



HAL
open science

Composition génétique de semences vaccinales H3N2 et construction d'un virus vecteur : une histoire d'encapsidation de segments chez les virus influenza de type A

Corinne Bergeron

► To cite this version:

Corinne Bergeron. Composition génétique de semences vaccinales H3N2 et construction d'un virus vecteur : une histoire d'encapsidation de segments chez les virus influenza de type A. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2009. Français. NNT : 2009LYO10332 . tel-00625467

HAL Id: tel-00625467

<https://theses.hal.science/tel-00625467>

Submitted on 21 Sep 2011

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

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

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I

DIPLOME de DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

Spécialité : Virologie

Ecole Doctorale : Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation

par

Mlle Corinne BERGERON

**Composition génétique de semences vaccinales H3N2
et construction d'un virus vecteur :
une histoire d'encapsidation de segments chez les virus influenza de type A.**

Directeur de thèse : Pr. Bruno LINA

Présentée et soutenue publiquement le **11 décembre 2009** devant un jury composé de :

Pr Patrick POTIER	Président du jury
Dr Béatrice RITEAU	Rapporteur
Dr Patrick MAVINGUI	Rapporteur
Pr Jacques IZOPET	Rapporteur
Dr Isabelle LEGASTELOIS	Examinatrice
Dr Michèle OTTMANN	Examinatrice
Pr Bruno LINA	Directeur de thèse

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I

DIPLOME de DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

Spécialité : Virologie

Ecole Doctorale : Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation

par

Mlle Corinne BERGERON

**Composition génétique de semences vaccinales H3N2
et construction d'un virus vecteur :
une histoire d'encapsidation de segments chez les virus influenza de type A.**

Directeur de thèse : Pr. Bruno LINA

Présentée et soutenue publiquement le **11 décembre 2009** devant un jury composé de :

Pr Patrick POTIER	Président du jury
Dr Béatrice RITEAU	Rapporteur
Dr Patrick MAVINGUI	Rapporteur
Pr Jacques IZOPET	Rapporteur
Dr Isabelle LEGASTELOIS	Examinatrice
Dr Michèle OTTMANN	Examinatrice
Pr Bruno LINA	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

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

Secrétaire Général

M. le Professeur L. Collet

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

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

Institut Universitaire de Technologie A

Institut Universitaire de Technologie B

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. Le Professeur F. Gieres

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur R. Lamartine

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M R. Bernard

Je remercie le Pr Bruno LINA, le directeur de la CNRS FRE 3011, pour m'avoir accueillie dans son unité, et le directeur de thèse, pour m'avoir soutenue, encouragée et aidée, au cours de cette thèse, en dépit de son manque de disponibilité en ses temps de pandémie (grippale...).

Je tiens à témoigner toute ma gratitude la personne qui m'a encadré, le Dr Michèle OTTMANN pour son aide inestimable et l'intérêt constant ainsi que la confiance qu'elle a porté à mon travail mais aussi pour sa bonne humeur, son dynamisme et ses encouragements qui m'ont permis de ne pas baisser les bras et pourtant ...

Je suis extrêmement reconnaissante aux Drs Isabelle LEGASTÉLOIS, Béatrice RITTEAU, Patrick MAVINGUI ainsi qu'au Pr Patrick POTIER d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je ne voudrais oublier personne au sein de la CNRS FRE 3011, appartenant à l'équipe des « grippoux » (non grippés), mais également des autres équipes que composent notre unité : pour des discussions scientifiques éclairantes dans des moments d'obscurité, pour des lectures de manuscrits interminables entre Lyon et Grenoble, pour des aides inestimables notamment pour la construction d'un certain segment chimère, pour les moments de détente autour d'un café ou d'un tacos, aussi... Que dire à part : Merci !!!

Je suis extrêmement reconnaissante aux personnes de mon entourage pour m'avoir soutenue pendant trois ans et quelques mois et pour avoir su être compréhensifs (et patients) lors de mes moments de découragement, de ras-le-bol ou d'énervement... ainsi que pour avoir compris mon manque de disponibilité !!! C'est aussi grâce à vous... vraiment !

Résumé.

L'empaquetage des huit segments du génome des virus influenza de type A est une des étapes clef du cycle viral. Il intervient également dans l'apparition de virus réassortants, les virus pandémiques par exemple, ce qui en fait un enjeu fondamental de la recherche actuelle. Nous avons étudié ce mécanisme au cours de deux études, la première portant sur les vaccins antigrippaux (réassortiment), la seconde visant à construire un virus vecteur (incorporation d'un segment hétérologue). Les semences vaccinales sont obtenues par coinfection d'œufs de poule embryonnés avec deux souches virales une donneuse (souche circulante de référence) et une accepteuse (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8)). L'analyse de la composition génétique de treize semences vaccinales H3N2 montre que le segment PB1 de la souche donneuse est présent dans plus de 50 % des semences analysées et qu'une grande variété de réassortants, allant de 6:2 à 2:6 (PR8:H3N2), peut résulter de ces coinfections. Des expériences de compétition d'encapsidation de segments à l'aide de la génétique inverse révèlent que l'encapsidation sélective du segment PB1 dépend de son environnement génétique notamment l'origine virale des segments HA et NA. La seconde partie de mon travail de thèse a été consacrée à la construction d'un vecteur répliatif sur la base d'un virus influenza H3 naturel sans segment NA. Aucune des constructions contenant le transgène *gfp* n'a été incorporée dans les particules virales, contrairement à ce qui a été décrit dans la littérature. Bien que les mécanismes moléculaires régissant l'incorporation des segments des virus influenza A demeurent très complexes, le fond génétique semble être déterminant pour ce processus.

Title.

Genetic composition of H3N2 vaccine seeds and vector virus construction:

A story of packaging in type A Influenza viruses.

Abstract.

The packaging of the eight segments corresponding to the influenza A viruses genome is a key process of the viral replication as well as a stake of actual scientific researches because it leads to reassortant viruses, e.g. pandemic viruses. We studied the two main facets of influenza segment packaging: reassortment, during vaccine seeds production and foreign segment incorporation for influenza vector construction. Vaccine seeds are produced by coinfection of hens' eggs with two viruses, a donor one (reference circulating strain) and an acceptor one (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8)). Analysis of internal genetic composition of thirteen H3N2 vaccine seeds reveals that PB1 segment of H3N2 donor strain is incorporated in more than fifty per cent of the cases. Moreover, coinfection events lead to an extremely wide range of reassortants from 6:2 to 2:6 (PR8:H3N2). Segment incorporation competition assays performed using plasmid-based reverse genetics show that selective packaging of PB1 segment is based on genetic environment, i.e. viral origin of HA and NA segments. The second part of my PhD work has been devoted to replicative influenza vector based on H3 virus isolated from patients without NA segment at the native stage. None of the *gfp* transgenic constructions containing reporter gene have been incorporated in viral particles, contrary to literature studies performed using H1N1 laboratory-adapted strains. Even if molecular mechanisms controlling influenza A viruses segments incorporation remain still complex, genetic background seems to be an essential element which must be considered with interest.

Mots clefs.

Virus Influenza de type A – empaquetage – semence vaccinale – vecteur viral.

Key words.

Influenza A virus – packaging – vaccine – viral vector.

Sommaire.

SOMMAIRE.....	VII
INDEX DES FIGURES.....	X
INDEX DES TABLEAUX.....	XII
ABREVIATIONS.....	XIII
INTRODUCTION.....	1
I. HISTORIQUE DE LA MALADIE.....	2
1. <i>L'étymologie de la grippe.</i>	2
2. <i>Avant les certitudes, les suppositions.</i>	2
1) <i>Les traces au cours de l'Antiquité.</i>	2
2) <i>Au cours du Moyen Age.</i>	3
3. <i>A partir de 1510.</i>	4
4. <i>Le vingtième siècle.</i>	5
1) <i>L'étiologie de la grippe : bactérie ou virus ?</i>	5
2) <i>La pandémie de 1918-20, la meurtrière « grippe espagnole ».</i>	7
3) <i>La découverte d'un virus.</i>	9
4) <i>Les deux dernières pandémies du XXème siècle : 1957 et 1968.</i>	10
5. <i>De nos jours.</i>	12
1) <i>Les épidémies hivernales.</i>	12
2) <i>2009 : une nouvelle pandémie.</i>	13
II. LE VIRUS.....	15
1. <i>Classification et nomenclature.</i>	15
2. <i>Structure du virion.</i>	17
1) <i>Le génome viral.</i>	17
2) <i>Le segment 1 : PB2.</i>	19
3) <i>Le segment 2 : PB1.</i>	20
a. <i>La protéine PB1.</i>	21
b. <i>La protéine PB1-F2.</i>	22
c. <i>Une troisième protéine.</i>	23
4) <i>Le segment 3 : PA.</i>	23
5) <i>Le segment 4 : HA.</i>	25
6) <i>Le segment 5 : NP.</i>	27
7) <i>Le segment 6 : NA.</i>	28
8) <i>Le segment 7 : M.</i>	29
a. <i>La protéine de matrice M1.</i>	30
b. <i>Le canal à protons M2.</i>	30
9) <i>Le segment 8 : NS</i>	31
a. <i>La protéine non structurale 1 (NS1).</i>	31
b. <i>La protéine d'export nucléaire (NEP, anciennement NS2)</i>	33
3. <i>Le cycle viral (Figure 30).</i>	35
1) <i>Reconnaissance du récepteur et attachement du virus.</i>	35
2) <i>Fusion des membranes virale et cellulaire.</i>	36
3) <i>Transport des RNPv jusqu'au noyau.</i>	37
4) <i>Transcription et réplication du génome.</i>	38
5) <i>Export des RNPv et transport jusqu'aux radeaux lipidiques.</i>	39
6) <i>Acheminement des protéines jusqu'à la membrane apicale.</i>	40
7) <i>Empaquetage du génome viral et assemblage.</i>	42
8) <i>Bourgeoisement et libération de nouvelles particules virales.</i>	43
4. <i>L'évolution des virus influenza de type A.</i>	44
1) <i>La dérive antigénique.</i>	44
2) <i>La cassure antigénique.</i>	45
III. EPIDEMIOLOGIE DE LA GRIPPE.....	46
1. <i>Réservoir naturel du virus.</i>	46
2. <i>Transmission inter-espèce de la maladie.</i>	47
3. <i>Transmission inter-humaine des virus influenza.</i>	47
4. <i>La grippe et l'hiver.</i>	48

IV.	PREVENTION ET CONTROLE.....	49
1.	<i>Les réseaux de surveillance.</i>	49
2.	<i>Les antiviraux.</i>	50
1)	<i>L'amantadine et ses dérivés.</i>	50
2)	<i>Les inhibiteurs de neuraminidase.</i>	51
3.	<i>Le vaccin antigrippal.</i>	53
1)	<i>Généralités sur les vaccins.</i>	53
2)	<i>Historique du vaccin antigrippal.</i>	54
3)	<i>Mode de fabrication du vaccin antigrippal.</i>	55
4)	<i>Les différents types de vaccins.</i>	58
a.	<i>Les vaccins inactivés.</i>	58
b.	<i>Les vaccins atténués.</i>	59
5)	<i>L'efficacité du vaccin antigrippal.</i>	60
6)	<i>Les perspectives.</i>	61
a.	<i>Vaccins ADN.</i>	61
b.	<i>Vaccins universels</i>	61
c.	<i>Production sur cellules</i>	61
V.	L'EMPAQUETAGE DES RNPV.....	62
1)	<i>La nécessité de huit segments.</i>	62
2)	<i>Un empaquetage sélectif des segments, ...</i>	63
3)	<i>... des séquences spécifiques pour l'empaquetage des segments, ...</i>	63
4)	<i>... Mais également des mécanismes plus complexes !!!</i>	65
	OBJECTIFS	67
	MATERIELS ET METHODES.	70
I.	MATERIELS.....	71
1.	<i>Biologie Cellulaire.</i>	71
1)	<i>Cellules</i>	71
2)	<i>Milieux de Culture et compléments.</i>	71
3)	<i>Plastiques.</i>	71
4)	<i>Anticorps.</i>	72
5)	<i>Appareillage.</i>	72
6)	<i>Autres.</i>	72
2.	<i>Biologie Moléculaire.</i>	73
1)	<i>Enzymes de restriction.</i>	73
2)	<i>Autres enzymes.</i>	73
3)	<i>Amorces.</i>	74
a.	<i>Clonage dans pHW2000 des produits d'amplification correspondant au segment entier.</i>	74
b.	<i>Amorces utilisées pour le changement des extrémités d'empaquetage de PB1 PR8.</i>	74
c.	<i>Amorces utilisées pour construire les segments NA modifiés.</i>	75
d.	<i>Amorces utilisées pour le séquençage des plasmides.</i>	76
4)	<i>Plasmides.</i>	76
5)	<i>Appareillage.</i>	76
6)	<i>Autres.</i>	77
3.	<i>Bactériologie.</i>	77
4.	<i>Informatique.</i>	78
II.	METHODES.	78
1.	<i>Lignées Cellulaires et Virus.</i>	78
1)	<i>Lignées cellulaires.</i>	78
2)	<i>Virus.</i>	78
3)	<i>Bactériologie.</i>	79
1)	<i>Milieux et antibiotiques.</i>	79
2)	<i>Protocole de préparation des bactéries compétentes.</i>	79
3)	<i>Transformation de bactéries compétentes.</i>	80
4)	<i>Préparation de culture liquide.</i>	80
2.	<i>Plasmides.</i>	80
1)	<i>Mise en place du système de génétique inverse à huit plasmides permettant la production de virus A/Réunion/586/2004 (H3N-).</i>	80
2)	<i>Plasmides codant pour les segments NA modifiés.</i>	81
3.	<i>Extraction des plasmides.</i>	83
4.	<i>Extraction des ARNv avec traitement à la DNase.</i>	83
5.	<i>Test des différents plasmides.</i>	84
1)	<i>Test des plasmides codant pour les segments du virus H3N-.</i>	84
2)	<i>Fonctionnalité des segments exprimant un transgène.</i>	84

6.	<i>Production de virus recombinants par génétique inverse à huit plasmides.</i>	84
7.	<i>Cinétique de réplication des virus produits par génétique inverse.</i>	85
8.	<i>Immunofluorescence anti-NP.</i>	85
9.	<i>Préparation des hématies et test d'héماغglutination.</i>	85
10.	<i>Analyse de l'encapsulation des segments NA.</i>	86
1)	<i>Activité neuraminidase.</i>	86
2)	<i>Présence de la protéine GFP.</i>	86
3)	<i>Présence de la protéine LUC.</i>	86
4)	<i>Analyse biomoléculaire.</i>	87
11.	<i>Analyse bioinformatique des segments NA modifiés.</i>	87
ETUDE DES SEMENCES VACCINALES - RESULTATS -		90
ETUDE DES SEMENCES VACCINALES - DISCUSSION -		116
CONSTRUCTION D'UN VECTEUR VIRAL - RESULTATS -		121
	PRODUCTION DE VIRUS H3N- PAR GENETIQUE INVERSE.	123
	CARACTERISATION DE VIRUS H3N- COMPORTANT UN SEGMENT N2 FONCTIONNELLE.	124
	EXPRESSION DE GENE RAPPORTEUR PAR UN SEGMENT NA MODIFIE.	127
	INCORPORATION DE DIFFERENTS SEGMENTS NA MODIFIES DANS LES PARTICULES.	129
	<i>Incorporation des segments NA tronqués et des segments NA possédant une région inversée.</i>	129
	<i>Incorporation des segments NA contenant le gène gfp.</i>	131
	<i>Incorporation des segments NA contenant le gène luciférase.</i>	132
	<i>Incorporation des segments NA contenant le gène cat.</i>	133
	ANALYSE BIOINFORMATIQUE DES SEGMENTS NA.	134
	<i>Régions conservées aux extrémités du segment NA.</i>	134
	<i>Composition en nucléotides des différents segments NA analysés.</i>	135
	<i>Analyse bioinformatique des segments NA modifiés.</i>	137
CONSTRUCTION D'UN VECTEUR VIRAL - DISCUSSION -		142
PERSPECTIVES.		148
ANNEXE.		151
BIBLIOGRAPHIE.		154

Index des figures.

