, mais pas dans les NA du groupe 2. La taille et la localisation de cette cavité sont ainsi exploitées pour développer de nouveaux inhibiteurs de la neuraminidase des virus grippaux de type A (**Colman, 2009 ; Russel et al., 2006**).

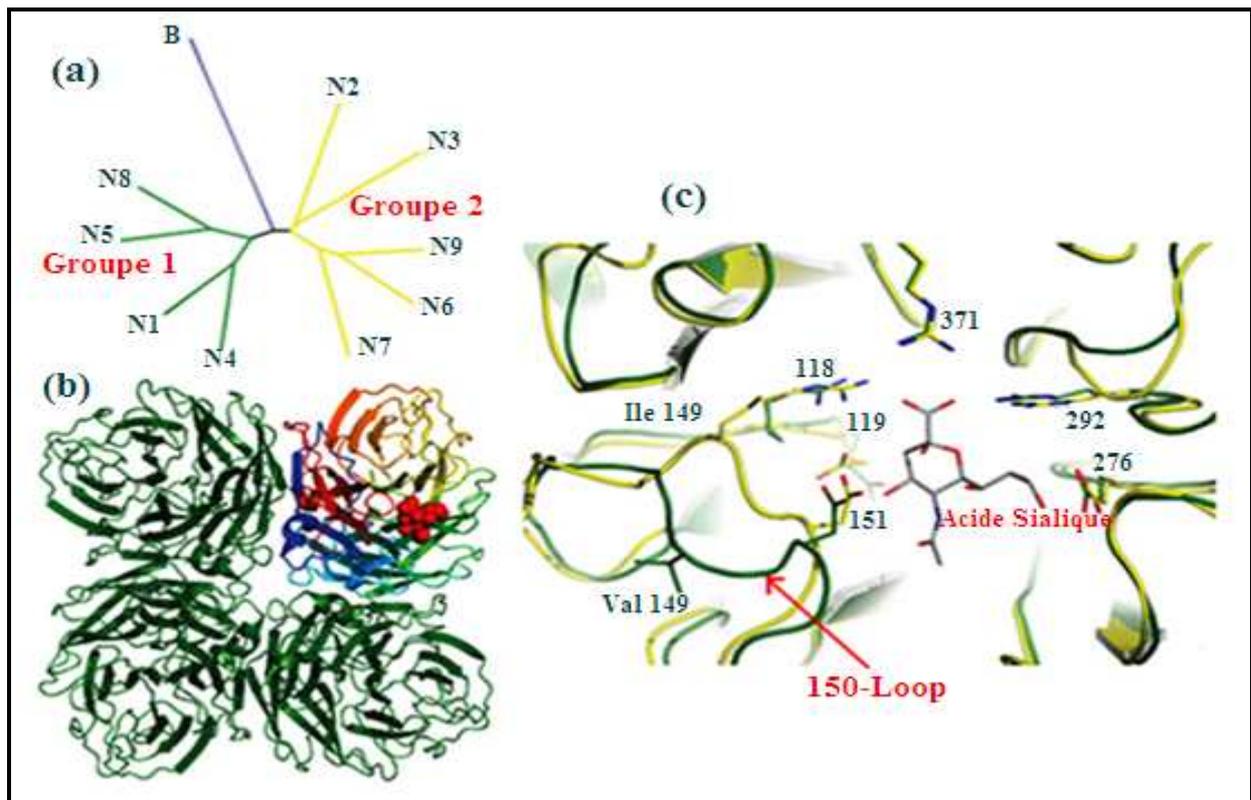


Figure 11 : Organisation phylogénétique et structure cristalline de NA (Russel *et al.*, 2006).

- a) - Arbre phylogénétique des neuf sous-types NA du virus influenza type A et une seule NA du virus type B. Les NA de l'influenza type A se divisent en deux groupes distincts.
- b) - Représentation cristallographique d'un tétramère NA. Trois de ces monomères sont de couleur verte. Le quatrième monomère (les six feuillets bêta) sont de couleurs différentes.
- c) - Superposition des sites actifs de N1 (groupe 1, vert) et N9 (groupe 2, jaune). Les chaînes latérales des principaux acides aminés du site actif ainsi que l'acide sialique sont représentés par des bâtonnets en couleurs : L'oxygène est coloré en rouge, l'azote en bleu, le carbone pour des résidus NA en jaune et le carbone de l'acide sialique en gris.

I.2.2. Fonction de la Neuraminidase du virus influenza

Le rôle de la neuraminidase dans la libération des particules virales des cellules infectées a été démontré par Palese et ses collaborateurs en 1974 (Palese *et al.*, 1974). Des images de surfaces de cellules ont été prises par microscopie électronique. Ces cellules ont été infectées avec des virus préalablement traités par la chaleur de façon à garder leur pouvoir reproductif mais altérer l'activité sialidase de leurs neuraminidases. Des cellules témoins, infectées avec des virus non traités, ont été observées parallèlement. Les images de ces dernières ont montré des particules virales bourgeonnant normalement à partir des surfaces cellulaires, envahissant d'autres cellules (figure 12-a). Cependant, les images des cellules infectées par les virus traités ont révélé des particules de virus restées attachées aux surfaces cellulaires, formant des agrégats. Les nouveaux virions ont été ainsi bloqués, ne pouvant plus infecter d'autres cellules, ce qui arrête leur multiplication (Figure 12-b). Ces expériences confirmaient alors que la fonction de la neuraminidase était bien le clivage de l'acide sialique, récepteur de la cellule hôte indispensable à la multiplication virale.

Une autre fonction de la neuraminidase est le clivage des acides sialiques contenus dans les sécrétions muqueuses des voies respiratoires, dont le rôle est d'arrêter la propagation du virus en se liant à ses hémagglutinines. Ce clivage libère le virus et lui permet ainsi d'infecter plus facilement les cellules.

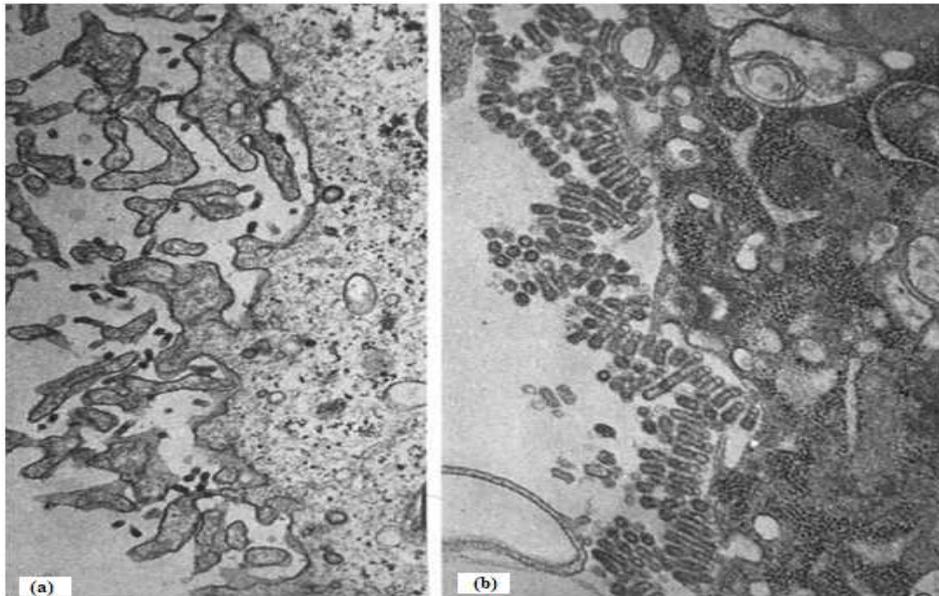


Figure 12 : Images de microscopie électronique. Surfaces de cellules MDCK infectées par des virus non traités (a) et des virus dont la neuraminidase a perdu son activité sialidase (b) (Palese *et al.*, 1974).

I.2.3. Inhibition de la neuraminidase du virus Influenza

La neuraminidase a été choisie comme cible antivirale, en raison de son rôle majeur dans la propagation des virus influenza et en raison de la conservation des résidus d'acides aminés de son site actif qui interagissent directement ou indirectement avec le substrat dans les virus influenza de type A et B (Moscona, 2005).

Les inhibiteurs de la neuraminidase (INA) utilisés actuellement pour le traitement prophylactique et curatif de la grippe sont le zanamivir et l'oseltamivir. Ce sont des analogues structuraux de l'acide sialique. Ils se fixent dans la poche catalytique de la NA et bloquent son activité sialidase en empêchant l'hydrolyse de la liaison alpha-cétosidique. Ainsi, les virions ne sont pas détachés de la cellule hôte dont ils sont issus et sont incapables d'infecter d'autres cellules. Les virus neutralisés sont exposés alors aux anticorps qui vont les éliminer (Hayden et Pavia, 2006).

En raison de sa bonne tolérance (faibles effets secondaires) comparé au zanamivir, l'oseltamivir était l'antiviral recommandé par l'OMS au cours de la pandémie de grippe A(H1N1)2009 (Ferraris *et al.*, 2010).

Oseltamivir

Cette molécule (figure 13-a) a été conçue par Chung Kim et ses collaborateurs (Kim *et al.*, 1997) sur la base de structures cristallines aux rayons X de l'acide sialique (figure 13-b) : Des études structurales de complexes neuraminidase-acide sialique ont montré

qu'il y avait une zone chargée négativement dans le site actif de la neuraminidase qui interagissait avec le carbone en position 4 de l'acide sialique (**Colman *et al.*, 1983**). Cela a conduit à suggérer que l'introduction d'un groupement chargé positivement à la position C4 devrait renforcer la liaison du substrat au site actif.

Ils ont remarqué aussi la présence d'une grande poche hydrophobe dans une région du site actif de l'enzyme qui logeait la chaîne latérale de glycérol de l'acide sialique. Cette poche a été exploitée dans la synthèse d'une molécule carbocyclique, l'oseltamivir, dont le groupement CHOH à la position C7 a été remplacé par un atome d'oxygène. Aussi, des chaînes latérales lipophiles, ont été greffées à cette position, afin de créer une molécule ayant des groupements hydrophobes qui interagiraient bien avec les acides aminés Glu 276, Ala 246, Arg 224 et Ile 222 du site actif de la neuraminidase (figure 14). Cette molécule n'est pas un sucre et ne porte pas de molécule d'oxygène au niveau de sa structure cyclique (**Garman et Laver, 2005**).

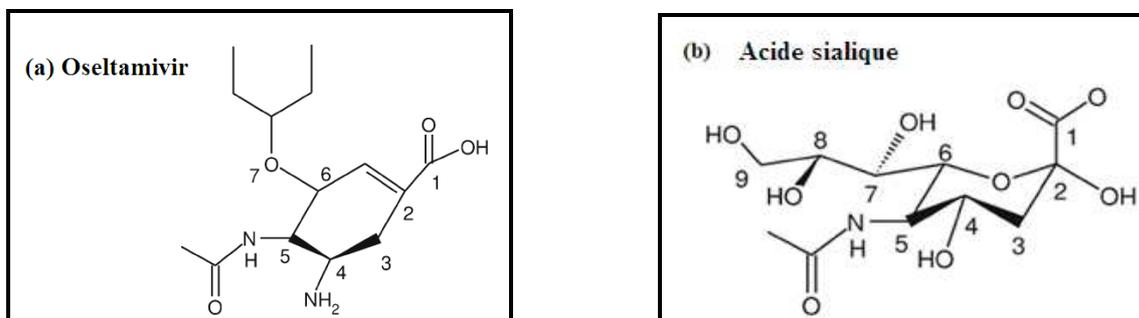


Figure 13 : Structures chimiques de l'Oseltamivir (a) et de l'Acide sialique (b) (**Garman et Laver, 2005**)

Formules brutes : Oseltamivir = $C_{16}H_{28}N_2O_4$ - Acide sialique = $C_{11}H_{19}NO_9$

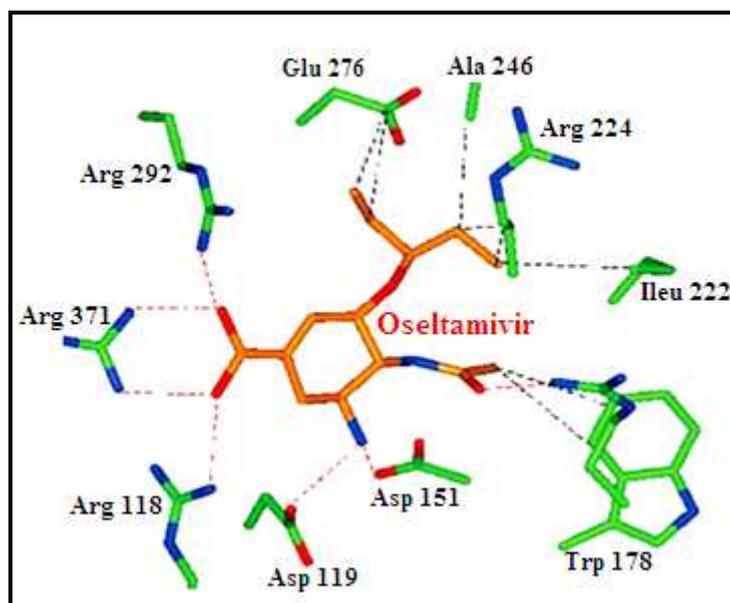


Figure 14 : Structure cristalline de l'oseltamivir lié au site actif de la neuraminidase du virus grippal (sous-type N9). Les pointillés rouges indiquent les interactions polaires, les pointillés noirs indiquent les contacts hydrophobes (**Chen, 2006**).

Résistance aux inhibiteurs de la neuraminidase

Les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de la neuraminidase reposent essentiellement sur des mutations du gène de la neuraminidase touchant des acides aminés structuraux ou catalytiques (Marmier *et al.*, 2010).

Lorsque les acides aminés catalytiques sont mutés, le site actif de la neuraminidase est modifié entraînant une diminution de l'activité enzymatique. Les mutations les plus fréquemment retrouvées (in vivo et in vitro) en fonction des différents types et sous-types de neuraminidase sont : R292K, D151E, R152K, R371K, R118K, R224K, E176D. Seules les mutations R292K et R152K ont été retrouvées dans des prélèvements humains. La mutation R152K confère une résistance croisée à l'oseltamivir et au zanamivir (Ferraris et Lina, 2008).

Les mutations sur les acides aminés structuraux entraînent une diminution de l'affinité du substrat pour son site actif, conduisant à une diminution de la sensibilité aux inhibiteurs de neuraminidase. En fonction du type grippal et du sous-type de neuraminidase, différentes mutations ont été retrouvées : E119V, D198N, H275Y et N294S (tableau II) (Ferraris et Lina, 2008 ; Okomo-Adhiambo *et al.*, 2010 ; Yen *et al.*, 2006).

Tableau II : Mutations des acides aminés catalytiques et structuraux et spécificité des antiviraux (Marmier *et al.*, 2010).

Mutations	Types et/ou sous-type	Efficacité	
		Oseltamivir	Zanamivir
Acides aminés catalytiques			
R292K	A/N2	R	NT
R152K	B	R	R
Acides aminés structuraux			
E119V	A/N2	R	S
D198N	B	R	R
H275Y	A/N1	R	S
N294S	A/N2 – A/N1	Faible R	NT

R : Résistant
S : Sensible

NT : non testé

Acides aminés : R(Arg), K(Lys), E(Glu), V(Val), D(Asp), N(Asn), H(His), Y(Tyr), S(Ser)

La principale mutation observée sur les neuraminidases de sous-type N1 après traitement à l'oseltamivir est la H275Y (H274Y en numérotation N2). Il s'agit d'un changement d'un résidu conservé au niveau du site actif de la neuraminidase, l'Histidine (H) en position 275, par une Tyrosine (Y).

Cette mutation est spécifique du sous-type N1 et est présente dans un nombre important de virus A/H1N1 isolés chez l'homme. Elle est la conséquence d'une substitution d'une Cytosine par une Thymine (mutation ponctuelle C→T) à la position 823 du segment NA du génome viral (Collins *et al.*, 2008).

L'analyse de structure de la neuraminidase N1 portant la mutation H275Y et en complexe avec l'oseltamivir, a révélé que la présence de cette mutation provoquait un changement de conformation d'un résidu clé du site actif, le glutamate à la position 276 (Glu276). Ce résidu se déplace de 2.0 Å (figure 15) et perturbe les liaisons hydrophobes entre les chaînes latérales lipophiles de la molécule d'oseltamivir et le Glu276, diminuant ainsi l'affinité de cet inhibiteur pour le site actif de l'enzyme (Hay *et al.*, 2008).

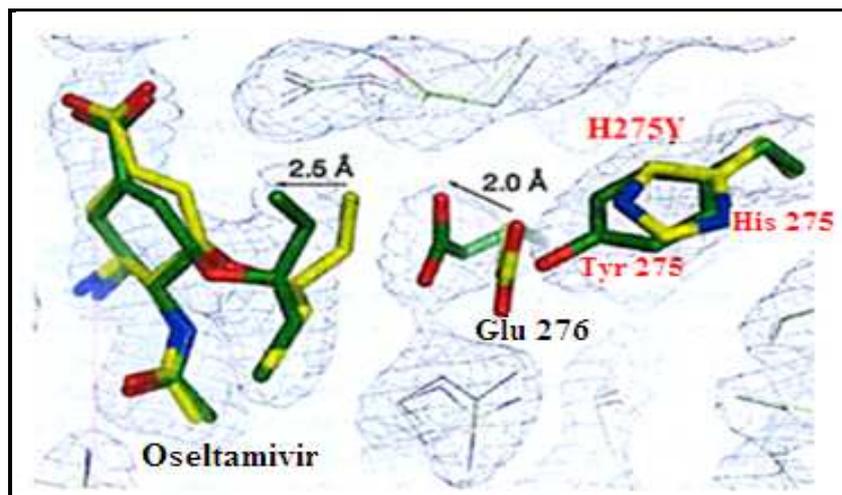


Figure 15 : Structure de la neuraminidase N1 portant la mutation H275Y en complexe avec l'oseltamivir. La substitution d'une Histidine par une Tyrosine en position 275 (H275Y) pousse le groupement carboxyle du Glu276 de 2.0 Å vers l'intérieur du site actif. Cette nouvelle orientation provoque un déplacement de 2.5 Å d'une chaîne latérale lipophile de l'oseltamivir par rapport à sa position initiale de liaison lorsque la N1 n'est pas mutée (Collins *et al.*, 2008).

I.3. Epidémiologie de la grippe

I.3.1. Pathologie

Le virus grippal est excrété par les voies respiratoires et rejeté dans l'air ambiant sous formes de particules au moment des épisodes de toux ou d'éternuements des sujets infectés, libérant des taux élevés de virus surtout en début d'infection.

La transmission se fait essentiellement via les gouttelettes, expulsées, mais elle peut également se faire par contact direct avec la salive, les sécrétions nasales du sujet infecté ou par contact indirect, c'est-à-dire par l'intermédiaire de surfaces ou d'objets contaminés.

Le virus peut survivre 24h sur des surfaces dures, non poreuses, 5 minutes sur les mains et 15 minutes sur les vêtements ou tissus. Le virus survit plus longtemps dans l'air lorsque le taux d'humidité est bas et que les températures sont faibles (**Lowen et al., 2007**).

Lors des épidémies habituelles, les patients atteints de grippe développent en général des symptômes non-spécifiques comme la fièvre, la toux, des céphalées, des myalgies, et se rétablissent complètement en une à deux semaines. Des complications peuvent cependant survenir chez des personnes âgées ou déjà atteintes de maladies respiratoires ou cardiovasculaires, les enfants en bas âge, les immunodéprimés. Les décès observés alors ne sont pas directement dus au virus de la grippe lui-même mais à d'autres agents pathogènes (viraux ou bactériens) secondaires à l'infection grippale : l'épithélium respiratoire mis à mal par le développement du virus de la grippe devient une porte d'entrée pour les autres pathogènes.

I.3.2. Réservoir :

Le caractère segmenté du génome du virus grippal de type A (8 segments d'ARN) et l'infidélité de son ARN polymérase sont à l'origine des phénomènes de réassortiments et de mutations qui ont permis au virus de franchir la barrière d'espèce, entraînant des pandémies chez l'homme.

Les espèces sensibles au virus type A sont les mammifères terrestres (homme, porc, cheval, vison), les mammifères marins (dauphins, baleines phoques, requins) et l'espèce aviaire (notamment les oiseaux sauvages aquatiques) qui représente le grand réservoir du virus et de sa diversité génétique (**Munier et al., 2010**).

Chez les oiseaux sauvages, le virus de la grippe est rarement pathogène. L'infection se fait par voie orale, le virus se réplique dans le tube digestif et est excrété en grande quantité dans les selles. Le virus est ainsi transmis à d'autres espèces aviaires, en particulier aux volailles, aux mammifères aquatiques, et aux mammifères terrestres.

Différents virus d'origine aviaire ont déjà été responsables de pathologies chez l'homme comme H7N7, H9N2 et H5N1 mais il n'y a que quelques souches de virus grippaux qui se sont bien établies chez les mammifères comme H1N1, H2N2 et H3N2 chez l'homme (**Amiel, 2010**).

Si les oiseaux constituent le grand réservoir de la diversité génétique des virus de la grippe, le porc est un acteur important dans le franchissement de la barrière d'espèce et donc dans la genèse des pandémies, du fait de la présence au niveau de l'épithélium respiratoire des deux types de récepteurs (Acides sialiques en branchement $\alpha 2-3$ et $\alpha 2-6$) qui favorisent les co-infections et donc les phénomènes de réassortiments (**Vincent et al., 2012**).

I.3.3. Causes des épidémies et pandémies

Plusieurs facteurs sont à mettre en cause quant à la variabilité génétique des virus influenza mais la cause principale réside dans le fait que ces virus présentent un génome segmenté.

