



V E I L L E

**Actualités sur la grippe aviaire et sa transmission  
chez l'homme**

DOSSIER DE SYNTHÈSE DOCUMENTAIRE

Rédigé par Thérèse Delvallée  
Ingénieur de recherche CNRS- Docteur en médecine  
Avril 2006



V E I L L E

**MISE AU POINT** **3**

---

<b>1 INTRODUCTION</b>	<b>3</b>
<b>2 CARACTÉRISTIQUES DES VIRUS INFLUENZA A</b>	<b>4</b>
2.1 TAXONOMIE – STRUCTURE	4
2.2 AFFINITÉ DU VIRUS VIS-À-VIS DE L'HÔTE	6
2.3 VIRULENCE	9
2.4 VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE	12
<b>3 EPIDÉMIOLOGIE DES VIRUS INFLUENZA DE TYPE A</b>	<b>14</b>
3.1 HÔTES PRINCIPAUX	14
3.2 TRANSMISSION	14
<b>4 GRIPPE HUMAINE D'ORIGINE AVIAIRE</b>	<b>17</b>
4.1 HISTORIQUE	17
4.2 EXPOSITION DE L'HOMME AUX VIRUS INFLUENZA A AVIAIRES	18
4.3 EVOLUTION DE LA SITUATION ÉPIDÉMIOLOGIQUE	20
4.4 ASPECTS CLINIQUES ET DIAGNOSTIQUES - TRAITEMENT	22
4.5 EVOLUTION DU VIRUS A (H5N1)	37
4.6 PRÉVENTION	39
4.7 SURVEILLANCE ÉPIDÉMIOLOGIQUE DE LA GRIPPE	54
<b>5 CONCLUSION</b>	<b>57</b>

**DOCUMENTATION** **58**

---

<b>1 ORGANISMES INTERNATIONAUX ET NATIONAUX DE SURVEILLANCE</b>	<b>58</b>
<b>2 WEBOGRAPHIE</b>	<b>58</b>
<b>3 LIENS UTILES</b>	<b>59</b>
<b>4 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>59</b>

## MISE AU POINT

### 1 Introduction

Depuis début janvier 2004, les médias relatent largement les épidémies de grippe aviaire dans les élevages de volaille du sud-est asiatique, leur progression et l'apparition de cas graves ou mortels de transmission de la maladie à l'homme.

Les maladies infectieuses sont la seconde cause de mortalité humaine dans le monde. Pour répondre aux nouvelles infections émergentes, il est indispensable de comprendre les interactions entre les pathogènes responsables et leurs hôtes, sachant que 75% des maladies infectieuses émergentes sont des zoonoses, c'est-à-dire qu'elles sont adaptées à l'origine chez l'animal.

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a lancé un message très alarmant pour la santé humaine au niveau planétaire. Les connaissances actuelles sur les virus influenza A sont à même de faire prendre la mesure d'une éventuelle pandémie de grippe chez l'homme, c'est à dire l'émergence et la dissémination mondiale d'un nouveau virus influenza pour lequel l'homme ne dispose d'aucune protection immunitaire et thérapeutique.

## 2 Caractéristiques des virus influenza A

### 2.1 Taxonomie – Structure

Les virus influenza (Hilleman 2002 [83]) font partie de la famille des *Orthomyxoviridae* et constituent le genre Influenzavirus. Le genre Influenzavirus est réparti en trois types : A, B et C, selon les différences antigéniques de certaines protéines : la nucléoprotéine (NP) et les protéines M.

Les virus de la grippe aviaire sont tous du genre A (on parle communément de type A). La particularité du type A vient de sa distribution chez différentes espèces animales, notamment les mammifères et les oiseaux, et d'un pouvoir pathogène potentiellement élevé ; il est le seul à être subdivisé en sous-types.

- Ce sont des virus à ARN monocaténaire ou simple brin de polarité négative, c'est-à-dire que l'ARN ne peut agir comme ARN messager et nécessite une transcription à la phase initiale de la réplication. Ils apparaissent comme des particules de 80 à 120 nanomètres de diamètre. En microscopie électronique, ils se présentent comme une sphère recouverte de spicules correspondant aux deux glycoprotéines de surface : l'hémagglutinine HA et la neuraminidase NA, ancrées dans une bicouche lipidique qui entoure la particule virale. Sous cette enveloppe se trouvent des protéines internes et matricielles, et au centre, une structure moléculaire hélicoïdale associant l'ARN à des complexes de nucléoprotéines et de polymérases. Le génome est fractionné en huit segments indépendants, chacun codant pour une (ou deux) protéine(s). Chacun des segments est associé à quatre molécules : une nucléoprotéine qui emballe l'ARN (formant une nucléocapside ou ribonucléoprotéine) et un complexe de transcription et de réplication constitué par les trois polymérases virales PA, PB1, PB2.
- Dix protéines sont codées de façon indépendante par les huit segments de l'ARN monocaténaire : les glycoprotéines de surface HA et NA, des protéines structurales internes M1, M2, NP, PA, PB1 et PB2, NS2 et non structurale, NS1.
  - L'hémagglutinine HA est composée de deux sous-unités qui possèdent des sites de fixation spécifiques à certains récepteurs des cellules cibles, et des sites de fixation pour les anticorps neutralisants et protecteurs anti-HA. La sous-unité HA1 permet l'attachement du virus à la cellule cible ; la sous-unité HA2 intervient dans la libération du contenu du virus dans la cellule. L'HA s'attache à l'acide N-acétyl-neuraminique (ou acide sialique) terminal des chaînes des glycoprotéines ou glycolipides des récepteurs membranaires de la cellule hôte, permettant ainsi l'entrée du virus dans la cellule par endocytose. L'endosome contenant la particule virale migre vers l'intérieur de la cellule ; au cours de cette migration, le pH endosomal devient acide (5-5,5). L'acidification du milieu provoque un changement de conformation

de la molécule d'hémagglutinine qui permet la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale.

- La neuraminidase est présente en moins grande quantité que l'HA à la surface virale. Son rôle est complémentaire à celui de l'hémagglutinine. Elle est dotée d'une activité enzymatique assurant le clivage des liaisons osidiques formées entre l'HA et les résidus d'acide sialique. Cette fonction est capitale au stade tardif de la réplication, pour permettre la libération des virions nouvellement formés, attachés à la surface de la cellule infectée, et empêcher leur agrégation. Elle facilite également le détachement des virions du mucus présent au niveau de l'épithélium respiratoire, très riche en acide sialique.

Ces deux protéines représentent les déterminants antigéniques majeurs du virus, suscitant la formation d'anticorps protecteurs.

Jusqu'en 2004, quinze types antigéniques différents d'hémagglutinine et neuf types de neuraminidase étaient identifiés. Un seizième type d'hémagglutinine a été récemment décrit chez un virus influenza A circulant dans une population de mouettes rieuses en Suède (Fouchier, Munster *et al.* 2005 [66]).

La combinaison de ces deux glycoprotéines permet de définir des sous-types de souche virale. La désignation des souches virales obéit à des règles internationales d'écriture. La nomenclature décrit successivement le type viral, l'hôte d'origine pour les souches animales uniquement, le lieu d'isolement, le numéro de souche, l'année d'isolement et enfin les caractéristiques antigéniques des glycoprotéines HA et NA (exemple : A/Vietnam/1194/04 (H5N1)) (Beby-Defaux, Giraudeau *et al.* 2003 [22]).

- Les protéines M1 et M2 se trouvent sous la couche lipidique et assurent la cohérence de la structure.

La protéine M1 ou protéine matricielle est la plus abondante des protéines virales. Elle s'associe à la partie intracellulaire des protéines de surface et à la nucléoprotéine, et assure la rigidité de l'enveloppe virale.

La protéine M2 est codée par le même segment d'ARN que M1 et insérée dans l'enveloppe virale. Elle se comporte comme un canal ionique et régule le pH interne du virus par le transport d'ions H<sup>+</sup>. Elle intervient dans la maturation des glycoprotéines ; elle agit en association avec l'hémagglutinine dans les processus de décapsidation et le transport des glycoprotéines vers la surface cellulaire pour la formation de nouvelles particules infectieuses.

- Les nucléoprotéines (NP) s'associent à chaque segment d'ARN viral pour former huit nucléocapsides à symétrie hélicoïdale.
- Les protéines acide PA, basiques PB1 et PB2 forment un complexe polymérase qui s'associe avec les nucléocapsides et interviennent dans le contrôle de la transcription et la réplication de l'ARN viral.

PB1 correspond à l'ARN polymérase ARN dépendante.

PB2 intervient dans le décodage lors de la formation des protéines.

PA joue un rôle dans la formation de nouveaux brins d'ARN de polarité négative, qui sont incorporés dans les nouveaux virions.

- La protéine NS2 assure le transport des ribonucléoprotéines nouvellement formées du noyau vers le cytoplasme.  
La protéine NS1 est produite directement dans la cellule infectée et n'est pas incorporée dans les nouveaux virions ; elle jouerait un rôle dans l'échappement du virus à l'action antivirale de l'interféron.

## 2.2 Affinité du virus vis-à-vis de l'hôte

Elle est déterminée au niveau moléculaire par l'hémagglutinine et la neuraminidase (Van and Manuguerra 2000 [199]). La restriction d'hôte fait appel à de nombreux mécanismes, et n'est pas totalement élucidée.

### 2.2.1 L'hémagglutinine

- L'hémagglutinine est impliquée dans l'attachement du virus sur des récepteurs cellulaires sialyloligosaccharidiques. L'extrémité distale de chaque sous-unité de l'HA se fixe à l'acide sialique lié à une molécule de galactose. Les virus de type A sont capables de reconnaître deux variétés d'acide sialique (SA) : l'acide N-acétylneuraminique (NeuAc) et l'acide N-glycolylneuraminique (NeuGc) qui s'attachent à une molécule de galactose voisine par deux types de liaison,  $\alpha 2,3$  ou  $\alpha 2,6$ . Chez l'homme, les organes cibles contiennent majoritairement des variétés NeuAc, à la différence des oiseaux et des porcs où l'on trouve des SA de type NeuGc. L'adaptation d'un virus à une nouvelle variété d'acide sialique requiert son échappement à des inhibiteurs sériques : sialyl-protéines, lectines liant le mannose, par des mutations au niveau du site de fixation à l'acide sialique de l'HA (Parrish and Kawaoka 2005 [154]).  
La présence, à la surface des cellules hôtes, d'un récepteur sialoglycoconjugué, associant une variété de SA et un type de liaison, conditionne la spécificité de reconnaissance de ce récepteur par le virus (Suzuki, Ito *et al.* 2000 [187]).
- L'abondance d'un ou plusieurs types de récepteurs sur les cellules cibles, aux sites de réplication virale, exerce une pression de sélection variable sur la spécificité d'hôte.  
Les cellules intestinales aviaires, site de réplication majeur du virus chez les oiseaux, possèdent uniquement des récepteurs cellulaires en  $\alpha 2,3$ . Les virus influenza équin et aviaires reconnaissent SA lié au galactose (Gal) par une liaison de type  $\alpha 2,3$  (SA $\alpha 2,3$ Gal), ce qui explique la transmission directe des virus aviaires au cheval. Chez le porc, la présence des deux types de récepteurs au niveau de l'épithélium trachéal explique sa sensibilité aux virus grippaux humains et aviaires.  
Les récepteurs de type SA $\alpha 2,6$ Gal sont majoritaires au niveau des cellules épithéliales respiratoires humaines. Les virus humains se lient préférentiellement à des acides sialiques attachés au Gal par des liaisons de type  $\alpha 2,6$ . Les études du tropisme cellulaire des virus influenza humains démontrent que l'infection des cellules épithéliales respiratoires non ciliées est indispensable à une réplication et à une transmission efficaces du virus, les cellules non ciliées possédant majoritairement des récepteurs de type SA $\alpha 2,6$ Gal. Les cellules ciliées de l'épithélium respiratoire humain, possèdent

quant à elles des récepteurs de type SA $\alpha$ 2,3Gal qui seraient les cibles des virus aviaires, dans les cas où ils infectent l'homme (Matrosovich, Matrosovich *et al.* 2004 [130]).

- La capacité de réplication des virus grippaux A est également influencée par la nature des acides aminés en position 226 et 228 du site de fixation de l'HA au récepteur cellulaire. La présence de la glutamine en position 226 est associée à la spécificité des virus aviaires pour le récepteur SA $\alpha$ 2,3Gal ; la leucine en 226, à la spécificité des virus humains de sous-types H2 et H3 pour le récepteur SA $\alpha$ 2,6Gal. D'autre part, l'orientation adéquate de SA au niveau du site de fixation de l'HA au récepteur cellulaire nécessite l'existence de paires d'acides aminés : ainsi, les virus humains possèdent tous la leucine en position 226 en association à la sérine en position 228 ; chez les virus équin et aviaires, la glutamine en position 226 est associée à la glycine en position 228 (Baigent and McCauley 2003 [18]).

Il est démontré qu'une simple substitution au niveau d'un des acides aminés en position 205, 226 ou 227 de l'hémagglutinine virale suffit à modifier sa spécificité de fixation à l'un des deux types de récepteurs (Suzuki 2001 [185]) (Suzuki 2005 [186]) (Gambaryan, Tuzikov *et al.* 2005 [68]). Les mutations au niveau des acides aminés en position 190 et 225 de l'HA des virus H1 humains et porcins sont associées à l'acquisition de la spécificité pour les liaisons de type SA $\alpha$ 2,6Gal et favorisent ainsi l'adaptation des virus aviaires à l'homme et au porc (Baigent and McCauley 2003 [18]).

Ces mécanismes sont impliqués dans les variations de la spécificité d'hôte : la transmission des virus influenza entre différentes espèces aussi bien que l'émergence de nouveaux sous-types dans la population humaine.

### 2.2.2 La neuraminidase

La neuraminidase est une sialidase responsable du clivage des liaisons osidiques entre les résidus d'acide sialique et le sucre voisin au niveau du récepteur cellulaire à l'hémagglutinine. Son rôle dans la restriction d'hôte des virus grippaux est encore mal connu.

- La spécificité de la neuraminidase pour les liaisons entre l'acide sialique et le galactose (liaisons SA $\alpha$ 2,3Gal et SA $\alpha$ 2,6Gal) et pour les différentes espèces moléculaires d'acide sialique (forme N-acétyl et N-glycolyl) a été étudiée chez les virus N2 : deux acides aminés en position 275 et 431 déterminent la spécificité de reconnaissance par la NA des liaisons de type SA $\alpha$ 2,6Gal et de la forme NeuGc de l'acide sialique respectivement. La présence de la valine en position 275 est associée à une haute spécificité pour les récepteurs de type  $\alpha$ 2,6, la présence de la lysine en position 451 confère un haut niveau de spécificité pour l'acide sialique NeuGc. L'adaptation de la neuraminidase à différents substrats ferait appel à des substitutions d'acides aminés qui progressivement altèrent la conformation de la NA au niveau et autour de son site actif, permettant ainsi la fixation des différentes espèces d'acide sialique (Kobasa, Kodihalli *et al.* 1999 [106]).

- Les virus aviaires se répliquent préférentiellement dans le tube digestif des oiseaux et sont donc adaptés à se développer dans des conditions de pH acide. Les virus humains H3N2 isolés après 1971 ne possèdent pas d'activité sialidase à pH acide. Des virus réassortants porteurs du gène NA humain associé aux autres gènes viraux d'origine aviaire sont incapables de provoquer une infection digestive après inoculation par voie orale (Suzuki 2005 [186]). L'activité enzymatique de la neuraminidase des virus aviaires H1N1 est mieux conservée à pH acide que celle des virus de même sous-type adaptés à l'homme ou au porc (Baigent and McCauley 2003 [18]). Deux acides aminés sont impliqués dans la stabilité à pH acide de la neuraminidase des virus influenza A : l'arginine en position 344 et la phénylalanine en position 466. Des substitutions à leurs niveaux modifient l'activité enzymatique (Suzuki 2005 [186]). L'activité de NA à pH acide contribue à la restriction d'hôte des virus influenza A.

Les mutations au niveau du gène de la neuraminidase participent à l'adaptation des virus grippaux à de nouveaux hôtes et en conséquence au franchissement de la barrière d'espèces. L'adaptation à un nouvel hôte nécessite néanmoins une compatibilité entre la NA et l'HA, dans la mesure où ces protéines ont des fonctions complémentaires : la NA dissociant les liaisons entre SA et HA.

### 2.2.3 Les protéines internes

- Les polypeptides du complexe de réplication  
Dans les modèles animaux et les cultures cellulaires, la protéine PB2 a une forte influence sur la spécificité d'hôte. Le résidu en position 627, même si d'autres sont impliqués, en est le déterminant majeur. Les autres polypeptides, PB1, PA et NP ont également leur rôle, et l'analyse de l'efficacité de la réplication de ribonucléoprotéines reconstituées montre que la compatibilité entre les différents polypeptides est fondamentale pour la réplication virale dans les cellules de mammifères. La réplication est plus performante quand PB2 et NP dérivent de la même souche aviaire ou humaine, ou quand PB1 est d'origine aviaire quelle que soit sa combinaison avec d'autres gènes (Baigent and McCauley 2003 [18]). La combinaison de ces protéines intervient également sur le caractère thermosensible de la réplication ; les virus aviaires ont une croissance optimale à 42°C, les virus humains à 37°C (Parrish and Kawaoka 2005 [154]).
- Les protéines M  
L'analyse des séquences d'acides aminés montre dix régions contenant des acides aminés spécifiques des souches aviaires ou humaines, le nombre de sites différents est plus important pour la protéine M2 (sept sites) que pour la protéine M1 (trois sites) ; on ignore actuellement lesquels d'entre eux contribuent à la restriction d'hôte. Les protéines M des virus grippaux humains ont progressivement perdu la capacité de coopérer avec l'hémagglutinine des virus aviaires, les virus réassortants sont devenus incapables de se répliquer efficacement (Baigent and McCauley 2003 [18]).
- Les protéines NS  
Il existe deux sous-types A et B du gène NS. Tous les gènes NS des virus qui

infectent les mammifères sont du sous-type A (sauf pour un virus H3N8 d'origine aviaire adapté au cheval). Il n'est pas possible cependant de différencier les isolats aviaires des isolats humains, sur la seule base de modifications d'acides aminés (Baigent and McCauley 2003 [18]).

### 2.3 Virulence

La virulence est la capacité pour un microorganisme de pénétrer dans un organisme hôte, de s'y multiplier, avec pour conséquence le développement d'une maladie. Elle dépend de l'interaction entre le virus et ses composants, avec un type de cellule, un tissu spécifique ou un organisme entier ; cette association de facteurs lui permettant de se répliquer et de disséminer au sein de l'organisme hôte.

Les oiseaux sauvages sont les hôtes naturels des virus influenza A. Régulièrement, ces virus infectent les populations d'oiseaux domestiques, et le passage des virus A de la faune sauvage à la volaille industrielle s'accompagne du développement d'une virulence chez les nouveaux hôtes. Les facteurs qui contribuent à l'apparition de cette virulence sont difficilement reproductibles en laboratoire, et sont vraisemblablement multiples. Un certain nombre de déterminants moléculaires de la virulence ont été identifiés :

- Le rôle des protéines HA et NA

La protéine HA intervient dans la fusion du virus avec la membrane endosomale cellulaire. La fusion nécessite que l'HA soit activée et pour cela clivée en deux sous-unités HA1 et HA2. L'extrémité N terminale de HA2 assure la fusion avec la cellule. Le clivage de l'hémagglutinine est une condition préalable à l'initiation de l'infection et donc un facteur déterminant de la virulence du virus.

Les virus H1, H2, H3 contiennent un seul acide aminé, l'arginine, au site de clivage. Le clivage est assuré par des protéases extracellulaires sécrétées par un seul type de cellule (chez l'homme, les cellules de l'épithélium respiratoire). Les souches hautement pathogènes H5N1 et H7, présentent de multiples acides aminés basiques adjacents au site de clivage (Puthavathana, Auewarakul *et al.* 2005 [159]) (Govorkova, Rehg *et al.* 2005 [75]) (Perdue, Suarez *et al.* 2000 [157]). La présence de ces acides aminés permet le clivage de l'HA par des protéases intracellulaires ubiquitaires telles la furine ; en conséquence, le processus de clivage est plus efficace et peut s'effectuer dans un grand nombre de cellules (Horimoto and Kawaoka 1994 [88]).

Selon le nombre et le type d'acides aminés présents au niveau du site de clivage, on identifie des souches virales avirulentes ou peu pathogènes et des souches virales hautement pathogènes. Une substitution de la sérine vers l'isoleucine, au niveau de la position 227 de l'HA, diminue la virulence de la souche hautement pathogène isolée chez l'homme à Hong Kong en 1997 (Hatta, Peng *et al.* 2001 [79]). Un minimum de cinq acides aminés à proximité d'un hydrate de carbone est nécessaire pour un clivage optimal et le remplacement de l'arginine par la lysine à l'extrémité C terminale de HA1 inhibe la clivabilité de HA (Walker and Kawaoka 1993 [201]). Les virus recombinants H5N1 ne possédant pas ces acides aminés basiques ne sont pas virulents chez la souris (Hatta, Peng *et al.* 2001 [79]). Leur présence atteste donc de l'importance de

cette caractéristique de l'hémagglutinine dans la manifestation de la virulence des virus influenza A.

Cependant, l'intensité de la virulence peut être modulée par la présence d'acides aminés au niveau de régions différentes de l'hémagglutinine des virus A (H5N1). La présence de séquence polybasique au site de clivage n'est pas toujours associée à la virulence, la composition du site de clivage et l'existence d'un résidu acide ayant une influence sur le phénotype pathogène du virus (Hulse, Webster *et al.* 2004 [92]). L'hémagglutinine du virus de la grippe espagnole de 1918 ne présente pas de site de clivage polybasique ; les souches humaines peu virulentes dont il est issu ont pourtant généré un virus hautement pathogène ; on ignore quelle caractéristique lui confère une telle virulence (Kobasa, Takada *et al.* 2004 [107]).

La neuraminidase joue également un rôle dans l'activation de l'hémagglutinine. La présence d'un site de glycosylation supplémentaire au niveau de la structure globulaire de NA du virus H5N1 augmente la virulence de celui-ci chez le poulet, peut-être par une augmentation de l'activation des protéases de la cellule hôte (Hulse, Webster *et al.* 2004 [92]). Le raccourcissement de la longueur de la tige de l'enzyme, les mutations à son niveau seraient des facteurs de la manifestation de la virulence chez l'homme (Zambon 2001 [213]). L'évolution de souches aviaires peu pathogènes vers des souches hautement pathogènes s'accompagne d'une succession de mutations au niveau du gène de la neuraminidase (Banks, Speidel *et al.* 2001 [20]) (Deshpande, Naeve *et al.* 1985 [55]).

On pense qu'un équilibre est nécessaire entre les activités de l'HA et de la NA ; la force de fixation de l'HA sur la cellule hôte à la période initiale de l'infection, doit être adaptée à l'efficacité de la NA dans la libération des nouveaux virions de la surface cellulaire (Baigent and McCauley 2001 [17]).

- Le rôle des polymérases virales

Les protéines du complexe polymérase des virus influenza A sont impliquées dans la virulence du virus A (H5N1). Les études menées sur les souches virulentes et avirulentes isolées chez l'homme au cours de l'épidémie de Hong Kong en 1997, démontrent que le pouvoir pathogène de chacune de ces deux souches est déterminé par l'acide aminé en position 627 de la protéine PB2 ; la présence de la lysine en remplacement de la glutamine augmente la capacité répliquative du virus chez la souris (Shinya, Hamm *et al.* 2004 [173]) ; elle est sans effet sur la répliquative du virus dans des cellules aviaires (Hatta, Peng *et al.* 2001 [79]).

La souche humaine hautement pathogène A/Vietnam/1203/04 (H5N1) présente la même substitution à la position 627 de PB2 (Govorkova, Rehg *et al.* 2005 [75]). L'acide aminé en position 627 jouerait un rôle dans l'interaction de la polymérase virale avec des facteurs d'hôtes spécifiques (aviaires ou mammifères), ou déterminerait la température seuil de l'activité de l'ARN polymérase virale, la répliquative virale s'initiant à des températures différentes chez les oiseaux et les mammifères (Noah and Krug 2005 [146]).

Des souches de virus A (H5N1), isolées chez des canards sains en Chine, entre 1999 et 2002, ont acquis progressivement un pouvoir pathogène et létal chez la

souris. Par génétique inverse on a pu démontrer qu'une mutation au niveau de l'acide aminé à la position 701 de la protéine PB2 est responsable du franchissement de la barrière d'espèces et de l'acquisition de la virulence chez la souris (Li, Chen *et al.* 2005 [117]).

- Le rôle de la protéine NS1

L'infection du porc par un virus recombinant H1N1 porteur du gène NS de la souche A/Hong Kong/156/97 (H5N1) est responsable d'une virémie plus importante et durable que l'infection par le virus sauvage H1N1. La virulence du virus réassorti requiert l'existence d'un acide glutamique en position 92 de la protéine NS1 ; elle est interprétée comme la conséquence de la résistance du virus à l'action antivirale des interférons et du facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  sécrétés par l'hôte (Seo, Hoffmann *et al.* 2004 [171]) (Seo, Hoffmann *et al.* 2002 [170]).

L'infection des macrophages dérivés de monocytes par deux souches A/Hong Kong/97 (H5N1) isolées chez l'homme, induit une production importante de cytokines proinflammatoires (interféron  $\beta$ , facteur de nécrose tumorale  $\alpha$ ) comparativement à d'autres virus influenza A, H1N1 ou H3N2. Un taux élevé de cytokines circulantes contribuerait au pouvoir pathogène du virus A (H5N1) (Lipatov, Andreansky *et al.* 2005 [121]).

- Le pouvoir apoptotique des virus influenza A

Les virus influenza A ont la capacité de déclencher la mort programmée de cellules en culture. L'apoptose se caractérise par la désintégration du cytosquelette et la fragmentation de l'ADN cellulaire. Les virus grippaux de type A étant des parasites intracellulaires obligatoires, leurs fonctions apoptotiques sont efficaces à la fin de la réplication, après utilisation de la machinerie cellulaire.

Trois protéines virales seraient impliquées dans la mort cellulaire. La neuraminidase joue un rôle initiateur du processus apoptique par l'activation du facteur de croissance transformant  $\beta$ , à la différence de la protéine NS1A dont l'absence chez un virus recombinant augmente l'activité apoptotique de celui-ci. Ces observations corroborent l'hypothèse selon laquelle la virulence du virus A (H5N1) est en relation avec une augmentation importante des cytokines circulantes, notamment les interférons (Cheung, Poon *et al.* 2002 [40]). La troisième protéine impliquée dans l'apoptose des cellules infectées est une petite protéine de 87 acides aminés encodée par le gène PB1. Elle augmente spécifiquement l'apoptose des monocytes, limitant son action aux cellules immunitaires de l'hôte (Noah and Krug 2005 [146]) (Baigent and McCauley 2003 [18]).