Figure 1 : Carte de l'Antiquité figurant la ville de Périnthe où eut lieu une forte épidémie pouvant être imputée au virus de la grippe.	1
Figure 2 : Carte représentant les vagues successives supposées de la pandémie de 1580 en Europe.	1
Figure 3 : Photographie de <i>Bacillus influenzae</i> , renommée <i>Haemophilus influenzae</i> (a) et de son découvreur (b).	1
Figure 4 : Travaux de René Dujarric de la Rivière.	1
Figure 5 : Page de garde d'un document de 1922.	1
Figure 6 : Carte représentant les différentes vagues de la pandémie de 1918-1919.	1
Figure 7 : Impact des la grippe espagnole sur 1	1
Figure 8 : Photographie d'un hôpital d'urgence..... 1	1
Figure 9 : Vagues successives durant la pandémie de 1957 (grippe asiatique). 1	1
Figure 10 : Origine des virus pandémiques du XXème siècle. 1	1
Figure 11 : Localisation des principaux symptômes d'une infection à virus influenza. 1	1
Figure 12 : Caractéristiques phylogénétique des segments du virus pandémique de 2009. 1	1
Figure 13 : Schémas d'un virus influenza de type A. 1	1
Figure 14 : Représentation schématique d'un complexe ribonucléoprotéique ou RNPv. 1	1
Figure 15: Visualisation au microscope électronique d'une infection de cellule MDCK par un virus influenza de type A (A/California/7/2004 (H3N2)). 1	1
Figure 16: Schéma des domaines fonctionnels de la protéine PB2..... 1	1
Figure 17 : Transcrits issus du segment PB1. 1	1
Figure 18 : Domaines fonctionnels de la protéine PB1..... 1	1
Figure 19 : Représentation schématique des différents domaines fonctionnels de la protéine PA..... 1	1
Figure 20 : Structure tridimensionnelle du complexe polymérase d'influenza. 1	1
Figure 21 : Représentations des trimères de HA..... 1	1
Figure 22 : Spectre d'affinité de la HA en fonction du type de liaison des acides sialiques. 1	1
Figure 23 : Représentation schématique des différents domaines de la protéine NP des virus influenza de type A. 1	1
Figure 24 : Représentation des tétramères de protéines NA du virus pandémique de 1918. ... 1	1
Figure 25 : Les transcrits issus du segment M. 1	1
Figure 26 : Représentation schématique des domaines fonctionnels de la protéine M1..... 1	1
Figure 27 : Les transcrits issus du segment NS..... 1	1
Figure 28 : Schéma de quelques domaines fonctionnels de la protéine NS1..... 1	1
Figure 29 : Domaines fonctionnels de la protéine NEP..... 1	1
Figure 30 : Cycle de réplication des virus influenza de type A. 1	1
Figure 31 : Processus de fusion des membranes par la HA des virus influenza A. 1	1
Figure 32 : Entrée des différents composants viraux dans le noyau : complexe polymérase, RNPv. 1	1
Figure 33 : Etapes de transcription et de réplication de l'ARN viral..... 1	1
Figure 34 : Mécanisme d'export des RNPv où entrent en jeu les protéines M1 et NEP. 1	1
Figure 35 : Clichés de microscopie électronique de virus influenza bourgeonnant (virus A/California/7/2004 (H3N2)). 1	1
Figure 36 : Oiseaux considérés comme réservoir naturel des virus influenza de type A. 1	1
Figure 37 : Données du GROG sur la saison 2008-2009..... 1	1
Figure 38 : Représentation de l'amantadine et de la rimantadine. 1	1

Figure 39 : L'acide sialique et ses dérivés.	1
Figure 40 : Prévalence des virus influenza A/H1N1 résistants à l'oseltamivir au cours de l'hiver 2007-2008.	1
Figure 41 : La fabrication des vaccins antigrippaux dans le temps.	1
Figure 42 : Mode de fabrication des vaccins antigrippaux.	1
Figure 43 : Les différents types de vaccin antigrippaux.	1
Figure 44 : Les régions d'empaquetage validées pour tous les ARNv.	1
Figure 45 : Interactions entre segments déterminées à partir des résultats des expériences de compétition sur le segment PB1.	1
Figure 46 : Interactions entre segments confirmées par la compétition entre les segments PB1 MPM et PR8.	1
Figure 47 : Présence de virus dans des surnageants de culture détecté par test d'hémagglutination.	1
Figure 48 : Photographie d'une nappe cellulaire de MDCK après une immunofluorescence anti NP.	1
Figure 49 : Visualisation d'ECP.	1
Figure 50 : Vérification de la présence/absence des segments NS et NA du virus H3N- + NA/M10.	1
Figure 51 : Activité NA mesurée dans des surnageants de culture.	1
Figure 52 : Représentation schématique des segments NA utilisés lors de cette étude.	1
Figure 53 : Expression du gène rapporteur <i>gfp</i> en contexte transcriptionnel.	1
Figure 54 : Vérification de la présence/absence des segments NS et NA du virus H3N- + NA388-120Δ (passage 1).	1
Figure 55 : Vérification de la présence/absence des segments NS et NA du virus H3N- + NA388-120Inv (passage 1).	1
Figure 56 : Vérification de la présence/absence des segments NS et NA du virus H3N- + NA388-120LUC (passage 1).	1
Figure 57 : Vérification de la présence/absence des segments NS et NA des virus H3N- + NA388-120CAT et H3N- + NA31-26CAT (passage 1).	1
Figure 58 : Alignement de l'extrémité 3' de 20 segments NA (sens ARNv, orienté 3'-5').	1
Figure 59 : Alignement de l'extrémité 5' de 20 segments NA (sens ARNv, orienté 5'-3').	1
Figure 60 : Représentation graphique du rapport CG/AU dans les 22 segments analysés.	1
Figure 61 : Tailles des différentes constructions de segments NA et incorporation.	1
Figure 62 : Composition en nucléotides des différentes constructions et incorporation.	1

Index des tableaux.

Tableau 1 : Composition génomique et protéines synthétisées par les membres de la famille des <i>Orthomyxoviridae</i>	1
Tableau 2 : Répartition des sous-types de virus influenza de type A dans différentes espèces animales.....	1
Tableau 3 : Génome et protéines des virus influenza de type A.....	1
Tableau 4 : Fréquences des substitutions en nucléotides et AA des différents types de virus influenza circulant chez l'homme (gène <i>ha</i> et protéine HA).....	1
Tableau 5 : Les différents NA utilisés au cours de l'étude bioinformatique.....	1
Tableau 6 : Régions conservées des segments NA retrouvés de manière naturelle.....	1
Tableau 7 : Composition en nucléotides des différents segments NA étudiés.....	1
Tableau 8 : Composition en nucléotides et taille des différentes constructions	1

Abréviations.

A

A : Adénine
AA : Acide(s) aminé(s)
ADN : Acide desoxyribonucléique
ANT3 : *Adenine nucleotide translocator 3*
ARN : Acide ribonucléique
ARNc : ARN complémentaire
ARNm : ARN messenger
ARNv : ARN viral

B

BHK : *Baby Hamster Kidney*

C

C : Cytosine
ca : *Cold adapted*
CAT : Chloramphénicol acétyltransférase
CNR : Centre national de référence
CRM1 : *Chromosome region maintenance 1*
cRNP : Complexe ribonucléoprotéique complémentaire

D

DMEM : *Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*
DIG : *Detergent insoluble glycolipids*
DO : Densité optique

E

ECDC : *European centre for disease prevention and control*
ECP : Effets cytopathiques
EMEM : *Eagle's Minimal Essential Medium*
EISS : *European influenza surveillance scheme*

G

G : Guanine
GFP : *Green fluorescent protein*
GROG : Groupes régionaux d'observation de la grippe

H

H3N- : A/Réunion/586/2004 (H3N-)
HA : Hémagglutinine / Segment codant la HA
HA0 : Précurseur de la protéine HA
HA1 : Sous unité de la protéine HA
HA2 : Sous unité de la protéine HA
Hpi : Heure(s) post-infection
hr : *Host range*

I

IFN : Interféron
INA : Inhibiteur de neuraminidase
IRES : *Internal ribosome entry site*
InVS : Institut de veille sanitaire

K

kDa : KiloDalton

L

LUC : Luciférase

M

M : Segment codant pour « les » protéines de matrice
M1 : Protéine de matrice
M10 : A/Moscow/10/99 (H3N2)
M2 : Canal à ions
MDCK : Cellules *Madin Darby Canine Kidney*

N

NA : Neuraminidase / Segment codant pour la NA
NA inv : Segment NA de M10 possédant une partie de sa séquence interne en orientation inversée
NA/M10 : Plasmide permettant la synthèse de l'ARNv correspondant au segment NA de A/Moscow/10/99
NDV : Virus de la maladie de Newcastle.
NEP : *Nuclear export protein* (anciennement appelée NS2 : Protéine non structurale 2)
NES : Signal d'export nucléaire (*nuclear export signal*)
NLS : Signal de localisation nucléaire (*nuclear localization signal*)
NP : Nucléoprotéine / Segment codant pour la NP
NS : Segment codant pour les protéines « non structurales »
NS1 : Protéine non structurale 1

O

OAS : 2'-5'oligoadenylate synthetase
OMS : Organisation mondiale de la santé (WHO : *World health organization*)
ORF : Cadre ouvert de lecture (*open reading frame*)

P

PA : *Polymerase acid* / Segment codant pour PA
PB1 : *Polymerase basic protein 1* / Segment codant pour PB1, N40 (et PB1-F2)
PB2 : *Polymerase basic protein 2* / Segment codant pour PB2
PCR : *Polymerase chain reaction*
PKR : Protéine kinase R
PR8 : A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)

R

RDE : *Receptor destroying enzyme*

RE : Réticulum endoplasmique
RNTMT : Réseau national téléinformatique des maladies transmissibles
RNPv : Complexe ribonucleoprotéique viral
RT : *Reverse transcription*

T

TGN : *Trans Golgi Network*
ts : *Thermosensitive*

U

U : Uracile
Uni12 : Les douze premiers nucléotides de la région 3', conservés chez tous les segments, quelque soit le sous-type de virus influenza de type A
Uni13 : Les treize premiers nucléotides de la région 5', conservés chez tous les segments, quelque soit le sous-type de virus influenza de type A
UV : Ultra violets

V

VDCA1 : *Voltage-dependent anion channel 1*
VLP : *Virus like particle*

"Student of influenza is constantly looking back over his shoulder and asking 'what happened?' in the hope that understanding of past events will alert him to the catastrophes of the future".

ED Killbourne.

The molecular epidemiology of influenza. J. Infect. Dis. 1973, 127: 478-87.

Introduction.

I. Historique de la maladie.

1. L'étymologie de la grippe.

La grippe, à travers les âges, a connu de nombreuses appellations. Certaines se basaient sur la rapidité avec laquelle l'épidémie apparaissait (grippe, tac, catarrhe épidémique ...), d'autres étaient plus fantaisistes telles que la folette, la coquette, le petit courrier ... Le dictionnaire Littré littéraire définit la grippe comme un catarrhe épidémique, nommé ainsi parce qu'il *grippe*, dans le sens de saisir, une foule de gens. Ce nom serait dérivé de *grippen*, d'origine germanique. Selon l'*Oxford Dictionary*, le mot « grippe », qui n'est plus compris étymologiquement de nos jours, apparaîtrait en 1743.

Influenza doit son origine à la langue italienne, où son sens médical est attesté depuis 1363. Ces termes, *influenza di freddo* ou *influenza di stelle* (influence du froid ou des astres), suggèrent que l'apparition de cette maladie proviendrait d'une conjoncture cosmique particulière, ou encore feraient référence au caractère saisonnier de la maladie, laissant supposer l'influence de l'environnement extérieur sur l'Homme. Aux XIV et XV^{ème} siècles, les récits d'une famille de Florence mentionnent ce terme d'*influenza*.

Seules les revues médicales et les articles scientifiques parlent aujourd'hui d'*influenza*, la grippe demeurant le nom commun pour désigner cette maladie.

2. Avant les certitudes, les suppositions.

1) *Les traces au cours de l'Antiquité.*

La grippe est une infection respiratoire qui a marqué l'histoire de l'Humanité et constitue aujourd'hui encore une des maladies infectieuses les plus répandues.

Cette maladie semble avoir frappé les populations humaines depuis l'Antiquité. Hippocrate décrivit en 412 avant Jésus Christ, dans les livres IV et VI « *des Epidémies* », une maladie présentant des symptômes proches de ceux de la grippe (92). La toux de Périnthe (**Figure 1**), ville du nord de la Grèce proche de l'actuelle Istanbul, serait ainsi la première référence à une épidémie grippale en Europe. Elle était caractérisée par une toux sèche, des fièvres, une lassitude aiguë et une rechute après une quarantaine de jours, amenant une suppuration au niveau des membres.