En fonction de cette variabilité, le virus de la grippe peut se manifester sous trois modes (**Bouscambert-Duchamp, 2010**) :

- sporadique, touchant un petit nombre de cas séparés les uns des autres
- épidémique, lié à des variations antigéniques de type glissement
- pandémique, lié à une cassure responsable d'une modification antigénique brutale et radicale.

Le glissement ou dérive antigénique (« Drift »)

C'est un phénomène classique d'accumulation de mutations ponctuelles sur les segments codant l'HA et la NA. Cela est dû à la faible fidélité et l'absence d'activité correctrice de l'ARN polymérase ARN-dépendante du virus influenza. Il en résulte un nouveau variant antigénique viral remplaçant la souche initiale.

Les sujets infectés par un virus ancien conservent le plus souvent une immunité partielle face à ce nouveau virus. Néanmoins, l'accumulation de mutations au fil du temps entraîne un changement radical des glycoprotéines de surface du virus, permettant au virus d'échapper à l'immunité établie vis-à-vis des virus précédents. Les nouveaux variants s'éloignent progressivement de leur souche d'origine.

La dérive antigénique est responsable des épidémies hivernales. Elle est la cause de la réactualisation annuelle des souches vaccinales et donc de la vaccination.

La cassure antigénique (« shift »)

Ce phénomène concerne uniquement les virus influenza de type A. Il s'agit de l'émergence d'un nouveau sous-type viral, contre lequel la population n'est pas immunisée.

Le caractère segmenté du génome viral permet, lors de co-infection par deux virus différents, des réassortiments génétiques, c'est-à-dire l'encapsidation d'un mélange de segments d'ARN issus de l'un et l'autre de deux virus parentaux, générant un virus nouveau dont le génome est hybride. Ce mécanisme, appelé également cassure antigénique, permet l'échange de segments qui codent pour les protéines dites internes mais aussi des segments codant pour les deux glycoprotéines HA et NA de surface aboutissant, pour les virus de l'influenza A, à des formules antigéniques variées HxNy. Ce phénomène est particulièrement important pour l'évolution des virus influenza humains, dans la mesure où il peut conduire au remplacement complet de protéines de surface telles que l'HA et/ou la NA par des protéines d'un type moléculaire différent. C'est ce mécanisme qui est à l'origine de l'émergence chez l'homme de nouveaux sous-types de virus pandémiques (**Abt et al., 2011**).

I.3.4. La grippe A(H1N1)2009

Le virus A(H1N1)2009, nommé A(H1N1)/Californie/04/09, est né de la recombinaison de trois virus qui circulaient chez le porc mais n'étaient pas pathogènes pour l'homme (**Zimmer et Burke, 2009**) :

- la souche H1N1 dite « classical swine », circulant chez le porc aux Etats-Unis depuis 1918,
- la souche dite « triple réassortant » H3N2 circulant aux Etats-Unis, apparue suite à la recombinaison de trois virus grippaux (réassortiment entre le virus grippal humain H3N2, le virus grippal aviaire nord américain et le virus grippal porcine classique),
- la souche « eurasian swine » H1N1 circulant sur le continent eurasiatique analogue à un virus aviaire.

La nouvelle souche pandémique A(H1N1)2009 a finalement hérité des gènes PB1, PB2 et PA du virus triple réassortant nord-américain, des gènes HA, NP et NS issus du virus porcine dit classique et des gènes NA et M des virus porcins européens (**Peiris *et al.*, 2009**).

La figure 16 représente le réassortiment du nouveau virus grippal A(H1N1)2009.

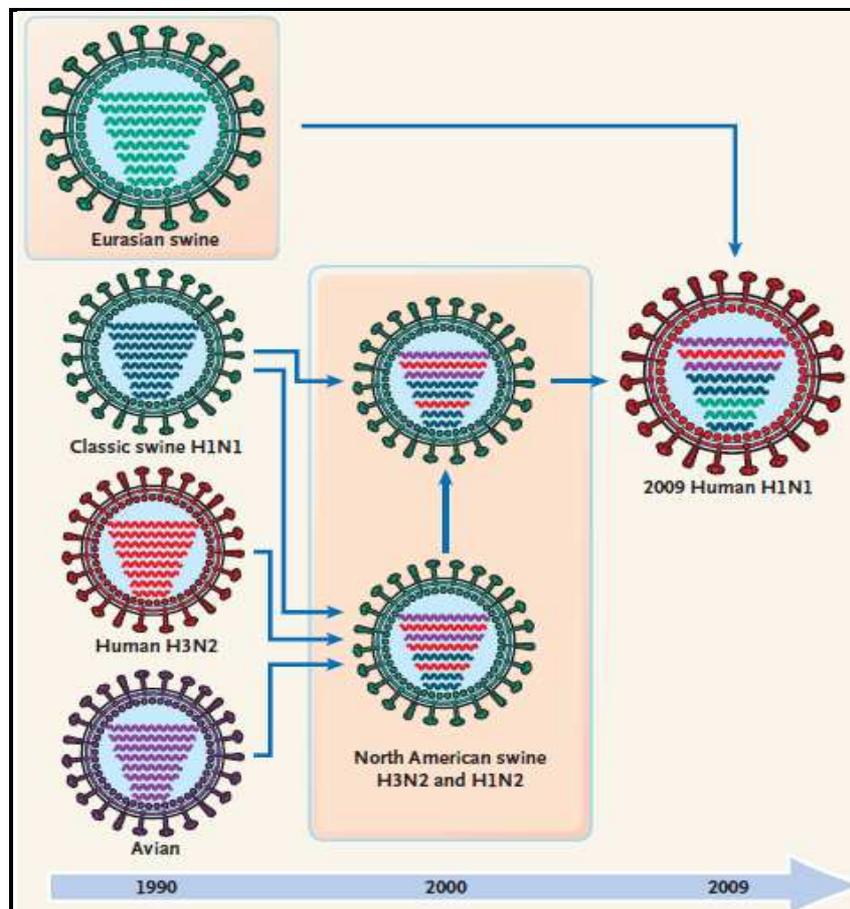


Figure 16: Schéma du réassortiment génétique du nouveau virus A(H1N1)2009 (**Trifonov V *et al.*, 2009**)

I.4. Diagnostic de la grippe

I.4.1. Diagnostic clinique

La symptomatologie de l'infection grippale est non spécifique, et il est donc impossible de faire un diagnostic de certitude de la grippe avec des arguments cliniques seuls. Sur le plan

clinique, il est possible de différencier les formes simples, les formes compliquées (en général associées à une surinfection), et les formes graves.

Grippe simple

C'est la forme la plus fréquente. Les patients ont de la fièvre, parfois élevée, des signes respiratoires (toux, éternuements, rhinorrhée modérée claire, pharyngite ou rhino-pharyngite) et des signes généraux (céphalées, myalgies, arthralgies, douleurs abdominales). La durée des symptômes est habituellement comprise entre 5 et 7 jours (**Vabret *et al.*, 2010**).

Grippe compliquée

Les complications sont liées soit au terrain sous jacent, soit au virus, soit aux surinfections bactériennes. Elle est observée dans toutes les tranches d'âge mais sont plus fréquentes chez la personne âgée.

Les lésions provoquées par le virus influenza favorisent la prolifération bactérienne au niveau du tractus trachéo-bronchique, notamment par *Hæmophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*. Ces surinfections sont favorisées par l'existence de lésions sous-jacentes. Cela implique que la grippe est une maladie potentiellement grave chez certains sujets. Ainsi, les personnes de plus de 65 ans et les patients présentant une insuffisance respiratoire, une insuffisance cardiaque, un diabète insulino-dépendant ont une mortalité et une morbidité liées à l'infection grippale supérieures à la moyenne (**Epelboin et Macey, 2009**).

Grippe grave

Autrefois appelée grippe maligne, la grippe grave est rare. Elle survient surtout lors de pandémies, c'est-à-dire lors d'une cassure antigénique, l'infection se propageant alors dans une population dite « non exposée ». Cliniquement, après un début de grippe d'apparence banale, un état de défaillance respiratoire aiguë s'installe, avec dyspnée, polypnée, cyanose, hypoxie (**Potter, 2000**). Le sérotype A est le plus souvent en cause. Le tableau évolue souvent fatalement (**Duffau et Moiton, 2006**).

I.4.2. Diagnostic biologique

Le diagnostic biologique de la grippe repose exclusivement sur le diagnostic virologique. Il permet aussi l'identification des virus circulants. Le diagnostic rapide permet la mise en place d'un traitement spécifique.

Prélèvement

La mise en évidence du virus influenza se fait dans l'ensemble des prélèvements respiratoires. Ces prélèvements doivent être collectés dans les deux premiers jours de la maladie pour augmenter les chances d'obtenir un résultat positif. Le site primaire de réplication du virus de la grippe étant l'épithélium cilié des voies aériennes supérieures, la muqueuse nasale, facile d'accès, doit systématiquement être prélevée lors d'une suspicion d'infection grippale. L'écouvillonnage nasal est réalisé avec des écouvillons spécifiques aux analyses virologiques (Annexe 1). L'objectif du prélèvement est de collecter des cellules de l'épithélium respiratoire infectées par le virus influenza. Le prélèvement doit être acheminé

rapidement au laboratoire dans un milieu de transport pour éviter que les virus ne soient inactivés (Huraux *et al.*, 2003).

Méthodes de diagnostic

▪ Isolement des virus grippaux sur cellules en culture

Historiquement, la culture des virus influenza était réalisée sur des œufs embryonnés de poule, elle est maintenant réalisée sur des lignées cellulaires adaptées, comme les cellules de rein de chien MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) (figure 17-a).

La culture cellulaire est la technique de diagnostic de référence pour la grippe. Elle consiste à inoculer les prélèvements respiratoires sur une nappe cellulaire (Annexe 2). La présence du virus induit des modifications morphologiques caractéristiques appelées Effet Cytopathogène (ECP), visibles au microscope photonique : arrondissement ou rétraction des cellules, foyers de lyse (figure 17-b).

La culture demande au moins 4 jours. C'est la seule technique qui permet de caractériser avec précision un virus. L'isolement sur œuf de poule embryonné reste la technique de référence pour la culture des virus de la grippe pour l'OMS. C'est sur ce système que sont cultivés les virus destinés à la composition des vaccins.

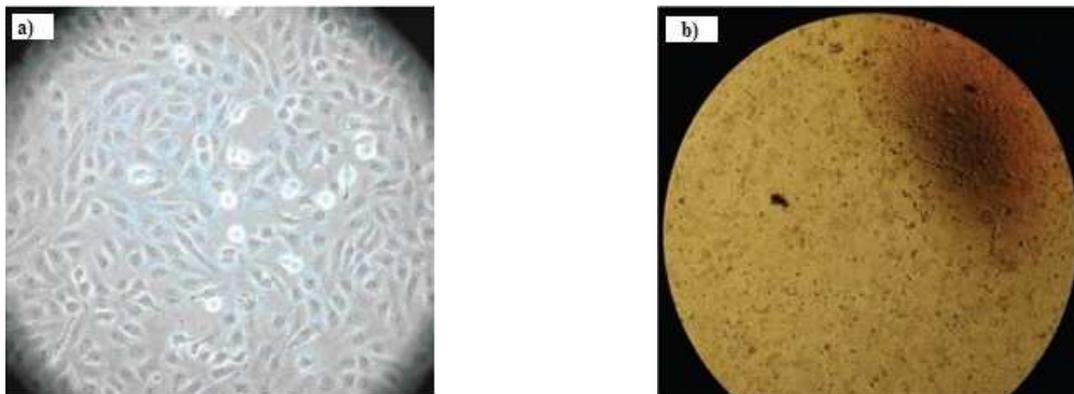


Figure 17 : La culture cellulaire. Nappe de cellules MDCK (WHO Global Influenza Surveillance Network, 2011)

a)- Cellules MDCK non infectée

b)- Effet cytopathique typique d'une infection par le virus influenza sur cellules MDCK

▪ Détection directe des antigènes viraux

Les virus influenza sont riches en constituants protéiques ou glycoprotéiques pouvant faire l'objet d'une reconnaissance immunitaire par les anticorps spécifiques. Ces anticorps constituent des outils diagnostiques précieux.

La technique la plus utilisée pour la détection directe des antigènes viraux est l'immunofluorescence (Annexe 3). Cette technique consiste à détecter la présence d'antigènes viraux dans les prélèvements à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques de ces antigènes liés à la fluorescéine. L'avantage majeur de l'immunofluorescence par rapport à la culture

cellulaire est qu'elle se pratique sur un prélèvement dans lequel les virus sont inactivés, il y a donc moins de contrainte dans les délais d'acheminement au laboratoire.

- **Titration et Identification des virus grippaux par les tests d'Hémagglutination et d'Inhibition de l'Hémagglutination (IHA)**

Le virus grippal possède la propriété d'agglutiner les hématies de différentes espèces animales de façon quantitative et visible macroscopiquement. L'agglutination est due à l'attachement des molécules d'hémagglutinine par leur site récepteur aux acides sialiques des hématies qui sont portées par les glycoprotéines et les gangliosides. L'hémagglutinine est un antigène de surface de la particule virale et l'évaluation de sa quantité (titrage) permet d'apprécier celle du virus grippal dans une suspension.

L'hémagglutination du virus grippal peut être inhibée par des anticorps spécifiques de la souche virale. Lorsque ces anticorps se lient spécifiquement aux sites antigéniques de la protéine, ils bloquent la liaison du virus aux globules rouges (**WHO Global Influenza Surveillance Network, 2011**) : c'est le principe du test IHA (Annexe 4). Ce test permet la détermination du type et sous-type du virus en cause.

- **Amplification génique**

L'amplification génique est une technique efficace d'identification des génomes du virus grippal. Elle permet de discriminer les virus selon leur type (A, B ou C) et pour les virus de type A, selon leur sous-type.

Le génome du virus influenza est constitué d'un ARN monocaténaire. L'amplification de cet ARN se fait par « Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction » (RT-PCR) : Un ADN complémentaire (ADNc) doit être en premier lieu synthétisé à l'aide d'une polymérase, la transcriptase inverse, puis amplifié. La présence de produits de PCR est visualisée sur un gel d'agarose ou de polyacrylamide. La RT-PCR s'avère aussi sensible que l'isolement en culture (**Huraux *et al.*, 2003**).

Récemment, une nouvelle technologie, la PCR en temps réel, a révolutionné le diagnostic virologique de la grippe. Cette technique rapide et bénéficiant d'une forte sensibilité en fait la méthode de référence en situation épidémique ou pandémique (**Leruez-Ville, 2006**).

La technique de PCR en temps réel appliquée au virus influenza consiste à réaliser une RT-PCR en une seule étape en utilisant dans le milieu réactionnel à la fois des amorces permettant l'amplification mais aussi une sonde permettant la détection des produits de PCR au fur et à mesure de leur apparition. La sonde est marquée par un fluorochrome et une émission de fluorescence a lieu lorsque la sonde s'hybride avec l'ADN cible présent dans l'échantillon. L'émission de fluorescence est détectée à chaque cycle de PCR par l'appareil de PCR en temps réel.

Pour déterminer la positivité d'une PCR et/ou quantifier un échantillon par PCR en temps réel, on détermine le nombre de cycles à partir duquel le produit PCR est détectable. Le moment d'apparition de ce signal seuil dénommé cycle seuil ou Ct (Cycle threshold) est dépendant de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon amplifié. Le Ct

calculé est inversement proportionnel au logarithme décimal du nombre de copies initiales. Il apparaît toujours au cours de la phase exponentielle de la PCR.

Le résultat d'une PCR en temps réel est représenté graphiquement sous forme de courbes sigmoïdes (Figures 18-a et 18-b).

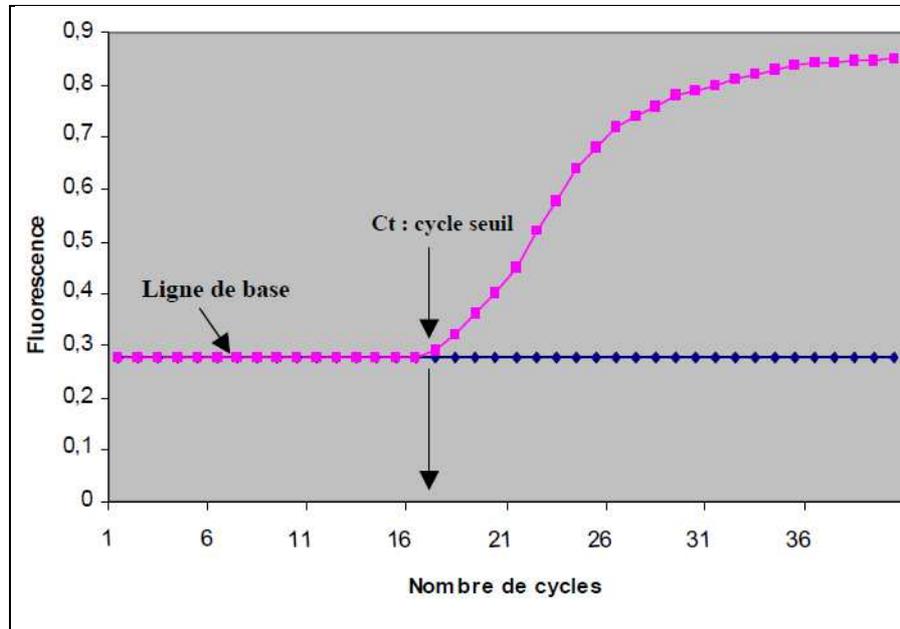


Figure 18-a : Modèle graphique de la PCR en temps réel. L'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles. L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration d'amplicons, le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base (**Poitras et Houde, 2002**).

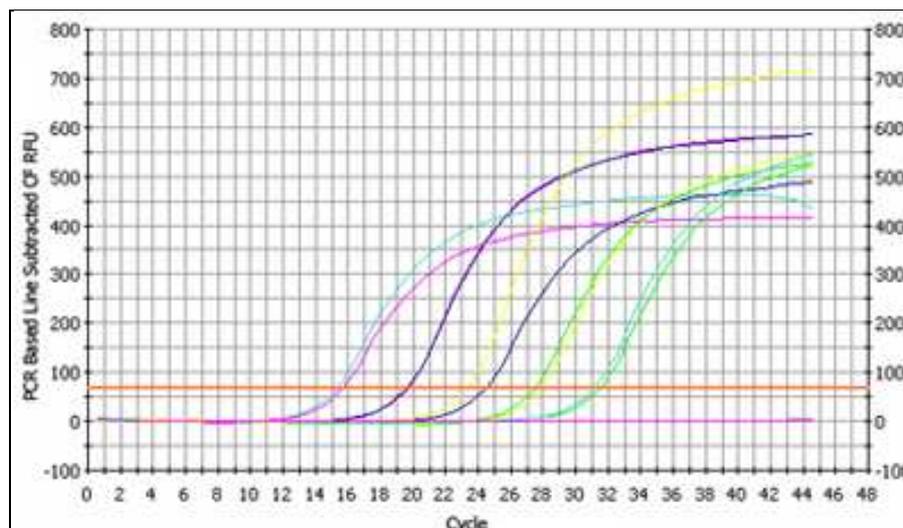


Figure 18-b : PCR en temps réel. Mesure de la fluorescence des échantillons. Chaque courbe correspond à un échantillon. Le signal seuil calculé automatiquement est matérialisé sur le graphe par une ligne horizontale (**Poitras et Houde, 2002**)

La courbe de fusion permet de vérifier qu'il n'y a qu'un seul produit de PCR amplifié. Elle est réalisée en soumettant les produits PCR (amplicons) à une température progressant de 55°C à 95°C et en mesurant l'intensité de fluorescence en continu. Elle correspond à la variation de la fluorescence en fonction de la température (Figure 19).

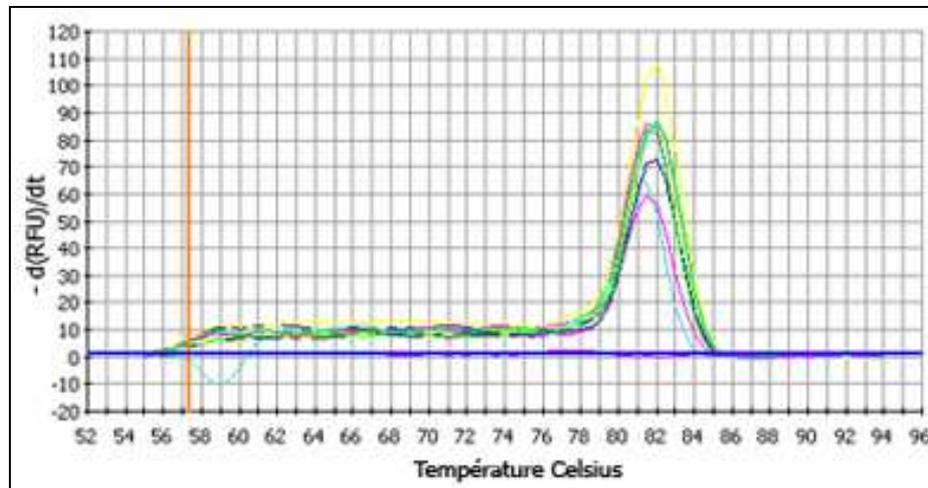


Figure 19 : Température de fusion des amplicons (T_m) représentée par un pic. Dans l'exemple ci-dessus, tous les échantillons ont un T_m d'environ 81,5°C (Poitras et Houde, 2002).

- **Identification de la résistance du virus de la grippe aux antiviraux**

Pour déterminer les mutations de résistance, on réalise des tests phénotypiques et génotypiques (Okomo-Adhiambo *et al.*, 2012) :

- **Tests phénotypiques**

La détection de la résistance repose sur la détermination des valeurs d'IC50 (concentration minimale d'antiviral inhibant 50 % de la réplication virale). Le substrat, analogue de l'acide sialique, est incubé en présence du virus grippal avec des concentrations croissantes d'inhibiteur de neuraminidase. Après clivage du substrat, on observe une augmentation de la fluorescence ou de la chimiluminescence (selon la technique de détection utilisée). Le signal est proportionnel à l'activité enzymatique de la neuraminidase. Plus l'IC50 est faible, plus la souche est sensible à la molécule testée. Cette technique phénotypique peut être confirmée par la détection de mutations à l'aide de méthodes génotypiques.