La virulence des virus influenza A est plurifactorielle. Des interactions fonctionnelles sont identifiées comme déterminants au niveau moléculaire de la virulence de certains virus, notamment du virus A (H5N1). Il est envisageable que toute interaction entre les protéines d'origine virale et/ou cellulaire, qui optimise l'enveloppement des ribonucléoprotéines virales dans les particules virales et l'assemblage de nouveaux virions, facilite la dissémination virale et donc potentialise la virulence de ces virus.

La plupart des virus isolés chez les oiseaux sont avirulents, responsables d'infection asymptomatique ou peu sévère. On a pu mettre en évidence au cours d'épidémies de grippe, l'évolution de souches peu pathogènes vers des souches hautement pathogènes. Ce phénomène concerne les sous-types H5 et H7 (Banks, Speidel *et al.* 2001 [20]).

Tumpey et ses collaborateurs ont reconstruit par génétique inverse, le virus de la grippe espagnole de 1918, afin de comprendre les raisons de son extrême virulence. Les études sur des cellules épithéliales respiratoires humaines suggèrent que la présence conjointe du gène HA et des gènes de la polymérase du virus de 1918 est essentielle à une réplication optimale. La comparaison du virus de 1918 avec d'autres virus recombinants exprimant un ou plusieurs gènes du virus de la grippe espagnole démontre que ces gènes sont impliqués dans la virulence optimale de ce virus (Tumpey, Basler *et al.* 2005 [196]).

Les souches virales A (H5N1) isolées chez l'homme et les oiseaux au cours des flambées de 1997 et la période 2003-2004 montrent une augmentation de la virulence des isolats humains de 2004 chez le furet (Maines, Lu *et al.* 2005 [127]).

## 2.4 Variabilité génétique

Les virus influenza sont pourvus d'une grande plasticité génétique. La dérive génétique et les réassortiments géniques sont les mécanismes connus contribuant à leurs variations antigéniques (Abed, Hardy *et al.* 2002 [9]) (Van and Manuguerra 2000 [199]).

- La dérive génétique (ou glissement antigénique)

La dérive génétique est la conséquence du caractère peu fidèle de l'enzyme ARN polymérase, ARN dépendante dont les erreurs de lecture commises au cours de la réplication virale ne sont pas réparées ; elle résulte également de la pression de sélection exercée par les anticorps neutralisants sur les sites antigéniques de l'HA (Al Faress, Cartet *et al.* 2005 [10]). Ces erreurs aboutissent à des mutations ponctuelles au niveau des bases nucléotidiques des gènes viraux et par conséquent à des modifications au niveau des protéines pour lesquelles ils codent.

Ces variations antigéniques sont mineures, surviennent environ tous les deux à trois ans et apparaissent essentiellement pour l'hémagglutinine et à moindre titre pour la neuraminidase. Tous les gènes codant pour les autres protéines viraux peuvent a priori subir des mutations, dans la limite où les protéines codées par ces gènes conservent des fonctions compatibles avec la réplication virale.

Le glissement antigénique concerne un sous-type, pour lequel apparaissent des variants successifs qui diffèrent progressivement de la souche d'origine. Il concourt à l'apparition d'épidémies annuelles limitées en raison de l'échappement partiel du virus à la réponse immunitaire de l'hôte. Il apparaît que chaque nouveau variant de virus grippal A, capable de réinfecter un individu préalablement exposé, présente au moins quatre substitutions d'acides aminés au niveau d'au moins deux sites antigéniques de l'hémagglutinine.

L'étude de l'évolution génétique de l'hémagglutinine des virus grippaux humains A (H1N1) et A (H1N2), isolés dans le sud de la France au cours des hivers 2001 à 2004,

met en évidence 28 substitutions d'acides aminés au niveau de la région HA1 des virus A (H1N1) ou A (H1N2) exclusivement, voire des deux. Par ailleurs, neuf isolats A (H1N2) présentent une substitution de l'acide aminé en position 90 ; il en résulte l'introduction d'un nouveau site de glycosylation adjacent au site antigénique E de HA, et la possibilité d'une modification de l'antigénicité du virus A (H1N2) (Al Faress, Cartet *et al.* 2005 [10]).

Le taux d'évolution des virus influenza aviaires est beaucoup plus important chez les volailles que chez l'hôte naturel, représenté par les oiseaux sauvages (Suarez, Van *et al.* 2000 [181]). Les erreurs dans les gènes codant la neuraminidase et l'hémagglutinine sont les plus fréquentes.

- La cassure antigénique (ou saut)

Elle est rendue possible par le caractère segmenté du génome des virus grippaux et constitue le second mécanisme de variation antigénique. Elle correspond au remplacement complet d'un ou plusieurs gènes d'une souche virale par un gène équivalent d'une autre souche virale. Ce réassortiment génétique peut conduire à l'apparition de nouveaux sous-types de virus et être à l'origine de pandémies de grippe : la grippe asiatique en 1957 et la grippe de Hong Kong en 1968 (Laver and Garman 2002 [111]).

Le virus de la grippe asiatique est issu du réassortiment entre les gènes PB1, HA et NA de la souche aviaire A (H2N2) et des cinq autres gènes du virus grippal humain saisonnier A (H1N1) ; le virus de la grippe de Hong Kong possède les gènes HA et PB1 de virus aviaire A (H3) et les six autres gènes du virus grippal humain circulant A (H2N2) ; ces réassortiments génétiques ont permis l'émergence des sous-types H2N2 et H3N2 respectivement (Russell and Webster 2005 [167]) (Kawaoka, Krauss *et al.* 1989 [102]).

L'analyse phylogénétique des huit segments du génome des virus humains A (H2N2), isolés entre 1957 et 1968 et des virus humains A (H3N2) isolés entre 1968 et 1972 montre que le sous-type A (H2N2) continue de circuler après 1968 et l'émergence des virus A (H3N2) chez l'homme est associée à de multiples réassortiments qui contribuent à leur diversité génétique (Lindstrom, Cox *et al.* 2004 [120]).

Depuis 1977, les souches circulant dans la population humaine mondiale sont de sous-types A (H1N1) essentiellement, virus réapparu à l'occasion de la « grippe russe », et de type A (H3N2). Cette situation est propice aux réassortiments génétiques en cas d'infection concomitante par les deux virus. En 1983, un premier et unique cas d'infection par un virus réassorti A (H1N2) est diagnostiqué sur un prélèvement pharyngé chez un patient coinfected par les virus A (H1N1) et A (H3N2). Durant la saison grippale 2000-2001, des virus réassortis A (H1N2) ont été isolés sur tous les continents, le virus s'étant propagé d'Asie du sud vers l'Afrique, l'Europe et l'Amérique du nord. Les études virologiques ont démontré la proximité antigénique et génétique d'une part, de l'hémagglutinine du virus réassorti A (H1N2) avec celle de la souche vaccinale actuelle A (H1N1), et de la neuraminidase de A (H1N2) avec celle de la souche prototype A (H3N2) d'autre part. Les six autres gènes internes sont issus d'un virus A (H3N2) (Xu, Lindstrom *et al.* 2004 [209]).

## 3 Epidémiologie des virus influenza de type A

### 3.1 Hôtes principaux

Les virus influenza A ont été isolés chez un grand nombre d'espèces aviaires et chez les mammifères.

- Les oiseaux sauvages sont considérés comme le réservoir naturel des virus influenza A. Ils hébergent des virus porteurs de tous les types d'hémagglutinine (HA) et de neuraminidase (NA) connus, même si l'on n'a pu isoler toutes les combinaisons possibles de sous-types. La plupart de ces virus apparaissent adaptés à leurs hôtes naturels et sont rarement responsables d'infections dans les populations aviaires sauvages ; ils peuvent par contre disséminer à grande échelle dans l'environnement par élimination fécale. On suppose qu'en raison de leur large distribution, les virus influenza A quittent de façon ponctuelle cet état d'équilibre et vont coloniser d'autres espèces de vertébrés. L'hypothèse selon laquelle les virus influenza aviaires sont les précurseurs des virus grippaux adaptés et circulants chez le cheval, le porc et l'homme, prévaut actuellement (Perdue, Suarez *et al.* 2000 [157]).

- Il en est différemment des mammifères, pour lesquels on ne connaît qu'un nombre limité de sous-types viraux. Seulement trois sous-types de l'HA (H1, H2, H3) et deux sous-types de la NA (N1 et N2) ont été identifiés à ce jour chez l'homme. Les combinaisons A (H1N1) et A (H3N2) sont responsables actuellement des épidémies saisonnières annuelles dans la majorité des régions du globe. Les mammifères sont en fait des hôtes accidentels au même titre que les oiseaux d'élevage.

En raison de sa capacité à héberger et à permettre la réplication des virus influenza d'origine humaine et d'origine aviaire, le porc a été impliqué comme hôte intermédiaire servant de « creuset » à l'émergence de nouvelles souches virales à potentiel pandémique (Taubenberger, Reid *et al.* 1997 [189]) (Zhou, He *et al.* 1996 [214]) (Castrucci, Donatelli *et al.* 1993 [35]) (Kida, Ito *et al.* 1994 [104]). A ce titre, le porc jouerait un rôle particulier dans le franchissement de la barrière d'espèces.

On qualifie de « virus influenza A aviaire », un virus isolé chez un oiseau ou dont les séquences de gènes sont semblables à celles qui circulent habituellement chez les oiseaux et référencées comme telles dans les banques de données.

### 3.2 Transmission

#### 3.2.1 Transmission des virus grippaux de type A

D'une façon générale chez les oiseaux, le virus est excrété au niveau des voies respiratoires, de la conjonctive et des excréments ; la transmission se fait par

contact direct avec d'autres animaux infectés, ou indirect dans un environnement contaminé par les fientes, les plumes. La transmission verticale n'est pas établie, même si l'on a pu mettre en évidence la contamination d'œufs au cours d'une épidémie de grippe aviaire en Pennsylvanie (Cappucci, Johnson *et al.* 1985 [33]). Récemment, un virus A (H5N1) proche antigénétiquement du virus de Hong Kong de 1997 a été isolé dans des œufs de canard et d'oie sauvages (Li, Lin *et al.* 2006 [116]).

La transmission interhumaine des virus influenza de type A se fait par inhalation d'aérosol de particules infectieuses, par contact direct ou peut-être indirect, par autoinoculation au niveau de la conjonctive et des voies respiratoires. Elle est d'autant plus efficace en milieu confiné ou clos.

### 3.2.2 Transmission des virus aviaires aux mammifères

Habituellement, les virus grippaux aviaires n'infectent pas l'homme. Cependant, le 20<sup>e</sup> siècle a connu trois pandémies de grippe, toutes dues à des virus grippaux émergents d'origine aviaire. Les souches virales responsables des pandémies de 1957 et 1968 sont apparues en Asie du sud-est, à l'occasion d'un réassortiment entre des gènes d'origine aviaire et ceux de la souche humaine circulante, responsable des épidémies saisonnières. Il en serait différent pour la souche responsable de la grippe espagnole de 1918 : des études ont suggéré la transmission directe à l'homme d'un virus aviaire avec adaptation chez l'homme ou d'autres mammifères (le porc par exemple qui peut héberger des virus humains et des virus aviaires et servir d'hôte intermédiaire (Taubenberger, Reid *et al.* 2005 [190]) (Taubenberger, Reid *et al.* 1997 [189]).

Depuis 1997, on a régulièrement mis en évidence des cas de contamination humaine directe et indirecte (Capua and Alexander 2002 [34]) (Banks, Speidel *et al.* 1998 [19]). Les premières études virologiques menées dans le cadre de l'épidémie de grippe du poulet de Hong Kong, en 1997 (Claas, De *et al.* 1998 [44]), ont clairement établi le passage direct à l'homme du virus A (H5N1), totalement d'origine aviaire.

Chez d'autres mammifères, l'infection naturelle par les virus influenza aviaires est peu connue. Des études antérieures datant des années 70-80 chez le chat, le furet et le porc, ont démontré la capacité des virus d'origine aviaire à se répliquer dans les tissus pulmonaires, sans manifestation de virulence : l'administration intranasale de virus influenza de type A et B est responsable d'une infection asymptomatique, avec sécrétion d'anticorps et présence de virus grippal au niveau des voies respiratoires (Hinshaw, Webster *et al.* 1981 [84]).

Par contre, le pouvoir pathogène du virus influenza A (H5N1) est documenté chez le singe (Kuiken, Rimmelzwaan *et al.* 2003 [110]), la souris (Bright, Cho *et al.* 2003 [30]), le porc (Choi, Nguyen *et al.* 2005 [41]), le furet (Govorkova, Rehg *et al.* 2005 [75]) ; ils sont utilisés comme modèles expérimentaux dans l'étude de la pathogénie chez l'homme (Rimmelzwaan, Kuiken *et al.* 2003 [163]). Les félinés étaient jusqu'ici considérés comme résistants aux virus influenza A (Keawcharoen, Oraveerakul *et al.* 2004 [103]).

Les premiers cas connus d'infection naturelle chez le tigre et le léopard datent du début 2004. Ils concernent quatre animaux d'un zoo de Thaïlande chez lesquels le virus influenza A (H5N1) a pu être isolé des tissus pulmonaires. Les séquences génétiques des isolats, hormis une modification au niveau de la position 627 de la protéine PB2, ne sont pas significativement différentes de la souche responsable des épizooties concomitantes dans les élevages de volaille (Keawcharoen, Oraveerakul *et al.* 2004 [103]). En octobre 2004, une seconde flambée de pneumopathies sévères causa la mort de 45 tigres (sur 102 cas officiellement répertoriés (Quirk 2004 [161])) dans un autre zoo de Thaïlande. L'analyse du génome viral de deux isolats révèle une proximité génétique (99,9 à 100%) avec les virus isolés en Asie du sud-est, chez des mammifères (tigres, léopards et hommes) et les volailles infectées. On y retrouve la substitution par la lysine de l'acide aminé en position 627, présente dans le génome des virus isolés chez l'homme et absente du virus A (H5N1), responsable actuellement des épizooties (Amonsin, Payungporn *et al.* 2005 [12]) (Thanawongnuwech, Amonsin *et al.* 2005 [191]) (Thornley 2004 [192]).

L'enquête épidémiologique a conclu à une contamination par ingestion de carcasses de poulet cru infectées par le virus A (H5N1).

De même, des cas mortels d'infection naturelle par le virus A (H5N1) ont été reportés à plusieurs reprises chez des chats domestiques, pendant les épizooties de grippe aviaire dans le sud-est asiatique, et plus récemment en février 2006 en Allemagne et mars 2006 en Autriche, enfin, chez la fouine en mars 2006, en Allemagne, pays indemne d'épizootie aviaire.

L'infection expérimentale par inoculation intratrachéale d'une souche virale prélevée chez un patient décédé de grippe aviaire au Vietnam (A/Vietnam/1194/04) ou par ingestion de viande de poulet infectée par ce même virus, provoque une pneumopathie sévère voire mortelle, une excrétion du virus au niveau des voies respiratoires, la contamination des chats sentinelles qui présentent le même tableau clinique (Kuiken, Rimmelzwaan *et al.* 2004 [109]) (Enserink and Kaiser 2004 [60]).

## 4 Grippe humaine d'origine aviaire

### 4.1 Historique

Les premiers cas d'infection humaine par des virus influenza aviaries ont été diagnostiqués et confirmés à partir de 1997.

- En mars 1997, le premier cas documenté d'infection humaine a été recensé à Hong Kong (Claas, Van *et al.* 2000 [45]) (Boibieux, Bouhour *et al.* 1998 [27]) (Subbarao, Klimov *et al.* 1998 [183]), sous la forme d'une pneumopathie grave, ayant atteint 18 personnes et provoqué la mort de six d'entre elles (Institut Pasteur, Réseau national de santé publique *et al.* 1998 [94]). Cet épisode était contemporain d'une épidémie de grippe aviaire provoquée par une souche A (H5N1) hautement pathogène, dans les élevages de volailles de Hong Kong. Les études génétiques des prélèvements chez l'homme et l'animal ont permis d'établir l'identité des souches virales. C'est le premier cas avéré de transmission directe du virus grippal aviaire à l'homme.
- En 1999, deux cas humains de grippe dus au virus A (H9N2) faiblement pathogène sont confirmés virologiquement chez deux enfants à Hong Kong (Peiris, Yuen *et al.* 1999 [156]) (Butt, Smith *et al.* 2005 [32]) (Lin, Shaw *et al.* 2000 [119]). C'est la première fois que ce sous-type viral est isolé chez l'homme. L'origine exacte de l'infection est inconnue, mais la responsabilité des oiseaux d'élevage est fortement évoquée. Plusieurs autres cas d'infection humaine à influenza A (H9N2) ont été diagnostiqués en Chine en 1998-1999.
- En 2002, en Virginie, au décours d'une flambée de grippe du poulet due au virus A (H7N2), une personne a présenté une sérologie positive pour ce virus.
- En février 2003, une nouvelle flambée de grippe A (H5N1) à Hong Kong est responsable de deux cas d'infection dont un mortel, au sein de la même famille. L'enquête épidémiologique n'a pas pu déterminer le mode de contamination. En décembre 2003, un cas de grippe A (H9N2) a été confirmé chez un enfant présentant une forme bénigne.
- En 2003, aux Pays-Bas, une épidémie de grippe aviaire A (H7N7) hautement pathogène débute dans des élevages de volaille. Quarante-neuf personnes, professionnels exposés et leurs familles, développeront une forme bénigne de la maladie. Un seul décès sera à déplorer (Fouchier, Schneeberger *et al.* 2004 [67]) (Koopmans, Wilbrink *et al.* 2004 [108]). Aucun autre cas d'infection humaine par le virus A (H7N7) n'a été reporté depuis.
- En novembre 2003, à New York, une personne est infectée par un virus aviaire A (H7N2).
- En février 2004, des flambées de grippe aviaire dues au virus hautement pathogène A (H7N3) déciment les élevages de poulet en [Colombie britannique](#) (Canada) et sont responsables d'infections humaines à type de conjonctivites chez le personnel avicole.
- En janvier 2004, les études virologiques confirment la présence de la souche A (H5N1) du virus influenza aviaire chez quatre patients hospitalisés pour une

pneumopathie grave, à Hanoï (Vietnam), puis chez deux enfants en Thaïlande. Ce sont les premiers cas déclarés de grippe A (H5N1) depuis février 2003 ; ils surviennent dans un contexte d'épizooties de grippe aviaire A (H5N1) qui sévissent dans les élevages de poulets.

## 4.2 Exposition de l'homme aux virus influenza A aviaires

### 4.2.1 Matières contaminantes

Elles sont représentées par les sécrétions respiratoires et surtout les matières fécales qui peuvent contenir un taux important de particules infectieuses.

La contamination peut être directe, par la manipulation d'oiseaux infectés, ou indirecte, par contact avec la nourriture, l'eau, le matériel et les vêtements contaminés. Les virus influenza sont particulièrement résistants dans les tissus et l'environnement (notamment dans l'eau) et peuvent survivre plus de 30 jours à 0°C et indéfiniment dans le cas de matières congelées. En raison de ces capacités de survie, d'autres modes de transmission sont théoriquement possibles. L'ingestion, l'inoculation directe par voie nasale ou conjonctivale d'eau contaminée par le virus, notamment au cours de baignades, est à considérer (Beigel, Farrar *et al.* 2005 [23]).

Le risque lié à la consommation alimentaire de viandes infectées est estimé de nul à négligeable. Les souches virales hautement pathogènes qui disséminent dans tout l'organisme, notamment au niveau des tissus musculaires, sont détruites très rapidement à des températures supérieures à 60°C. Dans l'éventualité d'une ingestion de viande crue, le virus serait détruit par le milieu acide de l'estomac. Les mêmes arguments seraient valables pour la consommation des œufs. La consommation de sang de canard et de viande de poulet insuffisamment cuite a néanmoins été impliquée dans des cas de contamination humaine (Beigel, Farrar *et al.* 2005 [23]).

En février 2006, l'[AFSSA](#) a remis ses conclusions sur la probabilité de contamination du consommateur par ingestion de viande infectée par les virus influenza A hautement pathogènes (HPAI) A (H5) et A (H7) dans l'hypothèse de la présence ou non sur le territoire français d'épizooties dans les élevages de volailles, en fonction de l'espèce consommée, et de son mode de consommation.

On ne connaît pas les doses infectieuses chez l'homme.

### 4.2.2 Populations exposées

Le risque potentiel varie en fonction des conditions d'exposition, de la nature des espèces aviaires, de la fréquence et de la durée des contacts, des modes de transmission décrits ci-dessus ; il est donc difficile à quantifier.

Les professionnels sont les catégories les plus exposées, qu'ils soient au contact d'oiseaux sauvages (chasseurs, ornithologues..), d'oiseaux de compagnie (éleveurs, commerce animalier..) ou encore d'oiseaux d'élevage (volaille).

Durant les épizooties de grippe aviaire, le personnel avicole est le plus à risque ; il

évolue dans un environnement massivement contaminé, voire confiné, en raison de la densité de population des élevages. Les personnels impliqués dans les opérations de décontamination des lieux d'élevage et d'élimination des animaux malades ou suspectés d'être infectés, sont considérés également à risque. A ce propos, l'[AFSSA](#) a édité une liste des taux d'exposition aux matières virulentes des professionnels avicoles en fonction des catégories professionnelles et des situations d'exposition.

L'exposition dans le cadre d'activités de loisir, ou de contact domestique avec des oiseaux de compagnie serait à moindre risque.

Il n'y a, à ce jour, aucun cas documenté de grippe d'origine aviaire lié à la manipulation d'oiseaux sauvages ; un cas de contamination au contact d'oiseau de compagnie a été décrit.

#### 4.2.3 Epidémiologie de la transmission des virus aviaires

- Transmission de l'animal à l'homme  
Les investigations menées dans le cadre des premiers cas humains de grippe aviaire A (H5N1) à Hong Kong en 1997 (Bridges, Lim *et al.* 2002 [29]) (Mounts, Kwong *et al.* 1999 [139]), et de grippe A (H7N7) aux Pays-Bas en 2003 (Koopmans, Wilbrink *et al.* 2004 [108]), ont confirmé le contact direct avec des volailles infectées, comme facteur de risque déterminant de transmission des virus HPAI, dans le cadre d'activités professionnelles avicoles, vétérinaires, ou à l'occasion de la fréquentation des marchés de volailles vivantes (Hayden and Croisier 2005 [80]).
- Transmission interhumaine  
La transmission interhumaine a été évoquée pour la première fois à Hong Kong en 1997, à la suite d'une étude de séroprévalence auprès des personnels de santé exposés à des patients contaminés par le virus A (H5N1) : 3,7% des personnes exposées professionnellement ont une sérologie positive pour le virus (Bridges, Katz *et al.* 2000 [28]). En 2004, une enquête sérologique sur un échantillon plus restreint de soignants s'est montrée négative (Apisarntharak, Erb *et al.* 2005 [13]) (Liem and Lim 2005 [118]) (Schultsz, Dong *et al.* 2005 [169]).

Par la suite, elle a fait l'objet d'enquêtes systématiques pour certains cas de clusters familiaux. On définit un cluster comme le regroupement au sein d'une même famille d'au moins deux personnes présentant une infection au même virus, confirmée biologiquement, ou, atteintes d'une pneumonie sévère ou décédées dans un tableau de détresse respiratoire, et chez une desquelles au moins le diagnostic a été confirmé en laboratoire (Olsen, Ungchusak *et al.* 2005 [149]) :

- Le premier cluster a été décrit aux Pays Bas en 2003. Il concerne trois personnes d'une même famille chez lesquelles on a mis en évidence une sérologie positive pour le virus A (H7) et une notion de contact avec un fermier exposé professionnellement (Koopmans, Wilbrink *et al.* 2004 [108]).
- En 2004, en Thaïlande, un cas de transmission d'un enfant à sa mère et à sa tante est suspecté. L'enquête épidémiologique n'a retrouvé aucune notion de contact avec la volaille malade. Les prélèvements réalisés chez les

adultes ont révélé la présence d'un virus A (H5N1) dont le séquençage a montré la proximité génétique avec la souche A (H5N1) responsable des épizooties (Ungchusak, Auewarakul *et al.* 2005 [197]).

- De janvier 2004 à juillet 2005, 109 cas humains de grippe A (H5N1) ont été déclarés par l'OMS. Pendant cette période, 15 clusters familiaux ont été identifiés : 11 au Vietnam, deux en Thaïlande, un au Cambodge et un en Indonésie. La taille des clusters varie de deux à cinq personnes. Dans 60% des cas, la présence du virus A (H5N1) est confirmée virologiquement chez au moins deux personnes et témoigne d'une transmission interhumaine probable mais limitée. Pour les autres clusters, les informations épidémiologiques sont insuffisantes pour évoquer la transmission interhumaine (Olsen, Ungchusak *et al.* 2005 [149]).

### 4.3 Evolution de la situation épidémiologique

#### 4.3.1 Les épizooties aviaires

Les souches hautement pathogènes du virus influenza A aviaire (HPAI) sont isolées principalement chez les poulets et les dindons. Elles appartiennent aux sous-types H5 et H7 de l'hémagglutinine (Alexander, Van *et al.* 2000 [11]). Des épizooties dues à ces HPAI ont été signalées aux Etats-Unis, en Australie, au Pakistan, au Mexique, plus récemment aux Pays-Bas. Néanmoins, tous les sous-types H5 et H7 ne sont pas hautement pathogènes, c'est notamment le cas pour le virus influenza A (H5N1) mis en cause actuellement.

Ces épizooties étaient relativement rares avant 1990. Depuis 1959, seulement [21 flambées](#) de grippe aviaire hautement pathogène ont été signalées dans le monde, principalement sur le continent américain, en Europe et en Australie. Depuis l'épidémie de Hong Kong en 1997, des virus HPAI ont été régulièrement isolés en Asie, à l'occasion des prélèvements systématiques effectués dans le cadre de la surveillance de la grippe. Vers le milieu de l'année 2003, des foyers de grippe aviaire apparaissent en Asie ; ils ne feront pas l'objet d'investigations immédiates ni de communications à l'OMS. Les premiers cas référencés datent de la fin de l'année 2003.

- En décembre 2003, deux tigres et deux léopards meurent de façon inattendue dans un zoo de Thaïlande ; les études virologiques ultérieures identifient le virus A (H5N1) dans les prélèvements effectués sur les animaux.
- Le 15 décembre 2003, la république de Corée confirme l'existence d'une épidémie de grippe aviaire due à une souche hautement pathogène A (H5N1) du virus influenza, dans un élevage de poulets au sud de Séoul.
- L'épizootie à influenza A (H5N1) va s'étendre rapidement au cours du mois de janvier 2004 pour atteindre successivement le Vietnam, le Japon, la Thaïlande, le Cambodge, le Laos, l'Indonésie et la République populaire de Chine, début février 2004.

- D'autres épidémies de grippe aviaire sont signalées à Taiwan et au Pakistan ; elles sont dues aux sous-types A (H5N2) et A (H7) respectivement, moins virulents que la souche A (H5N1).

Début 2004, la situation est particulièrement préoccupante pour le Vietnam, la Thaïlande, l'Indonésie, où les épizooties ne sont pas contrôlées ; celles-ci touchent 67%, 46% et 38% des provinces de ces pays, et, surtout, des premiers cas humains de grippe aviaire sont observés, au Vietnam et en Thaïlande. Ailleurs, l'épidémie est soit limitée, soit contrôlée.