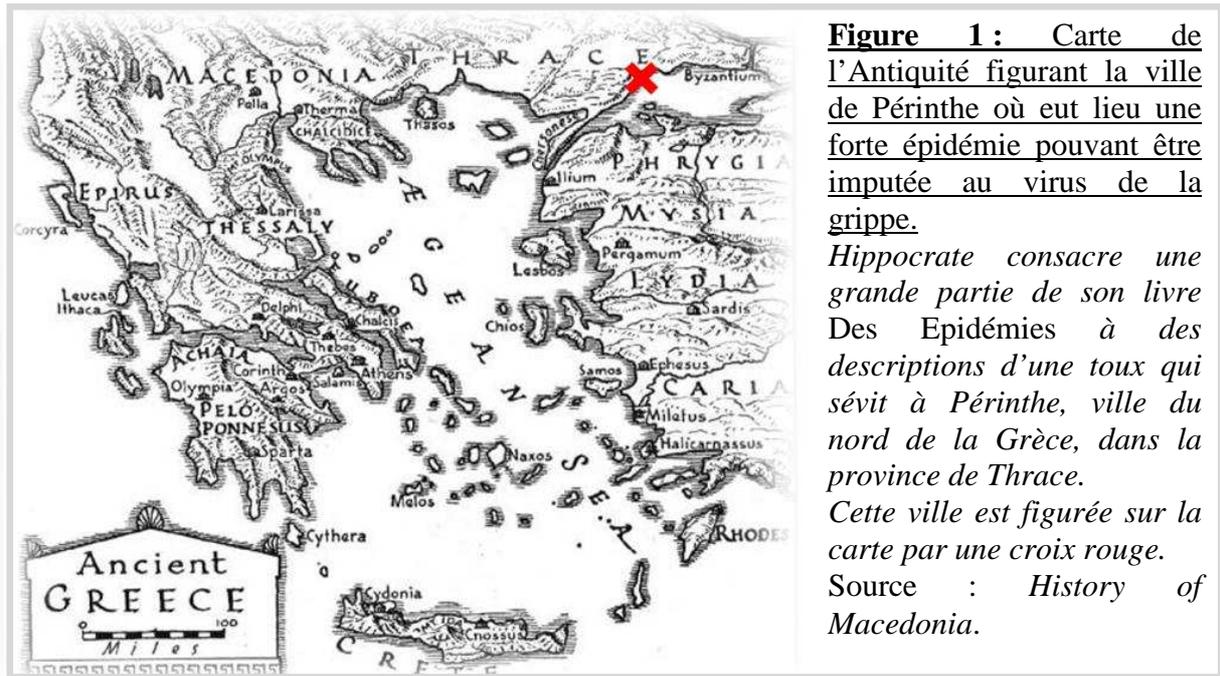


Figure 1 : Carte de l'Antiquité figurant la ville de Périnthe où eut lieu une forte épidémie pouvant être imputée au virus de la grippe.

Hippocrate consacre une grande partie de son livre Des Epidémies à des descriptions d'une toux qui sévit à Périnthe, ville du nord de la Grèce, dans la province de Thrace.

Cette ville est figurée sur la carte par une croix rouge.

Source : *History of Macedonia.*

Deux siècles plus tard, en 212 avant Jésus Christ, Livy relate une épidémie ayant décimé l'armée romaine. Elle peut être attribuée au virus de la grippe.

2) Au cours du Moyen Age.

D'après A. Hirsch (1882), la grippe serait apparue chez l'Homme aux alentours du XII^{ème} siècle (185). Selon G. André (1908), « *les maladies catarrhales, décrites avant le XVII^{ème} siècle, devaient être, sans doute, des plus variées et comprendre des associations morbides fort dissemblables* ». Ainsi, retracer une chronologie détaillée de la grippe se révèle être une entreprise périlleuse car ne sont relatés dans les écrits que les faits les plus marquants et/ou d'une grande mortalité. De plus, un grand nombre de maladies telles que la diphtérie, le choléra ou le typhus peuvent se manifester par des symptômes grippaux (6).

La première épidémie grippale décrite de manière convaincante date des années 1173-1174. Dès lors, la masse de documents est plus importante et il est plus aisé de retracer avec précision les épisodes grippaux dans les populations européennes et mondiales. Ainsi, selon V. de Tarente, en 1387, la population de Montpellier est décimée par un *catarrhe*. La *Tac* ou *Horion* fait son apparition à Paris en 1403. Cette maladie décrite par E. Pasquier, correspond sans doute à un épisode grippal. En 1414, la *coqueluche*, décrite par F. Mézeray en France, sévit surtout chez les personnes âgées.

3. A partir de 1510.

En 1510, une épidémie traverse l'Europe d'est en ouest. Relatée par T. Thompson (1852), cette première description clinique vraiment précise de la grippe fait mention de pneumonies (221). Sa gravité est exceptionnelle chez les femmes enceintes. Elle est dénommée *gravedo anhelosa* par J. Fernel, tandis qu'en France, c'est sous le nom de *coqueluche* qu'elle sévit. Ce catarrhe quasi planétaire selon G. André fut décrit en latin par D. Sennert, et en français par F.-E. Mézeray.

La première description convaincante d'une pandémie grippale date de 1580 (185). Partie d'Asie, la maladie s'étendit à l'Europe et à l'Afrique. En juillet 1580, l'infection est décrite simultanément en Espagne, en Turquie et en Hollande. Deux mois plus tard, elle devient pandémique (**Figure 2**). Plus de huit mille morts furent recensés à Rome et plusieurs villes espagnoles, dont Madrid, furent quasiment dépeuplées. Plus de neuf mille décès furent dénombrés à Paris. Cette pandémie pourrait sans contexte être qualifiée d'« espagnole », avec une plus grande justesse que celle de 1918-20.

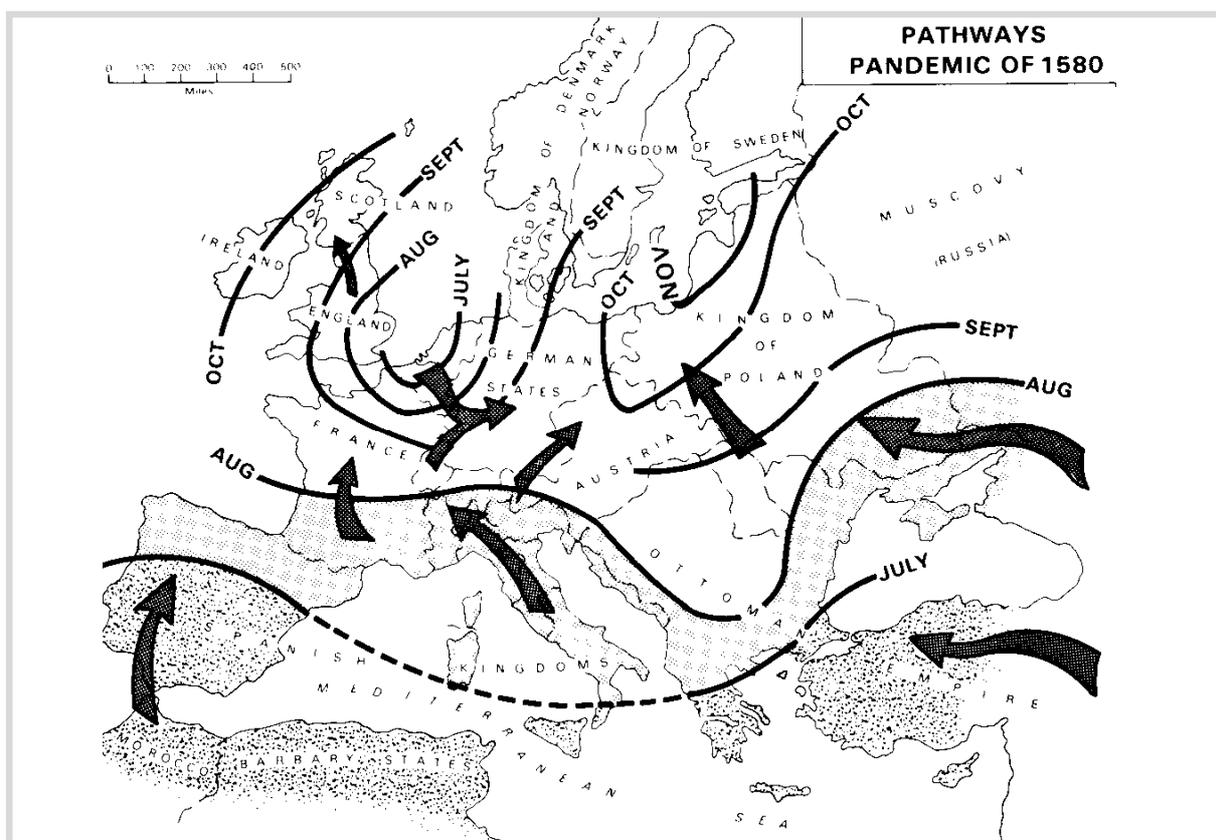


Figure 2 : Carte représentant les vagues successives supposées de la pandémie de 1580 en Europe.

La pandémie de 1580, dont le berceau se situe en Asie, arrive en Europe dès juillet. Les différentes vagues sont superposables aux principales voies de voyage et de communication de l'époque.

Source : G. F. Pyle. (185)

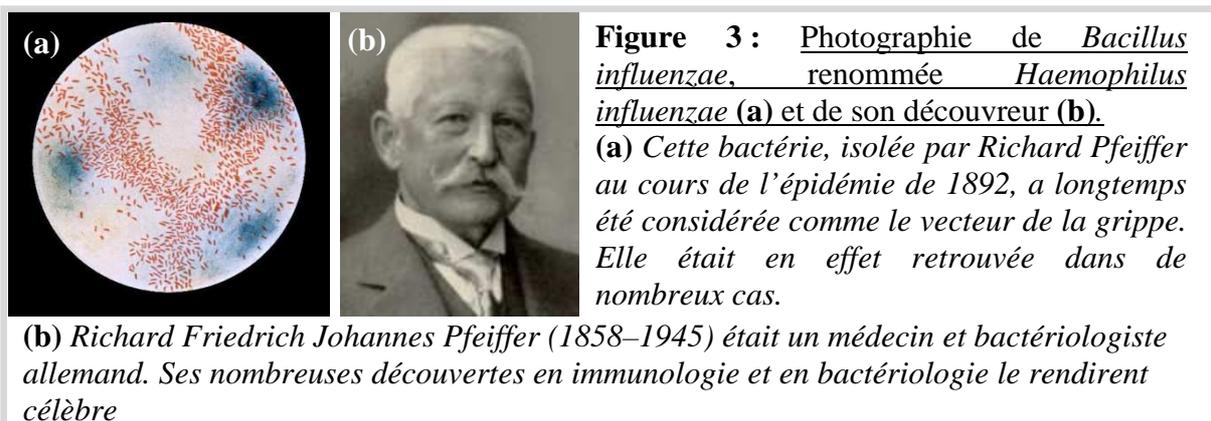
Au cours du XVIII^{ème} siècle, deux cliniciens anglais permettront, par leurs écrits, une meilleure connaissance de la grippe. T. Willis et T. Sydenham pendant les épidémies de Londres en 1657-1658 et 1675 respectivement décrivent ainsi avec précision les symptômes grippaux : coryza, fièvre, fatigue, douleurs ...

Entre 1580 et la pandémie de 1889-1990, plus de quarante épisodes potentiellement grippaux ont été décrits par G. André (6). G. F. Pyle détaille sept pandémies pendant ce même laps de temps : 1580, 1781-82, 1800-1803, 1830-33, 1847-48 et 1889-92. Il est important de noter qu'à ce stade, la majorité des pandémies décrites se sont propagées à partir de l'Asie dans un mouvement est-ouest. Seule exception, la pandémie de 1800 dont le berceau serait la France. Cependant, les guerres napoléoniennes (1799-1815) peuvent avoir joué un rôle dans la diffusion de l'infection.

4. Le vingtième siècle.

1) *L'étiologie de la grippe : bactérie ou virus ?*

Dès 1883, le docteur O. Seifert, de Wurtzbourg (Allemagne), isole dans le mucus nasal et bronchique des patients atteints de grippe des microcoques Gram positif. L'histoire retiendra surtout le nom du Bacille de Pfeiffer, isolé en 1892 (**Figure 3**). Cette bactérie, baptisée *Bacillus influenzae*, puis par la suite *Haemophilus influenzae*, fut retrouvée dans la salive, les crachats, le mucus pulmonaire (isolée par H. Meunier), les séreuses, la plèvre (isolée par R. Pfeiffer), et également dans le système nerveux central, chez des patients présentant des atteintes neurologiques. Son implication dans tous les cas fut loin d'être démontrée bien que le rôle de ce bacille dans la mise en place de l'infection a été prouvé par divers observateurs. Cette hypothèse ne fait pas l'unanimité. Citons par exemple l'hématozoaire de l'influenza découvert par E. Klebs en 1890 ou la toxine *mutatis mutandis* pouvant être produite par n'importe quelle bactérie et qui serait la cause de l'influenza.



Avec la découverte du virus filtrant responsable de la fièvre jaune par W. Reed et ses collaborateurs aux alentours de 1901 et les travaux de L. Pasteur sur le virus de la rage, certains scientifiques voient le rôle d'un autre virus filtrant dans l'établissement de la grippe. Les bactéries ne seraient alors que des agents de surinfections aléatoires. En France, R. Dujarric de la Rivière présente à l'Académie des Sciences en 1918 ses résultats démontrant que l'agent étiologique de la grippe était une particule filtrable, un virus (**Figure 4**). En s'inoculant par voie sous-cutanée un filtrat de sécrétions respiratoires de patients atteints de la grippe, il constata qu'il présentait les symptômes d'une grippe. Il devint résistant à une seconde inoculation de ce même filtrat, il s'était vacciné. Ces résultats seront confirmés par une autre équipe de chercheurs français, C. Nicolle et C. Lebaillly en 1918, par H. Selter en Allemagne en 1918, ainsi que par T. Yamanouchi et ses collaborateurs au Japon en 1919. Cependant, la communauté scientifique de l'époque réfute cette hypothèse, et considère que la grippe est due à une bactérie (**Figure 5**), le bacille de Pfeiffer.

MÉDECINE EXPÉRIMENTALE. – *La grippe est-elle une maladie à virus filtrant ?* Note de M. **R. Dujarric de la Rivière**, présentée par M. Roux.

Pour essayer de déterminer si le virus de la grippe est une maladie à virus filtrant et si de ce fait les microbes trouvés dans le sang (pneumocoque, streptocoque) ne sont que des microbes de sortie, nous avons pratiqué l'expérience suivante :

Le 8 octobre 1918, j'ai choisi, dans le pavillon des grippés graves de l'hôpital 45, à T..., quatre malades grippés parmi les plus graves (l'un d'eux est mort). A chacun nous avons prélevé 20^{cm3} de sang : 5^{cm3} ont servi à pratiquer des hémocultures qui, toutes les quatre, ont été négatives ; le reste a été défibriné et les quatre sangs mélangés ont été passés à la bougie Chamberland (L3). Le filtrat a été utilisé ainsi : une partie a servi à inoculer

Figure 4 : Travaux de René Dujarric de la Rivière.

Ces travaux ont été présentés le 21 octobre 1918 à l'Académie des Sciences de Paris. Ces notes furent suivies d'un second travail intitulé « Quelques notions expérimentales sur le virus de la grippe », de M. C. Nicolle et C. Lebaillly.

Source : Académie des Sciences, Paris.