Rappel : Le seuil 50% est un seuil standard international utilisé dans la recherche pharmacologique pour évaluer l'efficacité d'inhibition d'un composé à fonction biologique ou biochimique (exemple : inhibition d'une enzyme ou d'un récepteur cellulaire) (Food and Drug Administration, 2006).

- **Tests génotypiques**

Les mutations ponctuelles affectent un seul nucléotide et sont appelées SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Elles peuvent être silencieuses, engendrer des mutations non-sens ou modifier la séquence primaire d'une protéine. C'est le cas de la mutation H275Y de la neuraminidase du virus grippal A(H1N1) responsable de la résistance à l'oseltamivir.

L'identification des mutations se fait par séquençage. La technique la plus utilisée est celle de Sanger : Elle repose sur l'utilisation d'un mélange d'amorces spécifiques, de désoxynucléotides en large excès et de didésoxynucléotides couplés à des fluorophores. Ces ddNTP sont des nucléotides modifiés, ayant perdu le groupement hydroxyl en 3' du ribose, permettant l'élongation de la molécule d'ADN de 5' vers 3' par l'ADN polymérase. Ces ddNTP se comportent comme des terminateurs de chaînes stoppant l'élongation. On obtient alors au cours de la réaction de séquence des fragments de toutes les tailles possibles. Ces fragments sont soumis à migration dans un champ électrique. Il s'agit le plus souvent d'une électrophorèse capillaire. Chaque ddNTP étant marqué par un fluorophore différent, un signal lumineux sera généré, spécifique de la base didéoxy incorporée. Les fragments étant de taille différente et la résolution allant jusqu'à une base de différence, il sera simple de recueillir ce signal et en déduire la séquence (**Lamoril *et al.*, 2008**).

La technique de séquençage est la technique de référence pour l'identification des mutations de résistance (**WHO Global Influenza Surveillance Network, 2011**). Une fois identifiées et répertoriées, les mutations d'intérêt peuvent être mises en évidence directement par d'autres techniques génotypique plus rapides basées sur la RT-PCR en temps réel utilisant des sondes spécifiques de séquences pour la détection des SNP (**Suzuki *et al.*, 2011**), comme la technique utilisée pour la réalisation de ce travail qui sera détaillée dans le chapitre matériel et méthodes.

I.5. Traitement et prévention de la grippe : antiviraux et vaccination

La vaccination reste encore et incontestablement en première ligne dans la lutte contre la grippe, mais n'offre pas de protection complète. Les médicaments antiviraux peuvent combler certaines carences de la vaccination et constituent par conséquent un complément intéressant. Ils ne peuvent en aucun cas remplacer la vaccination annuelle des groupes à risque (**Bouscambert-Duchamp, 2010**).

Il y a actuellement dans notre pays deux médicaments antiviraux disponibles dans la lutte contre la grippe. Il s'agit de deux inhibiteurs de neuraminidase, l'oseltamivir et le zanamivir, actifs contre les virus de l'influenza A et B. Seul l'Oseltamivir est enregistré pour un usage prophylactique. Le zanamivir est administré dans le cas d'une résistance à l'oseltamivir.

I.5.1. Efficacité des inhibiteurs de neuraminidase

La réplication du virus de la grippe atteint son point ultime entre 24 à 72 heures après l'apparition des premiers symptômes. Cela signifie que les inhibiteurs de neuraminidase doivent être pris le plus tôt possible. Plus ce médicament est pris rapidement après l'infection, plus l'effet attendu est important. La diminution des symptômes et de la fièvre est observable dans les 24 à 48 heures (**Ferraris *et al.*, 2010**).

Les inhibiteurs de neuraminidase peuvent être envisagés lors de symptômes grippaux évocateurs observés durant une épidémie chez les patients qui courraient un risque grave pour leur santé s'ils devaient contracter une forte grippe, et pour qui l'on craint une réaction insuffisante au vaccin contre la grippe (par exemple les personnes âgées et les personnes immunodéprimées). Ces antiviraux peuvent en outre être conseillés aux patients à risque vaccinés présentant des symptômes de grippe, lorsqu'une discordance importante est

démontrée entre les souches vaccinales et le virus circulant, comme lors de la pandémie de grippe A(H1N1)2009.

Les inhibiteurs de neuraminidase ne sont pas indiqués pour les jeunes et adultes sains ne courant pas de risques essentiels lors d'une infection grippale. L'usage non contrôlé et la prescription préventive à des personnes qui n'appartiennent pas aux groupes à risque peut conduire à l'ineffectivité (par développement de résistance) (**Bouscambert-Duchamp, 2010**).

I.5.2. Oseltamivir dans le traitement de la grippe

Plusieurs études confirment l'efficacité de l'oseltamivir dans la prévention de la grippe. La précocité d'administration de cet antiviral paraît être le déterminant le plus important de l'efficacité du traitement (**Hayden *et al.*, 1999 ; Hayden *et al.*, 2000**).

L'oseltamivir est pris oralement sous la forme de capsules (pour adultes) ou de sirop (pour enfants), pour une durée de 5 jours. Après sa transformation dans le foie en forme active (carboxylate d'oseltamivir), de hautes concentrations sériques d'une demi-vie de 6 à 10 heures sont atteintes et permettent de contrôler la diffusion du virus. Sa tolérance est bonne, ses principaux effets secondaires sont gastro-intestinaux (nausées et vomissements) (**Huraux *et al.*, 2003**). Sa posologie doit être adaptée à la fonction rénale et hépatique.

Chez les patients immunodéprimés, en particulier chez les greffés de moelle osseuse, une excrétion virale prolongée, observée avec les virus saisonniers (**Khanna *et al.*, 2009**), peut justifier une durée de traitement par oseltamivir supérieure aux cinq jours habituellement préconisés. Cette donnée motive également un suivi ciblé de l'émergence de résistances ; 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 H275Y et/ou un test phénotypique (détermination de l'IC50), 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 (**Kumar *et al.*, 2009**).

I.5.3. Prévention de la grippe par la vaccination

La vaccination antigrippale est la méthode la plus efficace pour prévenir la grippe et ses complications. Elle cible en priorité les personnes à risque d'une grippe sévère les professionnels de santé en contact avec ces personnes. L'objectif est de conférer une protection individuelle directe ainsi qu'une protection collective indirecte (diminuer la transmission en particulier vers les sujets fragiles) (**Lagathu et Colimon, 2010**).

Les vaccins utilisés contre la grippe sont préparés à partir de virus grippaux cultivés sur œufs de poules embryonnés, purifiés, inactivés. Ce sont des vaccins trivalents comportant, chaque année, deux souches de virus A [A(H1N1) et A(H3N2)] et une souche de virus B. Les souches sont choisies en fonction des données épidémiologiques, selon les recommandations de l'OMS (**Manuguerra et Hannoun, 1999**).

En 2009, le vaccin contre la grippe saisonnière ne protégeait pas contre la nouvelle grippe A(H1N1)2009 car il n'était pas fabriqué avec les mêmes antigènes. Inversement, le vaccin contre la grippe A(H1N1)2009 ne protégeait pas contre la grippe saisonnière. C'est pourquoi une vaccination spécifique contre cette nouvelle grippe a été organisée. Depuis, cette souche

est incluse dans le vaccin contre la grippe saisonnière (**Haut Conseil de la Santé Publique-France, 2010**).

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

Afin d'évaluer le profil de sensibilité aux inhibiteurs de la neuraminidase des souches grippales circulant en Algérie, nous avons ciblé une population de 70 malades de la pandémie de grippe de 2009 chez qui le virus A/H1N1 a été isolé.

Pour cela, nous avons eu recours à deux techniques :

- Une technique phénotypique : pour l'étude de l'activité de la neuraminidase en présence et en absence d'inhibiteur.
- Une technique génotypique : pour la détermination de la mutation responsable de la résistance du virus de la grippe aux inhibiteurs de la neuraminidase.

Pour cette étude, nous avons testé l'oseltamivir qui est l'antiviral utilisé en Algérie dans le traitement de la grippe de type A.

II.1. Technique phénotypique

Elle est basée sur le principe de clivage du substrat NANA par la neuraminidase virale. C'est une technique qui permet d'étudier l'activité de cette enzyme et de déterminer la sensibilité des virus grippaux aux inhibiteurs qui bloquent cette activité par liaison compétitive au niveau du site actif de l'enzyme. En présence de l'inhibiteur, comme l'Oseltamivir, cette technique permet d'obtenir la concentration inhibant 50% de l'activité de la neuraminidase (IC₅₀).

Le test de chimiluminescence a été choisi pour réaliser cette étude en raison de sa sensibilité élevée dans la détection du signal émit lors du clivage du substrat par l'enzyme (**Sheu *et al.*, 2008**). Ce test utilise un Kit NA-*Star* (Applied Biosystems) de détection de la résistance avec comme substrat chimiluminescent le NA-*Star*1, 2-dioxetane dont la structure est analogue à celle de NANA.

II.1.1. Matériel et Equipement

▪ Echantillons de virus

1. Soixante dix souches virales ont été isolées sur cellules MDCK lors de la pandémie de grippe A/H1N1 de 2009, au Laboratoire Grippe et Virus Respiratoires de l'Institut Pasteur d'Algérie (Annexes 1 et 2). La période d'isolement était de Juin à Décembre 2009. Ces souches ont été d'abord titrées par le test d'hémagglutination (Annexe 4), puis conservées à - 80°C. Le titre HA des 70 souches était > 128.

Le Tableau XI en Annexe 5 donne les renseignements relevés sur les 70 malades chez qui ces souches ont été isolées.

2. Quatre souches de référence, sensibles et résistantes à l'oseltamivir, fournies par le NIMR - UK, dont le titre HA est >128 :

- Souches de référence, grippe saisonnière (pays d'origine: Norvège) :
 - o A/Norway/1758/2007 H1N1 seasonal - H275 - Sensible
 - o A/Norway/1735/2007 H1N1 seasonal - Y275 - Résistante
- Souches de référence, grippe pandémique (pays d'origine: Danemark) :
 - o A/Denmark/524/2009 H1N1 pandemic - H275 - Sensible
 - o A/Denmark/528/2009 H1N1 pandemic - Y275 - Résistante

▪ **Réactifs** : Kit NA-*Star* (Applied Biosystems) (Photo 1)

Tableau III : contenu du Kit NA-*Star*

Produit	Description	Volume/Quantité
Substrat NA- <i>Star</i> 1, 2-dioxetane	Concentration 10mM	100 µL
Tampon NA- <i>Star</i>	26 mM MES (2-[NMorpholino] Ethanesulfonic acid) (pH 6.0), 4 mM CaCl ₂	480 mL
Accélérateur NA- <i>Star</i>	Solution propriétaire contenant un activateur luminescent	2 × 70 mL
Microplaques NA- <i>Star</i> de détection	Opaques, blanches, 96 cupules à fond plat, avec couvercle	100 plaques



Photo 1 : Kit NA-Star (Applied Biosystems)

- **Inhibiteur de la neuraminidase:** Oseltamivir Carboxylate concentré à 10mM (Roche, Réf. GS4071). Le diluer dans du tampon *NA-Star* à une concentration de 50µM et répartir dans des tubes de 500µl ; congeler à -20°C (solutions stock d'oseltamivir).
- **Appareils**
 - Agitateur de plaques à 96 puits (Fisher Scientific)
 - Agitateur de tubes (Vortex- Scientific industries)
 - Etuve réglée à +37°C (Mettler)
 - Réfrigérateur réglé à +4°C (Samsung)
 - Congélateur réglé à - 20°C (Eni)
 - Congélateur réglé à - 80°C (Thermo Scientific)
 - Hotte microbiologique à flux laminaire (FLUFRANCE)
 - Lecteur de luminescence (Victor Light Wallac 1420-060, Perkin Elmer) fonctionne avec un logiciel de mesure de l'intensité de lumière émise (Wallac 1420 Manager, Perkin Elmer) (Photo 2).
- **Matériel supplémentaire nécessaire**
 - Micropipettes réglable (10-50µl) (Sorenson)
 - Micropipette réglable (100-1000µl) (Transferpette- BRAND)
 - Micropipette multicanaux, réglable (10-150µl) (One Touch)
 - Embouts avec filtre (Volume 10-50µl) (Gilson)
 - Embouts avec filtre (Volume 100-1000µl) (ART-Molecular Bio Products)
 - Tubes de 1,5 ml (Fisher Scientific)
 - Tubes de 500µl (Fisher Scientific)
 - Réservoirs pour micropipettes multicanaux (Fisher Scientific)
 - Pipettes stériles de 10 ml à 25 ml (Nunc)



Photo 2 : Victor Light Wallac 1420-060 (Perkin Elmer) fonctionne avec logiciel (Wallac 1420 Manager)

II.1.2. Méthodes

II.1.2.1. Etude de l'activité de la neuraminidase et détermination du titre viral

L'étude de l'activité de la neuraminidase de chaque virus est réalisée avant chaque test d'inhibition afin d'améliorer la reproductibilité des résultats des IC50.

Le test est réalisé sur une plaque blanche de 96 puits pour un total de 04 virus/plaque, chaque virus est testé sur deux lignes (figure 22). Pour chaque test, 02 souches de référence « sensible » et « résistante » doivent être introduite dans le lot de virus à tester.

Protocole

1. Dans une hotte microbiologique à flux laminaire, diluer les échantillons des virus à tester et les souches de référence dans le tampon NA-*Star*, en réalisant des dilutions en séries de $\frac{1}{2}$ comme décrit dans les étapes ci-dessous et illustré dans la figure 20.
2. Dans une plaque blanche NA-*Star* de 96 puits, ajouter 80 μ l de tampon NA-*Star* dans tous les puits de la colonne 1.
3. Ajouter 50 μ l de tampon NA-*Star* dans les autres puits de la plaque (colonnes 2→11)
4. Ajouter 50 μ l de tampon NA-*Star* dans les puits de la colonne 12 (colonne « Contrôle Blanc »).
5. Préparer une dilution initiale au 1/5eme pour chaque virus en ajoutant 20 μ l de suspension virale aux 80 μ l de tampon NA-*Star* des puits de la colonne 1 de chaque ligne (lignes A→H), deux lignes/virus.
6. Réaliser des dilutions au $\frac{1}{2}$ par transfert d'un volume de 50 μ l de la colonne 1 à la colonne 11 pour les 04 virus testés sur la plaque. Rejeter les derniers 50 μ l de la colonne 11.
7. Préparer une dilution au 1/1000eme du substrat NA-*Star* dans le tampon NA-*Star*.
8. Ajouter 10 μ l du substrat NA-*Star* dilué dans tous les puits de la plaque en partant de la colonne 12 vers la colonne 1.
9. Incuber à température ambiante (~20-22°C) pendant 30min.
10. Après incubation, rajouter 60 μ l de l'accélérateur NA-*Star* dans tous les puits et placer la plaque dans le lecteur de luminescence (Photo 3).

11. Lancer le logiciel Wallac 1420 Manager de mesure de l'intensité de lumière émise par le produit de clivage du substrat NA-*Star*1,2-dioxetane par la neuraminidase.

Les résultats de ce test nous permettent d'obtenir la dilution de virus (titre viral) nécessaire pour entamer l'étude de l'inhibition de la neuraminidase et la détermination de l'IC50.



Photo 3 : Ouvrir le couvercle du lecteur de luminescence et placer la plaque blanche NA-*Star*

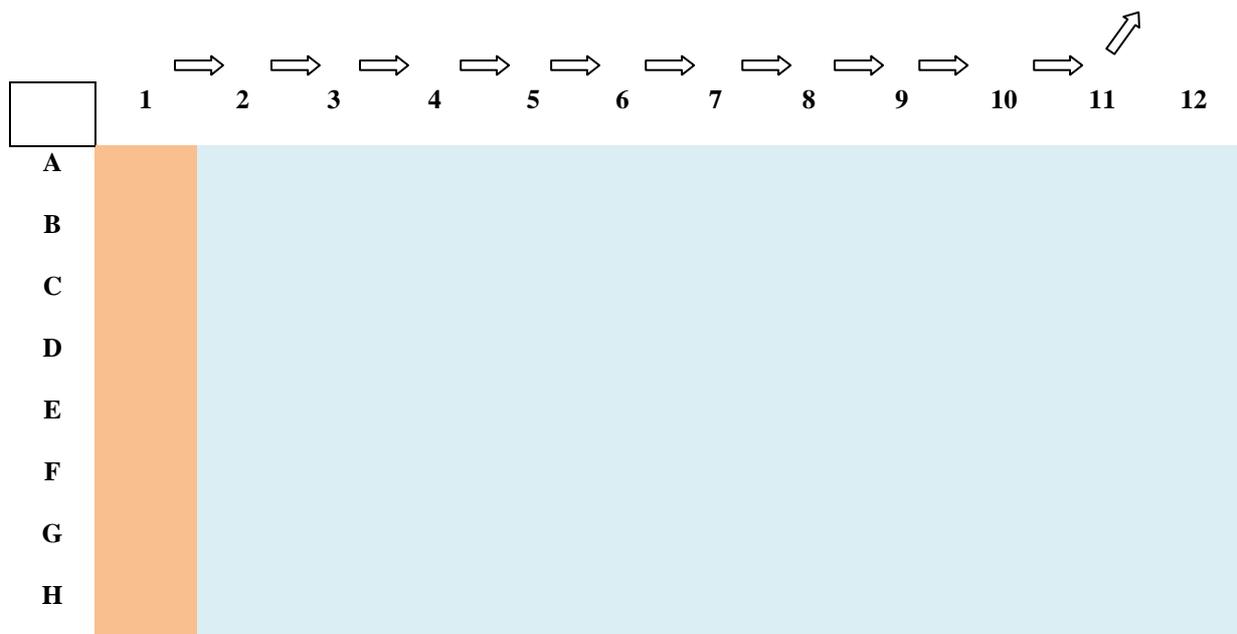


Figure 20 : Dilutions en série de $\frac{1}{2}$ des virus à tester et des souches de référence

 Addition de 20 μ l de virus pour une dilution initiale au 1/5eme (2 lignes / virus)

 Tampon NA-*Star*

⇒ Transfert d'un volume de 50µl ; à la colonne 11 rejeter les derniers 50µl

II.1.2.2. Etude de l'inhibition de la neuraminidase : détermination de l'IC50

La sensibilité à l'oseltamivir de chaque virus est testée sur plaque NA-*Star* de 96 puits avec un total de 4 virus/plaque (chaque virus est testé sur deux lignes, voir figure 21).

Pour chaque test nous avons introduit deux souches de référence, « sensible » et « résistante », afin de valider les résultats.

Protocole

1. Dans une hotte microbiologique à flux laminaire, préparer 800µl de dilution de chaque virus à tester selon les résultats obtenus par le test précédent (Etude de l'activité de la neuraminidase et détermination du titre viral) dans du tampon NA-*Star*.
2. A partir de la solution stock d'oseltamivir à 50µM, préparer des dilutions en suivant le tableau IV.
3. Sur une plaque de 96 puits, déposer les solutions en suivant la figure 21:
 - Colonne 12 « contrôle Blanc »: ajouter 50µl de tampon NA-*Star* dans tous les puits.
 - Colonne 11 « contrôle négatif »: ajouter 25µl de tampon NA-*Star* dans tous les puits
 - Dans les colonnes 1 à 10 : ajouter 25µl de chaque dilution d'oseltamivir dans les puits correspondants en commençant par de la plus faible concentration (colonne 10) vers la plus forte concentration (colonne 1).
 - Déposer 25µl de la dilution de chaque virus à tester dans les puits correspondants (2 lignes/virus) en allant de la colonne 11 vers la colonne 1.
4. Incuber à +37°C pendant 30 minutes
5. Ajouter 10µl de substrat NA-*Star* dilué au 1/1000ème dans tous les puits de la plaque en partant de la colonne 12 vers la colonne 1.
6. Incuber à température ambiante (~20-22°C) pendant 30 minutes.
7. Après incubation, rajouter 60µl de l'accélérateur NA-*Star* dans tous les puits et placer la plaque dans le lecteur de luminescence.
8. Lancer le logiciel Wallac 1420 Manager de mesure de l'intensité de lumière émise par le produit de clivage du substrat NA-*Star*1,2-dioxetane par la neuraminidase.

Analyse statistique

L'analyse statistique a consisté en une partie descriptive de notre échantillon de malades (41 hommes et 29 femmes) en fonction de leurs derniers déplacements à l'étranger et de leur provenance wilayale.

Les calculs portant sur l'IC50 (half maximal inhibitory concentration) ont été log-transformées dans un but de normalisation pour le calcul des SMAD (standard median absolute deviation). Les valeurs extrêmes (quand elles existent) ont été mises en évidence pour celles dépassant de 1,65 SMAD la médiane (minoroutliers) et de 3,00 SMAD la médiane (major outlier).

Les tests de comparaison des IC50 ont été établis en utilisant l'ANOVA (ANalysis Of VAriance) non paramétrique de Kruskal-Wallis et le test de la médiane.

L'analyse statistique a été établie sur Statistica 10.0 de StatsoftInc, Tulsa, USA et sur le complément dédié au SMAD de Microsoft Excel.

