

THÈSE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

JOLY Candie

Présentée et soutenue publiquement le 16 décembre 2015

***Réponse cellulaire d'un vaccin antigrippal ciblant les cellules dendritiques
Etude chez le macaque cynomolgus.***

Président : Mme Berthe-Marie IMBERT-MARCILLE, Professeur de Virologie

**Membres du jury : Mr Stéphane BIRKLE, Professeur d'Immunologie
Mme Vanessa CONTRERAS, Docteur en Immunologie**

Table des matières

Liste des Figures.....	3
Liste des Tableaux.....	4
Liste des abréviations.....	5
Remerciements.....	6
Présentation du Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies relatives et du projet de recherche.....	8
I. Le Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies relatives.....	8
II. Projet de recherche de Master 2.....	11
Synthèse bibliographique.....	14
I. Virologie.....	14
1. Introduction.....	14
2. Structure et facteurs de virulence du virus.....	14
3. Restriction d'hôte du virus influenza.....	19
4. Cycle de multiplication virale.....	19
5. Variabilité du virus influenza.....	22
6. Transmission et circulation inter-espèces.....	23
II. Epidémiologie : grippe saisonnière / grippe pandémique.....	25
1. La grippe pandémique.....	25
2. La grippe saisonnière : réseaux de surveillance et épidémiologie.....	30
III. Infection grippale.....	31
1. Physiopathologie de l'infection grippale.....	31
2. Réponse immunitaire anti-influenza.....	32
3. Symptomatologie et diagnostic de l'infection grippale.....	35
4. Formes graves et complications liées à l'infection grippale.....	35
5. Patients à risques.....	36
IV. Traitements et prévention.....	37
1. Prise en charge du patient.....	37
2. Posologie du traitement antiviral.....	39
3. La vaccination.....	42
Synthèse expérimentale.....	50
I. Introduction.....	50
1. Vaccination : les voies de recherche.....	50
2. Modèle d'infection expérimental.....	52

3.	Stratégie vaccinale envisagée	53
II.	Matériels et méthodes	58
1.	Modèle animal utilisé	58
2.	Observations et prélèvements.....	59
3.	Traitement des prélèvements	60
4.	Vaccins et tampons	60
5.	Immunisation et évaluation de la tolérance	61
6.	Protéine de la phase aigüe et production de cytokines dans le sérum.....	62
7.	Protocole « ICS »	63
III.	Résultats.....	67
1.	Mise au point du panel de cytométrie	67
2.	Données cliniques	73
3.	Réponse adaptative.....	79
	Discussion	94
	Conclusion et Perspectives	100
	ANNEXES	104
	Bibliographie.....	108

Liste des Figures

Figure 1. Structure du virus influenza A	15
Figure 2. Structure du virion et de la protéine HA.....	16
Figure 3. Cycle réplcatif du virus influenza A	21
Figure 4. Réassortiment du virus influenza A au cours du temps	27
Figure 5. Origine du virus pandémique A (H1N1) de 2009	29
Figure 6. Mécanismes de défense immunitaire adaptative contre le virus influenza.....	34
Figure 7. Schéma de la présentation de protéines internes du virus influenza par une cellule infectée aux lymphocytes T CD8 ⁺	51
Figure 8. Résultats d'une étude menée par le BIIR.....	54
Figure 9. Résultats de l'étude expérimentale sur macaques menée par le laboratoire.....	56
Figure 10. Schéma résumant la méthode d'évaluation de la réponse cellulaire avant et après la vaccination des animaux.	58
Figure 11. Schéma représentatif des protéines de fusion composant le vaccin candidat, produit par l'Institut du Baylor à Dallas	61
Figure 12. Stratégie de fenestration des populations sur PBMC de macaque effectuée avec le logiciel Flow Jo	69
Figure 13. Titrage de l'anticorps CD137 couplé à l'APC	70
Figure 14. Diagrammes de cytométrie en flux obtenus avec FlowJo, représentant les résultats de la comparaison des fluorochromes Alexa 700 et PE couplés au TNF- α	71
Figure 15. Stratégie de fenestration des populations sur les cellules de LBA	72
Figure 16. Représentation des poids en kilogramme de chaque macaque au cours de l'étude.....	73
Figure 17. Diagramme représentant le taux de lymphocytes dans le sang de chaque macaque au cours du temps.....	76
Figure 18. Diagramme représentant le taux de monocytes dans le sang de chaque macaque au cours du temps.....	77
Figure 19. Diagramme représentant le taux de neutrophiles dans le sang de chaque macaque au cours du temps.....	78
Figure 20. Résultats des plaques de mesure des cytokines dans le sérum des macaques représentés avec le logiciel Tableau.	80
Figure 21. Résultats des plaques de mesure des cytokines dans le sérum des macaques représentés avec le logiciel Tableau	81
Figure 22. « Heatmap » générée par Tableau représentant les résultats des mesures de cytokines intracellulaires par cytométrie en flux sur les lymphocytes T CD154 ⁺ CD4 ⁺ et CD137 ⁺ CD8 ⁺ sanguins aux différentes dates de prélèvement	83
Figure 23. Analyse polyfonctionnelle des LT CD154 ⁺ CD4 ⁺ sanguins par le logiciel Tableau	86
Figure 24. Analyse polyfonctionnelle des LT CD137 ⁺ CD8 ⁺ sanguins par le logiciel Tableau.....	87
Figure 25. Heatmap » générée par Tableau représentant les résultats des mesures de cytokines intracellulaires par cytométrie en flux sur les lymphocytes TCD154 ⁺ CD4 ⁺ et CD137 ⁺ CD8 ⁺ muqueux, aux différentes dates de prélèvement	89
Figure 26. Analyse multifonctionnelle des LT CD154 ⁺ CD4 ⁺ muqueux par le logiciel Tableau..	90
Figure 27. Analyse multifonctionnelle des LT CD8 ⁺ CD137 ⁺ muqueux par le logiciel Tableau...	91
Figure 28. Représentation du panel de cytométrie de masse comprenant 32 marqueurs pour évaluer la réponse innée lors de l'infection grippale et la vaccination	102

Liste des Tableaux

Tableau 1. Doses d'Oseltamivir recommandées pour un traitement curatif selon le poids du nourrisson de moins de 1 an et de l'enfant entre 2 et 12 ans.....	39
Tableau 2. Echelle de Draize permettant l'évaluation de l'irritation dermique par visualisation de la peau à l'œil nu.	62
Tableau 3. Panel de cytométrie de l'étude.....	65
Tableau 4. Températures rectales (°C) relevées à chaque prélèvement/manipulation sur les huit macaques au cours de l'étude.....	74

Liste des abréviations

ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
BFA : Brefeldine A
BIIR : *Baylor Institute for Immunology Research* - Institut Baylor de recherche en immunologie
CD: *Cluster of Differentiation* – groupe de différenciation
CDC : *Center for Disease Control*
CMH-I/ CMH-II : Complexe Majeur d’Histocompatibilité de type I/II
CPT : *Cell Preparation Tube*- tube de préparation cellulaire
CRP : *C-reactiv protein*- Protéine C-réactive
DC : *Dendritic Cell*- Cellule dendritique
DPBS : *Dulbecco’s Phosphate Buffer Saline*- Tampon phosphate salin de Dulbecco
DSV : Direction des Sciences du Vivant
PBMC : *Peripheric Blood Mononuclear Cell* - Cellules Mononucléaires Périphériques du Sang
HA : Hémagglutinine
IAFP : Influenza A Faiblement Pathogène
IAHP : Influenza A Hautement Pathogène
ICS: *Intracellular Staining* - mesure de cytokines intracellulaires
IFN: Interféron
IL: Interleukine
IgG : immunoglobuline de type G
InVS : Institut de Veille Sanitaire
IRF3 : *Interferon Regulatory Factor 3* – facteur de régulation de l’interféron 3
LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire
LB : Lymphocyte B
LT: Lymphocyte T
NA: Neuraminidase
NEP : *Nuclear Export Protein* - protéine d’export nucléaire
NFS : Numération de la Formule Sanguine
NK (cellules) : *natural killer cells* - cellules tueuses naturelles
NP : Nucléoprotéine
RE : Réticulum Endoplasmique
OMS : Organisation Mondiale de la Santé (WHO en anglais pour *World Health Organization*)
RNP : Ribonucléoprotéine
SIV : Service d’Immuno-Virologie
SIV : *Swine Influenza Virus*- virus influenza porcin
TCID50 : *50% Tissue Culture Infective Dose*-
TCR : *T- Cell Receptor* - récepteur des cellules T
TNF: *Tumor necrosis factor* - facteur de nécrose tumorale
TLR : *Toll-like receptor* – récepteur de type Toll

Remerciements

Je tiens à remercier mon maître de stage de Master 2, **Mr Roger Le Grand** de m'avoir permis d'effectuer ce stage enrichissant au sein du Service d'Immunologie Virologie, et pour le partage de sa culture scientifique et ses conseils avisés.

Je remercie mon encadrante au quotidien au cours de ce stage, **Mme Vanessa Contreras** pour sa disponibilité, son soutien tout au long de ce stage et les connaissances tant sur le plan pratique que scientifique qu'elle m'a apportées.

Je tiens également à remercier tout le personnel de la plateforme « Flowcytech », service avec lequel j'ai beaucoup interagi lors de mon stage et qui m'a été d'une grande aide. Je tiens à remercier tous les autres membres du SIV qui m'ont réservé un accueil très chaleureux et ont permis une intégration rapide et enrichissante, particulièrement les étudiants de master 2, de thèse et post-doctorat du laboratoire : **Lamine Alaoui, Pierre Rosenbaum, Gustavo Martelli, Samuel Bitoun, Simon Delandre, Julie Jouffrey, Karuna Suphaphiphat.**

Je tiens à remercier mon directeur de thèse monsieur **Stéphane BIRKLE** pour ses conseils quant à la rédaction de cette thèse et sa disponibilité, ainsi que madame **Berthe-Marie IMBERT** pour avoir accepté de présider cette thèse.

Pour finir, je tiens également à remercier ma famille qui m'a toujours soutenue et encouragée tout au long de mon parcours.

**Présentation du Commissariat à l'énergie atomique et aux
énergies relatives et du projet de recherche**

Présentation du Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies relatives et du projet de recherche

I. Le Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies relatives

Après la 5^{ème} année de pharmacie filière Industrie, j'ai intégré un master 2 de recherche à la Faculté de Pharmacie de Tours, intitulé « Infectiologie cellulaire et moléculaire, Vaccinologie et Anticorps Thérapeutiques ». Dans le cadre de ce master j'ai effectué un stage de recherche de 6 mois au sein du Commissariat à l'Energie Atomique et aux énergies alternatives (CEA) de Fontenay-aux-Roses dans le Service d'Immunologie Virologie, sous la direction du Dr Roger Le Grand et encadrée par le Dr Vanessa Contreras.

Le Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) est une entreprise centrée sur la recherche, le développement et l'innovation, elle intervient dans quatre domaines principaux : les énergies bas carbone (énergie nucléaire et énergies renouvelables), la défense et la sécurité, les technologies pour l'information et les technologies pour la santé. Le CEA s'appuie sur une recherche fondamentale d'excellence et assure un rôle de soutien à l'industrie. Il représente une catégorie unique d'établissements publics à caractère industriel et commercial. Il est implanté sur 10 centres répartis dans toute la France : 5 centres d'études civils (Saclay, siège administratif, Fontenay-aux-Roses, Grenoble, Marcoule et Cadarache), 5 centres d'études pour applications militaires (région Ile-de-France, Le Ripault, Valduc, Cesta et Gramat) et un siège social à Paris.

C'est en septembre 1945, que le Général De Gaulle demande au directeur du CNRS Frédéric Julio-Curie et à Raoul Dautry, alors ministre de la reconstruction et de l'urbanisme, de mettre en place un organisme de recherche consacré à l'énergie atomique : le commissariat à l'énergie atomique est créé le 8 octobre 1945. Il est destiné à mettre en place des recherches scientifiques et techniques en vue de l'utilisation de l'énergie nucléaire dans les domaines de la science (notamment les applications médicales), de l'industrie (électricité) et de la défense nationale. Après sa création, les premiers membres établissent le CEA dans le fort de Chatillon (Fontenay-aux-Roses), à proximité de Paris. C'est ici que la pile Zoé, premier réacteur nucléaire français, est bâtie en 1948 par l'équipe de Julio-Curie. En 1952, le centre d'études nucléaires de Saclay est ouvert sur le plateau de Saclay, où cette même année sont mis en service le successeur de Zoé, le réacteur EL2 (*Eau Lourde n°2*), et le premier accélérateur de particule du CEA. Suit ensuite

l'installation d'autres successeurs sur différents sites (Marcoule...).

L'organisme a développé un intérêt croissant pour les sciences du vivant, poussé par les collaborations entre biologistes et chercheurs d'autres disciplines. Ainsi, la Direction des sciences du vivant est officiellement créée en 1990, regroupant sept instituts.

Depuis 2005, la DSV gère également le centre CEA de Fontenay-aux-Roses où le démantèlement des anciennes installations nucléaires laisse progressivement la place aux installations dans le domaine de la biologie et tout particulièrement de la santé.

La DSV constitue l'un des cinq pôles opérationnels du CEA avec la Direction de l'énergie nucléaire, la Direction des sciences de la matière, la Direction des applications militaires, la Direction de la recherche technologique.

Aujourd'hui, les objectifs scientifiques de la DSV se concentrent autour de cinq programmes. Deux d'entre eux s'intéressent à la thématique « Les sciences du vivant et les défis de l'énergie » et consistent à mesurer l'impact des technologies de l'énergie sur l'homme (notamment les cellules souches) et l'environnement mais également à travailler sur l'élaboration de nouvelles filières énergétiques.

La santé est au cœur de deux programmes qui visent à explorer les mécanismes de pathogénèse, en particulier des maladies cancéreuses, infectieuses et dégénératives. Le but est de mettre ces découvertes à profit pour la conception de stratégies diagnostiques et thérapeutiques innovantes. Ceci en ayant recours au large panel de compétences et d'outils de la DSV (de l'imagerie au criblage haut débit).

Les travaux au sein des instituts de la DSV sont très axés vers une recherche translationnelle qui fait le lien entre la recherche fondamentale et la recherche clinique. Les équipes ont accès à une plateforme de recherche préclinique hébergeant des modèles animaux prédictifs de pathologies humaines et de réactions aux thérapies envisagés chez l'homme. Cette démarche de recherche est renforcée par l'étroite collaboration avec le milieu hospitalier qui héberge des cohortes de patients inclus dans les études.

La DSV pilote sept instituts dont l'Institut des Maladies Emergentes et des Thérapies Innovantes IMETI. L'institut est divisé en quatre services :

- Le Service des Thérapies Innovantes (STI) et U962 INSERM, qui s'intéresse au traitement des maladies génétiques innées ou acquises par le développement d'approches moléculaires et cellulaires.

- Le Service d'Immuno-Virologie (SIV, UMR CEA/Université Paris-Sud) qui étudie les interactions virus/hôtes au cours des infections virales chroniques et émergentes. L'activité du service consiste à développer des modèles expérimentaux pertinents permettant l'étude des mécanismes physiopathologiques de ces infections et l'évaluation de nouvelles thérapies préventives et curatives.
- Le Service des Prions et des Infections Atypiques (SEPIA), qui travaille à la compréhension de la physiopathogénie des maladies à prions et des pathogènes atypiques ainsi qu'à l'élaboration de stratégies de sécurisation.
- Service de Recherches en Hémato-Immunologie (SRHI), qui participe à la recherche liée aux greffes et transplantations et à la dissémination tumorale.

Le SIV possède une grande expertise dans le domaine du modèle primate qu'il développe depuis plus de 15 années. Ce modèle animal permet d'explorer de façon approfondie les interactions virus/hôtes et les mécanismes de pathogénèse. Il permet également d'étudier des nouvelles stratégies thérapeutiques et préventives directement transposables chez l'Homme. Si les recherches du service étaient principalement axées vers le virus du SIDA humain à ses débuts, il s'intéresse également aux virus émergents (Chykungunya, grippe, fièvre Jaune, Dengue...).

Le service est composé de deux laboratoires : le Laboratoire d'Immunité-Antivirale (LIA), dirigé par Roger LE GRAND et le Laboratoire des Thérapies Innovantes et de Prévention des Infections Virales (TIPIV), dirigé par Nathalie BOSQUET ; il développe aussi un partenariat avec l'Industrie (Bertin Pharma) .

Cette infrastructure bénéficie de l'expertise et des connaissances de ses fondateurs mondialement reconnus : CEA, Institut Pasteur, Université Paris-Sud, INSERM, ANRS et Bertin Pharma.

II. Projet de recherche de Master 2

C'est au sein du SIV que j'ai participé à l'évolution d'un projet de recherche sur la grippe. L'étude que j'ai intégrée est une étude pilote qui va permettre de mener à bien un projet européen visant à l'élaboration d'une nouvelle stratégie vaccinale à large spectre. L'étude consiste aussi à approfondir la compréhension de la physiopathologie de différentes infections grippales (plusieurs souches virales testées) et en particulier l'état du système immunitaire face au virus.

L'étude pilote va permettre, dans le cadre d'une stratégie vaccinale envisagée chez l'homme, de tester des antigènes directement chez un petit nombre de primates et de récolter des informations préliminaires pour orienter précisément le projet. Les antigènes testés sont élaborés par un collaborateur, le « Baylor Institute for Immunology Research » (BIIR), situé à Dallas (Texas, Etats-Unis), un institut de recherche translationnelle en immunologie dont les travaux sont très axés sur les DC. Le déroulement de l'étude a nécessité l'appui indispensable de la plateforme de cytométrie en flux FlowcyTech' rattachée au service et au laboratoire TIPIV, composée d'une équipe d'animaliers prenant soin des primates impliqués.

Synthèse Bibliographique

Synthèse bibliographique

I. Virologie

1. Introduction

Les virus influenza, agents de la grippe, sont des virus enveloppés à acide ribonucléique (ARN) double brin segmenté, appartenant à la famille des *Orthomyxoviridae*, genre *Influenza* dont on distingue trois types : A, B et C. Les virus influenza de type A, plus virulents et plus fréquents, sont à l'origine des pandémies et d'une partie des épidémies annuelles. Les virus de type B sont à l'origine des épidémies annuelles et ceux de type C sont la cause de cas sporadiques donnant le plus souvent des infections grippales modérées ou inapparentes.¹

La classification du genre *influenza* repose sur la nature de leurs protéines de matrice, leurs glycoprotéines de surface et sur la taille de leur génome. Les virus influenza de type A sont les seuls à compter différents sous-types. La classification des sous-types est fonction du type de leurs glycoprotéines de surface présentes au niveau de l'enveloppe virale. La nomenclature des virus influenza est la suivante : citation du type, de l'hôte d'origine (excepté pour les virus humains), du lieu d'isolement, du numéro de la souche, de l'année d'isolement suivie de la description du sous-type antigénique.

Au cours de notre étude, nous nous intéressons uniquement au virus de type A à l'origine d'une grande partie des infections épidémiques et des pandémies, qui représente un réel défi de santé publique.

2. Structure et facteurs de virulence du virus

Les particules virales de type A apparaissent comme des sphères d'environ 1000 Angstrom de diamètre qui comportent un matériel génétique divisé en huit segments ARNs de polarité négative. Il s'agit d'un virus enveloppé dans une double couche lipidique. L'enveloppe des virus influenza de type A est une membrane dans laquelle sont enchâssées les glycoprotéines de surface : Hémagglutinine (HA) et Neuraminidase (NA), ainsi que la protéine M2, canal ionique. La partie interne des particules virales contient des protéines de matrice M1, des nucléoprotéines associées

aux segments d'ARNs ainsi que trois polymérases et deux protéines non structurales NS1 et NS2 (Figure 1).

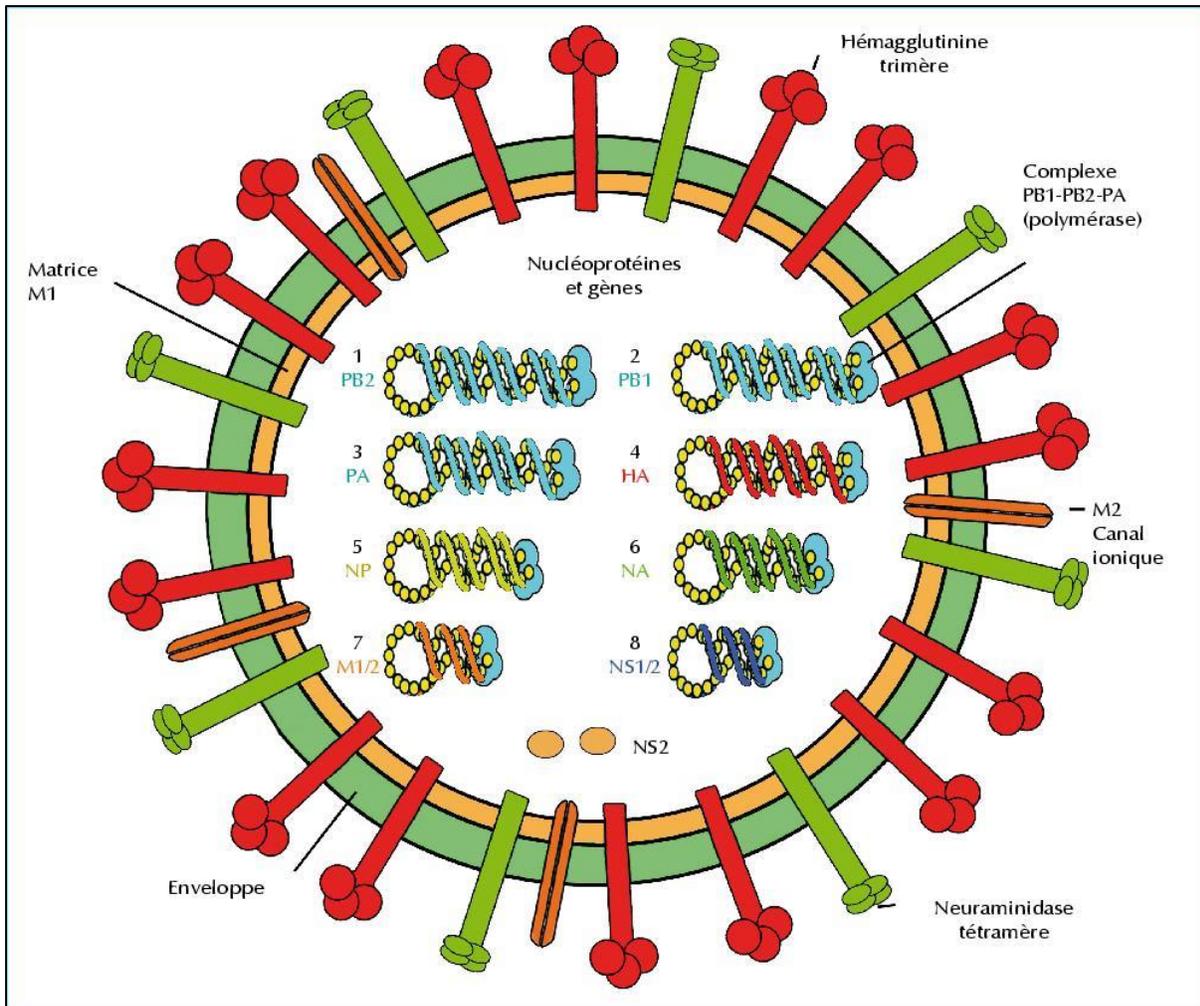


Figure 1. Structure du virus influenza A (d'après ²). Le virus Influenza A est un virus à ARN enveloppé. Sur le schéma on distingue les 8 segments d'ARNs codant les protéines virales : les gènes 4 et 6 codent les glycoprotéines antigéniques HA et NA qui forment des projections à la surface de la membrane virale. Les gènes 1, 2 et 3 codent les polymérases PB2, PB1 et PA respectivement qui formeront un complexe constituant l'ARN polymérase. Le gène 5 code la nucléoprotéine (NP) qui permet l'enroulement des fragments d'ARNs de façon hélicoïdale, formant les ribonucléoprotéines. Le gène 7 code les protéines M : M1 constituant une matrice protéique sous-jacente à l'enveloppe virale et M2 qui constitue le canal ionique de la particule virale. Le gène 8 code les protéines dites non structurales NS1 et NS2 (ou appelée NEP pour *Nuclear Export Protein*).

La protéine HA est un homotrimère : l'association de ces trois monomères forme une spicule (projection) à la surface de la particule virale, il s'agit de la glycoprotéine la plus abondante du virus (Figure 2). Il existe 16 sous-types de HA différents, allant de HA1 à HA16. Le dernier type

HA 16 a été découvert suite à son isolation chez des mouettes rieuses en Suède et a fait l'objet d'une publication en 2005.³

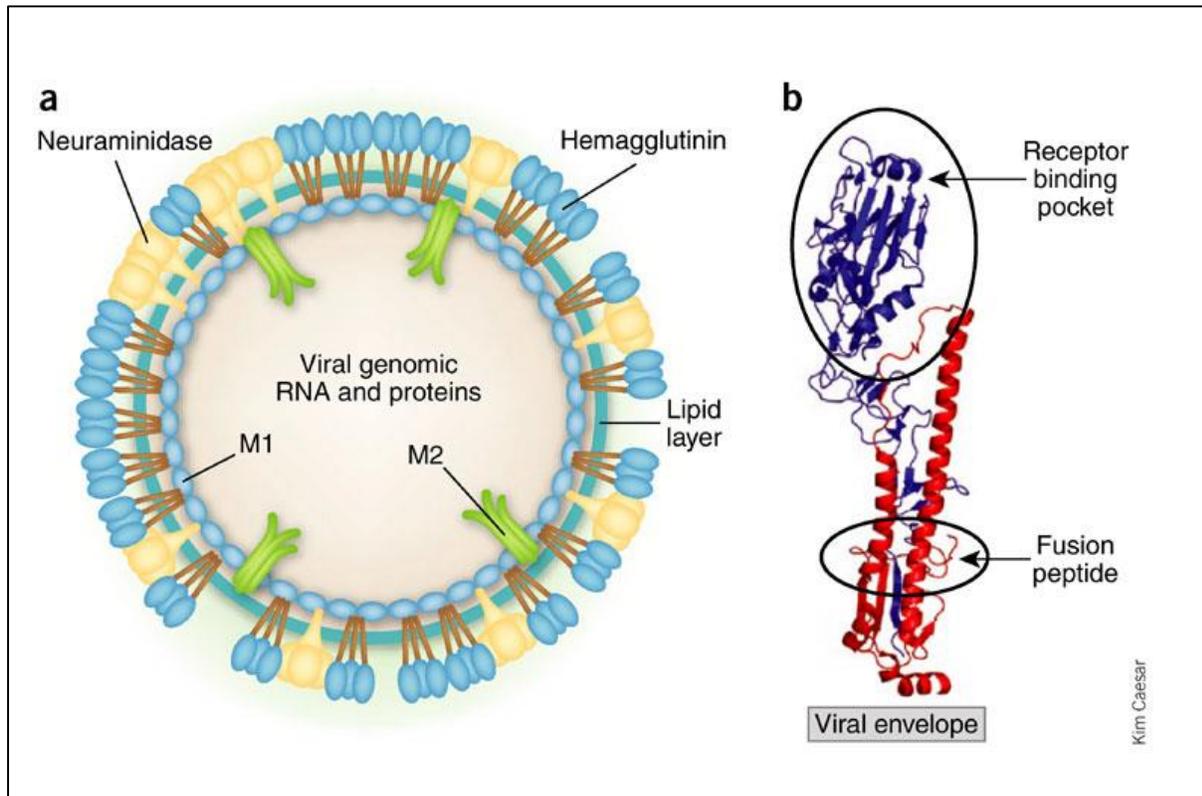


Figure 2. Structure du virion et de la protéine HA (D'après ⁴). a) Le virus porte la protéine HA qui est un trimère et la protéine NA qui est un tétramère, fixées dans l'enveloppe virale b) Structure d'un monomère d'HA : il est composé de deux sous-unités, HA1 (en bleu) qui contient le site de liaison au ligand (*Receptor binding pocket*) et HA2 (en rouge) qui contient le peptide de fusion. HA1 est extracellulaire tandis que HA2 contient un domaine transmembranaire ainsi qu'un domaine intracellulaire.

Chaque monomère d'HA est composé de deux sous-unités : HA1 qui contient le site de fixation aux récepteurs (nommé *Receptor Binding Site (RBS)*), et HA2 qui contient le peptide de fusion. HA se fixe par interaction de la sous-unité HA1 avec des récepteurs composés d'acide sialique (SA) présents à la surface des cellules de l'épithélium respiratoire.⁵ La sous-unité HA2 permet la fusion de la membrane lipidique de la particule virale avec la membrane endosomale de la cellule hôte, permettant l'entrée du virus dans la cellule hôte et la libération du matériel génétique dans le domaine intracellulaire.⁴ Après l'étape de liaison à la cellule cible, les deux sous-unités HA liées doivent être clivées ; cette séparation permet à la particule virale d'infecter définitivement la cellule.

La protéine NA est un homotétramère, association de quatre monomères identiques formant des projections à la surface du virus (Figure 1).⁶ C'est la deuxième glycoprotéine la plus abondante du virus, elle existe sous 9 types différents. Elle fait partie de la famille des glycosidases et permet l'hydrolyse des liaisons osidiques de type α -2,3 ou α -2,6 des résidus de l'acide sialique à une large variété de glycoprotéines. Ainsi, elle va induire la rupture de la liaison entre l'acide sialique porté par les cellules cibles et la glycoprotéine HA. La NA permet grâce à ce clivage, d'une part la sortie des virions qui sont liés à l'acide sialique cellulaire après leur assemblage interne, d'autre part la séparation des virions entre eux après leur libération (les virions ont tendance à s'agréger, ce qui est lié à la présence d'acides sialiques provenant de la membrane plasmique cellulaire dont ils se recouvrent à leur sortie).⁵ De plus, la protéine NA permet le détachement des particules virales du mucus, riche en acides sialiques, ce qui participe à la motilité de ces particules.⁷

Dans l'enveloppe virale, on retrouve également la protéine M2. Il s'agit d'une protéine tétramérique, possédant le rôle de canal ionique transmembranaire uniquement pour les cations monovalents (Figure 1). Elle permet la régulation du pH grâce au transport d'ions H^+ au sein de la particule virale. Le fonctionnement précis du canal au niveau structural a été décrit.⁸ L'activation de ce canal est une étape importante permettant la libération du contenu du virus dans la zone intracellulaire.

Sous l'enveloppe virale se trouve la protéine M1 constituant la matrice qui contribue à maintenir la rigidité de l'enveloppe. Il s'agit de la protéine structurale la plus abondante du virus.

Les virus influenza possèdent un matériel génétique particulier : en effet l'ARN est fragmenté en huit segments monocaténaux de polarité négative qui se répliquent chacun de manière indépendante et codent une à deux protéines. Chaque fragment d'ARN est encapsidé par une nucléoprotéine (NP) formant ainsi une nucléocapside, encore appelée ribonucléoprotéine (RNP) et est associé à un complexe de transcription et de réplication.⁹ Cette ribonucléoprotéine virale constitue la forme apte à la transcription du génome. La NP est indispensable au maintien de la structure de la RNP.

Le complexe de polymérase virale associé est composé de trois protéines internes du virus influenza : deux protéines basiques PB1 et PB2 et d'une protéine acide PA.^{10 11 12} La protéine PB1

correspond à l'ARN polymérase ARN dépendante, elle est de taille plus importante que PB2 et interagit avec les deux polymérases ainsi qu'avec NP. Elle est la seule des trois polymérases à posséder les quatre motifs conservés chez toutes les ARN polymérases virales ARN dépendantes, qui sont indispensables à leur activité.¹³ PB1 possède la capacité de polymériser un nouveau brin d'ARN à partir d'un brin d'ARN initial. De par ce rôle, elle intervient dans la variabilité du virus.⁹ La protéine PB2 est recrutée au niveau du complexe de transcription polymère par interaction avec PB1 et elle interagit également avec NP, mais pas avec PA.¹⁴ PB2 contient deux signaux de localisation nucléaires et une région liant le « cap » des ARNs. Elle est impliquée dans le clivage des ARNm cellulaires, ce qui va permettre la formation de précurseurs utilisés comme amorces lors de la transcription virale.¹⁵ La protéine acide PA est une phosphoprotéine dont le rôle exact reste imprécis. Les données collectées suggèrent un rôle dans la formation des nouveaux brins d'ARNs de polarité négative qui seront empaquetés dans les virions, à partir des brins d'ARNs de polarité positive.¹⁶

La protéine NS2, initialement appelée protéine non structurale 2, assure le transport des RNP virales nouvellement formées du noyau vers le cytoplasme.^{17 18} Des données ont démontré qu'il s'agissait d'une protéine structurale phosphorylée¹⁹, qui fut par la suite renommée NEP, pour viral *Nuclear Export Protein*, en accord avec l'identification de sa fonction (on la trouve sous ses deux appellations dans la littérature).¹⁷

La protéine non structurale 1 (NS1) n'est pas présente dans la particule virale infectante ; elle est synthétisée dans la cellule infectée et ne la quitte pas. Cette protéine phosphorylée est impliquée dans la défense du virus face à la cellule infectée. En effet, lors de l'infection, la cellule va se défendre en induisant l'activation de facteurs de transcription tels que le facteur de transcription régulateur de l'interféron 3 (IRF3), le facteur de nécrose tumorale (NFκB), qui vont induire la sécrétion d'interféron-β (IFN-β) et d'autres molécules antivirales (voir partie III. 2. Réponse immunitaire anti-influenza). Ce processus permet l'inhibition de la réplication virale. La protéine NS1 va interférer avec l'activation de ces protéines antivirales.^{20 21}

3. Restriction d'hôte du virus influenza

La spécificité d'hôte des virus influenza dépend du type de liaison établie avec son récepteur et de la distribution du récepteur au site de réplication du virus.

HA se fixe par interaction de la sous-unité HA1 avec des récepteurs composés d'acide sialique (SA). L'acide sialique, également appelé acide N-acétylneuraminique, est lié à une chaîne glucidique à la surface de la membrane cellulaire et se retrouve dans les sécrétions glandulaires, en particulier le mucus du tractus respiratoire. La liaison au galactose de la chaîne glucidique peut être une liaison type alpha 2, 3 acide sialique-galactose (SA α 2,3-Gal) ou SA α 2,6-Gal.

Au niveau du tractus respiratoire, les cellules épithéliales possèdent des récepteurs spécifiques selon l'espèce. Les cellules épithéliales trachéales humaines (appareil respiratoire supérieur) portent majoritairement des récepteurs de type SA α 2,6-Gal (c'est-à-dire des acides sialiques liés au galactose par des liaisons de type alpha2,6). En revanche, au niveau pulmonaire, les cellules non ciliées possèdent des récepteurs de type SA α 2,3-Gal.²² Chez les espèces aviaires, les cellules cibles portent essentiellement des récepteurs de type SA α 2,3-Gal²³ et on retrouve les deux types de récepteurs chez les cellules de porc. Les virus influenza A adaptés à l'homme et le virus influenza B se lient préférentiellement au récepteur SA α 2,6-Gal. Du fait de la présence de récepteur de type SA α 2,3-Gal au niveau des cellules pulmonaires humaines, celles-ci sont aussi susceptibles d'être infectées par des virus aviaires.²³ Cette infection est possible suite à une exposition à de forte quantité de virus pénétrant dans l'appareil respiratoire inférieur.²⁴

4. Cycle de multiplication virale

Le cycle de réplication des virus influenza se décompose en plusieurs étapes (d'après ^{25 26}), illustré par la Figure 3:

Entrée dans la cellule hôte :

- La particule virale se fixe par liaison de la sous-unité HA1 de la protéine HA aux récepteurs contenant des résidus d'acide sialique présents à la surface de la cellule cible.
- Une fois fixée, la particule virale est internée par un processus d'endocytose dans le cytoplasme. Le virus se trouve alors dans un endosome.