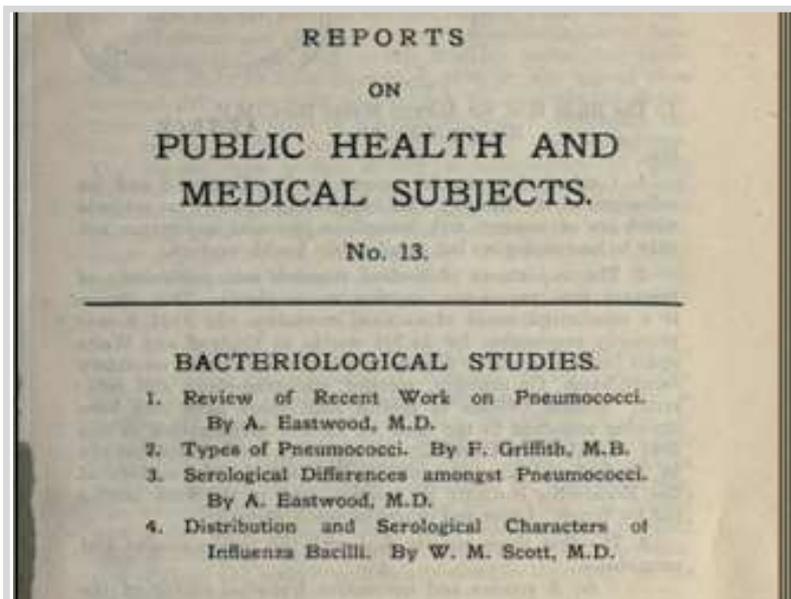


Figure 5 : Page de garde d'un document de 1922.

En 1922, la grippe est encore considérée comme une maladie d'origine bactérienne, bien que de nombreux travaux démontrent le rôle d'agents filtrants dans l'établissement de la maladie.

2) La pandémie de 1918-20, la meurtrière « grippe espagnole ».

La première pandémie du XXème siècle s'est répandue dans un relativement court laps de temps en trois vagues successives au cours des années 1918-1919, à travers l'Europe, l'Asie et l'Amérique (219).



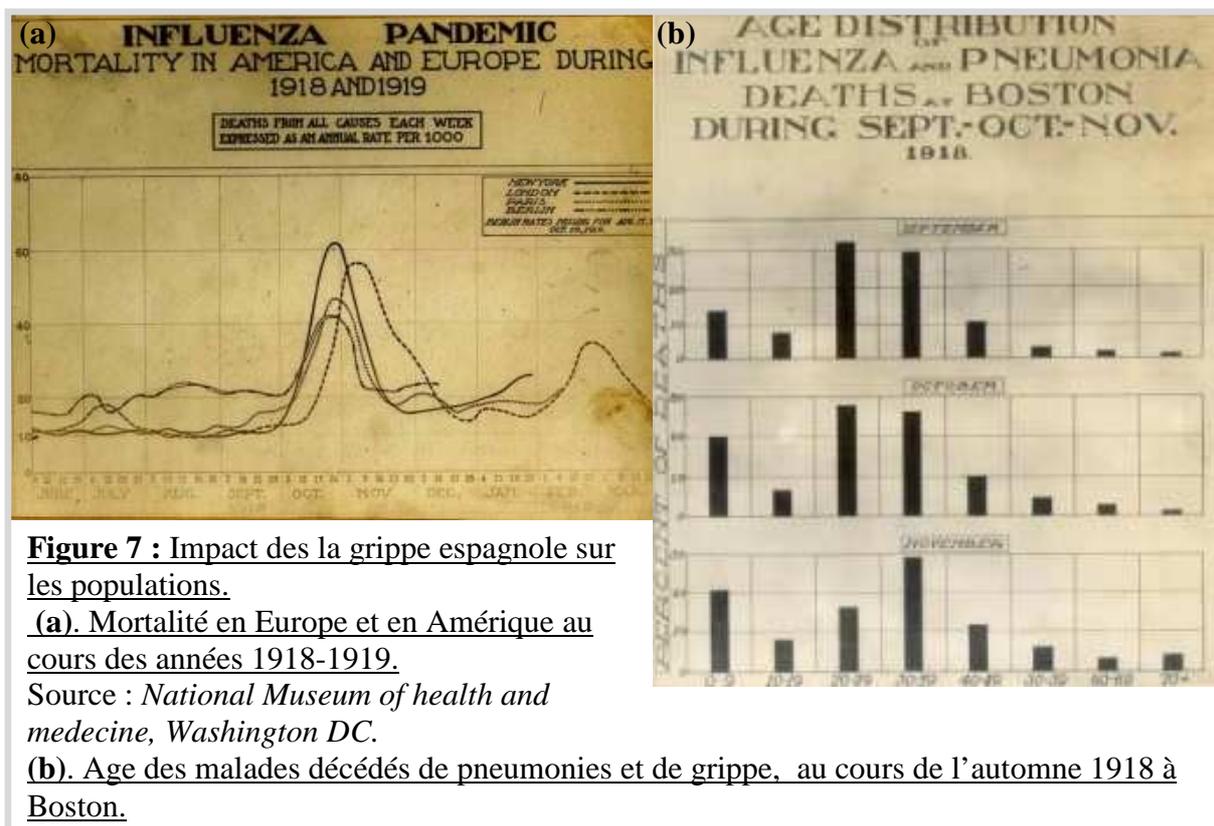
Figure 6 : Carte représentant les différentes vagues de la pandémie de 1918-1919.

Les premiers cas (mars 1918) sont figurés (■), ainsi que les première (- ->) et seconde (->) vagues.

Source : C. W. Potter. J Appl Microbiol. 2001. (184)

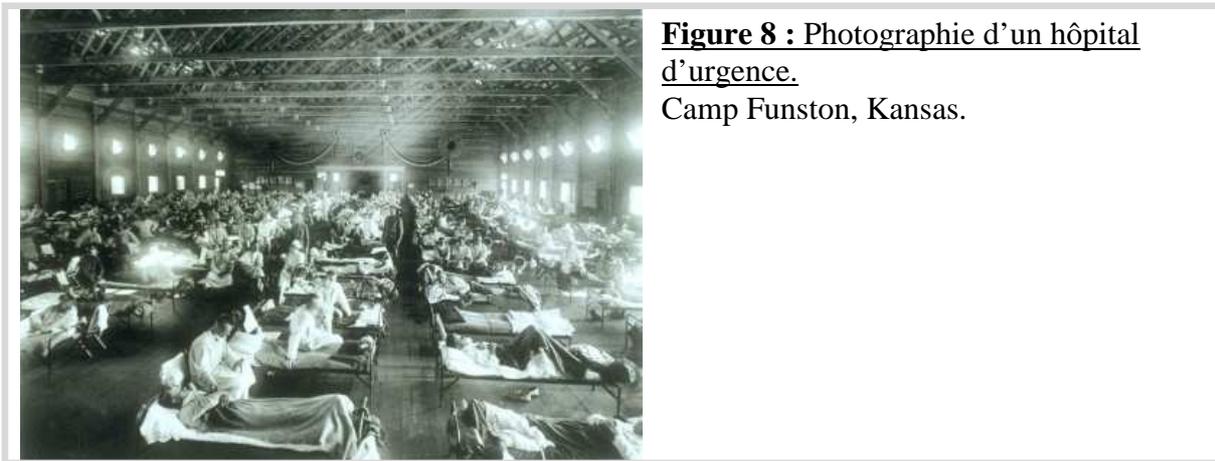
L'origine géographique de cette pandémie n'est pas connue avec certitude. En effet, bien que de nombreux rapporteurs aient discuté d'une possible origine en Chine, les premiers signes sont apparus quasiment simultanément à Détroit, en Caroline du Sud et dans la prison d'état de San Quentin, au nord de San Francisco, en mars 1918 (Figure 6). L'origine de cette pandémie semble donc américaine (41). En France, les premiers cas identifiés ont été observés en avril 1918 dans les armées présentes en Normandie. La première vague qui a sévi au printemps 1918 était très contagieuse mais pas particulièrement meurtrière, contrairement à la seconde sévissant en septembre de la même année correspondant à la propagation de la forme pandémique.

Cette pandémie a été exceptionnelle sur différents points tels que son étendue ou ses répercussions. Le virus de 1918 était extrêmement virulent et a causé de nombreux décès notamment suite à des complications bactériennes. En effet, la pneumonie virale primaire pouvait tuer une personne saine en deux jours. De plus, la gravité de ces symptômes était telle que nombreux furent ceux qui doutèrent du diagnostic. Ainsi, choléra, dengue ou typhus furent évoqués en 1918 (12). Cependant, le plus surprenant demeure son profil de mortalité selon l'âge des patients, en forme de « W », au lieu de la forme en « U » des grippe saisonnières. En effet, les personnes succombant le plus aux assauts de cette grippe se trouvaient être les adultes entre vingt et quarante ans (Figure 7). Une forte mortalité n'a pas été constatée chez les personnes âgées, sans doute du fait d'une immunité relative à des virus antigéniquement proches ayant circulé avant la pandémie (228).



Bien que certaines des mesures prises pour tenter d'enrayer la propagation de la maladie se révélèrent efficaces, telles que le port de masque de protection, la fermeture des lieux publics ou l'interdiction de se réunir, les véritables moyens de lutte contre la grippe, basés sur la certitude que l'agent pathogène était une bactérie restèrent inopérants : vaccins non protecteurs, gargarismes avec des solutions antiseptiques...

La pandémie de 1918-1920 fit entre 20 et 50 millions de morts selon les estimations, et aurait touché au total environ la moitié de la population mondiale estimée à l'époque à environ 1,9 milliard d'individus (108) (**Figure 8**).



L'agent pathogène responsable, loin d'être une bactérie était un virus influenza A(H1N1).

3) La découverte d'un virus.

La première isolation d'un virus grippal fut réalisée chez le porc par R. Shope en 1931. Ce dernier fut en effet frappé par la concomitance de la *grippe espagnole* chez l'homme et d'une maladie similaire chez le porc vers 1918-1919. La souche fut plus tard rebaptisée A/Swine/Iowa/15/30 (H1N1) (189).

C'est en 1933, en Angleterre, que fut isolé le premier virus influenza humain, par W. Smith, C. H. Andrewes et P. P. Laidlaw, de manière assez fortuite. En effet, ils travaillaient à la mise au point d'un vaccin contre la maladie de Carré sur le furet. A la même époque sévit une épidémie humaine de grippe, touchant également les furets. L'implication des virus influenza fut faite par inoculation de filtrat de sécrétions nasales à des furets qui développèrent les symptômes de la maladie (210). Par la même occasion, le furet devint le modèle animal privilégié pour l'étude des virus influenza.

En 1940, T. P. Magill et T. Francis Jr isolèrent un second type de virus influenza, qui sera nommé influenza de type B pour le différencier du précédent, le type A. Le dernier type de virus influenza, type C, est isolé par R. M. Taylor en 1950. La distinction entre les différents types de virus influenza se base sur l'organisation génomique globale et les propriétés antigéniques de protéines internes, M1 et NP.

4) Les deux dernières pandémies du XX^{ème} siècle : 1957 et 1968.

Le XX^{ème} siècle connut deux autres pandémies de moindre importance, la grippe « asiatique » de 1957 et la grippe « de Hong Kong » en 1968.

Le virus de la grippe asiatique, de sous-type H2N2, émerge en février 1957 dans la province de Yunnan, puis se propage dans toute la Chine, à Singapour, à Taïwan et au Japon. Rapidement, la pandémie grippale se déclare et s'étend à tout le globe (**Figure 9**). Le nombre de décès est estimé entre un et quatre millions, dont beaucoup dus à une pneumonie virale.

Il a été montré que 30 % des personnes âgées de plus de 75 ans présentaient des anticorps spécifiques contre ce virus. La pandémie de 1889-90 pourrait ainsi être due à une souche proche de ce virus, expliquant la présence de protection immunitaire.



Figure 9 : Vagues successives durant la pandémie de 1957 (grippe asiatique).

Les premiers cas sont figurés (■), ainsi que les vagues (→). La pandémie grippale prend sa source en Chine avant de s'étendre au reste du Monde.

Source : C. W. Potter. J Appl Microbiol. 2001. (184)

La pandémie de 1968 débute en juillet à Hong Kong et est causée par un virus de sous-type H3N2. La deuxième vague (hiver 1969-1970) causa le plus de pertes humaines. La maladie causa le décès de un à deux millions de personnes dans le monde.

Dans les deux cas, le virus pandémique est issu d'un réassortiment entre virus humain et virus aviaire, avec des constellations génétiques bien définies (**Figure 10**). Pour le virus A(H2N2) de 1957, sur un fond génétique correspondant au virus circulant dans la population humaine A(H1N1) depuis la pandémie de 1918-1919, trois segments de gènes d'origine aviaire (sous-type H2N2) ont été incorporés : les segments PB1, HA et NA (voir partie II.2). Ces segments permettaient notamment l'échappement du virus à la réponse immunitaire de l'hôte. Dans le cas du virus A(H3N2) de 1968, le virus A(H2N2) devenu circulant chez l'Homme après la pandémie de grippe asiatique a incorporé deux segments de gènes d'un virus aviaire, de sous-type H3 : les segments HA et PB1. Dans les deux cas, un des segments codant pour une protéine interne des souches aviaires impliquées dans le réassortiment, s'est incorporé dans le fond humain circulant, en plus de ceux impliqués dans le processus d'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte (110) .

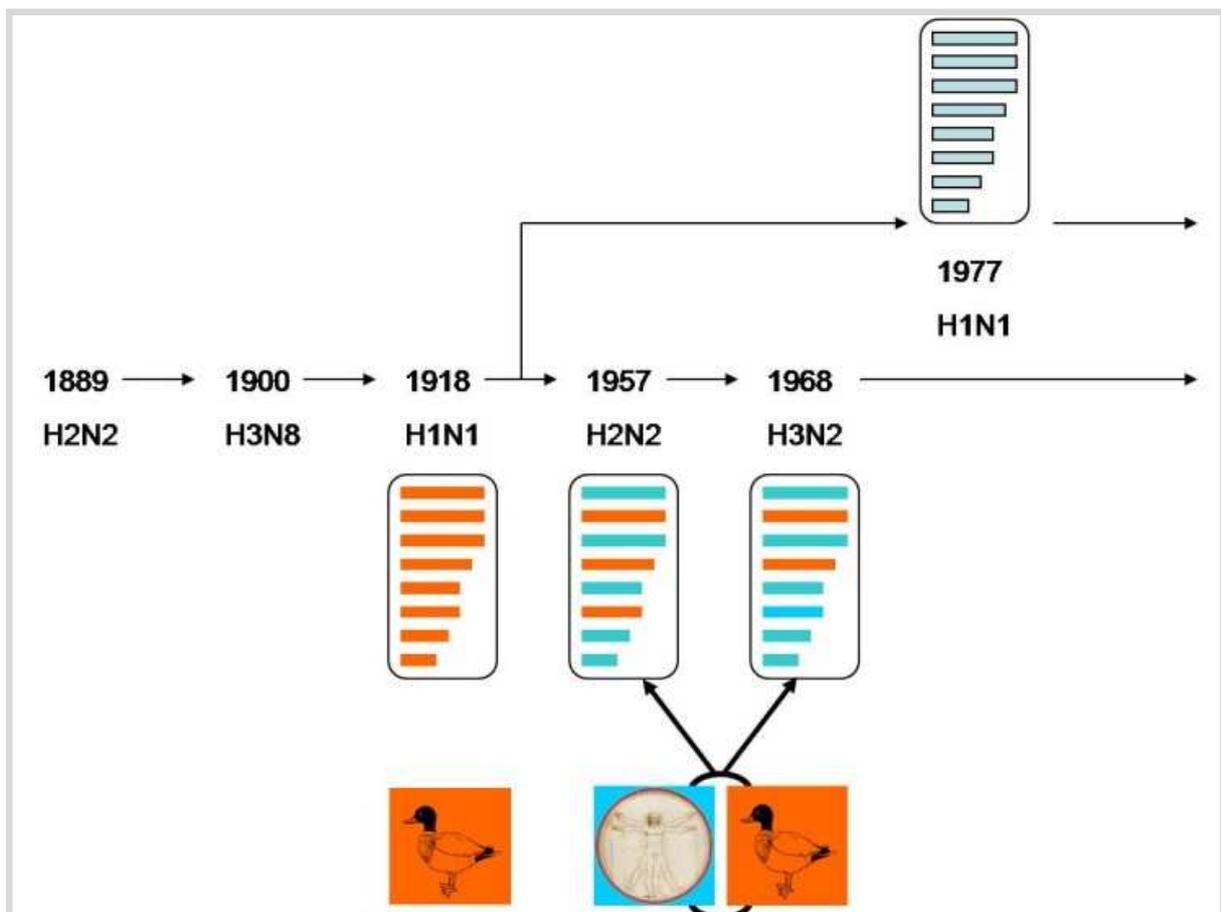


Figure 10 : Origine des virus pandémiques du XXème siècle.