- En août 2004, la grippe aviaire fait son apparition dans les élevages de volaille en Malaisie.
- En août-septembre 2004, après une période d'accalmie, une seconde vague d'épizooties resurgit en République populaire de Chine, en Indonésie, en Thaïlande et au Vietnam, alors que la République de Corée et le Japon se déclarent indemnes de grippe aviaire auprès de l'OIE (Office International des Epizooties ou organisation mondiale de la santé animale).
- En avril 2005, des milliers d'oiseaux sauvages sont retrouvés morts au bord d'un lac en République populaire de Chine où la grippe aviaire va devenir endémique dès octobre 2005.

A partir de juillet 2005, les rapports officiels communiqués à l'OIE mettent en évidence une propagation et une expansion géographique du virus A (H5N1), pour une part en relation avec les [flux migratoires des oiseaux sauvages](#) :

- A la fin de l'été 2005, le virus A (H5N1) va être identifié chez de nombreux oiseaux migrateurs en Mongolie, au Koweït, puis sur le continent européen durant l'hiver 2005-2006 : en Azerbaïdjan, en Bulgarie, en Grèce, en Italie, en Slovénie, en Autriche, en Allemagne, en Pologne, en Slovaquie, en Bosnie Herzégovine, en Georgie, Suède, en Suisse et en Serbie. Le 19 février 2006, la France déclare un cas de grippe aviaire A (H5N1) chez un canard sauvage.
- Dès juillet 2005, le virus A (H5N1) apparaît dans les élevages de volaille, sur le continent européen, successivement en Russie (Sibérie), au Kazakhstan, en Turquie, en Roumanie, en Ukraine, puis début 2006, en Iraq, en Albanie. Le 25 février 2006, la France confirme la présence du virus dans un élevage de dindes, dans le département de l'Ain, représentant ainsi le premier cas de grippe aviaire domestique au sein de l'Union Européenne.
- En février 2006, l'Egypte, le Niger, l'Inde et Israël déclarent des épizooties de grippe A (H5N1) dans leurs élevages d'oiseaux domestiques.

Les [rapports officiels](#) des pays faisant état d'épizooties aviaires sur leur territoire sont communiqués à l'OIE.

#### 4.3.2 Les cas humains

- Les autorités sanitaires vietnamiennes déclarent le premier cas humain de grippe aviaire le 11 janvier 2004. Les prélèvements proviennent de deux enfants et d'un adulte hospitalisés pour une pneumopathie grave et confirment la présence d'une souche A (H5N1). Depuis octobre 2003, quatorze personnes, dont treize enfants, étaient hospitalisées dans la région de Hanoï pour les

mêmes symptômes ; au 13 janvier 2004, treize d'entre elles étaient décédées.

Le 23 janvier 2004, le ministère de la santé thaïlandais informe l'OMS de l'existence de deux cas de grippe A (H5N1) chez deux enfants.

Jusqu'au début du mois de février 2005, le Vietnam et la Thaïlande sont les seuls pays où la grippe aviaire A (H5N1) est diagnostiquée chez l'homme. Le Vietnam totalise 51 cas humains (17 cas pédiatriques) dont 32 mortels, et la Thaïlande 17 cas (8 cas pédiatriques) dont 12 mortels.

- Les épizooties de grippe aviaire vont s'étendre dans tout le sud-est asiatique ; début 2005, des cas humains de grippe aviaire sont diagnostiqués au Cambodge et en juillet 2005, les premiers cas sont signalés en Indonésie.

Fin octobre 2005, l'OMS confirme au total 121 cas de grippe humaine A (H5N1), parmi lesquels 62 furent mortels. Ils sont recensés dans les quatre pays sus-cités (91 cas au Vietnam, 19 en Thaïlande, 7 cas en Indonésie et 4 au Cambodge). La République populaire de Chine ne déplore à cette date aucun cas humain, bien que la grippe aviaire y soit endémique.

- Le 17 novembre 2005, la République populaire de Chine déclare ses premiers cas humains de grippe aviaire (16 cas au 24/03/2006).
- Fin janvier 2006, c'est au tour de l'Iraq de notifier ses premiers cas humains à l'OMS (2 cas au 24/03/2006).
- En mars 2006, sept pneumopathies graves mortelles sont confirmées être en rapport avec le virus A (H5N1) en Azerbaïdjan.

Au [24 mars 2006](#), le nombre cumulé de cas de grippe humaine due au virus A (H5N1) dans le monde s'élève à 186 cas dont 105 mortels. Aucun nouveau cas humain n'a été signalé depuis le début de l'année 2006 au Vietnam et en Thaïlande.

L'ensemble des [déclarations à l'OMS des cas humains](#) de grippe aviaire, la [cartographie](#) des infections chez l'homme, la [chronologie de la propagation](#) des épizooties dans les différentes régions du monde et des cas humains de grippe due au virus A (H5N1) sont consultables sur le site de l'OMS.

## 4.4 Aspects cliniques et diagnostiques - Traitement

### 4.4.1 La symptomatologie

Elle se limite aux cas décrits chez des patients hospitalisés, lors des épisodes de grippe humaine d'origine aviaire depuis 1997. En fonction du sous-type de virus, différentes formes cliniques sont décrites. La grippe aviaire touche préférentiellement les enfants.

#### 4.4.1.1 Les infections à virus influenza A (H5N1)

Elles représentent les cas le plus fréquemment diagnostiqués, les aspects cliniques les plus largement décrits. La symptomatologie est variée, des formes bénignes aux

formes mortelles (de Jong and Hien 2006 [52]) (Yuen and Wong 2005 [212]) (Grose and Chokephaibulkit 2004 [76]).

- L'incubation est courte, de un à trois jours, pouvant aller jusqu'à une semaine, voire dix jours ; la moyenne étant de deux à quatre jours après l'exposition.
- La période initiale est caractérisée dans la quasi-totalité des cas par un syndrome grippal.

Au cours de la première épidémie de Hong Kong, en 1997 (Chan 2002 [36]), les malades présentent essentiellement une fièvre élevée, avec céphalées, malaise général, et myalgies, une pharyngite, toux et rhinite ; plus rarement des troubles gastro-intestinaux et une conjonctivite.

En 2004, au Vietnam (Tran, Nguyen *et al.* 2004 [194]) et en Thaïlande (Chotpitayasunondh, Ungchusak *et al.* 2005 [43]) (Chokephaibulkit, Uprasertkul *et al.* 2005 [42]), les cas décrits font état également d'un syndrome grippal, avec dyspnée et diarrhée chez la moitié des patients.

La fièvre est souvent le premier signe clinique, la symptomatologie est essentiellement respiratoire, la dyspnée apparaît en moyenne vers le cinquième jour après le début des troubles.

- La période d'état est dominée par des signes d'atteinte des voies respiratoires hautes dans les formes bénignes et des voies respiratoires basses dans les formes sévères.

Le tableau clinique est classiquement celui d'une pneumopathie le plus souvent grave avec détresse respiratoire, tachypnée et crépitants.

- L'évolution se fait en règle générale vers une insuffisance respiratoire aiguë, nécessitant une assistance ventilatoire.

Le stade ultime d'insuffisance organique multiple avec insuffisance rénale et insuffisance cardiaque est fréquent (Beigel, Farrar *et al.* 2005 [23]).

La durée moyenne d'évolution dans les formes mortelles, varie de huit jours (Cambodge, 2005) à 23 jours (Hong Kong, 1997) (Beigel, Farrar *et al.* 2005 [23]).

La mortalité est très élevée, de l'ordre de 55%, d'après le nombre de cas déclarés à l'OMS.

La quasi-totalité des sujets infectés par le virus A (H5N1) présente un tableau de pneumonie plus ou moins sévère, avec des troubles digestifs fréquemment associés.

En Thaïlande, un cas d'infection à virus influenza A (H5N1) sans troubles respiratoires a été rapporté en 2004 : le diagnostic posé étant celui d'une diarrhée fébrile (Apisarntharak, Kitphati *et al.* 2004 [14]) (Wiwanitkit 2005 [206]).

Au Vietnam, d'autres cas atypiques ont été décrits, sous forme d'encéphalite mortelle, compliquant une diarrhée sévère initiale, sans aucune manifestation respiratoire (de Jong, Bach *et al.* 2005 [51]). La neurovirulence du virus A (H5N1) est documentée chez les mammifères (Keawcharoen, Oraveerakul *et al.* 2004 [103]) (Rowe, Cho *et al.* 2003 [166]), son neurotropisme a été démontré expérimentalement chez la souris (Tanaka, Park *et al.* 2003 [188]) (Iwasaki, Itamura *et al.* 2004 [96]).

Il est donc important, pour faire le diagnostic, de ne pas se focaliser sur la présence ou non de manifestations respiratoires.

Ces formes graves sont observées chez des individus sains auparavant, sans facteur de risque particulier.

L'existence de formes asymptomatiques et de formes paucisymptomatiques passées inaperçues est réelle, en témoignent les différentes études sérologiques effectuées dans le cadre des infections humaines dues au virus A (H5N1), à Hong Kong. La présence d'anticorps sériques anti-H5 a été démontrée chez des personnes exposées professionnellement et chez des sujets contacts de cas confirmés de grippe A (H5N1) (Katz, Lim *et al.* 1999 [101]) (Bridges, Katz *et al.* 2000 [28]) (Bridges, Lim *et al.* 2002 [29]).

#### 4.4.1.2 Les infections à virus influenza A (H7)

- Les études sérologiques menées en 2003, en Italie, à la suite des épizooties à virus A (H7N3) dans les élevages de volaille, montrent à l'évidence le caractère asymptomatique des infections à virus A (H7N1) et A (H7N3) chez les personnes exposées professionnellement ; un seul cas séropositif a présenté une conjonctivite (Puzelli, Di Trani *et al.* 2005 [160]).
- En mars 2003, aux Pays-Bas, une épizootie de grippe aviaire due au virus hautement pathogène A (H7N7) touche les élevages de volaille. Une enquête épidémiologique et virologique est alors effectuée auprès de tous les employés et intervenants de l'industrie volaillière et de leur famille, afin d'enregistrer les symptômes présentés au cours de cette période (Koopmans, Wilbrink *et al.* 2004 [108]).

18,32% des personnes ayant rapporté un problème de santé ont une infection à A (H7N7) confirmée virologiquement. La conjonctivite est la manifestation la plus fréquente (87,64%), en association avec un syndrome grippal dans 5,6% des cas.

L'évolution est bénigne dans la quasi-totalité des cas. Un seul cas mortel a été signalé chez un vétérinaire présentant un syndrome de détresse respiratoire aiguë (Fouchier, Schneeberger *et al.* 2004 [67]), similaire à celui des infections graves à virus A (H5N1).

Les études de séroprévalence ont mis en évidence des anticorps spécifiques anti-H7 chez 49% des personnes exposées professionnellement et chez 64% des sujets contacts, et témoignent de l'existence de formes asymptomatiques (Meijer, Valette *et al.* 2005 [135]).

#### 4.4.1.3 Les infections à virus influenza A (H9N2)

- Les premiers cas ont été diagnostiqués à Hong Kong, en 1999. Ils concernent deux enfants en bas âge. Les caractéristiques cliniques se résument à un syndrome grippal (fièvre, malaises, manifestations respiratoires hautes) accompagné de troubles gastro-intestinaux (anorexie, vomissements, douleurs abdominales, diarrhée). Un autre cas pédiatrique diagnostiqué en 2003, également à Hong Kong, a fait récemment l'objet d'une description (Butt, Smith *et al.* 2005 [32]). L'évolution est simple et favorable (Uyeki, Chong *et al.* 2002 [198]).

- A côté de ces cas cliniques sporadiques s'ajoutent vraisemblablement des infections asymptomatiques ; des actions de surveillance séroépidémiologique ont mis en évidence des anticorps spécifiques dirigés contre le virus A (H9N2) chez des habitants du nord-est et du sud de la République populaire de Chine, et chez des personnes exposées professionnellement aux élevages de volaille à Hong Kong (Cheng, Liu *et al.* 2002 [39]) (Peiris, Yuen *et al.* 1999 [156]).

#### 4.4.2 Les signes paracliniques

Ils ont été essentiellement étudiés dans les formes graves des infections à virus grippaux A (H5N1).

- Les signes biologiques incluent une leucopénie avec lymphopénie, une thrombopénie, une anémie (Wiwanitkit 2005 [206]), une atteinte de la fonction hépatique avec élévation des transaminases sériques et augmentation des temps de coagulation, une atteinte de la fonction rénale avec augmentation de la créatinémie (Chotpitayasunondh, Ungchusak *et al.* 2005 [43]) (Beigel, Farrar *et al.* 2005 [23]).
- Les signes radiographiques, dans le cas d'atteinte des voies respiratoires basses sont ceux d'une pneumonie ; la radiographie pulmonaire montre des images d'infiltrats clairsemés, localisés ou diffus, des infiltrations interstitielles, de distribution lobaire, plurilobaire, unilatérale ou bilatérale. Au fur et à mesure de l'évolution, les poumons prennent un aspect en verre dépoli, de façon diffuse et bilatérale. En Thaïlande, le délai d'apparition de ces images a été étudié : il est en moyenne de six jours à compter du début des symptômes (Chotpitayasunondh, Ungchusak *et al.* 2005 [43]). Les pneumothorax sont rares et plutôt le fait de complications liées à la ventilation artificielle.

#### 4.4.3 Le diagnostic

##### 4.4.3.1 Diagnostic clinique

En dehors des zones d'épizooties à virus aviaires hautement pathogènes

Suite à l'épidémie de grippe aviaire aux Pays-Bas en 2003, la Direction Générale de la Santé dépendant du Ministère français de la santé, avait émis une directive le 7 juillet 2003, réactualisée le 22 mars 2006, à l'intention des professionnels de santé. Cette note définit « le [cas humain suspect de grippe à influenza A hautement pathogène](#) », notamment à A (H5N1). Les définitions de cas, possible, probable et confirmé de grippe aviaire ont été élaborées par l'OMS et tiennent compte de l'évolution de la situation épidémiologique mondiale.

Cas possible (ou suspect) :

- toute personne présentant un syndrome respiratoire aigu fébrile, ayant eu dans les sept jours précédant les symptômes :

- une exposition professionnelle à des cas humains ou animaux, avérés ou présumés, de grippe aviaire, ou à tout lieu ou matériel biologique avéré ou présumé contaminé par le virus A (H5N1) ;
  - ou un contact direct, prolongé, répété, ou à moins d'un mètre dans les pays avec épizooties et cas humains de grippe A (H5N1), avec des oiseaux vivants ou morts, sauvages ou domestiques, ou leurs fientes ;
  - ou un contact proche et répété avec une personne infectée par un virus influenza A (H5) ou fortement suspectée de l'être.
- toute personne présentant un syndrome grippal avec détresse respiratoire aiguë :
    - de retour d'un pays atteint par les épizooties de grippe aviaire A (H5N1), depuis moins de sept jours ;
    - de retour d'un pays où le virus A (H5N1) a été détecté chez les oiseaux sauvages et qui a eu un contact direct avec des oiseaux sauvages malades ou morts.
  - L'analyse des cas possibles se fait en fonction des listes des pays atteints par la grippe humaine d'origine aviaire et par les épizooties de grippe A (H5N1) ; ces listes sont actualisées en permanence et sont disponibles respectivement sur le site de l'OMS (OMS 2006 [6]) et le site de l'OIE.

En zone d'épizooties à virus grippal aviaire hautement pathogène

Dans les pays où une activité grippale aviaire est suspectée ou identifiée, le diagnostic de grippe humaine d'origine aviaire fait partie du diagnostic différentiel des pneumonies aiguës sévères. Le contexte d'épidémie de grippe saisonnière en rapport avec des virus influenza A/H1, A/H3 ou B, ou de tout syndrome grippal en relation avec d'autres pathogènes des voies respiratoires rend le diagnostic clinique difficile.

L'OMS a édité un guide de prise en charge des personnes susceptibles d'être infectées par le virus influenza A (H5N1) (OMS 2004 [3]).

Cas possible :

- pendant les sept jours précédant les symptômes, toute personne ayant été en contact avec :
  - des oiseaux sauvages ou de la volaille domestique, vivants ou morts, à une distance de moins d'un mètre ;
  - des élevages de volaille domestique ayant fait l'objet d'un confinement dans les six semaines précédentes ;
  - toute personne faisant l'objet d'une suspicion ou d'un diagnostic de grippe A (H5N1) ;
  - toute personne décédée à la suite d'une pneumopathie aiguë inexpliquée.
- toute personne exposée professionnellement à des isolats cliniques humains ou animaux de virus influenza hautement pathogènes, pendant les sept jours précédant le début de la symptomatologie.

- Tout cas possible doit faire l'objet d'investigations virologiques.
- Le diagnostic clinique est subordonné au diagnostic biologique.

#### 4.4.3.2 Diagnostic biologique (de Jong and Hien 2006 [52])

##### Le diagnostic direct

Il est virologique (Beby-Defaux, Giraudeau *et al.* 2003 [22]) (Playford and Dwyer 2002 [158]) (OMS 2005 [5]). Il repose sur la mise en évidence du virus grippal, ou de ses antigènes, sur différents prélèvements : écouvillonnage nasopharyngé, aspiration nasale, expectoration, liquide de lavage nasal. Les prélèvements doivent être effectués dès le début des symptômes, avant quatre à cinq jours chez l'adulte, l'excrétion virale diminuant rapidement. Par contre, chez le jeune enfant, l'excrétion virale se fait sur une plus longue période et les prélèvements sont justifiés et utiles au-delà de cinq jours. Des échantillons respiratoires multiples sur plusieurs jours sont hautement recommandés.

- Détection rapide de l'antigène viral : les résultats sont obtenus en 15 à 30 minutes (Beigel, Farrar *et al.* 2005 [23]).
  - L'immunofluorescence est une méthode largement utilisée et d'une bonne sensibilité ; elle permet de diagnostiquer soit la grippe A ou la grippe B, soit la grippe A/B parmi cinq autres virus respiratoires. L'identification du sous-type par les kits commerciaux a montré ses limites, les anticorps monoclonaux dirigés contre l'influenza A/H1 donnent une réaction croisée avec le sous-type H5. Les résultats doivent donc être confirmés par le kit OMS qui contient un pool d'anticorps monoclonaux spécifiques du type A/H5, un pool dirigé contre le type A et B et un pool spécifique de A/H1 et A/H3.
  - Les méthodes immunoenzymatiques (comme l'ELISA) permettent la mise en évidence du virus influenza A uniquement (par la nucléoprotéine NP). Elles ont une sensibilité équivalente à l'immunofluorescence, mais sont plus faciles à mettre en œuvre, et moins subjectives dans leur interprétation.
  - L'utilisation de ces tests rapides n'est en général pas recommandée par l'OMS pour le diagnostic des infections humaines dues à un virus grippal aviaire. Ils permettent le diagnostic d'une grippe de type A ou B. Ils ne permettent pas la différenciation certaine du sous-type et un résultat négatif ne peut exclure la présence d'une infection. Ils peuvent être utilisés uniquement dans le cas où la confirmation peut être apportée par un test de RT-PCR (voir ci-dessous), disponible localement, ou dans le cas contraire, par l'envoi des prélèvements à un laboratoire de référence national ou du réseau de l'OMS.
- Technique de RT-PCR ou technique d'amplification en chaîne par polymérisation après transcription inverse. Elle permet d'amplifier le génome viral, de détecter spécifiquement un ARN viral et donc d'identifier le type et le sous-type viral (Coiras, Aguilar *et al.* 2001 [46]) (Ellis and Zambon 2001 [58]). Les résultats sont disponibles en quelques heures.  
Elle utilise la transcription inverse de l'acide ribonucléique (ARN) viral en ADN complémentaire (ADNc). Elle requiert une paire d'amorces oligonucléotidiques;

les amorces sont basées sur les séquences connues de la protéine HA et N1 des virus influenza A et permettent d'amplifier spécifiquement un sous-type.

Récemment, des tests multiplex appliqués à la détection du virus A (H5N1) sont apparus (Payungporn, Chutinimitkul *et al.* 2006 [155]), ciblant de façon simultanée :

- deux régions différentes du gène HA du virus A (H5N1)(Ng, Cheng *et al.* 2005 [143]) ;
  - ou des séquences des gènes M, H5 et N1 en seul passage (single set) ; les amorces sont sélectionnées à partir de 75 séquences conservées répertoriées du gène de la protéine M et de 50 régions invariables connues, spécifiques des gènes H5 et N1(Amonsin, Payungporn *et al.* 2005 [12]).
  - L'OMS recommande l'utilisation des amorces pour l'amplification des gènes H5, H9 et N1.
  - C'est une technique qui tend progressivement à remplacer les méthodes traditionnelles ; elle bénéficie d'une excellente sensibilité, la spécificité est dépendante de la pertinence des amorces utilisées ; elle ne nécessite pas de virus vivant et peut donc s'opérer en laboratoire de niveau de sécurité classique.
  - L'OMS a mis en place un comité technique dont le travail consiste à développer et actualiser les amorces en fonction de l'évolution antigénique des virus.
- Isolement du virus
    - L'inoculation se réalise soit sur œufs de poule embryonnés d'une dizaine de jours (peu utilisé actuellement), soit sur culture de cellules rénales de chien (cellules MDCK) et donne des résultats en deux à dix jours. Pour des raisons de biosécurité, l'isolement des souches hautement pathogènes doit être réalisé en laboratoire de confinement de niveau trois ou supérieur.
    - Les cultures positives peuvent exhiber ou non des effets cytopathogènes, c'est-à-dire des modifications morphologiques des cellules infectées, par exemple une rétraction des cellules qui apparaissent réfringentes et de tailles inégales, et, surtout, la multiplication virale permet la mise en évidence de l'hémagglutinine par hémadsorption (fixation des globules rouges sur la couche cellulaire).
    - L'identification du virus s'obtient par technique d'immunofluorescence des cellules infectées, d'inhibition de l'hémagglutination du supernatant, à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques.
    - La culture virale est considérée comme le « gold standard » car elle permet à la fois l'identification du virus, sa caractérisation et l'étude de sa variabilité antigénique et génétique, notamment par technique de RT-PCR, la réalisation des tests de sensibilité médicamenteuse et la préparation de vaccins (Collins, Ko *et al.* 2002 [47]).

Tout diagnostic d'infection par le virus influenza A, suspect d'être d'origine aviaire, doit être confirmé par un laboratoire de référence pour la grippe aviaire de l'OMS, en période d'alerte interpandémique ou pandémique.

Les laboratoires n'ayant pas la capacité d'effectuer le sous-typage du virus influenza A se doivent d'adresser les échantillons à un centre national pour la

grippe ou à un laboratoire de référence pour le virus H5, mis sur pied par l'OMS et d'informer toute instance régionale, nationale ou internationale de l'OMS de la destination des prélèvements et isolats viraux.

Chez l'oiseau, on évalue la virulence de la souche obtenue en culture par injection intraveineuse chez des poulets. Les virus influenza aviaires hautement pathogènes sont définis dans la directive européenne 92/40/CEE, et au Journal Officiel Arrêté du 8 juin 1994.

Il est important de mener les études d'épidémiologie moléculaire de façon parallèle chez l'animal et l'homme, en cas d'épizootie concomitante, afin de suivre l'évolution de l'infection humaine et sa propagation, soit directe à partir des oiseaux, soit inter-humaine.

La souche H5N1, isolée chez l'homme au Vietnam a été en partie séquencée et a révélé que tous les gènes sont d'origine aviaire.

#### Le diagnostic indirect

La sérologie présente peu d'intérêt en pratique clinique ; elle est très importante a posteriori dans les enquêtes épidémiologiques sur les flambées épidémiques.

L'identification sérologique du virus influenza A (H5N1) repose sur la mesure d'anticorps spécifiques par méthode immunoenzymatique, inhibition de l'hémagglutination ou test de neutralisation.

Les anticorps neutralisants apparaissent une dizaine de jours après la contamination.

- L'inhibition de l'hémagglutination est l'examen de référence pour la détection des anticorps dirigés contre les virus grippaux humains, mais dans sa forme standard, il a montré ses limites dans le diagnostic des infections à virus aviaires.

Récemment (Stephenson, Wood *et al.* 2003 [179]), une modification du test classique qui utilise des érythrocytes de cheval en remplacement des érythrocytes de dinde, a montré une sensibilité équivalente au test de micro-neutralisation dans les études sérologiques des personnes exposées aux virus A (H7N7) en 2003, aux Pays-Bas. La présence des liaisons galactose/acide sialique de type  $\alpha(2,3)$  à la surface des érythrocytes de cheval explique l'affinité de l'hémagglutinine des virus aviaires pour ce type de récepteur (Meijer, Valette *et al.* 2005 [135]) (Puzelli, Di Trani *et al.* 2005 [160]).

- La technique ELISA nécessite des antigènes hautement purifiés ; de plus, une réactivité croisée a été signalée entre des différents sous-types d'hémagglutinine.
- Le test de micro-neutralisation est le test de choix pour la mise en évidence d'anticorps dirigés contre les virus aviaires hautement pathogènes. Il permet la détection d'anticorps spécifiques anti-HA, à des titrages que ne permettent pas les techniques d'inhibition de l'hémagglutination.

Le principe repose sur l'inhibition, par les anticorps sériques neutralisants anti-HA, des effets cytopathogènes provoqués par le virus sur des cellules MDCK en culture. Après une incubation du virus en présence de dilutions progressives de

sérum, la protéine NP du virus influenza A est mise en évidence par technique ELISA au niveau des cellules infectées. Les résultats sont observables en 48 heures.

En raison de la manipulation de virus vivant, ces tests sont effectués en laboratoire de niveau trois de confinement.

- Des études récentes ont éprouvé la performance de l'association de différentes techniques sérologiques. L'utilisation des tests de micro-neutralisation ou ELISA avec confirmation par des méthodes de western-blot a fait ses preuves en termes de sensibilité et spécificité dans les études séroépidémiologiques des infections à A (H5N1) (Rowe, Abernathy *et al.* 1999 [165]).

#### 4.4.4 Le traitement

##### 4.4.4.1 Les antiviraux

On dispose actuellement en pratique clinique, de deux classes d'antiviraux qui agissent à des stades différents de la réplication virale (Oxford, Bossuyt *et al.* 2003 [152]) (Luscher-Mattli 2000 [124]) (Cooper, Sutton *et al.* 2003 [48]) (Monto, Osterhaus *et al.* 2003 [137]) (de Jong and Hien 2006 [52]).

- La première génération est représentée par les inhibiteurs de la protéine virale M2.
  - Mode d'action et indications

La protéine M2 agit comme une pompe à protons qui régule le pH interne du virus ; l'acidification du virus étant nécessaire à son encodage, le blocage de la protéine M2 entraîne l'arrêt de la réplication virale au stade précoce de l'infection.

Deux molécules dérivées de l'adamantane sont disponibles depuis une quarantaine d'années : l'amantadine et la rimantadine.