Libération des RNP et transfert au noyau :

- L'environnement acide de l'endosome va entraîner un changement de conformation important de la protéine HA, libérant l'extrémité de la sous-unité HA2 qui va permettre la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale. La fusion des membranes libère les segments ribonucléiques dans le cytoplasme de la cellule hôte.²⁷ Cette étape de changement de conformation a été décrite avec précision il y a plusieurs années.²⁸
- Le pH acide du milieu endosomal permet également l'activation du canal ionique M2 qui participe à la libération des ribonucléoprotéines dans le cytoplasme cellulaire.⁸
- Les 8 RNP migrent vers le noyau par les pores nucléaires grâce à la protéine NP enroulée avec l'ARN, qui contient un signal permettant l'interaction avec les protéines de la machinerie d'importation cellulaire.

Transcription et réplication du génome viral :

- Dans le noyau, les segments d'ARNs à polarité négative sont transcrits en ARN à polarité positive par l'ARN polymérase ARN dépendante. Les segments de polarité positive sont ensuite maturés en ARN messager (ARNm) grâce à la polymérase PB2.
- Une partie des ARNs à polarité positive ne sont pas maturés et servent de matrice pour la synthèse d'ARNs à polarité négative qui seront empaquetés lors de la formation du virion.

Synthèse des protéines virales :

- Après leur maturation, les ARNm sont transférés dans le cytoplasme pour leur traduction en protéines.
- Les protéines précoces PA, NP, NS1, PB1, PB2, nécessaires à la réplication et la transcription sont transportées vers le noyau après leur synthèse pour la formation des RNP.
- Les protéines d'enveloppe HA, NA et M2 sont produites par les ribosomes fixés à la membrane du réticulum endoplasmique (RE), puis entrent dans le RE pour subir des modifications post-traductionnelles, et sont ensuite amenées vers l'appareil de Golgi où ont lieu d'autres modifications. Elles sont, par la suite, transférées au niveau de la membrane plasmique.
- Les segments ARNs de polarité négative s'associent avec les protéines NP et sont exportés hors du noyau grâce à la protéine d'exportation nucléaire (NEP ou NS2) et à M1.

Assemblage et bourgeonnement à la membrane cellulaire :

- L'enveloppe des virus influenza est issue de la membrane plasmique des cellules hôtes. Les glycoprotéines de surface HA et NA vont s'enchaîner dans la membrane cellulaire ainsi que M2, ensuite les protéines M1 vont former la matrice sous-jacente.
- Au niveau de la matrice, les ARNs à polarité négative vont s'associer aux nucléoprotéines puis s'assembler aux polymérases.
- Les virions bourgeonnent à la surface cellulaire et sont libérés grâce au clivage de la liaison HA-acide sialique par la protéine NA et vont infecter d'autres cellules dans le tractus respiratoire.

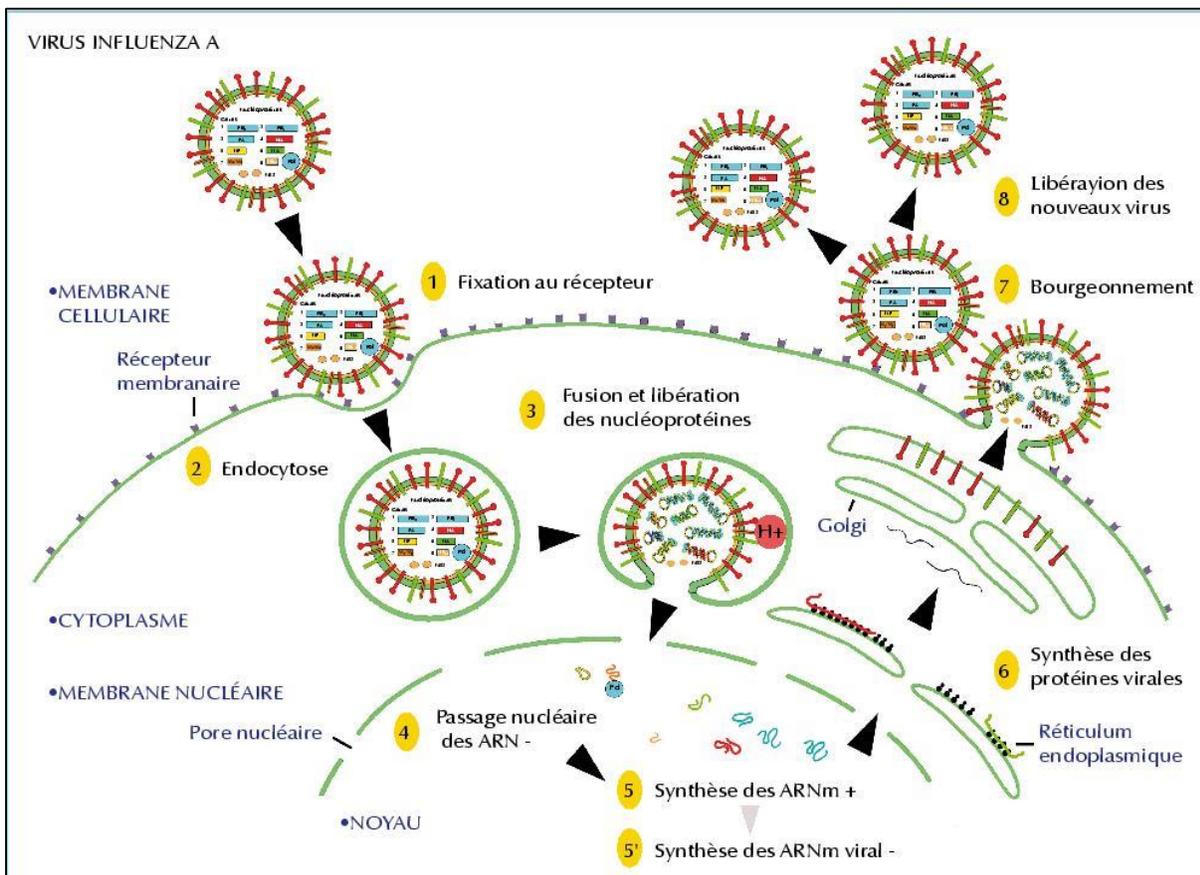


Figure 3. Cycle réplcatif du virus influenza A (D'après²). Son cycle réplcatif se décompose en plusieurs étapes : 1 : Attachement du virus par interaction d'HA avec les récepteurs sialylés; 2 : Endocytose de la particule virale par la cellule hôte; 3 : Fusion de la membrane du virus avec celle de la vacuole d'endocytose et libération des nucléoprotéines contenues dans la particule virale dans le cytoplasme, 4 : Passage des ARNs à polarité négative dans le noyau, 5 : Transcription et réplication de l'ARN viral à polarité négative en ARNs à polarité positive; 6 : Production des protéines virales dans les différents organites cellulaires (glycosylation de HA et NA à travers l'appareil de Golgi), 7 : Bourgeonnement du virion à la surface de membrane, 8 : Libération du virion grâce à NA qui détache HA de ses récepteurs sialylés membranaires.

5. Variabilité du virus influenza

Les virus influenza connaissent une importante variabilité génétique et antigénique. Ils évoluent rapidement par mutation de leurs glycoprotéines d'enveloppe HA et NA selon deux modes : le « glissement antigénique » et la « cassure antigénique » responsables respectivement des épidémies annuelles et des pandémies.

Les épidémies sont attribuables à une dérive par glissement antigénique liée à l'accumulation progressive de mutations des glycoprotéines d'enveloppe HA et NA. Ces mutations sont dues au fort taux d'erreur de l'ARN polymérase lors de la transcription. La polymérase ne possède pas de systèmes de correction. Cela entraîne l'introduction d'une nouvelle HA ou NA comportant des changements d'acides aminés aux sites antigéniques (Figure annexe 1).²⁹ Ce phénomène appelé *antigenic drift* ou glissement antigénique permet au virus d'échapper au système immunitaire. Ainsi, le virus dérivé est différent du virus épidémique de l'année précédente ; il n'est pas totalement neutralisé par les anticorps de la population et peut provoquer une épidémie. C'est le phénomène des épidémies annuelles, qui se déclenchent d'octobre à avril dans l'hémisphère Nord et inversement pour l'hémisphère Sud.

Les pandémies sont dues à l'émergence d'une nouvelle souche résultant de l'apparition d'un nouveau type de HA ou de NA du virus. Le phénomène est appelé *antigenic shift* ou cassure antigénique. Cet événement est possible du fait de la recombinaison de deux virus de sous-types différents lors d'une co-infection dans une même cellule chez un individu. Lors de l'assemblage du virion, des segments ARNs s'associent pour donner un nouveau virion. Il est également possible d'observer l'apparition d'un nouveau sous-type viral lors du passage du virus de l'animal à l'homme par l'adaptation progressive du virus. Ce passage à l'homme est associé à l'introduction d'un gène HA et/ou NA provenant d'un virus influenza animal (porcin, aviaire...) par mutation et réassortiment dans un virus influenza humain circulant.

C'est l'hypothèse qui a été formulée concernant la pandémie de 1918 causée par un virus influenza A(H1N1).³⁰ La naissance d'un nouveau virus humain est possible par adaptation au récepteur humain, par répllication et dissémination dans les cellules humaines efficaces grâce à l'adaptabilité des protéines HA et NA.

6. *Transmission et circulation inter-espèces*

La transmission du virus est directe et se fait par inhalation d'aérosols et de gouttelettes propagées par la toux et les éternuements. Elle est également possible par contact avec une surface contaminée où le virus peut rester infectant plusieurs heures selon le matériau.¹¹ Les lieux de collectivité confinés tels que le métro, les écoles ou le bus sont les plus favorables à la transmission de l'infection. L'infection est très contagieuse, la dose de virus nécessaire à l'infection d'un humain est de 0,6 à 3 *Tissue-culture infective dose 50%* (TCID₅₀). La TCID₅₀ est une mesure du titre viral infectieux, elle indique la quantité de particule virale qui va induire un changement pathologique de 50% des cellules en culture inoculées.³¹ Cette dose est faible compte tenu qu'un individu infecté peut excréter 10³ à 10⁷ TCID₅₀/mL dans ses sécrétions nasopharyngées.³²

Circulation inter-espèces : virus aviaires et porcins.

Tous les sous-types viraux d'influenza A circulent parmi les oiseaux aquatiques qui constituent le réservoir primitif de ces virus.³³ Certaines souches sont également en circulation chez beaucoup d'autres mammifères tels que le porc, la baleine, le cheval, et le phoque. Les virus de types C infectent les oiseaux et certains mammifères dont le porc et l'être humain. En revanche, les virus de types B infectent presque exclusivement l'espèce humaine (mis à part des cas observés chez les phoques).³⁴

Les virus aviaires sont responsables d'infections légères à modérées chez les oiseaux sauvages, par contre ils peuvent être à l'origine de formes sévères et dangereuses chez les oiseaux domestiques tels que les poulets, oies, dindes, cailles et canards. Les palmipèdes constituent le réservoir principal des virus influenza A car ils persistent d'une année sur l'autre, se transmettant par l'eau. De plus, la migration des oiseaux renforce la dissémination des virus.³³ Ces virus aviaires sont classés en deux catégories selon leur pathogénicité : en virus influenza faiblement pathogène IAFP et virus influenza hautement pathogène IAHP. La classification est établie en fonction de caractéristiques moléculaires du virus et de la virulence du virus chez le poulet. La caractéristique moléculaire concerne le site de clivage de HA qui peut se situer à différents endroits sur la protéine. Les infections humaines par des virus IAFP peuvent se manifester par des conjonctivites, des syndromes pseudo-grippaux (fièvre, toux, myalgie) et dans certains cas par des atteintes plus

importantes comme des pneumonies. Les infections humaines par des virus IAHP sont à l'origine d'atteintes bénignes (conjonctivites), de gripes simples, à des formes sévères associées à des complications respiratoires (pneumonies, syndrome de détresse respiratoire...) et à des atteintes multi-organiques.³⁵

Les virus aviaires n'infectent habituellement pas l'espèce humaine mais sont pourtant capables, dans certains cas limités, de se propager à l'homme par la transmission aux volailles domestiques. Ce phénomène représente un risque de santé publique ; plusieurs cas humains ont déjà été rapportés par l'OMS avec le virus influenza A(H5N1) en 1997, puis, depuis 2003 en Asie du Sud-Est avec le virus influenza A(H7N7), en 2003 aux Pays-Bas avec le virus influenza A(H9N2), à Hong-Kong en 1999 et enfin, plus récemment avec le virus influenza A(H7N9) en 2013 en Chine. Les virus aviaires les plus observés et les plus préoccupants à l'heure actuelle sont les virus IAHP (H7N9) et IAHP (H5N1) asiatiques, responsables de la majorité des infections humaines par des virus aviaires au niveau international, et ceci incluant les cas les plus sévères et les décès.³⁵ Dans la plupart de ces cas, l'infection de l'homme était en lien avec un contact rapproché avec des volailles infectées.

Les virus A(H5N1) aviaires viennent se fixer sur les récepteurs de type SA α 2,3Gal au niveau de l'appareil respiratoire inférieur, c'est-à-dire au niveau des cellules épithéliales alvéolaires. La localisation des récepteurs cibles est la cause d'une atteinte alvéolaire importante lors de l'infection, entraînant des taux de mortalité de l'ordre de 60%.³⁶ La plupart des infections par le virus influenza A(H7N9) aviaire se manifestent également par des formes respiratoires sévères amenant au décès dans 1/3 des cas.

Les infections de gripes aviaires sont également associées à des taux de virémie élevés, ce qui permet au virus de se disséminer et d'atteindre d'autres organes. Les récepteurs ne se trouvent pas au niveau de l'appareil respiratoire supérieur, aussi la réplication virale et l'excrétion dans les sécrétions nasopharyngées sont peu importantes, ce qui rend la transmission interhumaine des virus aviaires peu efficace. Cependant la rencontre entre le virus aviaire et le virus humain est actuellement redoutée : elle pourrait conduire à des échanges génétiques entre les deux types de virus et déboucher sur la formation d'un nouveau virus susceptible de s'adapter plus facilement à l'homme. Il serait alors capable de se propager de façon épidémique, voire pandémique.

La grippe se manifeste chez le porc par une infection aigüe du tractus respiratoire causée par les virus influenza A, cependant le taux de mortalité est faible. Les trois sous-types actuellement circulant chez le porc sont le virus influenza A(H1N1), le virus influenza A(H1N2) et le virus A(H3N2), ce sont tous des virus porcins, distincts des virus influenza A humains de même nomenclature.³⁷ Des cas de virus influenza porcins (SIV- *swine influenza virus*- virus de lignage porcine) transmis à l'homme ont été rapportés dans plusieurs régions du globe, notamment des cas de virus A (H1N1) d'origine porcine aux USA avant la pandémie H1N1 de 2009.³⁸ Les SIV peuvent également se transmettre aux volailles. Les cas de grippe porcine sont enregistrés principalement dans le Sud des Etats-Unis, à Mexico, au Canada, en Europe (au Royaume-Uni, en Suède et en Italie), au Kenya, en Chine, au Japon, à Taïwan, et dans d'autres parties de l'Est-Asie. Les SIV sont capables d'infecter l'homme mais se propagent rarement entre humains. L'infection chez l'humain se manifeste par un syndrome grippal léger à modéré.³⁹ Les sujets en contact avec les porcs s'exposent à un risque plus important de contamination. Depuis quelques années le rôle du porc dans l'apparition de nouveaux virus influenza pathogènes pour l'homme s'est installé jusqu'à se confirmer lors de la dernière pandémie H1N1 en 2009.⁴⁰

II. Epidémiologie : grippe saisonnière / grippe pandémique

1. La grippe pandémique

Une pandémie grippale est une épidémie qui sévit au niveau d'une zone géographique très étendue. Ces pandémies surviennent régulièrement et rentrent dans le cycle normal du virus chez l'homme. En effet, quand un nouveau virus grippal touche l'homme, une pandémie démarre car la population est peu ou non protégée contre ce nouveau virus. Celui-ci prend généralement la place du virus qui était jusqu'alors responsable des gripes saisonnières, générant chaque année une épidémie hivernale et ce, jusqu'à la pandémie suivante.

Les virus pandémiques se comportent de façon identique aux virus grippaux. Il existe cependant certaines spécificités. Les personnes les plus touchées ne sont pas toujours les mêmes que pour la grippe saisonnière. Par exemple, tant pendant les pandémies du siècle dernier que lors de la pandémie de 2009, les femmes enceintes sont particulièrement à risque de formes graves. L'ampleur et la gravité des pandémies sont très variables.

La première pandémie serait apparue en 1580, originaire d'Asie et se serait étendue en Afrique puis en Europe. Toute l'Europe aurait été infectée en 6 mois de temps puis le virus aurait atteint l'Amérique.⁴¹ En 1729, une nouvelle pandémie aurait démarré en Russie et se serait étendue à toute l'Europe, puis au monde entier pendant environ 3 ans, enregistrant des taux de mortalité élevés. À partir de 1781 est recensée une nouvelle pandémie issue de la Chine et étendue à tous les continents avec des taux d'attaque importants chez les jeunes adultes. Cette dernière aurait circulé pendant des décennies, faisant rage encore dans les années 1782 en Grande-Bretagne. La dernière pandémie rapportée au XIX^{ème} siècle date de 1830.⁴²

Au XX^{ème} siècle on a dénombré plusieurs pandémies grippales, à commencer par la pandémie de 1918-1919 appelée « la grippe espagnole » qui fut l'un des plus dramatiques événements de l'histoire médicale. Elle fut largement rapportée dans divers articles par la suite.^{43 41 44}

Le virus à l'origine de la pandémie est un virus influenza A(H1N1), issu de la transmission et de l'adaptation d'un virus d'origine aviaire à l'homme.⁴⁵ Les estimations des scientifiques indiquent qu'environ 40 à 50 millions de personnes en seraient décédées, pour environ un tiers de la population mondiale infectée à l'époque (environ 500 millions de personnes).⁴⁶ La forme développée suite à la contamination était particulièrement sévère, avec des taux de mortalité très importants chez les adultes entre 20 et 40 ans. Ce taux de mortalité particulièrement élevé chez les populations jeunes reste inexplicé, néanmoins il semble lié à la survenue de complications telles que les pneumonies virales et pneumonies de surinfection bactérienne, dont les conséquences ont été lourdes en raison de l'absence d'antibiotiques à l'époque.⁴⁷ L'impact de la pandémie ne s'est pas limitée aux années 1918 et 1919, en effet toutes les pandémies grippales postérieures causées par les virus influenza A descendent de cette souche : la souche dérivée A(H1N1), et les souches ré-assorties A(H2N2) et A (H3N2).⁴⁸

C'est par réassortiment génétique au cours de la co-infection d'une même cellule par deux virus influenza A que ces virus ont émergé tour à tour. La pandémie de 1957 ou « grippe asiatique » fut causée par la recombinaison du virus A(H1N1) humain avec un virus aviaire A(H2N2). Le virus humain a acquis les segments codant les protéines HA, NA et PB1 du virus aviaire, donnant un nouveau sous-type influenza A (H2N2) adapté à l'homme. Ce même virus A(H2N2) a acquis les protéines HA et PB1 d'un virus aviaire A (H3N2), donnant naissance à un nouveau virus

A(H3N2) humain à l'origine de la pandémie de 1968 renommée « grippe de Hong-Kong » (Figure 4). Ces dernières pandémies furent moins dramatiques et ravageuses que la pandémie de 1918 avec un nombre de victimes d'environ 1 à 4 millions dans le monde.

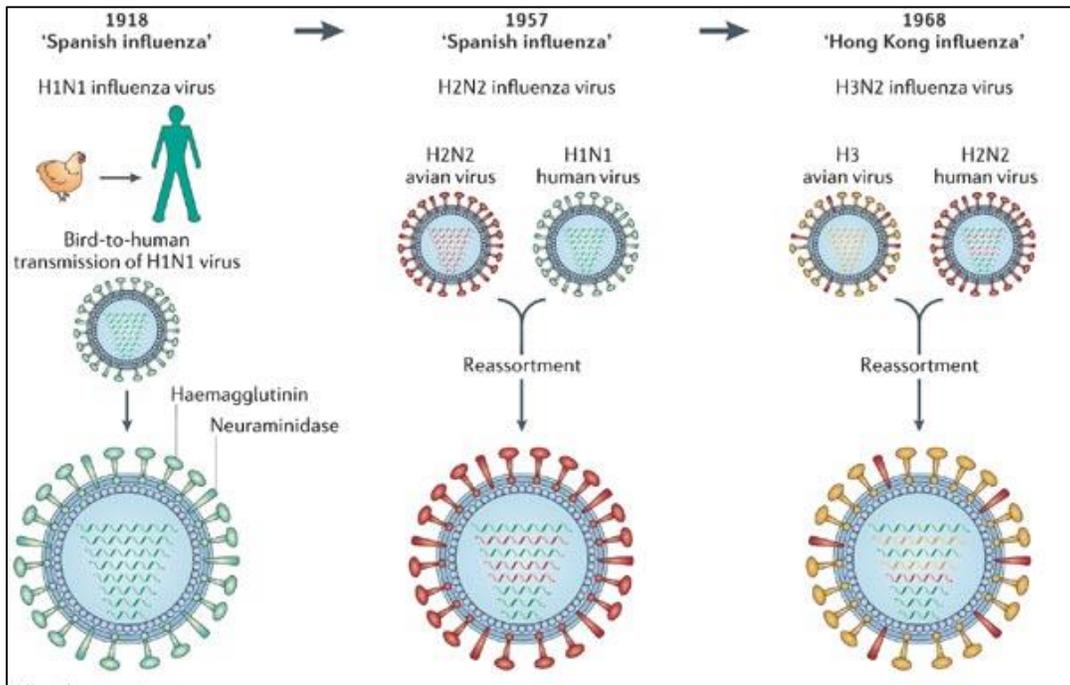


Figure 4. Réassortiment du virus influenza A au cours du temps (adapté d'après ⁴⁹). A l'origine des grandes pandémies de 1918 à 1968 : un virus aviaire transmis à l'humain déclenche la « grippe espagnole » (H1N1), puis ce même virus devenu humain s'est réarrangé avec un autre virus aviaire H2N2 pour devenir le virus H2N2 humain lors d'une co-infection. Puis, en 1957, s'est déclarée la pandémie grippe de « Hong Kong » après un réassortiment du virus humain H2N2 avec deux fragments génétiques codant HA et PB1 issus d'un virus aviaire.

En 2009 est survenue une nouvelle pandémie grippale causée par le virus pandémique influenza A (H1N1). Ce virus s'est rapidement propagé à la surface du globe après une première flambée observée au Mexique en avril 2009. Selon l'OMS le virus pandémique a touché plus de 214 pays et aurait causé jusqu'à 18 449 décès. Les populations de femmes enceintes et d'Autochtones du Canada étaient particulièrement vulnérables au cours de la pandémie. Les femmes enceintes représentant jusqu'à 30% des cas chez les femmes de 20 à 39 ans.⁵⁰ Concernant les autochtones du Canada, la situation avait déjà été observée lors de la pandémie grippale de 1918.⁴⁶

En France, après un début de diffusion du virus pandémique au cours de l'été 2009, la vague pandémique est apparue au cours des mois de septembre/octobre et s'est montrée plus précoce que les épidémies saisonnières de ces 10 dernières années.⁵¹

L'InVS a estimé au total qu'entre 7,7 et 14,7 millions de personnes auraient été infectées par la grippe en France métropolitaine (ce qui représente 13 à 24% de la population). Le nombre total de décès attribuable à la grippe est resté limité par rapport à une épidémie saisonnière, néanmoins le profil des sujets touchés a été modifié. Les adultes âgés de moins de 65 ans (sans facteurs de risques particuliers) ont enregistré 75% des décès (comparé à environ 10% en général), tandis que le taux de mortalité chez les personnes de plus de 65 ans est resté limité, un phénomène qui a été observé à l'international.⁵²

La fin de la pandémie a été déclarée le 10 août 2010 par l'OMS même si l'incidence de l'infection était réduite dans la plupart des pays avant cette date.⁵¹

Des études épidémiologiques démontrent que la diversité du génome du virus H1N1 pandémique de 2009 suggère qu'une multitude d'introductions sont apparues entre 1999 et 2009.⁵³ Le virus pandémique tri-réassorti résulterait de la combinaison de plusieurs virus porcins : des virus porcins classiques originaires d'Amérique du Nord et des virus similaires à des virus aviaires venant d'Europe et d'Asie.⁵³ (Figure 5)

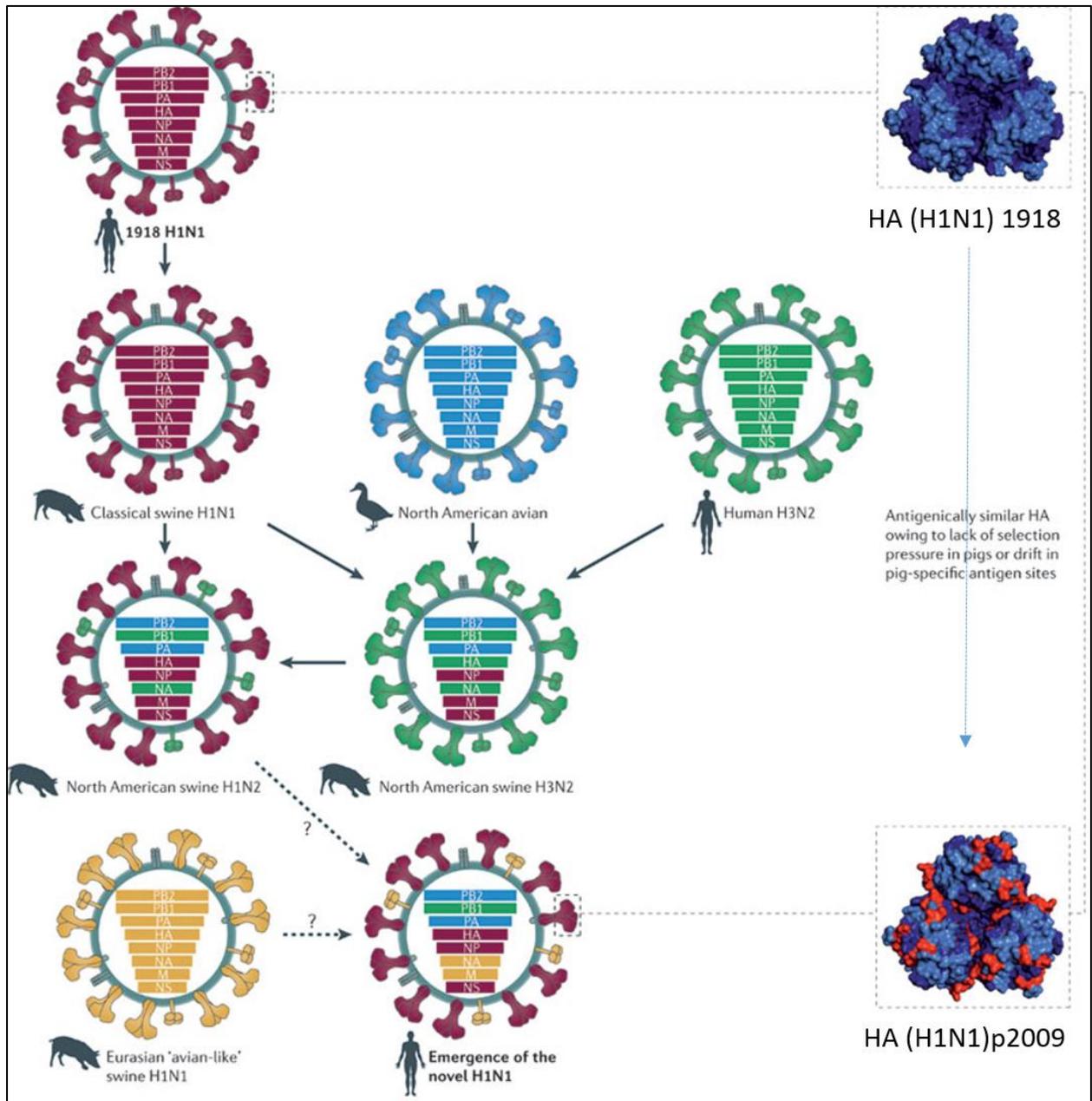


Figure 5. Origine du virus pandémique A (H1N1) de 2009 (d'après ⁴⁵). Le virus pandémique est composé de segments codant les protéines PB2 et PA issus d'un virus aviaire provenant du nord des États-Unis, d'un segment codant PB1 issu du virus H3N2 humain, de segments codant les protéines HA, NP et NS issus d'un virus porcin H1N2 dérivé du virus porcin H1N1, et de segments codant NA et M d'un virus porcin eurasiens H1N1 de type aviaire. Il a été démontré que les virus H1N1 pandémiques de 2009 et 1918 présentaient des similarités au niveau des séquences antigéniques HA. Les régions antigéniques de HA sont colorées en bleu clair et non antigéniques en bleu foncé, les parties différentes entre les deux virus sont en rouge.

2. La grippe saisonnière : réseaux de surveillance et épidémiologie

L'évolution du virus par la voie de glissement antigénique est responsable d'épidémies variables de saison en saison. Il est difficile d'anticiper l'ampleur de l'épidémie, c'est pourquoi il est important de pouvoir identifier rapidement les premiers virus et de surveiller leur évolution sur le territoire. C'est la mission des réseaux de surveillance actifs. Le réseau de surveillance est composé de plusieurs entités qui effectuent une surveillance épidémiologique : le réseau Sentinelle composé de médecins libéraux, les services d'urgence des hôpitaux qui constituent le réseau Oscour, SOS médecins et certaines collectivités de personnes âgées. Dans une politique de financement de réseau unique, le réseau des Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe (GROG) est stoppé à partir de la saison 2014/2015. La surveillance épidémiologique est accompagnée d'une surveillance virologique coordonnée par le Centre National de Recherche (CNR) des virus influenza (Institut Pasteur de Paris et de Guyane), et le réseau de laboratoires hospitaliers. Toutes les données épidémiologiques et virologiques sont récoltées, analysées chaque semaine et publiées dans des Bulletins Grippe par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS). En 2012, un nouveau système de surveillance a été mis en place par les équipes du réseau Sentinelle, il s'agit de « grippeNet.fr », un site internet qui récolte toutes les informations épidémiologiques fournies par la population française de façon volontaire ou anonyme. Le système permet d'apporter des données complémentaires, notamment issues d'une partie de la population ne consultant pas de médecins traitants.

Au niveau international, le réseau mondial d'alerte et d'action en cas d'épidémie (GOARN) est un dispositif permettant aux pays d'identifier rapidement une épidémie (due à un virus influenza ou autre) à potentielle portée internationale et d'être prêts à agir pour y répondre.

Chaque année, l'OMS estime que le virus est responsable de 3 à 5 millions de cas de grippe sévère et de 250 000 à 500 000 décès par an à travers le monde. La grippe épidémique possède un taux d'attaque annuel estimé à environ 5 à 10% chez l'adulte et 20 à 30% chez l'enfant. La mortalité et la morbidité la plus grave concernent les enfants âgés de moins de 2 ans ainsi que les personnes de plus de 65 ans et les sujets à risques. En revanche, les taux d'infection les plus élevés sont enregistrés chez les enfants de 5 à 9 ans (données concernant les pays industrialisés). Dans les zones tropicales à subtropicales, les données de mortalité et de morbidité semblent sous-estimées. En 2002, une épidémie à Madagascar a atteint un taux de létalité de 3%, la plupart des

décès touchant les jeunes enfants, de même qu'au Congo où un taux de létalité de 3,5% a été observé chez les enfants de moins de 5 ans au cours de cette même année.⁵⁴

En France, chaque saison hivernale, l'infection grippale touche 2 à 7 millions de personnes et le nombre de décès est estimé à 2500-3000 sujets par an, touchant majoritairement des personnes âgées ou fragilisées.

Selon le rapport de l'InVS, l'épidémie grippale 2014/2015 en France a été très forte, avec une estimation de près de 2,9 millions de consultations pour syndromes grippaux en médecine générale, pour une durée de 9 semaines d'épidémie.⁵⁵ Les enfants ont beaucoup consulté mais la mortalité est plus importante chez les seniors. L'excès de mortalité (écart entre le nombre observé et le nombre attendu de décès, estimé selon les chiffres des 30 dernières saisons, extrapolé à l'échelle nationale à partir des données de 1000 communes participant à la surveillance de routine) a été estimé à 18 300 patients, touchant essentiellement les personnes de plus de 65 ans. Un excès de 90 000 décès a également été observé dans la plupart des 15 pays participant au projet de surveillance européen (Belgique, Danemark, Angleterre, Pays de Galles, Ecosse, Grèce, Hongrie, Irlande, Pays-Bas, Portugal, Espagne, Suède et Suisse) ainsi qu'aux Etats-Unis. Trois virus grippaux ont été identifiés : avec 75% de virus influenza A, dont 19% de H1N1 et 55% de H3N2, et 25% de virus de type B. Les virus influenza A (H1N1) et A (H3N2) sont les principaux sous-types actuellement circulant au sein de la population humaine.^{55 56}

III. Infection grippale

1. Physiopathologie de l'infection grippale

Comme déjà précisé auparavant, les particules virales ont un tropisme pour les cellules ciliées et à mucus des voies aériennes supérieures et inférieures.

Après infection de l'hôte, le virus va connaître une importante phase de réplication et voit sa concentration augmenter de façon importante pendant 24 à 48h puis va rapidement diminuer pour disparaître complètement dans les 6 à 10 jours suivants.³¹

C'est durant cette phase de réplication intense que surgissent les symptômes grippaux tels que la fièvre et les symptômes inflammatoires des voies respiratoires hautes : toux, rougeur du pharynx.

La phase de réaction immuno-inflammatoire dure 7 à 10 jours pendant lesquels le sujet combat l'infection. La mort des cellules épithéliales infectées est suivie de lésions inflammatoires impactant la paroi bronchique, déclenchant un afflux de cellules immunitaires déversant des cytokines et chimiokines inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-6, l'IL-1, l'IL-8 et l'IFN- α à l'origine des symptômes de fièvre, céphalées, myalgies...⁵⁷ Cette réaction inflammatoire importante entraîne des lésions de la muqueuse respiratoire et ouvre la voie à des surinfections bactériennes, qui sont les complications observées les plus courantes lors d'un syndrome grippal. Une réaction trop importante des lymphocytes CD8 cytotoxiques et des macrophages peut également entraîner de graves lésions alvéolaires conduisant certains patients à développer des syndromes de détresse respiratoire aiguë dans les cas les plus graves (complications observées chez des patients à risques, souffrant de pathologies respiratoires ou autres). Cette phase de réaction immuno-inflammatoire s'accompagne des symptômes de toux, d'hypersécrétions bronchiques et parfois de dyspnée (surtout chez le sujet âgé).³¹ Le réflexe de toux est déclenché par la stimulation des glandes sécrétrices qui produisent une hypersécrétion bronchique associée à l'exposition des terminaisons nerveuses sensibles aux produits de sécrétions inflammatoires du fait de l'altération de l'épithélium respiratoire. Plus l'épithélium est abrasé et l'hypersécrétion intense, plus la toux sera importante.