Tableau IV : Préparation des dilutions d'oseltamivir

Dilution	Volume Tampon	Volume oseltamivir	Concentration oseltamivir (nM)	Concentration finale d'oseltamivir (nM)*
1	21,6 ml	900µl oseltamivir [50 µM]	2000	1000
2	16,2 ml	7,5 ml de la dilution 1	633	317
3	16,2 ml	7,5 ml de la dilution 2	200	100
4	16,2 ml	7,5 ml de la dilution 3	63,4	31,70
5	16,2 ml	7,5 ml de la dilution 4	20	10,00
6	16,2 ml	7,5 ml de la dilution 5	6,3	3,20
7	16,2 ml	7,5 ml de la dilution 6	2	1,01
8	16,2 ml	7,5 ml de la dilution 7	0,64	0,32
9	16,2 ml	7,5 ml de la dilution 8	0,20	0,10
10	16,2 ml	7,5 ml de la dilution 9	0,06	0,032

nM : nano Molaire

* : concentration finale d'oseltamivir dans le volume réactionnel, après addition de la dilution de virus.

		+Virus										-Virus	
Virus		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	A	1000	317	100	31,70	10	3,20	1,01	0,32	0,10	0,032	0	0
1	B	1000	317	100	31,70	10	3,20	1,01	0,32	0,10	0,032	0	0
2	C	1000	317	100	31,70	10	3,20	1,01	0,32	0,10	0,032	0	0
2	D	1000	317	100	31,70	10	3,20	1,01	0,32	0,10	0,032	0	0
3	E	1000	317	100	31,70	10	3,20	1,01	0,32	0,10	0,032	0	0
3	F	1000	317	100	31,70	10	3,20	1,01	0,32	0,10	0,032	0	0
4	G	1000	317	100	31,70	10	3,20	1,01	0,32	0,10	0,032	0	0

4	H	1000	317	100	31,70	10	3,20	1,01	0,32	0,10	0,032	0	0
---	---	------	-----	-----	-------	----	------	------	------	------	-------	---	---

Figure 21: Concentrations finales d'oseltamivir (nM) dans chaque puits d'une plaque à 96 cupules

II.2. Technique génotypique

Un fragment de 277 pb de la neuraminidase N1 du virus influenza de type A est amplifié grâce à une technique de RT-PCR en temps réel utilisant des amorces spécifiques du virus A/H1N1. Cette technique permet de détecter les virus résistants à l'oseltamivir possédant la mutation H275Y, par utilisation d'une sonde marquée spécifique conçue pour révéler la présence d'un nucléotide C ou T à la position 823 du segment NA du génome viral.

II.2.1. Matériel et Equipement

▪ Echantillons de virus

- Quatre souches de référence, saisonnières et pandémiques, fournies par Le NIMR-UK :
 - Souches de référence, saisonnières (pays d'origine : Norvège) :
 - A/Norway/1758/2007 H1N1 seasonal – H275 - Sensible
 - A/Norway/1735/2007 H1N1 seasonal – Y275 - Résistante
 - Souches de référence, pandémiques (pays d'origine : Danemark) :
 - A/Denmark/524/2009 H1N1 pandemic – H275 - Sensible
 - A/Denmark/528/2009 H1N1 pandemic – Y275 - Résistante
- Deux souches de référence, pandémiques, fournies par le CDC-USA, dont les IC50 sont prédéfinies (pays d'origine respectifs : Californie-USA et Texas-USA) :
 - A/California/12/2012 / H1N1 pdm09 - H275 - Sensible : IC50 = 0.20
 - A/Texas/23/2012 / H1N1 pdm09 - Y275- Résistante : IC50 = 174.91
- Deux souches algériennes ayant donné des valeurs IC50 extrêmes par la technique phénotypique:
 - G176/10 H1N1 pdm
 - G300/10 H1N1 pdm

▪ Réactifs pour l'extraction de l'ARN viral

Nous avons fait une extraction de l'ARN viral avec un kit « High Pure Viral Nucleic Acid » (Roche).

Tableau V : contenu du Kit pour l'extraction de l'ARN viral

Produit	Description	Vol / Quant
Tampon de fixation	Guanidine HCl (sel) + Triton X-100	2 x 25 ml
ARN entraîneur (Carrier RNA)	Séquence Poly A - Lyophilisé	2 ml

Protéinase K	Lyophilisée	100 mg
Tampon éliminant les inhibiteurs	Liquide	33 ml
Tampon de lavage	Liquide	2 x 10 ml
Tampon d'élution	Liquide	30 ml
Colonnes	Avec membrane en fibres de verre	100
Tubes collecteurs	Pour un volume de 2ml	400

▪ Réactifs pour l'amplification

Pour la RT-PCR en temps réel nous avons utilisé un kit « LightCycler FastStart DNA Master plus HybProbe » (Roche).

Tableau VI : contenu du Kit pour l'amplification

Produit	Description	Volume/Quantité
Enzyme : Taq DNA polymérase	Liquide	50 µl
Mix cDNA	Tampon + MgCl ₂ + dNTP	590 µl
Eau ultra pure	Qualité PCR	2 x 25 ml

Amorces et sonde pour la détection de la résistance : Nous avons utilisé un kit conçu par *TIB MOLBIOL- Roche Diagnostics* sous le nom « LightMix Kit Influenza A Virus HxN1 Tamiflu Resistance [H274Y] », contenant des amorces spécifiques au virus A/H1N1 saisonnier ou pandémique et une sonde simple qui détecte la mutation ponctuelle C→T.

Ce kit contient aussi des contrôles ADN :

- Contrôle ADN pandémique (wild type « wt ») - Sensible : [H274]
- Contrôle ADN pandémique (mutant « mt ») - Résistant : [274Y]

▪ Appareils

- Appareil pour PCR en temps réel (Light Cycler 480 II - Roche) fonctionne avec un logiciel de détection de l'amplification (Light Cycler 480 SW, V. 1.5.1 - Roche) (Photo 4)
- Micro-centrifugeuse ajustable à 8.000 rpm
- Agitateur de tubes (Vortex-Scientific industries)
- Spectrophotomètre (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific)

▪ Matériel supplémentaire nécessaire

- Micropipettes réglable (10-20 μ l) (Sorenson)
- Micropipette réglable (100-1000 μ l) (Transferpette- Brand)
- Embouts avec filtre (Volume 10-50 μ l) (Gilson)
- Embouts avec filtre (Volume 100-1000 μ l) (ART-Molecular Bio Products)
- Plaques PCR à 96 puits



Photo 4 : Appareil pour PCR en temps réel (Light Cycler 480 II - Roche) fonctionne avec un logiciel de détection de l'amplification (Light Cycler 480 SW, V. 1.5.1-Roche)

II.2.2. Méthodes

Pour chaque souche virale il sera réalisé successivement :

- Une extraction de l'ARN
- Une RT-PCR en temps réel

II.2.2.1. Extraction de l'ARN

1. Reconstituer l'ARN entraîneur (Carrier RNA) dans 2 ml de tampon de fixation, puis rajouter 0,5ml de tampon d'élution.
2. Reconstituer la Protéinase K dans 5ml de tampon d'élution
3. Dans un tube de 1,5 ml, ajouter :
 - 200 μ l d'échantillon de virus
 - 200 μ l d'ARN entraîneur
 - 50 μ l de Protéinase K
4. Incuber à 72°C pendant 10 min
5. Ajouter 100 μ l de tampon de fixation
6. Transférer chaque échantillon dans une colonne montée sur un tube collecteur
7. Centrifuger pendant 1min à 8000 tpm
8. Changer le tube collecteur et ajouter 500 μ l du tampon éliminant les inhibiteurs, puis centrifuger pendant 1 min à 8000 tpm.
9. Changer le tube collecteur et ajouter 450 μ l de tampon de lavage.
10. Répéter les étapes 7 et 8.

11. Enlever le tube collecteur et insérer la colonne dans un tube de 1,5 ml.
12. Ajouter 50µl de tampon d'éluion, puis centrifuger pendant 1min à 8000 tpm.
13. Après centrifugation, nous obtenons des extraits d'ARN viraux. Faire un dosage spectrophotométrique pour déterminer leurs concentrations.

II.2.2.2. Réalisation de la RT-PCR en Temps Réel

1. Reconstitution des amorces et sondes (contenues dans le même tube) : Rajouter 66µl d'eau PCR ; faire des aliquots de 22µl/tube.
2. Reconstitution des contrôles ADN : Rajouter 40µL d'eau PCR à chaque contrôle ; faire des aliquots de 10µl/tube.
3. Préparation du Mix :

Tableau VII : Mix pour la détection de la mutation H275Y

Contenu du Mix	Pour une réaction (µl)
Eau PCR	11µl
Mélange amorces et sondes	2 µl
Mix cDNA (additionné de 50µl d'enzyme)	2 µl

Volume total : 15 µl

Rappel : l'enzyme utilisée pour la réalisation de la RT-PCR est une enzyme hybride qui possède les deux fonctions : transcription inverse ARN/ADN et réplication ADN/ADN.

4. Sur une plaque PCR à 96 puits déposer :
 - pour chaque échantillon de virus : 15 µl de Mix et 5µl d'échantillon.
 - Pour chaque contrôle ADN : 15 µl de Mix et 5µl de contrôle
5. Fermer la plaque avec du papier autocollant
6. Insérer la plaque dans l'appareil pour PCR en temps réel.

NB : La programmation de l'appareil se fait avant la préparation du mix

- **Programme RT-PCR en temps réel :** composé de 5 étapes
 - Transcription inverse : synthèse du l'ADNc à partir de l'ARN viral
 - Dénaturation de l'ADNc
 - Amplification : phase de lecture du signal
 - Fusion : détermination de la température de fusion Tm
 - Refroidissement

Tableau VIII : Programmation de l'appareil Light Cycler 480 II (Roche)

	Cycle	Température (°C)	Temps
Transcription inverse	1	50	20 min

Dénaturation	1	95	5 min
		95	15 sec
Amplification	45	56	45 sec
		72	15 sec
		95	20 sec
Fusion	1	40	20 sec
		85	Mode continu
Refroidissement	1	40	30 sec

Mode continu : faire augmenter la température graduellement (de 40°C à 85°C).

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. RESULTATS

III.1.1. Caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée

Ce travail a été réalisé sur une population de 70 malades algériens chez qui le virus A/H1N1 pandémique a été isolé au LGVR-IPA durant la période allant de juin à décembre 2009.

Les renseignements relevés sur ces malades, rapportés dans le tableau XI (Annexe 5) ont été analysés par des méthodes de statistiques descriptives :

▪ Age des patients

L'analyse nous a donné les résultats suivants (Annexe 6)

- La moyenne d'âge des personnes touchées est de $34,9 \pm 2,5$ ans
- Le sex-ratio $n(\text{Mas})/n(\text{Fém}) = 0,7073 \approx 70,7\%$ révèle une prédominance féminine
- Deux classes d'âges particulièrement touchées, les 20-30 ans (15,71%) et 30-40 ans (15,71%) chez les femmes.

Ces résultats sont donnés sous forme d'un histogramme (figure 22) :

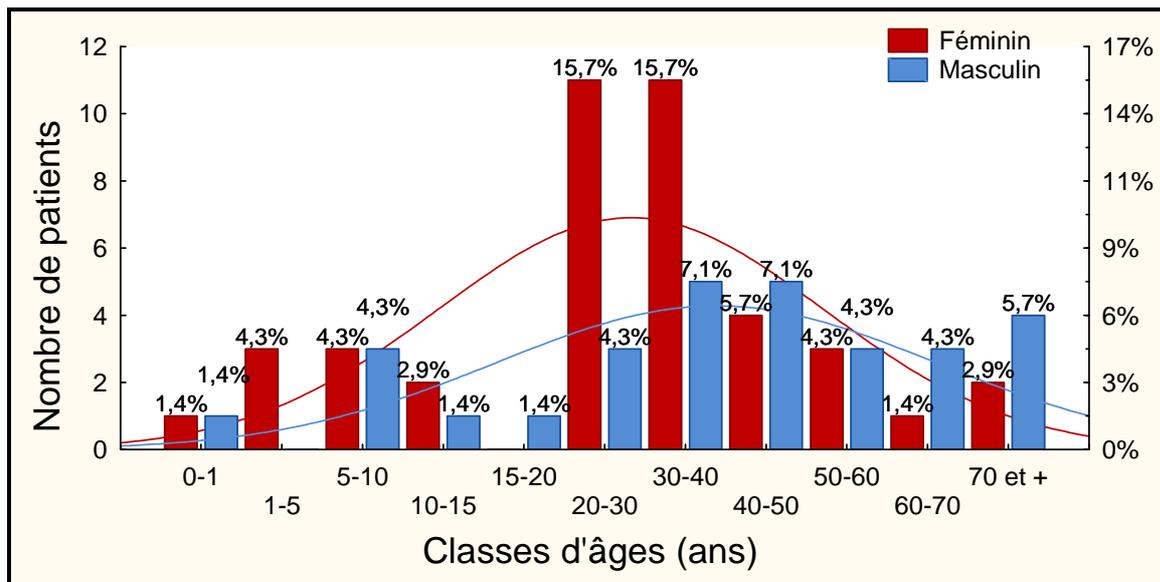


Figure 22 : Distribution dans les classes d'âges

▪ **Provenance des cas (origine géographique du virus influenza isolé)**

La notion de voyage récent est importante pour connaître l'origine du virus isolé surtout en cas de pandémie. Parmi les 70 patients révélés porteurs du virus A(H1N1)2009 nous pouvons noter que (Annexe 6):

- Plus des 2/3 des patients n'avaient pas voyagé ($49/70 = 70,0\%$) (Figure 23).
- Pour les 21 patients ayant récemment voyagé (< 07 jours), la plus grande part (5 patients soit 24%) revenaient d'Arabie Saoudite (Figure 24). une part non négligeable (4 patients soit 19%) revenaient de France.
- La répartition des cas autochtones par wilaya montre que la région Centre (Alger) était la plus touchée avec 19 patients soit 22 % de cas (Figure 25).

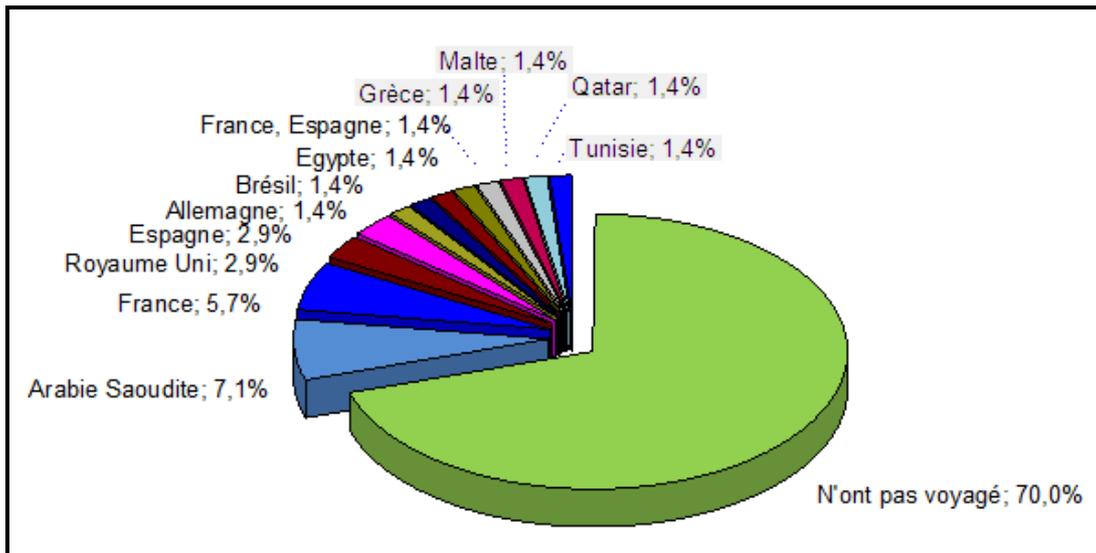


Figure 23: Provenance des cas confirmés du virus pandémique A/H1N1 entre Juin et Décembre 2009.

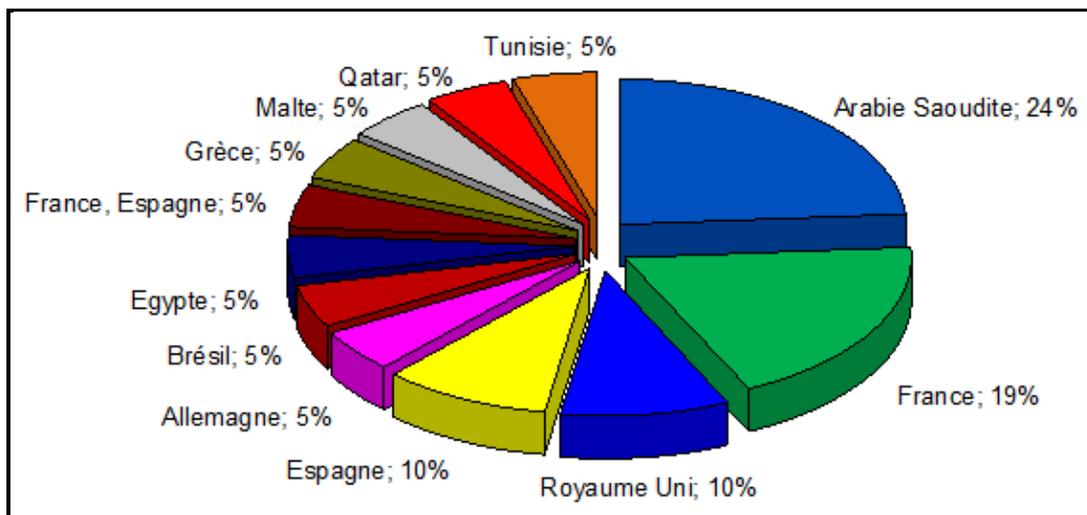


Figure 24 : Notion de voyage récent. Cas confirmés de virus A/H1N1 pandémique par pays de provenance, entre Juin et Décembre 2009

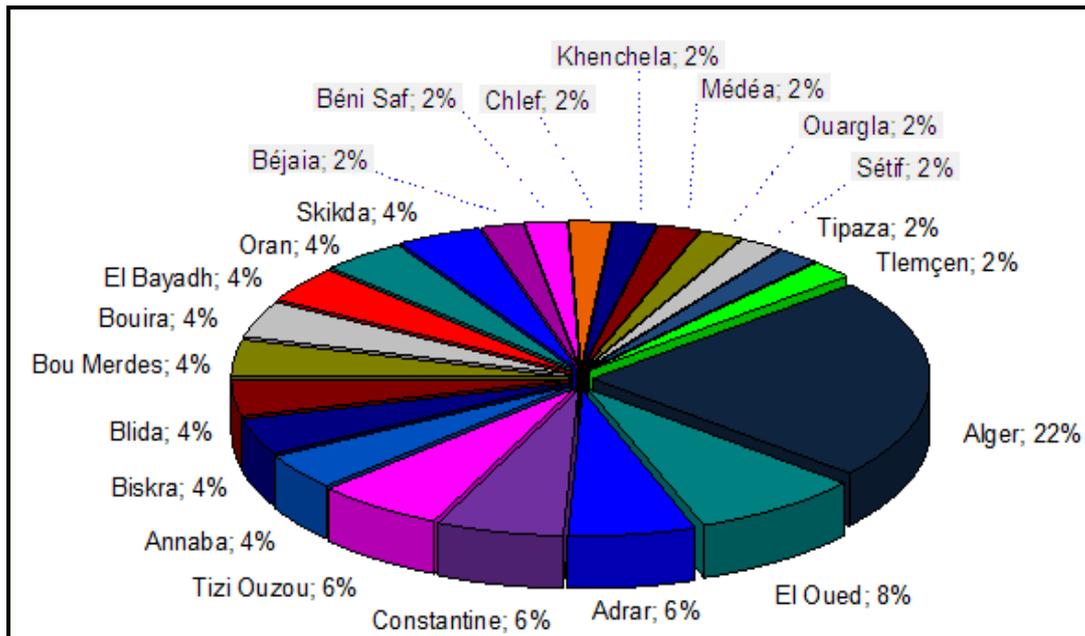


Figure 25 : Répartition des cas autochtones par Wilaya

III.1.2. Résultats de la technique phénotypique

- **Etude de l'activité de la neuraminidase**

La technique phénotypique permet de mesurer l'activité de la neuraminidase du virus grippal en présence du substrat *NA-Star*. Ce substrat est composé d'une molécule d'acide sialique et d'un Dioxetane. Après clivage de l'acide sialique par l'enzyme, le Dioxetane émet une lumière qui est détectée par le lecteur de chimiluminescence.

Le logiciel du lecteur (Wallac 1420 Manager) traduit ce signal en Unités Relatives de Lumière (RLU). L'intensité du signal est inversement proportionnelle à la dilution du virus : elle diminue au fur et à mesure que la dilution du virus augmente (figure 26).

Les résultats obtenus sont transformés par le même logiciel en un fichier Microsoft Excel, puis transférés sur un programme « Point to Point », fourni par le NIMR-UK, qui donne la dilution de virus à réaliser pour déterminer les IC50 (figure 27).

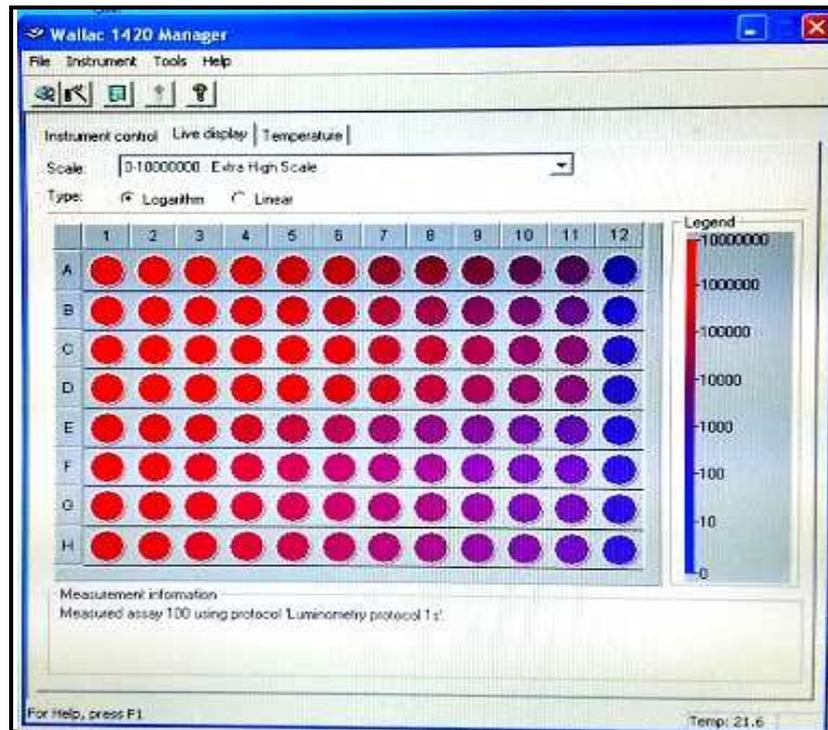


Figure 26: Logiciel Wallac 1420 Manager (capture d'écran). Le signal émis (couleur rouge) traduit l'activité de l'enzyme, il diminue au fur et à mesure que la dilution du virus augmente (en allant de la colonne 1 vers la colonne 11). La couleur bleu traduit l'absence d'activité enzymatique. La barre « Legend » correspond aux unités RLU.