Elles ont une action significative *in vitro* sur tous les virus influenza A, les infections expérimentales chez la souris et, chez l'homme, leur efficacité thérapeutique et prophylactique est démontrée dans les infections à virus A (H1N1), A (H2N2) et A (H3N2). L'apparition de résistance dans le traitement de la grippe commune est documentée (Masuda, Suzuki *et al.* 2000 [129]) (Fleming 2001 [65]). En pratique, les inhibiteurs de la protéine M2 ne sont pas utilisés actuellement dans le cadre des infections à virus influenza d'origine aviaire. Même si les études *in vitro* effectuées sur un isolat clinique A (H5N1) en 1997 ont montré la sensibilité du virus A (H5N1) à l'amantadine et la rimantadine (Subbarao, Klimov *et al.* 1998 [183]), les données sur leur activité sont trop peu nombreuses et leur toxicité neurologique limite leur utilisation. La rimantadine est moins toxique que l'amantadine, mais elle est indisponible dans la plupart des pays, notamment en France.
  - Résistance aux inhibiteurs de la protéine M2

Les déterminants moléculaires de la résistance à l'amantadine ont été identifiés au niveau de quatre régions du domaine transmembranaire de la protéine M2, correspondant aux acides aminés 26, 27, 30, 31.

La fréquence de l'émergence de souches virales résistantes aux adamantanes varie selon le sous-type de l'hémagglutinine, la localisation géographique et

la période étudiée. Elle est en augmentation chez les souches saisonnières (Bright, Medina *et al.* 2005 [31]). L'analyse de 60 et 74 virus aviaires à potentiel pandémique, isolés respectivement dans le sud-est asiatique et en Amérique du Nord, pendant les périodes 1979-1983 et 2000-2004 démontre l'apparition d'une résistance à l'amantadine et la rimantadine, pendant la seconde période, pour les sous-types H5, H9 des souches asiatiques. 31,1% des souches H5 et 10,6% des souches H9 portent des mutations caractéristiques au niveau du gène de la protéine M2. Seules 16,4% des souches H7 nord-américaines présentent des variations au niveau de M2 (Ilyushina, Govorkova *et al.* 2005 [93]). Les souches résistantes possèdent des substitutions d'acides aminés à l'une des trois positions identifiées : 27, 30, 31, la substitution en position 31 étant la plus fréquente.

Dans le cas du virus influenza A (H5N1), l'analyse des séquences aminoacides de la protéine M2 montre que tous les isolats viraux de génotype Z, circulant en 2003 et en 2004 en Thaïlande et au Vietnam montre une mutation correspondant à l'acide aminé en position 31 (substitution de la sérine par l'asparagine) ; cette mutation confère invariablement la résistance à l'amantadine. La résistance est croisée avec les autres inhibiteurs de la pompe à protons M2 (Puthavathana, Auewarakul *et al.* 2005 [159]).

L'amantadine et la rimantadine ne sont pas une option thérapeutique valable dans le cadre des infections humaines dues au virus influenza A (H5N1).

- Les inhibiteurs de la neuraminidase
  - Mode d'action (Dreitlein, Maratos *et al.* 2001 [56])

Lors de la répllication, les nouvelles particules virales sont fixées à la surface cellulaire par une liaison entre l'hémagglutinine et les résidus d'acide sialique du récepteur cellulaire. Les inhibiteurs de la neuraminidase bloquent la neuraminidase virale au niveau de son site de clivage, empêchant la coupure de la liaison et la libération des virions qui restent attachés à la cellule. La répllication s'arrête. La conception de ces molécules est devenue possible avec la connaissance de la localisation précise et de la structure 3D du site catalytique de l'enzyme. La cristallographie a montré la conservation du site actif de l'enzyme et de sa séquence d'acides aminés dans les différents sous-types de la NA (Oxford, Bossuyt *et al.* 2003 [152]).
  - Molécules

Le zanamivir (Relenza®) est un dérivé de l'acide sialique par addition d'un groupement guanidino de charge positive ; il se fixe aux acides aminés chargés négativement du site actif de la neuraminidase virale et agit comme inhibiteur sélectif. Il a été synthétisé en 1989 et commercialisé en 1990. Il est administré directement dans les voies respiratoires, par inhalation. Des effets secondaires, à type de bronchospasme et altération de la fonction respiratoire, ont été signalés chez des patients porteurs de broncho-pneumopathie obstructive chronique et d'asthme. Sa voie d'administration limite son utilisation chez certains patients.

L'oseltamivir (Tamiflu®) est une molécule similaire, agissant au même site de fixation de la neuraminidase virale. A la place du groupe guanidino, il possède un groupement hydrophobe qui se lie fortement à la région

hydrophobe de l'enzyme et l'inactive. La nature hydrophobe de la molécule limite son absorption gastro-intestinale. Un promédicament administrable par voie orale, l'oseltamivir phosphate, a été synthétisé, par incorporation d'une chaîne lipophile dans la molécule ; après hydrolyse par les estérases hépatiques, il se transforme en un métabolite actif l'oseltamivir carboxylate (Oxford, Bossuyt *et al.* 2003 [152]).

○ Activité de l'oseltamivir in vitro

La spécificité de l'oseltamivir pour les neuraminidases d'origine grippale est grande. Les tests de sensibilité in vitro ont démontré l'efficacité de la molécule sur les souches A (H5N1) et A (H9N2) circulant à Hong Kong en 1997 (Leneva, Roberts *et al.* 2000 [113]) et sur la souche A/Vietnam/1194/04 (H5N1) circulant actuellement dans le sud-est asiatique.

L'antiviral est actif, a priori, sur tous les sous-types de la NA, en raison du caractère hautement conservé du site actif de la neuraminidase virale.

○ Activité de l'oseltamivir et du zanamivir chez l'animal in vivo

Des études chez la souris ont montré l'efficacité du zanamivir (par voie orale à des doses de 1 et 10 mg/kg/jour) et de l'oseltamivir (par inhalation) dans la prévention et le traitement des infections expérimentales par les souches de virus influenza A/Hong Kong/156/97(H5N1) et A (H9N2) responsables des cas humains de grippe aviaire en 1997, à Hong Kong. La charge virale est diminuée au niveau des poumons, et indétectable au niveau cérébral (Ward, Small *et al.* 2005 [202]) (Leneva, Roberts *et al.* 2000 [113]).

Une étude récente a démontré un effet dose réponse de l'oseltamivir dans l'infection expérimentale de la souris par une souche A/Vietnam/1203/04 (H5N1) isolée en 2004 au Vietnam chez un patient décédé. La survie est significativement augmentée pour une posologie de 10 mg/kg/jour pendant huit jours. La dose efficace prophylactique de l'infection par la souche A (H5N1) de 1997 ne protège pas de façon équivalente de la même dose contaminante de la souche virale A/Vietnam/1203/04(H5N1) (Yen, Monto *et al.* 2005 [211]).

○ Données cliniques (Cooper, Sutton *et al.* 2003 [48]) (Roberts 2001 [164]) (McNicholl and McNicholl 2001 [134]) (Dreitlein, Maratos *et al.* 2001 [56]) (Kaiser 2001 [98]) (McClellan and Perry 2001 [131]) (McKimm-Breschkin 2005 [133]).

Des essais cliniques ont démontré l'efficacité du zanamivir et de l'oseltamivir dans le traitement des gripes saisonnières. On observe un raccourcissement de la durée des symptômes, de trois à quatre jours, une diminution de la sévérité de la maladie, une baisse de la fréquence des complications, notamment des surinfections bactériennes des voies respiratoires basses (pneumonies, bronchites, otites moyennes chez l'enfant), et par delà, une réduction de la prescription d'antibactériens et des hospitalisations (Oxford 2005 [151]).

Le facteur déterminant de l'efficacité est le délai d'initiation du traitement. Idéalement, il doit être instauré dans les 12 premières heures suivant l'apparition de la fièvre, auquel cas la maladie est raccourcie de plus de trois jours (Moscona 2005 [138]).

Dans la prise en charge des cas de grippe aviaire dus au virus A (H5N1), les patients reçoivent un inhibiteur de la neuraminidase. Il n'existe pas d'essais cliniques contrôlés qui pourraient avaliser les recommandations thérapeutiques qui se limitent à des extrapolations à partir des résultats des traitements de la grippe saisonnière. Au vu des données expérimentales récentes chez les mammifères, la dose optimale et la durée du traitement ne sont pas vraiment codifiées, mais la souche circulant actuellement nécessite des doses plus importantes d'oseltamivir sur une plus longue durée par rapport à la souche isolée en 1997 (Yen, Monto *et al.* 2005 [211]).

L'[OMS](#) recommande le traitement par oseltamivir, à la dose de 75 mg chez l'adulte, deux fois par jour, pendant cinq jours et à doses adaptées en fonction du poids, chez l'enfant de plus de un an, ceci dans les formes modérées. Dans les formes graves, des doses de 150 mg/jour pendant sept à dix jours ont été suggérées, chez l'adulte, mais des études cliniques sont nécessaires. Le traitement doit débiter dans les 48 heures suivant l'apparition de symptômes pour espérer atteindre un bénéfice clinique notable. Le zanamivir en inhalation n'a jamais été utilisé dans les cas de grippe A (H5N1).

[En France](#), l'oseltamivir a une autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la grippe chez l'adulte et l'enfant de plus de un an, aux mêmes doses que celles définies ci-dessus.

Les données cliniques concernant l'utilisation de l'oseltamivir chez les premiers patients atteints par le virus influenza A (H5N1) au Vietnam, fin 2003, début 2004, ne sont pas concluantes : cinq patients sur dix furent traités, au mieux au cinquième jour de la maladie, trois d'entre eux sont décédés (Tran, Nguyen *et al.* 2004 [194]).

Les observations faites dans les 12 cas confirmés, entre janvier et mars 2004, en Thaïlande montrent que quatre des sept patients traités par oseltamivir qui ont récupéré, ont démarré le traitement plus tôt (en moyenne quatre jours et demi) que les patients décédés (neuf jours en moyenne) (Chotpitayasunondh, Ungchusak *et al.* 2005 [43]).

Aucune conclusion ne peut être tirée à ce jour quant à l'efficacité des inhibiteurs de la neuraminidase dans la grippe A (H5N1).

o Effets secondaires

En général, le zanamivir est bien toléré (Cooper, Sutton *et al.* 2003 [48]) (Moscona 2005 [138]). Les premiers essais cliniques ont montré des effets secondaires mineurs, essentiellement respiratoires (sinusites) et gastro-intestinaux (nausées, diarrhée) à des taux équivalents aux groupes placebo. Des rapports de pharmacovigilance ont signalé des cas de toux, de bronchospasme, d'altération de la fonction respiratoire chez des patients souffrant de maladies respiratoires chroniques (asthme, broncho-pneumopathies obstructives chroniques) (McNicholl and McNicholl 2001 [134]) (Dreitlein, Maratos *et al.* 2001 [56]). Son utilisation est déconseillée en cas de pneumopathie chronique. Plus récemment, un essai clinique en double aveugle, sur des patients hospitalisés pour grippe sévère a démontré l'excellente tolérance du zanamivir en inhalation (Ison, Gnann *et al.* 2003 [95]). Des manifestations cutanées à type de rash ont également été rapportées

chez un patient porteur d'un carcinome hépatocellulaire (Kaji, Fukuda *et al.* 2005 [99]).

En 2003, une importante étude rétrospective a été publiée sur les effets secondaires de l'oseltamivir (Dutkowski, Thakrar *et al.* 2003 [57]) à partir de résultats d'essais cliniques, des données d'une compagnie d'assurance maladie américaine et des éléments de pharmacovigilance, portant sur plus de 11 000 patients et émanant d'Europe, d'Amérique du Nord et des pays de l'hémisphère sud, sur une période de cinq ans. L'oseltamivir montre un profil de toxicité faible. Les effets indésirables se résument essentiellement en des troubles gastro-intestinaux (céphalées, nausées, douleurs abdominales, vomissements, diarrhée) et des réactions cutanées à type de rash, d'urticaire, d'eczéma, quelques cas exceptionnels de syndrome de Stevens-Johnson et d'érythème polymorphe (Ward, Small *et al.* 2005 [202]) ; la responsabilité de l'oseltamivir dans ces manifestations cutanées n'est pas clairement établie, une étude antérieure avait conclu à son innocuité (Nordstrom, Oh *et al.* 2004 [147]). L'oseltamivir n'a pas d'incidence sur la fonction respiratoire, notamment chez les enfants asthmatiques.

La toxicité neurologique, peu évoquée jusqu'alors, à type de vertiges et d'insomnies, a été signalée chez des handicapés mentaux (McGeer, Lee *et al.* 2004 [132]). Elle a récemment été posée dans le [rapport du 18 novembre 2005](#) de l'Office des Médicaments Pédiatriques (Office of Pediatric Therapeutics), instance de la FDA. (Agence américaine du médicament). Dans ce rapport, l'oseltamivir est mis en cause dans la mort de 12 enfants et dans la survenue de manifestations neuropsychiatriques à type d'hallucinations, de confusion, de convulsions et de troubles du comportement ; des cas d'encéphalite sont cités. Toutes ces complications sont répertoriées au Japon, le plus gros prescripteur mondial de Tamiflu (24 millions de doses) et s'inscrivent dans une période de surveillance renforcée des effets secondaires du médicament. Il est impossible pour le moment d'établir une relation directe entre ces complications et l'oseltamivir, la grippe étant responsable de manifestations neurologiques, certes rares, mais également graves voire mortelles. La FDA maintient la vigilance.

On ne dispose pas de données suffisantes actuellement, pour évaluer le risque tératogène de l'oseltamivir, ni sa toxicité au cours de l'allaitement : l'oseltamivir et son métabolite actif sont excrétés dans le lait chez la rate allaitante, l'extrapolation à l'homme estime de 0,01 à 0,3 mg/jour respectivement les quantités excrétées dans le lait maternel (Ward, Small *et al.* 2005 [202]).

o Résistance aux inhibiteurs de la neuraminidase

Il n'y a aucune évidence de l'existence d'une résistance primaire à l'oseltamivir. Les tests réalisés sur les isolats cliniques avant tout traitement antiviral n'ont jamais montré d'altération de la sensibilité à l'oseltamivir. Les résistances apparaissent à une fréquence peu élevée pendant le traitement, et plutôt tardivement, jamais avant le quatrième jour, en concordance avec les études *in vitro*. Elles sont spécifiques du sous-type, la mutation H274Y est identifiée sur le gène N1, les mutations R292K et E119V sur le gène N2. Dans les échantillons cliniques, la population des virus

sauvages domine toujours celle des virus porteurs de la mutation. L'évolution clinique des patients infectés par un virus résistant ne diffère pas de celle de patients atteints par un virus de type sauvage.

En juillet 2004, l'incidence de la résistance à l'oseltamivir a été estimée à 0,33% chez l'adulte et l'adolescent, à 4% chez l'enfant, avec un taux global de 1,26% (Ward, Small *et al.* 2005 [202]).

Au Japon, des études récentes ont néanmoins rapporté des taux élevés de résistance, de l'ordre de 18% et 16% des cas pédiatriques traités par oseltamivir pour une grippe à A (H3N2) ou A (H1N1) ; ces taux pourraient s'expliquer comme le résultat d'une exposition à une dose d'antiviral insuffisante, favorisant l'apparition de résistance (Kiso, Mitamura *et al.* 2004 [105]).

L'analyse des séquences des gènes de la neuraminidase et les tests de sensibilité aux INA effectués sur des isolats cliniques humains A (H5N1) en 2005 au Vietnam, ont mis en évidence, chez un patient, un virus A/Hanoi/30408/2005 (H5N1) à phénotype mixte, correspondant à une population de virus de type sauvage et de virus résistants, présentant le phénotype 274Y, phénotype de résistance à l'oseltamivir. Le patient avait été traité par oseltamivir (de Jong, Tran *et al.* 2005 [53]). L'infection expérimentale de furets par des clones viraux hautement résistants issus de la souche isolée a montré l'efficacité du zanamivir en diminuant la charge virale. Il n'y aurait pas de résistance croisée entre les INA (Le, Kiso *et al.* 2005 [112]).

La résistance des virus aux inhibiteurs de la neuraminidase (INA) peut s'acquérir par le biais de modification au niveau de la neuraminidase (NA) ou d'altération des propriétés de fixation de l'hémagglutinine au niveau des récepteurs cellulaires. Les mutations mises en évidence en pratique clinique correspondent à des substitutions des acides aminés en position 292 ou 119 sur la neuraminidase N2 ou en position 274 sur N1. H274Y correspond à la substitution de l'histidine par la tyrosine, E119V, la substitution de l'acide glutamique par la valine et R292K, la substitution de l'arginine par la lysine.

Les capacités d'adaptation des virus porteurs de la mutation R292K sont réduites dans la grippe expérimentale H3N2 chez le furet et l'on n'observe aucune transmission avec les animaux contacts, dans des conditions où le type sauvage provoque une transmissibilité de 100% (Ward, Small *et al.* 2005 [202]). Par contre, les virus porteurs de la mutation E119V ou de la mutation H274Y infectent le furet et se transmettent aux animaux contacts ; cependant, dans ce dernier cas, la dose infectante est de 100 fois supérieure à celle de la souche sauvage et la transmission est plus lente (Herlocher, Truscon *et al.* 2004 [82]). Ces résultats ont été confirmés dans une étude récente, à l'aide de virus recombinants générés par génétique inverse : la mutation R292K est associée à une diminution des capacités de réplication *in vitro* et de transmissibilité *in vivo*, alors que les virus présentant la mutation E119V ont une croissance et une capacité de transmission identiques à la souche sauvage (Yen, Herlocher *et al.* 2005 [210])

En général, les substitutions au niveau de la neuraminidase virale

s'accompagnent d'un déficit de la virulence dans les modèles animaux d'infection. En pratique clinique, le risque de transmission de virus résistant aux INA est faible. Il n'existe pas à ce jour de système de culture fiable pour le dépistage des résistances aux INA sur des isolats cliniques : le même virus peut, selon le type de culture dans lequel il est propagé, révéler un phénotype sensible ou résistant (Gubareva 2004 [77]).

#### 4.4.4.2 Les traitements associés

Les antibactériens à large spectre sont associés au traitement antiviral pour la prévention des surinfections bactériennes pulmonaires, et les corticoïdes sont utilisés fréquemment avec des résultats incertains qui nécessitent des essais cliniques approfondis afin d'établir des recommandations d'usage.

#### 4.4.4.3 Perspectives thérapeutiques

- Le peramivir, inhibiteur de la neuraminidase, a des propriétés inhibitrices plus puissantes que l'oseltamivir et le zanamivir in vitro et in vivo chez la souris et le furet dans la prévention de l'infection expérimentale par le virus influenza A (Mishin, Hayden *et al.* 2005 [136]). Les essais cliniques phase I et II chez l'homme ont montré son excellente tolérance et une bonne efficacité en diminuant la charge virale après administration orale. Mais, en raison de sa faible biodisponibilité par voie orale, le développement de cette forme galénique a été stoppé et une forme à usage parentéral, par voie intramusculaire ou intraveineuse a donné d'excellents résultats et est en cours d'évaluation préclinique (Bantia, Arnold *et al.* 2005 [21]). Des [essais cliniques phase I](#) du péramivir par voie intraveineuse ont démarré en février 2006. En raison de la longueur des procédures d'autorisation de mises sur le marché, délivrées par la FDA américaine, il est prévu d'utiliser le péramivir uniquement dans le contexte d'une pandémie de grippe. L'administration par voie parentérale est particulièrement intéressante dans le cas de patients critiques, chez lesquels l'utilisation de la voie orale n'est pas possible (UPMC 2005 [8]).
- Les composés dimères du zanamivir, conjugués à des molécules de 14 à 18 atomes au niveau du groupe hydroxyle en position C7, ont une activité antivirale jusqu'à 100 fois supérieure à celle du zanamivir in vitro et in vivo chez le rat, avec pour une dose unique, un maintien de taux thérapeutiques efficaces, de l'ordre d'une semaine, au niveau des tissus pulmonaires (Macdonald, Watson *et al.* 2004 [126]). D'autres dimères ont été synthétisés, par modification de la structure des molécules de liaison. Ces nouvelles molécules ont démontré leur efficacité antivirale sur de nombreux types de virus influenza A, et pour certaines, sur la souche aviaire A (H5N1) isolée en 2004 au Vietnam (Macdonald, Cameron *et al.* 2005 [125]). Des trimères et tétramères du zanamivir ont été également synthétisés et testés avec succès pour certains d'entre eux, en raison de leur activité sur les virus grippaux A et B (Watson, Cameron *et al.* 2004 [203]).
- Les dérivés hétérocycliques de la thiourée ont montré des propriétés inhibitrices in vitro sur une souche A (H1N1) et pourraient représenter une nouvelle classe d'antiviraux (Sun, Huang *et al.* 2006 [184]).

- L'activité antineuraminidase des dérivés du cyclopentane fait l'objet d'études *in vivo* chez la souris, par voie orale et nasale (Chand, Babu *et al.* 2004 [37]) (Chand, Bantia *et al.* 2005 [38]).
- L'activité biologique de la viramidine (précurseur ou prodrogue de la ribavirine) a été étudiée sur un panel de virus influenza A (H1N1, H3N2, et H5N1) *in vitro* et *in vivo* chez la souris. Son efficacité est comparable à celle de la ribavirine (index thérapeutique équivalent), mais sa toxicité moindre, notamment hématologique, pourrait en faire un candidat potentiel dans le traitement de la grippe humaine (Sidwell, Bailey *et al.* 2005 [175]).
- Depuis sa découverte récente en 1998, l'interférence par l'ARN a montré ses potentialités comme nouvelle classe d'antiviraux. L'interférence par l'ARN repose sur la propriété qu'ont des ARN double brin de dégrader les ARN simple brin présentant les mêmes séquences. Il suffit d'introduire dans les cellules des petits ARN double brin (ARN interférents) qui ont la même séquence que l'ARN messenger du gène à inhiber ; on dit qu'ils interfèrent avec l'ARN. L'utilisation d'ARN interférents, spécifiques de régions conservées des gènes de virus influenza A, en particulier, les nucléotides 1496 à 1516 de la nucléoprotéine NP, les nucléotides 2097-2107 de l'ARN transcriptases PA et les nucléotides 2257-2277 de la polymérase PB1 a démontré une activité inhibitrice de la réplication virale *in vitro* (Bennink and Palmore 2004 [24]). Ces mêmes séquences ont un effet prophylactique et thérapeutique dans l'infection expérimentale par un virus grippal A chez la souris, en diminuant la charge virale au niveau des tissus pulmonaires (Ge, Filip *et al.* 2004 [72]) (Ge, Eisen *et al.* 2004 [71]) et protègent contre une dose contaminante létale de virus hautement pathogènes de sous-type H5 et H7 (Tompkins, Lo *et al.* 2004 [193]). Ces résultats sont pleins de promesse pour le traitement d'infections virales émergentes ; l'optimisation des séquences cibles et des systèmes de délivrance est nécessaire.
- Les effets théoriques des inhibiteurs de protéases, antirétroviraux utilisés dans le traitement du sida, commencent à être explorés. Ils se basent sur l'existence probable d'une protéase à activité chymotrypsine-like dans la région C terminale de la sous-unité PA de la RNA directed RNA polymerase des virus influenza de type A. Les inhibiteurs de protéases pourraient inhiber les fonctions protéolytiques ou endonucléolytiques de la sous-unité PA. Ces fonctions sont indispensables à la transcription de l'ARN viral en ARN messenger et leur blocage entraîne une réduction de la réplication virale (Savarino 2005 [168]). Ces recherches sont à un stade embryonnaire et constituent une base à des études urgentes *in vitro*. La détermination de la structure 3D de la sous-unité PA par cristallographie est impérative au développement de molécules inhibitrices spécifiques.

#### 4.5 Evolution du virus A (H5N1)

Les premiers cas avérés d'infection humaine grave voire mortelle due aux virus HPAI datent de 1997, à Hong Kong, pendant les épizooties de grippe aviaire qui dévastent les élevages de volaille. L'élimination de toutes les volailles met fin à la flambée. Bien que le virus A (H5N1) continue de circuler chez les oiseaux

d'élevage, aucun nouveau cas humain ne sera signalé entre 1999 et février 2003. Le séquençage des segments viraux effectué sur les isolats cliniques A (H5N1) de 1997 montre la proximité avec les virus qui circulent chez les volailles et les oiseaux sauvages et met en évidence des facteurs de virulence que l'on retrouvera ultérieurement au cours des flambées de 2003 à 2005 (Beigel, Farrar *et al.* 2005 [23]) :

- les acides aminés basiques multiples au niveau du site de clivage de l'hémagglutinine lui permettent d'être activée par de nombreuses protéases cellulaires ;
- la substitution de la glutamine en position 627 par la lysine, au niveau de la protéine PB2 augmente la capacité répliquative du virus ;
- la substitution de l'asparagine en position 92 par la glutamine, au niveau de la protéine NS1, accroît la résistance du virus à l'activité antivirale des interférons et du facteur nécrose tumorale  $\alpha$  in vitro.

Les études antigéniques et phylogénétiques d'isolats A (H5N1) aviaires et humains prélevés en 2004 et 2005 en Asie (WHO Global Influenza Program 2005 [205]), montrent une proximité étroite du gène de l'hémagglutinine des spécimens humains avec l'HA des virus aviaires (taux de divergence  $\leq 1\%$ ) et l'existence de deux lignées (ou clades) différents pour l'HA, appelés clade 1 et clade 2 :

- le clade 1 est isolé chez les oiseaux et l'homme au Vietnam, en Thaïlande et au Cambodge, uniquement chez les oiseaux au Laos et en Malaisie ;
- le clade 2 est isolé chez les oiseaux uniquement en Chine, en Indonésie, au Japon et en Corée du sud ;
- ils sont différents des virus isolés chez les oiseaux et l'homme à Hong Kong en 2003 et 1997 qui appartiennent à des clades différents : 1' et 3 respectivement.

La comparaison des séquences d'acides aminés de l'HA des isolats humains de clade 1 et 2 avec ceux des cas mortels de 1997 et 2003 à Hong Kong, montre des variations au niveau de l'HA des virus 2004-2005 (WHO Global Influenza Program 2005 [205]) :

- la substitution de la sérine vers la leucine à la position 126 est associée à une modification de la capacité de fixation du virus au récepteur cellulaire ;
- la substitution de l'adénosine vers la tyrosine à la position 156, entraîne une glycosylation de l'asparagine à la position 154. Cette modification est habituellement associée à une adaptation du virus aux oiseaux terrestres et une accentuation de la virulence chez ces oiseaux.

De nombreuses modifications des acides aminés de l'hémagglutinine apparaissent dans les trois premiers mois de 2005 par rapport aux isolats de 2004. Les plus fréquentes sont localisées près du site de fixation au récepteur cellulaire (WHO Global Influenza Program 2005 [205]).

L'arbre phylogénétique des gènes de la neuraminidase NA est semblable à celui des gènes de l'HA, avec une évolution parallèle des deux gènes de l'enveloppe virale. Les gènes des isolats de Thaïlande semblent diverger des gènes de virus isolés au Vietnam, pour former un groupe distinct. Les gènes de la NA des isolats humains et

aviaires de 2003 à 2005 ainsi que ceux du clade 3 présentent des délétions au niveau de la tige de l'enzyme, correspondant aux acides aminés de la position 49 à 68 dans les clades 1 et 2, de la positions 54 à 72 dans le clade 3. Ces délétions favoriseraient la rétention des virions au niveau de la membrane plasmique pour contrebalancer la faiblesse de la liaison entre l'HA et l'acide sialique induite par la glycosylation de l'acide aminé en position 154 récemment acquise (WHO Global Influenza Program 2005 [205]).