On observe ensuite une phase de guérison qui dure environ trois semaines, pendant laquelle la muqueuse respiratoire se restaure.

2. Réponse immunitaire anti-influenza

Lors d'une infection naturelle, la réponse immunitaire se met en place. Les mécanismes de défense précoces font intervenir les acteurs de la réponse innée au niveau local : les cellules macrophagiques, les cellules dendritiques (DC), les cellules « *natural killer* », cellules tueuses naturelles (NK). Ces cellules vont sécréter un grand nombre de cytokines et de chimiokines (IL-1 β and IL-18, RANTES, MCP-1, MIP-1 α/β , IL-6, IL1, TNF- α), responsables de l'afflux de neutrophiles et de monocytes et de l'inflammation au site d'infection.⁵⁷

Réponse spécifique au virus influenza

Puis, 10 à 14 jours après l'infection, un relais s'établit avec l'immunité adaptative. La réponse adaptative se met en place avec la présentation des antigènes viraux par les macrophages et les DC aux lymphocytes T CD4 et CD8, conduisant à leur activation.⁵⁸ Les lymphocytes T CD4 activés vont stimuler à leur tour l'activation et la prolifération des lymphocytes B (LB) sécréteurs d'anticorps. Les anticorps sécrétés sont des immunoglobulines G (IgG) sériques et des immunoglobulines A (IgA) muqueuses. Les anticorps synthétisés par les LB sont dirigés contre les épitopes viraux de surface : les glycoprotéines HA et NA, et M2. Ils vont alors neutraliser les particules virales en se fixant sur le site antigénique de HA, bloquant la fixation du virus sur la cellule cible et donc empêchant la contamination d'une nouvelle cellule. Les anticorps spécifiques de NA vont eux stopper la libération de nouveaux virions. La neutralisation de la protéine NA empêche la séparation de HA d'avec son récepteur cellulaire (acide sialique) ; le virion reste fixé sur la cellule infectée. Les anticorps dirigés contre M2 vont lier les particules virales à la cellule et bloquer la libération de particules virales dans les fluides extracellulaires. Les protéines virales internes NP sont présentées aux lymphocytes T CD8 via le complexe majeur d'histocompatibilité de type 1 (CMH1) et vont permettre leur activation et prolifération. Les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques spécifiques du virus vont participer à la défense de l'hôte en détruisant les cellules infectées par la sécrétion de cytokines antivirales (IFN- γ), de facteur de nécrose tumorale (TNF) et de perforines qui induisent la cytolysse de la cellule.

En résumé, les acteurs effecteurs dans la guérison du patient sont les lymphocytes T CD8 activés qui vont augmenter la clairance virale, les lymphocytes T CD4 activés et les anticorps neutralisants (les IgA muqueuses et les IgG transsudant du sérum).⁵⁹

Seuls les anticorps anti-HA sont capables de prévenir l'infection, les autres mécanismes de défense (anticorps anti-M2, anti-NA et lymphocytes T CD8⁺) interviennent après l'infection de la cellule.

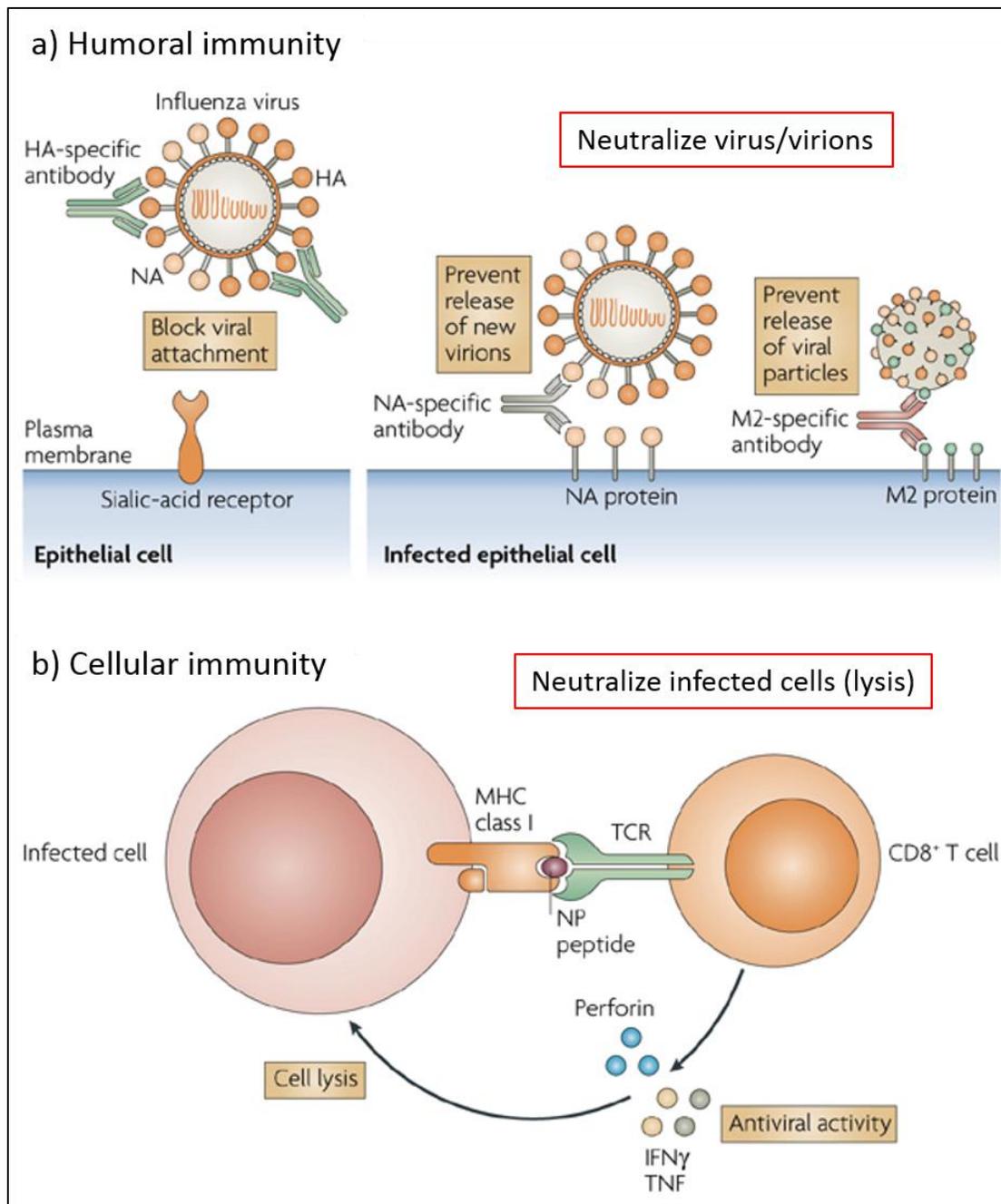


Figure 6. Mécanismes de défense immunitaire adaptative contre le virus influenza (d'après ⁵⁹). a) Les anticorps dirigés contre la protéine HA vont neutraliser les particules virales dans les voies respiratoires en se fixant au site de liaison de l'HA à son récepteur (acide sialique) et empêche ainsi l'infection des cellules épithéliales. Au niveau des cellules épithéliales déjà infectées les anticorps anti-NA vont empêcher la libération de nouveaux virions et les anticorps anti-M2 neutralisent les particules virales. b) Les lymphocytes T CD8 cytotoxiques spécifiques des protéines internes du virus influenza (par exemple NP) vont se fixer aux cellules infectées et sécréter des cytokines, principalement de l'IFN- γ , du TNF et des perforines induisant la lyse et la destruction de cette cellule.

3. Symptomatologie et diagnostic de l'infection grippale

Les virus influenza de type A sont responsables d'infections grippales simples à des formes de grippe compliquées et graves nécessitant une hospitalisation (complications détaillées dans la partie ci-après « complications liées à l'infection grippale »). Les virus de types B, eux, sont responsables de formes généralement moins importantes se manifestant parfois uniquement par une rhinite ou par une trachéo-bronchite sans fièvre.

La période d'incubation est brève : 1 à 5 jours. Concernant les formes simples communes, en période de circulation du virus, la plupart des patients présentent différents symptômes qui permettent d'établir le diagnostic : fièvre pouvant atteindre ou dépasser 40°C, frissons, asthénie, sensation de malaise, arthralgies et myalgies, céphalées, toux, douleurs pharyngées, congestion nasale. Ces symptômes surgissent en général assez brusquement.⁶⁰ Certains patients peuvent également montrer des vomissements et diarrhée, ce qui est plus commun chez l'enfant et les personnes âgées que chez l'adulte.⁶¹

Lors de la période d'épidémie saisonnière, le tableau clinique caractéristique est suffisant pour poser le diagnostic de l'infection grippale. La fièvre dure 3 à 5 jours avec potentiellement des remontées puis va disparaître tandis que les signes respiratoires vont s'intensifier. La guérison est rapide, en 8 jours en moyenne les symptômes vont disparaître, cependant l'asthénie peut persister plusieurs semaines. Si les symptômes tels que la toux, la fièvre et les douleurs musculaires sont significatives de l'infection grippale en temps d'épidémie, toute fièvre n'est pas forcément indicatrice d'une grippe et le diagnostic différentiel avec d'autres pathologies doit être fait par un examen clinique complet comprenant une recherche de symptômes autres et des examens complémentaires. Le diagnostic différentiel concerne principalement les infections par le virus respiratoire syncytial (VRS), l'adénovirus, le rhinovirus, l'entérovirus, le coronavirus, les infections bactériennes telle que la pyélonéphrite aigüe (lorsque des symptômes urinaires sont associés), une méningite à méningocoque voire même un paludisme en cas de retour d'un pays endémique.^{60 31}

4. Formes graves et complications liées à l'infection grippale

Les complications graves sont liées à la virulence de la souche influenza et également à l'état général du patient infecté. Il existe des gripes malignes conduisant à des formes graves telles qu'une pneumopathie virale primitive (se traduisant par un œdème pulmonaire lésionnel avec

insuffisance respiratoire aigüe, ou une pneumopathie interstitielle avec un syndrome de détresse respiratoire aigüe) ou une pneumopathie bactérienne de surinfection.

Les complications dues à l'infection sont essentiellement les surinfections pulmonaires bactériennes qui se traduisent par une fièvre persistante, une dégradation des capacités respiratoires et une hypersécrétion bronchique, fréquentes chez les sujets âgés et les insuffisants respiratoires.⁶²

On rencontre chez les enfants des complications infectieuses qui se manifestent essentiellement sous la forme d'otites moyennes aigües, de sinusites, de bronchites dues à *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*, et des pneumonies dues principalement à *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Staphylococcus aureus*. Sont également observées des complications neurologiques telles qu'une atteinte encéphalique, ce qui reste rare, et des complications cardiaques telles que des atteintes myocardiques et péricardiques.⁶²

5. Patients à risques

Les patients à risques sont les patients souffrant d'asthme ou de pneumopathie chronique, de troubles neurologiques (retard mental, épilepsie..), les patient atteints de troubles endocrinologiques tels que les diabétiques, les patients immunodéprimés (cancer, SIDA, corticothérapie), les sujets ayant des troubles hépatiques, rénaux ou cardiaques (insuffisants cardiaques, hépatiques et rénaux), les personnes âgées de plus de 65 ans, les patients souffrant d'obésité, les enfants en bas âge (notamment ceux en dessous de 5 ans) ainsi que les femmes enceintes.³¹

En effet, chez la femme enceinte, le virus est capable de traverser la barrière fœto-placentaire, ce qui représente un risque (faible) d'avortement spontané ou de malformation congénitale si la contamination du fœtus survient lors du premier trimestre de la grossesse. Pour la mère, la mortalité par pneumonie au cours du 3^{ème} trimestre est augmentée, c'est pourquoi les femmes enceintes présentant des facteurs de risques (obésité, diabète, âge plus avancé...) peuvent être vaccinées au cours du 2^{ème} ou 3^{ème} trimestre.⁶⁰

Chez le sujet âgé le tableau clinique est légèrement différent car ce sont les symptômes respiratoires qui dominent, ainsi le diagnostic est moins évident. Néanmoins on observe de façon fréquente l'association d'une toux importante avec expectoration accompagnée d'une dyspnée. Le sujet âgé est également plus susceptible de développer des complications pulmonaires telles qu'une insuffisance respiratoire aigüe menant parfois à un syndrome de détresse respiratoire

aigüe. La période d'alitement que les symptômes grippaux imposent mène également à des complications de type thromboembolique, trouble de la marche et escarres.

L'enfant en bas âge demande une surveillance médicale rapprochée lors d'une infection grippale. Les complications sévères sont la plupart du temps observées chez les enfants de moins de 2 ans. Les enfants à plus haut risque sont les enfants jusqu'à 5 ans, qui représentent une part importante des hospitalisations pour grippe, et particulièrement ceux âgés de moins de 6 mois, notamment du fait de leur trop jeune âge pour être vaccinés. De même que les adultes, tous les enfants de 6 mois à 18 ans présentant des facteurs de risque tels que l'asthme, le diabète, une pneumopathie chronique, des troubles cardiaques, rénaux ou hépatiques, une immunodépression ou des altérations cérébrales et du système nerveux sont sujets aux complications.⁶³

Les patients immunodéprimés sont exposés à un risque augmenté d'infections sévères et enregistrent des taux de morbidité et de mortalité importants. En revanche, il a été rapporté que chez les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) les cas de grippe ne sont pas plus fréquents que chez les sujets non infectés. Néanmoins, on observe un risque de complications augmenté et ceci malgré la vaccination.⁶⁴ Les patients adultes ayant subi une transplantation d'organe solide sont particulièrement susceptibles de développer des complications pulmonaires et extra-pulmonaires pouvant s'avérer létales, et l'infection peut aller jusqu'au rejet du greffon.⁶⁵

IV. Traitements et prévention

1. Prise en charge du patient

La rémission est naturelle, elle ne requiert aucun traitement thérapeutique. Les objectifs de traitement sont le soulagement des symptômes, le raccourcissement de la durée de l'infection, la réduction de la transmission et le traitement des possibles complications. Le traitement symptomatique consiste essentiellement à délivrer des antalgiques et antipyrétiques : paracétamol, acide acétylsalicylique (sauf chez l'enfant), et certains anti-inflammatoires non stéroïdiens - AINS- (ibuprofène) éventuellement accompagnés d'antitussifs (codéine, dextrométhorphan) et associés au repos.⁶⁰

Les antiviraux

Les traitements curatifs disponibles visent essentiellement les individus à risque déjà cités auparavant. Ces traitements comptent deux types d'antiviraux : les inhibiteurs de la NA, Oseltamivir (Tamiflu® du laboratoire Roche) et Zanamivir (Relenza® du laboratoire GlaxoSmithKline), actifs sur les virus influenza A et partiellement sur les virus influenza B et les anti-M2. ⁶⁰ Les anti-M2, Amantadine et Rimantadine, utilisés uniquement contre les virus de type A, sont malheureusement devenus obsolètes en raison de l'apparition de nombreuses souches résistantes portant des mutations ciblées.⁶⁶ Les inhibiteurs de la NA peuvent réduire le risque de complications et diminuer la durée de la maladie.⁶⁷ Le traitement peut être efficace uniquement s'il est administré précocement, c'est-à-dire 48 h après l'apparition des premiers symptômes.^{68 69}

70

Les inhibiteurs de la NA sont des faux substrats, des analogues de l'acide sialique, ils se fixent au niveau du site catalytique de la protéine NA et vont inhiber son activité de glycosidase. Ainsi, ils permettent d'inhiber la libération des virions par les cellules épithéliales du tractus respiratoire en empêchant la NA de séparer la protéine HA des résidus d'acide sialique.^{71 72} L'Oseltamivir possède une bonne biodisponibilité par voie orale et agit par voie systémique. Le Zanamivir possède une mauvaise biodisponibilité par voie orale (diffuse mal dans l'organisme par cette voie) et est donc administré sous forme de poudre à inhalation endobuccale qui va principalement avoir une action locale au niveau du tractus respiratoire. En raison de son mode d'administration, le Zanamivir est uniquement prescrit chez l'adulte et l'enfant de plus de 5 ans. L'Oseltamivir est quant à lui prescrit chez l'adulte et l'enfant à partir de 1 an (avec possibilité de prescription adaptée chez le nourrisson de 1 mois à 1 an). Les inhibiteurs de la NA sont en général bien tolérés. Les effets secondaires de l'Oseltamivir se résument à des réactions cutanées, à une hypersensibilité potentielle à l'un des composants du médicament, à des troubles gastro-intestinaux, et plus rarement à une perturbation de la fonction hépatique et à des troubles neuropsychiatriques.⁷¹ Concernant le Zanamivir, les effets indésirables sont identiques à ceux de l'Oseltamivir excepté les troubles gastro-intestinaux et de la fonction hépatique. Cependant, le Zanamivir peut provoquer des bronchospasmes et une dyspnée liés à la voie d'administration. En

effet, en raison de l'inhalation orale, la poudre peut s'accumuler au niveau de l'oropharynx et provoquer ces effets indésirables supplémentaires.⁷²

En période de circulation du virus, la transmission par contact avec une surface contaminée ou par inhalation d'aérosols est très importante. Ainsi, lors de la prise en charge du patient, le médecin et le pharmacien se doivent également de dispenser des conseils de prévention simples permettant de limiter la propagation du virus. Il est notamment conseillé aux patients de respecter quelques règles d'hygiène : se couvrir la bouche et le nez en cas de toux ou d'éternuements, procéder à un lavage des mains à l'eau et au savon ou à la solution hydro-alcoolique plusieurs fois par jour, utiliser des mouchoirs jetables à usage unique et les jeter immédiatement, limiter les contacts avec les personnes à risque. Aussi, le médecin et le patient doivent considérer l'intérêt de la mise en place d'une vaccination antigrippale annuelle selon la condition du sujet. (Voir partie « 3.Vaccination »)

2. Posologie du traitement antiviral

Oseltamivir, Tamiflu® (d'après 71)

La molécule se trouve sous forme de gélule à des doses de 30, 45 et 75 mg et de suspension buvable à 6 mg/mL (les deux formulations sont bioéquivalentes).

Pour les adolescents de 13 à 17 ans, la posologie recommandée est de 75 mg deux fois par jour pendant 5 jours par voie orale pour un traitement curatif. Pour les nourrissons de plus de 1 an et les enfants âgés de 2 à 12 ans, la dose est adaptée en fonction du poids corporel selon le tableau suivant :

Poids corporel	Dose à administrer pendant 5 jours - gélules	Dose à administrer pendant 5 jours – suspension buvable
< 15 kg	30 mg deux fois par jour	5 mL deux fois par jour
> 15 kg à 23 kg	45 mg deux fois par jour	7,5 mL deux fois par jour
> 23 kg à 40 kg	60 mg deux fois par jour	10 mL deux fois par jour
> 40 kg	75 mg deux fois par jour	12,5 mL deux fois par jour

Tableau 1. Doses d'Oseltamivir recommandées pour un traitement curatif selon le poids du nourrisson de moins de 1 an et de l'enfant entre 2 et 12 ans (D'après ⁷³).

La posologie du Tamiflu® pour un traitement curatif chez le nourrisson de 0 à 1 an lors d'une pandémie grippale est la suivante :

- 2 mg/kg pour le nourrisson de 0 à 1 mois,
- 2,5 mg/kg pour le nourrisson de 1 mois à 3 mois,
- 3 mg/kg chez le nourrisson de 3 à 12 mois, et ceci deux fois par jour pendant 5 jours.

Concernant les traitements prophylactiques, la posologie recommandée en période d'épidémie est de 75 mg une fois par jour pour une durée de traitement pouvant aller jusqu'à 6 semaines.

Le traitement prophylactique du Tamiflu® chez les nourrissons de moins d'un an est de :

- 2 mg/kg pour le nourrisson de 0 à 1 mois,
- 2,5 mg/kg pour le nourrisson de 1 mois à 3 mois,
- 3 mg/kg chez le nourrisson de 3 à 12 mois, et ceci une fois par jour pendant 10 jours.

Il n'y a pas de données disponibles concernant la prescription de Tamiflu® chez le nourrisson de moins d'un mois.

Zanamivir Relenza® (d'après 72)

La molécule se trouve sous forme de poudre blanche pour inhalation orale à 5 mg pour un récipient dose.

La posologie pour un traitement curatif par le Zanamivir chez l'adulte et l'enfant de plus de 5 ans est de deux inhalations (2 fois 5 mg), deux fois par jour pendant 5 jours.

La posologie pour un traitement prophylactique en période épidémique est de deux inhalations (2 fois 5 mg), une fois par jour pour une durée pouvant aller jusqu'à 28 jours pour les adultes et les enfants de plus de 5 ans.

Résistance aux antiviraux

L'apparition de souches résistantes semble résulter d'un phénomène spontané d'émergence de variants plutôt que d'une apparition sous la pression de sélection d'utilisation des molécules antivirales. Depuis plusieurs années, des souches résistantes A ont été isolées chez des patients.

En raison du pourcentage important de souches A(H3N2) et A(H1N1) résistantes aux anti-M2, ces molécules ne sont plus recommandées en monothérapie.

Comme nous l'avons déjà indiqué, les anti-NA se fixent au niveau du site d'action de la protéine NA en mimant les substrats naturels de la NA. Le mécanisme de développement des résistances concerne la molécule d'Oseltamivir chez les anti-NA. En effet, lors de la fixation de l'Oseltamivir au niveau du site actif de la NA, la molécule doit changer de conformation pour réarranger sa chaîne latérale hydrophobe, afin de s'insérer correctement. Une mutation empêchant ce réarrangement peut occasionner l'émergence d'une résistance. La molécule de Zanamivir étant plus proche structurellement des substrats naturels de la NA, elle s'insère directement au niveau du site actif et elle n'est donc pas touchée par ce phénomène de résistance. Plusieurs des mutations empêchant le changement de conformation de la molécule d'Oseltamivir ont été identifiées et concernent le gène de la NA. La présence d'une seule de ces mutations chez une souche d'influenza A se traduit par une résistance à l'Oseltamivir. La mutation appelée « His-274-Tyr » correspond à un remplacement en position 274 de la NA d'une histidine par une tyrosine, et est décrite chez des virus A(H1N1) 2009. Des cas de transmission interhumaine des souches portant cette mutation ont été observés dans l'Hémisphère Nord depuis 2009.^{74 75} Le phénomène paraît limité mais il fait l'objet d'une surveillance rapprochée.

Au cours de la saison épidémique 2014/2015, une majorité des souches influenza A(H1N1) 2009 testées étaient sensibles à l'Oseltamivir (à 98.4%) et 100% de ces souches étaient sensibles au Zanamivir.⁷⁶ De plus, aucune résistance aux anti-NA n'a été rapportée chez virus influenza A(H3N2) et influenza B.

3. *La vaccination*

Corrélat de protection

Face aux traitements devenus obsolètes en raison de résistances émergentes, la meilleure arme de prévention reste la vaccination annuelle pour se protéger contre le virus et les éventuelles complications et pour limiter la propagation du virus. Elle doit être faite deux semaines avant le début de la saison grippale et renouvelée tous les ans en raison de la grande variabilité antigénique des souches influenza circulantes. En effet l'immunité antigrippale apportée par la vaccination est médiée par l'induction d'anticorps qui permet de réduire l'incidence et la sévérité de la maladie.⁷⁷ Les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques au virus permettent de limiter également l'infection. Le corrélat de protection du vaccin antigrippal, prouvé des années plus tôt, est directement lié au taux d'anticorps anti-HA dans le sérum, HA étant la cible antigénique principale des anticorps produits.⁷⁸ Les protéines HA et NA étant très variables, le vaccin nécessite d'être reformulé annuellement. Ainsi, chaque année l'OMS émet les recommandations sur la composition du vaccin pour la saison épidémique à venir. La détermination de la composition repose sur la surveillance accrue de l'évolution des souches virales circulantes dans les hémisphères Nord et Sud.

Composition des vaccins et recommandations

Le vaccin contient des composants antigéniques issus de 3 souches virales d'influenza : deux souches A : A (H1N1) et A (H3N2) et une souche B. La composition du vaccin de la saison 2015/2016 est la suivante : une souche A/California/7/2009 (H1N1) pdm09, une souche A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) et une souche B/Phuket/3073/2013-like (lignée Yamagata).⁷⁹ Cela représente des changements par rapport à la composition du vaccin 2014 /2015 concernant la souche A (H3N2) et la souche B, respectivement (A/Texas/50/2012 (H3N2) et (B/Massachusetts/2/2012). Il existe également des vaccins quadrivalents protégeant contre deux souches influenza A et deux souches influenza B, mais ceux-ci ne sont pas commercialisés en France. Utilisés essentiellement aux États-Unis, les vaccins quadrivalents contiennent les trois souches citées ci-dessus et une souche B supplémentaire : B/Brisbane/60/2008-like (lignée Victoria).

La grande majorité des souches circulantes A (H1N1) et B étaient identiques aux souches vaccinales, en revanche la moitié des souches A (H3N2) circulantes n'étaient pas couvertes par le vac-

cin annuel ; ceci étant dû à une mutation non anticipée de cette souche.⁸⁰ Les organismes de surveillance ont enregistré une baisse considérable de la protection de la population vaccinée pour cause de mutation de la souche circulante A (H3N2) prédominante au cours de la saison 2014-2015.⁵⁶ Malgré cela, les organismes de surveillance de la grippe rappellent que dans les pays industrialisés les vaccins antigrippaux offrent une couverture protectrice d'environ 70% à 90% contre la maladie, chez l'adulte sain, à condition que les antigènes vaccinaux correspondent aux souches influenza virales en circulation. Chez les personnes âgées non institutionnalisées, la vaccination permet de réduire de 25% à 39% le nombre d'hospitalisation et de 39% à 75% la mortalité pendant la saison épidémique. Ainsi les institutions de santé encouragent la vaccination des populations, de la manière suivante :⁸¹

Recommandation générale :

- Toutes personnes âgées de plus de 65 ans.

Recommandations particulières :

- Tous pensionnaires des établissements de soins et des établissements médico-sociaux d'hébergement.
- Toutes les personnes, y compris les enfants âgés de plus de 6 mois, atteintes des pathologies suivantes : affections broncho-pulmonaires et insuffisance respiratoires chroniques, dysplasie broncho-pulmonaire, mucoviscidose, affections et insuffisance cardiaque, affections neurologiques et musculaires graves, affections rénales et hépatiques, diabète, immunodépression primitive ou acquise.
- Les femmes enceintes quel que soit le trimestre de la grossesse (la vaccination est pratiquée à la maternité).
- Les personnes obèses (indice de masse corporelle supérieur ou égal à 40).
- Entourage des nourrissons de moins de 6 mois présentant des facteurs de risque de forme sévère de grippe : prématurés, enfants atteints de cardiopathie congénitale, de déficit immunitaire, d'affection pulmonaire neurologique ou neuromusculaire.

Recommandations professionnelles :

- Les professionnels de santé et tous autres professionnels en contact régulier et prolongé avec des sujets à risque (listés dans la partie « sujets à risque »).

- Personnel navigant des bateaux de croisière et des avions, ainsi que le personnel accompagnant les voyageurs.

Vaccins actuels

Deux types de vaccins antigrippaux sont commercialisés à l'heure actuelle : les vaccins inactivés (TIV) et les vaccins vivants atténués (LAIV).

Il existe trois types de vaccins inactivés : les vaccins à virus entier, les vaccins à virus fragmenté et les vaccins sous-unitaires. Les vaccins sous-unitaires ainsi que les vaccins à virus fragmenté sont prédominants dans la plupart des pays, étant moins réactogènes que les vaccins à virus entier. Les vaccins à virus fragmenté sont produits par dissociation du virus avec un agent détergent. Concernant les vaccins sous-unitaires, les protéines HA et NA sont synthétisées puis purifiées. Les vaccins inactivés trivalents sont indiqués à partir de l'âge de 6 mois. Ils sont injectés par voie intramusculaire chez les vaccinés de plus de 1 an et dans la face antéro-latérale de la cuisse chez les vaccinés de 6 à 12 mois.

Le schéma vaccinal est le suivant (d'après le calendrier vaccinal 2015 publié par le ministère français des affaires sociales, de la santé et des droits des femmes) : deux demi-doses de vaccin (soit 0,25 mL) pour les enfants de 6 à 35 mois en un mois d'intervalle en primo-vaccination, et une demi-dose en rappel annuel du vaccin. Pour les enfants de 3 à 8 ans, deux doses de 0,5 mL en un mois d'intervalle pour une primovaccination et une dose en rappel annuel. Enfin pour tous les autres sujets à partir de 9 ans : une dose de 0,5 mL.

Les vaccins vivants atténués sont constitués de virus affaiblis administrés par voie nasale. Ces vaccins ont été approuvés pour la vaccination des sujets âgés de 2 à 49 ans. En revanche ils sont déconseillés pour les enfants de moins de 2 ans et les sujets de plus de 49 ans, les femmes enceintes, les sujets immunodéprimés, les enfants de 2 à 4 ans asthmatiques.⁸²

Les deux types de vaccins semblent équivalents en termes d'efficacité de protection chez l'enfant et l'adulte. Pour les sujets âgés de 2 à 49 ans n'ayant pas de contre-indications particulières, les vaccins inactivés ou vivant atténués sont appropriés sans qu'il y ait de préférence pour une des deux formulations. Chez l'adulte, des études comparatives ont montré une efficacité similaire

voire une meilleure efficacité des vaccins inactivés.⁸³ Plusieurs études conduites avant 2009 ont démontré une efficacité supérieure des vaccins atténués chez l'enfant, d'où l'approbation de son utilisation chez les enfants âgés de 2 à 8 ans ne montrant pas de contre-indications.^{84 85} Lors de la saison 2014/2015 au cours de laquelle la souche A(H3N2) ayant dérivé était prédominante, ni les vaccins vivants atténués ni les inactivés n'ont conféré une immunité protectrice suffisante chez les enfants et adultes.⁸²

Les effets indésirables de ces vaccins sont souvent bénins : réaction locale au site d'injection (rougeur, douleur, et gonflement), fièvre, céphalées, malaises et myalgies. Ils surviennent généralement entre 6 et 12 h après l'injection et peuvent persister pendant 1 à 2 jours. Les réactions allergiques majeures sont assez rares et peuvent se manifester par une crise d'asthme, un œdème, des palpitations, de l'urticaire dans les minutes ou les heures suivant l'injection. Ces réactions résultent souvent d'une hypersensibilité due au résidu de protéines d'œufs de poules. En effet les vaccins peuvent en contenir des petites quantités car la culture des virus sur œufs embryonnés est souvent utilisée pour la production des vaccins.

Certaines études mettent en cause les vaccins antigrippaux dans le développement d'un syndrome de Guillain-Barré post-injection, notamment les vaccins pandémiques.⁸⁶ Ce syndrome se traduit par une faiblesse, voire une paralysie progressive partant des membres inférieurs puis pouvant remonter jusqu'au muscles respiratoires et aux voies nerveuses centrales. La plupart des personnes atteintes du syndrome récupèrent leurs capacités physiques au bout de 6 à 12 mois, mais certaines peuvent garder des séquelles neurologiques. Si on ignore l'origine précise et les mécanismes de déclenchement du syndrome, dans la grande majorité des cas les patients avaient souffert d'une infection virale ou bactérienne dans les jours ou les semaines précédant l'apparition des premiers symptômes. L'incidence annuelle du syndrome est de 10 à 20 cas sur un millions d'adultes, ce qui est bien inférieur au risque de complication sévère induite par l'infection grippale, risque qui peut être évité grâce au vaccin.

Voies d'immunisation

Les vaccins actuels sont administrés par cinq voies principales : la plupart par voie intramusculaire, en sous-cutanée (vaccin contre la rougeole, les oreillons et la rubéole), en intradermique

(rage) en intranasale (pour les vaccins vivants atténués contre la grippe) et par voie orale (poliomyélite, choléra, rotavirus...)

Les voies d'immunisation les plus classiques restent l'intramusculaire et la sous-cutanée car elles sont bien tolérées, faciles à administrer, n'induisent pas de réaction inflammatoire et permettent l'induction d'une réponse immunitaire efficace pour une grande majorité de vaccins.

Parmi les voies d'immunisation moins répandues, on retrouve la voie intradermique que nous employons lors de l'étude et qui consiste à introduire l'antigène au niveau du derme. Cette voie permet de cibler un grand nombre de cellules présentatrices d'antigènes, principalement situées au niveau du derme mais aussi les cellules de Langerhans au niveau de l'épiderme. Cette voie permet d'obtenir la même réponse que celle obtenue avec une administration du vaccin de façon sous-cutanée ou intramusculaire tout en nécessitant une dose d'antigène inférieure. Elle permet ainsi d'induire des réponses immunes chez certains individus non répondeurs avec un mode d'immunisation plus classique.⁸⁷ Néanmoins cette voie présente l'inconvénient d'être plus douloureuse nécessitant un geste de vaccination plus technique et donc un personnel formé (l'immunisation consiste à insérer une aiguille biseautée dans la couche superficielle et à conserver l'aiguille de façon parallèle à la surface). Elle peut également entraîner une réaction inflammatoire locale au site d'injection contrairement aux voies plus classiques.⁸⁷

La voie d'administration par les muqueuses est également à l'étude pour de nouveaux vaccins. Elle consiste à induire une réponse immune au niveau de la voie d'entrée du pathogène, et ainsi de développer une réponse mémoire protectrice empêchant toute nouvelle contamination. Ce mode d'immunisation peut solliciter une réponse au niveau des voies respiratoires (comme c'est le cas pour le vaccin vivant atténué contre la grippe, administré en intranasal), mais aussi de la muqueuse génitale dans le cadre de vaccin contre le VIH ou d'autres maladies sexuellement transmissibles.^{88 89} Cette voie d'administration permet l'induction d'une importante réponse humorale, générant des immunoglobulines G et A (IgG et IgA) au niveau local et systémique.⁸⁹

Couverture vaccinale

À l'échelle internationale on observe une baisse de la couverture vaccinale des populations malgré une mobilisation importante des institutions de santé. En France, le pourcentage de personnes

à risque non vaccinées s'élevait à 53% pour la saison épidémique 2014/2015. Cette baisse de la couverture est préoccupante, car, même si les composants antigéniques vaccinaux ne correspondent pas exactement aux souches circulantes, la majorité des virus sont couverts par le vaccin.

Synthèse Expérimentale

I. Introduction

1. Vaccination : les voies de recherche

Les limites des vaccins trivalents actuels et l'émergence d'un virus pandémique incitent les chercheurs à développer de nouvelles stratégies vaccinales. Les études récentes travaillant sur un candidat induisant des anticorps à réactivité croisée s'intéressent principalement à la partie extracellulaire de la protéine M2.^{90 91} Les chercheurs se focalisent également sur la protéine HA,⁹² de récentes études ayant mis en évidence que, malgré sa variabilité importante, la protéine présentait des régions conservées.^{93 94 95}

Les vaccins actuels sollicitent essentiellement la réponse humorale qui ciblent les épitopes des protéines externes HA et NA qui varient significativement entre les souches, ne conférant pas de protection croisée. Le ciblage de structures conservées, essentiellement présentes dans les protéines internes du virus, permettrait une efficacité croisée de la vaccination. Ces protéines n'étant pas exposées à la surface des virus, elles sont en partie inaccessibles aux anticorps et imposent le développement de stratégies sollicitant la réponse cellulaire cytotoxique (Figure 7).