Injected: A, AIT AISSA 28.04.13	Titration													
Virus	5	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	Blank		
G123/10 H1N1 pdm	830741	620847	390667	200486	103835	57053	29042	15256	7714	4021	2156	330		
	824826	618491	397505	205721	118447	55701	29997	14581	8065	3719	2392	273		
G139/10 H1N1 pdm	889200	741283	557355	333349	176242	95611	47842	25680	12774	5932	3263	211		
	862913	730471	532304	326948	184217	96470	48374	26253	13693	6766	3206	207		
A/ Norway /Sensitive 2007	70543	36304	17918	9315	5295	2328	1223	935	487	310	280	192		
	72053	36330	16763	8197	4520	2147	1071	751	466	298	248	188		
A / Norway /Resistant 2007	70123	29865	15114	5690	3602	1659	1458	841	332	219	188	158		
	70145	20941	17990	5711	3550	1276	1672	709	329	209	194	140		
										Average Blank		1490,88		
Find Conc	0,69897000	1,00000000	1,30103000	1,60205999	1,90308999	2,20411998	2,50514998	2,80617997	3,10720997	3,40823997	3,70926996	Conc	Dilution	Dilution for IC50
G123/10 H1N1 pdm					2,1779121							150,6302	75	75
	0				2,1780936							150,6932	75	
G139/10 H1N1 pdm						2,4214378						263,8991	132	133
	0					2,4253368						266,2789	133	
A/ Norway /Sensitive 2007	0,7817656											6,050142	3	3
	0	0,7910505										6,180883	3	
A / Norway /Resistant 2007	0,7662462											5,837759	3	3
	0	0,754149										5,677394	3	

Figure 27 : Programme « Point to Point » (NIMR-UK). La colonne en violet donne la moyenne des dilutions de chaque virus calculée en testant chaque virus en double (2 lignes/virus : un total de 4 virus/plaque). Cette dilution est utilisée pour la détermination des IC50.

▪ **Détermination des IC50**

Les valeurs des IC50 obtenues par le programme « Point-to-Point » (NIMR-UK) pour les 70 souches isolées au LGVR-IPA ainsi que celles des souches de références (Annexe 7) sont analysées par une méthode statistique en calculant la médiane, l'écart type (Standard Deviation « SD »), le coefficient de variation (CV) et l'amplitude de variation des IC50 (Annexe 8). Le résumé est donné dans le tableau IX :

Tableau IX : Moyennes et intervalles des IC50 obtenues pour les 70 souches LGVR-IPA et les souches de référence

Nom de la Souche	Moyenne (SD)	Intervalle IC50
Souches LGVR-IPA	0,36 (0,11)	0,12 - 0,71
A/Norway/1758/2007		
H1N1- Seasonal – H275	0,41 (0,16)	0,29 - 0,53
Sensible		
A/Denmark/524/2009		
H1N1- Pandemic - H275	0,56 (0,30)	0,28 - 1,07
Sensible		
A/Norway/1735/2007		
H1N1 - Seasonal – Y275	165,6 (66,3)	118,8 - 212,5
Résistante		
A/Denmark/528/2009		
H1N1- Pandemic - Y275	119,3 (33,8)	86,2 - 177,0
Résistante		

Afin

d'analyser les résultats obtenus avec nos souches algériennes isolées au LGVR-IPA nous avons comparé leurs valeurs IC50 avec celles des souches de référence (NIMR-UK). Pour cela nous avons fait une analyse de la variance - ANOVA (ANalysis Of VAriance) de Kruskal-Wallis et un test de la médiane (Annexe 8). La figure 28 donne les résultats basés sur la moyenne et les écart-types.

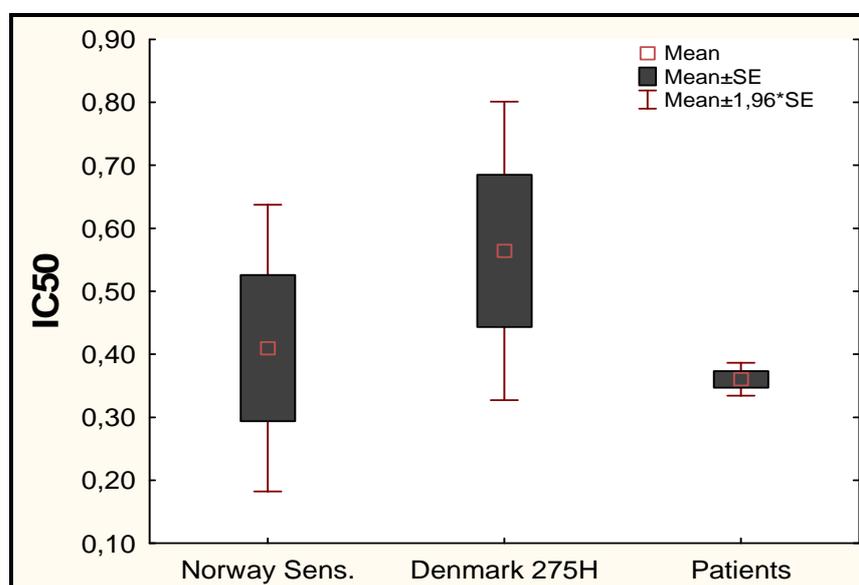


Figure 28 : Comparaison des valeurs des IC50 basée sur la moyenne et les écart-types. Norway Sens et Denmark 275H : Souches de références (NIMR-UK) sensibles à l'oseltamivir

Ces tests de comparaison des IC50 par l'ANOVA montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre les valeurs obtenues avec les souches algériennes et celles obtenues avec les souches de référence (NIMR-UK) sensibles à l'oseltamivir. Il y a lieu cependant de signaler la très forte variabilité de ces dernières (larges box-plots).

▪ **Mesure de la dispersion des valeurs des IC50 des 70 souches LGVR-IPA**

La médiane ainsi que le SMAD (Standard Median Absolute Deviation) des IC50 sont calculés afin de relever les valeurs extrêmes « outliers » (Tableau X). Dans le but de normaliser les données, nous travaillons sur des valeurs log-transformées pour revenir après calcul vers les valeurs naturelles par transformation inverse (fonction antilog).

Les « outliers », qui selon les contextes peuvent être considérés comme des valeurs extrêmes ou aberrantes, sont définis par rapport à des seuils calculés comme suit (**Lackenby, 2008**) :

- **Seuil « Minor outliers »** : Médiane + 1,65.SMAD
- **Seuil « Major outliers »** : Médiane + 3.SMAD
- Si la valeur IC50 obtenue est > [Médiane + 1,65.SMAD] => **Minor outlier**
- Si la valeur IC50 obtenue est > [Médiane + 3.SMAD] => **Major outlier**

Tableau X : Calcul des seuils pour valeurs extrêmes « outliers »

	Nbr	Médiane	SMAD	Médiane+1,65.SMAD	Médiane+3.SMAD	Amplitude IC50	Minor outlier
				Seuil « minor outlier »	Seuil « major outlier »		
Souches LGVR-IPA	70	0,35	0,121	0,63	1,02	0,12-0,71	0,70 0,71

A partir des résultats des IC50 obtenus (Annexe 7) nous pouvons relever pour les 70 souches LGVR-IPA 02 « minor outliers » (>0,63) : **0,70** et **0,71** (Figure 29) correspondants aux souches : *G176/10 H1N1 pdm* et *G300/10 H1N1 pdm*, respectivement.

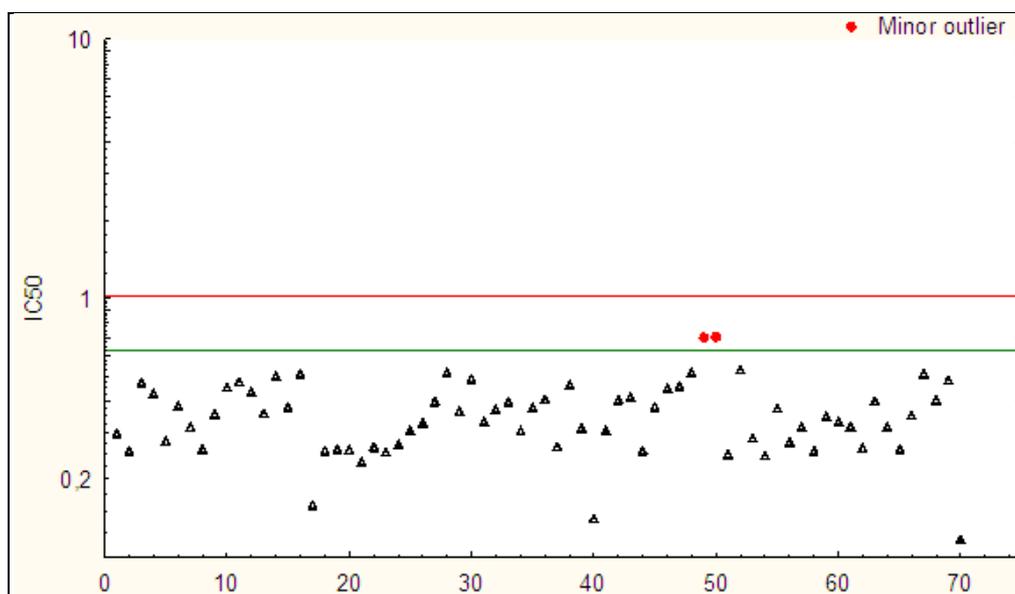
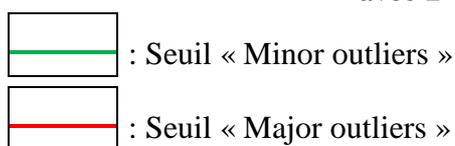


Figure 29: Dispersion des valeurs des IC50 des 70 souches LGVR-IPA, avec 2 « Minor outliers »



▪ Profil phénotypique des souches sensibles et résistantes

Les concentrations d'oseltamivir testées sont analysées par le programme « Point-to-Point » (NIMR-UK) qui donne des courbes de cinétique enzymatique décrivant la vitesse de la réaction enzymatique (clivage du substrat par la neuraminidase) en présence de concentrations croissantes d'oseltamivir (inhibiteur de l'enzyme). Cette vitesse diminue au fur et à mesure que la concentration de l'inhibiteur augmente (Figure 30 et Figure 31).

Par ailleurs, le profil des courbes des souches de référence résistantes se révèle différent de celui des souches de références sensibles, ceci est dû à la présence de la mutation H275Y au niveau du site actif de l'enzyme qui fait baisser son affinité pour le substrat et donc sa vitesse maximale (V_{max}) comme nous le voyons bien sur les deux Figures 30 et 31.

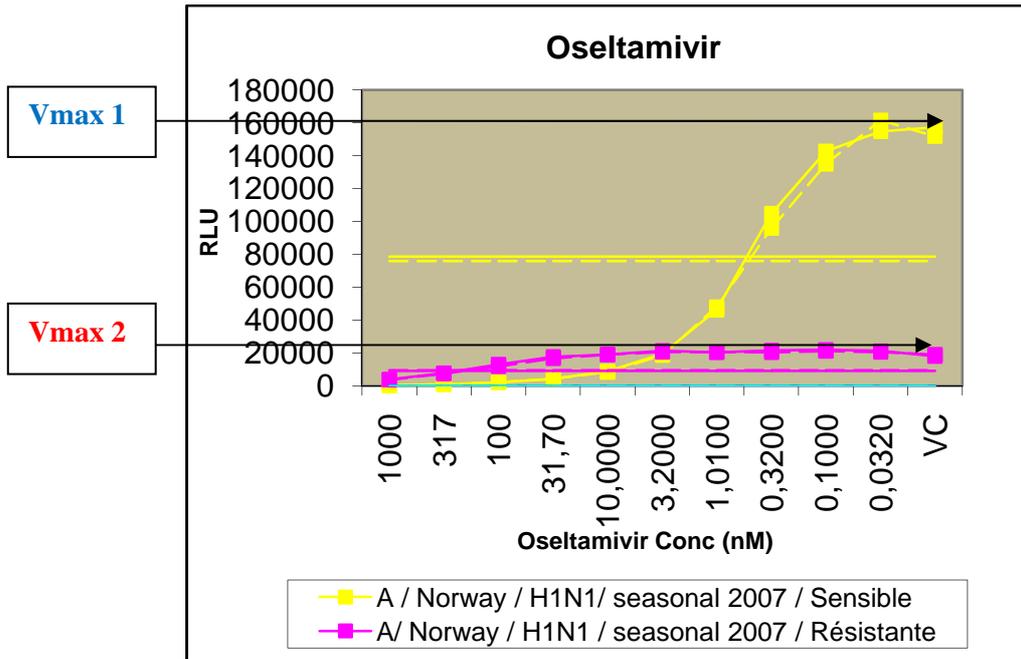


Figure 30 : Cinétique enzymatique des souches de référence A/H1N1 saisonnières.
 Courbes $V = f([\text{oseltamivir}])$

RLU : Unité Relative de Lumière
 VC : Virus Contrôle

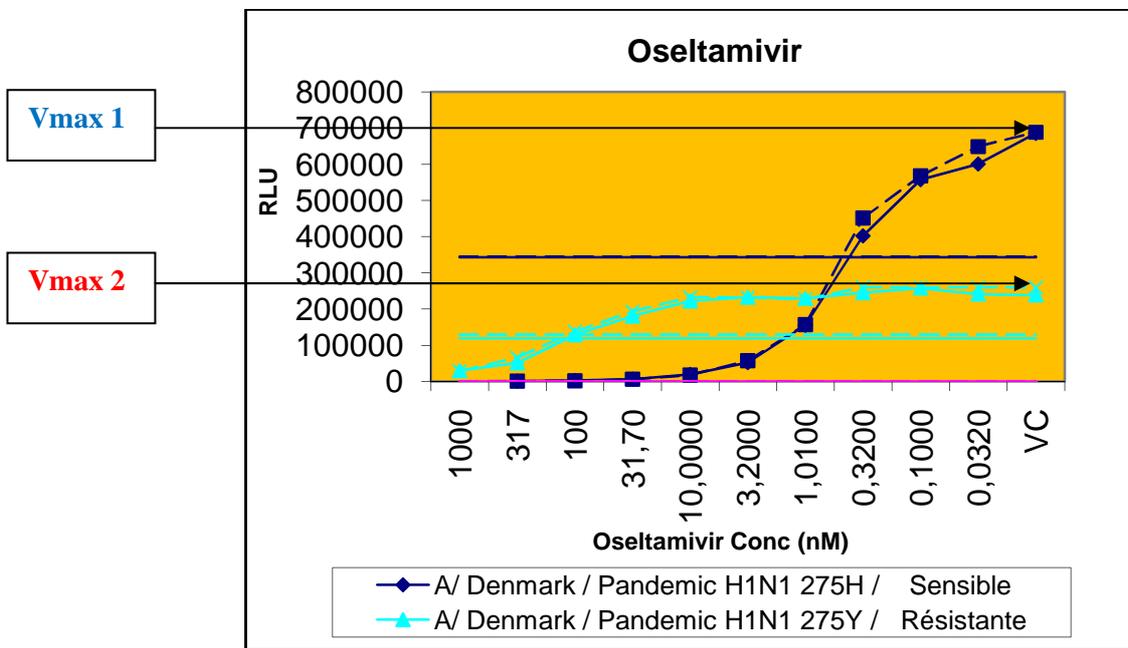


Figure 31: Cinétique enzymatique des souches de référence A/H1N1 pandémiques
 Courbes $V = f([\text{oseltamivir}])$

RLU : Unité Relative de Lumière
 VC : Virus Contrôle

III.1.3. Résultats de la technique génotypique

L'amplification par RT-PCR en temps réel a été programmée pour l'analyse des pics de fusion de la sonde marquée au niveau des deux allèles, sauvage H275 (sensible), et muté Y275 (résistant). L'hybridation de cette sonde au niveau de l'allèle muté crée une zone de mésappariement qui fait baisser sa température de fusion T_m .

La technique génotypique a été réalisée en prenant les deux souches algériennes LGVR-IPA pandémiques ayant donné des valeurs extrêmes (outliers) par la technique phénotypique afin de confirmer leur profil de sensibilité à l'oseltamivir, comparé à celui des souches de références et des contrôles positifs ADN pandémique.

La Figure 32 représente la cinétique de fusion de la sonde calculée en unités de fluorescence en fonction de la température ($^{\circ}\text{C}$). Ce graphique montre bien une diminution de la fluorescence au fur et à mesure que la température augmente. Ce résultat s'explique par le fait que nous avons utilisé une sonde marquée qui émet une fluorescence lorsqu'elle s'hybride à la séquence cible (séquence contenant la mutation). Cette fluorescence tend à s'annuler lorsque la sonde retourne à l'état libre.

La Figure 33 donne les pics de fusion de la sonde fluorescente au niveau des allèles : sauvage H275 (sensible) et muté Y275 (résistant). Les résultats sont donnés en $-(d/dT)$ fluorescence en fonction de la température.

Rappel : $-(d/dt)$ fluorescence est la dérivée négative de l'intensité de la fluorescence en fonction de la variation de la température (Intapan *et al.*, 2008).

L'interprétation de la Figure 33 commence d'abord par relever les T_m des contrôles « allèle sauvage » *pDNA (wt) H275* et « allèle muté » *pDNA (mt) Y275*, puis comparer ces valeurs aux T_m des souches testées :

- Les souches LGVR-IPA (*G176 pdm* et *G300 pdm*) donnent le même pic $T_{m2} = 52.71^{\circ}\text{C}$ correspondant à l'allèle sauvage
- Les souches de référence pandémiques, sensibles (*C H275* et *D H275*) donnent également la même valeur T_{m2} que le contrôle « allèle sauvage ».
- La valeur T_{m1} du contrôle « allèle muté » est de 49.21°C , même valeur donné par la souche de référence pandémique, résistante (*T Y275*).
- Les souches de référence saisonnières, résistantes et sensibles (respectivement *N Y275* et *N H275*) donnent des valeurs T_m décalées par rapport à celles des contrôles ADN pandémiques : $T_{m3} = 50.15^{\circ}\text{C}$ et $T_{m4} = 54.52^{\circ}\text{C}$.

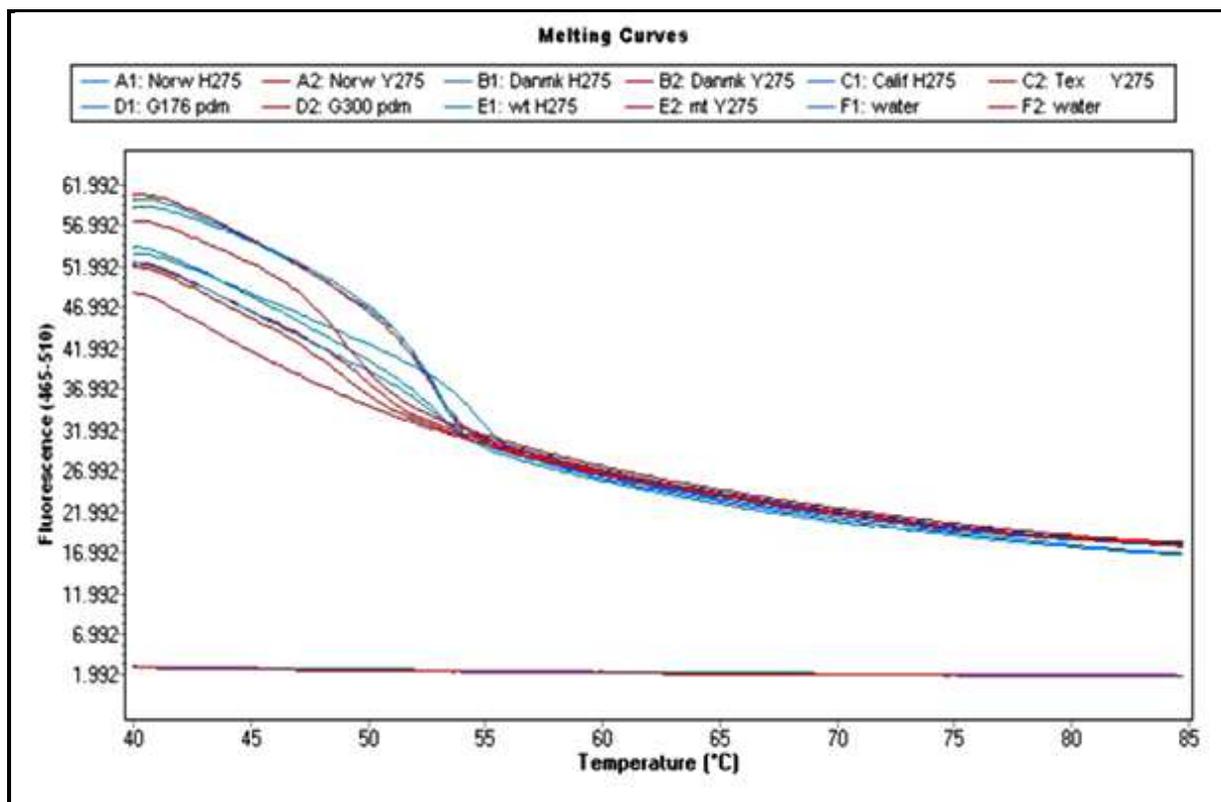


Figure 32 : Amplification par RT-PCR en temps réel. Cinétique de fusion de la sonde calculée en unités de fluorescence en fonction de la température (°C). L'hybridation de la sonde donne une fluorescence maximale à 40°C. Le signal diminue au fur et à mesure que la température augmente (retour de la sonde à l'état libre).