L'arbre phylogénétique des gènes de la protéine M2 évolue de façon parallèle à celui des gènes de la HA. La séquence d'acides aminés de M2 des virus du clade 1 et du clade 1' (A/Hong Kong/213/03) révèle une substitution de la sérine vers l'asparagine au résidu 31 ; cette substitution confère la résistance aux adamantanes. Les virus de clade 1 de 2004 et 2005, cultivés en présence de rimantadine se répliquent aussi efficacement qu'en l'absence de l'antiviral dans le milieu de culture (WHO Global Influenza Program 2005 [205]).

La caractérisation complète des gènes des virus humains circulant en Asie de 2003 à 2005 confirme l'origine aviaire de tous les gènes et l'absence de tout réassortiment avec des gènes d'origine humaine.

Depuis 1997, la circulation du virus A (H5N1) dans de nombreuses espèces aviaires, s'est accompagnée de nombreux réassortiments et a favorisé l'apparition de nombreux génotypes. La phylogénie a permis de tracer l'origine du virus A (H5N1) hautement pathogène asiatique, en comparant des isolats aviaires et humains d'Indonésie, de Thaïlande, du Vietnam, avec des prélèvements effectués au cours de la surveillance systématique sur les marchés de Hong Kong et en Chine, de 2000 à 2004. Les gènes codant pour la HA et la NA dérivent de la souche Goose/Guangdong/1/96, isolée en Chine en 1996. Les six gènes codant pour les protéines internes sont issus de multiples réassortiments (Sims, Domenech *et al.* 2005 [176]).

Depuis janvier 2002, le génotype Z est le type dominant en Chine du sud : caractérisé par la présence de délétions au niveau de la tige de la neuraminidase, et de délétions de cinq acides aminés (position 80-84) au niveau de la protéine NS1. Tous les virus responsables des flambées en Indonésie, Thaïlande et au Vietnam, fin 2003 et 2004 sont de génotype Z (Li, Guan *et al.* 2004 [114]) (Puthavathana, Auewarakul *et al.* 2005 [159]). La caractérisation du virus A (H5N1) isolé chez l'homme en 2003, à Hong Kong montre l'absence de délétion au niveau de la tige de la neuraminidase et l'absence de site de glycosylation supplémentaire à la tête de l'hémagglutinine ; ces caractéristiques sont typiquement associées à l'adaptation du virus aux oiseaux terrestres (Shinya, Hatta *et al.* 2005 [174]).

## 4.6 Prévention

### 4.6.1 Prévention chez l'homme

#### 4.6.1.1 Les vaccins

La prévention repose presque exclusivement sur la vaccination dont le but est d'initier une réponse immune protectrice adéquate en cas de contact avec un virus grippal. Dans l'Union Européenne, les critères d'immunogénicité d'un vaccin sont basés sur la mesure d'un taux sérique efficace d'anticorps neutralisants dirigés contre les glycoprotéines de l'enveloppe virale : l'hémagglutinine et la neuraminidase, l'hémagglutinine étant la plus antigénique (Aymard, Gerentes *et al.* 1999 [15]).

Selon les recommandations de l'OMS, les vaccins ayant une autorisation de mise sur le marché (AMM) comportent les deux sous-types H3N2 et H1N1 de virus de type A et un virus de type B, correspondant aux souches circulant dans la population humaine au cours des épidémies saisonnières. Chaque année, les trois souches sont sélectionnées par des experts virologues, à partir de dizaines de milliers de prélèvements effectués sur tous les continents et caractérisés par les centres nationaux de référence du réseau mondial de surveillance de la grippe. L'OMS fournit les souches virales prototypes aux fabricants de vaccins afin qu'ils mettent à jour la composition des vaccins saisonniers pour la période à venir. Deux réunions ont lieu chaque année, une, en février pour l'hémisphère nord et six mois plus tard pour l'hémisphère sud.

On dispose actuellement de deux types de vaccins antigrippaux : les vaccins inactivés et les vaccins vivants atténués (Demicheli, Jefferson *et al.* 2000 [54]).

#### Les vaccins antigrippaux trivalents inactivés (VTI)

Les vaccins inactivés faisant l'objet d'une autorisation de mise sur le marché exploitent la nature segmentaire du génome des virus grippaux ; depuis le début des années 1970, ils sont composés de virus réassortis contenant les segments codant pour l'hémagglutinine et la neuraminidase des souches saisonnières et les six gènes internes provenant d'une souche mère A/Puerto Rico/8/34 (PR8) (H1N1), avirulente, adaptée en laboratoire. La recombinaison se fait par l'injection simultanée des deux souches virales (sauvage et PR8) dans des embryons de poulet. Les virus réassortis possèdent ainsi les propriétés antigéniques des souches circulantes, l'innocuité et les capacités de multiplication de la souche PR8.

Il existe trois types de VTI : les vaccins à virus entier, les vaccins à virus fragmenté et les vaccins sous-unités. Ces deux derniers sont de loin les plus utilisés, car moins réactogènes que les préparations à virus entier.

Les vaccins à virions fragmentés sont constitués de particules obtenues après dissociation du virus par un détergent. Les vaccins sous-unités sont composés de neuraminidase et d'hémagglutinine virales purifiées après élimination des autres constituants (OMS 2005 [150]).

L'utilisation d'adjuvants immunologiques permet d'augmenter l'immunogénicité des vaccins inactivés. L'Union Européenne a récemment homologué un vaccin adjuvé avec une émulsion huile dans l'eau, le MF59 (FluAD<sup>®</sup>) ; celui-ci s'est montré plus performant que les vaccins sans adjuvant chez les personnes naïves.

Les vaccins inactivés virosomaux sont apparus récemment sur le marché dans quelques pays européens : Influvac Plus<sup>®</sup>, Inflexal V<sup>®</sup> en Suisse et Invivac<sup>®</sup> aux Pays-Bas. Ils se sont montrés plus efficaces que les vaccins classiques chez la personne âgée pour laquelle les défenses immunes sont affaiblies (de Bruijn, Nauta

*et al.* 2005 [50]). Ils ouvrent une nouvelle voie dans la prévention de la grippe, notamment par l'inclusion [d'adjuvants immunologiques](#).

Les VTI ont en général une efficacité protectrice comparable, étroitement liée à la correspondance antigénique entre la souche vaccinale et la souche circulante saisonnière. La durée moyenne de la protection est estimée de quatre à six mois. Leur tolérance est bonne et meilleure pour les VTI à virus fragmenté et les vaccins sous-unités. Les effets secondaires sont à type de réactions locales au point d'injection, ou plus rarement de réactions généralisées à type de syndrome pseudo-grippal. Une augmentation du risque de syndrome de Guillain Barré a également été signalée au cours de certaines saisons grippales (OMS 2005 [150]).

Les VTI sont administrés par voie intramusculaire, dans le deltoïde ou la face antérolatérale de la cuisse, chez l'adulte, la personne âgée et l'enfant à partir de six mois.

Les vaccins utilisés en France sont des vaccins inactivés. La vaccination est recommandée par le Conseil supérieur d'hygiène publique pour les sujets à risque (personnes de plus de 65 ans, dans certaines affections de longue durée et pour toutes les personnes exposées professionnellement aux sujets à risque). Pour [la saison hivernale 2006/2007](#), seule la souche A (H3N2) sera modifiée par rapport à la période 2005-2006, selon les recommandations de l'OMS.

[Huit vaccins](#) sont commercialisés en France, correspondant à des préparations vaccinales différentes : six d'entre eux sont des vaccins classiques trivalents inactivés, sous forme de virus fragmentés (Fluarix®) ou d'antigènes de surface purifiés (Influvac®) ; un vaccin VTI adjuvé a été mis sur le marché en 2004 (Gripguard), et le vaccin Tetagrip® associe la vaccination antitétanique. Le [ministère de la santé](#) émet chaque année un guide de vaccination antigrippale.

Suite à l'épisode de grippe aviaire de Hong Kong en février 2003, les laboratoires de référence et les centres collaborateurs de l'OMS pour la grippe ont développé plusieurs souches vaccinales recombinantes prototypes, à partir des virus de 2003 et 2004 ; ces souches pandémiques ont été mises à disposition d'un certain nombre d'institutions et de compagnies pharmaceutiques pour la fabrication et la production de différents vaccins destinés à protéger l'homme contre la souche A (H5N1) de l'influenza (OMS 2003 [2]).

#### Les vaccins vivants atténués

Le développement de vaccins vivants atténués, administrés par voie nasale, représente une alternative aux vaccins inactivés. Ils sont utilisés depuis plusieurs années en Russie. En 2003, la FDA américaine a autorisé la mise sur le marché d'un vaccin trivalent vivant atténué pour administration nasale, chez les personnes de 5 à 49 ans (FluMist). Chaque dose contient les virus réassortis des trois souches virales épidémiques.

Le transfert des six gènes des protéines internes d'une souche mère de virus influenza A/Ann Arbor/-/60 (AA)(H2N2) (ou AA ca) vivante, atténuée, adaptée au froid, dans chacune des trois souches sauvages circulantes, contenant les gènes HA et NA recommandés par l'OMS, permet de générer des vaccins réassortis possédant

un phénotype d'atténuation (spécifié par des mutations au niveau des gènes internes) et d'immunogénicité adapté pour l'homme, une stabilité génétique et une transmissibilité absente ou négligeable des sujets vaccinés aux sujets contacts non immunisés (Girard, Cherian *et al.* 2005 [74]). La génération des virus réassortis se fait de manière classique, par la co-infection de la cavité allantoïdienne d'œufs embryonnés par la souche virale sauvage et la souche mère. Les souches vaccinales se multiplient efficacement dans des cultures primaires de cellules rénales de poulet et dans les œufs fertilisés à 25-33°C ; elles ont un taux de réplication faible à 37°C.

Les vaccins vivants atténués semblent être d'une efficacité protectrice comparable aux vaccins trivalents inactivés. Ils induisent principalement une sécrétion d'IgA locale au niveau des voies respiratoires supérieures, qui contribuent à une résistance à l'infection. Des études de pharmacovigilance ont été menées aux Etats-Unis pendant les saisons grippales de 2003-2004 et 2004-2005. Quatre cent soixante effets secondaires ont été répertoriés sur ces périodes parmi lesquels 9% sont considérés comme sérieux. Les accidents allergiques à type de réaction anaphylactique et les problèmes respiratoires, notamment à type d'aggravation d'asthme préexistant, sont les complications les plus fréquentes. On cite également deux cas de syndrome de Guillain Barré et une paralysie faciale périphérique (Izurieta, Haber *et al.* 2005 [97]). Les contre indications sont notamment les allergies aux protéines d'œuf, le premier trimestre de la grossesse et les états d'immunodépression.

Dans son [bulletin du 30 janvier 2004](#), l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande la vaccination par le vaccin saisonnier, des populations potentiellement exposées aux virus A (H5N1), dans les régions atteintes par les épizooties. Cette vaccination ne protège pas contre les souches virales d'origine aviaire. Elle se justifie par la crainte de voir apparaître des réassortiments entre les virus aviaires et humains, en cas d'infection mixte. De tels échanges de gènes pourraient favoriser l'apparition de souches mutantes capables de s'adapter rapidement à l'homme.

Les vaccins antigrippaux saisonniers sont produits selon des méthodes classiques, mises au point il y a une cinquantaine d'années. Chaque souche virale de référence est injectée et mise en culture dans des œufs de poule embryonnés d'une dizaine de jours. Il est ensuite isolé, purifié (débarrassé des protéines d'œuf) et tué chimiquement par le formol ou la beta-propiolactone, avant son inclusion dans les vaccins. Il faut en moyenne un à deux œufs pour produire une dose annuelle de vaccin inactivé, et le processus de fabrication est long : il demande environ six mois.

Ces méthodes traditionnelles ne conviennent pas pour les virus aviaires hautement pathogènes tels que le virus A (H5N1), en raison de leur virulence létale pour les embryons où ils n'ont guère le temps de s'y multiplier. D'autres techniques de production se sont développées, et utilisent notamment les cultures cellulaires et la génétique inverse.

### La génétique inverse et les cultures cellulaires

En virologie moléculaire, la génétique inverse définit la génération de virus dont le génome est produit à partir d'ADNc (ADN complémentaire). L'ARN viral est isolé et transcrit en ADNc par une transcriptase inverse. L'ADNc est amplifié par amorces spécifiques des segments viraux puis cloné (Marsh and Tannock 2005 [128]).

La préparation des virus réassortis entrant dans la composition des vaccins fait appel à la coinfection de cellules par deux souches de virus influenza et peut générer théoriquement 254 ( $2^8$ ) virus recombinés. La sélection indispensable des « bons réassortis » nécessite des procédures d'analyse et de vérification longues et dispendieuses. Le développement des techniques de génétique inverse permet de réduire le nombre de virus réassortis résultants.

- Les techniques de génétique inverse (Neumann, Whitt *et al.* 2002 [142])  
Les premiers systèmes de génétique inverse appliqués aux virus influenza A font appel à des virus helper (virus qui assure les fonctions manquantes d'un virus défectif). Un complexe de ribonucléoprotéines (RNP) est produit par la synthèse *in vitro* des segments d'ARN viral (vRNA) en présence des polymérase et de NP. Ce complexe représente l'unité de réplication minimale des virus influenza A. Des cellules eucaryotes sont ensuite transfectées avec ces RNP et infectées par un virus influenza A helper. L'infection cellulaire par le virus helper génère des virus possédant le gène correspondant à l'ADNc cloné.

Une autre méthode, utilisant le même type de système, est basée sur la transcription *in vivo* des vRNA par l'ARN polymérase I (pol I) cellulaire ; il y a production intracellulaire des complexes RNP. Dans ce système, l'ADNc codant pour les vRNA est inséré entre les séquences promoteur et terminale de pol I. Les complexes fonctionnels RNP sont générés à l'aide d'un virus helper infectant (Neumann, Watanabe *et al.* 1999 [141]).

Ces systèmes utilisant des virus influenza helper nécessitent également une sélection des virus transfectants parmi la population des helper.

En 1999, un système de génétique inverse a permis la génération de virus influenza A à partir d'ADN complémentaire exclusivement. Des cellules humaines embryonnaires rénales (cellules 293T) sont transfectées avec huit plasmides, chacun codant un segment d'ARN viral d'une souche H1N1, encadré par le promoteur (d'origine humaine) et la séquence de terminaison de l'ARN polymérase I, auxquels s'ajoutent quatre plasmides pour l'expression des protéines NP et le complexe polymérase (PA, PB1, PB2). Ce système à 12 plasmides permet de produire en 48 heures plus de  $10^6$  unités formatrices de plages par millilitre (ml) de supernatant (Neumann, Watanabe *et al.* 1999 [141]).

Par la suite, des systèmes de génération de virus influenza A à partir de huit plasmides ont été développés. Chaque plasmide contient une copie d'un des huit segments de l'ARN viral : l'ADNc est inséré entre le promoteur et le terminateur de pol I ; cette unité de transcription est encadrée par le promoteur de pol II (ARN polymérase II) et un signal de polyadénylation (signal de fin de gène). Après transfection, l'ARN viral antisens (de polarité négative)

est synthétisé par la pol I cellulaire, et la transcription par la pol II résulte en la synthèse de brins d'ARNm (ARN messenger) de polarité positive traduits ensuite en protéines virales. La réplication virale est initiée dès la synthèse des protéines du complexe polymérase virale (PB1, PB, PA, NP). Ce système a montré son efficacité dans la génération de virus influenza A H1N1 et H6N1 en cultures de cellules 239T et MDCK ; il a permis également la génération de virus réassortis entre ces mêmes souches (Hoffmann, Neumann *et al.* 2000 [87]).

D'autres systèmes de génétique inverse utilisant un nombre réduit de plasmides ont été expérimentés, en combinant plusieurs gènes viraux dans le même plasmide :

- un plasmide pour la transcription des huit ARN viraux ; chacune des huit unités de transcription comprend le promoteur d'origine humaine de pol I, l'ADNc de polarité négative codant un segment du génome viral, et la séquence terminator de pol I d'origine murine ;
- un système à deux plasmides basé sur pol I : un plasmide contenant deux unités de transcription, une pour HA, une pour NA, selon le même schéma que ci-dessus ; un second plasmide avec six unités de transcription correspondant aux six autres segments viraux (PB1, PB2, PA, NP, NS, M) ;
- un système à deux plasmides basé sur pol II : un plasmide pour la transcription de PA, PB1, PB2 ; chacune des trois unités de transcription contient l'ARNm codant pour la protéine virale, intercalé entre le promoteur de pol II et une séquence de polyadénylation ; le second plasmide est construit sur le même modèle pour la transcription de l'ARNm de la protéine NP ;
- en combinant ces unités de transcription, la génération de virus influenza A dans des cultures de cellules Vero est plus importante 48 heures après la transfection que dans les systèmes à 12 plasmides. L'utilisation d'un ou deux plasmides pour la synthèse des vARN en combinaison avec le plasmide codant pour le complexe polymérase basé sur pol II, donne des titres de l'ordre de  $2.5 \times 10^6$  particules virales par ml, 72 heures après la transfection. De même, la combinaison des sous-unités du complexe polymérase dans le même plasmide augmente la capacité de génération virale (Neumann, Fujii *et al.* 2005 [140]).

La génération de virus à partir de systèmes de transfection à huit plasmides et moins, réduit le temps nécessaire à la création de virus potentiellement candidats à l'élaboration de vaccins et globalement en diminue le coût de préparation.

- La construction de souches vaccinales contre les virus influenza A  
Les systèmes de transfection de l'ADN à huit plasmides ont été testés pour la génération de souches vaccinales saisonnières et la construction de virus circulant en Asie du sud-est en 1997 (Hoffmann, Krauss *et al.* 2002 [86]) :
  - la souche A/PR/8/34 (H1N1) : souche mère pour la production des vaccins inactivés humains, obtenue à l'aide de huit plasmides, chacune codant un segment de l'ARN viral ;

- les virus réassortis H1N1 et H3N2, souches recommandées par l'OMS pour la fabrication des vaccins saisonniers de 2001/2002 ;
- le virus réassorti des souches H9N2 et H6N1 circulant en Asie, présumées être les précurseurs du virus H5N1 responsable des cas de grippe aviaire à Hong Kong en 1997.  
Dans ces deux derniers cas, les virus réassortis sont générés par la transfection en culture mixte de cellules 293T et MDCK, avec six plasmides contenant les six gènes internes de la souche mère PR8 et deux plasmides codant les sous-types NA et HA choisis ;
- les capacités de croissance de la souche recombinée PR8 sont identiques à celles de la souche sauvage ; les caractéristiques antigéniques des virus réassortis sont identiques à celles des virus parents. Les résultats sont en faveur de l'utilisation de cette technique pour la génération rapide et reproductible de souches vaccinales.
- Avantages des techniques de génétique inverse  
La génétique inverse utilise les cellules en culture, permettant la génération des souches vaccinales à partir de cellules approuvées pour leur utilisation dans le développement des vaccins humains (cellules qualifiées). Elle permet de maîtriser la virulence des souches prototypes, par manipulations au niveau du motif multibasique d'acides aminés près du site de clivage de HA.  
  
Elle ne nécessite pas de système de sélection des virus réassortis pertinents parmi tous les virus recombinés.  
Les plasmides codant les gènes de la souche mère sont disponibles par avance, seuls les gènes HA et NA nécessitent d'être clonés pour chaque vaccin (Luke and Subbarao 2006 [123]).  
Les procédures de génétique inverse doivent être adaptées au niveau de biosécurité approprié en fonction des agents biologiques manipulés. L'OMS a édité, à ce sujet, un guide de développement des souches vaccinales de référence par génétique inverse (OMS 2005 [4]).
- Les cultures cellulaires  
Les souches vaccinales utilisées dans les vaccins inactivés sont produites sur des œufs de poules fertilisés depuis un demi siècle. Le risque de contamination des œufs par des rétrovirus aviaires n'est pas nul et peut compromettre l'innocuité des préparations vaccinales. Les techniques de génétique inverse ont permis le développement de souches vaccinales contre le virus A (H5N1) pour lesquelles on a montré l'immunogénicité et l'absence de pouvoir pathogène. Les premiers essais de transfert génétique ont utilisé des lignées cellulaires 293T, très adaptées à cette technique (Subbarao, Chen *et al.* 2003 [182]). Mais ces lignées ne sont pas validées actuellement par les instances qui contrôlent la production de vaccins humains, pour la raison qu'elles n'ont pas encore fait l'objet de recherche sur leur potentiel oncogène ou infectieux. Les cellules Vero quant à elles, bénéficient d'une licence d'utilisation pour la fabrication des vaccins antipoliomyélitiques et sont en cours de validation pour la fabrication des vaccins antigrippaux.  
L'utilisation des cellules Vero dans les procédures de génétique inverse a montré ses performances dans la génération de virus réassorti H5N1/PR8 non

pathogène, toutes les procédures ayant fait l'objet d'une démarche de contrôle et d'assurance qualité pour des systèmes à 12 plasmides (Nicolson, Major *et al.* 2005 [145]) et pour des systèmes à huit plasmides (Webby, Perez *et al.* 2004 [204]).

### Les virosomes et les ISCOMs

Les virosomes sont des systèmes de transport liposomal et représentent un nouveau système de délivrance des vaccins. Ils ressemblent étroitement au virus naturel. Ce sont des pseudo particules virales, constituées de l'enveloppe virale, sans aucun matériel génétique où l'hémagglutinine et la neuraminidase du virus grippal sont intercalées entre deux couches de phospholipides. Ils sont obtenus après solubilisation à l'aide d'un détergent et reconstruction. Ils ont une morphologie et des capacités de pénétration cellulaire identiques au virus original, et conservent leurs propriétés de fixation au récepteur cellulaire et de fusion membranaire qui sont propres à l'hémagglutinine virale. En raison de l'absence de l'ARN viral, les virosomes n'infectent pas les cellules avec lesquelles ils fusionnent.

Ils fonctionnent comme un système de présentation d'antigène, avec une capacité d'induction et de stimulation des cellules dendritiques (cellules présentatrices d'antigène) (Huckriede, Bungener *et al.* 2005 [91]) : l'activation des lymphocytes T déclenche la production de cytokines qui activent à leur tour les lymphocytes B et la sécrétion d'anticorps. Ils ont l'avantage sur les vaccins conventionnels de stimuler l'immunité cellulaire, primordiale dans la réponse immune chez les personnes naïves de tout contact avec un agent viral, activité précisément intéressante dans le contexte d'une pandémie, et intéressante pour l'immunisation des personnes âgées (de Bruijn, Nauta *et al.* 2005 [50]) (Zurbriggen 2003 [215]).

Les virosomes permettent d'autre part, l'incorporation d'adjuvants immunologiques dont le but est de booster la sécrétion d'anticorps dirigés contre l'hémagglutinine (Huckriede, Bungener *et al.* 2005 [91]).

Les ISCOMs (immunostimulatory complex) sont constitués de Quil A, de cholestérol et de phospholipides. Quil A est un adjuvant puissant. Les ISCOMs sont utilisés comme vecteurs d'antigènes. Des formulations de vaccins antigrippaux inactivés pour administration nasale sont à l'étude.

### Les adjuvants immunologiques

Un certain nombre d'adjuvants, en raison de leurs capacités à booster la réponse immune, font l'objet d'études expérimentales pour leur inclusion dans les vaccins anti-grippaux.

- Le MF59 : a donné des taux de séroconversion plus élevés qu'un vaccin sans adjuvant, dans un essai clinique de vaccin expérimental contre une souche H5 (Stephenson, Nicholson *et al.* 2003 [178]).
- Une classe potentiellement intéressante d'adjuvants est représentée par les entérotoxines bactériennes sous forme détoxifiée : la toxine de *Vibrio cholerae*, la toxine thermolabile de *Escherichia coli*. Il a été démontré que l'adjonction d'une de ces toxines à un antigène conduit à une forte réponse immune contre cet antigène. Ces molécules ont un grand intérêt dans le cadre

d'une administration locale, par voie nasale : où elles induisent une sécrétion importante systémique et locale d'IgG et d'IgA.

Leur utilisation par voie nasale réduit de beaucoup leur toxicité pour le tractus digestif.

Un vaccin virosomal additionné d'une entérotoxine native non détoxifiée HLT (Heat labile toxine d'E.coli) a été homologué en Suisse, en 2001, et retiré rapidement du marché en raison d'un nombre important de cas de paralysie faciale périphérique (Huckriede, Bungener *et al.* 2005 [91]).

- La stimulation de l'immunité par des cytokines spécifiques, telles l'interleukine 2 (IL-2), le facteur de croissance des granulocytes et des monocytes (GM-CSF) ou encore l'interféron gamma, encapsulées dans des liposomes, donne des résultats variables.

L'utilisation d'antigènes complets induit une forte réponse humorale, dirigée contre les glycoprotéines de surface, l'hémagglutinine et également la neuraminidase, dans un modèle murin (Babai, Barenholz *et al.* 2001 [16]). La même préparation vaccinale a été évaluée cliniquement avec succès, chez le sujet âgé et l'adulte jeune (Ben-Yehuda, Joseph *et al.* 2003 [25]) (Ben-Yehuda, Joseph *et al.* 2003 [26]).

Par contre, les fractions antigéniques de l'hémagglutinine (basées sur un ou plusieurs déterminants antigéniques des lymphocytes B et T) fusionnées ou additionnées à une cytokine dans la préparation vaccinale, n'ont pas d'effet protecteur dans l'infection expérimentale par un virus influenza A chez la souris (Wales, Baird *et al.* 2005 [200]), alors que le vaccin inactivé standard assure une protection totale (Faulkner, Buchan *et al.* 2003 [61]).

- Les sels d'aluminium ont démontré leur efficacité en permettant de réduire jusqu'à huit fois la dose vaccinale nécessaire à l'induction d'un taux d'anticorps similaire à celui obtenu avec la dose commune (15 microgrammes d'hémagglutinine par souche virale) (Hehme, Engelmann *et al.* 2004 [81]).