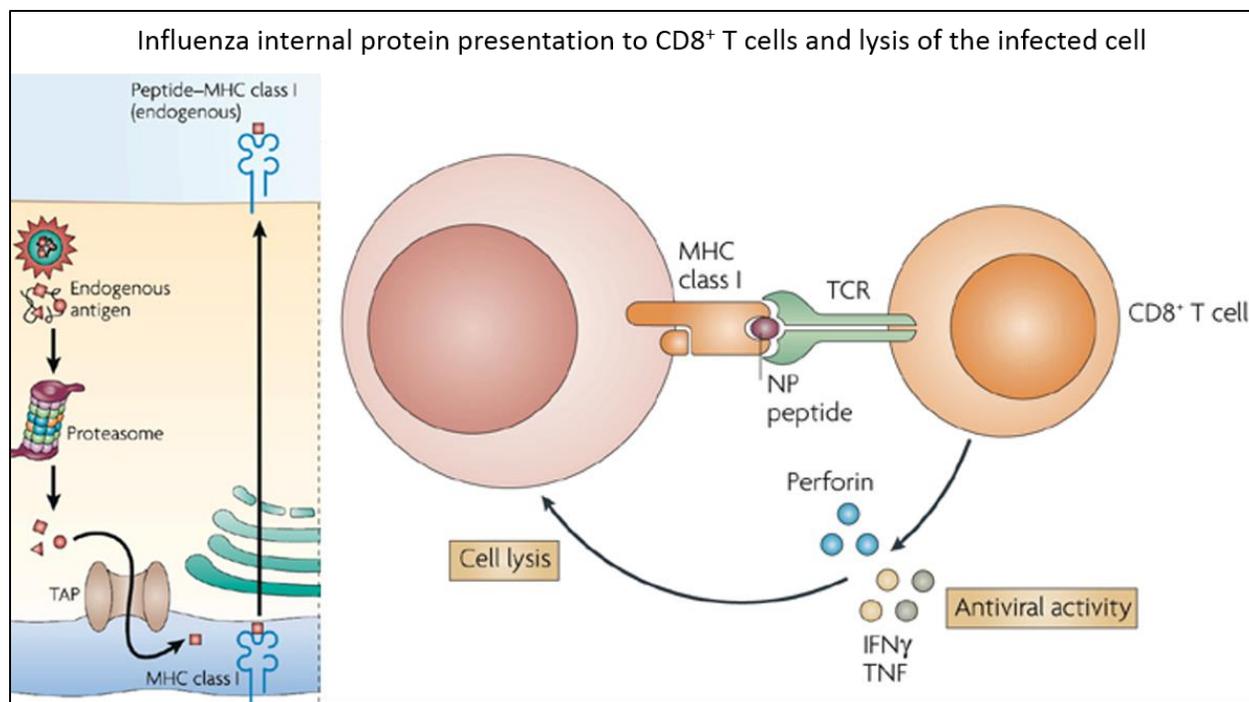


Figure 7. Schéma de la présentation de protéines internes du virus influenza par une cellule infectée aux lymphocytes T CD8⁺ (adapté d'après ⁵⁹ et ⁹⁶). La protéine interne NP produite de façon intracellulaire est captée et dégradée par le protéasome et les peptides antigéniques sont ensuite présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH-I) au récepteur des lymphocytes (*T-Cell receptor*, TCR). Le récepteur TCR est capable de reconnaître le complexe peptides_CMH-I, ce qui entraîne l'activation des cellules T CD8 qui vont lyser la cellule infectée par sécrétion de molécules antivirales telle que des perforines, du TNF- α , et de l'IFN- γ .

En alternative à une réponse humorale, il est donc apparu que le développement d'une immunité cellulaire permettait de limiter la progression et la sévérité de l'infection, notamment lorsque cette réponse cellulaire cible les protéines internes et conservées.⁹⁷ Ainsi nombre d'études cherchent à induire une réponse cellulaire à large spectre en se concentrant sur les protéines internes du virus telles que les nucléoprotéines (NP) et la protéine de matrice M1.^{98 99 100} Cette immunité cellulaire spécifique du virus influenza a déjà été mise en évidence chez l'homme lors d'une infection, cependant les mécanismes de protection reliés restent flous.¹⁰¹ Cependant, la pandémie de 2009 a donné l'opportunité aux chercheurs d'étudier le rôle de la réponse cellulaire (CD8⁺ en particulier). Il a été démontré que les individus développant des formes moyennes voire asymptomatiques de la maladie, possédaient des taux préexistants plus élevés de cellules T mémoires CD8⁺ spécifiques du virus influenza et notamment aux épitopes conservés.¹⁰² Une étude chez le macaque confirme qu'une réponse cellulaire T préexistante, à réactivité croisée est

capable d'induire une clairance rapide d'une nouvelle souche virale.¹⁰³ Ainsi un vaccin capable de générer une telle réponse cellulaire pourrait protéger les Hommes contre un virus pandémique émergent responsable d'infections sévères. Une étude antérieure sur souris avait obtenu des résultats similaires avec des modèles d'infection H3N2 et H5N1. Cette étude prouve que, lors de l'infection virale (avec le virus influenza A (H5N1) après une pré-infection avec le virus A (H3N2)), lorsque la réponse humorale est manquante, la présence d'une réponse CD8⁺ spécifique du virus est corrélée à l'augmentation de la clairance virale et à une baisse des symptômes.¹⁰⁴ Les résultats de ces études indiquent clairement que les nouvelles stratégies vaccinales devraient se concentrer sur la réponse cellulaire T pour combattre la contamination et l'infection grippale.

2. *Modèle d'infection expérimental*

Le développement de formule vaccinale nécessite un modèle d'infection expérimental animal. L'infection virale étudiée chez l'humain induit une importante sécrétion de cytokines pro-inflammatoire au niveau systémique et local puis une augmentation de la réponse lymphocytaire B et T 14 jours suivant l'infection par le virus. Pour élaborer des vaccins répondant aux besoins humains, il est indispensable de développer des modèles animaux adéquats, capables de reproduire au plus proche la physiopathologie de l'infection et les réactions du système immunitaire de l'humain. Les modèles animaux d'étude les plus communs sont la souris, le furet et le primate non humain, en particulier le macaque cynomolgus (*Macaca fascicularis*).^{106 107}

Le modèle animal de prédilection est le primate non-humain du fait de sa situation phylogénétiquement proche de l'Homme, il est sensible aux pathogènes humains et reproduit l'infection et la maladie. En effet il est génétiquement, physiologiquement, neurologiquement et comportementalement plus proche de l'humain que les modèles rongeurs du fait de leur ancêtre commun plus récent, ce qui promet de meilleurs résultats pour les études précliniques. Le macaque cynomolgus est l'un des plus utilisés en recherche et notamment pour le développement de médicaments en raison de sa petite taille comparée à d'autres primates de laboratoire. Des macaques de cette espèce ont été introduits dans l'environnement de l'île Maurice. Ces macaques cynomolgus issus de l'île présentent l'avantage d'un polymorphisme très réduit, ils ont maintenu un niveau d'hétérogénéité très bas par rapport aux autres animaux de la même espèce résidant en Asie du Sud-Est ou d'autres régions.¹⁰⁸ Un nombre considérable d'études sur les macaques

prouvent que la physiopathologie et la symptomatologie des infections sont proches de celles observées chez l'homme.^{109 110} De plus, les outils et techniques pour étudier la réponse immunitaire sont adaptés au modèle de primate non-humain, ce qui n'est pas le cas de certains autres modèles. Dans le cas de notre étude, par exemple, les anticorps monoclonaux développés chez l'homme et utilisés dans les panels de cytométrie en flux comme outil de caractérisation reconnaissent également les molécules correspondantes chez le macaque. Ces différents modèles d'étude voient le développement de nombreuses stratégies vaccinales antigrippales émergentes : des vaccins ADN aux vaccins MVA.^{111 112}

3. *Stratégie vaccinale envisagée*

La peau, de par sa richesse en cellules immunitaires constitue une voie d'immunisation privilégiée des vaccins. Cet organe contient des DC en grand nombre. Ces cellules présentent un grand intérêt de par leur rôle. En effet, la réponse cellulaire induite par l'infection est en partie médiée par les DC, des cellules présentatrices d'antigènes faisant le lien entre la réponse innée et adaptative par phagocytose et présentation des peptides antigéniques aux lymphocytes par le complexe majeur d'histocompatibilité I et II (Figure annexe 2). Ces DC sont présentes en particulier au niveau du derme, elles sont caractérisées par les marqueurs CD33, CD11c et CMH-I et sont capables d'induire l'activation et la prolifération des LT.¹⁰⁵ C'est pourquoi la voie intradermique a été privilégiée dans le cas de notre étude.

L'élaboration de notre stratégie s'appuie sur des données préalables de nos collaborateurs du BIIR, qui montrent, dans le cadre d'expériences *in vitro*, que le ciblage des antigènes vaccinaux sur des récepteurs exprimés par les DC, augmente la stimulation des cellules CD8⁺ cytotoxiques spécifiques^{113 114}. Ceci est illustré, par exemple, par la Figure 8 qui montre qu'un antigène grippal couplé à un anticorps ciblant le récepteur CD40 sur les DC induit une importante prolifération des lymphocytes T CD8⁺ (LT CD8⁺), par rapport à un anticorps non ciblé.

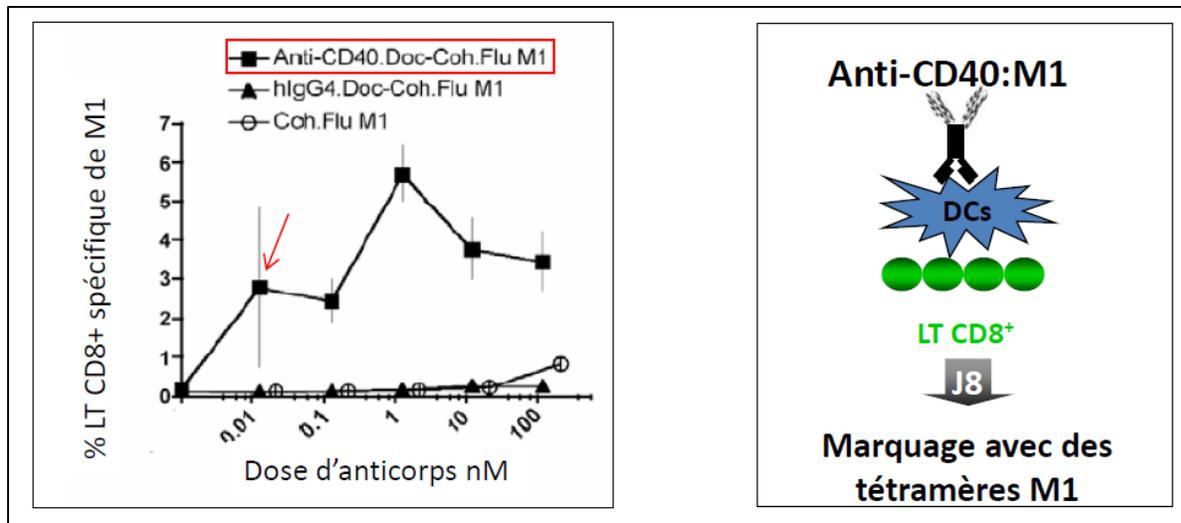


Figure 8. Résultats d'une étude menée par le BIIR. Au cours de cette étude ont été testés des anticorps ciblant le récepteur CD40 des DC et fusionnés à l'antigène grippal M1 (protéine de matrice M1, interne). Les anticorps ont été mis en culture avec des DC et ces cellules en co-culture avec des lymphocytes T CD8. Le taux de LT CD8⁺ activés a ensuite été mesuré grâce à un marquage spécifique par des tétramères M1.

L'intérêt de ce ciblage est justifié par les propriétés originales de cette population. Ces cellules sont intéressantes de par leur localisation en partie tissulaire et leur capacité à migrer vers les sites lymphoïdes primaires et secondaires.⁹⁶ Elles représentent donc un intérêt en tant que cible de vaccination pour induire une immunité spécifique contre un antigène soluble au niveau systémique ou local. Le ciblage vise différents récepteurs à la surface des DC tels que le récepteur CD40 (un récepteur de co-stimulation des DC) ou Dectin-1 (un récepteur TNF) et a déjà prouvé son efficacité dans différentes études.^{115 114} Un vaccin ciblant les DC via ces récepteurs précis permettrait d'induire une réponse cellulaire spécifique des antigènes. Cet objectif pourrait être atteint en couplant des antigènes vaccinaux à des anticorps spécifiques des récepteurs spécifiques CD40 ou Dectine-1 présents sur les DC afin d'induire l'activation et d'orienter la réponse des LT CD8⁺. De telles protéines de fusion ont été sélectionnées par l'équipe de G. Zurawski de l'Institut Baylor, et elles nécessitent d'être testées *in vivo* dans un modèle d'infection expérimental par les virus de la grippe afin d'évaluer leur potentiel. De plus, les anticorps anti-CD40 et anti-Dectine-1 développés contre les déterminants humains, reconnaissent ces récepteurs à la surface des DC de l'épiderme et du derme du macaque (site d'injection des prototypes vaccinaux), ce qui permet de tester directement la stratégie envisagée chez l'homme.¹¹⁶

Ainsi, notre équipe, forte de son expertise dans le domaine du modèle primate, a développé un modèle d'infection grippale expérimental chez le macaque cynomolgus au cours des années précédentes. La réponse cellulaire et la charge virale ont été évaluées chez des macaques auxquels on a tout d'abord injecté une dose de vaccin commercial trivalent, puis que l'on a infectés avec un virus grippal. Il a été confirmé que le vaccin trivalent commercial était efficace pour réduire la charge virale chez le macaque après exposition au virus pathogène (Figure 9).

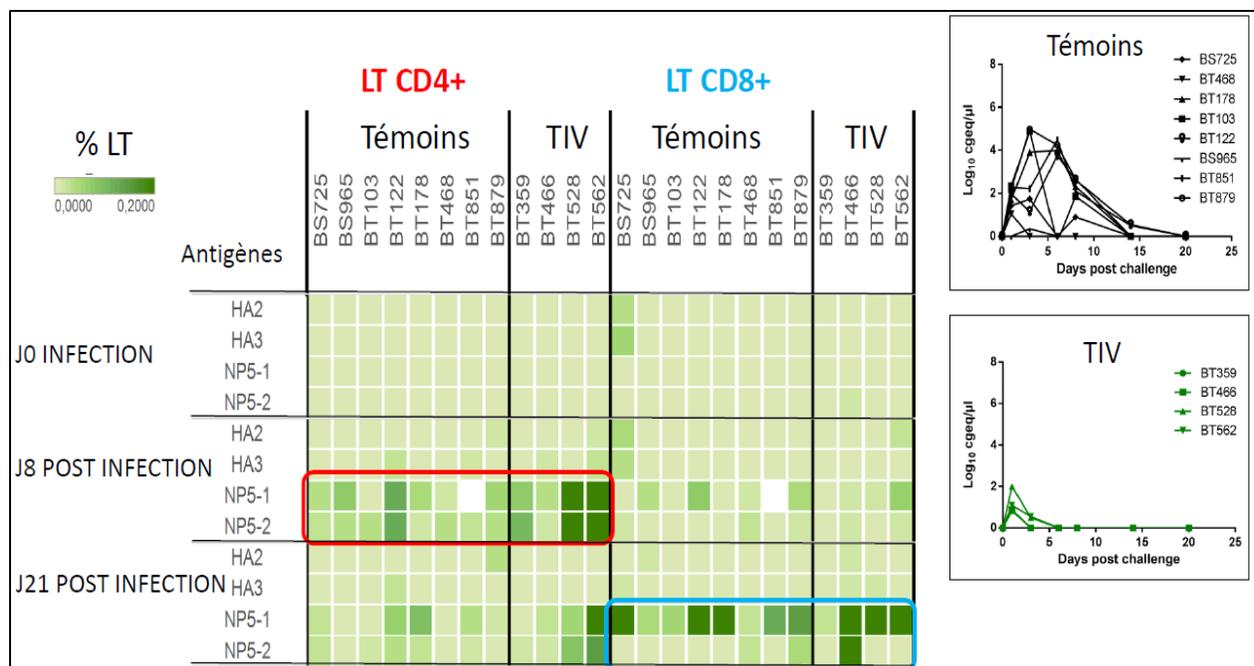


Figure 9. Résultats de l'étude expérimentale sur macaques menée par le laboratoire. Le tableau à gauche représente les résultats de cytométrie en flux mesurant le taux de lymphocytes T CD4 et CD8 activés après la vaccination des animaux, avant infection (J-0 infection) et 8 et 21 jours après infection (J-8, J-21). Le taux de lymphocytes est exprimé en pourcentage sur une échelle de 0 à 0.2% des LT d'un échantillon et est proportionnel à l'intensité de la teinte verte. En colonne sont indiqués les différents macaques séparés en deux groupes selon l'injection reçue (« témoins » : macaques non vaccinés et TIV : pour vaccin inactivé trivalent, soit les macaques ayant reçu le vaccin commercial). En ligne sont représentées les différentes stimulations peptidiques effectuées à chaque date de prélèvement (stimulation avec deux pools de peptides HA : HA2, HA3, et deux pools de peptides NP5 : NP5-1, NP5-2). On remarque que la réponse cellulaire CD4⁺ et CD8⁺ ne se déclare qu'après l'épreuve d'infection et non suivant le vaccin. Sur les diagrammes à droite figurent les charges virales représentées en log 10 par jours après épreuve infectieuse chez des macaques témoins non vaccinés (en haut) et chez des macaques vaccinés par le vaccin commercial trivalent. On note une importante diminution de la charge virale suite à la vaccination.

La réponse cellulaire CD4 ou CD8 n'a pu être observée uniquement après infection des animaux. Le modèle a également permis d'évaluer les réponses cellulaires induites par différentes protéines de fusion de l'équipe du BIIR, toujours sur des animaux sains. Tout d'abord, il a été observé que seule l'immunisation avec la protéine de fusion anti-dectin1-NP complétementée par un adjuvant montrait une stimulation de la réponse CD4 après immunisation des animaux. Aucune réponse des LT CD8 n'a été détectée. Après l'épreuve virale avec le virus pandémique A/Cal/07/09 (H1N1), il a été observé une importante réponse cellulaire LT CD4⁺ et LT CD8⁺ chez tous les macaques infectés. Ces derniers résultats encouragent l'essai de protéines de fusion similaires

mais non adjuvantées élaborées par l'équipe de G.Zurawski. Cependant, au cours de cette étude, les animaux étaient initialement naïfs vis-à-vis du virus, ce qui n'est pas la situation la plus répandue chez l'homme adulte, qui est exposé au virus saisonnier et/ou au vaccin.

Ainsi, mon projet de master 2 a consisté d'un part à tester la réponse du vaccin commercial trivalent chez des animaux préalablement exposés au virus influenza A (H1N1) pour que le modèle expérimental soit plus représentatif de la situation chez l'homme, et d'autre part à évaluer la capacité du ciblage des DC à induire une réponse cellulaire spécifique des protéines internes. Pour ce faire, les 8 macaques cynomolgus ont été infectés par le virus influenza A (H1N1) il y a environ un an, afin que la situation soit plus proche de la réalité. Dans un premier temps ils ont été immunisés avec un tampon témoin (celui des protéines de fusion), puis, 5 semaines après, ils ont été séparés en deux groupes : l'un a reçu une dose unique du cocktail d'anticorps, l'autre une dose du vaccin commercial trivalent IMMUGRIP. Le cocktail d'anticorps contient des protéines internes du virus NP, M1 pour induire une réponse cellulaire CD8 cytotoxique indépendante du sous-type de virus, et les protéines M2 et HA pour l'induction d'une réponse humorale potentiellement à large spectre. Ces protéines sont fusionnées à des anticorps ciblant les récepteurs Dectine-1 et CD40.

L'évaluation de l'efficacité du vaccin candidat et du vaccin commercial consiste à étudier la réponse adaptative d'une part au niveau systémique, en caractérisant la réponse cellulaire lymphocytaire l'environnement cytokinique sérique et d'autre part au niveau local. En effet, la grippe étant une infection respiratoire, il est nécessaire de caractériser la réponse vaccinale au niveau du site d'infection également. Nous avons donc cherché à identifier et analyser les cellules spécifiques en récupérant les leucocytes du sang et de lavages broncho-alvéolaire.

Le but principal à long terme est de formuler un vaccin antigrippal pouvant induire une réponse immune à large spectre en particulier par l'induction d'une réponse lymphocytaire CD8 cytotoxique.

II. Matériels et méthodes

Pour cette étude, huit macaques ont été sélectionnés, ils sont tous issus de la précédente étude expérimentale sur la grippe s'étant déroulée au laboratoire, et ont donc tous été infectés par le virus A (H1N1) un an auparavant. Cette étude comprend donc la prise en charge et la surveillance des macaques, ainsi que l'organisation des prélèvements et leur traitement jusqu'au passage des échantillons au cytomètre ou dans le lecteur de plaque milliplex. La Figure 10 résume le principe d'évaluation de la réponse cellulaire par la cytométrie en flux dont la méthode est décrite précisément ci-après.

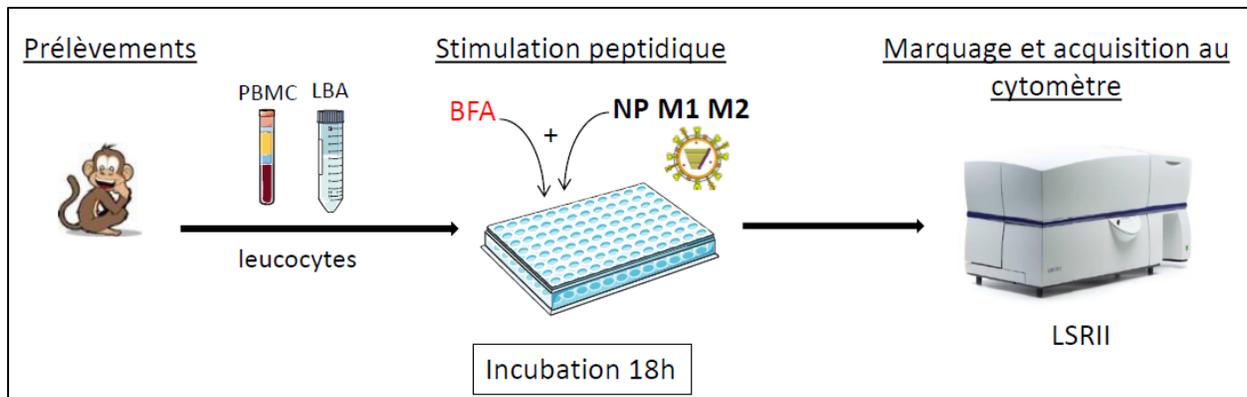


Figure 10. Schéma résumant la méthode d'évaluation de la réponse cellulaire avant et après la vaccination des animaux. Les animaux sont prélevés : environ 8mL de sang et 20mL de solution de lavage broncho-alvéolaire par animaux. Après la lyse des érythrocytes et les lavages, les leucocytes de chaque animal sont comptés et déposés dans une plaque 96 puits ou sont ajoutés les peptides grippaux (une condition peptidique par puits). Les cellules sont mises en incubation pendant 18h puis fixées et marquées avec les anticorps du panel puis les échantillons sont acquis au cytomètre.

1. Modèle animal utilisé

Huit macaques cynomolgus (*Macaca fascicularis*) adultes pesant entre 3 et 4.5 kg ont été importés de l'île Maurice et génotypés pour les allèles des CMH de classe 1 (1a et 1b) et de classe 2 : #BS725, #BS965, #BT103, #BT122, #BT468, #BT851 et #BT879.

Tous les animaux ont été infectés par le virus influenza pandémique A/California/07/2009 (H1N1) environ 8 à 9 mois avant le début de l'étude. Ils ont été hébergés dans une animalerie de niveau 1 (Animal Biosafety level 1 :ABS 1) pendant toute la durée de l'étude. Toutes les procédures de prélèvements et d'immunisation suivent les directives du Journal officiel de

l'Union européenne pour le bien-être animal (directive 2010/63/UE) et sont assurées par l'équipe d'animaliers du service d'Immunologie-Virologie de la DSV, qui s'occupe également de surveiller l'état général des macaques 5 jours par semaine (évaluation de tout comportement anormal, morbidité, souffrance ou maladie), et ceci sous la supervision du vétérinaire responsable.

2. Observations et prélèvements

Préalablement à chaque intervention (immunisations, prélèvements de sang ou lavages broncho-alvéolaire) les animaux sont anesthésiés par une injection intramusculaire d'hydrochloride de kétamine (Imalgen 10-20 mg/kg). Systématiquement les animaliers relèvent le poids et la température rectale des macaques et prélèvent selon le planning de l'étude (Tableau 1 en annexe) :

- 1 mL de sang en tube EDTA pour effectuer une numération de la formule sanguine (NFS) (automate HMX *Hematology analyzer*, Beckman Coulter) à jour 0, 1, 3, 7, 14 et 28 après immunisation
- 2.5 mL de sang en tube sec pour doser la *C-reactive protein* (CRP) et le taux de cytokines dans le sérum à jour 0, 1, 3, 7, 14 et 28 après immunisation.
- 8 mL de sang en tube CPT (CPT: *Cell Preparation Tube*) pour isoler les cellules périphériques mononucléaire du sang (PBMC) et évaluer la réponse cellulaire par cytométrie en flux (voir la partie ICS) à jour 0, 7, 14 et 28 après immunisation.
- 2 mL de sang en Lithium héparine pour l'analyse de la réponse immunitaire innée par cytométrie de masse à jour 0 et 1 après immunisation.
- 25 mL de lavage broncho-alvéolaire (LBA) pour évaluer la réponse cellulaire (voir la partie ICS).

Pour la collecte des lavages broncho-alvéolaires les macaques sont positionnés en décubitus sur le côté gauche. La visualisation du pharynx et de l'épiglotte s'effectue à l'aide d'un laryngoscope afin d'administrer un spray de lidocaïne 5 % au niveau du larynx. Deux minutes plus tard l'animal est intubé avec un tube endotrachéal (de taille 3 mm et de diamètre 16 cm COVETO) par lequel est injecté au minimum 20 mL de NaCl 0.9 % à l'aide d'une seringue. Rapidement après l'injection une première partie du lavage est collecté dans un tube Falcon 50 mL après compression du diaphragme de l'animal. Puis la deuxième partie du lavage est récoltée à l'aide d'une seringue de 60 mL.

3. *Traitement des prélèvements*

Le sérum est obtenu à partir du sang récolté en tube sec. Après 2 heures à température ambiante puis centrifugation à 400 g pendant 15 minutes, les sérums sont ensuite aliquotés et congelés à -80 °C.

Les CPT sont centrifugés à 765 g pendant 30 minutes. Les leucocytes sont collectés au-dessus du gel des tubes CPT et transférés dans des tubes Falcon 50 mL (un pour chaque macaque) qui sont ensuite complétés à 50 mL avec du milieu RPMI 1640 GlutaMAX (Gibco® , Invitrogen) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Lonza) et 100 U/mL de Penicilline-Streptomycine (PenStrepNeo Gibco® , Invitrogen) appelé milieu de culture. Les tubes Falcon sont centrifugés à 561 g pendant 5 minutes, le surnageant est retiré par renversement et le culot de cellules resuspendu dans 1 mL de milieu de culture. Les leucocytes sont ensuite automatiquement comptés sur un échantillon d'1 mL à l'aide du Vi-Cell® (Vi-CELL *Series Cell Viability Analyzers* Beckman Coulter) pour la mise en culture dans des plaques 96 puits (96 *well plate U-bottomed*, BD Falcon). Le surplus de cellules est congelé en SVF-DMSO 10 % et conservé à -135 °C

Après leur prélèvement, les LBA sont centrifugés à 4°C à 400 g pdt 30 min, les surnageants sont aliquotés et stocké à -80°C, les cellules sont resuspendues dans 1 mL de milieu de culture et sont automatiquement comptées au Vi-Cell®. Les cellules sont ensuite utilisées pour l'évaluation de la réponse cellulaire (voir ICS).

4. *Vaccins et tampons*

Le vaccin est composé de trois anticorps chimériques ciblant les récepteurs Dectin-1 et CD40 fusionnés à des antigènes grippaux, conçus et produits par l'équipe de G. Zurawski (*Baylor Institute for Immunology Research*, Dallas, Texas). : Un anticorps anti-Dectin-1 fusionné à la protéine NP provenant d'un virus influenza A (H5N1), un anti-CD40 fusionné aux protéines HA et M2 issues d'une souche influenza A (H1N1), un anti-Dectin fusionné à la protéine M1 issue du virus influenza A/California/04/2009 (H1N1) (Figure 11).

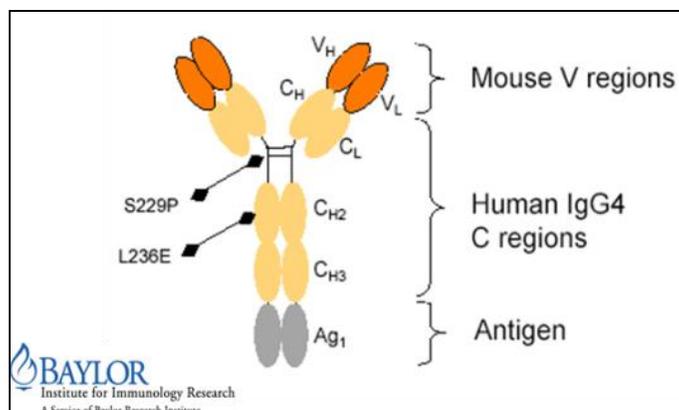


Figure 11. Schéma représentatif des protéines de fusion composant le vaccin candidat, produit par l'Institut du Baylor à Dallas. Il s'agit d'une immunoglobuline de type 4 (IgG4) dont la région « C_{H3} » : 3^{ème} domaine constant de la chaîne lourde, est fusionné à un antigène d'intérêt. Les domaines variables des chaînes lourdes (V_H) et des chaînes légères (V_L), qui constituent le paratope, ciblent des récepteurs spécifiques (dans notre cas des récepteurs de DC). (Source : Baylor Institut for Immunology Research).

L'origine précise des souches virales dont sont issues les protéines est inconnue car non divulguée par le BIIR en raison d'un futur dépôt de brevet concernant les anticorps chimériques.

Le vaccin IMMUGRIP™ 2014/2015 (Sanofi Pasteur, vaccin commercial) est injecté à 4 macaques en comparaison au cocktail d'anticorps. Il s'agit d'un vaccin inactivé composé de trois souches de virus influenza :

- souche influenza A (H1N1)/California/7/2009 (15 µg d'hémagglutinine)
- souche A (H3N2)/Victoria/361/2011 (15 µg d'hémagglutinine)
- souche B/Massachusetts/2/2012 (15 µg d'hémagglutinine).

Le tampon contrôle est composé en quantité égale de PBS Calcium Magnésium (Sigma) et de tampon d'Arginine (1M Arginine + 100mM Tris pH6-8, BIIR). Il correspond au tampon du candidat vaccin.

5. Immunisation et évaluation de la tolérance

Pour l'immunisation par le cocktail d'anticorps la voie d'administration est intra-dermale dans le dos (zone préalablement rasée) en cinq injections de 150 µL. Concernant IMMUGRIP l'immunisation se fait en une seule injection (dose commerciale) intramusculaire au niveau de la cuisse. La réaction inflammatoire locale potentiellement induite par les différentes injections (tampon et vaccins) est évaluée au jour de l'immunisation et le lendemain par l'échelle de Draize adressant un score de 0 à 4 proportionnel au niveau d'irritation dermique (Tableau 2).

Score	Niveau	Œdème	Erythème
0	Nul	Pas de gonflement	Couleur normale
1	Minime	Léger gonflement, bords irréguliers	Légèrement rosé, bords réguliers
2	Moyen	Gonflement à bords distincts	Rouge pale, bords réguliers
3	Modéré	Gonflement à bords surélevés (<1mm)	Rouge clair, bords réguliers
4	Sévère	Important gonflement à bords surélevés (>1mm)	Rouge foncé, bords réguliers

Tableau 2. Echelle de Draize permettant l'évaluation de l'irritation dermique par visualisation de la peau à l'œil nu. Un score de zéro à quatre est attribué à chaque stade d'irritation selon la taille et le gonflement de l'œdème, ainsi que la couleur et les bords de l'érythème cutané traduisant une inflammation cutanée nulle à sévère.

6. Protéine de la phase aigüe et production de cytokines dans le sérum

Le dosage de la CRP est effectué sur sérums congelés par le laboratoire VeBio (Arceuil).

Le taux de cytokine dans le sérum est évalué par technologie Luminex sur des plaques Milliplex map Non-human Primante (PCYTMG-40K-PX23, Millipore) permettant la détection de 23 cytokines : des facteurs de croissance de la lignée leucocytaire (granulocytes colony stimulating factor (G-CSF), et granulocytes macrophages colony stimulating factor (GM-CSF)), l'interféron gamma (IFN- γ), des interleukines (Interleukine-1RA (IL1-RA), interleukine 1 β (IL-1 β), interleukine 2 (IL-2), interleukine 4 (IL-4), interleukine 5 (IL-5), interleukine 6 (IL-6), interleukine 8 (IL-8), interleukine 10 (IL-10), interleukine 12/23 (IL-12/23), interleukine 13 (IL-13), interleukine 15 (IL-15), interleukine 17 (IL-17), interleukine 18 (IL-18)), des chimiokines (monocytes chemoattractant protein 1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein α (MIP-1 α), et macrophage inflammatory protein β (MIP-1 β)), et le ligand du CD40 (sCD40L). Le protocole appliqué est celui fourni par le vendeur : les sérums sont disposés dans la plaque contenant les anticorps fixés aux billes magnétiques, celle-ci est incubée et les résultats sont lus à l'aide du système Bio-plex (lecteur de plaque multiplex, Bio-Rad200).

7. Protocole « ICS »

Le protocole d'ICS (Intra-cellular Staining) permet la mesure des cytokines intracellulaires sur les PBMC du sang et des cellules de LBA. Il s'agit d'une manipulation de trois jours : à jour 0 les macaques sont immunisés, à jour 1 les prélèvements sont récoltés et les cellules sont mises en culture, à jour 2 les cellules sont perméabilisées et congelées et à jour 3, elles sont marquées avec les anticorps du panel.

Jour 1 :

- La préparation des antigènes :

Nous disposons de deux pools de peptide M1 (M1-1 et M1-2 from BEI Resources NR-21541, Influenza Peptide array, Matrix 1 protein A/California/04/2009 (HINI)), deux pools de peptide NP5 (NP5-1 et NP5-2, provided by Dr. Oh's laboratory, BIIR, Dallas) et un pool de peptide M2 (provided by Dr. Oh's laboratory, BIIR, Dallas). Les peptides antigéniques sont utilisés à une concentration de 2 µg/mL dans un volume final de 200 µL. La concanavaleine A (Sigma) constitue le contrôle positif, elle est utilisée dans le protocole à une concentration de 5 µg/mL dans un volume final de 200 µL par puits.