Melting Curves : Courbes de Fusion

wt : wild type - *mt* : mutant

wt H275 : Contrôle « allèle sauvage »

mt Y275 : Contrôle « allèle muté »

water: Contrôle négatif (Eau PCR)

Souches de référence pandémique :

- Sensibles : **Danmk H275** (Danemark) - **Calif H275** (Californie)
- Résistante : **Tex Y275** (Texas)

Souches de référence saisonnières :

- Sensible : **Norw H275** (Norvège)
- Résistante : **Norw Y275** (Norvège)

Souches LGVR-IPA : **G176 pdm** – **G300 pdm** (Algérie)

G: Grippe ; *pdm* : pandémique.

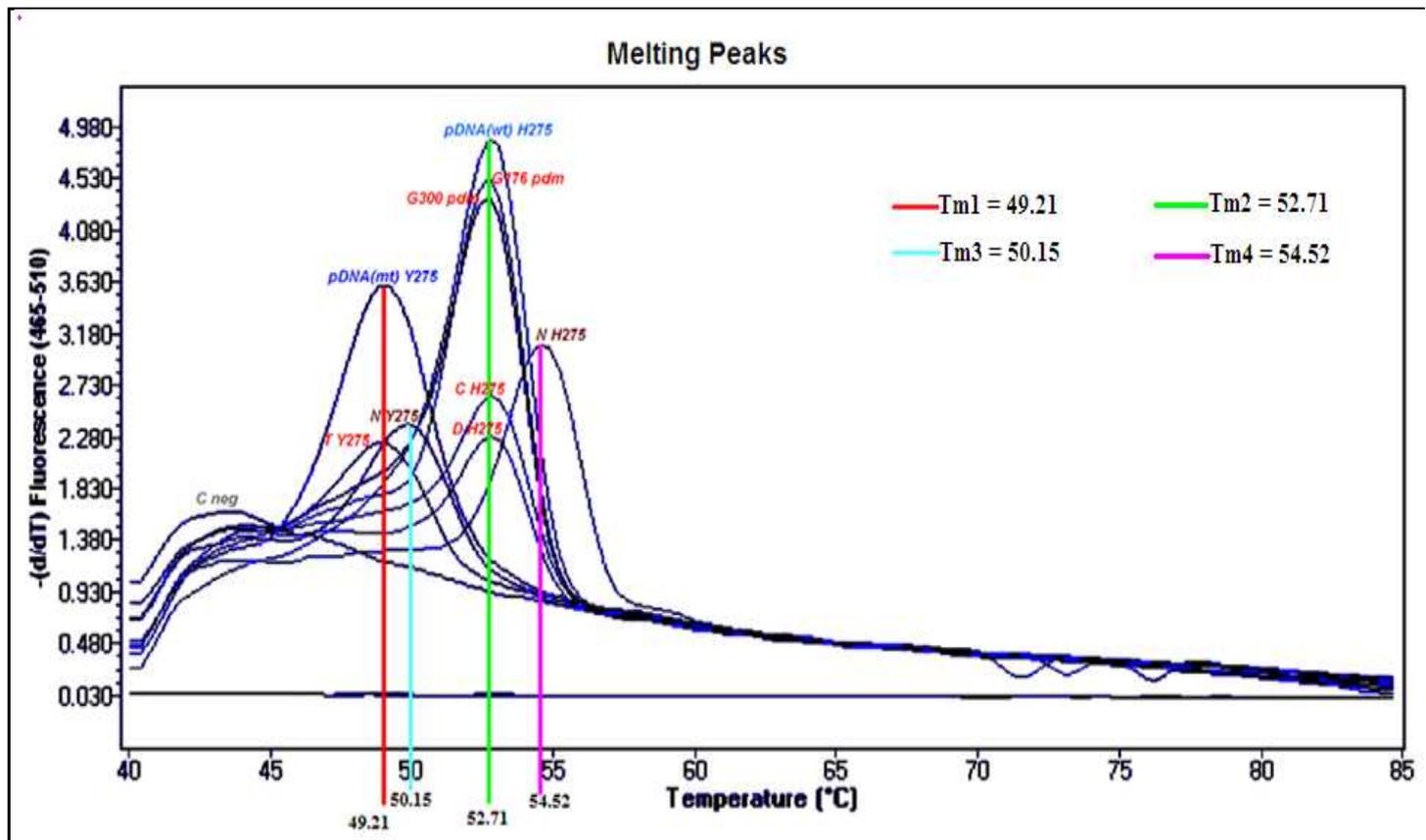


Figure 33 : Pics de fusion de la sonde fluorescente au niveau des allèles :
sauvage *H275* (sensible) et muté *Y275* (résistant).

Melting Peaks : Pics de Fusion

p : pandémique

wt : wild type - **mt :** mutant

pDNA(wt) H275 : Contrôle « allèle sauvage »

pDNA(mt) Y275 : Contrôle « allèle muté »

C neg : Contrôle négatif (Eau PCR)

G : Grippe - **pdm :** pandémique

Souches de référence pandémique :

- Sensibles : **D H275** (Danemark) - **C H275** (Californie)
- Résistante : **T Y275** (Texas)

Souches de référence saisonnières :

- Sensible : **N H275** (Norvège)
- Résistante : **N Y275** (Norvège)

Souches LGVR-IPA : **G176 pdm** – **G300 pdm** (Algérie)

III.2. DISCUSSION

Le présent travail a porté sur l'étude du profil de sensibilité du virus influenza de type A à l'oseltamivir, qui est l'antiviral le plus utilisé lors des épidémies et pandémies de grippe (**Thorlund *et al.*, 2011**).

En nous basant sur de nombreuses études ayant signalé l'émergence rapide et fréquente dans le monde de souches grippales résistantes porteuses de la mutation H275Y au cours du traitement à l'oseltamivir (**Calatayud *et al.*, 2011 ; Nguyen *et al.*, 2012 ; Okomo-Adhiambo *et al.*, 2010-b**), et notamment l'émergence en Algérie en 2007 de souches A/H1N1 saisonnières, nous avons réalisé ce travail sur le A/H1N1 pandémique qui a remplacé le A/H1N1 saisonnier (**Organisation Mondiale de la Santé, *www.who.int***) dans le but de détecter une éventuelle circulation de ce type de souches résistantes en Algérie. Pour cela nous avons appliqué deux techniques, une phénotypique par détermination des IC50 et une autre génotypique par discrimination allélique entre une souche sauvage (sensible) et une souche mutée (résistante).

Pour valider les résultats de notre étude, nous avons introduits dans nos tests des souches de référence OMS (fournies par le NIMR-UK et le CDC-USA).

La population ciblée était des malades Algériens chez qui le virus A/H1N1 pandémique a été isolé au LGVR-IPA durant la période allant de Juin à Décembre 2009. Par analyse statistique des données épidémiologiques de cette population, nous avons noté que plus de 2/3 de ces malades (70%) n'avaient pas quitté le territoire nationale avant leur infection ce qui nous amène à conclure que durant cette période le virus pandémique était bien installé en Algérie et que la transmission était majoritairement autochtone.

L'analyse du profil de sensibilité à l'oseltamivir des souches algériennes comparé à celui des souches de référence OMS a montré par détermination des IC50 que nos résultats se rapprochaient des valeurs obtenues par les souches OMS « sensibles ». Ce qui nous laisse supposer que le virus pandémique importé en Algérie durant cette période ne possédait pas la mutation H275Y.

Par ailleurs, concernant la mise au point de la technique phénotypique, les résultats des IC50 que nous avons obtenu étaient comparables à ceux obtenus par la littérature (**Baz *et al.*, 2010 ; Hurt *et al.*, 2012**), et ont montré que la test de chimiluminescence appliqué au virus influenza fournit une grande sensibilité pour la détection des IC50.

La détermination des IC50 est la méthode de référence utilisée pour la surveillance de la résistance du virus influenza aux inhibiteurs de la neuraminidase (**Okomo-Adhiambo *et al.*, 2012**). Cependant, afin de valider nos résultats, nous nous sommes référés à des travaux de plusieurs auteurs (**Bolotin *et al.*, 2009 ; Nakauchi *et al.*, 2011 ; Suzuki *et al.*, 2011**) pour mettre au point une technique génotypique basée sur la RT-PCR en temps réel par utilisation d'une sonde spécifique contenant des bases correspondant aux deux virus saisonnier et pandémique A/H1N1.

Une diminution de la température de fusion T_m est une indication de variation de base C \rightarrow T (mutation ponctuelle) à la position 275 du gène de la neuraminidase.

Les résultats obtenus de notre étude par cette technique moléculaire ont été corrélés avec ceux de la détermination des IC50. Alors, le profil génétique des souches étudiées correspondait au profil phénotypique. Cette observation est en accord avec celle rapportée par **Nguyen *et al.* (2012)**.

Concernant l'analyse des courbes de fusion obtenues par la technique génotypique (figure 33), nos résultats révèlent une différence dans le gène de la neuraminidase du virus A/H1N1 saisonnier (*N H275* et *N Y374*) comparé à celui du virus pandémique (*pDNA(wt) H275* et *pDNA(mt) Y275*). Nous pouvons voir sur la figure 33 que cette différence affecte la température de fusion T_m de la sonde donnant ainsi un décalage de quelques °C entre les pics T_m pandémiques et saisonniers :

- $T_{m1} = 49.21^\circ\text{C} \rightarrow T_{m3} = 50.15^\circ\text{C}$
- $T_{m2} = 52.71^\circ\text{C} \rightarrow T_{m4} = 54.52^\circ\text{C}$

Cette différence de profil génétique entre les virus A/H1N1 saisonnier et pandémique a été déjà observée par **Wong *et al* (2012)** dans une étude où ils démontrent que l'activité enzymatique de la neuraminidase d'un virus saisonnier était plus basse que celle d'un virus pandémique.

Il est à noter que nous n'avons pas décelé de résistance du virus A/H1N1 liée à la mutation H275Y durant la période pandémique Juin-Décembre 2009 en Algérie. Ce résultat est en accord avec celui rapporté par **Thorlund *et al* (2011)** dans une étude globale sur l'incidence de la résistance du virus grippal aux inhibiteurs de la neuraminidase dans le monde lors de la pandémie de 2009. L'auteur rapporte que la fréquence de la résistance à l'oseltamivir durant cette année était relativement faible (1%), ce qui nous amène à conclure que la souche A/H1N1pdm qui circulait en Algérie en 2009 était effectivement une souche sensible, et que l'échantillon de 70 malades était bien représentatif de la population globale Algérienne infectée (travail réalisé sur des malades originaires de plusieurs Wilayas d'Algérie). D'où la surveillance de la résistance à l'oseltamivir qui est suivie de près par le Système mondial OMS de surveillance et d'action afin de déceler des signes d'une augmentation suffisante du nombre de virus résistants pour représenter une menace pour la santé publique (**Organisation Mondiale de la Santé, www.who.int**).

CONCLUSION

Les antiviraux type inhibiteurs de la neuraminidase représente un complément d'un appui certain à la vaccination antigrippale car en cas de non compatibilité du vaccin annuel ou pandémique avec les souches circulantes ou en cas d'émergence d'un nouveau sous type viral (exemple : H5N1, H7N9...etc.) seuls ces inhibiteurs de la neuraminidase sont actifs sur ces virus en attendant la mise au point d'un vaccin adapté.

L'émergence récente de la mutation H275Y conférant au virus influenza A/H1N1 une résistance à l'oseltamivir soulève un problème de santé publique et nécessite une surveillance étroite de la résistance aux inhibiteurs de la neuraminidase (**Sheu *et al.*, 2008**).

L'évaluation de la sensibilité du virus grippal aux antiviraux par détermination des IC50 suivie d'une confirmation des résultats par une technique génotypique fournit une approche assez complète pour l'identification de souches virales résistantes (**Nguyen *et al.*, 2012**).

Les valeurs IC50 résultant de l'analyse phénotypique donnent des informations précieuses pour la détection de virus résistants, mais l'obtention de valeurs extrêmes « outliers » indique la nécessité d'un test moléculaire pour différencier une souche réellement résistante d'une souche sensible donnant une valeur aberrante.

Le but majeur de notre étude était de mettre au point des techniques fiables pour la surveillance épidémiologique de la résistance du virus grippal en Algérie, en tenant compte de la rapidité d'exécution des tests afin d'adapter le traitement antiviral. Nous avons obtenu, par les deux techniques phénotypique et génotypique, des résultats comparables à ceux fixés par l'OMS en termes de sensibilité et résistance du virus A/H1N1 (**WHO Global Influenza Surveillance Network, 2011**). Nous pouvons dire qu'une partie de l'objectif est atteinte par cette étude qui permettra de réaliser d'autres études sur des saisons de grippe complètes et surtout de caractériser la dynamique de ces virus résistants versus virus sensibles.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- Abt M., De Jonge J., Laue M., Wolff T., (2011). Improvement of H5N1 influenza vaccine viruses: Influence of internal gene segments of avian and human origin on production and hemagglutinin content. *Vaccine*, 29 (32) : 5153–5162
- 2- Akarsu H., (2005). Etudes structurales et fonctionnelles des protéines virales impliquées dans le trafic intracellulaire du génome du virus de la grippe. Thèse pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université Grenoble I - Joseph Fourier Spécialité : Biologie Structurale et Nanobiologie. Réf. 00011131, version 1.
- 3- Amiel C., (2010). Virus de la grippe et barrière d'espèce. *Revue Francophone Des Laboratoires*.423, 55-62.
- 4- Area E., Martin-Benito J., Gastaminza P., Torreira E., Valpuesta J.M., Carrascosa J.L., Ortin J., (2004). 3D structure of the influenza virus polymerase complex: localization of subunit domains. *Proc Nat Acad Sci*, 101: 308-313.
- 5- Baudin F., Petit I., Weissenhorn W., Ruigrok R. W., (2001). In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein. *Virology* 281(1): 102-108.
- 6- Baz M., Abed Y., Simon P., Hamelin M.E., Boivin G., (2010). 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. *JID*, 201 : 740- 745.
- 7- Bolotin S., Robertson A.V., Eshaghi A., De Lima C., E. Lombos E., Chong-King E., Burton L., Mazzulli T., Drews S.J., (2009). Development of a novel real-time reverse-transcriptase PCR method for the detection of H275Y positive influenza A H1N1 isolates. *Journal of Virological Methods*, 158 : 190–194.
- 8- Boulo S., Akarsu H., Ruigrok R. W., Baudin F., (2007). Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res*, 124: 12-21.
- 9- Bouscambert-Duchamp M., (2010). Etude du réassortiment génétique des virus influenza d'origines et de sous-types différents. Thèse Ecole Doctorale E2M2, Evolution, Ecosystème, Microbiologie et Modélisation. Université Claude Bernard – Lyon 1. Réf. 00733681, version 1.
- 10- Bui M., Whittaker G., Helenius A., (1996). Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *J Virol*, 70(12): 8391-8401.
- 11- Calatayud L., Lackenby A., Reynolds A., Menamin J.M., Phin N.F., Zambon M.C., Pebody R., (2011). Oseltamivir-Resistant Pandemic (H1N1) 2009 Virus Infection in England and Scotland, 2009–2010. *Emerging Infectious Diseases*, 17 (10) : 1807-1815.
- 12- Chen J., Lee K. H., Steinhauer D. A., Stevens D. J., Skehel J. J., Wiley D. C., (1998). Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell*, 95(3): 409-417.
- 13- Chen X., (2006). Structural Basis of Neuraminidase Inhibitors with Broad Spectrum Activity against Influenza. *Avian Flu Focus*, 1: 25-29.
- 14- Chenavas S, Monod A., Ruigrok R.W.H., Crépin T.,(2013). Le complexe de transcription et de réplication des virus influenza, une cible pour de nouvelles molécules antivirales. *Virologie*, 17 (1): 6-16
- 15- Collins P.J, Haire L.F., Lin Y.P., Liu J., Russell R.J., Walker P.A., Skehel J.J., Martin S.R., Hay A.J., Gamblin S.J., (2008). Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants. *Nature*, 453(26):1258-1262.

- 16- Colman P.M., Varghese J.N., Laver W.G., (1983). Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus NA. *Nature*, 303: 41-44.
- 17- Colman P. M. (2009). New antivirals and drug resistance. *Annu Rev Biochem*, 78: 95-118.
- 18- Deleage C., (2008). Etude des mécanismes contrôlant l'incorporation du génôme et le réassortiment génétique des virus influenza A aviaires et humains. Mémoire pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes- France. Réf. EPHE Banque de Monographies SVT.
- 19- Dias A., Bouvier D., Crepin T., (2009). The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature*, 458 : 914-918.
- 20- Duffau P., Moiton M.P., (2006). Une grippe exceptionnelle. *Médecine et maladies infectieuses*, 36: 473-475
- 21- Epelboin L., Macey J., (2009). *Maladies infectieuses et Transmissibles*. Editions Elsevier Masson: 92-93
- 22- Ferraris O., Lina B., (2008). Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. *J Clin Virol*, 41(1):13-19.
- 23- Ferraris O., Escuret V., Bouscambert-Duchamp M., Lina B., Morfin F., (2010). Intérêts des inhibiteurs de la neuraminidase dans la prise en charge des infections dues aux virus influenza. *Pathol Biol*, 58(2) : 69-78
- 24- Food and Drug Administration, (2006). Antiviral Product Development -Conducting and Submitting Virology Studies to the Agency *Guidance for Industry* : 1-14.
- 25- Gamblin S., (2004). The Structure and Receptor Binding Properties of the 1918 Influenza Hemagglutinin. *Science*, 303 : 1838.
- 26- Garman E., Laver G., (2005). The Structure, Function, and Inhibition of Influenza Virus Neuraminidase. *Viral Membrane Proteins: Structure, Function, and Drug Design*, edition Wolfgang Fischer, New York, pp: 247-267.
- 27- Gradel C. (2011). Étude des cas graves de grippe à virus A(H1N1)2009 à la Réunion en 2009-2010 : expérience du service de Réanimation du Centre Hospitalier Félix Guyon de Saint-Denis. Thèse pour l'obtention du Diplôme d'Etat de Docteur en Médecine, Université Bordeaux 2 - Victor Segalen U.F.R. Des Sciences Médicales. Réf. N°24.
- 28- Hannoun C., (1995). La grippe, éditions techniques – encyclopédie médico-chirurgicale, Paris France, Maladies Infectieuses, 8-069 A-10.
- 29- Hayden G.F, Pavia A.T., (2006). Antiviral management of seasonal and pandemic influenza. *J Infect Dis*, 194 :119-126.
- 30- Hay A.J., Collins P.J., Rupert J. Russell R.J., (2008). Antivirals and resistance. *Monogr Virol Basel Karger*, 27 : 252-271.
- 31- Hayden F.G., Atmar R.L., Schilling M., (1999). Use of the selective oral neuraminidase inhibitor oseltamivir to prevent influenza. *N Engl J Med*, 341:1336-1343.
- 32- Hayden F.G., Gubareva L.V., Monto A.S., (2000). Inhaled zanamivir for the prevention of influenza in families. *N Engl J Med*, 343:1282-1289.
- 33- Haut Conseil de la Santé Publique, France (2010). Stratégie vaccinale contre la grippe pour la saison 2010-2011. Aide mémoire sur la vaccination antigrippale.
- 34- Huang T. S., Palese P., and Krystal M., (1990). Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J Virol*, 64 (11): 5669-5673.
- 35- Huraux J.M., Nicolas J.C., Agut H., Peigue-Lafeuille H., (2003). *Traité de Virologie médicale*. Editions ESTEM : 439-456.

- 36- Hurt A.C., Hardie K., Wilson N.J., Deng Y.M., Osbourn M., Leang S.K., *et al*, (2012). Characteristics of a Widespread Community Cluster of H275Y Oseltamivir-Resistant A (H1N1)pdm09 Influenza in Australia. *JID*, 206 : 148-157.
- 37- Intapan P.M., Thanchomnang T., Lulitanond V., Phongsaskulchoti P., Maleewong W., (2008). Real-time Fluorescence Resonance Energy Transfer PCR with melting curve analysis for the detection of *Opisthorchis viverrini* in fish intermediate hosts. *Veterinary Parasitology*, 157 :65–71
- 38- Kimura N., Nishida M., Nagata K., Ishihama A., Oda K., Nakada S., (1992). Transcription of a recombinant influenza virus RNA in cells that can express the influenza virus RNA polymerase and nucleoprotein genes. *J Gen Virol* 73 (6): 1321-1328.
- 39- Kim C.U., Williams M.A., Lui H., Zhang L., Swaminathan S., Bischofberger N., (1997). 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*, 119 : 681-690.
- 40- Katz J., Hancock K., Veguilla V., Zhong W., Lu X.H., Sun H., Butler E., Dong L., Liu F., Li Z.N., DeVos J., Gargiullo P., Cox N., (2009). Serum Cross-Reactive Antibody Response to a Novel Influenza A (H1N1) Virus After Vaccination with Seasonal Influenza Vaccine. *Morbid Mortal Weekly Rep*, 58 (19) : 521-524
- 41- Khanna N., Steffen I., Studt J.D., Schreiber A., Lehmann T., Weisser M., (2009). Outcome of influenza infections in outpatients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis*, 11:100-105.
- 42- Kumar D., Morris M.I., Kotton C.N., Fischer S.A., Michaels M.G., Allen U., (2009). Guidance on novel influenza A/H1N1 in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*, 10: 18-25.
- 43- Lackenby A., (2008). Determination of influenza virus susceptibility to neuraminidase inhibitors using a fluorescent substrate. Protocole de laboratoire HPA-UK, Version 24.5.2008, Virgil Clinvir.
- 44- Lamoril J., Ameziane N., J.-C. Deybach J.C., Bouizegarène P., Bogard M.(2008). Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. *Immuno-analyse et Biologie Spécialisée*, 23 (5) : 260–279
- 45- Lagathu G., Colimon R., (2010). Grippe : vaccination, prophylaxie et traitement par les antiviraux. *Médecine thérapeutique*, 16 (4) : 357-373.
- 46- Lazarovits J., Roth M., (1988). A single amino acid change in the cytoplasmic domain allows the influenza virus hemagglutinin to be endocytosed through coated pits. *Cell*, 53(5): 743-752.
- 47- Li M.L., Rao P., Krug R.M., (2001). The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *Embo J*, 20: 2078-2086.
- 48- Luo G. X., Luytjes W., Enami M., Palese P., (1991). The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *J Virol*, 65(6): 2861-7.
- 49- Lowen A., Mubareka S., Steel J., Palese P., (2007). Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLOS pathogens*, 3(10): 1470-1475
- 50- Li M.L., Rao P., Krug R.M., (2001). The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *Embo J*, 20: 2078-2086.
- 51- Leruez-Ville M., (2006). Diagnostic virologique des infections respiratoires. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 46 : 538-542.