### La production de souches vaccinales contre les virus A (H5N1) et A (H9N2)

On peut considérer quatre approches pour la génération de vaccins dirigés contre le virus influenza A (H5N1) :

- un vaccin inactivé élaboré à partir d'une souche A (H5N1) isolée chez l'homme. La faisabilité de cette approche pose deux problèmes : elle est tout d'abord limitée techniquement par la létalité du virus sur les embryons de poulet et sa croissance insuffisante pour sa propagation dans les oeufs fertilisés ; la manipulation de souches virales hautement pathogènes soulève la question de la sécurité des personnels de laboratoire et requiert un niveau de confinement trois au minimum ;
- un vaccin inactivé préparé à partir d'une souche virale avirulente, antigéniquement proche d'une souche virale A (H5N1) isolée chez l'homme et capable d'induire la fabrication d'anticorps contre la souche pathogène (comme le vaccin issu de la souche A/duck/Singapore/97 (H5N3)) ;
- l'utilisation de l'hémagglutinine HA comme molécule immunogène unique :

- dans un vaccin à ADN nu ou vaccin génétique : le gène de HA est introduit directement dans l'organisme, le plus souvent dans les cellules musculaires par voie intramusculaire ; le vaccin est produit, in situ, dans l'organisme à immuniser ;
- par la production d'une hémagglutinine recombinante dans un système d'expression de type adénovirus humain, dans lequel le gène codant pour HA est inséré dans le génome du vecteur viral, qui exprimera ensuite HA à sa surface. Le vecteur est inclus dans le vaccin, injecté par voie intramusculaire ou par voie intranasale, agit comme un système de délivrance d'antigènes au système immunitaire ;
- par la production d'une hémagglutinine recombinante dans un système d'expression de type baculovirus (Nwe, He *et al.* 2006 [148]) dans lequel un baculovirus génétiquement modifié pour l'expression de HA est introduit et propagé dans des cellules d'insectes en culture. La protéine recombinante exprimée est ensuite extraite et purifiée, et peut servir de base à des vaccins sous-unités ; elle est souvent administrée avec un adjuvant qui potentialise leur pouvoir immunogène ;
- un vaccin conventionnel préparé à partir de virus réassortis à haut potentiel de multiplication, porteurs des gènes HA et NA d'une souche A (H5N1) isolée chez l'homme et des gènes internes d'une souche vaccinale mère telle que PR8 ou A/Ann Arbor/6/60 adaptée au froid (Shengqiang, Chongguang *et al.* 1999 [172]). L'hémagglutinine est rendue avirulente par une modification de la séquence qui code pour son site de clivage (Subbarao, Chen *et al.* 2003 [182]) (Horimoto, Takada *et al.* 2005 [89]) (Lipatov, Webby *et al.* 2005 [122]).

En 2002, le CDC d'Atlanta développe par génétique inverse un virus candidat vaccin, proche dans son principe des vaccins antigrippaux bénéficiant actuellement d'une AMM. Ce virus réassorti est généré par un système à 12 plasmides qui comporte : deux plasmides pour NA et HA qui proviennent de la souche A/Hong Kong/491/97 (H5N1) ; le gène HA a subi une délétion au niveau du motif d'acides aminés multibasiques du site de clivage, par mutagenèse dirigée, six plasmides assurent la transcription des six gènes internes de la souche mère PR8, et quatre autres l'expression des protéines PA, PB1, PB2, NP de PR8. La transfection a lieu sur culture de cellules 293T et la propagation virale par injection dans des oeufs fertilisés de poulet. Les tests de pathogénicité du virus réassorti H5N1/PR8 montrent que l'altération du motif d'acides aminés multibasiques du gène de l'HA atténue la virulence du virus chez la souris et le poulet, sans en diminuer l'antigénicité. Le vaccin issu de l'inactivation du virus se révèle être immunogène et protège la souris d'une dose létale de la souche sauvage A (H5N1) (Subbarao, Chen *et al.* 2003 [182]).

Les vaccins vivants sont une alternative intéressante aux vaccins inactivés. Ils requièrent des doses plus faibles d'antigènes, élicitent une réponse immune plus importante, plus rapide (environ dix jours après la vaccination), plus globale (immunité cellulaire) que les vaccins inactivés, notamment chez les personnes naïves. Le laboratoire du NIAID (Luke and Subbarao 2006 [123]) développe actuellement un vaccin pandémique, vivant et atténué, basé sur la souche mère

A/Ann Arbor/-/60 (AA) (H2N2), porteuse des gènes HA et NA des virus HPAI circulants. Leur programme de recherche inclut :

- La génération d'un lot de virus vivants atténués porteurs d'une HA des sous-types 4 à 16, associée à une NA, selon les combinaisons existantes chez les virus de type sauvage, ces deux protéines étant combinées aux autres gènes de la souche mère A/Ann Arbor/-/60 (AA) (H2N2).
- La préparation de chaque lot de vaccins pandémiques candidats.
- L'évaluation chez l'homme de l'innocuité, de l'immunogénicité et de la stabilité phénotypique de chaque vaccin.

Des essais précliniques chez la souris ont testé le pouvoir immunogène de vaccins vectorisés utilisant un adénovirus humain non répliquatif comme vecteur d'expression de l'hémagglutinine d'une souche A (H5N1).

- Le vecteur est porteur du gène HA d'une souche A/Hong Kong/156/97 (H5N1) (Hoelscher, Garg *et al.* 2006 [85]) ou d'une souche A/Vietnam/1203/04 (H5N1) (Gao, Soloff *et al.* 2006 [70]).
- La vaccination induit une sécrétion d'anticorps spécifiques anti HA et une stimulation de l'immunité cellulaire.
- L'immunisation donne une protection efficace contre une dose létale de virus A (H5N1).
- La production du vaccin vectorisé est rapide, 36 jours après la détermination de la séquence du gène viral (Gao, Soloff *et al.* 2006 [70]).

#### Les essais cliniques de vaccins candidats contre les virus hautement pathogènes

Le principe de base de l'efficacité des vaccins antigrippaux humains est de provoquer la synthèse d'anticorps neutralisants dirigés contre l'antigène majeur des virus influenza : l'hémagglutinine HA. Les premières études menées avec les vaccins inactivés dirigés contre des souches isolées en 1997, A (H9N2) et A (H5) ont démontré leur faible pouvoir immunogène comparé à celui des vaccins saisonniers anti H1N1 et H3N2.

- Les essais cliniques de phase I, réalisés avec un vaccin inactivé entier et un vaccin sous-unité à partir d'un isolat humain A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), montrent des taux protecteurs d'anticorps neutralisants et inhibant l'hémagglutination, après injection d'une dose unique de vaccin chez les personnes âgées de plus de 32 ans ; par contre la réponse humorale, chez les sujets âgés de moins de 32 ans est faible et nécessite deux doses de vaccins. Les doses vaccinales ont été testées pour des teneurs en hémagglutinine de 7,5 à 30 µg (Luke and Subbarao 2006 [123]).
- En 1997, le virus A/Hong Kong/97 (H5N1) est isolé et mis en cause, pour la première fois dans des cas humains de grippe aviaire ; une souche variante non pathogène du virus, la souche A/Duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3) est testée cliniquement en tant que vaccin candidat, en raison d'une similitude antigénique suffisante avec la souche A (H5N1) d'origine humaine et aviaire. Le

vaccin sous-unité, sans adjuvant, est faiblement immunogène quelles que soient les doses utilisées. Des taux protecteurs d'anticorps neutralisants sont atteints uniquement par l'utilisation d'adjuvant immunologique, tel le MF59, et deux doses vaccinales de 7,5 µg (Nicholson, Colegate *et al.* 2001 [144]).

- L'immunogénicité et la tolérance d'un vaccin exprimant l'hémagglutinine recombinante H5, générée par un système d'expression baculovirus à partir d'un isolat humain, de la souche A/Hong Kong/156/97 (H5N1) ont été testées chez 147 adultes sains ; une immunité protectrice est atteinte uniquement dans 50% des cas, pour les dosages les plus élevés d'hémagglutinine (90 µg) et deux doses vaccinales. On peut penser que l'utilisation de doses d'hémagglutinine plus élevées et/ou l'addition d'adjuvants améliorerait la réponse immune (Treanor, Wilkinson *et al.* 2001 [195]).

Un certain nombre d'essais cliniques sur des vaccins candidats réalisés à partir des souches A (H5N1) circulant dans le sud-est asiatique en 2004 et 2005 sont en cours ou planifiés.

- En décembre 2005, [Sanofi Pasteur](#) a annoncé les premiers résultats des études menées en Europe et notamment en France, sur un vaccin prototype inactivé adjuvé (aluminium) contre le virus H5N1, réassorti par génétique inverse, produit par le NIBSC, au Royaume- Uni.
- Le Japon teste actuellement chez l'homme un vaccin contre le virus H5N1, à virus entier, adjuvé par l'aluminium.
- Différentes formulations seront testées en 2006 : vaccins inactivés entiers ou sous-unités propagés sur culture d'œufs, vaccins produits sur cultures cellulaires, vaccins adjuvés (hydroxyde et phosphate d'aluminium, MF59), et également des vaccins vivants atténués. Des vaccins candidats contre les souches H7 et H9 sont actuellement à l'étude chez l'homme.
- Sanofi Pasteur participe au projet [FLUPLAN](#), financé par l'Union Européenne, pour la production d'un vaccin contre une souche A (H7N1) à potentiel pandémique.
- Le [laboratoire Chiron](#) expérimente actuellement un vaccin inactivé sous-unité A (H9N2) réassorti G9/PR8 ; les taux d'anticorps en inhibition de l'hémagglutination sont meilleurs avec le vaccin adjuvé par le MF59, même pour des doses vaccinales basses (de 3,75 à 30 µg).
- En avril 2005, le groupe Sanofi-Pasteur, sous contrat avec le [National Institute of Allergy and Infectious Diseases \(NIAID\)](#), démarre les essais cliniques phase I, d'un vaccin inactivé sous-unité A (H5N1) chez 451 adultes sains. La souche vaccinale a été développée par génétique inverse par le St. Jude Children's Research Hospital (Etats-Unis) à partir du virus isolé en 2004, A/Vietnam/1203/04 (H5N1). Les résultats préliminaires attestent de l'innocuité du vaccin candidat et de sa capacité à induire une réponse immune protectrice avec un protocole de deux doses de 90 µg chacune. Les données complètes sont attendues en 2006. Des essais sont prévus par la suite chez l'enfant et la personne âgée (Enserink 2005 [59]) (Quirk 2005 [162]).
- Des [essais cliniques de phase I](#) sont actuellement en cours avec un vaccin candidat vivant atténué A (H9N2) issu du réassortiment entre les virus

A/chicken/Hong Kong/G9/97 et la souche mère A/Ann Arbor/6/60 ca (voir [1.4.5.1.1.2](#)).

Les vaccins génétiques antigrippaux ne sont qu'à un stade précoce de développement, en raison du trop faible pouvoir immunogène chez l'homme de l'ADN nu.

#### 4.6.1.2 Les anti-viraux

Les études génétiques des isolats aviaires et humains de clade 1 de 2004-2005 en Asie, montrent une substitution d'acide aminé à la position 31 de la protéine M2 du virus A (H5N1) ; cette mutation confère invariablement une résistance aux adamantanes (WHO Global Influenza Program 2005 [205]) ; de même les tests de sensibilité in vitro mettent en évidence une résistance aux adamantanes, du virus A (H5N1) isolé en Thaïlande en 2004 (Chotpitayasunondh, Ungchusak *et al.* 2005 [43]). Les inhibiteurs de la protéine M2 ne sont pas indiqués a priori en prophylaxie des infections humaines à A (H5N1).

Les inhibiteurs de la neuraminidase ont démontré leur efficacité dans la prévention des manifestations cliniques de la grippe saisonnière (McClellan and Perry 2001 [131]) (McNicholl and McNicholl 2001 [134]) (Dreitlein, Maratos *et al.* 2001 [56]). Mais l'on ne dispose pas, à l'heure actuelle, de données suffisantes permettant d'apprécier l'efficacité prophylactique de ces antiviraux, dans le cadre d'une pandémie de grippe.

- L'oseltamivir a été utilisé en 2003, aux Pays-Bas (Koopmans, Wilbrink *et al.* 2004 [108]) (Ward, Small *et al.* 2005 [202]) dans le contrôle de la transmission du virus influenza A (H7N7) chez les personnes exposées professionnellement et leur famille, à la dose de 75 mg par jour.

Bien que des cas de résistance du virus A (H5N1) aient été signalés chez des patients ayant reçu des doses thérapeutiques ou prophylactiques d'oseltamivir (Le, Kiso *et al.* 2005 [112]) (de Jong, Tran *et al.* 2005 [53]), il n'a pas été démontré à ce jour de résistance primaire du virus à cet antiviral.

L'[OMS](#) recommande l'utilisation de l'oseltamivir chez les personnes en contact avec un sujet atteint par le virus A (H5N1), à la dose de 75 mg par jour chez l'adulte pendant sept à dix jours, et à des doses adaptées en fonction du poids chez l'enfant de plus d'un an. Pour les expositions prolongées et/ou répétées, notamment le personnel soignant et les personnes impliquées dans les opérations de destruction des élevages de volaille, des cures préventives, répétitives ou un traitement continu peut être nécessaire.

En [France](#), l'oseltamivir a une autorisation de mise sur le marché pour des doses et des personnes remplissant les critères de l'OMS décrits ci-dessus, chez l'adulte et l'enfant de plus de 13 ans. Le comité européen des médicaments a récemment émis un avis favorable à l'utilisation prophylactique de l'oseltamivir chez l'enfant à partir d'un an.

- Le pérāmivir a montré des propriétés inhibitrices plus puissantes in vitro que le zanamivir et l'oseltamivir sur les virus grippaux ; il est très efficace dans la prévention de la grippe expérimentale chez le furet et la souris. En raison de sa faible biodisponibilité par voie orale, les recherches se sont orientées vers des

formes parentérales. Bien que l'administration parentérale soit plus difficile à mettre en œuvre qu'une forme orale, la possibilité d'une dose unique prophylactique par voie intramusculaire, dans le contexte d'une pandémie fait l'objet de recherches (UPMC 2005 [8]).

Les polyribonucléotides stimulent l'immunité cellulaire et humorale et ont démontré une activité protectrice antivirale à large spectre, notamment contre les virus influenza. Les poly ICLC sont des ARN synthétiques double brin, composés d'acide polyribonucleotidique-polyribocytidylique (I,C), stabilisé avec de la poly-L-lysine (L) et de la carboxyméthylcellulose (C). Ils ont une activité prophylactique à 100% dans la grippe expérimentale chez la souris (Wong, Nagata *et al.* 2005 [207]). L'activité antivirale est en relation avec l'augmentation de la production d'interféron  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  in vivo et l'activation des cellules NK (Wong, Yang *et al.* 1999 [208]).

#### 4.6.1.3 La protection des populations exposées

##### Les personnes en contact avec les animaux infectés

Les mesures de prévention s'adressent aux personnes exposées professionnellement aux virus aviaires hautement pathogènes, ou potentiellement exposées dans le cadre d'activités quotidiennes, dans les zones d'épizooties aviaires.

- Les professionnels de l'élevage aviaire, les personnes qui procèdent à l'abattage des volailles infectées, les vétérinaires doivent disposer de chaussures, de vêtements, de gants, et de masques protecteurs. Ces derniers doivent faire l'objet d'une décontamination systématique à chaque sortie d'une zone contaminée.  
Toute manipulation de volaille malade ou suspectée d'être infectée par un virus HPAI, toute intervention dans les zones contaminées ou suspectées de l'être doivent suivre les mesures de contrôle émises par les instances officielles telles que l'OMS ou l'OIE.
- L'OMS a publié un certain nombre de recommandations à destination des personnes vivant dans les zones affectées par les épizooties :
  - éviter d'une manière générale tout contact avec les poulets, canards, les plumes et fientes, sauf nécessité absolue ;
  - être particulièrement vigilant à l'égard des enfants, spécifiquement à risque ;
  - éviter préparation culinaire de volaille et sa consommation.

Il faut insister sur l'importance capitale de l'hygiène des mains, qui doivent être désinfectées à l'eau et au savon après chaque contact à risque, et d'assurer l'éducation des enfants vivant souvent en contact étroit avec la volaille.

##### Les professionnels de santé

- Des précautions d'usage s'appliquent au patient suspecté de grippe aviaire, qui doit être maintenu en chambre d'isolement.
- Les recommandations de l'OMS (OMS 2006 [7]) aux personnels de santé incluent :

- la [vaccination](#) par le vaccin antigrippal saisonnier ;
  - la tenue d'un registre du personnel ayant prodigué des soins aux patients atteints par la grippe aviaire ;
  - la mise en place d'un système de surveillance qui recueille d'éventuels épisodes pseudo-grippaux et les motifs d'absentéisme chez les soignants ;
  - l'assurance d'un approvisionnement suffisant en inhibiteurs de la neuraminidase à but prophylactique ;
  - des mesures spécifiques de protection individuelle pour le personnel dispensant les soins : masques de protection faciale certifiés (yeux, nez, bouche) afin de prévenir l'inhalation ou l'inoculation de gouttelettes de particules infectieuses, tabliers, lunettes de protection et gants.
- Les précautions standard concernent la manipulation du sang et de tous les liquides biologiques ainsi qu'une hygiène des mains irréprochable.
- Les soignants sont tenus de contrôler deux fois par jour leur température corporelle, afin de dépister toute fièvre. En cas de contact probable avec des gouttelettes émises par un patient et lorsque l'équipement de protection est insuffisant, une chimioprophylaxie par oseltamivir per os à raison de 75 mg par jour est instaurée pour sept jours.

#### 4.6.2 Prévention des épizooties et de leur extension

##### 4.6.2.1 L'abattage des animaux

Les autorités sanitaires internationales, représentées par l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), l'Office International des Epizooties ([OIE](#)) et l'OMS ont émis des recommandations concernant l'abattage massif des volailles infectées, ou en contact avec des animaux infectés, à tous les pays concernés par les épizooties de grippe aviaire.

A ce jour, plus de 150 millions de volailles ont été abattues ou sont mortes de la maladie. Les scientifiques s'accordent à penser que l'abattage de toutes les volailles à Hong Kong en 1997, et en 2003 aux Pays-Bas a contribué à l'arrêt de la progression de l'épidémie et à son extinction, beaucoup plus que les mesures de confinement et d'isolement des élevages infectés (Stegeman, Bouma *et al.* 2004 [177]).

##### 4.6.2.2 Les mesures d'hygiène

Les mesures de protection vestimentaire, de décontamination et d'hygiène, citées plus haut s'appliquent à un niveau local, afin d'empêcher la propagation du virus aux fermes et aux habitations voisines des lieux contaminés. La circulation des volailles et du personnel à l'intérieur des pays concernés doit être strictement réglementée et surveillée. L'[OMS](#) a émis des recommandations à l'intention des personnes vivant en zone d'épizooties.

##### 4.6.2.3 Les mesures économiques et commerciales

Au niveau de l'Union européenne, des mesures législatives ont été adoptées. Elles définissent les moyens de lutte et de contrôle en cas d'introduction des virus HPAI en Europe et en France notamment, indemnes jusqu'à fin 2005 de cas de grippe

aviaire A (H5N1). La directive [2005/94/EC](#) de décembre 2005 abroge celle de 1992 et décrit notamment :

- les mesures concernant les exploitations où des foyers de grippe aviaire sont suspectés ou avérés, notamment le mouvement et le transport des oiseaux, de la volaille, des œufs, des cadavres animaux ;
- les conditions de repeuplement des exploitations avicoles ;
- les règles de circulation et de commercialisation des viandes de volaille et de leurs produits dérivés, en provenance des pays atteints par les épizooties.

#### 4.6.2.4 La vaccination

La vaccination des oiseaux (FAO, OIE *et al.* 2005 [1]) apparaît comme la mesure indispensable pour contrôler l'extension d'une épidémie, dans les pays où la densité des populations animales est importante, et où l'application stricte des mesures de sécurité et d'hygiène agricole est aléatoire. On dispose actuellement d'un certain nombre de vaccins :

- les vaccins inactivés, soit homologues qui contiennent la même souche virale que le virus responsable de l'épidémie, soit hétérologues pour lesquels seule l'hémagglutinine est identique à la souche épidémique. Un vaccin inactivé dirigé contre le virus asiatique A (H5N1) de 2003 a été développé à partir de la souche A (H5N9) et confère une protection de 100% contre le A (H5N1) après infection expérimentale chez la souris (Girard, Cherian *et al.* 2005 [74]) ;
- les vaccins recombinants ont été développés, exprimant notamment l'hémagglutinine de sous type H5 ; ce type de vaccin a déjà été utilisé au Mexique. Leur utilisation est assez limitée, en raison des réactions collatérales au virus vecteur.

Le 5 février 2004, une commission d'experts vétérinaires, réunie à Rome, a recommandé l'utilisation de la [vaccination des volailles](#) d'élevage dans les zones concernées par les épidémies, par des vaccins inactivés homologues ou hétérologues exclusivement.

La directive [2005/94/EC](#) adoptée en décembre 2005 par l'Union Européenne approuve la vaccination des volailles comme mesure de prévention à court terme, voire à long terme. Des programmes de vaccination sont implémentés en Italie, en France et aux Pays Bas.

## 4.7 Surveillance épidémiologique de la grippe

Un certain nombre d'organisations internationales ont mis en place des systèmes de surveillance de l'évolution de la grippe humaine et animale, au niveau mondial. Dans certains pays, ces systèmes sont relayés au niveau national et régional par des réseaux sentinelles.

#### 4.7.1 L'OMS

L'OMS a développé, depuis 1947, un [programme mondial](#) de contrôle et de surveillance de la grippe qui vise à coordonner les actions globales et nationales, à centraliser et analyser les données recueillies afin de gérer les épidémies annuelles et préparer une éventuelle pandémie. Le détail de ce programme fait état, en particulier, des points suivants :

- le renforcement de la surveillance virologique et épidémiologique nationale et internationale ;
- la prise en compte des éléments de surveillance de la grippe animale (notamment aviaire) dans les programmes de surveillance de la grippe humaine ;
- l'amélioration du recueil, de l'utilisation, de l'échange et du traitement des données ;
- la promotion pour l'utilisation des vaccins anti-grippaux ;
- l'aide aux pays pour l'implémentation d'une politique sanitaire de vaccination et la préparation de plans de lutte contre les pandémies.

Grâce à son réseau de surveillance, l'OMS compile les analyses détaillées des prélèvements animaux et humains effectués tout au long d'une année, ce qui permet de détecter les variations antigéniques des souches circulantes et de déterminer la composition des vaccins de la saison future.

Il y a en France, deux centres de référence, l'un à l'Institut Pasteur de Paris, l'autre à la faculté de médecine de Lyon.

Elle consacre un site dédié à la [grippe aviaire humaine](#) qui communique les cas diagnostiqués chez l'homme et édite les informations et les recommandations pour le contrôle et la prévention chez l'homme ainsi qu'un programme de préparation à une éventuelle pandémie.

#### 4.7.2 L'OIE

L'[OIE](#) est une organisation intergouvernementale. Elle compte 165 pays membres. Son rôle est de recenser les maladies animales déclarées par les pays adhérents et d'en diffuser l'information, notamment s'il s'agit d'une maladie transmissible à l'homme et/ou potentiellement grave pour la santé humaine. Tous les [communiqués officiels](#) des autorités officielles des pays atteints par les épizooties de grippe aviaire sont disponibles sur leur site.

Elle est à l'origine d'un certain nombre de normes et de règles sanitaires internationales qui font référence dans le domaine de la santé animale et du commerce. Elle émet des recommandations en situation de crise.

#### 4.7.3 L'EISS

L'[European Influenza Surveillance Scheme](#) assure la surveillance de la grippe en Europe dans les pays membres. Il travaille en collaboration avec un réseau de laboratoires de référence spécialisés dans le diagnostic de la grippe. Ces

laboratoires ont été conjointement désignés par l'Union Européenne et l'OMS (Meijer, Valette *et al.* 2005 [135]).

#### 4.7.4 EuroGROG

[EuroGrog](#) est un système de diffusion paneuropéen; il émet des bulletins de surveillance de la grippe durant la saison épidémique, à partir des données que lui fournissent les différentes institutions sanitaires en Europe.

#### 4.7.5 Réseaux sentinelles en France

La surveillance est assurée par le réseau sentinelle de l'Inserm, et par le réseau des [GROG](#) (Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe). Ils suivent l'évolution de la diffusion de la grippe en France, émettent des alertes en cas de menace d'épidémie, et publient des bulletins hebdomadaires consultables sur leurs sites internet respectifs.

Ces groupes travaillent en partenariat avec l'OMS, l'EISS et EuroGROG.

#### 4.7.6 Plans de lutte contre les pandémies

En 2002, les instances de l'OMS ont élaboré et adopté un [programme mondial](#) de préparation des états à l'arrivée d'une pandémie de grippe.

Dès 1999, quelques pays ont commencé à développer des plans de préparation (Karcher and Buchow 2002 [100]) (Strikas, Wallace *et al.* 2002 [180]) (Paget and Aguilera 2001 [153]). En raison de la persistance et de l'extension de la circulation du virus A (H5N1), de véritables plans nationaux susceptibles de faire face à une pandémie, se sont mis en place dans les pays développés, en particulier [la France](#). Les pays en développement rencontrent plus de difficultés, en raison des moyens et de l'organisation sanitaire et des difficultés de collaboration avec l'OMS et l'OIE.

Le rôle de l'OMS est d'aider les nations à mettre en place ces programmes, à coordonner les recherches de nouveaux vaccins (Hualan, Subbarao *et al.* 2003 [90]) et, notamment, à établir les stratégies d'approvisionnement en vaccins et en antiviraux, de leur mise à disposition et de leur distribution (Fedson 2005 [64]) (Fedson 2003 [63]) (Daems, Del Giudice *et al.* 2005 [49]) (Fedson 2003 [62]) (Gani 2005 [69]).

Des [modèles mathématiques](#) d'analyse de risque sont élaborés par différents pays afin d'évaluer l'impact d'une pandémie en fonction des possibilités d'intervention.

## 5 Conclusion

La crainte d'une pandémie (Claas, Van *et al.* 2000 [45])

Le 20<sup>e</sup> siècle a connu trois pandémies de grippe humaine, la dernière remonte à 1968. Le plus grand intervalle observé entre deux pandémies est de 39 ans. En raison des caractéristiques virologiques des virus influenza A (glissement et dérive antigéniques), les experts s'attendent donc à l'apparition d'un virus à potentiel pandémique (Taubenberger, Reid *et al.* 1997 [189]) (Gibbs, Armstrong *et al.* 2001 [73]) (Hannoun 2001 [78]) (Kawaoka, Krauss *et al.* 1989 [102]).

Les pandémies sont en relation avec l'émergence d'un nouveau sous-type viral, pour lequel l'homme ne dispose d'aucune immunité protectrice. Par un mécanisme de réassortiment génétique, les gènes de l'hémagglutinine s'échangent entre différents virus, avec ou non une modification au niveau de la neuraminidase. La co-infection de l'homme par des virus grippaux d'origine aviaire et humaine, la transmission de virus réassortis à partir du porc, qui héberge à la fois des virus d'origine aviaire et humaine sont d'importants facteurs de risque.

La situation suscite de vives inquiétudes en raison :

- de la nature hautement pathogène du virus A (H5N1) isolé ;
- de l'ampleur des épizooties dans les pays atteints ;
- du nombre de pays concernés ;
- de la vitesse de propagation dans le sud-est asiatique ;
- du fait que des pays, jusque-là indemnes de grippe aviaire soient concernés ;
- du nombre de cas humains et du taux de mortalité élevé ;
- de l'expansion géographique récente du virus A (H5N1) au continent européen et africain.

L'OMS a lancé dès le début des épizooties dans le sud-est asiatique, des programmes de recherche et mis à disposition des souches mères pour l'élaboration rapide d'un vaccin contre la souche A (H5N1) du virus influenza (Li, Perdue *et al.* 2002 [115]).