- Préparation des cellules dans le milieu

Après le comptage les leucocytes sont resuspendus avec le volume de milieu nécessaire pour avoir 1.10^6 PBMC et 3.10^6 cellules de LBA par puits. La suspension cellulaire correspondant à chaque animal est distribuée dans les puits avant l'ajout des antigènes. Les différents animaux sont disposés en ligne dans l'ordre suivant : BS725, BS965, BT103, BT122, BT468, BT851 et BT879 à raison de 1.10^6 cellules par puits et les solutions de stimulation peptidiques sont ajoutées en ligne dans l'ordre suivant pour les PBMC (la première ligne de cellules étant non stimulée) : M1-1, M1-2, M2, NP5-1, NP5-2, ConA. Deux puits de contrôle sont ajoutés sur les cellules de BS725 : un puits de cellules non marquées et un puits de cellules marquées uniquement au BlueVID. En raison du faible nombre de leucocytes extraits par LBA (en moyenne $12,6.10^6$ cellules par LBA pour un besoin de 24.10^6 cellules pour remplir toutes les conditions), un ordre de priorité des stimulations peptidiques a été établi en fonction des résultats obtenus sur des études antérieures. Cet ordre de priorité est le suivant : NP5-1, M1-1, M1-2, NP5-2, M2. Toujours en raison du faible nombre de leucocytes issus des LBA, certaines conditions ne peuvent être effectuées. Immédiatement après l'adjonction des peptides, une solution de Brefeldine A (BFA,

Sigma), diluée au 10^{ème} est ajoutée dans le milieu de culture. La plaque est ensuite incubée 18 h à 37°C sous 5% CO₂.

Jour 2 :

La plaque est retirée de l'incubateur et les cellules sont resuspendues puis centrifugées à 561 g pendant 5 minutes à 4°C, puis lavées deux fois au tampon phosphate salin de Dulbecco 1X (DPBS) (Invitrogen).

- Marquage BlueVID :

Le BlueVID (Invitrogen) est un marqueur de viabilité cellulaire. Une solution de BlueVID est préparée au 1/1000^{ème} dans du PBS. Les cellules sont resuspendues dans 100 µL de solution BlueVID par puits à l'exception du puits de contrôle non marqué où sont ajoutés 100 µL de DPBS 1X. Pour le marquage de viabilité, les cellules sont maintenues 30 minutes à 4°C dans la solution de BlueVID. Puis, 100 µL de Staining Buffer (BD Pharmingen Stain Buffer 0.2 % BSA, 0.09 % Na Azide en DBPS) sont ajoutés à chaque puits et la plaque est mise à centrifuger à 561 g pendant 5 minutes à 4°C et les cellules sont lavées une fois avec 200 µL de Staining Buffer.

- Fixation et perméabilisation :

Les cellules sont perméabilisées et fixées par incubation 20 minutes à 4°C après ajout de 100 µL de solution Cytofix/Cytoperm (Cytofix/Cytoperm reagent kit, BD Pharmingen). Suite à la perméabilisation/fixation, les cellules sont lavées une fois avec une solution tampon de Perm/Wash diluée au 10^{ème} dans de l'eau milliQ (Perm/Wash buffer, BD Pharmingen). Après le lavage les cellules sont resuspendues dans 100 µL de solution Perm/Wash 1X diluée et sont transférées dans des tubes micronics et stockées à -80°C.

Jour 3 :

- Préparation des anticorps

Le mix d'anticorps nécessaire au marquage est préparé selon les valeurs du Tableau 3 pour un échantillon. Un volume de 50 µL du mix est distribué dans chaque puits d'une nouvelle plaque destinée aux échantillons de cellules congelées à l'exception du puits de contrôle non marqué et du puits de contrôle BlueVID.

Anticorps/ marqueur de viabilité	Fluorochromes	Clone	Fournisseur	Vol (ul) par échantillon	Fonction
BlueVid	Blue fluorescent dye	n.a.	Invitrogen™	0.1	marqueur viabilité
CD3	APC-Cy7	SP34-2	BD Pharmigen™	0.1	Phénotypage Lymphocytes T
CD4	V500	L200	BD Horizon™	0.2	Phénotypage Lymphocytes T CD4
CD8	PE-Cy7	RPA-T8	BD Pharmigen™	0.6	Phénotypage Lymphocytes T CD8
CD154	FITC	TRAP-1	BD Pharmigen™	5	Activation des lymphocytes CD8 spécifiques de l'antigène
CD137	APC	4B4-1	BD Pharmigen™	5	Activation des lymphocytes CD4 spécifiques de l'antigène
IFN- γ	V450	B27	BD Horizon™	3	Fonction-Réponse Th1
TNF- α	PE	MAB11	BD Pharmigen™	20	Fonction-Réponse Th1
IL-2	PerCP-Cy5.5	MQ1-17H12	BD Pharmigen™	5	Fonction-Réponse Th1

Tableau 3. Panel de cytométrie de l'étude. Anticorps et marqueurs de viabilité composant le panel de cytométrie utilisé pour la caractérisation de la réponse cellulaire T avec les clones des anticorps et les volumes utilisés par échantillon, les différents fluorochromes couplés, les fournisseurs et les références. Le panel permet la caractérisation de la réponse cellulaire lymphocytaire T spécifique de l'antigène, à partir de 8 anticorps couplés à des fluorochromes. CD154 et CD137 permettant la détection des populations de lymphocytes (CD4 et CD8 respectivement) activés et spécifiques de l'antigène d'intérêt.

Des contrôles de compensation sont ajoutés à la même plaque afin de pouvoir générer une matrice de compensation : pour cela 2 gouttes de billes positives et 2 gouttes de billes négatives sont mélangées dans 700 μ L de Perm/Wash 1X et la solution est répartie dans 8 puits pour les 8 fluorochromes du panel. 2 μ L de chaque anticorps conjugué sont ajoutés aux puits de billes.

Pour le titrage du marqueur CD137 ajouté au panel, 5 mix d'anticorps ont été réalisés afin de tester 5 concentrations différentes de l'anticorps et d'en déduire la concentration optimale. L'anticorps a donc été testé à 25 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL, 200 μ g/mL et 400 μ g/mL (équivalent à 1.25 μ L, 2.5 μ L, 5 μ L, 10 μ L et 20 μ L par échantillon). Les autres anticorps du panel ont tous été titrés à nouveau selon le schéma suivant : 4 dilutions en série de raison 3.

- Préparation des cellules et marquage

Les cellules sont décongelées à 37°C, puis transférées dans une nouvelle plaque 96 puits. Après une centrifugation à 561 g pendant 5 minutes, les cellules sont resuspendues dans 50 μ L de

Perm/Wash 1X et transférées dans la plaque où sont disposés les anticorps et les billes pour une incubation de 30 minutes à 4°C.

Après le marquage, les puits sont complétés à 200 µL avec du Perm/Wash 1X puis la plaque est centrifugée à 710 g pendant 5 minutes et les cellules sont lavées trois fois avec 200 µL de Perm/Wash 1X. A l'issue des trois lavages les cellules sont finalement resuspendues dans 200 µL de Staining Buffer et transportées au cytomètre LSRII pour l'acquisition. Diva est le logiciel d'acquisition des données sur le cytomètre LSRII (BD Bioscience).

III. Résultats

1. Mise au point du panel de cytométrie

Les événements tardifs de la réponse immune sont évalués par la technique de cytométrie en flux pour caractériser spécifiquement la réponse cellulaire des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques de l'antigène.

Pour cela, la première étape de mon projet a consisté à développer un panel adéquat.

a) Mise au point du panel de cytométrie en flux

La réponse cellulaire a été évaluée au niveau systémique et muqueux en mesurant par cytométrie en flux le taux de lymphocytes spécifiques de l'antigène et la production intracellulaire des cytokines : l'interféron- γ (IFN- γ), l'IL-2, et le *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α), par les cellules T issues du sang et des LBA, stimulées ex vivo pendant 18h par des peptides optimisés de la grippe : NP, M1, et M2. Ces mesures ont été effectuées avant et après la vaccination des animaux. Il est établi que la production de ces cytokines est corrélée avec la polyfonctionnalité des cellules T CD4 et CD8. En effet des cellules T effectrices sont polyfonctionnelles. Les échantillons de sang et de lavage broncho-alvéolaire traités et marqués sont acquis sur le LSRII, et les données sont analysées sur le logiciel Flow Jo qui permet d'isoler les lymphocytes et de déterminer leur état d'activation grâce aux différents marqueurs du panel.

Pour ce faire nous avons en premier lieu mis au point un panel pour optimiser la détection de ces cellules par cytométrie en flux, en nous focalisant sur l'expression de deux marqueurs :

- Le ligand du CD40 : le CD154 exprimé par les LT CD4⁺,
- Le récepteur au TNF : le CD137, exprimé par les LT CD8⁺ (et également par les LT CD4⁺).

Il est démontré que l'expression de ces marqueurs caractérise spécifiquement les cellules reconnaissant l'antigène. Cette approche augmente la sensibilité de détection et permet un suivi des cellules après une courte période de stimulation (18 h).

Pour l'évaluation de la réponse cellulaire des LT CD4 et CD8 spécifiques de l'antigène, le panel a été élaboré sur la base d'un panel utilisé en routine au laboratoire. Ce dernier est composé du marqueur CD3, comme marqueur de la lignée lymphocytaire T, du CD4 et CD8, comme marqueurs des LT CD4 et LT CD8, des cytokines IFN- γ , IL-2 et TNF- α , comme marqueurs

fonctionnels. De plus, le précédent panel comprenait déjà le marqueur CD154, autrement appelé CD40L, récepteur de co-stimulation présent à la surface des LT CD4 et décrit comme un marqueur d'activation des LT CD4 activés spécifiques de l'antigène¹¹⁷ et étudié pour ces propriétés en recherche thérapeutique.¹¹⁸ Notre but a été d'ajouter un marqueur similaire pour la population de LT CD8 activés spécifiques de l'antigène. Il a été montré, chez l'homme, que le marqueur CD137, un récepteur de la famille des récepteurs TNF, est un marqueur d'activation des LT CD8 spécifiques de l'antigène.³⁶

Dans un premier temps, le marqueur CD137 conjugué au fluorochrome APC, (CD137-APC, BD Bioscience) a été intégré au panel de cytométrie existant : l'IL-2-APC initialement utilisé a donc été remplacé par l'IL-2-PerCP5.5, entraînant le changement du CD4-PerCP5.5 en CD4-V500. Le reste des anticorps conjugués est resté identique entre deux panels. Le CD137 a été testé pour sa réactivité croisée homme-macaque et titré sur PBMC de macaques sains non stimulés et stimulés avec un contrôle positif (Concanavaleine A).

La stratégie d'analyse des PBMC est la suivante : tout d'abord, les doublets sont retirés selon la taille des cellules, puis les lymphocytes sont isolés grâce aux paramètres de taille (renseigné par le paramètre *Forward scattered* : FSC-A) et de granulosité (renseigné par le paramètre *Side scattered* : SSC-A), les lymphocytes étant une population de cellules de petite taille et de faible granulosité. Ensuite les cellules vivantes sont sélectionnées en se basant sur le marqueur de viabilité BlueVID, s'ensuit l'isolation des lymphocytes grâce au CD3. Sur cette population il est possible de séparer les LT CD4 des LT CD8 avec les marqueurs CD4 et CD8 et d'étudier leur activation spécifique de l'antigène avec le marqueur CD154 et le CD137 respectivement ainsi que leur sécrétion cytokinique (IL-2, TNF- α et IFN- γ) (Figure 12).

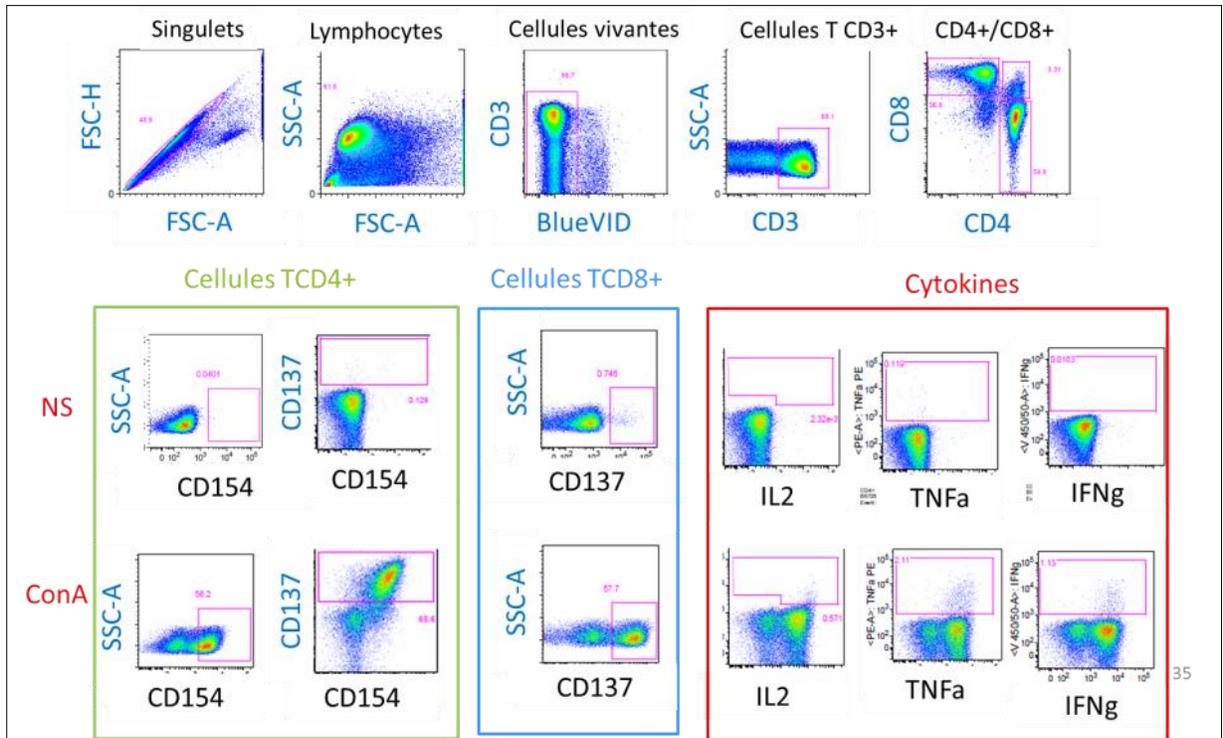


Figure 12. Stratégie de fenestration des populations sur PBMC de macaque effectuée avec le logiciel Flow Jo. Les lymphocytes sont sélectionnés selon leur taille et leur granulosité ainsi que leur viabilité cellulaire, puis séparés en deux populations selon leur phénotype CD4 ou CD8. Le niveau d'activation de ces lymphocytes est ensuite évalué par l'expression du CD154 ou du CD137 tout d'abord, puis des 3 cytokines du panel. Le CD137 est exprimé par les LT CD8 activés et également par les LT CD4 CD154.

Comme l'illustrent les diagrammes de la Figure 8, le marqueur CD137 humain fonctionne parfaitement sur PBMC de macaques, en effet il est exprimé par toutes les LT CD8⁺ activés (sécrétant les cytokines TNF- α , IFN- γ , et IL-2). Il a aussi été observé qu'une grande majorité des LT CD4⁺ CD154⁺ activés exprimait également le CD137. Le panel permet ainsi un double marquage spécifique des LT CD4⁺ activés. A l'issue du titrage du CD137, la concentration optimale a été fixée à 100 μ g/mL (équivalent à 5 μ L par échantillon). (Figure 13)

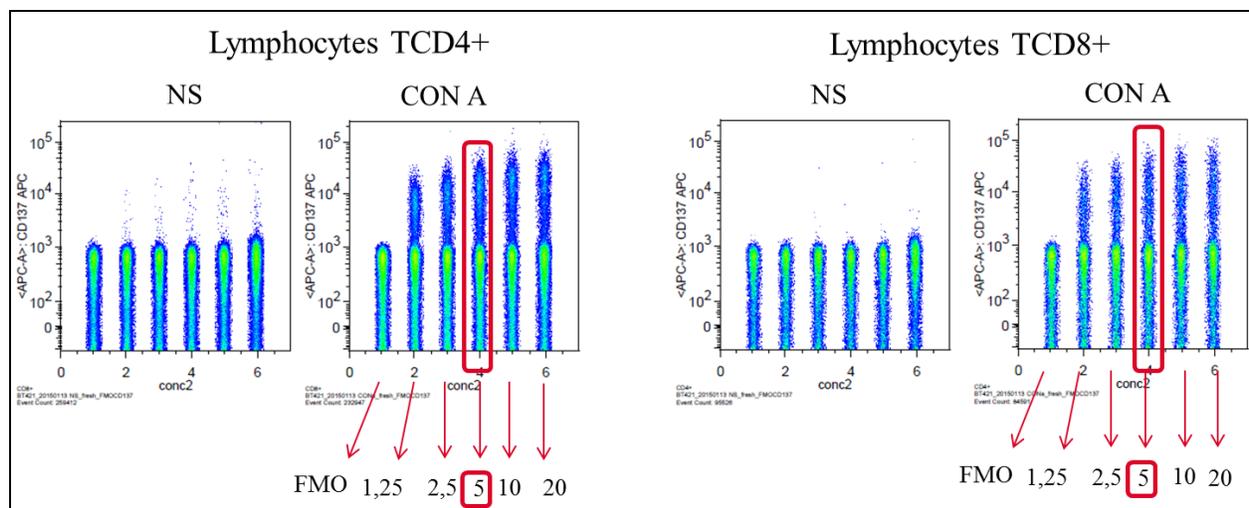


Figure 13. Titrage de l'anticorps CD137 couplé à l'APC. Représentation en concaténation de l'expression de l'anticorps sur les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, le CD137 ayant été ajouté à 5 quantités différentes par échantillon. Sur les diagrammes, l'expression du CD137 est en ordonnée et les différentes quantités de l'anticorps en abscisse : (de gauche à droite sur chaque diagramme) 0µL, 1.25 µL, 2.5 µL, 5 µL, 10 µL et 20 µL. « NS » signifie non stimulé et « ConA » est le contrôle positif de stimulation des lymphocytes. La quantité retenue pour l'anticorps est entourée en rouge, elle correspond à 5µL par échantillon, soit une concentration de 100 µg/mL.

Suite à l'inclusion du CD137-APC au panel, la question subsistante concernait le TNF- α disponible et efficace couplé avec Alexa700 et PE, tous deux utilisés dans des panels de routine du laboratoire. Un nouvel ICS comparatif des TNF- α -PE et TNF- α -A700 a été effectué pour finaliser et peaufiner notre panel. Les deux fluorochromes sont équivalents en terme d'intensité de marquage. Cependant les figures comparant le CD137-APC avec le TNF- α -A700 ont mis en évidence un phénomène de *spillover* (Schéma explicatif en annexe, Figure annexe 3) résiduel entre ces deux fluorochromes proches, ce qui rend la séparation des différentes populations CD137⁺ TNF- α ⁺ plus complexe malgré la compensation appliquée (Figure 14).

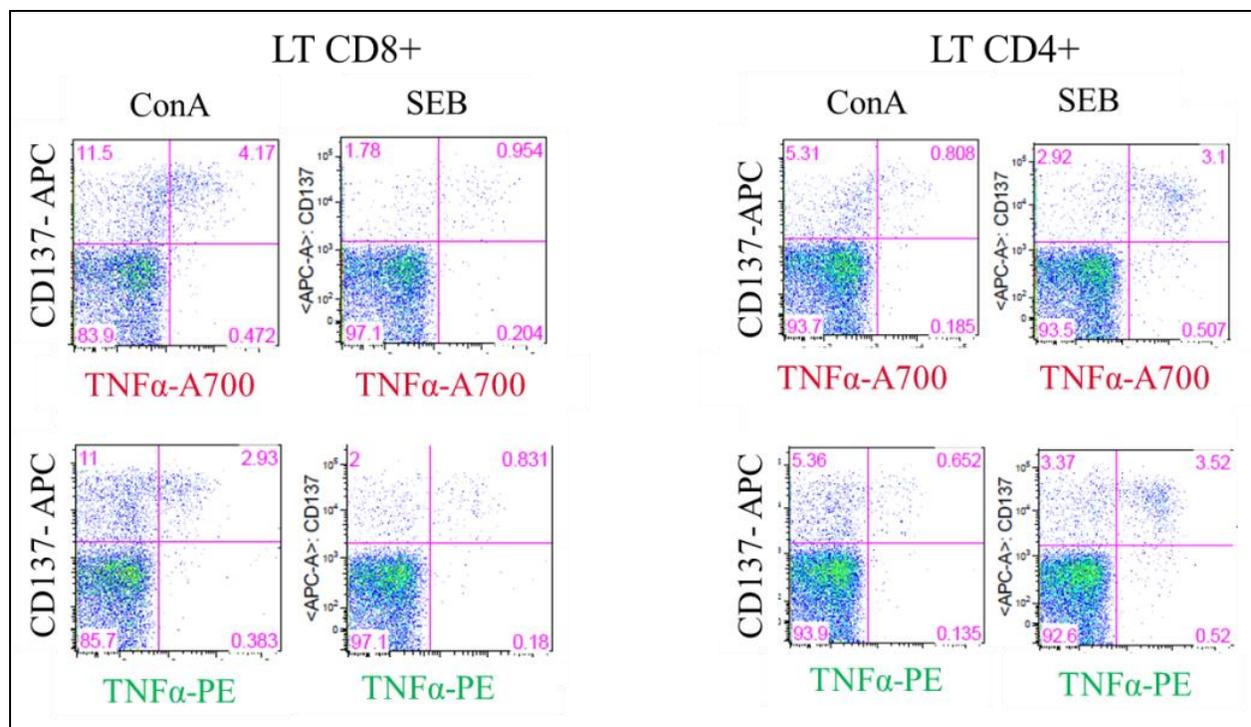


Figure 14. Diagrammes de cytométrie en flux obtenus avec FlowJo, représentant les résultats de la comparaison des fluorochromes Alexa 700 et PE couplés au TNF- α . On retrouve les lymphocytes T CD8 à gauche et les CD4 à droite sous deux stimulations fortes : la concanavoline A et la SEB (staphylococcus entérotoxine B) qui constituent des contrôles positifs. Lorsque le marqueur TNF- α -A700 est visualisé avec le marqueur CD137-APC, La population positive co-exprimant les marqueurs CD137 et TNF- α est plus difficile à discerner avec le marqueur TNF- α -A700 qu'avec TNF- α -PE, et notamment sur les lymphocytes stimulés avec la concanavoline A qui est le contrôle positif utilisé pour notre étude.

Ce problème n'est pas observé avec le TNF- α -PE lorsque celui-ci est comparé au marqueur CD137-APC. Néanmoins, on pourrait penser que les fluorescences émises par les deux fluorochromes PE du TNF- α et FITC du CD154 poseraient également ce problème, ce qui n'a pas été observé. Le TNF- α -PE a donc été gardé dans notre panel final (Tableau 3).

La deuxième étape a été de tester ce panel sur cellules de LBA, ce qui n'avait encore jamais été testé dans le laboratoire. L'analyse sur Flow Jo appliquée aux cellules de LBA est identique à celles des PBMC (Figure 15).

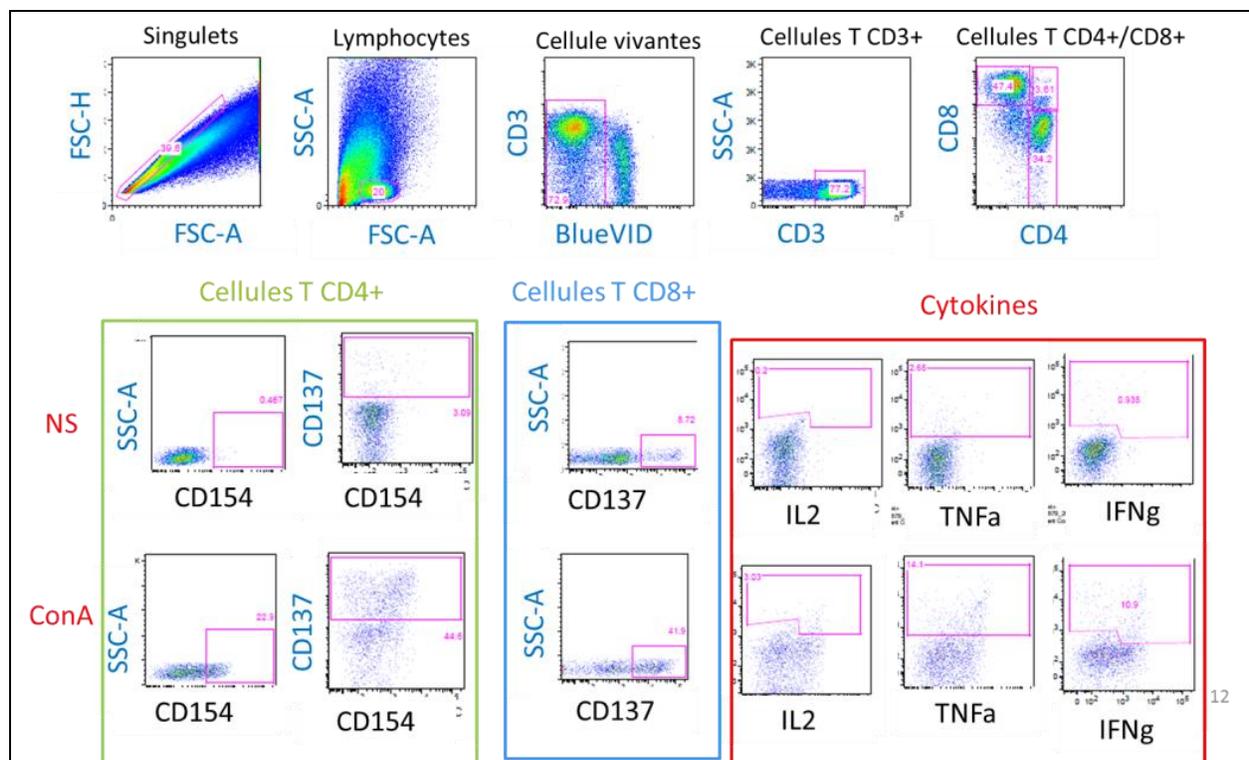


Figure 15. Stratégie de fenestration des populations sur les cellules de LBA. La stratégie est identique à celle appliquée sur les PBMC. Le marqueur CD137 permet bien la détection d'une population de LT CD8 activés ainsi qu'une population de LT CD4 CD154⁺. Nous avons donc accès à un double marquage spécifique des LT CD4 activés. Les bruits de fond sont plus importants avec ces échantillons qu'avec ceux de sang. Le CD137 est exprimé par les LT CD8 activés et également par les LT CD4 CD154.

Le résultat obtenu est équivalent à celui des PBMC, avec un net marquage des LT CD8⁺ par le CD137 et des LT CD4⁺ par le CD154 et le CD137. Cependant, le bruit de fond pour l'expression des marqueurs d'activation CD154 et CD137 ainsi que les cytokines est plus élevé, notamment sur les LT CD8. En effet, les cellules mucosales sont en contact continu avec les micro-organismes de l'air inspiré, ainsi le taux basal de cytokines non spécifiques sécrétées est plus élevé que dans le sang. Néanmoins, on observe une nette réponse positive lorsque les cellules sont stimulées avec le contrôle positif (Concanavoline A).

La mise au point de ce panel m'a permis d'évaluer l'efficacité du vaccin candidat à induire une réponse immunitaire protectrice. Le panel de cytométrie en flux va caractériser la réponse adaptative et plus particulièrement la réponse T CD4 et CD8.

Dans la démarche de développement d'une stratégie vaccinale originale, nous devons au préalable vérifier son innocuité, c'est-à-dire s'assurer que le vaccin n'induit pas d'état inflammatoire important ou une altération de l'état général chez le macaque.

2. Données cliniques

Les paramètres tels que les températures rectales, les poids, la NFS, le taux de CRP ainsi que l'irritation dermique ont été relevés pour chaque macaque tout au long de l'étude afin d'étudier l'impact de la voie d'administration (intramusculaire, intradermique) et des différents produits injectés (le tampon du vaccin, le cocktail d'anticorps, le vaccin commercial) sur l'état clinique général de l'animal.

Les poids et les températures relevés à chaque intervention n'ont pas démontré d'évolution importante au cours de l'étude. Le poids des macaques est stable (Figure 16) ainsi que les températures rectales relevées (Tableau 4) ; ces deux paramètres ne sont pas impactés suite à l'injection des différents immunogènes.

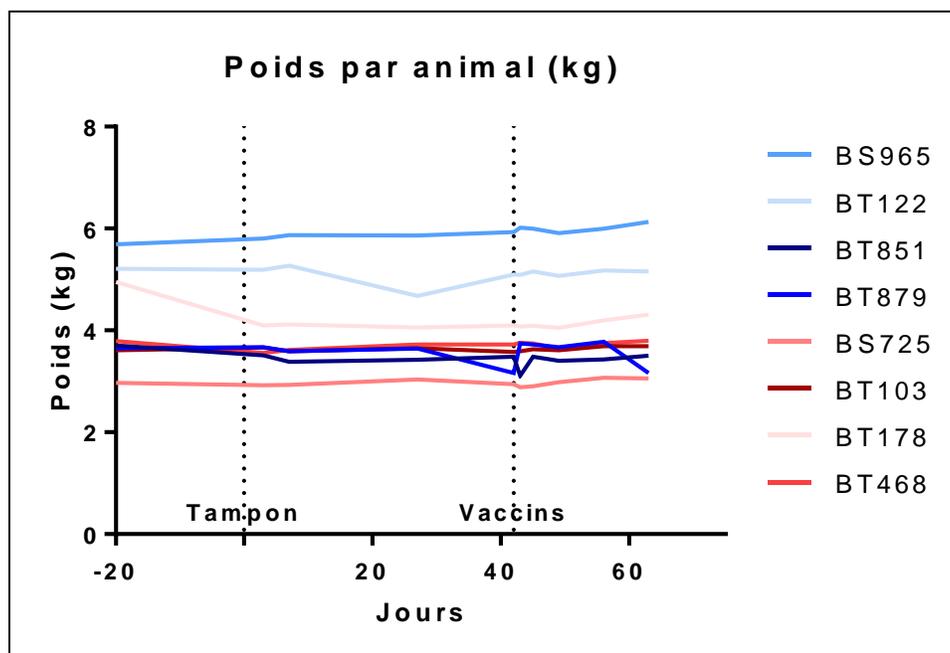


Figure 16. Représentation des poids en kilogramme de chaque macaque au cours de l'étude. Les macaques représentés par une couleur en nuance de bleu ont été vaccinés avec notre vaccin candidat et ceux en nuance de rouge avec IMMUGRIP. Les lignes pointillées verticales représentent le jour d'injection du tampon aux 8 macaques (celle de gauche) et le jour d'immunisation par les vaccins (celle de droite). On remarque que ces deux manipulations n'ont pas eu d'incidence importante sur le poids des macaques.

Température rectale par animal (°C)								
Date de mesure	Candidat vaccin				IMMUGRIP			
	BS965	BT122	BT851	BT879	BS725	BT103	BT178	BT468
J-20 avant injection du tampon	39,5	38	37,6	39	38,4	38	37,5	39,6
J0 injection du tampon	37,6	36,8	38,1	38,9	38,5	38	37,5	38,3
J1	37,7	37,8	37,2	37,7	37,2	37,9	37,7	36,7
J3	38,4	38,5	37,8	37,8	37,7	37,6	37,4	37,6
J7	38,1	38,4	37,4	38	36,9	37,6	37,9	37,6
J28	37	37,4	38,6	39,2	39	38,3	38,1	38,9
J0 injection des vaccins	38,9	38	37,4	37,8	36,8	38	37,9	37,8
J1	38,5	37,1	37,6	38,5	37,4	38,1	37,8	37,9
J3	38,4	38,1	37,8	38,6	37,7	37,9	37,8	38,6
J7	38,8	38,3	37,7	38,4	37,4	38	37,7	37,9
J14	38,4	38,5	37,7	39,4	37,8	37,1	38	38,7
J21	38,3	37,6	38,1	38,2	37,6	37,6	37,6	37,6

Tableau 4. Températures rectales (°C) relevées à chaque prélèvement/manipulation sur les huit macaques au cours de l'étude. Les températures oscillent entre 37 et 39°C et n'enregistrent pas de brusque élévation ou diminution après les injections de tampons ou de vaccins.

L'analyse de l'inflammation au site d'injection, évaluée en se basant sur l'échelle de Draize (Tableau 2), démontre qu'on ne distingue aucune inflammation locale importante induite par l'injection du tampon du vaccin ou d'IMMUGRIP. Cependant, l'immunisation par voie intradermique entraîne une légère inflammation au site d'injection chez certains animaux (score de 1 ou 2) qui disparaît totalement 48 h après l'injection (données non montrées).

L'inflammation systémique précoce est évaluée par le dosage de la protéine C-réactive (CRP) dans le sérum, une protéine hépatique dont le taux augmente précocement et intensément dans une situation d'inflammation. Les taux de CRP ne dépassent pas 10 mg/L pour les macaques aux différents points de prélèvement, sauf pour les macaques BT122 et BT851, dont les taux

s'élèvent respectivement à 13 mg/mL et 16 mg/mL le lendemain de l'injection des vaccins. Cependant ces taux élevés ne persistent pas dans le sang, ils retrouvent une valeur normale dans les deux jours suivants (données non montrées).

Les données de la NFS (taux d'hémoglobine, taux de globules rouges, hématocrite, volume globulaire moyen, taux de plaquettes) des macaques sont toutes comprises dans les valeurs normales (données non montrées). Les leucocytes n'enregistrent pas de variations majeures liées aux injections que ce soient les lymphocytes, les monocytes ou bien les neutrophiles (Figures 17 à 19).