Alors que le virus pandémique espagnol correspond à l'adaptation à l'hôte humain d'un virus aviaire, les deux virus suivants (grippe asiatique et de Hong Kong) sont le fruit de réassortiments entre virus aviaire et virus humain.*

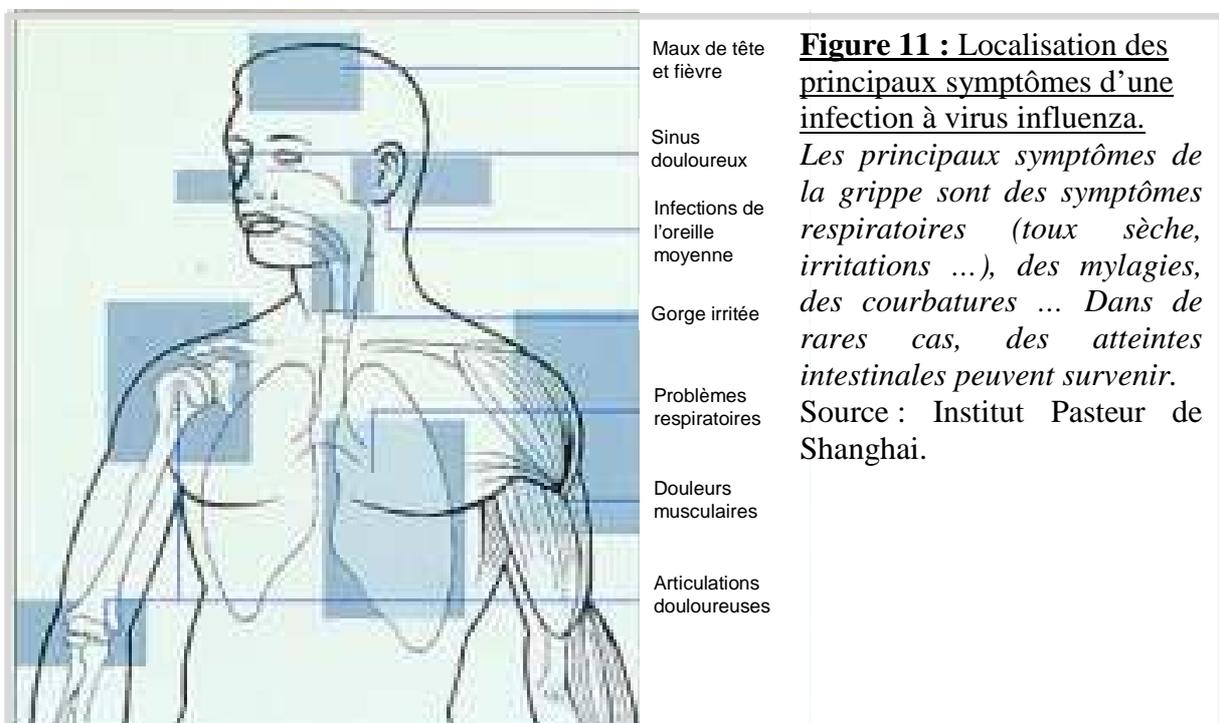
** Bien que cette hypothèse soit actuellement controversée.*

En 1976-1977, une pseudopandémie s'est déclarée aux Etats-Unis d'Amérique. Ce virus porcine de type A/New Jersey/76 (Hsw1N1), proche de celui de 1918, ne s'est pas propagé hors du continent américain. Un an plus tard, en novembre 1977, à Leningrad, se répand un virus de sous-type H1N1, provoquant une nouvelle épidémie. Ce virus ne remplace pas le précédent, le virus A(H3N2) devenu circulant depuis la pandémie de grippe de Hong Kong, mais s'y ajoute. A partir de cette date, deux virus de type A circulent simultanément.

5. De nos jours.

1) *Les épidémies hivernales.*

Sous nos latitudes, la grippe se manifeste de nos jours essentiellement sous la forme d'épidémies hivernales, frappant toutes les classes d'âges de la population, mais pouvant se révéler tragiques pour les personnes âgées, les sujets à risques ou les enfants. En effet, la maladie est grave dans trois à cinq millions de cas et est la cause de plus de trois cent mille décès à l'échelle mondiale. Au 2 décembre 2008, sur la base de données historiques collectées depuis 1984, l'Institut de veille sanitaire (InVS) estime qu'en France métropolitaine, entre 700 000 et 4,6 millions de personnes consultent pour syndrome grippal lors d'une épidémie. En moyenne, 2,5 millions de personnes seraient concernées chaque année. Cependant, pour une infection grippale cliniquement déclarée, on estime qu'il existe entre trois et neuf infections asymptomatiques. Des changements au niveau des antigènes de surface majeurs des virus influenza entraînent environ tous les deux ans l'apparition d'une nouvelle épidémie



A côté des symptômes grippaux classiques (fièvre, asthénie, céphalées, atteintes respiratoires...) (**Figure 11**), les virus influenza peuvent entraîner des complications (pneumonies primitive ou secondaire bactérienne) pouvant conduire au décès du patient.

Toutes ces caractéristiques font de la grippe un problème de santé publique majeur.

2) 2009 : une nouvelle pandémie.

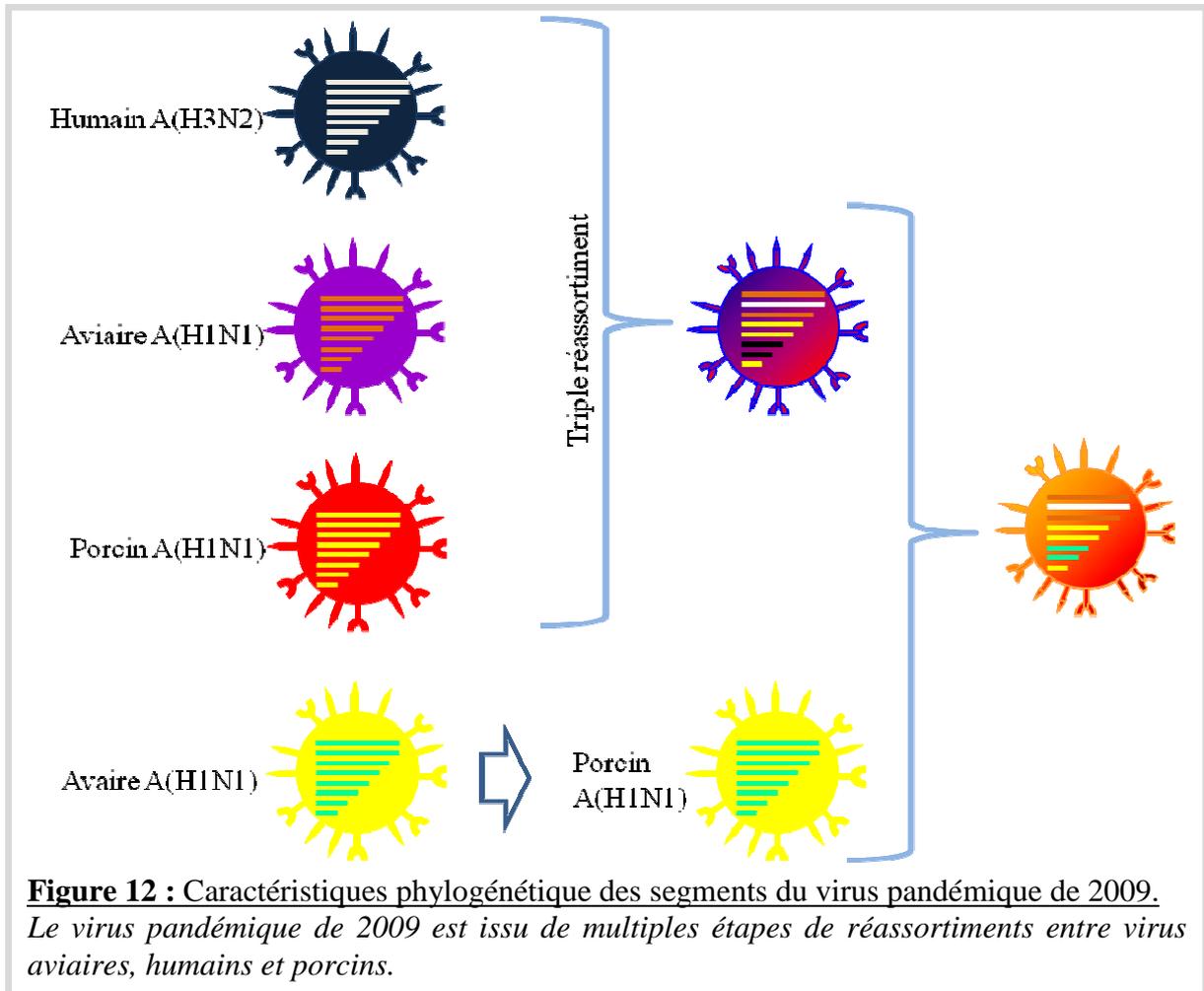
L'Histoire est ponctuée d'épisodes pandémiques dus aux virus influenza de type A. Ces pandémies grippales circulent autour du monde par vagues successives. Un réassortiment entre un virus humain circulant et un virus d'un autre hôte, aviaire par exemple, semble favoriser l'émergence de virus pandémiques.

Le 15 avril 2009, le centre de contrôle des maladies américain (CDC : *center for disease control and prevention*) a diagnostiqué des infections dues à un virus influenza porcine adapté à l'homme. Les premiers malades étaient localisés au Mexique et aux Etats-Unis d'Amérique. Le 26 avril 2009, l'organisation mondiale de la santé (OMS) déclare que la pandémie atteint la phase 3, caractérisée par une transmission du virus de l'animal à l'homme. Le lendemain, le niveau 4 est atteint. Enfin, le 29 avril 2009, la pandémie atteint la phase 5 : la maladie se transmet maintenant entre humains. La phase 6 est décrétée le 11 juin 2009.

Les récentes études de V. J. Munster et ses collaborateurs ou encore de l'équipe de T. R. Maines (juillet 2009) montrent que ce virus de sous-type H1N1 est plus pathogène que les virus A(H1N1) saisonniers (133) (155). Ce virus se multiplie chez les furets au niveau des voies respiratoires supérieures (155), mais également dans les bronches et bronchioles ou encore dans les intestins (133). Bien que leurs résultats divergent en termes de transmission de ce virus, il n'en demeure pas moins qu'il est capable de se disséminer très facilement. En juillet 2009, dans la population humaine, 60 % des personnes infectées ont moins de dix-huit ans (29), tandis que les séniors (âgés de plus de cinquante ans) représentent seulement 5 % des cas. De plus, un quart des patients présentent des problèmes intestinaux (diarrhées, vomissements...) en association avec les symptômes grippaux habituels (juillet 2009).

Ce virus pandémique comporte des segments issus de virus aviaires, humains et porcins. G. J. D. Smith et ses collaborateurs ont montré que les réassortiments entre virus de différentes espèces ne sont pas figés (208) (**Figure 12**). Ainsi, les segments codant pour le complexe polymérase ainsi que les segments HA, NP et NS du virus pandémique de 2009 sont issus d'un virus triple réassortant : les segments HA, NP et NS proviennent d'un virus porcine de sous-type H1N1, les segments PB2 et PA d'un virus aviaire A(H1N1), tandis que le

segment PB1 provient d'un virus A(H3N2) humain. Les segments NA et M du virus pandémique proviendraient quant à eux d'un lignage de virus porcin dérivé de virus aviaire.



Il semblerait, grâce aux données actuelles, que les virus pandémiques correspondent à des virus réassortants faisant intervenir des virus parentaux humains, aviaires, et porcins. Ces nouveaux virus nécessiteraient alors une adaptation plus longue. Il ne semble pas exister de franchissement de la barrière d'espèces (aviaire vers humain par exemple comme ce fut craint pour le virus A(H5N1) depuis 1997) au sens du virus entier, mais segment(s) par segment(s) sur des années précédant une pandémie (207) en passant par un hôte intermédiaire, le porc.