## DOCUMENTATION

### 1 Organismes internationaux et nationaux de surveillance

1. Organisation mondiale de la santé  
<http://www.who.int/csr/disease/influenza/en/>
2. Office international des épizooties  
[http://www.oie.int/fr/fr\\_index.htm](http://www.oie.int/fr/fr_index.htm)
3. European influenza surveillance scheme  
<http://www.eiss.org/index.cgi>
4. EuroGROG  
<http://www.eurogrog.org/html/introduction.html>
5. Réseau Sentinelles  
<http://rhone.b3e.jussieu.fr/senti/php/navigation/accueil/>
6. Réseau GROG  
<http://www.grog.org/>

### 2 Webographie

7. Ministère de la Santé  
[http://www.sante.gouv.fr/hm/dossiers/grippe\\_aviaire/](http://www.sante.gouv.fr/hm/dossiers/grippe_aviaire/)
8. Le point sur la vaccination des animaux  
[http://www.oie.int/download/71SG\\_2003/F\\_71%20SG\\_12\\_CS3E.pdf](http://www.oie.int/download/71SG_2003/F_71%20SG_12_CS3E.pdf)
9. Historique des épidémies de grippe aviaire  
[http://europa.eu.int/comm/health/ph\\_threats/com/Influenza/avian\\_influenza\\_en.htm](http://europa.eu.int/comm/health/ph_threats/com/Influenza/avian_influenza_en.htm)
10. AFSSA : Risques de transmission à l'homme des virus influenza aviaries  
<http://www.afssa.fr/ftp/basedoc/rapportinfluenza.pdf>
11. OIE : Situation dans le sud-est asiatique  
[http://www.oie.int/download/AVIAN%20INFLUENZA/f\\_AI-Asia.htm](http://www.oie.int/download/AVIAN%20INFLUENZA/f_AI-Asia.htm)
12. OMS- Recommandations  
[http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/guidelines/en/](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/en/)
13. OIE- Recommandations  
[http://www.oie.int/fr/info/fr\\_avinf.htm](http://www.oie.int/fr/info/fr_avinf.htm)

14. OMS- WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance  
<http://www.wpro.who.int/NR/rdonlyres/EFD2B9A7-2265-4AD0-BC98-97937B4FA83C/0/manualonanimalaidiagnosisandsurveillanc.pdf>
15. OMS- Guide de prise en charge des personnes atteintes par la grippe aviaire  
[http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/guidelines/clinicalmanage/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/clinicalmanage/en/index.html)
16. OMS- Consultation interrégionale du 6-7 Mai 2005 : La grippe humaine A/H5N1 en Asie  
[http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO\\_CDS\\_CSR\\_GIP\\_2005\\_7/en/index.html](http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_7/en/index.html)

### 3 Liens utiles

17. Conseils aux voyageurs  
<http://www.diplomatie.fr/voyageurs/etrangers/avis/conseils/default2.asp>
18. FAO des Nations Unies  
[http://www.fao.org/ag/againfo/subjects/en/health/diseases-cards/avian\\_update.html](http://www.fao.org/ag/againfo/subjects/en/health/diseases-cards/avian_update.html)
19. Eurosurveillance  
<http://www.eurosurveillance.org/index-01.asp>
20. Maladies émergentes  
<http://www.promedmail.org/pls/askus/f?p=2400:1000>

### 4 Références bibliographiques

1. **FAO, OIE and OMS** (2005). "Lignes directrices sur la prévention et le contrôle de l'influenza aviaire." Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture- Organisation Internationale des épizooties- Organisation Mondiale de la Santé.
2. **OMS** (2003). "Production of pilot lots of inactivated influenza vaccines from reassortants derived from avian influenza viruses. Interim biosafety risk assessment." Organisation Mondiale de la Santé.
3. **OMS** (2004). "Exposures that may have put a person at risk of becoming infected with influenza A(H5N1)." Organisation Mondiale de la Santé.
4. **OMS** (2005). "WHO guidance on development of influenza vaccine reference viruses by reverse genetics." Organisation Mondiale de la Santé.

5. **OMS** (2005). "Recommended laboratory tests to identify avian influenza A virus in specimens from humans." Organisation Mondiale de la Santé.
6. **OMS** (2006). "Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO." Organisation Mondiale de la Santé.
7. **OMS** (2006). "Avian influenza, including influenza A (H5N1), in humans : WHO interim infection control guideline for health care facilities." Organisation Mondiale de la Santé.
8. **UPMC** (2005). "Peramivir : Single Dose Prophylaxis for Flu?" Center for Biosecurity of UPMC, for a briefing on Capitol Hill.
9. **Abed Y, Hardy I, Li Y and Boivin G** (2002). "Divergent evolution of hemagglutinin and neuraminidase genes in recent influenza A:H3N2 viruses isolated in Canada." Journal of medical virology **67**(4) : 589-595.
10. **Al Faress S, Cartet G, Ferraris O, Norder H, Valette M and Lina B** (2005). "Divergent genetic evolution of hemagglutinin in influenza A H1N1 and A H1N2 subtypes isolated in the south-France since the winter of 2001-2002." J Clin Virol **33**(3) : 230-6.
11. **Alexander DJ, Van RK and Pensaert M** (2000). "A review of avian influenza in different bird species." Veterinary microbiology : (Amsterdam) **74**(1-2) : 3-13.
12. Amonsin A, Payungporn S, Theamboonlers A, Thanawongnuwech R, Suradhat S, Pariyothorn N, Tantilertcharoen R, Damrongwantanapokin S, Buranathai C, Chaisingh A, Songserm T and Poovorawan Y (2005). "Genetic characterization of H5N1 influenza A viruses isolated from zoo tigers in Thailand." Virology **344**(2) : 480-491.
13. Apisarnthanarak A, Erb S, Stephenson I, Katz JM, Chittaganpitch M, Sangkitporn S, Kitphati R, Thawatsupha P, Waicharoen S, Pinitchai U, Apisarnthanarak P, Fraser VJ and Mundy LM (2005). "Seroprevalence of anti-H5 antibody among Thai health care workers after exposure to Avian influenza (H5N1) in a tertiary care center." Clin Infect Dis **40**(2) : e16-8.
14. Apisarnthanarak A, Kitphati R, Thongphubeth K, Patoomanunt P, Anthanont P, Auwanit W, Thawatsupha P, Chittaganpitch M, Saeng-Aroon S, Waicharoen S, Apisarnthanarak P, Storch GA, Mundy LM and Fraser VJ (2004). "Atypical avian influenza (H5N1)." Emerg Infect Dis **10**(7) : 1321-4.
15. **Aymard M, Gerentes L and Kessler N** (1999). "Place des anticorps antineuraminidase dans la protection contre la grippe. (Role for antibody to neuraminidase in protecting against influenza)." La Semaine des hôpitaux de Paris **75**(23-24) : 933-941.
16. **Babai I, Barenholz Y, Zakay-Rones Z, Greenbaum E, Samira S, Hayon I, Rochman M and Kedar E** (2001). "A novel liposomal influenza vaccine (INFLUSOME-VAC) containing hemagglutinin-neuraminidase and IL-2 or GM-CSF induces protective anti-

neuraminidase antibodies cross-reacting with a wide spectrum of influenza A viral strains." Vaccine **20**(3-4) : 505-15.

17. **Baigent SJ and McCauley JW** (2001). "Glycosylation of haemagglutinin and stalk-length of neuraminidase combine to regulate the growth of avian influenza viruses in tissue culture." Virus Res **79**(1-2) : 177-85.

18. **Baigent SJ and McCauley JW** (2003). "Influenza type A in humans, mammals and birds : determinants of virus virulence, host-range and interspecies transmission." Bioessays **25**(7) : 657-71.

19. **Banks J, Speidel E and Alexander DJ** (1998). "Characterisation of an avian influenza A virus isolated from a human : is an intermediate host necessary for the emergence of pandemic influenza viruses?" Archives of virology **143**(4) : 781-787.

20. **Banks J, Speidel ES, Moore E, Plowright L, Piccirillo A, Capua I, Cordioli P, Fioretti A and Alexander DJ** (2001). "Changes in the haemagglutinin and the neuraminidase genes prior to the emergence of highly pathogenic H7N1 avian influenza viruses in Italy." Archives of virology **146**(5) : 963-973.

21. **Bantia S, Arnold CS, Parker CD, Upshaw R and Chand P** (2005). "Anti-influenza virus activity of peramivir in mice with single intramuscular injection." Antiviral Res.

22. **Beby-Defaux A, Giraudeau G, Bouguermouh S and Agius G** (2003). "La grippe humaine : aspects virologiques, épidémiologie et diagnostic virologique. (Influenza : virological aspects, epidemiology and virological diagnosis)." Médecine et maladies infectieuses **33**(3) : 134-142.

23. **Beigel JH, Farrar J, Han AM, Hayden FG, Hyer R, de Jong MD, Lochindarat S, Nguyen TK, Nguyen TH, Tran TH, Nicoll A, Touch S and Yuen KY** (2005). "Avian influenza A (H5N1) infection in humans." N Engl J Med **353**(13) : 1374-85.

24. **Bennink JR and Palmore TN** (2004). "The promise of siRNAs for the treatment of influenza." Trends Mol Med **10**(12) : 571-4.

25. **Ben-Yehuda A, Joseph A, Barenholz Y, Zeira E, Even-Chen S, Louria-Hayon I, Babai I, Zakay-Rones Z, Greenbaum E, Galprin I, Gluck R, Zurbriggen R and Kedar E** (2003). "Immunogenicity and safety of a novel IL-2-supplemented liposomal influenza vaccine (INFLUSOME-VAC) in nursing-home residents." Vaccine **21**(23) : 3169-78.

26. **Ben-Yehuda A, Joseph A, Zeira E, Even-Chen S, Louria-Hayon I, Babai I, Zakay-Rones Z, Greenbaum E, Barenholz Y and Kedar E** (2003). "Immunogenicity and safety of a novel liposomal influenza subunit vaccine (INFLUSOME-VAC) in young adults." J Med Virol **69**(4) : 560-7.

27. **Boibieux A, Bouhour D, Biron F, Chidiac C and Peyramond D** (1998). "La grippe aviaire de Hong Kong. (Avian influenza in Hong Kong)." Médecine et maladies infectieuses **28**(2) : 193-194.
28. **Bridges CB, Katz JM, Seto WH, Chan PKS, Tsang D, Ho W, Mak KH, Lim W, Tam JS, Clarke M, Williams SG, Mounts AW, Bresee JS, Conn LA, Rowe T, Hu-Primmer J, Abernathy RA, Xiuhua LU, Cox NJ and Fukuda K** (2000). "Risk of influenza A (H5N1) infection among health care workers exposed to patients with influenza A (H5N1), Hong Kong." The Journal of infectious diseases **181**(1) : 344-348.
29. **Bridges CB, Lim W, Hu-Primmer J, Sims L, Fukuda K, Mak KH, Rowe T, Thompson WW, Conn L, Lu X, Cox NJ and Katz JM** (2002). "Risk of influenza A (H5N1) infection among poultry workers, Hong Kong, 1997-1998." J Infect Dis **185**(8) : 1005-10.
30. **Bright RA, Cho DS, Rowe T and Katz JM** (2003). "Mechanisms of pathogenicity of influenza A (H5N1) viruses in mice." Avian Dis **47**(3 Suppl) : 1131-4.
31. **Bright RA, Medina MJ, Xu X, Perez-Oronoz G, Wallis TR, Davis XM, Povinelli L, Cox NJ and Klimov AI** (2005). "Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005 : a cause for concern." Lancet **366**(9492) : 1175-81.
32. **Butt KM, Smith GJ, Chen H, Zhang LJ, Leung YH, Xu KM, Lim W, Webster RG, Yuen KY, Peiris JS and Guan Y** (2005). "Human Infection with an Avian H9N2 Influenza A Virus in Hong Kong in 2003." J Clin Microbiol **43**(11) : 5760-7.
33. **Cappucci DT, Jr., Johnson DC, Brugh M, Smith TM, Jackson CF, Pearson JE and Senne DA** (1985). "Isolation of avian influenza virus (subtype H5N2) from chicken eggs during a natural outbreak." Avian Dis **29**(4) : 1195-200.
34. **Capua I and Alexander DJ** (2002). "Avian influenza and human health." Acta tropica **83**(1) : 1-6.
35. **Castrucci MR, Donatelli I, Sidoli L, Barigazzi G, Kawaoka Y and Webster RG** (1993). "Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in italian pigs." Virology : (New York, NY) **193**(1) : 503-506.
36. **Chan PK** (2002). "Outbreak of avian influenza A(H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997." Clin Infect Dis **34** Suppl 2 : S58-64.
37. **Chand P, Babu YS, Bantia S, Rowland S, Dehghani A, Kotian PL, Hutchison TL, Ali S, Brouillette W, El-Kattan Y and Lin TH** (2004). "Syntheses and neuraminidase inhibitory activity of multisubstituted cyclopentane amide derivatives." J Med Chem **47**(8) : 1919-29.

38. **Chand P, Bantia S, Kotian PL, El-Kattan Y, Lin TH and Babu YS** (2005). "Comparison of the anti-influenza virus activity of cyclopentane derivatives with oseltamivir and zanamivir in vivo." Bioorg Med Chem **13**(12) : 4071-7.
39. **Cheng X, Liu J, He J and Shan F** (2002). "Virological and serological surveys for H9N2 subtype of influenza A virus in chickens and men in Shenzhen city." Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi **16**(4) : 319-21.
40. **Cheung CY, Poon LL, Lau AS, Luk W, Lau YL, Shortridge KF, Gordon S, Guan Y and Peiris JS** (2002). "Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses : a mechanism for the unusual severity of human disease?" Lancet **360**(9348) : 1831-7.
41. Choi YK, Nguyen TD, Ozaki H, Webby RJ, Puthavathana P, Buranathal C, Chaisingh A, Auewarakul P, Hanh NT, Ma SK, Hui PY, Guan Y, Peiris JS and Webster RG (2005). "Studies of H5N1 influenza virus infection of pigs by using viruses isolated in Vietnam and Thailand in 2004." J Virol **79**(16) : 10821-5.
42. Chokephaibulkit K, Uprasertkul M, Puthavathana P, Chearskul P, Auewarakul P, Dowell SF and Vanprapar N (2005). "A child with avian influenza A (H5N1) infection." Pediatr Infect Dis J **24**(2) : 162-6.
43. Chotpitayasunondh T, Ungchusak K, Hansaoworakul W, Chunsuthiwat S, Sawanpanyalert P, Kijphati R, Lochindarat S, Srisan P, Suwan P, Osotthanakorn Y, Anantasetagoon T, Kanjanawasri S, Tanupattarachai S, Weerakul J, Chaiwirattana R, Maneerattanaporn M, Poolsavathitikool R, Chokephaibulkit K, Apisarnthanarak A and Dowell SF (2005). "Human disease from influenza A (H5N1), Thailand, 2004." Emerg Infect Dis **11**(2) : 201-9.
44. **Claas ECJ, De JJC, Van BR, Rimmelzwaan GF and Osterhaus ADME** (1998). "Human influenza virus A/HongKong/156/97 (H5N1) infection." Vaccine **16**(9-10) : 977-978.
45. **Claas ECJ, Van RK and Pensaert M** (2000). "Pandemic influenza is a zoonosis, as it requires introduction of avian-like gene segments in the human population." Veterinary microbiology : (Amsterdam) **74**(1-2) : 133-139.
46. **Coiras MT, Aguilar JC, Galiano M, Carlos S, Gregory V, Lin YP, Hay A and Perez-Brena P** (2001). "Rapid molecular analysis of the haemagglutinin gene of human influenza A H3N2 viruses isolated in Spain from 1996 to 2000." Archives of virology **146**(11) : 2133-2147.
47. **Collins RA, Ko L-S, So K-L, Ellis T, Lau L-T and Cheung HOIYUA** (2002). "Detection of highly pathogenic and low pathogenic avian influenza subtype H5 (Eurasian lineage) using NASBA." Journal of virological methods **103**(2) : 213-225.
48. **Cooper N, Sutton AJ, Abrams KR, Wailoo A, Turner DA, Nicholson KG and Hansen L** (2003). "Effectiveness of neuraminidase inhibitors in treatment and prevention of

influenza A and B : systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials. Commentary." BMJ. British medical journal : (International ed.) **326**(7401) : 1235-1240.

49. **Daems R, Del Giudice G and Rappuoli R** (2005). "Anticipating crisis : Towards a pandemic flu vaccination strategy through alignment of public health and industrial policy." Vaccine.
50. **de Bruijn IA, Nauta J, Cramer WC, Gerez L and Palache AM** (2005). "Clinical experience with inactivated, virosomal influenza vaccine." Vaccine **23 Suppl 1** : S39-49.
51. **de Jong MD, Bach VC, Phan TQ, Vo MH, Tran TT, Nguyen BH, Beld M, Le TP, Truong HK, Nguyen VV, Tran TH, Do QH and Farrar J** (2005). "Fatal avian influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma." N Engl J Med **352**(7) : 686-91.
52. **de Jong MD and Hien TT** (2006). "Avian influenza A (H5N1)." J Clin Virol **35**(1) : 2-13.
53. **de Jong MD, Tran TT, Truong HK, Vo MH, Smith GJ, Nguyen VC, Bach VC, Phan TQ, Do QH, Guan Y, Peiris JS, Tran TH and Farrar J** (2005). "Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection." N Engl J Med **353**(25) : 2667-72.
54. **Demicheli V, Jefferson T, Rivetti D and Deeks J** (2000). "Prevention and early treatment of influenza in healthy adults." Vaccine **18**(11-12) : 957-1030.
55. **Deshpande KL, Naeve CW and Webster RG** (1985). "The neuraminidases of the virulent and avirulent A/chicken/Pennsylvania/83 (H5N2) influenza A viruses : sequence and." Virology **147**(1) : 49-60.
56. **Dreitlein WB, Maratos J and Brocavich J** (2001). "Zanamivir and oseltamivir : Two new options for the treatment and prevention of Influenza." Clinical therapeutics **23**(3) : 327-355.
57. **Dutkowski R, Thakrar B, Froehlich E, Suter P, Oo C and Ward P** (2003). "Safety and pharmacology of oseltamivir in clinical use." Drug safety **26**(11) : 787-801.
58. **Ellis JS and Zambon MC** (2001). "Combined PCR-heteroduplex mobility assay for detection and differentiation of influenza A viruses from different animal species." Journal of clinical microbiology **39**(11) : 4097-4102.
59. **Enserink M** (2005). "Avian influenza. 'Pandemic vaccine' appears to protect only at high doses." Science **309**(5737) : 996.
60. **Enserink M and Kaiser J** (2004). "Virology. Avian flu finds new mammal hosts." Science **305**(5689) : 1385.

61. **Faulkner L, Buchan G, Slobbe L, Lockhart E, Wales J, Wilson M and Baird M** (2003). "Influenza hemagglutinin peptides fused to interferon gamma and encapsulated in liposomes protects mice against influenza infection." Vaccine **21**(9-10) : 932-9.
62. **Fedson DS** (2003). "Vaccination for pandemic influenza and severe acute respiratory syndrome : Common issues and concerns." Clinical infectious diseases **36**(12) : 1562-1563.
63. **Fedson DS** (2003). "Pandemic influenza and the global vaccine supply." Clinical infectious diseases **36**(12) : 1552-1561.
64. **Fedson DS** (2005). "Preparing for pandemic vaccination : an international policy agenda for vaccine development." J Public Health Policy **26**(1) : 4-29.
65. **Fleming DM** (2001). "Managing influenza : Amantadine, rimantadine and beyond." International journal of clinical practice : (Esher) **55**(3) : 189-195.
66. **Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B and Osterhaus AD** (2005). "Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls." J Virol **79**(5) : 2814-22.
67. Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SA, Munster V, Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Schutten M, Van Doornum GJ, Koch G, Bosman A, Koopmans M and Osterhaus AD (2004). "Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(5) : 1356-61.
68. **Gambaryan A, Tuzikov A, Pazynina G, Bovin N, Balish A and Klimov A** (2005). "Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses." Virology.
69. **Gani R** (2005). "Potential Impact of Antiviral Drug Use during Influenza Pandemic." Emerg Infect Dis **11**(9) : 1355-62.
70. Gao W, Soloff AC, Lu X, Montecalvo A, Nguyen DC, Matsuoka Y, Robbins PD, Swayne DE, Donis RO, Katz JM, Barratt-Boyes SM and Gambotto A (2006). "Protection of mice and poultry from lethal H5N1 avian influenza virus through adenovirus-based immunization." J Virol **80**(4) : 1959-64.
71. **Ge Q, Eisen HN and Chen J** (2004). "Use of siRNAs to prevent and treat influenza virus infection." Virus Res **102**(1) : 37-42.
72. **Ge Q, Filip L, Bai A, Nguyen T, Eisen HN and Chen J** (2004). "Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(23) : 8676-81.

73. **Gibbs MJ, Armstrong JS and Gibbs AJ** (2001). "Recombination in the hemagglutinin gene of the 1918 "spanish flu"." Science : (Washington, D.C.) **293**(5536) : 1842-1845.
74. **Girard MP, Cherian T, Pervikov Y and Kieny MP** (2005). "A review of vaccine research and development : Human acute respiratory infections." Vaccine **23**(50) : 5708-24.
75. Govorkova EA, Rehg JE, Krauss S, Yen HL, Guan Y, Peiris M, Nguyen TD, Hanh TH, Puthavathana P, Long HT, Buranathai C, Lim W, Webster RG and Hoffmann E (2005). "Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004." J Virol **79**(4) : 2191-8.
76. **Grose C and Chokephaibulkit K** (2004). "Avian influenza virus infection of children in Vietnam and Thailand." Pediatr Infect Dis J **23**(8) : 793-4.
77. **Gubareva LV** (2004). "Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors." Virus Res **103**(1-2) : 199-203.
78. **Hannoun C** (2001). "Sur la piste du virus de la grippe espagnole (1918-1919). (On the trail of Spanish influenza virus)." Virologie : (Montrouge) **5**(1) : 45-52.
79. **Hatta M, Peng GAO, Halfmann P and Kawaoka Y** (2001). "Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses." Science : (Washington, D.C.) **293**(5536) : 1840-1842.
80. **Hayden F and Croisier A** (2005). "Transmission of avian influenza viruses to and between humans." J Infect Dis **192**(8) : 1311-4.
81. **Hehme N, Engelmann H, Kuenzel W, Neumeier E and Saenger R** (2004). "Immunogenicity of a monovalent, aluminum-adsorbed influenza whole virus vaccine for pandemic use." Virus Res **103**(1-2) : 163-71.
82. **Herlocher ML, Truscon R, Elias S, Yen HL, Roberts NA, Ohmit SE and Monto AS** (2004). "Influenza viruses resistant to the antiviral drug oseltamivir : transmission studies in ferrets." J Infect Dis **190**(9) : 1627-30.
83. **Hilleman MR** (2002). "Realities and enigmas of human viral influenza : pathogenesis, epidemiology and control." Vaccine **20**(25-26) : 3068-3087.
84. **Hinshaw VS, Webster RG, Easterday BC and Bean WJ, Jr.** (1981). "Replication of avian influenza A viruses in mammals." Infect Immun **34**(2) : 354-61.
85. **Hoelscher MA, Garg S, Bangari DS, Belser JA, Lu X, Stephenson I, Bright RA, Katz JM, Mittal SK and Sambhara S** (2006). "Development of adenoviral-vector-based pandemic influenza vaccine against antigenically distinct human H5N1 strains in mice." Lancet **367**(9509) : 475-81.

86. **Hoffmann E, Krauss S, Perez D, Webby R and Webster RG** (2002). "Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines." Vaccine **20**(25-26) : 3165-70.
87. **Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G and Webster RG** (2000). "A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11) : 6108-13.
88. **Horimoto T and Kawaoka Y** (1994). "Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus." Journal of virology **68**(5) : 3120-3128.
89. Horimoto T, Takada A, Fujii K, Goto H, Hatta M, Watanabe S, Iwatsuki-Horimoto K, Ito M, Tagawa-Sakai Y, Yamada S, Ito H, Ito T, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Lim W, Guan Y, Peiris M and Kawaoka Y (2005). "The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate." Vaccine.
90. **Hualan C, Subbarao K, Swayne D, Qi C, Xiuhua LU, Katz J, Cox N and Matsuoka Y** (2003). "Generation and evaluation of a high-growth reassortant H9N2 influenza A virus as a pandemic vaccine candidate." Vaccine **21**(17-18) : 1974-1979.
91. Huckriede A, Bungener L, Stegmann T, Daemen T, Medema J, Palache AM and Wilschut J (2005). "The virosome concept for influenza vaccines." Vaccine **23** Suppl 1 : S26-38.
92. **Hulse DJ, Webster RG, Russell RJ and Perez DR** (2004). "Molecular determinants within the surface proteins involved in the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens." J Virol **78**(18) : 9954-64.
93. **Ilyushina NA, Govorkova EA and Webster RG** (2005). "Detection of amantadine-resistant variants among avian influenza viruses isolated in North America and Asia." Virology **341**(1) : 102-6.
94. Institut Pasteur, Réseau national de santé publique, Groupes régionaux d'observation de la grippe, Réseau Sentinelles de l'INSERM and Direction générale de la Santé (1998). "Données sur la grippe à virus A (H5N1) à Hong Kong et sur le début de grippe à virus A (H3N2) en France." Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire **8** : 31.
95. **Ison MG, Gnann JW, Jr., Nagy-Agren S, Treannor J, Paya C, Steigbigel R, Elliott M, Weiss HL and Hayden FG** (2003). "Safety and efficacy of nebulized zanamivir in hospitalized patients with serious influenza." Antivir Ther **8**(3) : 183-90.
96. **Iwasaki T, Itamura S, Nishimura H, Sato Y, Tashiro M, Hashikawa T and Kurata T** (2004). "Productive infection in the murine central nervous system with avian influenza virus A (H5N1) after intranasal inoculation." Acta Neuropathol (Berl) **108**(6) : 485-92.