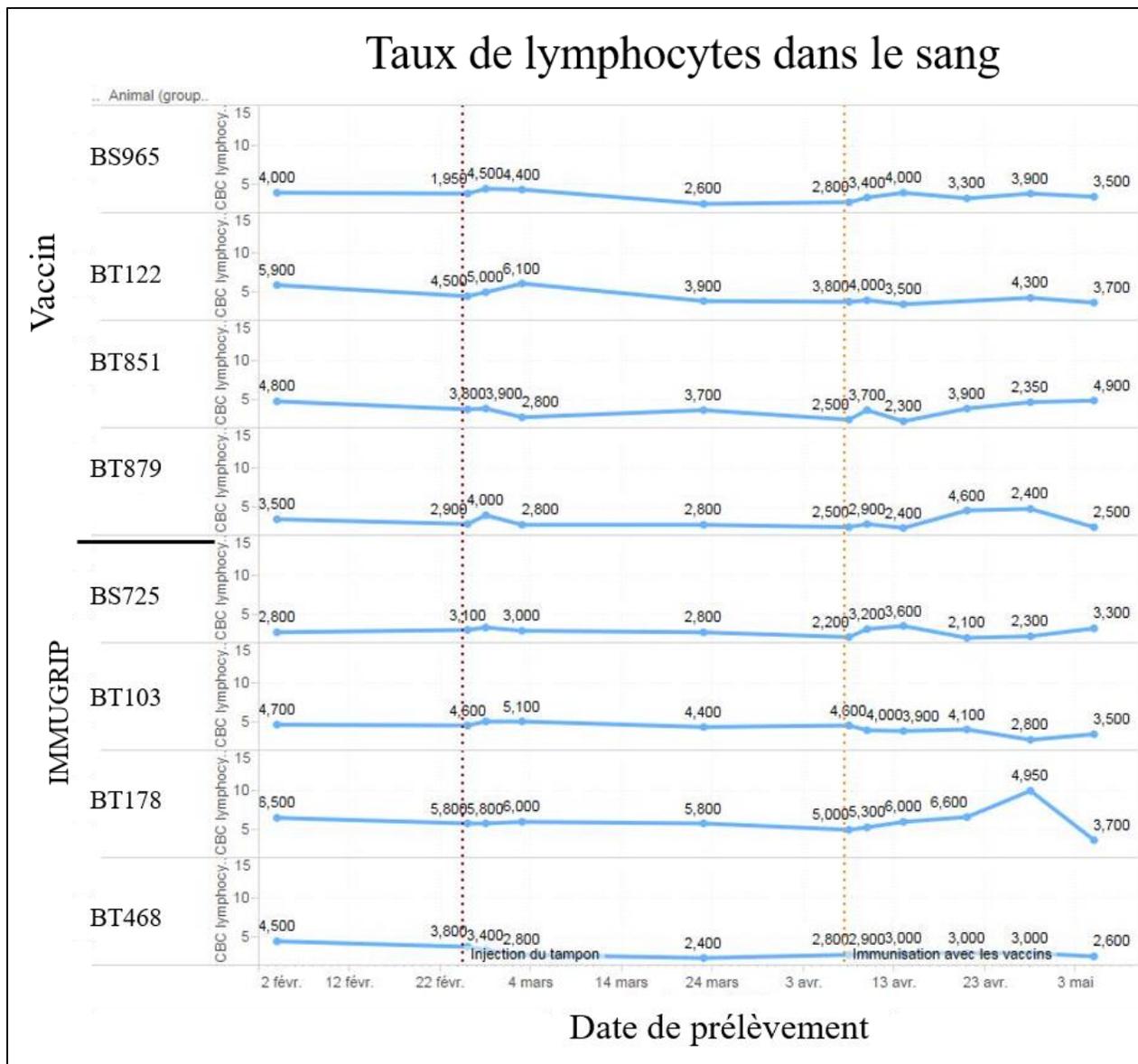


Figure 17. Diagramme représentant le taux de lymphocytes dans le sang de chaque macaque au cours du temps. Les valeurs sont exprimées en nombre de cellules par litre de sang en fonction de la date de prélèvement (date sampling). Les animaux sont classés en ligne dans leur groupe d'appartenance. Les lignes pointillées verticales représentent les dates d'injection du tampon (immunization with buffer) et des vaccins (immunization). Les deux injections entraînent de légères modifications du taux de lymphocytes chez certains macaques sans que ce taux ne s'éloigne des valeurs normales. (Valeur normale autour de 3.94 cellules par litre de sang).

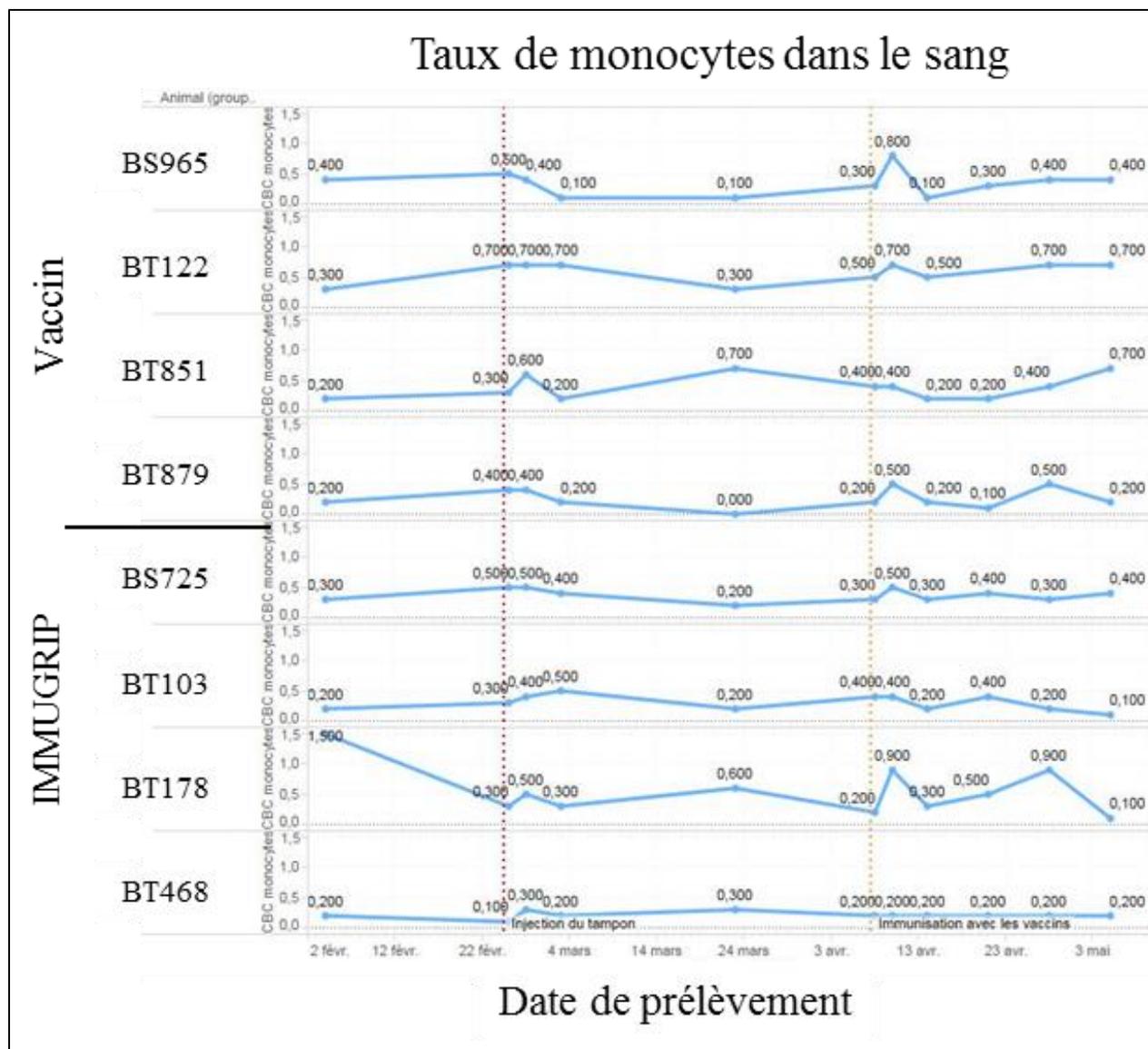


Figure 18. Diagramme représentant le taux de monocytes dans le sang de chaque macaque au cours du temps. Les valeurs sont exprimées en nombre de cellules par litre de sang en fonction de la date de prélèvement (date sampling). Les animaux sont classés en ligne dans leur groupe d'appartenance. Les lignes pointillées verticales représentent les dates d'injection du tampon (immunization with buffer) et des vaccins (immunization). Les deux injections entraînent de légères modifications du taux de monocytes chez certains macaques sans que ce taux ne s'éloigne des valeurs normales. (Valeur normale autour de 0,58 cellules par litre de sang).

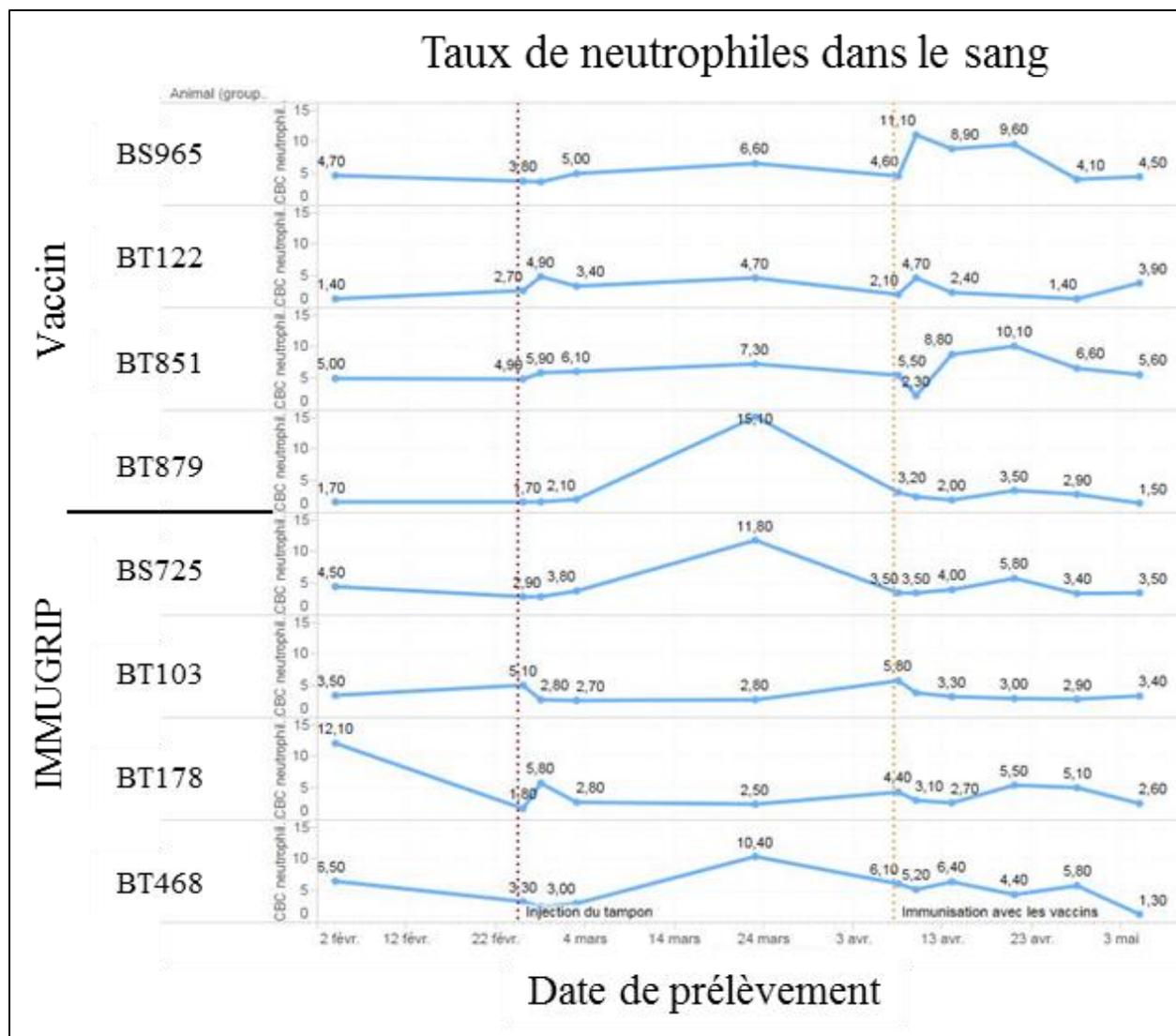


Figure 19. Diagramme représentant le taux de neutrophiles dans le sang de chaque macaque au cours du temps. Les valeurs sont exprimées en nombre de cellules par litre de sang en fonction de la date de prélèvement (date sampling). Les animaux sont classés en ligne dans leur groupe d'appartenance. Les lignes pointillées verticales représentent les dates d'injection du tampon (immunization with buffer) et des vaccins (immunization). (Valeur normale : 5 cellules par litre de sang). Un pic de neutrophiles est observé chez certains macaques (BT879, BT468, BS725) entre les deux injections, sans que nous puissions en expliquer l'origine.

Une légère augmentation des monocytes, des neutrophiles et des lymphocytes est observée après chaque immunisation chez certains animaux mais sans que ces augmentations ne sortent des normes.

Les données cliniques nous permettent de conclure que l'immunisation avec le candidat vaccin et le vaccin commercial n'entraîne pas d'altération majeure de l'état général des macaques ni

d'inflammation systémique. Une très légère irritation cutanée est induite suite à l'injection par voie intradermique selon la classification à l'aide de l'échelle de Draize, sans conséquences pour l'analyse de la réponse immunitaire adaptative.

3. Réponse adaptative

La réponse adaptative est analysée par la mesure intracellulaire de la production de cytokines par les LT au niveau systémique et local, et par l'évaluation du taux de cytokines sécrétées dans le sérum avant et après chaque immunisation, et ceci pour chaque macaque.

a) Analyse de la réponse systémique :

Une partie de la réponse systémique est évaluée par la mesure de 23 cytokines dans le sérum grâce à la technologie Luminex. Après acquisition de la plaque milliplex, les données sont transférées et analysées sur le logiciel de représentation graphique Tableau. Les résultats des 23 cytokines ne sont pas tous illustrés par les Figures 20 et 21, une grande partie des cytokines n'ont pas été détectées dans les échantillons sériques.

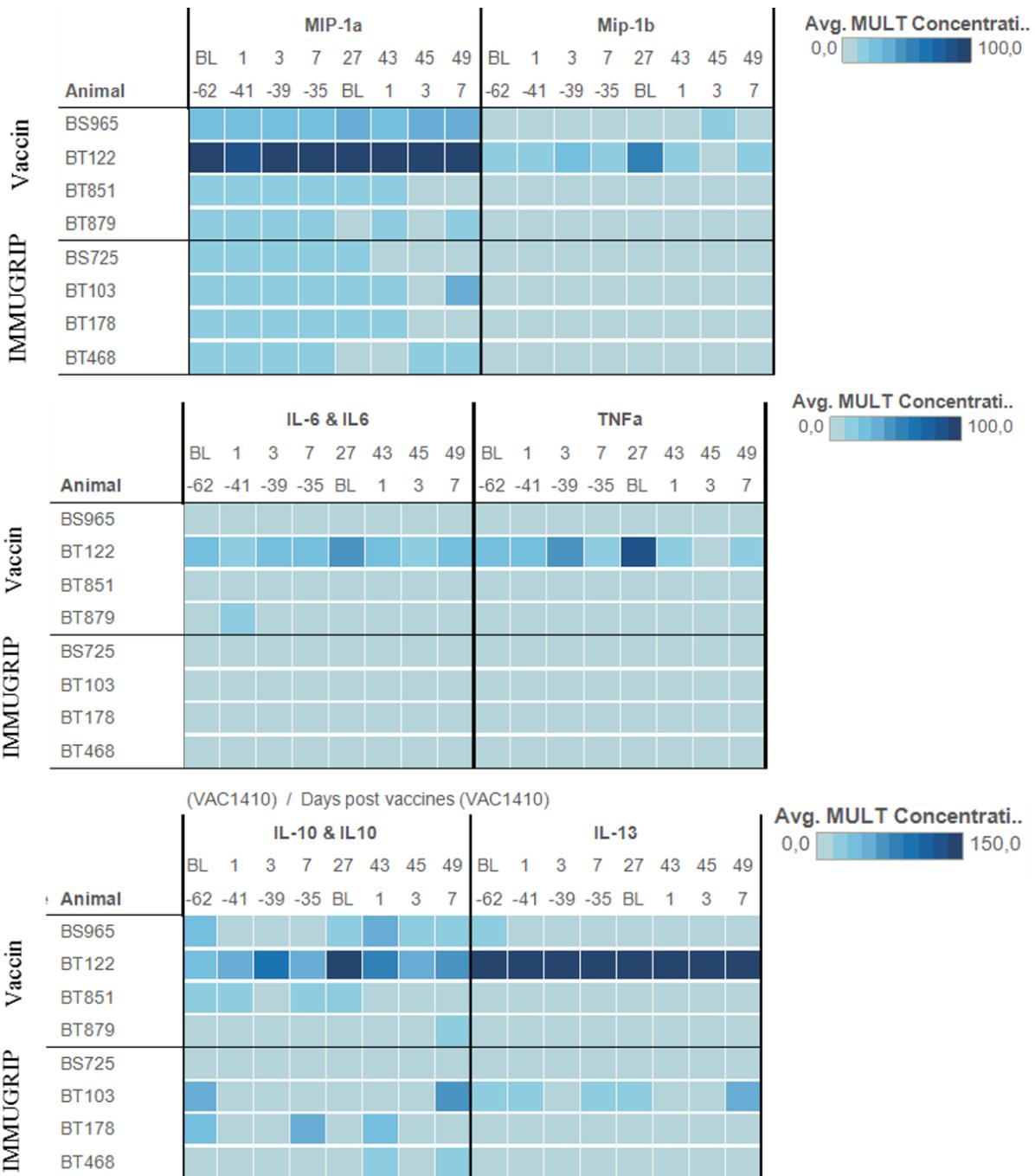


Figure 20. Résultats des plaques de mesure des cytokines dans le sérum des macaques représentés avec le logiciel Tableau. Toutes les cytokines ne sont pas montrées sur la figure en raison de résultats négatifs (très faible quantité cytokinique détectée dans l'échantillon) Les cytokines sont représentées en colonne aux différents temps de prélèvement : la première ligne indiquant les jours en fonction de l'injection du tampon (qui se situe à « BL ») et la deuxième les jours en fonction de l'injection des vaccins (qui se trouve à « BL »). Les différents singes sont représentés en ligne. L'intensité de la couleur de chaque case est proportionnelle au taux de cytokine détecté. Ici les résultats présentés concernent les cytokines IL-10, IL-13, TNF- α , IL-6, MIP-1b et MIP-1a.

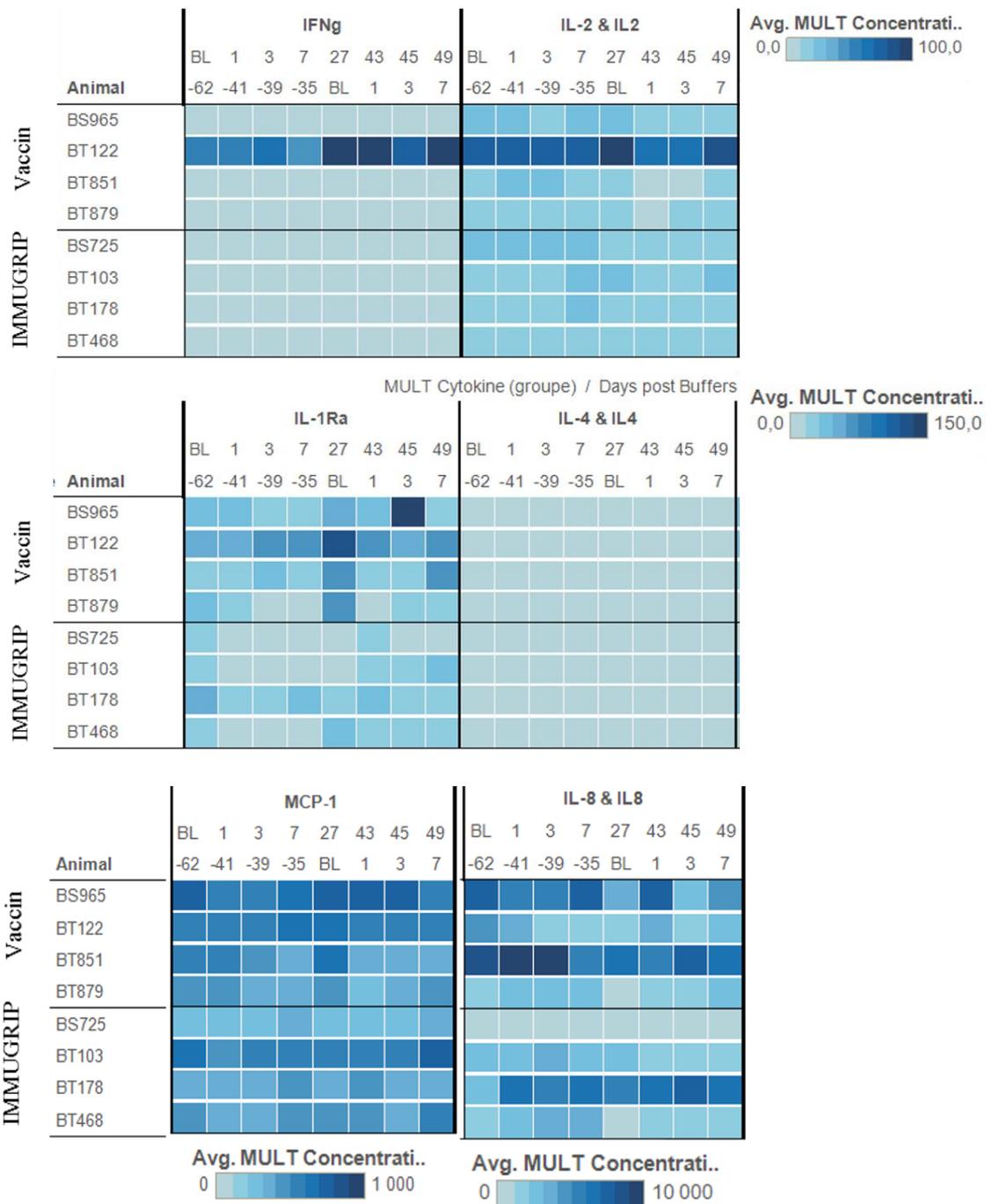


Figure 21. Résultats des plaques de mesure des cytokines dans le sérum des macaques représentés avec le logiciel Tableau. Toutes les cytokines ne sont pas montrées sur la figure en raison de résultats négatifs (très faible quantité cytokinique détectée dans l'échantillon). Les cytokines sont représentées en colonne aux différents temps de prélèvement : la première ligne indiquant les jours en fonction de l'injection du tampon (qui se situe à « BL ») et la deuxième les jours en fonction de l'injection des vaccins (qui se trouve à « BL »). Les différents singes sont représentés en ligne. L'intensité de la couleur de chaque case est proportionnelle au taux de cytokine détecté. Ici les cytokines représentées sont IL-8, IFN- γ , MCP1, IL1RA, IL-4 et IL-2.

Nous n'observons pas de modifications de production des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6 ou le TNF- α ou de cytokines inflammatoires de type Th1 telles que l'IFN- γ ou l'IL-2 après l'immunisation par le tampon ou après l'immunisation par les différents vaccins. De même nous n'observons pas de modifications importantes dans la production de chimiokines (MCP-1, IL-8, MIP1- α et MIP1- β), responsables du recrutement de cellules immunitaires telles que les monocytes et les neutrophiles. La production d'IL-8 est légèrement augmentée 1 jour et 3 jours après l'immunisation avec le tampon et les vaccins chez certains macaques. Ce résultat est corrélé négativement avec l'évolution du taux de neutrophiles dans le sang (test de corrélation de Pearson significatif). Nous n'observons pas d'évolution majeure de la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-13 et IL-10) après chaque immunisation. La cytokine IL1RA est légèrement augmentée après immunisation avec le tampon et après immunisation avec le vaccin commercial et légèrement diminuée après immunisation avec notre candidat vaccin. Le macaque BT 122 semble réagir activement aux injections, ses échantillons contiennent des taux supérieurs aux autres macaques pour la plupart des 23 cytokines, sans que nous ne puissions fournir une explication précise. (Les analyses statistiques sont en cours).

La réponse systémique lymphocytaire est évaluée sur prélèvements sanguins par cytométrie en flux. Une fois l'analyse des échantillons des différentes dates effectuée sur Flow Jo, les données sont transférées et analysées sur un logiciel de représentation graphique, Tableau. Ce logiciel permet graphiquement de synthétiser les résultats des différents ICS. Les analyses statistiques sont réalisées avec l'aide du logiciel GraphPad Prism.

Sur la figure 22 sont représentés une grande partie des résultats obtenus à partir des échantillons sanguins.

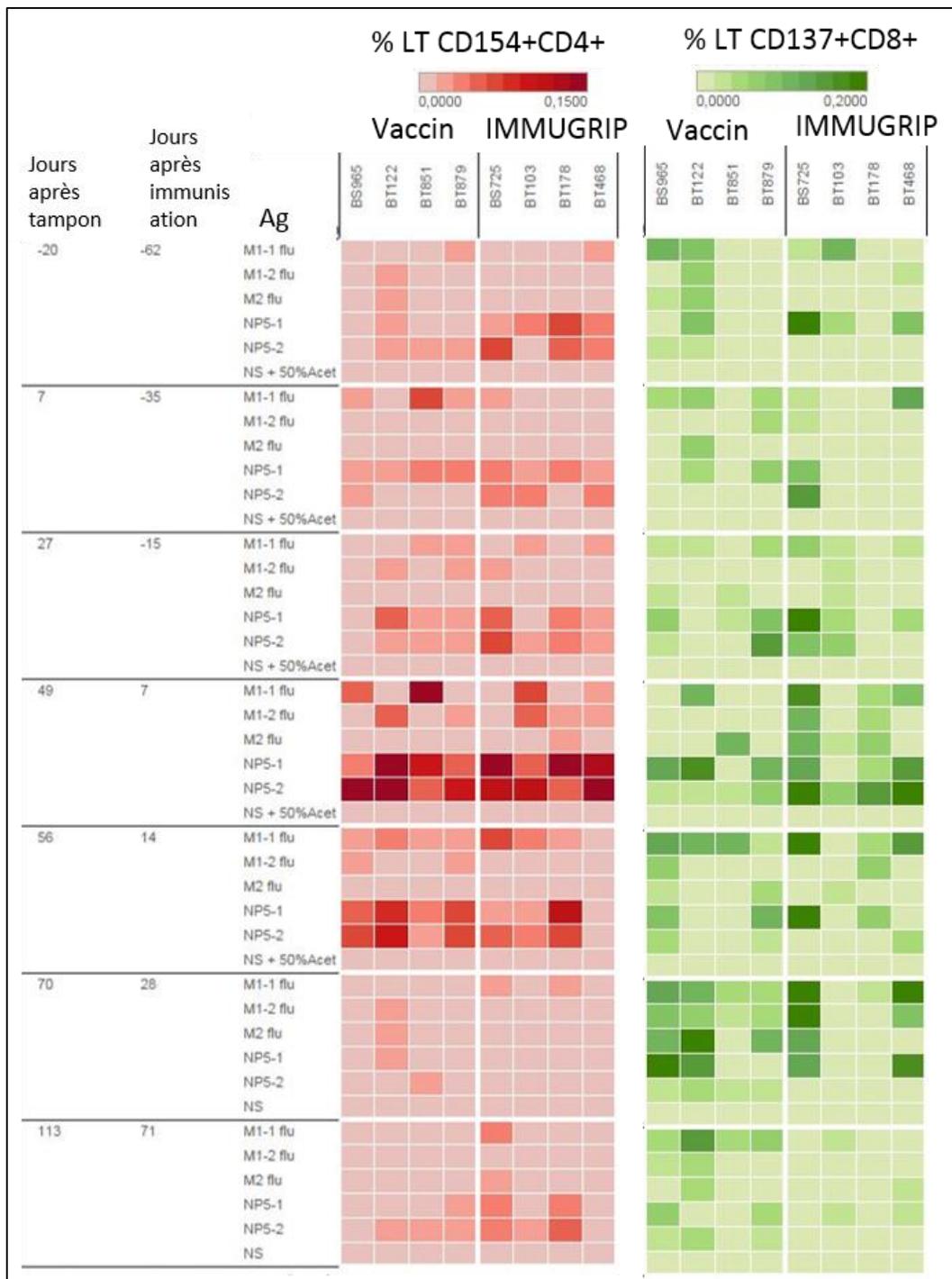


Figure 22. « Heatmap » générée par Tableau représentant les résultats des mesures de cytokines intracellulaires par cytométrie en flux sur les lymphocytes T CD154⁺CD4⁺ et CD137⁺CD8⁺ sanguins aux différentes dates de prélèvement. Chaque case représente le pourcentage de lymphocytes T CD4 ou T CD8, l'intensité de la couleur est proportionnelle au pourcentage. En ligne sont indiquées les différentes stimulations peptidiques effectuées à chaque date et en colonne les animaux avec leur groupe d'appartenance (macaques ayant été vaccinés avec notre candidat vaccin : « vaccin » ou avec le vaccin commercial « IMMUGRIP »).

La figure 22 représente les pourcentages des LT CD4⁺ CD154⁺ et des LT CD8⁺ CD137⁺ spécifiques de l'antigène aux différentes dates de prélèvement précédant et suivant l'immunisation.

Il est intéressant de remarquer qu'aux trois dates précédant l'injection des vaccins, on observe une réponse cellulaire mémoire CD4⁺ et CD8⁺ dirigée contre les protéines internes NP et M1, qui résulte de l'exposition 9 mois auparavant au virus sauvage. En effet, après une stimulation peptidique ex vivo des lymphocytes, on observe une augmentation du pourcentage de LT CD4⁺ CD154⁺ et LT CD8⁺ CD137⁺ spécifiques de l'antigène aux trois dates avant l'immunisation : 20 jours avant l'injection du tampon et 7 et 28 jours après l'injection du tampon. Cette réponse observée 9 mois après l'infection des animaux est par comparaison supérieure à celle obtenue après l'immunisation de ces mêmes macaques alors qu'ils étaient naïfs (Figure 9).

Comme nous l'avons déjà indiqué, les protéines internes ont une grande similarité entre les différentes souches, comme le démontrent les résultats d'alignement de séquences de NP et M1 entre différentes souches (H1N1, H5N1, H3N2...), qui atteignent 90 à 100% d'homologie (alignement de séquences grâce à l'outil Pubmed BLAST). Cette information montre que les protéines internes du virus sont capables d'induire une réponse cellulaire indépendante du sous-type d'influenza, comme il a déjà été démontré dans la littérature.^{99 100}

Comme escompté, le tampon n'impacte pas le taux de lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ ; la réponse cellulaire est d'intensité équivalente aux dates précédant et suivant son injection (Résultats non significatifs après un test de Wilcoxon comparant les données pré et post injection). La réponse cellulaire mémoire induite par l'infection est maintenue dans le temps de façon persistante.

Comme nous l'avons précédemment remarqué au cours de la mise en place du panel, 80,3 % de la population LT CD4⁺ CD154⁺ expriment également le marqueur CD137. Ce marqueur nous permet d'être encore plus précis dans l'analyse des LT CD4 spécifiques de l'antigène.

42 jours après l'injection du tampon, les macaques ont ensuite été immunisés avec les vaccins. La réponse cellulaire est stimulée par l'injection des deux vaccins, principalement dirigée contre NP et M1 (or, on pouvait s'attendre à ce que le vaccin trivalent commercial IMMUGRIP induise une réponse moins intense). La cinétique des réponses est différente entre les LT CD4 et LT CD8. Les LT CD4 montrent un pic d'activation 7 jours après la vaccination dans les groupes vaccinés puis

déclinent jusqu'à disparaître 28 jours après tandis que le taux de LT CD8 activés présente deux vagues d'activation : une première, 7 jours après l'immunisation et une seconde, 28 jours après immunisation. Les résultats semblent indiquer une supériorité de la réponse CD8⁺ induite par notre vaccin 28 jours suivant l'immunisation. Cette réponse CD8⁺ semble davantage prolongée dans le temps par rapport à la réponse CD4⁺, ce qui justifie de procéder à un prélèvement supplémentaire 70 jours après l'immunisation (non inclus dans le programme initial). Cette dernière expérimentation nous permet de constater que la réponse CD8⁺ est bien maintenue dans le temps puisqu'on observe encore une réponse 70 jours après l'immunisation, seulement celle-ci est diminuée par rapport au jour 28 suivant l'injection des vaccins. D'après la Figure 22, cette réponse CD8⁺ semble plus persistante chez les macaques ayant été immunisés par notre candidat vaccin. On observe également une réponse cellulaire CD4⁺ résiduelle particulièrement dirigée contre NP. Toutes ces éventuelles différences nécessitent d'être confirmées par une analyse statistique plus précise, en collaboration avec le biostatisticien du laboratoire.

Nous avons également caractérisé la polyfonctionnalité des cellules, c'est-à-dire la capacité des lymphocytes à sécréter différentes cytokines simultanément. Cette analyse est réalisée sur les réponses lymphocytaires les plus importantes, c'est-à-dire celles obtenues avec les pools de peptide NP5 (NP5-1 et NP5-2) (Figures 23 et 24).

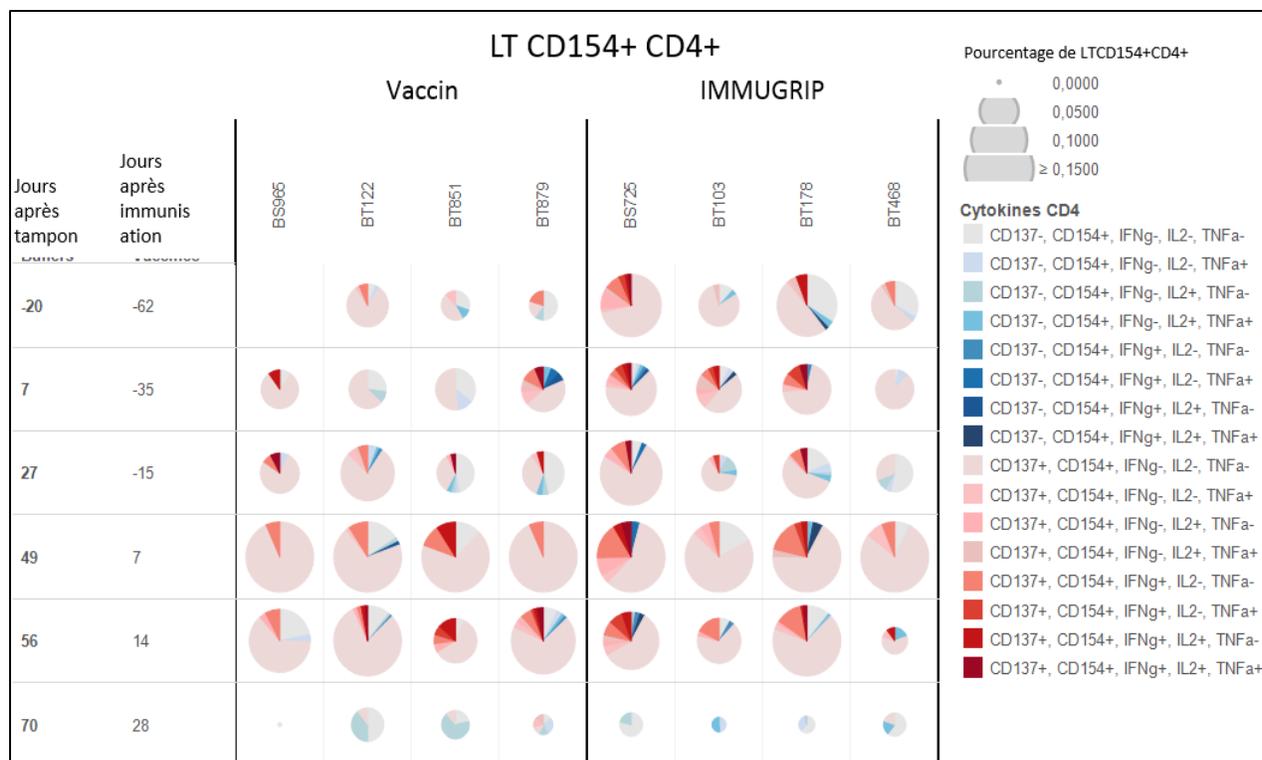


Figure 23. Analyse polyfonctionnelle des LT CD154⁺ CD4⁺ sanguins par le logiciel Tableau. Les singes sont indiqués en colonne et les différentes dates en ligne (en jours post tampon et jours post immunisation). La taille des camemberts est proportionnelle au taux de LT CD154⁺CD4⁺. Les parts représentent les différentes combinaisons de sécrétion de cytokines. Les parts en nuance de bleu représentent les LT CD4 CD154⁺ n'exprimant pas le CD137 et celles en nuance de rouge les LT CD4 co-exprimant le CD154 et le CD137. L'analyse est effectuée sur les LT ayant été stimulés par les peptides NP5. L'intensité des couleurs est proportionnelle à la polyfonctionnalité des LT, plus les lymphocytes expriment un nombre important de cytokines plus ils sont considérés comme polyfonctionnels.