II. Le virus.

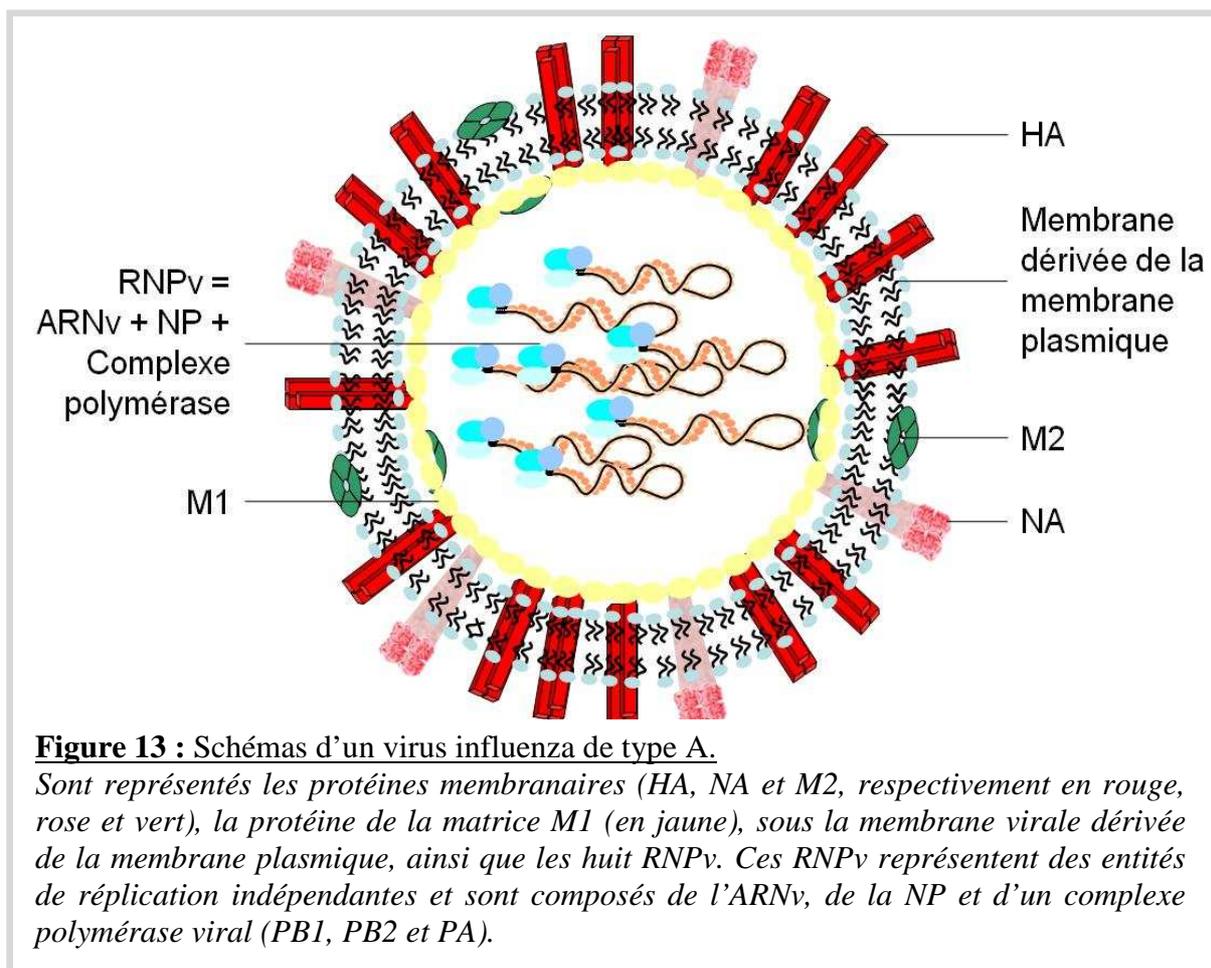


Figure 13 : Schémas d'un virus influenza de type A.

Sont représentés les protéines membranaires (HA, NA et M2, respectivement en rouge, rose et vert), la protéine de la matrice M1 (en jaune), sous la membrane virale dérivée de la membrane plasmique, ainsi que les huit RNPv. Ces RNPv représentent des entités de réplication indépendantes et sont composés de l'ARNv, de la NP et d'un complexe polymérase viral (PB1, PB2 et PA).

1. Classification et nomenclature.

	Virus Influenza de type A		Virus Influenza de type B		Virus Influenza de type C		Thogoto virus		Isavirus		
1	PB2		PB2		PB2		PB2		P1		1
2	PB1-F2*	PB1	PB1		PB1		PB1		PB1		2
3	PA		PA		P3		PA		NP		3
4	HA		HA		HEF		GP		P2		4
5	NP		NP		NP		NP		P3		5
6	NA		NA						HA		6
7	M1	M2	M1	BM2	M1	CM2	M1	ML	P4	P5	7
8	NS1	NEP	NS1	NS2	NS1	NS2	NS1*	NS2*	P6	P7	8

Tableau 1 : Composition génomique et protéines synthétisées par les membres de la famille des *Orthomyxoviridae*.

La famille des *Orthomyxoviridae* comporte cinq genres dont trois grippaux.

* Ces protéines ne sont pas retrouvées de manière ubiquitaire chez tous les virus.

Les virus influenza sont des virus enveloppés appartenant à la famille des *Orthomyxoviridae* (**Figure 13**). Cette famille comporte cinq genres (**Tableau 1**) dont trois grippaux, A, B et C. Cette classification est basée sur les propriétés antigéniques de la nucléoprotéine NP et de la protéine de la matrice M1 (84). Bien que les types B et C infectent l'homme, leurs impacts sanitaire et social sont moins importants que ceux des virus influenza de type A (91). Ces derniers sont différenciés en sous-types dépendants des caractéristiques antigéniques des deux glycoprotéines de surface : l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). A ce jour, 16 sous-types de HA (65) et 9 de NA ont été répertoriés dans le réservoir aviaire (**Tableau 2**) (65), bien que seules les combinaisons de H1, H2, H3 et N1 et N2 soient considérées comme circulantes chez l'Homme (**Tableau 2**) (175).

		NA								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
HA	1	AV Porc Homme	Homme AV	Baleine AV	AV	AV	AV	Porc AV	Cheval AV	AV
	2	AV	AV	AV	AV	Sterne Colvert	AV	AV	AV	AV
	3	Porc AV	Homme AV	Porc AV	AV	AV	AV	AV	Chien AV	AV
	4	AV	AV	Colvert Poulet	AV	AV	AV	Oie	AV	AV
	5	AV Félins Homme	AV	AV	AV	AV	AV	AV	AV	AV
	6	AV	AV	Colvert Poulet	AV	AV	AV	Oie	AV	AV
	7	AV	AV	AV	AV	Colvert	AV	Cheval AV	AV	AV
	8	AV	Canard	AV	AV	AV			AV	
	9	AV	Porc AV	AV	AV	AV	AV	AV	AV	AV
	10	AV	AV	AV	Vison AV	AV	AV	AV	AV	AV
	11	AV	AV (Buffle ?)	AV	AV	AV	Canard	AV	Canard	AV
	12	Colvert	Canard	AV	AV	AV	AV		1 AV	1 AV
	13	AV	Baleine AV	AV		AV	AV	Goéland	Goéland	AV
	14			AV		Colvert	Colvert	AV		
	15	AV	1 Shelduck			AV	AV		Canard	AV
	16			AV					AV	

Tableau 2 : Répartition des sous-types de virus influenza de type A dans différentes espèces animales.

Bien que le réservoir des virus influenza de type A soit aviaire (AV), différents sous-types sont circulants dans de nombreuses espèces animales, dont l'homme. Cette liste n'est pas exhaustive, il est cependant à noter que toutes les combinaisons n'ont pas encore été identifiées ou ne sont pas viables (combinaisons hachurées).

La nomenclature des virus influenza fait intervenir le type, l'hôte (si ce dernier n'est pas humain), le lieu, le numéro et l'année d'isolement. Dans le cas des virus influenza de type A, le sous-type est également mentionné (ex : B/Malaysia/2506/2004, A/Moscow/10/99 (H3N2), A/California/4/2009 (H1N1) ...) (84).

2. Structure du virion.

1) *Le génome viral.*

Le génome des virus influenza A est constitué de huit segments d'acide ribonucléique (ARN) simple brin de polarité négative. Les segments de gènes viraux ont une taille comprise entre 890 et 2341 nucléotides (**Figure 14**). Ils comportent deux régions non codantes, à leurs extrémités 3' et 5', de taille variable selon les segments considérés. Ces régions non codantes regroupent les signaux nécessaires à la transcription, à la réplication, et pour certains segments à l'empaquetage des segments dans la particule virale. A une exception près, le quatrième nucléotide de l'extrémité 3' pouvant être une adénosine (A) ou une guanine (G), les 12 nucléotides de l'extrémité 3' (Uni12) et les 13 de l'extrémité 5' (Uni13) sont conservés pour tous les segments d'une souche d'influenza A. Ces deux séquences sont partiellement complémentaires et s'apparient en une structure dite en poêle à frire (« *corkscrew* »).

Segment	Taille	Protéine(s)	Taille AA	Estimation du nombre / virion
PB2	2341	PB2	759	30-60
PB1	2341	PB1	757	30-60
		PB1-F2*	79-101	?
PA	2233	PA	716	30-60
HA	1732-1779	HA	560-568	500
NP	1565	NP	566	1000
NA	1413-1470	NA	453-473	100
M	1027	M1	252	3000
		M2	96-97	20-60
NS	889-890	NS1	230	/
		NEP	121	130-200

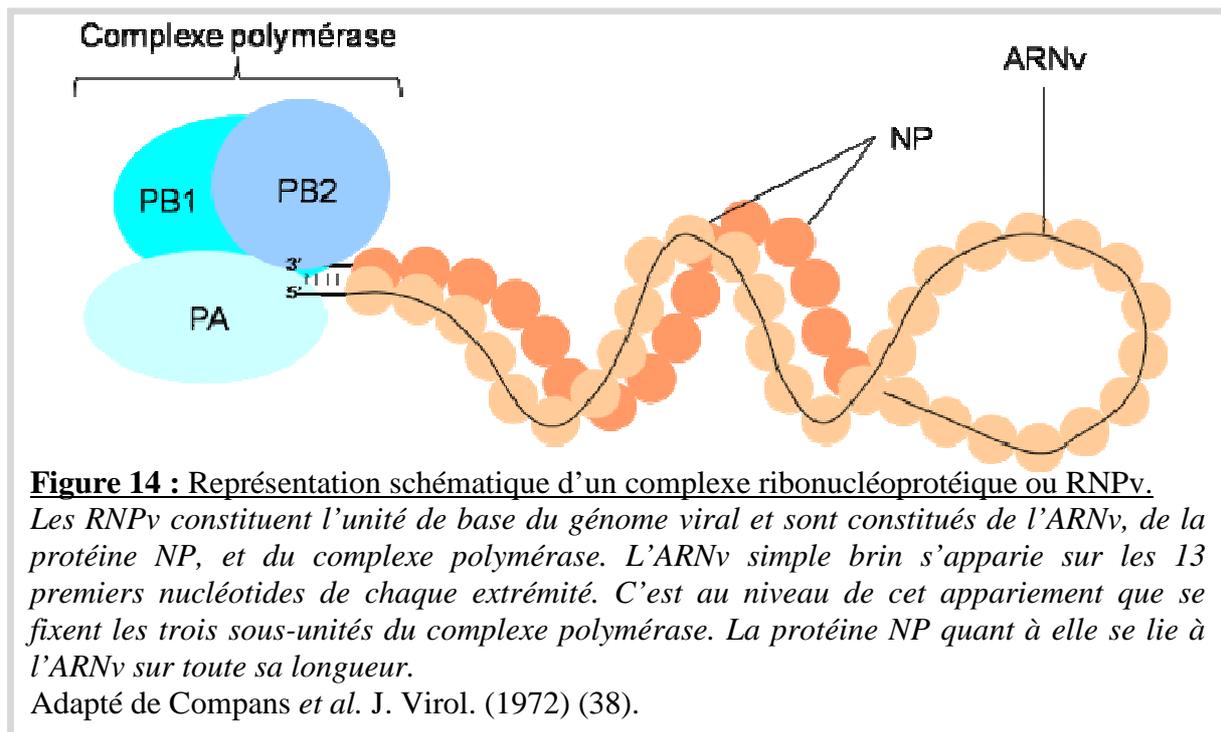
Tableau 3 : Génome et protéines des virus influenza de type A.

Le génome des virus influenza de type A se compose de huit RNPv qui correspondent à des unités indépendantes pour la transcription/réplication.

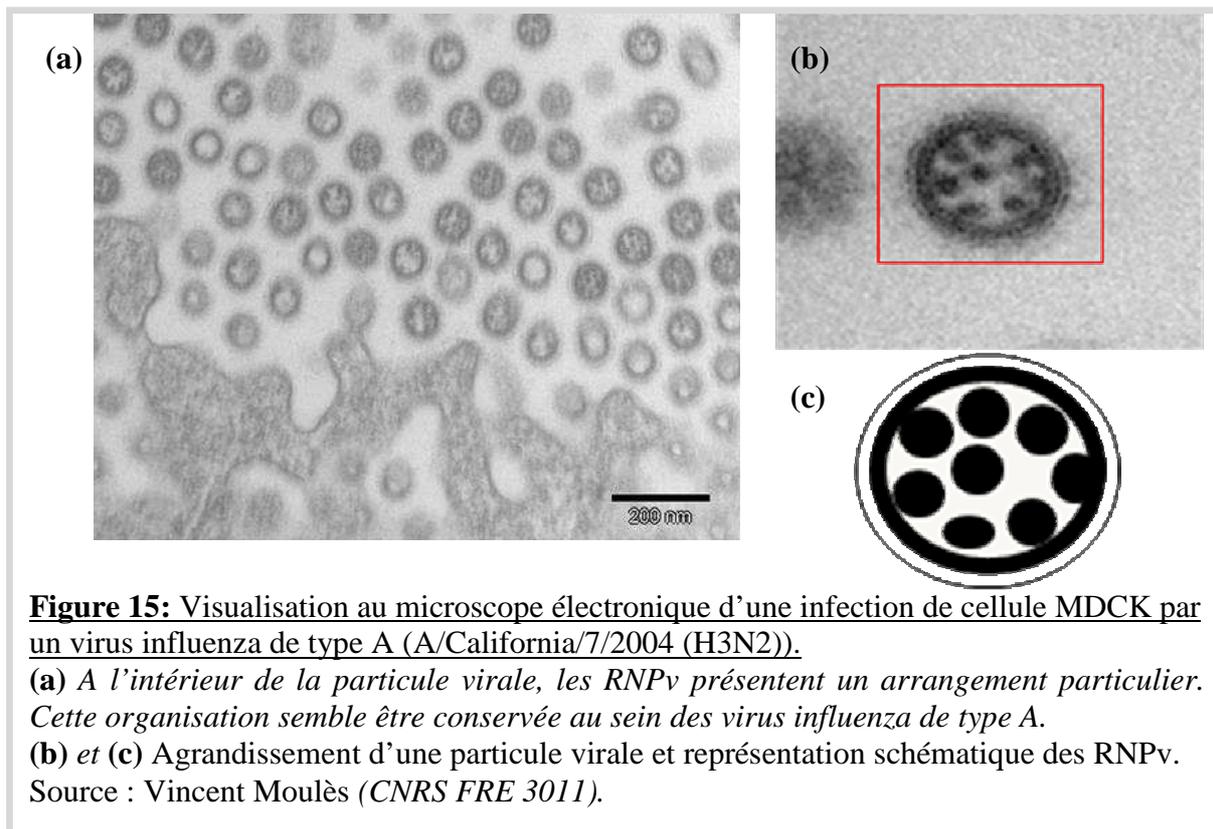
Ces huit segments codent pour 10 à 11 protéines selon les virus (PB1-F2 n'étant pas ubiquitaire ()).*

D'après R. A. Lamb et R. M. Krug (2001) et l'Influenza sequence database du European Influenza Surveillance Scheme.