- 52- Manuguerra J.C, Hannoun C., (1999). Grippe et autres viroses respiratoires : surveillance et diagnostic de laboratoire. Methodes de laboratoire – Institut Pasteur France.
- 53- Marmier E., Llavador V., Malato L., Roncin L., Fleury H.J., (2010). La résistance du virus de la grippe aux antiviraux : méthodes d'identification. *Revue Francophone des Laboratoires*, 422: 63-68
- 54- Moscona A., (2005). Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med*, 353:1363-1373.
- 55- Munier S., Moisy D., Marc D., Naffakh N., (2010). Interspecies transmission, adaptation to humans and pathogenicity of animal influenza viruses. *Pathol Biol*, 58(2): 59-68.
- 56- Naffakh N., Dos Santos E.A., Escriou N., Van der Werf S., (2006). Développement et applications de la génétique inverse des virus grippaux. *Virologie*, 10 (1) : 21-33.
- 57- Naffakh N., Tomoiu A., Rameix-Welti M.A., Van Der Werf S., (2008). Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins. *Annu Rev Microbiol*, 62 : 403-424.
- 58- Nakauchi M., Ujike M., Obuchi M., Takashita E., Takayama I., Ejima M., Oba K., Konomi N., Odagiri T., Tashiro M., Kageyama T., (2011). Rapid Discrimination of Oseltamivir-Resistant 275Y and -Susceptible 275H Substitutions in the Neuraminidase Gene of Pandemic Influenza A/H1N1 2009 Virus by Duplex One-Step RT-PCR Assay. *J. Med. Virol*, 83: 1121–1127.
- 59- Neumann G., Hughe M.T., Kawaoka Y., (2000). Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *Embo J*, 19: 6751-6758.
- 60- Neumann G., Noda T., Kawaoka Y., (2009). Emergence and pandemic potential of swine origine H1N1 influenza virus. *Nature*, 459: 931-939.
- 61- Nguyen H.T., Fry A.M., Gubareva L.V., (2012). Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods. *Antiviral Therapy*, 17 : 159-173.
- 62- Ninove L., (2010). Diagnostic biologique de la grippe pandémique A/H1N1. Cours de virologie. Laboratoire de Virologie Hopital La Timone, Unite des Virus Emergents Faculte de Medecine, France.
- 63- Nishimura K., Kim S., Zhang L., Cross T. A., (2002). The closed state of a H+ channel helical bundle combining precise orientational and distance restraints from solid state NMR. *Biochemistry*, 41(44): 13170-13177.
- 64- Okomo-Adhiambo M., Nguyen H.T., Sleeman K., Sheu T.G., Deyde V.M., Garten R.J., (2010-a). Host cell selection of influenza neuraminidase variants: implications for drug resistance monitoring in A(H1N1) viruses. *Antiviral Res*, 85(2):381-388.
- 65- Okomo-Adhiambo M., Sleeman K., Ballenger K., Nguyen H.T., Mishin V.P., Sheu T.G., Smagala J., Li Y., Klimov A.I., Gubareva L.V., (2010-b). Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Testing in Human Influenza Viruses: A Laboratory Surveillance Perspective. *Viruses*, 2 : 2269-2289
- 66- Okomo-Adhiambo M., Sheu T.G., Gubareva L.V., (2012). Assays for monitoring susceptibility of influenza viruses to neuraminidase inhibitors. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 7(Suppl. 1), 44–49.
- 67- Palese P., Ueda M., Tobita K., Compans R.W., (1974). Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology*, 61: 397-410.
- 68- Pinto L.H., Holsinger L.J., Lamb R.A., (1992). Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*, 69: 517-528.

- 69- Peiris J.S., Poon L.L.M., Guan Y., (2009). Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S-OIV)n H1N1 virus in humans. *Journal of Clinical Virology*,45: 169-173.
- 70- Plotch S.J., Bouloy M., Ulmanen I., Krug R.M., (1981). A unique cap (m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell*, 23 : 847-858.
- 71- Poitras E., Houde A., (2002). La PCR en temps réel : principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*, 2(2): 2-11.
- 72- Potter C.W., (2000). *Influenza. Principles and practice of clinical virology*.4eme edition: 253-277.
- 73- Rogers G.N., Paulson J.C., (1983). 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.
- 74- Ruigrok R. W., Barge A., Durrer P., Brunner J., Ma K., Whittaker G. R., (2000). Membrane interaction of influenza virus M1 protein. *Virology*, 267(2): 289-298.
- 75- Russell R.J., Haire L.F., Stevens D.J., Collins P.J., Lin Y.P., Blackburn G.M., Hay A.J., Gamblin S.J., Skehel J.J., (2006). The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature*, 443: 45-49.
- 76- Scheiffele P., Rietveld A., Wilk T., Simons K., (1999). Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *J Biol Chem*, 274: 2038-2044.
- 77- Sheu T.G., Deyde V.M., Okomo-Adhiambo M., Garten R.J., Xu X., Bright R.A., Butler E.N., Wallis T.R., Klimov A.I., Gubareva L.V., (2008). Surveillance for Neuraminidase Inhibitor Resistance among Human Influenza A and B Viruses Circulating Worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 52 (9): 3284-3292.
- 78- Steven J., Gamblin L., Skehel J.J., (2010). Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase Membrane Glycoproteins. *The journal of biological chemistry*,285,(37): 28403–28409.
- 79- Suzuki Y., Saito R., Sato I., Zaraket H., Nishikawa M., Tamura T., Daput C., Caperig-Daput I., Baranovich T., Suzuki T., Suzuki H., (2011). Identification of Oseltamivir Resistance among Pandemic and Seasonal Influenza A (H1N1) Viruses by an His275Tyr Genotyping Assay Using the Cycling Probe Method. *J Clin Microbiol*, 49 (1) : 125–130.
- 80- Thorlund K., Awad T., Boivin G., Thabane L., (2011). Systematic review of influenza resistance to the neuraminidase inhibitors. *BMC Infectious Diseases*, 11:134-146.
- 81- TIB MOLBIOL- Roche Diagnostics, (2010). LightMix Kit Influenza A Virus HxN1 Tamiflu resistance [H274Y]. Procedure For Life Science Research, Version 100824.
- 82- Tiley L. S., Hagen M., Matthews J. T., Krystal M., (1994). Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5' ends of the viral RNAs. *J Virol* 68(8): 5108-5116.
- 83- Trifonov V., Khiabani H., Rabadan R., (2009). Geographic Dependence, Surveillance, and Origins of the 2009 Influenza A (H1N1) Virus. *N Engl J Med*, 361:115-119.
- 84- Vabret A., Dina J., Cuvillon-Nimal D., (2010). La grippe saisonnière. *Pathologie Biologie*, 58 : 51-57
- 85- Vincent C. C., Cheng A.B., Kelvin K.W., To A.C., Herman Tse A.C., Ivan F. N., Hung C.D., Kwok-Yung Yuena C., (2012).Two Years after Pandemic Influenza A/2009/H1N1: What Have We Learned? *Clin. Microbiol.Rev.*, 25(2): 223–263

- 86- Wang X., Li M., Zheng H., Muster T., Palese P., Beg A.A., Garcia-Sastre A., (2000). Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. *J Virol*, 74: 11566-11573.
- 87- Wetherall N.T., Trivedi T., Zeller J., Hodges-Savola C., McKimm-Breschkin J.L., Zambon M., Hayden F.G., (2003). Evaluation of Neuraminidase Enzyme Assays Using Different Substrates To Measure Susceptibility of Influenza Virus Clinical Isolates to Neuraminidase Inhibitors: Report of the Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Network. *J. CLIN. MICROBIOL.*, 41(2) : 742-750.
- 88- WHO Global Influenza Surveillance Network (2011). Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. World Health Organization.
- 89- Wong D.D.Y., Choy K.T., Chan R.W.Y., Sia S.F., Chiu H.P., Cheung P.P.H., Chan M.C.W., Peiris M., Yen H.L., (2012). Comparable Fitness and Transmissibility between Oseltamivir- Resistant Pandemic 2009 and Seasonal H1N1 Influenza Viruses with the H275Y Neuraminidase Mutation. *Journal of Virology*, 86 (19):10558–10570.
- 90- Yen H.L, Hoffmann E., Taylor G., Monto A.S., Webster R.G., Govorkova E.A., (2006). Importance of neuraminidase active-site residues to the neuraminidase inhibitor resistance of influenza viruses. *J Virol*, 80 (17):8787-8795.
- 91- Zimmer Shanta M., Burke Donald S., (2009). Historical perspective – Emergence of Influenza (H1N1) Viruses, *New England Journal of Medicine*, 361 : 279-285.

ANNEXES

Annexe 1 : Prélèvement rhinopharyngé pour la recherche du virus Influenza (Manuguerra et Hannoun, 1999)

Matériel

- Ecouvillon stérile (Cultiplast SWAB, Photo 5)
- Tube contenant un milieu de transport viral additionné d'antibiotiques et d'antifongiques (Becton Dickinson, Photo 6).
- Glacière contenant de la glace pour le transport des prélèvements

Réalisation des frottis :

Le prélèvement est réalisé par grattage des parois internes des narines ou des zones inflammatoires au fond de la gorge : introduire l'écouvillon dans le conduit nasal jusqu'à atteindre le nasopharynx (environ 7 cm de l'arcade chez l'adulte), puis faire 2 rotations, retirer l'écouvillon, le plier et l'introduire directement dans le tube. Ensuite, effectuer un frottis pharyngé avec un 2ème écouvillon en frottant les 2 amygdales et la paroi postérieure du pharynx, puis le déposer dans le même tube qui contiendra ainsi 2 écouvillons. Coller l'étiquette correspondante du patient, puis, stocker le prélèvement à 4C° jusqu'à son acheminement par express au Laboratoire de Virologie.



Photo 5 : Ecouvillon pour prélèvement rhinopharyngé



Photo 6 : Milieu de transport viral

Annexe 2 : Isolement des virus grippaux sur cellules MDCK en culture (Manuguerra et Hannoun, 1999)

Réactifs et matériel

- Cellules MDCK en plaque de 12 cupules, prêtes à être inoculées (confluentes)
- Prélèvement à traiter
- Solution saline de Hanks
- Etuve à CO₂ (SANYO, Photo 7)
- MEM-tricine ou milieu de Leibovitz selon que l'on dispose ou non d'une étuve à CO₂
- Trypsine à 1mg/ml à diluer extemporanément pour une concentration finale de 2µg/ml.

Protocole

- Aspirer avec précaution le milieu de culture, rincer deux fois avec 2ml de solution de Hanks.
- Inoculer 150µl de chacun des prélèvements sur deux cupules marquées au préalable.
- Incuber à la température du laboratoire, à l'abri de la lumière, pendant 30 à 45 minutes.
- Ajouter 2ml de milieu MEM-tricine réchauffé à 37°C, sans sérum, contenant 2 à 10µg/ml de trypsine.
- Mettre les plaques de 12 cupules dans une étuve à CO₂ à 35°C
- A 48 heures, effectuer sur le liquide de culture une hémagglutination avec les globules rouges de cobaye (Annexe 4)



Photo 7 : Etuve à CO₂

Annexe 3 : Détection des antigènes viraux par immunofluorescence indirecte (IFI) (Manuguerra et Hannoun, 1999)

Réactifs et matériel

- Fixateur et saturateur : Acétone conservé à -20°C .
- Tampon : PBS et Tris-HCl 0,1 M.
- Anticorps dirigés contre un ou plusieurs antigènes (monoclonaux = anticorps de souris, polyclonaux = anticorps de lapin)
- Anticorps anti-espèce par exemple de chèvre anti-souris ou anti-lapin) marqués à la fluorescéine.
- Lames pour immunofluorescence (Flow Labs, photo 8)
- Centrifugeuse réfrigérée (Jouan, photo 9)
- Tubes à centrifuger
- Microscope à fluorescence (Nikon, photo 10)

Protocole

- Centrifuger le prélèvement pendant 5 minutes à 500 g à $+4^{\circ}\text{C}$
- Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 10ml de PBS froid ($+4^{\circ}\text{C}$), agiter doucement et centrifuger de nouveau pendant 5 minutes à 500g à $+4^{\circ}\text{C}$. Faire 3 lavages.
- Reprendre le culot dans 500 μl de PBS froid ($+4^{\circ}\text{C}$). Agiter pour homogénéiser la suspension
- Déposer 150 μl de suspension cellulaire dans les zones de la lame pour immunofluorescence
- Sécher à la température du laboratoire puis fixer à l'acétone portée au préalable à -20°C en mettant la lame à -20°C pendant 15 min
- Déposer pour chaque virus à détecter 50 μl de solution d'anticorps spécifiques sur chaque puits de la lame.
- Incuber 30 min dans une étuve à 37°C en chambre humide.
- Laver 3 fois avec de grands volumes de PBS.
- Déposer une goutte d'un mélange 50-50 de glycérol et de Tris-HCl 0,1 M.
- Apposer une lame et observer au microscope à fluorescence : La fluorescence révèle la positivité du prélèvement (Photo 11)



Photo 8 : Lame pour immunofluorescence



Photo 9 : Centrifugeuse réfrigérée



Photo 10 : Microscope à fluorescence

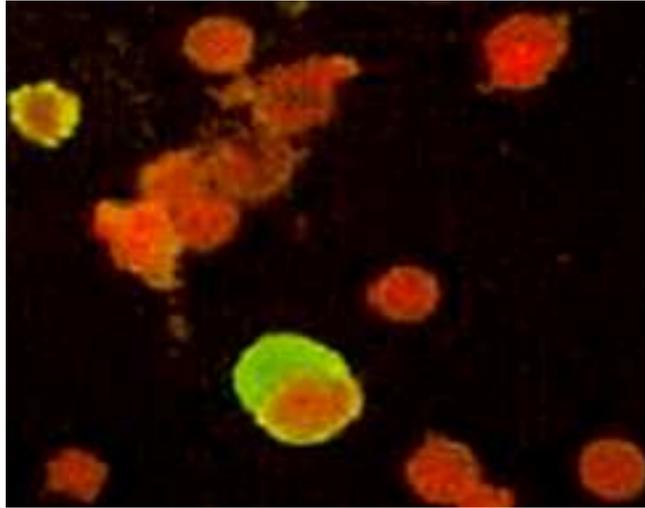


Photo 11: Mise en évidence des antigènes viraux intracellulaires par la technique d'Immunofluorescence. Des inclusions vertes sont retrouvées dans les cellules infectées (Ninove, 2010).

Annexe 4 : Titrage et Identification des virus grippaux par les tests d'Hémagglutination et d'Inhibition de l'Hémagglutination (IHA) (WHO Global Influenza Surveillance Network, 2011).

Le test IHA utilise des plaques de microtitration. Des dilutions en série (au 1/2) du virus sont préparées, mélangés avec une quantité spécifique de globules rouges, et ajoutés aux puits d'une plaque de microtitration. Les globules rouges qui ne sont pas liés aux virus se déposent au fond du puits et forment un point rouge, alors que ceux qui sont attachés à des particules virales forment un anneau qui recouvre le puits. Le test peut être effectué en 1 heure, et est donc un indicateur rapide des quantités relatives des particules virales dans l'échantillon.

1- Titrage de l'antigène = test d'Hémagglutination

Réactifs et matériel

- Souches de virus à titrer (surnageant de culture cellulaire)
- PBS
- Suspension d'hématies de cobaye à 0,5 % : le sang est recueilli sur anticoagulant. Avant usage, laver le culot 3 fois dans du PBS avant de préparer la suspension de travail à 0,5% en PBS
- Microplaques à 96 cupules (fond de la cupule en « V »)
- Pipette multicanaux
- Micropipettes

Protocole

- Utiliser une microplaque à 96 cupules en suivant les indications sur la figure 34 (affecter une rangée de 8 cupules pour chaque virus à titrer):

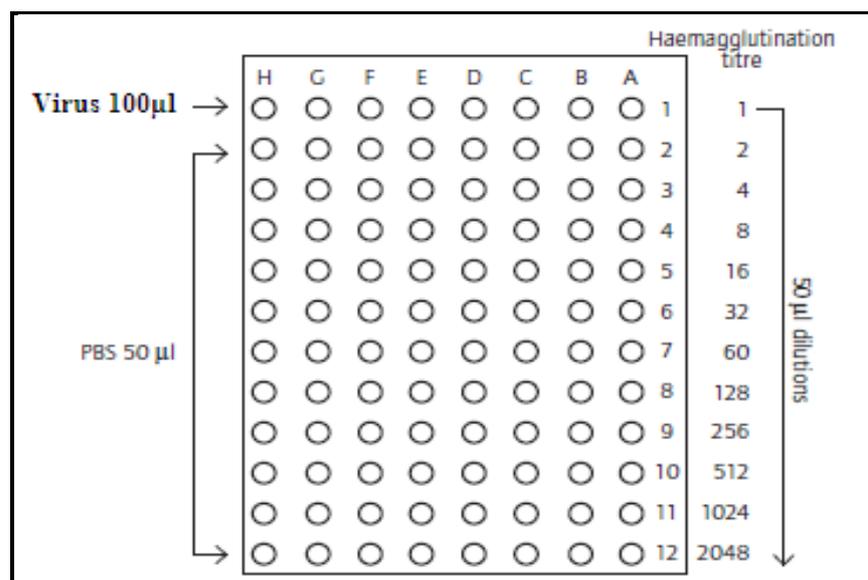


Figure 34 : Titrage et Identification des virus grippaux par le test d'Hémagglutination (WHO Global Influenza Surveillance Network, 2011).

- Après l'addition de 50µl d'hématies, laisser sédimenter 1h au moins à la température du laboratoire ; puis lire le titre du virus : il est indiqué par la dilution la plus élevée donnant encore une hémagglutination complète (figure 35).

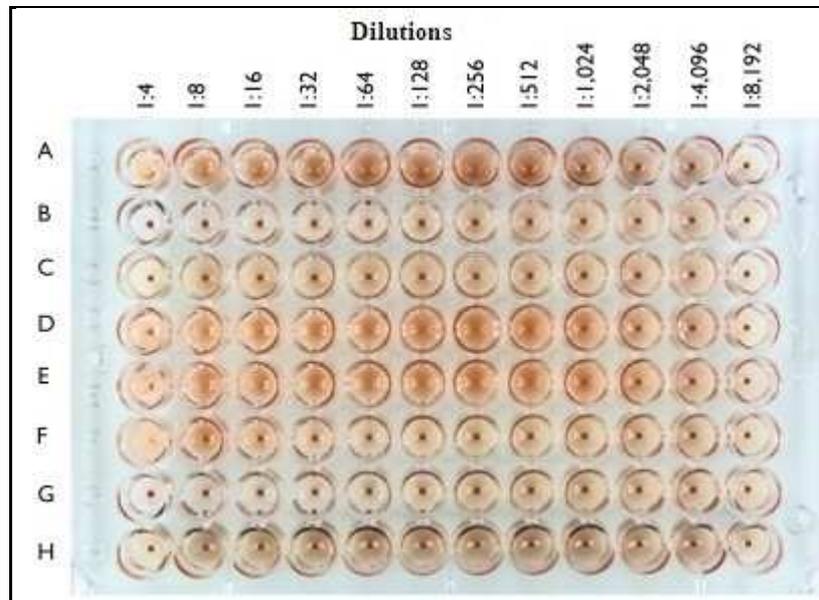


Figure 35: Test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) (**Katz *et al.*, 2009**).

2- Inhibition de l'Hémagglutination (IHA)

Réactifs et matériel

- Souches de virus à titrer (surnageant de culture cellulaire)
- PBS
- Suspension d'hématies de cobaye à 0,5 % : le sang est recueilli sur anticoagulant. Avant usage, laver le culot 3 fois dans du PBS avant de préparer la suspension de travail à 0,5% en PBS
- Sérums de référence :
 - influenza A(H1N1) antiserum;
 - influenza A(H3N2) antiserum;
 - influenza B (B/Yamagata/16/88 lineage) antiserum;
 - influenza B (B/Victoria/02/87 lineage) antiserum;
 - Sérum contrôle négatif
- Microplaques à 96 cupules (fond de la cupule en « V »)
- Pipette multicanaux
- Micropipettes

Protocole (Figure 36)

- Ajouter 25µl de PBS dans chaque cupule des lignes B à H
- Ajouter 50µl de chaque sérum : sérum 1, cupules A1 et A8; sérum 2, A2 et A9; etc.