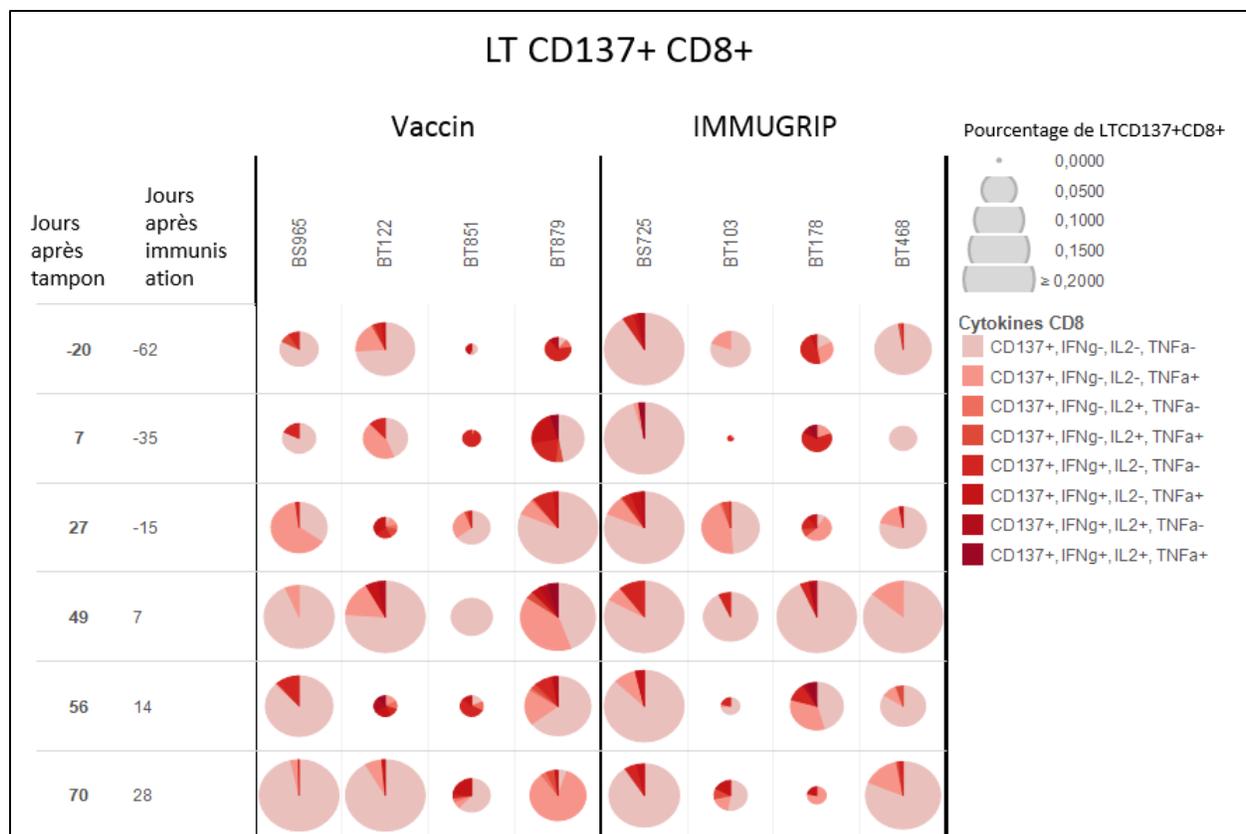


Figure 24. Analyse polyfonctionnelle des L T CD137⁺ CD8⁺ sanguins par le logiciel Tableau. Les singes sont indiqués en colonne et les différentes dates en ligne (en jours post tampon et jours post immunisation). La taille des camemberts est proportionnelle au taux de LT CD137⁺CD8⁺. Les parts représentent les différentes combinaisons de sécrétion de cytokines. L'analyse est effectuée sur les LT ayant été stimulés par les peptides NP5 et M1. L'intensité des couleurs est proportionnelle à la polyfonctionnalité des LT, plus les lymphocytes expriment un nombre important de cytokines plus ils sont considérés comme polyfonctionnels.

Sur la Figure 23, la taille des camemberts représente la fréquence de LT CD154⁺CD4⁺, on retrouve bien sur cette illustration le fait que la réponse cellulaire est rappelée par le vaccin. Des calculs de pourcentages nous permettent de déclarer que 21,7% des LT CD4⁺ CD154⁺ mémoires sécrètent au moins une cytokine (INF- γ , IL-2, TNF- α), un pourcentage qui s'élève à 46,6% pour les LT CD8⁺ CD137⁺ (Figures 23 et 24). La fine taille des parts représentant le pourcentage de lymphocytes sécrétant des cytokines indique qu'une importante part des LT CD4⁺ et LT CD8⁺ spécifiques de l'antigène ne sécrètent aucune des cytokines du panel. Ainsi, une majorité des lymphocytes mémoires, caractérisés par l'expression des marqueurs d'activation spécifiques de l'antigène, CD154 et CD137, n'exprime pas de cytokines. Cependant, on ne peut pas conclure

qu'ils ne sont pas polyfonctionnels, en effet, il est possible que ces lymphocytes activés expriment des cytokines différentes de celles utilisées avec notre panel (INF- γ , IL-2, TNF- α). Il ne semble pas y avoir de différences au niveau de la polyfonctionnalité des LT entre les deux groupes vaccinés. En collaboration avec un biostatisticien du laboratoire, des analyses statistiques plus approfondies de la multifonctionnalité sont en cours.

Une réponse cellulaire spécifique est observée avec notre cocktail de protéines de fusion et IMMUGRIP sans pouvoir distinguer une différence d'intensité de réponse entre les deux vaccins (confirmé par un test de Mann-Whitney non significatif). L'efficacité du candidat vaccin à stimuler la réponse adaptative systémique n'est ni supérieure ni inférieure à celle du vaccin commercial. Cependant, nous avons observé une réponse cellulaire mémoire persistante et principalement dirigée contre les protéines internes du virus. Les vaccins inactivés trivalents ainsi que notre candidat vaccin rappellent cette réponse lymphocytaire chez les macaques préalablement infectés.

b) Analyse de la réponse locale

La grippe étant une infection respiratoire, la réponse cellulaire locale, c'est-à-dire au site d'infection du virus de la grippe, a été évaluée par mesure des cytokines intracellulaires sur cellules de lavage broncho-alvéolaire.

Nous avons ensuite procédé à la même analyse que pour les PBMC, avec quelques différences. Comme indiqué dans la partie « Matériels et Méthodes » un faible nombre de leucocytes a été extrait des LBA en comparaison aux échantillons sanguins, ainsi il convient d'en prendre compte lorsque l'on compare la réponse locale et la réponse systémique. En effet, les pourcentages de lymphocytes activés sont calculés à partir de totaux différents selon le type d'échantillon. De plus, l'analyse de la réponse au niveau cellulaire n'est pas complète en raison de données manquantes pour certaines stimulations peptidiques non effectuées.

Comme illustrée par la Figure 25, nous constatons que la réponse muqueuse mémoire induite par l'infection grippale H1N1 9 mois auparavant est intense et persistante.

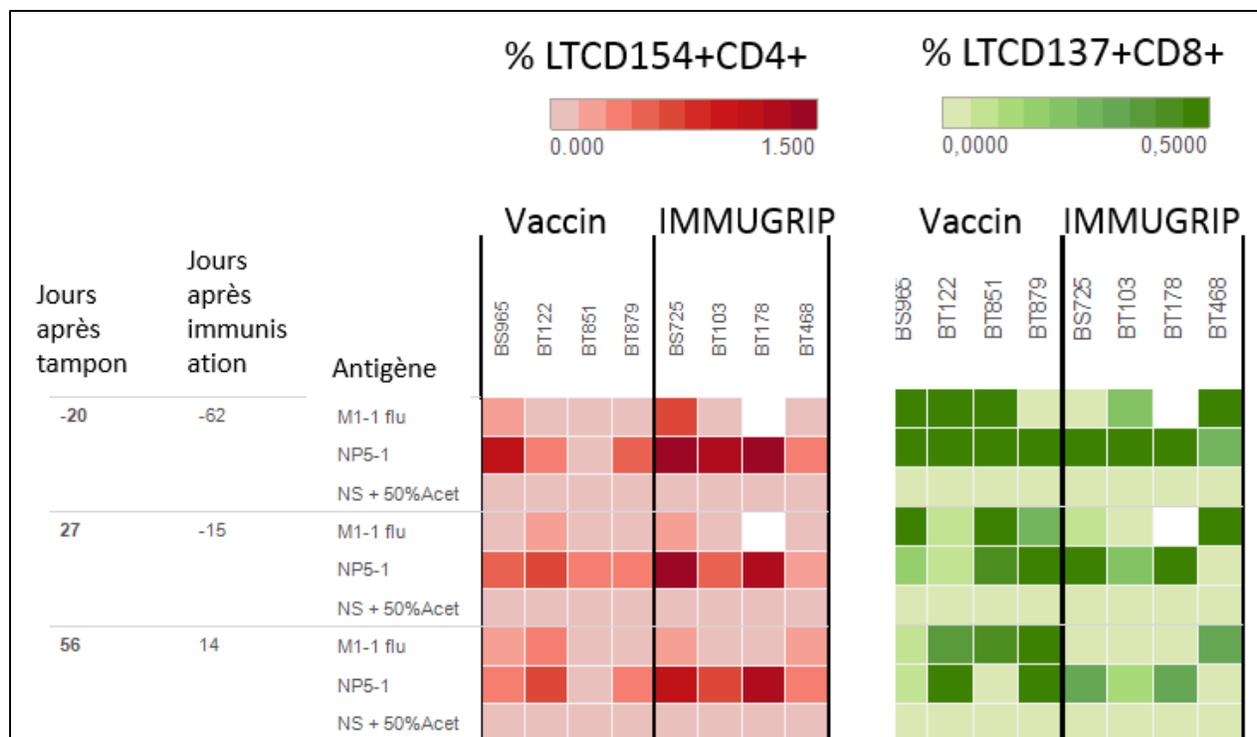


Figure 25. Heatmap » générée par Tableau représentant les résultats des mesures de cytokines intracellulaires par cytométrie en flux sur les lymphocytes TCD154⁺ CD4⁺ et CD137⁺ CD8⁺ muqueux, aux différentes dates de prélèvement. Chaque cas représente le pourcentage de lymphocytes T CD4 ou T CD8, l'intensité de la couleur est proportionnelle au pourcentage. En ligne sont indiquées les différentes stimulations peptidiques et en colonne les animaux avec leur groupe d'appartenance (candidat vaccin ou IMMUGRIP).

Cette réponse lymphocytaire mémoire CD4 et CD8 est spécifiquement observée vis-à-vis des protéines NP et M1. La réponse mémoire LT CD4 est principalement induite par l'antigène NP et la réponse LT CD8 par les antigènes NP et M1.

En revanche, l'immunisation par voie parentérale n'induit aucune variation significative de cette réponse cellulaire (résultat confirmé par des tests Mann-Whitney). Nous avons relevé que 72% des LT CD154⁺ CD4⁺ expriment le marqueur CD137. La vaccination n'impacte pas non plus la polyfonctionnalité des lymphocytes. En effet, l'analyse polyfonctionnelle révèle un taux de polyfonctionnalité des lymphocytes spécifiques activés très important mais celui-ci n'est pas influé par l'injection des vaccins. L'analyse de la polyfonctionnalité est effectuée à partir des échantillons stimulés par les peptides du pool NP5 pour les LT CD154⁺ CD4⁺ et NP5 et M1 pour

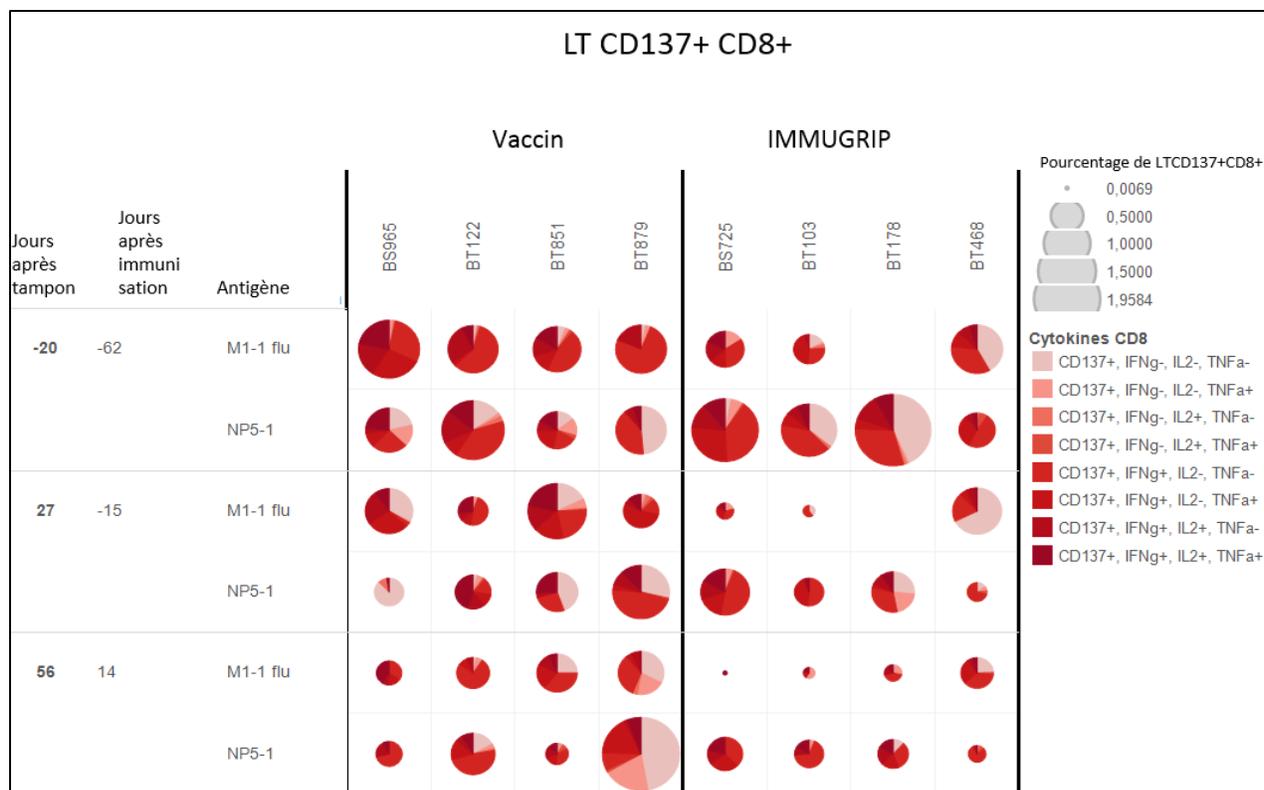


Figure 27. Analyse multifonctionnelle des LT CD8⁺ CD137⁺ muqueux par le logiciel Tableau. Les singes sont indiqués en colonne et les différentes dates en ligne (en jours post tampon et jours post vaccin). La taille des camemberts est proportionnelle au taux de LT CD8⁺ CD137⁺. Les parts représentent les différentes combinaisons de sécrétion de cytokines. L'analyse est effectuée sur les LT ayant été stimulés par les peptides NP5 et M1. L'intensité des couleurs est proportionnelle à la multifonctionnalité des LT, plus les lymphocytes expriment un nombre important de cytokines plus ils sont considérés comme multifonctionnels.

Au niveau systémique et local, aucune réponse cellulaire dirigée contre le M2 n'est détectée ce qui semble logique ; M2 étant décrite comme une protéine induisant une réponse humorale.

En résumé, nous avons observé une réponse mémoire CD4 et CD8 spécifique des antigènes NP et M1 au niveau local et systémique et une stimulation de cette réponse par les vaccins uniquement au niveau systémique, sans pouvoir les départager en matière d'efficacité. La réponse cellulaire au niveau local n'évolue pas après injection des vaccins. De plus, les vaccins testés n'engendrent pas d'inflammation systémique ou d'altération majeure de l'état général. Cependant, notre candidat vaccin entraîne une légère inflammation au site d'injection, plus probablement due au mode d'injection qu'à sa composition.

Discussion

Discussion

Au commencement de l'étude visant à évaluer l'effet d'un vaccin candidat à stimuler la réponse immunitaire (et notamment la réponse LT CD8), nous avons mis au point les outils adéquats.

Concernant la réponse adaptative, nous nous sommes focalisés sur la réponse cellulaire T que nous souhaitons stimuler avec notre candidat vaccin. Ainsi, nous avons mis en place un panel permettant la caractérisation de la réponse lymphocytaire T. Le développement a consisté à ajouter le marqueur CD137 spécifique des LT CD8 activés au panel utilisé au laboratoire comprenant déjà le marqueur spécifique des LT CD4 activés : le CD154. Ces deux marqueurs se sont avérés efficaces pour identifier les populations de lymphocytes T CD4 et T CD8 spécifiques de l'antigène. Cette technique nous a permis de détecter les lymphocytes effecteurs sécrétant des cytokines suite à leur contact avec l'agent pathogène peptidique. Il a d'ailleurs déjà été démontré que l'expression de ces deux récepteurs caractérise spécifiquement les cellules reconnaissant l'antigène.^{117 119} Cette approche augmente la sensibilité de détection et permet un suivi des cellules après une période de stimulation relativement courte. De plus, les marqueurs du panel sont également appropriés à la caractérisation des lymphocytes spécifiques de l'antigène issus des prélèvements de LBA, ce qui nous a permis d'évaluer la réponse au niveau du site d'infection.

Le panel de cytométrie en flux fera l'objet d'une publication après la preuve de sa réactivité croisée chez d'autres primates non humains (tests actuellement en cours chez des macaques rhésus, chez le babouin et chez le singe vert africain).

Grâce à l'évaluation par cytométrie des réponses cellulaires de nos huit macaques préalablement infectés, nous avons démontré que l'infection induisait une réponse mémoire persistante CD4 et CD8 au niveau systémique et local. En effet, après une stimulation ex vivo et de courte durée des lymphocytes sanguins et muqueux (LBA) avec des peptides internes du virus influenza A, le taux de cellules activées augmente. Ainsi, près d'un an suivant une première infection grippale, l'animal serait capable de développer une réponse cellulaire rapide lorsqu'il est à nouveau en contact avec le virus influenza A, et particulièrement au contact des protéines internes (NP et M1). Cette réponse cellulaire semble plus intense et polyfonctionnelle au niveau du site d'infection, ce

qui est dû à un fort « bruit de fond » en raison du taux basal de cytokines plus important au niveau des muqueuses. L'intensité de la réponse au niveau du site d'infection peut sembler logique car le site muqueux constitue la porte d'entrée du virus lors de la contamination. Il est probable qu'une grande partie des cellules mémoires y soit localisée, et qu'elles soient donc plus réactives en cas d'infection. Cette importante sécrétion de cytokines au niveau mucosal est liée au rôle barrière de ces tissus, en contact direct avec des agents pathogènes extérieurs.

Après vaccination des animaux, nous avons pu observer une augmentation de la réponse cellulaire T CD4⁺ et LT CD8⁺ spécifique de l'antigène au niveau systémique avec les deux vaccins (le vaccin trivalent et notre candidat vaccin). La réponse cellulaire est principalement dirigée contre les protéines NP et M1. Les réponses cellulaires induites par les deux vaccins semblent similaires, ce qui a été confirmé par des tests statistiques. Les vaccins trivalents sont composés de virus entiers, et contiennent des protéines internes qui sont capables de stimuler la réponse cellulaire. La stratégie de ciblage des DC par des anticorps couplés à des protéines internes grippales ne permet pas d'obtenir une efficacité de stimulation de la réponse cellulaire supérieure à celle du vaccin inactivé trivalent. La réponse LT CD4 est plus précoce que la réponse LT CD8, dont la cinétique se décompose en deux vagues, une première 7 jours après l'injection des vaccins, puis une autre 28 jours post-injection. La première vague de stimulation des LT CD4 et LT CD8 peut être issue de l'activation de LT mémoires. Cette intensification de la réponse T CD8 au 28^{ème} jour après l'immunisation peut s'expliquer par une activation médiée par les LT CD4⁺ puisqu'il s'agit en partie de leur rôle. Concernant l'analyse polyfonctionnelle, une importante part des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ ne sécrète aucune des cytokines du panel : IL-2, IFN- γ , TNF- α . Cette analyse ne permet pas de distinguer les deux vaccins testés selon leur capacité à augmenter la polyfonctionnalité des cellules stimulées. Ce résultat ne nous permet pas de conclure quant à la polyfonctionnalité de la réponse, en effet il est probable que ces LT activés sécrètent des cytokines non détectables avec notre panel d'anticorps. Il nous faut donc élargir le nombre de cytokines que nous pourrions explorer, telles que les granzymes et les perforines, sécrétées par les LT CD8 cytotoxiques, qui nous renseigneraient sur les capacités effectrices des LT activés. En effet, nous ignorons si cette réponse CD8 est effectivement cytotoxique comme nous le souhaitons. Ces analyses supplémentaires seraient réalisables par cytométrie de masse en développant un panel spécifique comprenant des marqueurs associés à la caractérisation de la réponse CD8. Il est envisageable d'effectuer différents tests de cytotoxicité sur les lymphocytes

extraits des prélèvements (test de lyse...).¹²⁰ Ces analyses permettraient également de comparer les réponses LT CD8⁺ induites par les deux vaccins. En complément des analyses de la réponse cellulaire, la réponse humorale va également être évaluée au niveau systémique et au niveau du site d'infection pour les deux vaccins (dosage IgG et IgA dans le sérum).

Le taux des 23 cytokines mesuré dans le sérum a peu évolué lors de la vaccination, on pouvait s'attendre à une réaction cytokinique plus importante au contact des immunogènes. L'infection grippale induit une importante production sérique de cytokines inflammatoires (IFN- γ , IL-2, IL-6), anti-inflammatoires (IL-10) et de chimiokines (MCP1 et IL-8).^{57 31} Cette mesure pourrait être effectuée sur les échantillons de LBA afin d'être améliorée. Mais cette hypothèse est difficilement réalisable pour des raisons éthiques : les prélèvements de LBA sont traumatisants pour l'animal, ils doivent donc être espacés de 14 jours. Ces résultats peuvent s'expliquer également par un mauvais temps de prélèvement des échantillons sanguins (prélèvements peut-être trop tardifs). Une discussion avec une équipe interne du laboratoire étudiant la réponse innée à un vaccin MVA (*Modified Vaccinia Ankara*), nous a indiqué que la signature cytokinique sérique serait en réalité plus précoce avec un pic à 3h et à 6h suivant l'injection du vaccin. De plus, nous manquons d'un contrôle négatif pour comparer, c'est à dire d'un échantillon de sérum de macaque non infecté préalablement par le virus influenza A (H1N1).

Aucune réaction lymphocytaire n'a été détectée au niveau du site d'infection. Ainsi l'étude de la réponse mucoale nous permet d'affirmer que l'immunisation par voie intradermique n'induit pas de rappel détectable au niveau des voies respiratoires. La voie d'administration du vaccin n'est pas adaptée. En effet, une administration au niveau de la muqueuse respiratoire serait plus appropriée pour l'induction d'une réponse cellulaire, par exemple par voie nasale, comme les vaccins vivants atténués, qui présentent une bonne efficacité chez les populations jeunes.⁸³ De plus, la présence de DC au niveau du tissu pulmonaire chez le macaque cynomolgus a déjà été prouvée, ce qui permettrait de conserver la stratégie de ciblage de ces cellules.¹²¹

Nous avons rassemblé les données cliniques rapportées au test du vaccin candidat afin de vérifier son innocuité. On distingue uniquement une légère inflammation ponctuelle au site d'injection, due au mode d'administration intradermique, ce qui est largement reconnu. Deux animaux ont vu leur taux de CRP augmenter après l'injection du vaccin, cependant ces taux autour de 10 mg/L ne reflètent pas une inflammation importante. En effet, au stade d'infection par la grippe neuf mois

auparavant, ces macaques présentaient des taux de CRP autour de 50 mg/L (résultats pas encore publiés). Le vaccin n'engendre pas d'inflammation systémique majeure ni d'altération de l'état général (perte de poids, d'appétit...).

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

En conclusion de l'étude et grâce aux mises au point préalables, nous avons démontré plusieurs faits que l'on peut résumer en quatre points :

- 1) Tout d'abord nous avons prouvé que l'infection induit une réponse mémoire cellulaire persistante locale et systémique et principalement dirigée contre les protéines internes NP et M1.
- 2) Nous avons également établi que les vaccins commerciaux trivalents ne sollicitent cette réponse que si les animaux ont préalablement été exposés au virus de la grippe.
- 3) L'étude de la réponse mucosale nous a permis de démontrer que l'immunisation par voie intra-dermique n'induit pas de réponse rappel détectable au niveau des voies respiratoires.
- 4) Enfin, la stratégie de ciblage des DC -sans co-stimulation particulière- par nos protéines de fusion ne semble pas améliorer la réponse cellulaire T CD4 et T CD8. En effet, elle semble équivalente à celle observée chez les animaux ayant reçu le vaccin commercial.

En perspective

L'utilisation de composés unitaires purifiés (dans notre cas des peptides issus de protéines grippales) permet de mieux orienter la réponse immunitaire mais semble également entraîner une baisse de l'immunogénicité du vaccin. Néanmoins une optimisation de la stratégie est possible. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'étude de la réponse innée et à l'activation des DC suite à l'injection du vaccin grâce à une approche par cytométrie de masse. En effet, une meilleure connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le déclenchement de la réponse innée pourrait nous permettre de mieux orienter et stimuler la réponse adaptative cellulaire. L'étude de la réponse innée à l'infection grippale, dont les mécanismes sont complexes, est compliquée car le nombre d'acteurs intervenant potentiellement à cette étape est important. La quantité importante de marqueurs nécessaires pour une telle analyse justifie l'utilisation de la cytométrie de masse, une technologie innovante qui combine la

cytométrie en flux à la spectrométrie de masse, en utilisant des anticorps conjugués à des métaux lourds plutôt qu'à des fluorochromes. Les cellules sont marquées de la même manière par les anticorps et passées une à une au niveau du cytomètre puis analysées grâce au spectromètre de masse détectant les métaux couplés, permettant ainsi l'analyse d'un grand nombre de paramètres simultanément (35 métaux lourds disponibles à ce jour) sans le problème de compensation des fluorescences (*spillover*).¹²²

Le panel d'anticorps a été développé pour permettre l'étude de plusieurs types leucocytaires, acteurs de la réponse innée et potentiellement impliqués dans la lutte contre le virus influenza :

- Les cellules NK, connues pour leurs propriétés cytotoxiques,
- Les granulocytes pour étudier l'inflammation précoce non décelable avec les données de NFS,
- Les monocytes,
- Les DC myéloïdes et les DC plasmacytoïdes, qui jouent un rôle clé dans la lutte contre les infections virales¹²¹ (en particulier les plasmacytoïdes par la sécrétion précoce des IFN de type I¹²³),
- Et les lymphocytes B, T CD4 et T CD8 dans le cas où la réponse mémoire serait déclenchée au stade précoce de la réponse immune.

Nous avons élaboré un panel classique pour étudier ces populations et nous avons souhaité ajouter des marqueurs particuliers à l'infection virale grippale : l'IFN- γ , une cytokine pro-inflammatoire antivirale ¹²⁴ et les *Toll-like receptor* 3 et 7 (TLR-3 et TLR-7) en tant que récepteurs spécifiques des virus ARN.

Les TLR sont des récepteurs de l'immunité innée. Ils sont présents à la surface des cellules de l'immunité innée et reconnaissent des motifs conservés de nature très diverse (protéines, oses, acides nucléiques) chez de nombreux pathogènes (bactéries, virus, parasites). Ces récepteurs sont impliqués dans la sécrétion de cytokines potentiellement inflammatoires et dans l'activation cellulaire.¹²⁵

Le TLR-3 est un récepteur endosomal présent à la surface des monocytes et des DC et est spécialisé dans la reconnaissance des ARNs doubles brins.¹²⁶ Le TLR-7 est spécialisé dans la reconnaissance des ARNs simple brin et est présent à la surface des DC plasmacytoïdes.¹²⁷ Ainsi,

il est fort probable que ces deux récepteurs soient impliqués dans le déclenchement de la réponse immune antigrippale. (Le marqueur TLR7 a pour l'instant été écarté du panel en raison des tests non concluants sur des échantillons, cependant il pourrait être inséré par la suite en testant d'autres clones d'anticorps). Le panel final est composé de 32 marqueurs (Figure 28). Les données que va générer l'acquisition des échantillons sur le cytomètre de masse vont permettre de faire le lien entre la réponse innée et la réponse adaptative et éventuellement nous permettre de l'orienter.

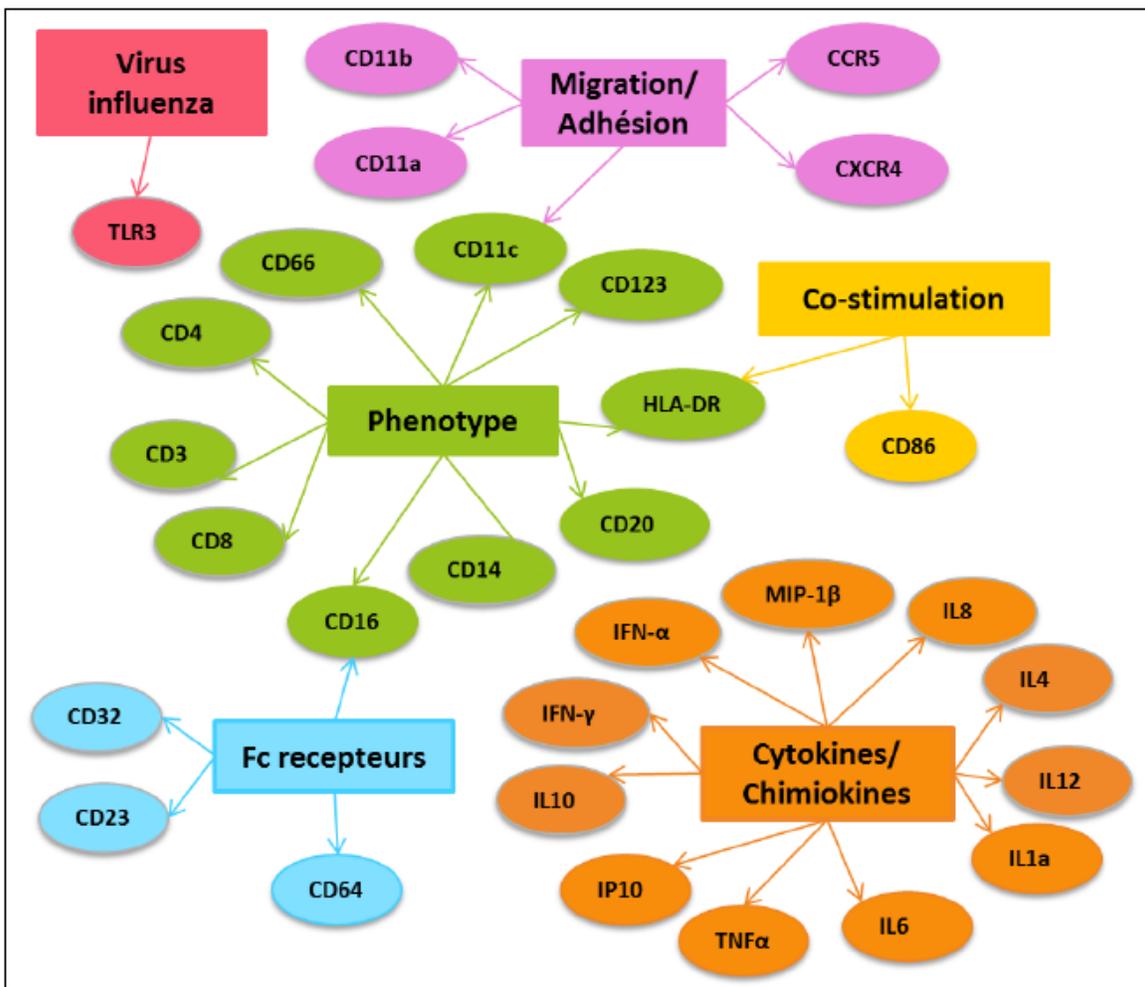


Figure 28. Représentation du panel de cytométrie de masse comprenant 32 marqueurs pour évaluer la réponse innée lors de l'infection grippale et la vaccination. Ce panel permet d'identifier différentes populations leucocytaires : les cellules NK, les granulocytes, les monocytes, les DC et les LT ainsi que leurs sécrétions potentielles (cytokines et chimiokines). Il permet également d'identifier des récepteurs Fc, des facteurs de co-stimulation et des marqueurs d'adhésion et de migration.

Il a été montré *in vitro* que le ciblage des DC n'était pas toujours suffisant pour stimuler une réponse immune, ce dernier peut être amélioré à l'aide de TLR. L'utilisation d'agonistes de ces récepteurs, comme l'acide polyinosinique-polycytidylique ou polyIC (un ARN double brin synthétique), agoniste du TLR-3 ou le R848 (composé imidazoquinoline) agoniste du TLR-7, pourrait alors permettre la stimulation d'une réponse cellulaire antivirale.

C'est dans cette optique que le marqueur du récepteur TLR-3 a été ajouté au panel de cytométrie de masse spécialement dans le cadre de l'infection grippe. L'anticorps anti-TLR7 fait l'objet de tests dans ce même but.

Une telle amélioration de la formule vaccinale envisagée s'inscrit dans les perspectives au long court de ce projet qui se décline en plusieurs étapes. Tout d'abord, il est nécessaire d'approfondir l'étude de la physiopathologie des infections grippales, notamment H1N1, dans le cadre du modèle expérimental sur macaque cynomolgus déjà mis en place au laboratoire. Il convient également de s'intéresser à d'autres sous-types viraux tels que H3N2 ou H7N9 en développant de nouveaux modèles expérimentaux. Il paraît important de se focaliser particulièrement sur la caractérisation de la réponse CD8 cytotoxique que nous cherchons à induire. La deuxième étape consisterait à immuniser les animaux avec un vaccin optimisé en fonction des données préalables accumulées au cours des études pilotes et selon les possibilités, c'est-à-dire le type de vaccins disponibles (vaccins ADN ou vaccins MVA, très étudiés au sein du laboratoire). Il convient aussi de sélectionner les antigènes ; l'étude nous démontre que les peptides issus de protéines internes NP et M1 semble constituer de bons candidats pour stimuler la réponse cellulaire. Suite au choix du vaccin et des antigènes, la stimulation et l'orientation de la réponse immune seraient évaluées avec les moyens employés lors de cette étude et avec des techniques innovantes (cytométrie de masse...). Puis, la dernière étape consisterait à infecter les macaques avec un virus hétérologue (différent du virus d'infection initial) afin d'évaluer l'efficacité du vaccin pour conférer une immunité croisée. Un vaccin efficace permettrait de diminuer le taux de contamination ou à minima la sévérité de l'infection grippale.