Chaque segment d'ARN viral (ARNv) est protégé par la nucléoprotéine (NP), à raison d'une protéine NP tous les 24 nucléotides. Ces complexes ribonucléoprotéiques viraux ou RNPv (*viral ribonucleoprotein complex*) sont constitués d'un ARNv lié à leurs extrémités au complexe polymérase viral composé des trois protéines PB1, PB2 (*polymerase basic protein 1 et 2*) et PA (*polymerase acid protein*) (**Figure 14 et 20**). Il a été démontré que les protéines PB1 et PB2 sont liées à l'extrémité 3' des ARNv, tandis que la protéine PA est liée à leur extrémité 5' (61-62) (**Figure 14**). D'après les études de L. S. Tiley, les complexes polymérase auraient une affinité plus forte pour l'extrémité 5' des RNPv (222).



T. Noda et ses collaborateurs ont montré que ces RNPv se présentent sous la forme de bâtonnets d'environ 12 nm de diamètre pour 30 à 120 nm de long. Ses travaux ont également permis de montrer l'organisation de ces RNPv à l'intérieur de la particule virale : sept RNPv de différentes tailles encadrent un segment central (**Figure 15**) (163), les complexes polymérase probablement localisés sous la membrane plasmique. Cette organisation a été décrite chez plusieurs sous-types de virus influenza de type A.



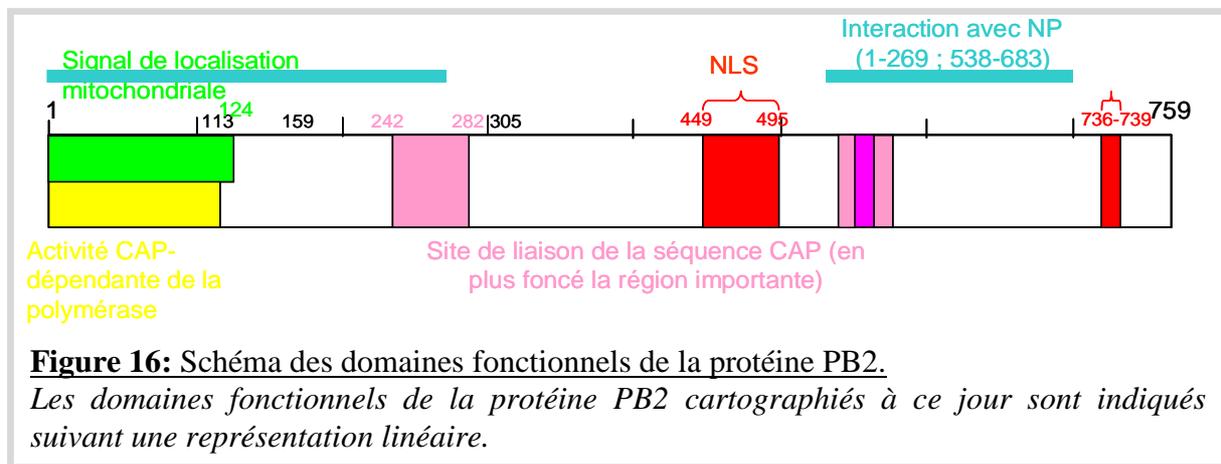
2) Le segment 1 : PB2.

Le complexe polymérase, une ARN polymérase ARN dépendante, est constitué de trois sous unités : les protéines PB1, PB2 et PA (**Figure 20**). Le premier segment des virus influenza de type A code pour la protéine PB2. Elle interagit avec les deux autres sous unités du complexe polymérase viral (18, 89), ainsi qu'avec la nucléoprotéine NP (17) (**Figure 16**).

La protéine PB2 a été identifiée très tôt comme pouvant reconnaître et se lier à la coiffe des ARN messagers (ARNm) cellulaires (19). Ce processus de capture de coiffe est indispensable pour la transcription des ARNm viraux. La région de la protéine responsable de la liaison est située dans une partie de la protéine riche en tryptophanes. Elle est analogue au domaine de capture de coiffe du facteur d'initiation de traduction eIF4E (134, 141).

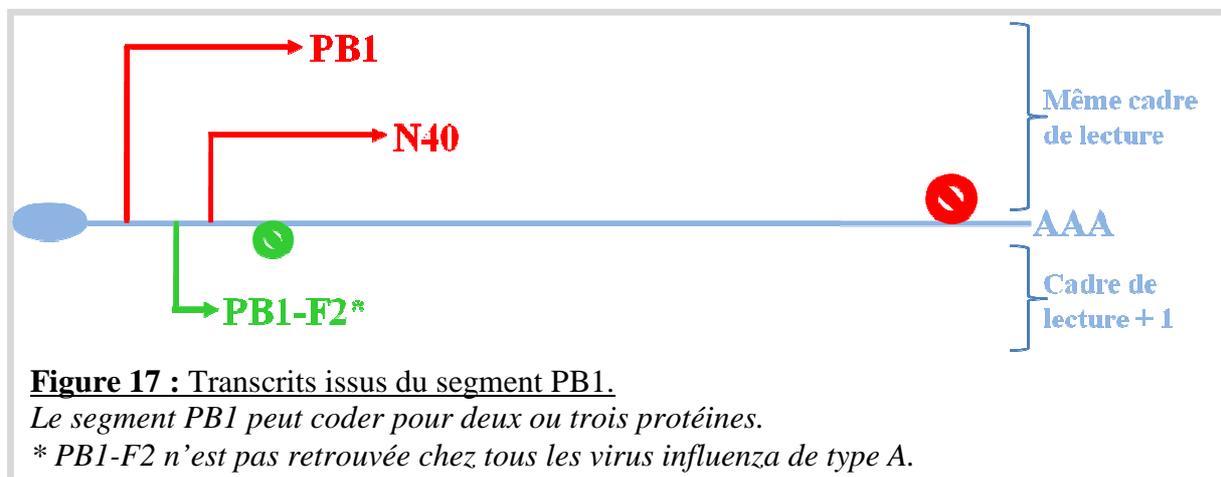
De plus, la protéine PB2 joue un rôle dans la pathogénicité des virus influenza de type A ainsi que dans le spectre d'hôte (215). L'acide aminé (AA) 627 semble participer à la restriction d'hôtes, bien que les mécanismes ne soient pas encore connus. En effet, chez la quasi-majorité des virus influenza de type A circulant dans la population humaine, l'AA en position 627 correspond à une lysine, tandis que les virus infectant les oiseaux possèdent un acide glutamique (211). Une des hypothèses est que le résidu 627 régit l'interaction de la protéine PB2 avec des facteurs cellulaires essentiels pour la transcription et/ou la réplication. Cependant, à ce jour, aucune des protéines cellulaires interagissant avec les sous-unités du

complexe polymérase viral ne semble se lier de manière spécifique au résidu 627. Cet AA pourrait intervenir sur la température permissive pour la réplication des virus selon la présence d'une lysine ou un glutamate en position 627, respectivement 37°C pour les humains et 33°C pour les espèces aviaires (138).



3) Le segment 2 : PB1.

Le deuxième segment des virus influenza de type A code pour une, deux, voire trois protéines selon les virus (**Figure 17**). En effet, si tous les virus influenza synthétisent la protéine PB1, indispensable aux étapes de transcription et de réplication, la protéine PB1-F2, découverte en 2001, n'est pas retrouvée chez tous les sous-types. Le segment PB1 joue un rôle dans la pathogénicité des virus influenza, en particulier *via* cette protéine PB1-F2. La troisième protéine codée par ce segment, N40, découverte récemment conserve encore une grande part de mystère.

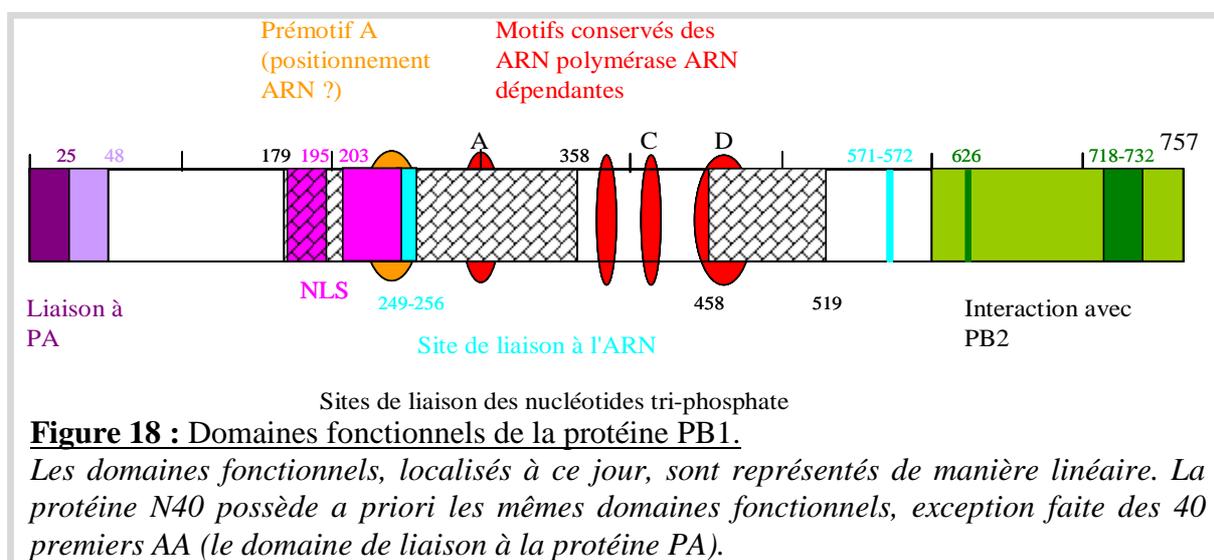


a. La protéine PB1.

Cette protéine de 757 AA (**Figure 18**) est considérée à plus d'un titre comme le cœur de l'ARN polymérase ARN dépendante virale : elle interagit avec les deux autres unités du complexe viral et porte l'activité catalytique de l'ARN polymérase.

La protéine PB1 interagit avec les deux autres protéines du complexe polymérase PB2 et PA (80). Sa région 601-757 interagit avec la protéine PB2 (170) tandis que sa région aminotermine est impliquée dans la liaison avec la protéine PA. La liaison entre les protéines PB1 et PA se fait par des d'interactions hydrophobes (170). Le type d'interaction entre les protéines PB1 et PB2 n'est pas encore connu à ce jour.

La protéine PB1 possède en outre 4 motifs caractéristiques des ARN polymérases ARN-dépendantes (A, B, C, D) (181) et le prémotif A qui permettrait le bon positionnement de l'ARN. Deux sites de liaison aux nucléotides sont également répertoriés (116). Selon la catégorie d'acides nucléiques, l'interaction de la protéine PB1 avec les ARN, ainsi que leur reconnaissance se situe dans deux régions différentes : pour les ARNv, la région aminotermine et la région 493-757, tandis que les ARN complémentaires (ARNc) se lient à la région 1-139, correspondant au domaine d'interaction, et à la région 267-493, dit domaine de reconnaissance. La protéine PB1 est ainsi la sous-unité de la polymérase permettant la discrimination des RNPv des intermédiaires répliatifs, les complexes ribonucléoprotéiques complémentaires (RNPC), en différenciant les promoteurs des RNPC et des RNPv grâce à deux domaines différents. Ces interactions spécifiques et de forte affinité ont été étudiées par Northern-blot (80). La spécificité a été confirmée par l'utilisation d'une sonde et des tests de compétition avec des ARN homologues ou hétérologues.



Le signal de localisation nucléaire de la protéine PB1 est bipartite (158, 178). La protéine PB1 interagit avec la nucléoprotéine NP mais la région d'interaction n'a pas encore été identifiée (8, 178).

b. La protéine PB1-F2.

La protéine PB1-F2 fut découverte lors de l'étude du virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8) en 2001, visant à déterminer de nouveaux peptides présentés par les lymphocytes T CD8+ infectés par un virus influenza de type A (33). Cette protéine est traduite à partir d'un cadre de lecture alternatif du segment PB1. Sa taille varie entre 87 et 90 AA et elle n'est pas retrouvée dans tous les génomes des virus influenza de type A. En effet, si 96 % des souches aviaires, tout sous-type confondu, comportent une protéine PB1-F2, seules les souches A(H3N2) humaines possèdent cette protéine. Les virus humains de sous-type H1N1 isolés après 1950 et les virus porcins comportent une protéine PB1-F2 tronquée (256). La protéine PB1-F2 est un élément non essentiel à la réplication virale. Cependant, il semblerait qu'elle soit un facteur de pathogénicité clef des virus influenza de type A qui la possèdent.

La protéine PB1-F2 est impliquée dans l'apoptose mitochondriale. Elle se localise au niveau de la mitochondrie (78, 248). Au niveau de la membrane de la mitochondrie, son interaction avec les protéines ANT3 (*adenine nucleotide translocator 3*) et VDAC1 (*voltage dependant anion channel 1*) permet le relargage de cytochromes C (254). Il a de même été démontré que la protéine PB1-F2 avait la capacité de se lier à la β tubuline (254). Selon les travaux de K. Bruns et de ses collaborateurs, l'instabilité au niveau de la membrane des mitochondries provient de l'oligomérisation de la protéine PB1-F2 (22).

En 2007, l'équipe de J. McAuley a montré le rôle de la protéine PB1-F2 dans le développement de pneumonies bactériennes secondaires. La protéine PB1-F2 augmente la concentration de macrophages et de neutrophiles au niveau des poumons. Il a de même été montré que la protéine PB1-F2 était responsable chez la souris d'une augmentation de la pathogénicité des virus influenza de type A ainsi que d'un dérèglement des cytokines (144). La même année, G. M. Conenello a montré qu'une simple mutation en position 66 sur la protéine PB1-F2 augmente la pathogénicité du virus (39).

Enfin, un rôle de la protéine PB1-F2 dans la régulation de l'activité du complexe polymérase viral a été avancé (143). En effet, même si la protéine PB1-F2 n'est pas un cofacteur direct des RNPv, elle se localise dans le noyau en phase tardive du cycle viral et son interaction avec la protéine PB1 a été prouvée par co-précipitation (143). Il semblerait que sa

liaison avec la protéine PB1 favorise la réplication de l'ARN viral au niveau des étapes tardives du cycle.

c. Une troisième protéine...

Récemment, une étude de l'équipe de P. Digard ont montré la présence d'une troisième protéine issue du segment 2 : N40 (245) (**Figure 18**). Cette protéine est traduite à partir d'un codon d'initiation présent dans le même cadre de lecture que celui de la protéine PB1 (**Figure 17**). N40 correspond à une protéine PB1 délétée de 39 acides aminés en position aminoterminal. La présence de cette protéine corrobore les observations antérieures des équipes de R. K. Akkina ainsi que de D. R. Perez (2, 177).