- Ajouter 50µl de PBS aux premières cupules des colonnes 6 et 7 (A6 et A7) pour le témoin hématies (RBC control)
- Faire des dilutions au 1/2 du sérum en faisant des transferts de volume de 25µl, puis rejeter les derniers 25µl
- Ajouter 50µl d'hématies dans toutes les cupules de la plaque
- Laisser 1 h à la température du laboratoire
- Lire les titres des sérums et déterminer le type du virus

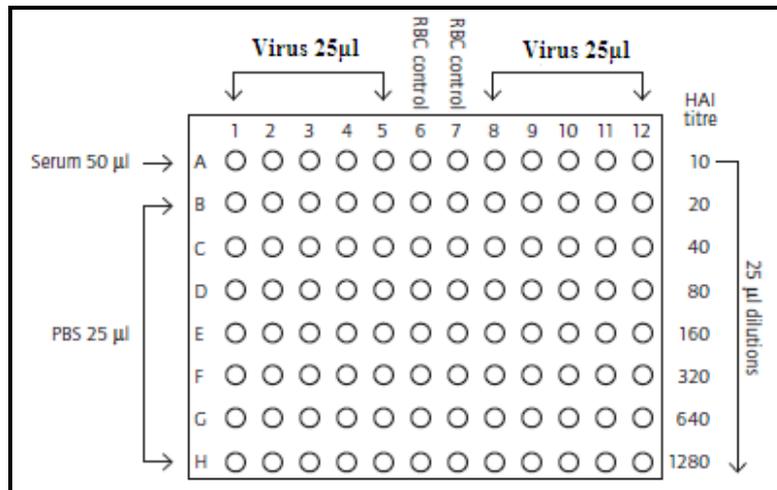


Figure 36 : Inhibition de l'Hémagglutination (IHA)
(WHO Global Influenza Surveillance Network, 2011).
RBC control = Red Blood Cell contrôle (hématies seules)

Annexe 5

Tableau XI : Renseignements relevés sur les 70 malades chez qui le virus A (H1N1)2009 a été isolé au LGVR - IPA

	Numéro d'enregistrement	Sexe	Age	Wilaya	Voyage récent (< 07 jours)
1	G31/09 H1N1 pdm	F	32	BEDJAIA	NON
2	G34/09 H1N1 pdm	F	25	ALGER	France
3	G35/09 H1N1 pdm	F	35	BISKRA	NON
4	G36/09 H1N1 pdm	F	15 mois	BLIDA	NON
5	G65/09 H1N1 pdm	M	35	ALGER	NON
6	G71/09 H1N1 pdm	M	35	SKIKDA	France + Espagne
7	G72/09 H1N1 pdm	M	52	TIZI OUZOU	NON
8	G73/09 H1N1 pdm	F	59	GUELMA	ARABIE SAOUDITE
9	G74/09 H1N1 pdm	F	39	TLEMCEN	NON
10	G75/09 H1N1 pdm	M	12	ADRAR	NON
11	G76/09 H1N1 pdm	M	70	TIZI OUZOU	NON
12	G77/09 H1N1 pdm	M	31	OUARGLA	NON
13	G78/09 H1N1 pdm	F	25	SKIKDA	NON
14	G79/09 H1N1 pdm	M	75	SKIKDA	ARABIE SAOUDITE
15	G80/09 H1N1 pdm	F	55	BENI SAF	NON

G : Grippe

pdm : pandémie

F : sexe Féminin

M : sexe Masculin

Tableau XI (suite) : Renseignements relevés sur les 70 malades chez qui le virus A (H1N1)2009 a été isolé au LGVR – IPA

	Numéro d'enregistrement	Sexe	Age	Wilaya	Voyage récent (< 07 jours)
16	G81/09 H1N1 pdm	F	49	ALGER	NON
17	G82/09 H1N1 pdm	M	06 mois	BOUMERDES	NON
18	G83/09 H1N1 pdm	F	45	BISKRA	NON
19	G84/09 H1N1 pdm	F	46	ORAN	QATAR
20	G85/09 H1N1 pdm	M	7	TIZI OUZOU	NON
21	G86/09 H1N1 pdm	F	56	ALGER	NON
22	G87/09 H1N1 pdm	M	34	BBA	ARABIE SAOUDITE
23	G90/09 H1N1 pdm	F	3	ALGER	ROYAUME UNI
24	G91/09 H1N1 pdm	F	8	ORAN	France
25	G93/09 H1N1 pdm	F	3	TIPAZA	NON
26	G95/09 H1N1 pdm	F	36	ALGER	BRESIL
27	G120/10 H1N1 pdm	F	29	SKIKDA	NON
28	G123/10 H1N1 pdm	F	24	SETIF	NON
29	G139/10 H1N1 pdm	F	36	EL BAYADH	NON
30	G142/10 H1N1 pdm	F	33	EL BAYADH	NON
31	G145/10 H1N1 pdm	F	9	TISSEMSILT	ROYAUME UNI
32	G146/10 H1N1 pdm	M	17	EL OUED	NON

G : Grippe

pdm : pandémie

F : sexe Féminin

M : sexe Masculin

Tableau XI (suite) : Renseignements relevés sur les 70 malades chez qui le virus A (H1N1)2009 a été isolé au LGVR - IPA

	Numéro d'enregistrement	Sexe	Age	Wilaya	Voyage récent (< 07 jours)
33	G149/10 H1N1 pdm	M	45	EL OUED	NON
34	G150/10 H1N1 pdm	M	60	EL OUED	NON
35	G151/10 H1N1 pdm	F	70	EL OUED	NON
36	G155/10 H1N1 pdm	F	29	CHLEF	NON
37	G156/10 H1N1 pdm	F	27	ALGER	NON
38	G157/10 H1N1 pdm	F	31	ALGER	NON
39	G160/10 H1N1 pdm	M	24	ADRAR	NON
40	G161/10 H1N1 pdm	M	68	ALGER	NON
41	G162/10 H1N1 pdm	M	21	ALGER	MALTE
42	G165/10 H1N1 pdm	M	5	CONSTANTINE	NON
43	G166/10 H1N1 pdm	M	7	CONSTANTINE	NON
44	G168/10 H1N1 pdm	F	23	SETIF	France
45	G169/10 H1N1 pdm	M	68	ORAN	GRECE
46	G171/10 H1N1 pdm	M	43	MOSTAGANEM	FRANCE
47	G172/10 H1N1 pdm	M	75	ALGER	ARABIE SAOUDITE
48	G173/10 H1N1 pdm	F	24	SETIF	ALEMAGNE
49	G176/10 H1N1 pdm	F	38	CONSTANTINE	NON
50	G300/10 H1N1 pdm	M	57	BOUMERDES	NON
51	G302/10 H1N1 pdm	F	35	ALGER	NON
52	G304/10 H1N1 pdm	M	41	ALGER	NON

G :Grippe

pdm : pandémie

F : sexe Féminin

M : sexe Masculin

Tableau XI (suite) : Renseignements relevés sur les 70 malades chez qui le virus A (H1N1)2009 a été isolé au LGVR – IPA

	Numéro d'enregistrement	Sexe	Age	Wilaya	Voyage récent (< 07 jours)
53	G310/10 H1N1 pdm	F	75	ANNABA	NON
54	G312/10 H1N1 pdm	M	49	ANNABA	NON
55	G313/10 H1N1 pdm	M	46	ALGER	NON
56	G316/10 H1N1 pdm	F	33	BOUIRA	NON
57	G319/10 H1N1 pdm	F	60	ALGER	ARABIE SAOUDITE
58	G322/10 H1N1 pdm	F	03 mois	BLIDA	NON
59	G323/10 H1N1 pdm	F	41	ALGER	NON
60	G324/10 H1N1 pdm	M	91	KHENCHLA	NON
61	G327/10 H1N1 pdm	F	28	ALGER	Espagne
62	G329/10 H1N1 pdm	F	24	BOUIRA	NON
63	G330/10 H1N1 pdm	F	10	MEDEA	NON
64	G332/10 H1N1 pdm	F	8	ALGER	NON
65	G339/10 H1N1 pdm	M	20	SIDI BELABES	TUNISIE
66	G346/10 H1N1 pdm	F	20	ORAN	NON
67	G348/10 H1N1 pdm	F	13	ORAN	NON
68	G350/10 H1N1 pdm	M	54	ADRAR	NON
69	G421/10 H1N1 pdm	F	32	MEDEA	EGYPTE
70	G429/10 H1N1 pdm	M	32	ALGER	Espagne

G : Grippe

pdm : pandémie

F : sexe Féminin

M : sexe Masculin

Annexe 6 : Statistiques descriptives des patients

- Age :

Rappels : $SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$

SE (standard error of mean) avec SD (standard deviation) égale à s, écart-type estimé, tel que

$$\frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}}$$

	Masculin (n=29)	Féminin (n=41)	Global (n=70)
Moyenne±SE	40,5±4,5	31,0±2,9	34,9±2,5
Médiane	41,0	31,0	33,0
Age minimum	6 mois	3 mois	
Age maximum	91,0	75,0	

$$\text{Sex ratio} = \frac{n(\text{Mas})}{n(\text{Fém})} = \frac{29}{41} = 0,7073 \approx 70,7\%$$

- Distribution dans les classes d'âges :

Classes d'âges (ans)	Féminin n (%)	Masculin n (%)	Total n (%)
[0-1[ans	1 (1,43%)	1 (1,43%)	2 (2,86%)
[1-5[ans	3 (4,29%)	0 (0,00%)	3 (4,29%)
[5-10[ans	3 (4,29%)	3 (4,29%)	6 (8,57%)
[10-15[ans	2 (2,86%)	1 (1,43%)	3 (4,29%)
[15-20[ans	0 (0,00%)	1 (1,43%)	1 (1,43%)
[20-30[ans	11 (15,71%)	3 (4,29%)	14 (20,00%)
[30-40[ans	11 (15,71%)	5 (7,14%)	16 (22,86%)
[40-50[ans	4 (5,71%)	5 (7,14%)	9 (12,86%)
[50-60[ans	3 (4,29%)	3 (4,29%)	6 (8,57%)
[60-70[ans	1 (1,43%)	3 (4,29%)	4 (5,71%)
[70 ans et +	2 (2,86%)	4 (5,71%)	6 (8,57%)
Total	41 (58,57%)	29 (41,43%)	70 (100,00%)

- **Notion de voyage récent. Pourcentage de cas par pays de provenance :**

Category	Frequency table: Var9 (Patients.sta)			
	Count	Cumulative Count	Percent	Cumulative Percent
N'ont pas voyagé	49	49	70,0	70,0
Arabie Saoudite	5	54	7,1	77,1
France	4	58	5,7	82,9
Royaume Uni	2	60	2,9	85,7
Espagne	2	62	2,9	88,6
Allemagne	1	63	1,4	90,0
Brésil	1	64	1,4	91,4
Egypte	1	65	1,4	92,9
France, Espagne	1	66	1,4	94,3
Grèce	1	67	1,4	95,7
Malte	1	68	1,4	97,1
Qatar	1	69	1,4	98,6
Tunisie	1	70	1,4	100,0
Missing	0	70	0,0	100,0

- **Répartition des cas autochtones par Wilaya :**

Category	Frequency table: Wilayas (Patients n'ayant pas voyagé.sta)			
	Count	Cumulative Count	Percent	Cumulative Percent
Alger	11	11	22,4	22,4
Oran	2	13	4,1	26,5
El Oued	4	17	8,2	34,7
Skikda	2	19	4,1	38,8
Adrar	3	22	6,1	44,9
Constantine	3	25	6,1	51,0
Sétif	1	26	2,0	53,1
Tizi Ouzou	3	29	6,1	59,2
Blida	2	31	4,1	63,3
Annaba	2	33	4,1	67,3
Biskra	2	35	4,1	71,4
Bou Merdes	2	37	4,1	75,5
Bouira	2	39	4,1	79,6
El Bayadh	2	41	4,1	83,7
Médéa	1	42	2,0	85,7
Béjaia	1	43	2,0	87,8
Béni Saf	1	44	2,0	89,8
Chlef	1	45	2,0	91,8
Khenchela	1	46	2,0	93,9
Ouargla	1	47	2,0	95,9
Tipaza	1	48	2,0	98,0
Tlemçen	1	49	2,0	100,0
Missing	0	49	0,0	100,0

Annexe 7 : Valeurs des IC50 (colonne en violet) de toutes les souches testées, obtenues par le programme « Point-to-Point » (NIMR-UK). Nombre d'essais réalisés : 6 Essais.

Essai 1 :

Nom de la souche	IC50	Mean IC50
A/Norway/1758/2007 H1N1- Seasonal – H275 - SENS	0,282276673 0,305180698	0,29
A/Norway/1735/2007 H1N1 - Seasonal – Y275 - RESIST	114,3244219 123,2492419	
A/Denmark/524/2009 H1N1- Pandemic - H275 - SENS	0,646419604 0,540265921	0,59
A/Denmark/528/2009 H1N1- Pandemic - Y275 - RESIST	218,9335554 135,0346484	176,98

Essai 2 :

Nom de la souche	IC50	Mean IC50
G31/09 H1N1 pdm	0,314870713	0,30
	0,288131195	
G34/09 H1N1 pdm	0,241337091	0,26
	0,274902551	
G35/09 H1N1 pdm	0,466034803	0,47
	0,480320314	
G36/09 H1N1 pdm	0,55314642	0,43
	0,30505618	
G65/09 H1N1 pdm	0,315267993	0,28
	0,244960066	
G71/09 H1N1 pdm	0,367255622	0,38
	0,402028594	
G72/09 H1N1 pdm	0,335041386	0,32
	0,299773234	
G73/09 H1N1 pdm	0,277526246	0,26
	0,247272082	
G74/09 H1N1 pdm	0,306691823	0,36
	0,409224694	
G75/09 H1N1 pdm	0,555142604	0,45
	0,353458263	
G76/09 H1N1 pdm	0,520056386	0,48
	0,432877641	
G77/09 H1N1 pdm	0,39067079	0,44
	0,479600341	
G78/09 H1N1pdm	0,344852601	0,36
	0,374295114	
G79/09 H1N1 pdm	0,487853597	0,50
	0,516836481	
A/Norway/1758/2007 H1N1- Seasonal – H275 - SENS	0,421698258	0,45
	0,48543269	
A/Norway/1735/2007 H1N1 - Seasonal – Y275 - RESIST	114,7843379	113,97
	113,1564932	
A/Denmark/524/2009 H1N1- Pandemic - H275 - SENS	0,534125354	0,53
	0,517646246	
A/Denmark/528/2009 H1N1- Pandemic - Y275 - RESIST	240,5745507	212,48
	184,3831388	

Essai 3 :

Nom de la souche	IC50	Mean IC50
G80/09 H1N1 pdm	0,387671652 0,37366567	0,38
G81/09 H1N1 pdm	0,630614802 0,389981668	0,51
G82/09 H1N1 pdm	0,149149022 0,168785687	0,16
G83/09 H1N1 pdm	0,244979344 0,271700089	0,26
G84/09 H1N1 pdm	0,247725524 0,275466755	0,26
G85/09 H1N1 pdm	0,264522887 0,254882129	0,26
G86/09 H1N1 pdm	0,251816691 0,214126281	0,23
G87/09 H1N1 pdm	0,292117031 0,241768973	0,27
G90/09 H1N1 pdm	0,224680639 0,283580209	0,25
G91/09 H1N1 pdm	0,304740157 0,239559967	0,27
G93/09 H1N1 pdm	0,310360619 0,306594799	0,31
G95/09 H1N1 pdm	0,32269505 0,335702863	0,33
G120/10 H1N1 pdm	0,40915079 0,388739145	0,40
G123/10 H1N1 pdm	0,549638829 0,488465208	0,52
A/Denmark/524/2009 H1N1- Pandemic - H275 - SENS	0,2685388	0,28
A/Denmark/528/2009 H1N1- Pandemic - Y275 - RESIST	101,849577 86,44714006	94,15

Essai 4 :

Nom de la souche	IC 50	Mean IC50
G139/10 H1N1 pdm	0,423934023	0,37
	0,307349449	
G142/10 H1N1 pdm	0,477011827	0,49
	0,500705033	
G145/10 H1N1 pdm	0,31267403	0,33
	0,354983994	
G146/10 H1N1 pdm	0,411878918	0,37
	0,333170473	
G149/10 H1N1 pdm	0,456972887	0,40
	0,338277182	
G150/10 H1N1 pdm	0,392467201	0,31
	0,222142659	
G151/10 H1N1 pdm	0,379901189	0,38
	0,379303954	
G155/10 H1N1 pdm	0,32853309	0,41
	0,482941009	
G156/10 H1N1 pdm	0,255994561	0,27
	0,277079922	
G157/10 H1N1 pdm	0,490282681	0,46
	0,436408315	
G160/10 H1N1 pdm	0,388179198	0,31
	0,240980468	
G161/10 H1N1 pdm	0,136112301	0,14
	0,146114754	
G162/10 H1N1 pdm	0,368663668	0,31
	0,248846489	
G165/10 H1N1 pdm	0,401375092	0,41
	0,40916251	
A/Denmark/524/2009	0,293664082	0,30
H1N1- Pandemic - H275 - SENS	0,30101513	
A/Denmark/528/2009	94,02266957	86,20
H1N1- Pandemic - Y275 - RESIST	78,37808087	

Essai 5 :

Nom de la souche	IC50	Mean IC50
G166/10 H1N1 pdm	0,436066178	0,42
	0,396394763	
G168/10 H1N1 pdm	0,331441484	0,26
	0,184519657	
G169/10 H1N1 pdm	0,373018792	0,38
	0,388584395	
G171/10 H1N1 pdm	0,328106796	0,45
	0,569541116	
G172/10 H1N1 pdm	0,583012768	0,46
	0,333678561	
G173/10 H1N1 pdm	0,534926502	0,52
	0,500568125	
G176/10 H1N1 pdm	0,785394875	0,70
	0,622142616	
G300/10 H1N1 pdm	0,597253071	0,71
	0,816881683	
G302/10 H1N1 pdm	0,243806549	0,25
	0,256860838	
G304/10 H1N1 pdm	0,560465909	0,53
	0,501208366	
G310/10 H1N1 pdm	0,305046008	0,29
	0,273316911	
G312/10 H1N1 pdm	0,2321328	0,25
	0,261693591	
G313/10 H1N1 pdm	0,35926561	0,38
	0,392599705	
G316/10 H1N1 pdm	0,273021968	0,28
	0,283702165	
A/Denmark/524/2009	0,990108137	1,07
H1N1- Pandemic - H275 - SENS	1,147201078	
A/Denmark/528/2009	111,2010308	104,51
H1N1- Pandemic - Y275 - RESIST	97,82665539	

Essai 6 :

Nom de la souche	IC50	Mean IC50
G319/10 H1N1 pdm	0,291348584	0,32
	0,346516384	
G322/10 H1N1 pdm	0,279889113	0,26
	0,235722182	
G323/10 H1N1 pdm	0,295860028	0,35
	0,404180341	
G324/10 H1N1 pdm	0,444681423	0,33
	0,223286834	
G327/10 H1N1 pdm	0,345304829	0,32
	0,292206885	
G329/10 H1N1 pdm	0,25631767	0,26
	0,270766246	
G330/10 H1N1 pdm	0,370641281	0,40
	0,429971345	
G332/10 H1N1 pdm	0,297257635	0,32
	0,343018003	
G339/10 H1N1 pdm	0,245066242	0,26
	0,278230994	
G346/10 H1N1 pdm	0,349973116	0,35
	0,356653092	
G348/10 H1N1 pdm	0,513241974	0,51
	0,511714434	
G350/10 H1N1 pdm	0,403070801	0,41
	0,4078262	
G421/10 H1N1 pdm	0,5198006	0,48
	0,4481652	
G429/10 H1N1 pdm	0,125226471	0,12
	0,109430065	
A/Denmark/524/2009 H1N1- Pandemic - H275 - SENS	0,751095698	0,70
	0,639109895	
A/Denmark/528/2009 H1N1- Pandemic - Y275 - RESIST	130,4487907	139,84
	149,2356396	

Annexe 8 : Valeurs des IC50, avec médiane, standard deviation (SD), coefficient de variation (CV), amplitude de variation.

Variable	Descriptive Statistics									
	Valid N	Mean	Median	Mode	Frequency of Mode	Minimum	Maximum	Std.Dev.	Coef.Var.	Standard Error
Nor_Sens	2	0,41	0,41	Multiple	1	0,29	0,53	0,16	40,07	0,12
Nor_Res	2	165,6	165,6	Multiple	1	118,8	212,5	66,3	40,0	46,8
Den_275H	6	0,56	0,52	Multiple	1	0,28	1,07	0,30	52,51	0,12
Den_275Y	6	119,3	109,2	Multiple	1	86,2	177,0	33,8	28,4	13,8
Patients	70	0,36	0,35	Multiple	1	0,12	0,71	0,11	31,02	0,01

Breakdown Table of Descriptive Statistics N=78 (No missing data in dep. var. list)							
Echant.	IC50 Means	IC50 N	IC50 Std.Dev.	IC50 Std.Err.	IC50 Q25	IC50 Median	IC50 Q75
Norway Sens.	0,41	2	0,16	0,12	0,29	0,41	0,53
Denmark 275H	0,56	6	0,30	0,12	0,30	0,52	0,70
Patients	0,36	70	0,11	0,01	0,27	0,35	0,43
All Grps	0,38	78	0,14	0,02	0,28	0,36	0,45

Depend.: IC50	Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; IC50 Independent (grouping) variable: Echant. Kruskal-Wallis test: H (2, N= 78) =3,492076 p =,1745			
	Code	Valid N	Sum of Ranks	Mean Rank
Norway Sens.	1	2	96,00	48,00
Denmark 275H	2	6	331,00	55,17
Patients	3	70	2654,00	37,91