ANNEXES

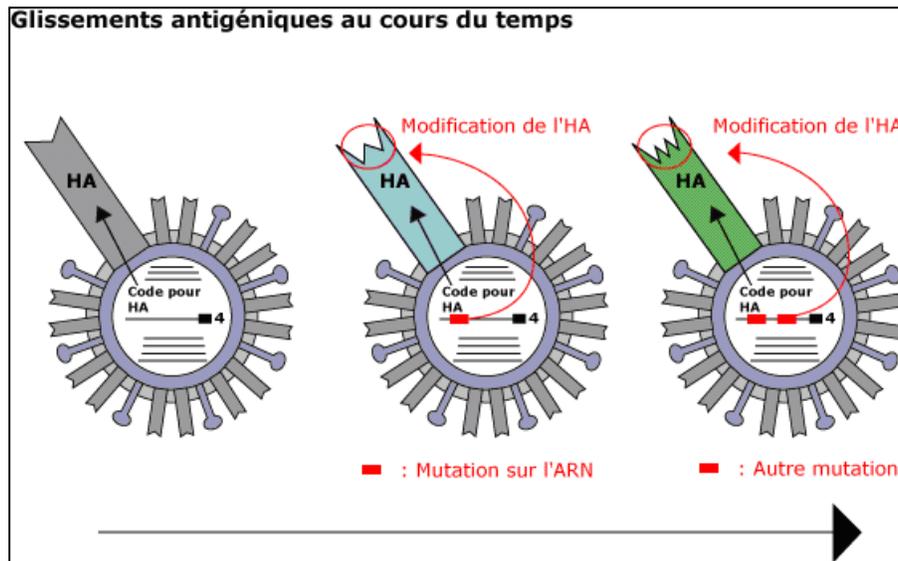


Figure Annexe 1. Mécanisme de glissements antigéniques du virus influenza A au cours du temps (d'après ¹²⁸) à l'origine des mutations fréquentes des protéines HA et NA. Ces mutations sont dues aux erreurs répétées de l'ARN polymérase virale qui ne possède pas de mécanisme d'autocorrection, en résulte un taux important de substitutions par an dans le génome viral. Ces mutations de surface permettent au virus d'échapper au système immunitaire.

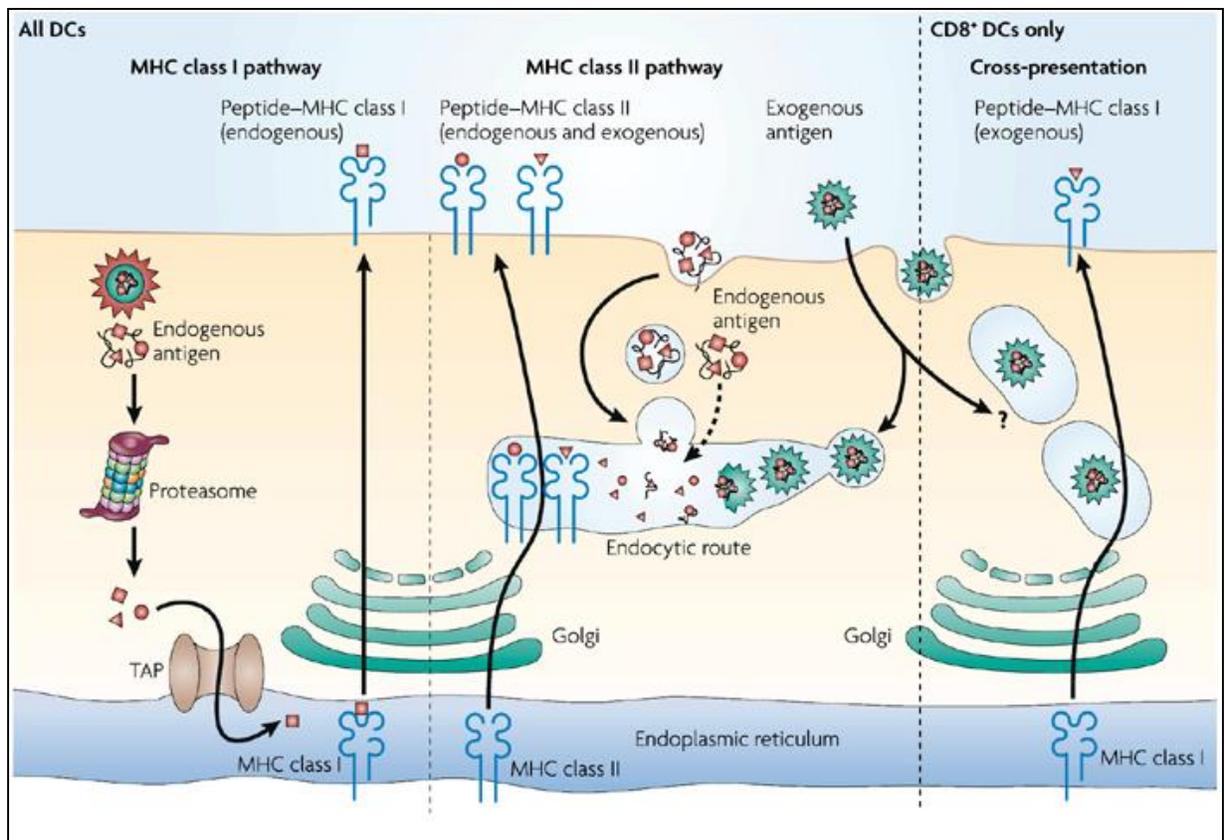


Figure Annexe 2. Mécanisme de la présentation des antigènes extra et intracellulaire par les DC aux lymphocytes T CD4 et CD8 par le CMH I et II (d'après ⁹⁶). Les antigènes extracellulaires sont internalisés dégradés et les peptides sont présentés à la surface par le CMH I aux lymphocytes T CD4. Les antigènes intracellulaires sont eux dégradés par le protéasome puis présentés par le CMH I aux lymphocytes T CD8. Il existe une troisième voie de présentation : la présentation croisée effectuée par les DC CD8⁺ qui permet la présentation de peptides extracellulaires par le CMH I aux lymphocytes CD8.

Jour post injection/immunisation	Date	Manipulations	Prélèvements
-20	04/02/2015	Examen clinique, poids et températures NFS Dosage sérum : CRP et cytokines Mesure cytokines intracellulaires sur PBMC et cellules de LBA (ICS) Congélation de sang total (CyTOF)	1mL EDTA 2,5mL sec 8mL CPT et LBA 2mL Lithium Héparine
0	24/02/2015	Injection du tampon Arginine Examen clinique, poids et températures Congélation de sang total (CyTOF)	2mL Lithium Héparine
1	25/02/2015	Examen clinique, poids et températures NFS Dosage sérum : CRP et cytokines Congélation de sang total (CyTOF)	1mL EDTA 2,5mL sec 2mL Lithium Héparine
3	27/02/2015	Examen clinique, poids et températures NFS Dosage sérum : CRP et cytokines	1mL EDTA 2,5mL sec
7	03/03/2015	Examen clinique, poids et températures NFS Dosage sérum : CRP et cytokines Mesure cytokines intracellulaires sur PBMC et cellules de LBA (ICS)	1mL EDTA 2,5mL sec 8mL CPT et LBA
28	23/03/2015	Examen clinique, poids et températures NFS Dosage sérum : CRP et cytokines Mesure cytokines intracellulaires sur PBMC et cellules de LBA (ICS) Congélation de sang total (CyTOF)	1mL EDTA 2,5mL sec 8mL CPT et LBA 2mL Lithium Héparine
0	07/04/2015	Immunisation avec les protéines de fusion/ IMMUGRIP Examen clinique, poids et températures Congélation de sang total (CyTOF)	2mL Lithium Héparine
1	08/04/2015	Examen clinique, poids et températures NFS Dosage sérum : CRP et cytokines Congélation de sang total (CyTOF)	1mL EDTA 2,5mL sec 2mL Lithium Héparine
3	10/04/2015	Examen clinique, poids et températures NFS Dosage sérum : CRP et cytokines	1mL EDTA 2,5mL sec
7	14/10/2015	Examen clinique, poids et températures NFS Dosage sérum : CRP et cytokines Mesure cytokines intracellulaires sur PBMC et cellules de LBA (ICS)	1mL EDTA 2,5mL sec 8mL CPT et LBA
14	21/04/2015	Examen clinique, poids et températures NFS Dosage sérum : CRP et cytokines Mesure cytokines intracellulaires sur PBMC et cellules de LBA (ICS)	1mL EDTA 2,5mL sec 8mL CPT et LBA
21	28/04/2015	Examen clinique, poids et températures NFS Dosage sérum : CRP et cytokines	1mL EDTA 2,5mL sec
28	05/05/2015	Examen clinique, poids et températures NFS Dosage sérum : CRP et cytokines Mesure cytokines intracellulaires sur PBMC et cellules de LBA (ICS)	1mL EDTA 2,5mL sec 8mL CPT et LBA

Tableau Annexe 1. Tableau du planning de l'étude récapitulant les différentes manipulations et les prélèvements associés aux différentes dates.

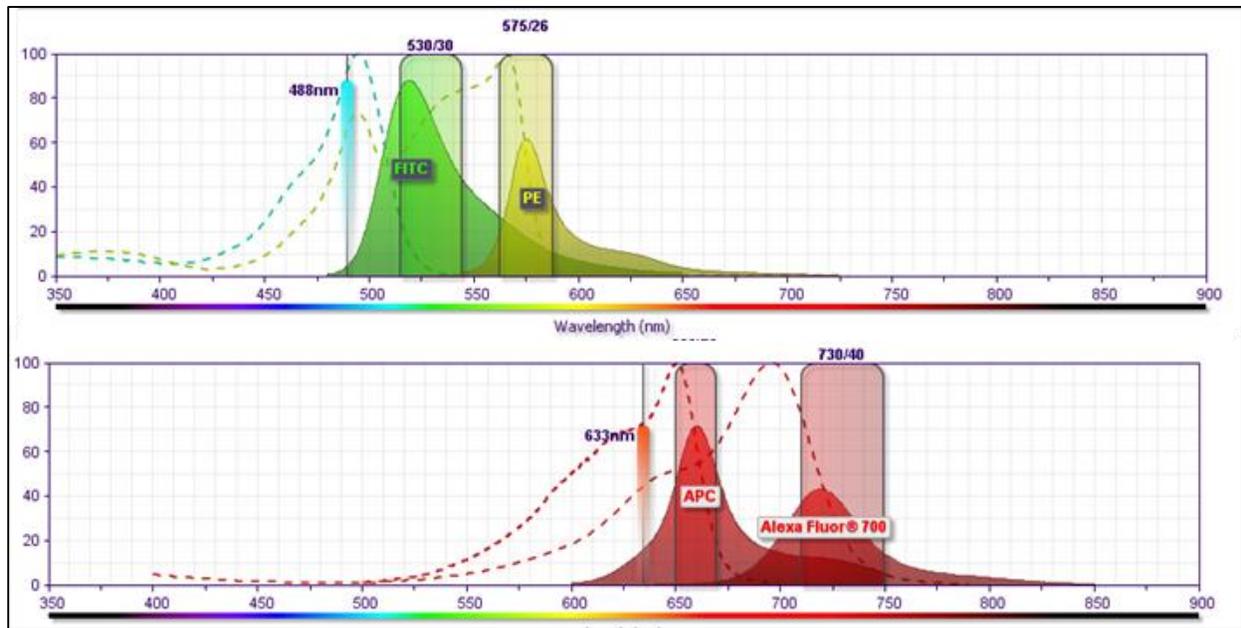


Figure Annexe 3. Schéma représentant le phénomène de *spillover*. Il s'agit d'un phénomène de recouvrement des spectres d'émissions des fluorochromes. On observe une fuite optique : les filtres ne suffisent pas à discriminer les fluorescences de deux fluorochromes analysés en même temps. Par exemple, sur le diagramme du haut, on a une émission de la fluorescence émise par le FITC dans le champ d'émission du PE. Idem pour l'APC et l'AlexaFluor 700. Sur le diagramme du bas. Une compensation électronique appliquée en temps réelle ou calculée permet d'éliminer les contaminations.

Bibliographie

1. Cox, D. N. J., Brammer, T. L. & Regnery, H. L. Influenza: Global surveillance for epidemic and pandemic variants. *Eur. J. Epidemiol.* **10**, 467–470 (1994).
2. Gisèle Lagathu, R. C. Grippe : vaccination, prophylaxie et traitement par les antiviraux. *Médecine Thérapeutique* **Volume 16**, (2010).
3. Fouchier, R. A. M. *et al.* Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J. Virol.* **79**, 2814–2822 (2005).
4. Wang, T. T. & Palese, P. Universal epitopes of influenza virus hemagglutinins? *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 233–234 (2009).
5. Munier, S., Moisy, D., Marc, D. & Naffakh, N. [Interspecies transmission, adaptation to humans and pathogenicity of animal influenza viruses]. *Pathol. Biol. (Paris)* **58**, e59–68 (2010).
6. Xu, X., Zhu, X., Dwek, R. A., Stevens, J. & Wilson, I. A. Structural Characterization of the 1918 Influenza Virus H1N1 Neuraminidase. *J. Virol.* **82**, 10493–10501 (2008).
7. Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A. & Klenk, H.-D. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J. Virol.* **78**, 12665–12667 (2004).
8. Pielak, R. M. & Chou, J. J. Influenza M2 proton channels. *Biochim. Biophys. Acta* **1808**, 522–529 (2011).
9. Bouvier, N. M. & Palese, P. THE BIOLOGY OF INFLUENZA VIRUSES. *Vaccine* **26**, D49–D53 (2008).
10. Lamb, R. A. & Choppin, P. W. The gene structure and replication of influenza virus. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 467–506 (1983).
11. Nicholson, K. G., Wood, J. M. & Zambon, M. Influenza. *Lancet* **362**, 1733–1745 (2003).
12. Honda, A. *et al.* Purification and molecular structure of RNA polymerase from influenza virus A/PR8. *J. Biochem. (Tokyo)* **107**, 624–628 (1990).
13. Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC236644/>>
14. Poole, E., Elton, D., Medcalf, L. & Digard, P. Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology* **321**, 120–133 (2004).
15. Shi, L., Summers, D. F., Peng, Q. & Galarza, J. M. Influenza A Virus RNA Polymerase Subunit PB2 Is the Endonuclease Which Cleaves Host Cell mRNA and Functions Only as the Trimeric Enzyme. *Virology* **208**, 38–47 (1995).
16. Huarte, M., Sanz-Ezquerro, J. J., Roncal, F., Ortín, J. & Nieto, A. PA Subunit from Influenza Virus Polymerase Complex Interacts with a Cellular Protein with Homology to a Family of Transcriptional Activators. *J. Virol.* **75**, 8597–8604 (2001).
17. O’Neill, R. E., Talon, J. & Palese, P. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J.* **17**, 288–296 (1998).
18. Neumann, G., Hughes, M. T. & Kawaoka, Y. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J.* **19**, 6751–6758 (2000).
19. Richardson, J. C. & Akkina, R. K. NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Arch. Virol.* **116**, 69–80 (1991).

20. Baigent, S. J. & McCauley, J. W. Influenza type A in humans, mammals and birds: determinants of virus virulence, host-range and interspecies transmission. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **25**, 657–671 (2003).
21. Hale, B. G., Randall, R. E., Ortin, J. & Jackson, D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* **89**, 2359–2376 (2008).
22. Rogers, G. N. & Paulson, J. C. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* **127**, 361–373 (1983).
23. Shinya, K. *et al.* Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* **440**, 435–436 (2006).
24. Nicholls, J. M. *et al.* Tropism of avian influenza A (H5N1) in the upper and lower respiratory tract. *Nat. Med.* **13**, 147–149 (2007).
25. Samji, T. Influenza A: Understanding the Viral Life Cycle. *Yale J. Biol. Med.* **82**, 153–159 (2009).
26. Rossman, J. S. & Lamb, R. A. Influenza Virus Assembly and Budding. *Virology* **411**, 229–236 (2011).
27. Shangguan, T. *et al.* Morphological changes and fusogenic activity of influenza virus hemagglutinin. *Biophys. J.* **74**, 54–62 (1998).
28. Bullough, P. A., Hughson, F. M., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* **371**, 37–43 (1994).
29. Ghedin, E. *et al.* Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature* **437**, 1162–1166 (2005).
30. Reid, A. H., Fanning, T. G., Hultin, J. V. & Taubenberger, J. K. Origin and evolution of the 1918 ‘Spanish’ influenza virus hemagglutinin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 1651–1656 (1999).
31. Buisson, Y., Nicand, É. & Saliou, P. *La grippe en face.* (Xavier Montauban SA, 2007).
32. Taubenberger, J. K. & Morens, D. M. Influenza: The Once and Future Pandemic. *Public Health Rep.* **125**, 16–26 (2010).
33. Olsen, B. *et al.* Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. *Science* **312**, 384–388 (2006).
34. Bodewes, R. *et al.* Recurring Influenza B Virus Infections in Seals. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 511–512 (2013).
35. CDC. Avian Influenza A virus infections in Humans. (2015). at <<http://www.cdc.gov/flu/avianflu/avian-in-humans.htm>>
36. De Jong, M. D. *et al.* Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat. Med.* **12**, 1203–1207 (2006).
37. European Centre for Disease, Prevention and Control. Influenza, in Swine. at <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/swine_influenza/Pages/index.aspx>
38. Shinde, V. *et al.* Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005–2009. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2616–2625 (2009).
39. Dandagi, G. L. & Byahatti, S. M. An insight into the swine-influenza A (H1N1) virus infection in humans. *Lung India Off. Organ Indian Chest Soc.* **28**, 34–38 (2011).
40. Garten, R. J. *et al.* Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* **325**, 197–201 (2009).
41. Beveridge, W. I. The chronicle of influenza epidemics. *Hist. Philos. Life Sci.* **13**, 223–234 (1991).

42. Potter, C. w. A history of influenza. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 572–579 (2001).
43. Beveridge, W. I. The start of pandemics: site, season and spread. *Dev. Biol. Stand.* **39**, 443–444 (1977).
44. Walters, J. H. Influenza 1918: the contemporary perspective. *Bull. N. Y. Acad. Med.* **54**, 855–864 (1978).
45. Medina, R. A. & García-Sastre, A. Influenza A viruses: new research developments. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 590–603 (2011).
46. Johnson, N. P. A. S. & Mueller, J. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 ‘Spanish’ influenza pandemic. *Bull. Hist. Med.* **76**, 105–115 (2002).
47. Morens, D. M., Taubenberger, J. K. & Fauci, A. S. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J. Infect. Dis.* **198**, 962–970 (2008).
48. Taubenberger, J. K. & Morens, D. M. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 15–22 (2006).
49. De Clercq, E. Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 1015–1025 (2006).
50. Creanga, A. A. *et al.* Severity of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in pregnant women. *Obstet. Gynecol.* **115**, 717–726 (2010).
51. WHO. *Weekly epidemiological record-Seroepidemiological studies of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus 11 june 2010.* at <<http://www.who.int/wer/2010/wer8524.pdf>>
52. Sophie Vaux. *BEH Numéro thématique – Épidémie de grippe A(H1N1)2009: premiers éléments de bilan en France- 29 juin 2010.* at <http://www.invs.sante.fr/beh/2010/24_25_26/beh_24_25_26_2010.pdf>
53. Kowalczyk, A. & Markowska-Daniel, I. Phylogenetic evolution of swine-origin human influenza virus: a pandemic H1N1 2009. *Pol. J. Vet. Sci.* **13**, 491–500 (2010).
54. WHO. Influenza vaccines- WHO position paper august 2005. at <http://www.who.int/immunization/wer8033influenza_August2005_position_paper.pdf>
55. *Campagne de vaccination contre la grippe saisonnière: la mobilisation continue.* (Institut de veille sanitaire, 2014).
56. *2014-2015 Influenza Season- weekd 20 ending May 23, 2015.*
57. Brydon, E. W. A., Morris, S. J. & Sweet, C. Role of apoptosis and cytokines in influenza virus morbidity. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 837–850 (2005).
58. Tamura, S. & Kurata, T. Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa. *Jpn. J. Infect. Dis.* **57**, 236–247 (2004).
59. Subbarao, K. & Joseph, T. Scientific barriers to developing vaccines against avian influenza viruses. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 267–278 (2007).
60. *VidalRECOs recommandations en pratique 2014.*
61. CDC. Flu Symptoms & Severity | Seasonal Influenza (Flu) | CDC. at <<http://www.cdc.gov/flu/about/disease/symptoms.htm>>
62. CMIT, Rapp, C., Pulcini, C. & Tattevin, P. *E. Pilly 2016 : Maladies infectieuses et tropicales.* (Alinéa Plus, 2015).
63. CDC. Children, the Flu, and the Flu Vaccine | Seasonal Influenza (Flu) | CDC. at <<http://www.cdc.gov/flu/protect/children.htm>>
64. Influenza A among Patients with Human Immunodeficiency Virus: An Outbreak of Infection at a Residential Facility in New York City. at <<http://cid.oxfordjournals.org/content/32/12/1784.long>>

65. Vilchez, R. A. *et al.* Influenza Virus Infection in Adult Solid Organ Transplant Recipients. *Am. J. Transplant.* **2**, 287–291 (2002).
66. Dong, G. *et al.* Adamantane-Resistant Influenza A Viruses in the World (1902–2013): Frequency and Distribution of M2 Gene Mutations. *PLoS ONE* **10**, (2015).
67. Dobson, J., Whitley, R. J., Pocock, S. & Monto, A. S. Oseltamivir treatment for influenza in adults: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet Lond. Engl.* **385**, 1729–1737 (2015).
68. Hiba, V. *et al.* Benefit of early treatment with oseltamivir in hospitalized patients with documented 2009 influenza A (H1N1): retrospective cohort study. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 1150–1155 (2011).
69. Les antiviraux - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. at <<http://ansm.sante.fr/Dossiers/Pandemie-grippale/Les-antiviraux/%28offset%29/1>>
70. Aoki, F. Y. *et al.* Early administration of oral oseltamivir increases the benefits of influenza treatment. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 123–129 (2003).
71. HAS. Résumé des Caractéristiques du Produit - Tamiflu - Oseltamivir. (2009). at <http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/0b945075fb03f82fa35daeb7fd928810.pdf>
72. HAS. Résumé des Caractéristiques du Produit - Relenza - Zanamivir. (2007). at <http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/ct-4715_relenza.pdf>
73. ANSM. RECOMMANDATIONS SUR L'UTILISATION DE TAMIFLU® (Oseltamivir) CHEZ LES NOURRISSONS DE MOINS DE 1 AN POUR LA PREPARATION D'UNE SOLUTION BUVALE. (2009). at <http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/6038cd1a84a96e2fd0ad9d5b7e411c01.pdf>
74. Moscona, A. Global Transmission of Oseltamivir-Resistant Influenza. *N. Engl. J. Med.* **360**, 953–956 (2009).
75. InVS. Cas groupés de résistance à l'oseltamivir, USA - cas_groupes_A(H1N1)2009_resistant_oseltamivir_. (2009). at <[http://www.invs.sante.fr/international/notes/cas_groupes_A\(H1N1\)2009_resistant_oseltamivir_251109.pdf](http://www.invs.sante.fr/international/notes/cas_groupes_A(H1N1)2009_resistant_oseltamivir_251109.pdf)>
76. Influenza Antiviral Drug Resistance | Seasonal Influenza (Flu) | CDC. at <<http://www.cdc.gov/flu/about/qa/antiviralresistance.htm>>
77. Subbramanian, R. A., Basha, S., Shata, M. T., Brady, R. C. & Bernstein, D. I. Pandemic and seasonal H1N1 influenza hemagglutinin-specific T cell responses elicited by seasonal influenza vaccination. *Vaccine* **28**, 8258–8267 (2010).
78. Davenport, F. M., Hennessy, A. V. & Francis, T. EPIDEMIOLOGIC AND IMMUNOLOGIC SIGNIFICANCE OF AGE DISTRIBUTION OF ANTIBODY TO ANTIGENIC VARIANTS OF INFLUENZA VIRUS. *J. Exp. Med.* **98**, 641–656 (1953).
79. WHO | Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2015-2016 northern hemisphere influenza season. *WHO* at <http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2015_16_north/en/>
80. *Bulletin 22/15 Office fédéral de la santé publique.*
81. Ministère des affaires sociales de la santé et des droits des femmes. Calendrier des vaccination et recommandations vaccinales 2015-. at <http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Calendrier_vaccinal_2015.pdf>
82. CDC. Prevention and Control of Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory

- Committee on Immunization Practices, United States, 2015–16 Influenza Season. at <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6430a3.htm>>
83. Ambrose, C. S., Levin, M. J. & Belshe, R. B. The relative efficacy of trivalent live attenuated and inactivated influenza vaccines in children and adults. *Influenza Other Respir. Viruses* **5**, 67–75 (2011).
 84. Live Attenuated versus Inactivated Influenza Vaccine in Infants and Young Children — NEJM. at <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa065368>>
 85. Ashkenazi, S. *et al.* Superior relative efficacy of live attenuated influenza vaccine compared with inactivated influenza vaccine in young children with recurrent respiratory tract infections. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **25**, 870–879 (2006).
 86. Martín Arias, L. H., Sanz, R., Sáinz, M., Treceño, C. & Carvajal, A. Guillain-Barré syndrome and influenza vaccines: A meta-analysis. *Vaccine* **33**, 3773–3778 (2015).
 87. Playford, E. G. *et al.* Intradermal recombinant hepatitis B vaccine for healthcare workers who fail to respond to intramuscular vaccine. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **23**, 87–90 (2002).
 88. Nardelli-Haeffliger, D. *et al.* Specific Antibody Levels at the Cervix During the Menstrual Cycle of Women Vaccinated With Human Papillomavirus 16 Virus–Like Particles. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**, 1128–1137 (2003).
 89. Johansson, E.-L., Wassén, L., Holmgren, J., Jertborn, M. & Rudin, A. Nasal and Vaginal Vaccinations Have Differential Effects on Antibody Responses in Vaginal and Cervical Secretions in Humans. *Infect. Immun.* **69**, 7481–7486 (2001).
 90. Kim, M.-C. *et al.* Supplementation of Influenza Split Vaccines with Conserved M2 Ectodomains Overcomes Strain Specificity and Provides Long-term Cross Protection. *Mol. Ther.* **22**, 1364–1374 (2014).
 91. Kim, M.-C. *et al.* Influenza M2 virus-like particles confer a broader range of cross protection to the strain-specific pre-existing immunity. *Vaccine* **32**, 5824–5831 (2014).
 92. Ellebedy, A. H. *et al.* Induction of broadly cross-reactive antibody responses to the influenza HA stem region following H5N1 vaccination in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 13133–13138 (2014).
 93. Whittle, J. R. R. *et al.* Broadly neutralizing human antibody that recognizes the receptor-binding pocket of influenza virus hemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 14216–14221 (2011).
 94. Ekiert, D. C. *et al.* Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science* **324**, 246–251 (2009).
 95. Fan, X. *et al.* Targeting the HA2 subunit of influenza A virus hemagglutinin via CD40L provides universal protection against diverse subtypes. *Mucosal Immunol.* **8**, 211–220 (2015).
 96. Villadangos, J. A. & Schnorrer, P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 543–555 (2007).
 97. La Gruta, N. L. & Turner, S. J. T cell mediated immunity to influenza: mechanisms of viral control. *Trends Immunol.* **35**, 396–402 (2014).
 98. Hillaire, M. L. B., Osterhaus, A. D. M. E. & Rimmelzwaan, G. F. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes as a basis for the development of broadly protective influenza vaccines. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 939860 (2011).
 99. Gotch, F., Rothbard, J., Howland, K., Townsend, A. & McMichael, A. Cytotoxic T lymphocytes recognize a fragment of influenza virus matrix protein in association with HLA-A2. *Nature* **326**, 881–882 (1987).
 100. Yewdell, J. W., Bennink, J. R., Smith, G. L. & Moss, B. Influenza A virus nucleoprotein is

- a major target antigen for cross-reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 1785–1789 (1985).
101. Lee, L. Y.-H. *et al.* Memory T cells established by seasonal human influenza A infection cross-react with avian influenza A (H5N1) in healthy individuals. *J. Clin. Invest.* **118**, 3478–3490 (2008).
 102. Sridhar, S. *et al.* Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza. *Nat. Med.* **19**, 1305–1312 (2013).
 103. Weinfurter, J. T. *et al.* Cross-Reactive T Cells Are Involved in Rapid Clearance of 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus in Nonhuman Primates. *PLoS Pathog.* **7**, (2011).
 104. Kreijtz, J. H. C. M. *et al.* Infection of mice with a human influenza A/H3N2 virus induces protective immunity against lethal infection with influenza A/H5N1 virus. *Vaccine* **27**, 4983–4989 (2009).
 105. Lenz, A., Heine, M., Schuler, G. & Romani, N. Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization. *J. Clin. Invest.* **92**, 2587–2596 (1993).
 106. Kuiken, T., van den Brand, J., van Riel, D., Pantin-Jackwood, M. & Swayne, D. E. Comparative pathology of select agent influenza a virus infections. *Vet. Pathol.* **47**, 893–914 (2010).
 107. Barnard, D. L. Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy. *Antiviral Res.* **82**, A110–A122 (2009).
 108. Ogawa, L. M. & Vallender, E. J. Genetic substructure in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) on the island of Mauritius. *BMC Genomics* **15**, (2014).
 109. Richt, J. A. *et al.* Recently Emerged Swine Influenza A Virus (H2N3) Causes Severe Pneumonia in Cynomolgus Macaques. *PLoS ONE* **7**, e39990 (2012).
 110. Herfst, S. *et al.* Pandemic 2009 H1N1 influenza virus causes diffuse alveolar damage in cynomolgus macaques. *Vet. Pathol.* **47**, 1040–1047 (2010).
 111. Ledgerwood, J. E. *et al.* DNA priming for seasonal influenza vaccine: a phase 1b double-blind randomized clinical trial. *PloS One* **10**, e0125914 (2015).
 112. Kamlangdee, A., Kingstad-Bakke, B., Anderson, T. K., Goldberg, T. L. & Osorio, J. E. Broad protection against avian influenza virus by using a modified vaccinia Ankara virus expressing a mosaic hemagglutinin gene. *J. Virol.* **88**, 13300–13309 (2014).
 113. Flamar, A.-L. *et al.* Targeting concatenated HIV antigens to human CD40 expands a broad repertoire of multifunctional CD4+ and CD8+ T cells. *AIDS Lond. Engl.* **27**, 2041–2051 (2013).
 114. Ni, L. *et al.* Concomitant activation and antigen uptake via human dectin-1 results in potent antigen-specific CD8+ T cell responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 3504–3513 (2010).
 115. Palucka, K., Ueno, H., Zurawski, G., Fay, J. & Banchereau, J. Building on dendritic cell subsets to improve cancer vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 258–263 (2010).
 116. Romain, G. *et al.* CD34-derived dendritic cells transfected ex vivo with HIV-Gag mRNA induce polyfunctional T-cell responses in nonhuman primates. *Eur. J. Immunol.* **42**, 2019–2030 (2012).
 117. Frentsch, M. *et al.* Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat. Med.* **11**, 1118–1124 (2005).
 118. Parameswaran, S., Khalil, M., Ahmed, K. A., Sharma, R. K. & Xiang, J. Enhanced protective immunity derived from dendritic cells with phagocytosis of CD40 ligand

- transgene-engineered apoptotic tumor cells via increased dendritic cell maturation. *Tumori* **0**, 0 (2015).
119. Wolfl, M. *et al.* Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8⁺ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities. *Blood* **110**, 201–210 (2007).
 120. Le Borgne, S. *et al.* In Vivo Induction of Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Mice and Rhesus Macaques Immunized with DNA Vector Encoding an HIV Epitope Fused with Hepatitis B Surface Antigen. *Virology* **240**, 304–315 (1998).
 121. Jie, Z. *et al.* The rapid and sustained responses of dendritic cells to influenza virus infection in a non-human primate model. *Braz. J. Infect. Dis. Off. Publ. Braz. Soc. Infect. Dis.* **18**, 406–413 (2014).
 122. Bendall, S. C., Nolan, G. P., Roederer, M. & Chattopadhyay, P. K. A deep profiler's guide to cytometry. *Trends Immunol.* **33**, 323–332 (2012).
 123. Siegal, F. P. *et al.* The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* **284**, 1835–1837 (1999).
 124. Sen, G. C. Viruses and Interferons. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 255–281 (2001).
 125. Takeda, K. & Akira, S. in *Current Protocols in Immunology* (John Wiley & Sons, Inc., 2001). at <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142735.im1412s109/abstract>>
 126. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732–738 (2001).
 127. Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529–1531 (2004).
 128. loevenbruck. Evolution virale et menace pandémique — Acces. at <<http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/sante/epidemies-et-agents-infectieux/comprendre/grippe-aviaire/la-menace-pandemique>>

Vu, le Président du jury,

Berthe-Marie IMBERT-MARCILLE

Vu, le Directeur de thèse,

Stéphane BIRKLE

Vu, le Directeur de l'UFR,

Virginie FERRE

Nom - Prénoms : JOLY Candie

Titre de la thèse : Réponse cellulaire d'un vaccin antigrippal ciblant les DC - Etude chez le macaque cynomolgus.

Résumé de la thèse :

Les vaccins antigrippaux disponibles de nos jours sont d'efficacité moindre et ont montré leurs limites lors de cette saison d'épidémie hivernale 2014-2015, alors qu'une des souches circulantes a subi une mutation génétique. Pour pallier ce problème, de nouvelles stratégies sont élaborées, basées sur l'induction d'une réponse cellulaire médiée par les protéines internes et donc conservées des virus influenza A. C'est dans ce but d'orienter la réponse immune vers une réponse CD8 cytotoxique que nous avons testé un vaccin. Celui-ci est composé de protéines de fusion ciblant des cellules stratégiques dans le déclenchement de la réponse adaptative ; les DC et fusionnées à des protéines internes du virus influenza A. Le vaccin innovant a été injecté à 4 macaques cynomolgus en comparaison avec le vaccin commercial IMMUGRIP. L'efficacité du vaccin à stimuler la réponse innée au niveau systémique et muqueux, a été évalué par cytométrie en flux. Le vaccin a démontré sa capacité à stimuler une réponse LT CD8 au niveau systémique médiée par les protéines NP et M1. Cependant les données obtenues ne permettent pas de différencier les deux vaccins testés, c'est pourquoi cette réponse nécessite d'être caractérisée plus amplement.

MOTS CLÉS

Vaccin, Virus influenza A, Réponse cellulaire, Cytométrie en flux.

JURY

PRÉSIDENT : Mme Berthe-Marie IMBERT-MARCILLE, Professeur de Virologie

Faculté de Pharmacie de Nantes

ASSESEURS : Mr Stéphane BIRKLE, Maître de Conférences d'Immunologie

Faculté de Pharmacie de Nantes

Mme Vanessa CONTRERAS, Docteur en Immunologie

Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies renouvelables (CEA) 92 260 Fontenay-aux-Roses

Adresse de l'auteur :

16, Avenue Gustave Flaubert 44 350 GUERANDE