97. **Izurieta HS, Haber P, Wise RP, Iskander J, Pratt D, Mink C, Chang S, Braun MM and Ball R** (2005). "Adverse events reported following live, cold-adapted, intranasal influenza vaccine." Jama **294**(21) : 2720-5.
98. **Kaiser L** (2001). "Inhibiteurs de la neuraminidase et traitement de la grippe : un bénéfice au-delà de la résolution des symptômes ? : Maladies infectieuses. (Treatment of Influenza with neuraminidase inhibitors : is there a benefit beyond symptom resolution ?)." Médecine et hygiène **59**(2369) : 2296-2300 [3 ].
99. **Kaji M, Fukuda T, Tanaka M and Aizawa H** (2005). "A side effect of neuraminidase inhibitor in a patient with liver cirrhosis." J Infect Chemother **11**(1) : 41-3.
100. **Karcher F and Buchow H** (2002). "Plan de préparation et réponse à la pandémie de grippe au niveau de la Communauté européenne." Eurosurveillance - Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles **7**(11) : 166-168.
101. Katz JM, Lim W, Bridges CB, Rowe T, Hu-Primmer J, Lu X, Abernathy RA, Clarke M, Conn L, Kwong H, Lee M, Au G, Ho YY, Mak KH, Cox NJ and Fukuda K (1999). "Antibody response in individuals infected with avian influenza A (H5N1) viruses and detection of anti-H5 antibody among household and social contacts." J Infect Dis **180**(6) : 1763-70.
102. **Kawaoka Y, Krauss S and Webster RG** (1989). "Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics." Journal of Virology **63**(11) : 4603-4608.
103. Keawcharoen J, Oraveerakul K, Kuiken T, Fouchier RA, Amonsin A, Payungporn S, Noppornpanth S, Wattanodorn S, Theambooniers A, Tantilertcharoen R, Pattanarangsarn R, Arya N, Ratanakorn P, Osterhaus DM and Poovorawan Y (2004). "Avian influenza H5N1 in tigers and leopards." Emerg Infect Dis **10**(12) : 2189-91.
104. **Kida H, Ito T, Yasuda J, Shimizu Y, Itakura C, Shortridge KF, Kawaoka Y and Webster RG** (1994). "Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs." Journal of general virology **75**(p.9) : 2183-2188.
105. **Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, Shiraishi K, Kawakami C, Kimura K, Hayden FG, Sugaya N and Kawaoka Y** (2004). "Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir : descriptive study." Lancet **364**(9436) : 759-65.
106. **Kobasa D, Kodihalli S, Luo M, Castrucci MR, Donatelli I, Suzuki Y, Suzuki T and Kawaoka Y** (1999). "Amino acid residues contributing to the substrate specificity of the influenza A virus neuraminidase." J Virol **73**(8) : 6743-51.
107. Kobasa D, Takada A, Shinya K, Hatta M, Halfmann P, Theriault S, Suzuki H, Nishimura H, Mitamura K, Sugaya N, Usui T, Murata T, Maeda Y, Watanabe S, Suresh M, Suzuki T, Suzuki Y, Feldmann H and Kawaoka Y (2004). "Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus." Nature **431**(7009) : 703-7.

108. Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, Natrop G, van der Nat H, Vennema H, Meijer A, van Steenbergen J, Fouchier R, Osterhaus A and Bosman A (2004). "Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands." Lancet 363(9409) : 587-93.
109. Kuiken T, Rimmelzwaan G, van Riel D, van Amerongen G, Baars M, Fouchier R and Osterhaus A (2004). "Avian H5N1 influenza in cats." Science 306(5694) : 241.
110. **Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Van Amerongen G and Osterhaus AD** (2003). "Pathology of human influenza A (H5N1) virus infection in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*)." Vet Pathol 40(3) : 304-10.
111. **Laver G and Garman E** (2002). "Pandemic influenza : its origin and control." Microbes and infection 4(13) : 1309-1316.
112. Le QM, Kiso M, Someya K, Sakai YT, Nguyen TH, Nguyen KH, Pham ND, Ngyen HH, Yamada S, Muramoto Y, Horimoto T, Takada A, Goto H, Suzuki T, Suzuki Y and Kawaoka Y (2005). "Avian flu : isolation of drug-resistant H5N1 virus." Nature 437(7062) : 1108.
113. **Leneva IA, Roberts N, Govorkova EA, Goloubeva OG and Webster RG** (2000). "The neuraminidase inhibitor GS4104 (oseltamivir phosphate) is efficacious against A/Hong Kong/156/97 (H5N1) and A/Hong Kong/1074/99." Antiviral research 48(2) : 101-115.
114. Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJ, Xu KM, Duan L, Rahardjo AP, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen TD, Estoepangestie AT, Chaisingh A, Auewarakul P, Long HT, Hanh NT, Webby RJ, Poon LL, Chen H, Shortridge KF, Yuen KY, Webster RG and Peiris JS (2004). "Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia." Nature 430(6996) : 209-13.
115. **Li S, Perdue ML, Patzer E, Brown F and Gust I** (2002). "Seed viruses containing novel avian HA and NA antigens for prevention against potential influenza pandemic." Developments in biologicals 110 : 135-141.
116. **Li Y, Lin Z, Shi J, Qi Q, Deng G, Li Z, Wang X, Tian G and Chen H** (2006). "Detection of Hong Kong 97-like H5N1 influenza viruses from eggs of Vietnamese waterfowl." Arch Virol(Mar 13).
117. **Li Z, Chen H, Jiao P, Deng G, Tian G, Li Y, Hoffmann E, Webster RG, Matsuoka Y and Yu K** (2005). "Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model." J Virol 79(18) : 12058-64.
118. **Liem NT and Lim W** (2005). "Lack of H5N1 avian influenza transmission to hospital employees, Hanoi, 2004." Emerg Infect Dis 11(2) : 210-5.

119. **Lin YP, Shaw M, Gregory V, Cameron K, Lim W, Klimov A, Subbarao K, Guan Y, Krauss S, Shortridge K, Webster R, Cox N and Hay A** (2000). "Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses : relationship between H9N2 and H5N1 human isolates." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(17) : 9654-8.
120. **Lindstrom SE, Cox NJ and Klimov A** (2004). "Genetic analysis of human H2N2 and early H3N2 influenza viruses, 1957-1972 : evidence for genetic divergence and multiple reassortment events." Virology **328**(1) : 101-19.
121. **Lipatov AS, Andreansky S, Webby RJ, Hulse DJ, Rehg JE, Krauss S, Perez DR, Doherty PC, Webster RG and Sangster MY** (2005). "Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenza virus NS gene reassortants in mice : the role of cytokines and B- and T-cell responses." J Gen Virol **86**(Pt 4) : 1121-30.
122. **Lipatov AS, Webby RJ, Govorkova EA, Krauss S and Webster RG** (2005). "Efficacy of H5 influenza vaccines produced by reverse genetics in a lethal mouse model." J Infect Dis **191**(8) : 1216-20.
123. **Luke CJ and Subbarao K** (2006). "Vaccines for pandemic influenza." Emerg Infect Dis **12**(1).
124. **Luscher-Mattli M** (2000). "Influenza chemotherapy : a review of the present state of art and of new drugs in development : Brief Review." Archives of virology **145**(11) : 2233-2248.
125. **Macdonald SJ, Cameron R, Demaine DA, Fenton RJ, Foster G, Gower D, Hamblin JN, Hamilton S, Hart GJ, Inglis GG, Jin B, Jones HT, McConnell DB, McKimm-Breschkin J, Mills G, Nguyen V, Owens IJ, Parry N, Shanahan SE, Smith D, Watson KG, Wu WY and Tucker SP** (2005). "Dimeric zanamivir conjugates with various linking groups are potent, long-lasting inhibitors of influenza neuraminidase including H5N1 avian influenza." J Med Chem **48**(8) : 2964-71.
126. **Macdonald SJ, Watson KG, Cameron R, Chalmers DK, Demaine DA, Fenton RJ, Gower D, Hamblin JN, Hamilton S, Hart GJ, Inglis GG, Jin B, Jones HT, McConnell DB, Mason AM, Nguyen V, Owens IJ, Parry N, Reece PA, Shanahan SE, Smith D, Wu WY and Tucker SP** (2004). "Potent and long-acting dimeric inhibitors of influenza virus neuraminidase are effective at a once-weekly dosing regimen." Antimicrob Agents Chemother **48**(12) : 4542-9.
127. **Maines TR, Lu XH, Erb SM, Edwards L, Guarner J, Greer PW, Nguyen DC, Szretter KJ, Chen LM, Thawatsupha P, Chittaganpitch M, Waicharoen S, Nguyen DT, Nguyen T, Nguyen HH, Kim JH, Hoang LT, Kang C, Phuong LS, Lim W, Zaki S, Donis RO, Cox NJ, Katz JM and Tumpey TM** (2005). "Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals." J Virol **79**(18) : 11788-800.
128. **Marsh GA and Tannock GA** (2005). "The role of reverse genetics in the development of vaccines against respiratory viruses." Expert Opin Biol Ther **5**(3) : 369-80.

129. **Masuda H, Suzuki H, Oshitani H, Saito R, Kawasaki S, Nishikawa M and Satoh H** (2000). "Incidence of amantadine-resistant influenza A viruses in sentinel surveillance sites and nursing homes in Niigata, Japan." Microbiology and immunology **44**(10) : 833-839.
130. **Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA and Klenk HD** (2004). "Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(13) : 4620-4.
131. **McClellan K and Perry CM** (2001). "Oseltamivir : A review of its use in influenza." Drugs : (Basel) **61**(2) : 263-283.
132. **McGeer AJ, Lee W, Loeb M, Simor AE, McArthur M, Green K, Benjamin JH and Gardner C** (2004). "Adverse effects of amantadine and oseltamivir used during respiratory outbreaks in a center for developmentally disabled adults." Infect Control Hosp Epidemiol **25**(11) : 955-61.
133. **McKimm-Breschkin JL** (2005). "Management of influenza virus infections with neuraminidase inhibitors : detection, incidence, and implications of drug resistance." Treat Respir Med **4**(2) : 107-16.
134. **McNicholl IR and McNicholl JJ** (2001). "Neuraminidase inhibitors : Zanamivir and oseltamivir." (The) Annals of pharmacotherapy **35**(1) : 57-70.
135. **Meijer A, Valette M, Manuguerra JC, Perez-Brena P, Paget J, Brown C and van der Velden K** (2005). "Implementation of the community network of reference laboratories for human influenza in Europe." J Clin Virol **34**(2) : 87-96.
136. **Mishin VP, Hayden FG and Gubareva LV** (2005). "Susceptibilities of antiviral-resistant influenza viruses to novel neuraminidase inhibitors." Antimicrob Agents Chemother **49**(11) : 4515-20.
137. **Monto AS, Osterhaus ADME, Palache AM, Peiris JSM, Savy VL and StÖHr K** (2003). "The role of antivirals in the control of influenza." Vaccine **21**(16) : 1796-1800.
138. **Moscona A** (2005). "Neuraminidase inhibitors for influenza." N Engl J Med **353**(13) : 1363-73.
139. **Mounts AW, Kwong H, Izurieta HS, Ho Y, Au T, Lee M, Buxton Bridges C, Williams SW, Mak KH, Katz JM, Thompson WW, Cox NJ and Fukuda K** (1999). "Case-control study of risk factors for avian influenza A (H5N1) disease, Hong Kong, 1997." J Infect Dis **180**(2) : 505-8.
140. **Neumann G, Fujii K, Kino Y and Kawaoka Y** (2005). "An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(46) : 16825-9.

141. Neumann G, Watanabe T, Ito H, Watanabe S, Goto H, Gao P, Hughes M, Perez DR, Donis R, Hoffmann E, Hobom G and Kawaoka Y (1999). "Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs." Proc Natl Acad Sci U S A 96(16) : 9345-50.
142. **Neumann G, Whitt MA and Kawaoka Y** (2002). "A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA - what have we learned?" J Gen Virol 83(Pt 11) : 2635-62.
143. **Ng EK, Cheng PK, Ng AY, Hoang TL and Lim WW** (2005). "Influenza A H5N1 detection." Emerg Infect Dis 11(8) : 1303-5.
144. **Nicholson KG, Colegate AE, Podda A, Stephenson L, Wood J, Ypma E and Zambon MC** (2001). "Safety and antigenicity of non-adjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine : a randomised trial of two potential vaccines against H5N1 influenza." Lancet : (British edition) 357(9272) : 1937-1943.
145. **Nicolson C, Major D, Wood JM and Robertson JS** (2005). "Generation of influenza vaccine viruses on Vero cells by reverse genetics : an H5N1 candidate vaccine strain produced under a quality system." Vaccine 23(22) : 2943-52.
146. **Noah DL and Krug RM** (2005). "Influenza virus virulence and its molecular determinants." Adv Virus Res 65 : 121-45.
147. **Nordstrom BL, Oh K, Sacks ST and L'Italien GJ** (2004). "Skin reactions in patients with influenza treated with oseltamivir : a retrospective cohort study." Antivir Ther 9(2) : 187-95.
148. **Nwe N, He Q, Damrongwatanapokin S, Du Q, Manopo I, Limlamthong Y, Fenner BJ, Spencer L and Kwang J** (2006). "Expression of hemagglutinin protein from the avian influenza virus H5N1 in a baculovirus/insect cell system significantly enhanced by suspension culture." BMC Microbiol 6 : 16.
149. **Olsen SJ, Ungchusak K, Sovann L, Uyeki TM, Dowell SF, Cox NJ, Aldis W and Chunsuttiwat S** (2005). "Family clustering of avian influenza A (H5N1)." Emerg Infect Dis 11(11) : 1799-1801.
150. **OMS** (2005). "Vaccins antigrippaux." Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire 33 : 279-287.
151. **Oxford J** (2005). "Oseltamivir in the management of influenza." Expert Opin Pharmacother 6(14) : 2493-500.
152. **Oxford JS, Bossuyt S, Balasingam S, Mann A, Novelli P and Lambkin R** (2003). "Treatment of epidemic and pandemic influenza with neuraminidase and M2 proton channel inhibitors." Clinical microbiology and infection 9(1) : 1-14.

153. **Paget WJ and Aguilera J-F** (2001). "Les plans de lutte contre la pandémie de grippe en Europe. (Influenza pandemic planning in Europe)." Euro surveillance **6**(9) : 136-140.
154. **Parrish CR and Kawaoka Y** (2005). "The origins of new pandemic viruses : the acquisition of new host ranges by canine parvovirus and influenza A viruses." Annu Rev Microbiol **59** : 553-86.
155. Payungporn S, Chutinimitkul S, Chaisingh A, Damrongwantanapokin S, Buranathai C, Amonsin A, Theamboonlers A and Poovorawan Y (2006). "Single step multiplex real-time RT-PCR for H5N1 influenza A virus detection." J Virol Methods **131**(2) : 143-147.
156. Peiris M, Yuen KY, Leung CW, Chan KH, Ip PL, Lai RW, Orr WK and Shortridge KF (1999). "Human infection with influenza H9N2." Lancet **354**(9182) : 916-7.
157. **Perdue ML, Suarez DL, Van RK and Pensaert M** (2000). "Structural features of the avian influenza virus hemagglutinin that influence virulence." Veterinary microbiology : (Amsterdam) **74**(1-2) : 77-86.
158. **Playford EG and Dwyer DE** (2002). "Laboratory diagnosis of influenza virus infection." Pathology : (Sydney) **34**(2) : 115-125.
159. Puthavathana P, Auewarakul P, Charoenying PC, Sangsiriwut K, Pooruk P, Boonnak K, Khanyok R, Thawachsupa P, Kijphati R and Sawanpanyalert P (2005). "Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand." J Gen Virol **86**(Pt 2) : 423-33.
160. **Puzelli S, Di Trani L, Fabiani C, Campitelli L, De Marco MA, Capua I, Aguilera JF, Zambon M and Donatelli I** (2005). "Serological analysis of serum samples from humans exposed to avian H7 influenza viruses in Italy between 1999 and 2003." J Infect Dis **192**(8) : 1318-22.
161. **Quirk M** (2004). "Zoo tigers succumb to avian influenza." Lancet Infect Dis **4**(12) : 716.
162. **Quirk M** (2005). "Avian influenza vaccine clinical trial begins in USA." Lancet Infect Dis **5**(5) : 266.
163. **Rimmelzwaan GF, Kuiken T, van Amerongen G, Bestebroer TM, Fouchier RA and Osterhaus AD** (2003). "A primate model to study the pathogenesis of influenza A (H5N1) virus infection." Avian Dis **47**(3 Suppl) : 931-3.
164. **Roberts NA** (2001). "Anti-influenza drugs and neuraminidase inhibitors." Progress in drug research **56** : 195-237.
165. **Rowe T, Abernathy RA, Hu-Primmer J, Thompson WW, Lu X, Lim W, Fukuda K, Cox NJ and Katz JM** (1999). "Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays." J Clin Microbiol **37**(4) : 937-43.

166. **Rowe T, Cho DS, Bright RA, Zitzow LA and Katz JM** (2003). "Neurological manifestations of avian influenza viruses in mammals." Avian Dis **47**(3 Suppl) : 1122-6.
167. **Russell CJ and Webster RG** (2005). "The genesis of a pandemic influenza virus." Cell **123**(3) : 368-71.
168. **Savarino A** (2005). "Expanding the frontiers of existing antiviral drugs : Possible effects of HIV-1 protease inhibitors against SARS and avian influenza." J Clin Virol **34**(3) : 170-8.
169. **Schultsz C, Dong VC, Chau NV, Le NT, Lim W, Thanh TT, Dolecek C, de Jong MD, Hien TT and Farrar J** (2005). "Avian influenza H5N1 and healthcare workers." Emerg Infect Dis **11**(7) : 1158-9.
170. **Seo SH, Hoffmann E and Webster RG** (2002). "Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses." Nat Med **8**(9) : 950-4.
171. **Seo SH, Hoffmann E and Webster RG** (2004). "The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses." Virus Res **103**(1-2) : 107-13.
172. **Shengqiang LI, Chongguang LIU, Klimov A, Subbarao K, Perdue ML, Delia MO, Yaying JI, Woods L, Hietala S and Bryant M** (1999). "Recombinant influenza A virus vaccines for the pathogenic human A/Hong Kong/97 (H5N1) viruses." The Journal of infectious diseases **179**(5) : 1132-1138.
173. **Shinya K, Hamm S, Hatta M, Ito H, Ito T and Kawaoka Y** (2004). "PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice." Virology **320**(2) : 258-66.
174. **Shinya K, Hatta M, Yamada S, Takada A, Watanabe S, Halfmann P, Horimoto T, Neumann G, Kim JH, Lim W, Guan Y, Peiris M, Kiso M, Suzuki T, Suzuki Y and Kawaoka Y** (2005). "Characterization of a human H5N1 influenza A virus isolated in 2003." J Virol **79**(15) : 9926-32.
175. **Sidwell RW, Bailey KW, Wong MH, Barnard DL and Smee DF** (2005). "In vitro and in vivo influenza virus-inhibitory effects of viraclidine." Antiviral Res **68**(1) : 10-7.
176. **Sims LD, Domenech J, Benigno C, Kahn S, Kamata A, Lubroth J, Martin V and Roeder P** (2005). "Origin and evolution of highly pathogenic H5N1 avian influenza in Asia." Vet Rec **157**(6) : 159-64.
177. **Stegeman A, Bouma A, Elbers AR, de Jong MC, Nodelijk G, de Klerk F, Koch G and van Boven M** (2004). "Avian influenza A virus (H7N7) epidemic in The Netherlands in 2003 : course of the epidemic and effectiveness of control measures." J Infect Dis **190**(12) : 2088-95.

178. **Stephenson I, Nicholson KG, Colegate A, Podda A, Wood J, Ypma E and Zambon M** (2003). "Boosting immunity to influenza H5N1 with MF59-adjuvanted H5N3 A/Duck/Singapore/97 vaccine in a primed human population." Vaccine **21**(15) : 1687-93.
179. **Stephenson I, Wood JM, Nicholson KG and Zambon MC** (2003). "Sialic acid receptor specificity on erythrocytes affects detection of antibody to avian influenza haemagglutinin." J Med Virol **70**(3) : 391-8.
180. **Strikas RA, Wallace GS and Myers MG** (2002). "Influenza pandemic preparedness action plan for the United States : 2002 Update." Clinical infectious diseases **35**(5) : 590-596.
181. **Suarez DL, Van RK and Pensaert M** (2000). "Evolution of avian influenza viruses." Veterinary microbiology : (Amsterdam) **74**(1-2) : 15-27.
182. **Subbarao K, Chen H, Swayne D, Mingay L, Fodor E, Brownlee G, Xu X, Lu X, Katz J, Cox N and Matsuoka Y** (2003). "Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generated by plasmid-based reverse genetics." Virology **305**(1) : 192-200.
183. **Subbarao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, Perdue M, Swayne D, Bender C, Huang J, Hemphill M, Rowe T, Shaw M, Xu X, Fukuda K and Cox N** (1998). "Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness." Science : (Washington, D.C.) **279**(5349) : 393-396.
184. **Sun C, Huang H, Feng M, Shi X, Zhang X and Zhou P** (2006). "A novel class of potent influenza virus inhibitors : Polysubstituted acylthiourea and its fused heterocycle derivatives." Bioorg Med Chem Lett **16**(1) : 162-6.
185. **Suzuki Y** (2001). "Host mediated variation and receptor binding specificity of influenza viruses." Adv Exp Med Biol **491** : 445-51.
186. **Suzuki Y** (2005). "Sialobiology of influenza : molecular mechanism of host range variation of influenza viruses." Biol Pharm Bull **28**(3) : 399-408.
187. **Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holland RE, Jr., Chambers TM, Kiso M, Ishida H and Kawaoka Y** (2000). "Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses." J Virol **74**(24) : 11825-31.
188. **Tanaka H, Park C-H, Ninomiya A, Ozaki H, Takada A, Umemura T and Kida H** (2003). "Neurotropism of the 1997 Hong Kong H5N1 influenza virus in mice." Veterinary microbiology : (Amsterdam) **95**(1-2) : 1-13.
189. **Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE and Fanning TG** (1997). "Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus." Science : (Washington, D.C.) **275**(5307) : 1793-1796.

190. **Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G and Fanning TG** (2005). "Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes." Nature **437**(7060) : 889-93.
191. Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tantilertcharoen R, Damrongwatanapokin S, Theamboonlers A, Payungporn S, Nanthapornphiphat K, Ratanamungklanon S, Tunak E, Songserm T, Vivatthanavanich V, Lekdumrongsak T, Kesdangsakonwut S, Tunhikorn S and Poovorawan Y (2005). "Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1." Emerg Infect Dis **11**(5) : 699-701.
192. **Thornley M** (2004). "Avian influenza ravages Thai tigers." Aust Vet J **82**(11) : 652.
193. **Tompkins SM, Lo CY, Tumpey TM and Epstein SL** (2004). "Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(23) : 8682-6.
194. Tran TH, Nguyen TL, Nguyen TD, Luong TS, Pham PM, Nguyen VC, Pham TS, Vo CD, Le TQ, Ngo TT, Dao BK, Le PP, Nguyen TT, Hoang TL, Cao VT, Le TG, Nguyen DT, Le HN, Nguyen KT, Le HS, Le VT, Christiane D, Tran TT, Menno de J, Schultsz C, Cheng P, Lim W, Horby P and Farrar J (2004). "Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam." N Engl J Med **350**(12) : 1179-88.
195. **Treanor JJ, Wilkinson BE, Maseoud F, Hu-Primmer J, Battaglia R, O'Brien D, Wolff M, Rabinovich G, Blackwelder W and Katz JM** (2001). "Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin vaccine for H5 influenza in humans." Vaccine **19**(13-14) : 1732-7.
196. Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, Zeng H, Solorzano A, Swayne DE, Cox NJ, Katz JM, Taubenberger JK, Palese P and Garcia-Sastre A (2005). "Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus." Science **310**(5745) : 77-80.
197. Ungchusak K, Auewarakul P, Dowell SF, Kitphati R, Auwanit W, Puthavathana P, Uiprasertkul M, Boonnak K, Pittayawonganon C, Cox NJ, Zaki SR, Thawatsupha P, Chittaganpitch M, Khontong R, Simmerman JM and Chunsuttiwat S (2005). "Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1)." N Engl J Med **352**(4) : 333-40.
198. Uyeki TM, Chong YH, Katz JM, Lim W, Ho YY, Wang SS, Tsang TH, Au WW, Chan SC, Rowe T, Hu-Primmer J, Bell JC, Thompson WW, Bridges CB, Cox NJ, Mak KH and Fukuda K (2002). "Lack of evidence for human-to-human transmission of avian influenza A (H9N2) viruses in Hong Kong, China 1999." Emerg Infect Dis **8**(2) : 154-9.
199. **Van DWS and Manuguerra JC** (2000). "Bases moléculaires de la variabilité et diffusion des virus grippaux. (Molecular basis of influenza virus variability and diffusion)." L'Eurobiologiste : (Paris) **34**(247) : 38-41.

200. **Wales JR, Baird MA, Davies NM and Buchan GS** (2005). "Fusing subunit antigens to interleukin-2 and encapsulating them in liposomes improves their antigenicity but not their protective efficacy." Vaccine **23**(17-18) : 2339-41.
201. **Walker JA and Kawaoka Y** (1993). "Importance of conserved amino acids at the cleavage site of the haemagglutinin of a virulent avian influenza A virus." Journal of general virology **74**(p.2) : 311-314.
202. **Ward P, Small I, Smith J, Suter P and Dutkowski R** (2005). "Oseltamivir (Tamiflu) and its potential for use in the event of an influenza pandemic." J Antimicrob Chemother **55 Suppl 1** : i5-i21.
203. **Watson KG, Cameron R, Fenton RJ, Gower D, Hamilton S, Jin B, Krippner GY, Luttick A, McConnell D, MacDonald SJ, Mason AM, Nguyen V, Tucker SP and Wu WY** (2004). "Highly potent and long-acting trimeric and tetrameric inhibitors of influenza virus neuraminidase." Bioorg Med Chem Lett **14**(6) : 1589-92.
204. **Webby RJ, Perez DR, Coleman JS, Guan Y, Knight JH, Govorkova EA, McClain-Moss LR, Peiris JS, Rehg JE, Tuomanen EI and Webster RG** (2004). "Responsiveness to a pandemic alert : use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccines." Lancet **363**(9415) : 1099-103.
205. **WHO Global Influenza Program** (2005). "Evolution of H5N1 Avian Influenza Viruses in Asia." Emerg Infect Dis **11**(10).
206. **Wiwanitkit V** (2005). "Diarrhoea as a presentation of bird flu infection : a summary on its correlation to outcome in Thai cases." Gut **54**(10) : 1506.
207. **Wong JP, Nagata LP, Christopher ME, Salazar AM and Dale RM** (2005). "Prophylaxis of acute respiratory virus infections using nucleic acid-based drugs." Vaccine **23**(17-18) : 2266-8.
208. **Wong JP, Yang H, Nagata L, Kende M, Levy H, Schnell G and Blasetti K** (1999). "Liposome-mediated immunotherapy against respiratory influenza virus infection using double-stranded RNA poly ICLC." Vaccine **17**(13-14) : 1788-95.
209. **Xu X, Lindstrom SE, Shaw MW, Smith CB, Hall HE, Mungall BA, Subbarao K, Cox NJ and Klimov A** (2004). "Reassortment and evolution of current human influenza A and B viruses." Virus Res **103**(1-2) : 55-60.
210. **Yen HL, Herlocher LM, Hoffmann E, Matrosovich MN, Monto AS, Webster RG and Govorkova EA** (2005). "Neuraminidase inhibitor-resistant influenza viruses may differ substantially in fitness and transmissibility." Antimicrob Agents Chemother **49**(10) : 4075-84.
211. **Yen HL, Monto AS, Webster RG and Govorkova EA** (2005). "Virulence may determine the necessary duration and dosage of oseltamivir treatment for highly pathogenic A/Vietnam/1203/04 influenza virus in mice." J Infect Dis **192**(4) : 665-72.

212. **Yuen KY and Wong SS** (2005). "Human infection by avian influenza A H5N1." Hong Kong Med J **11**(3) : 189-99.
213. **Zambon MC** (2001). "The pathogenesis of influenza in humans." Reviews in medical virology **11**(4) : 227-241.
214. **Zhou N, He S, Zhang T, Zou W, Shu L, Sharp GB and Webster RG** (1996). "Influenza infection in humans and pigs in southeastern China." Archives of virology **141**(3-4) : 649-661.
215. **Zurbriggen R** (2003). "Immunostimulating reconstituted influenza virosomes." Vaccine **21**(9-10) : 921-4.