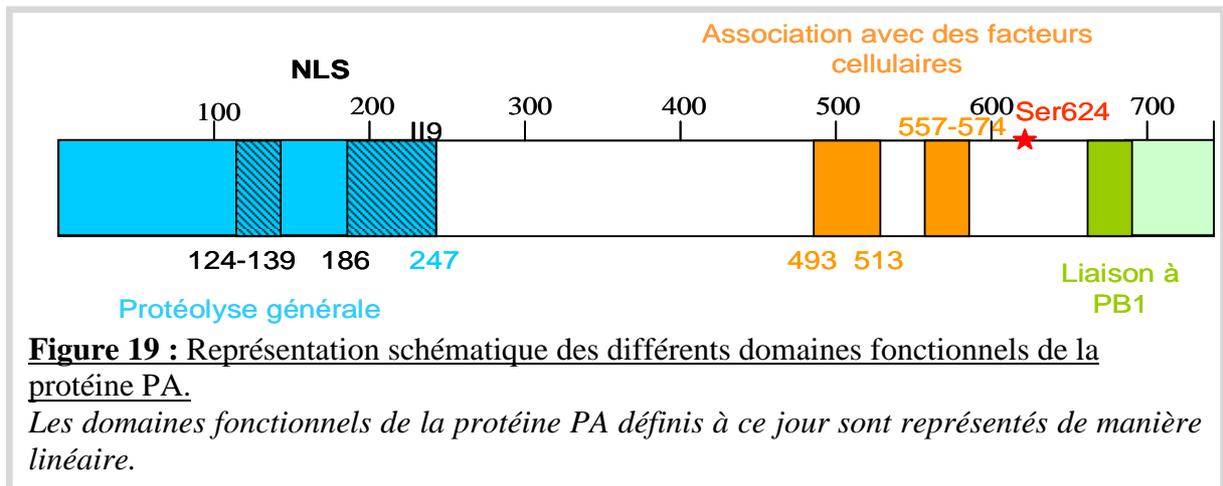
Ses rôles dans le cycle viral ne sont pas clairement établis, même s'il apparaît que la synthèse de cette protéine ne serait pas due à un artefact dans les processus de traduction du fait de l'interdépendance dans la traduction des deux autres produits du segment 2. L'implication de la protéine N40 dans les étapes de transcription/réplication/élongation des transcrits serait une piste intéressante de recherche, car elle comporte les mêmes domaines fonctionnels que la protéine PB1 à l'exception du site de liaison à PA.

L'étude menée par H. M. Wise a permis de montrer que N40 se retrouvait dans la plupart des segments PB1, qu'ils soient issus de virus ayant un spectre d'hôtes aviaire, humain, ou équin.

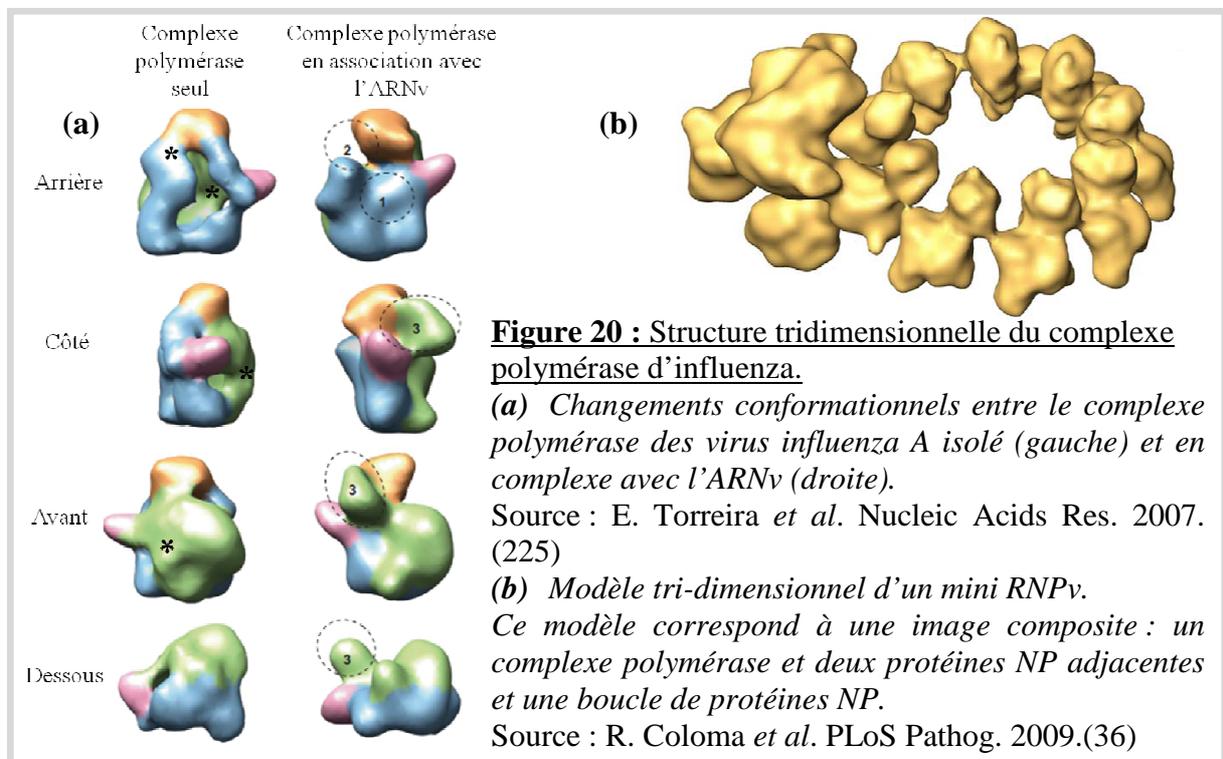
4) Le segment 3 : PA.

Le troisième segment des virus influenza de type A code pour une phosphoprotéine de 716 AA (**Figure 19**) (199). Cette protéine est le troisième élément du complexe polymérase viral. Elle interagit par des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes avec la protéine PB1 (166), et permet la translocation de la protéine PB1 au niveau du noyau (162).

Récemment son interaction avec la protéine PB2 a été montrée par complémentation de fluorescence bimoléculaire (*bimolecular fluorescence complementation*) (89). Cette technique permet d'identifier des interactions protéine-protéine, même faibles. L'association entre les protéines PA et PB2 est deux à trois fois plus faible que les interactions entre les protéines PB1 et PA ou entre PB1 et PB2. L'association entre ces deux protéines fait intervenir les 100 AA situés à l'extrémité aminoterminal de la protéine PA. Il n'est pas exclu que des facteurs cellulaires interviennent.



Bien que les rôles de la protéine PA dans le cycle viral aient longtemps été obscurs, l'étude de virus portant des mutations sur cette protéine a permis de comprendre une partie de ses fonctions. Certaines mutations de la protéine PA entraînent une incapacité du complexe polymérase viral à synthétiser ARNm, ARNv, et/ou ARNc, impliquant la protéine PA dans la transcription ainsi que la réplication. La protéine PA intervient également dans l'assemblage d'un complexe polymérase viral fonctionnel (109) (**Figure 20**).



La mutation H510A entraîne une diminution drastique de l'activité transcriptionnelle du complexe polymérase, tandis que la réplication n'est pas affectée (59). L'inverse a été

montré pour la mutation T157A, cet AA jouant également un rôle dans le transport de la protéine au niveau du noyau (100). Récemment, il a été montré que l'activité endonucléase du complexe polymérase, qui intervient au cours de la transcription était portée par la protéine PA, au niveau de sa partie aminoterminal, très conservée au sein des différents types de virus influenza.

La protéine PA interviendrait également dans l'élongation des transcrits. La mutation R638A provoque la génération d'ARN interférants défectifs : elle entraîne la synthèse d'ARNv incomplets d'une taille comprise entre 200 et 1000 bases (60). Ces ARN interférants défectifs sont empaquetés dans les virions, produisant des particules non infectieuses. Cette mutation n'intervient pas dans l'expression de la protéine PA. L'activité de réplication du complexe polymérase est multipliée par cinq lorsqu'un test avec un gène rapporteur est effectué, bien que ce phénomène ne soit pas observé en condition d'infection.

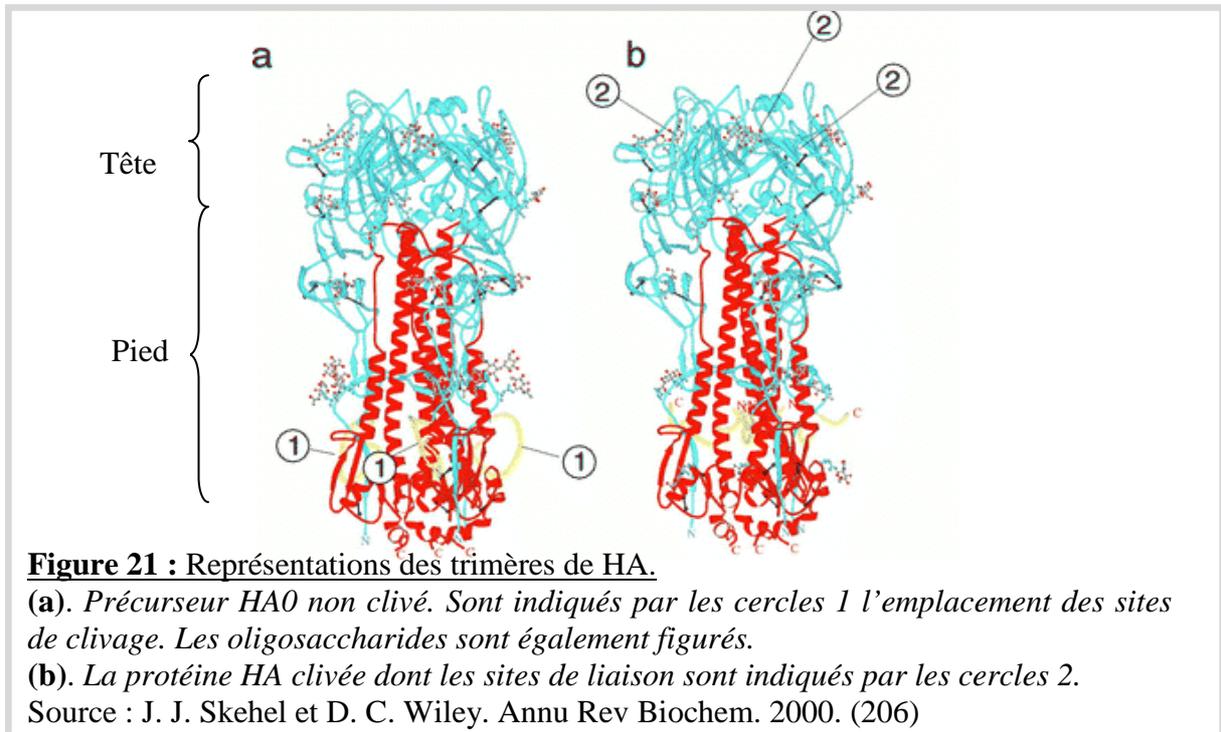
La protéine PA semble également participer à l'assemblage ainsi qu'au relargage des virions (188). Les mutations G507A et R508A entraînent la production de particules virales défectives non infectieuses, bien qu'elles n'aient pas d'impact sur la transcription ou la réplication. Ces mutations sont localisées au niveau d'un site de liaison à l'ATP/GTP putatif. En transfection avec 17 plasmides, les cellules produisent des particules ne contenant pas d'ARNv. Ceci pourrait être dû à un défaut dans l'empaquetage des RNPv, le complexe polymérase se localisant probablement au niveau de la membrane plasmique. Une mutation au niveau de la protéine PA ne serait pas préjudiciable à la formation d'un complexe polymérase actif mais empêcherait le recrutement des RNPv au niveau du site d'assemblage.

Il a été montré que la surexpression de la protéine PA dans des cellules de mammifères ou d'insectes induisait la dégradation des protéines PB2 et NP, suggérant ainsi une fonction de protéase (198). K. Hara et ses collaborateurs ont établi que la protéine PA était une sérine protéase, son site actif étant localisé au niveau du résidu S624 (87).

5) *Le segment 4 : HA.*

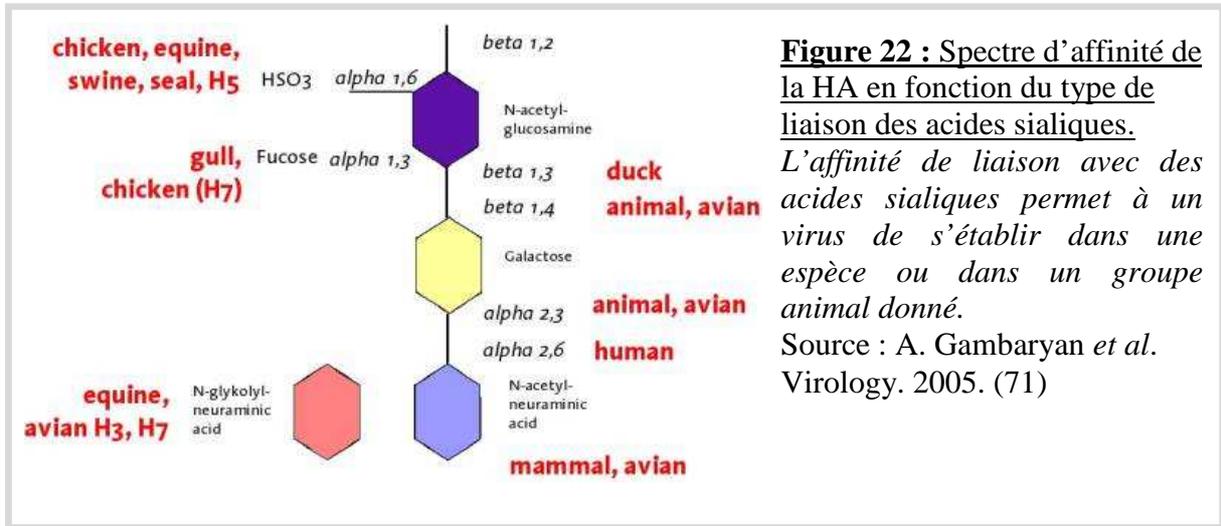
L'hémagglutinine (HA) est une glycoprotéine de surface trimérique (**Figure 21**). Chaque monomère contient deux ou trois sites de glycosylation. Elle comporte entre 562 et 566 AA, selon le sous-type. Son poids moléculaire est d'environ 76 kilodaltons (kDa). Le rôle principal de la protéine HA est la reconnaissance et la liaison à l'acide N-acétyl-neuraminique (239). La protéine HA constitue 80 % des protéines membranaires soit environ 500 protéines HA par virion. Elle est l'antigène majeur des virus influenza de type A. Ses sites antigéniques,

au nombre de cinq (A, B, C, D et E) sont présents sur la tête de la molécule (244), le pied étant ancré dans la membrane virale.



La protéine HA est synthétisée sous forme d'une précurseur HA0 clivé de manière post-traductionnelle. Ce clivage est indispensable à l'infection car il permet un changement conformationnel à pH acide. Le clivage peut être effectué par des protéases de type trypsine et des protéases intracellulaires par exemple la furine, exprimée dans la plupart des cellules grâce à la présence d'AA basiques au niveau du site de clivage. Les virus possédant des AA basiques près du site de clivage sont considérés comme hautement pathogènes, la délétion de ces mêmes acides aminés réduisent la pathogénicité des virus.

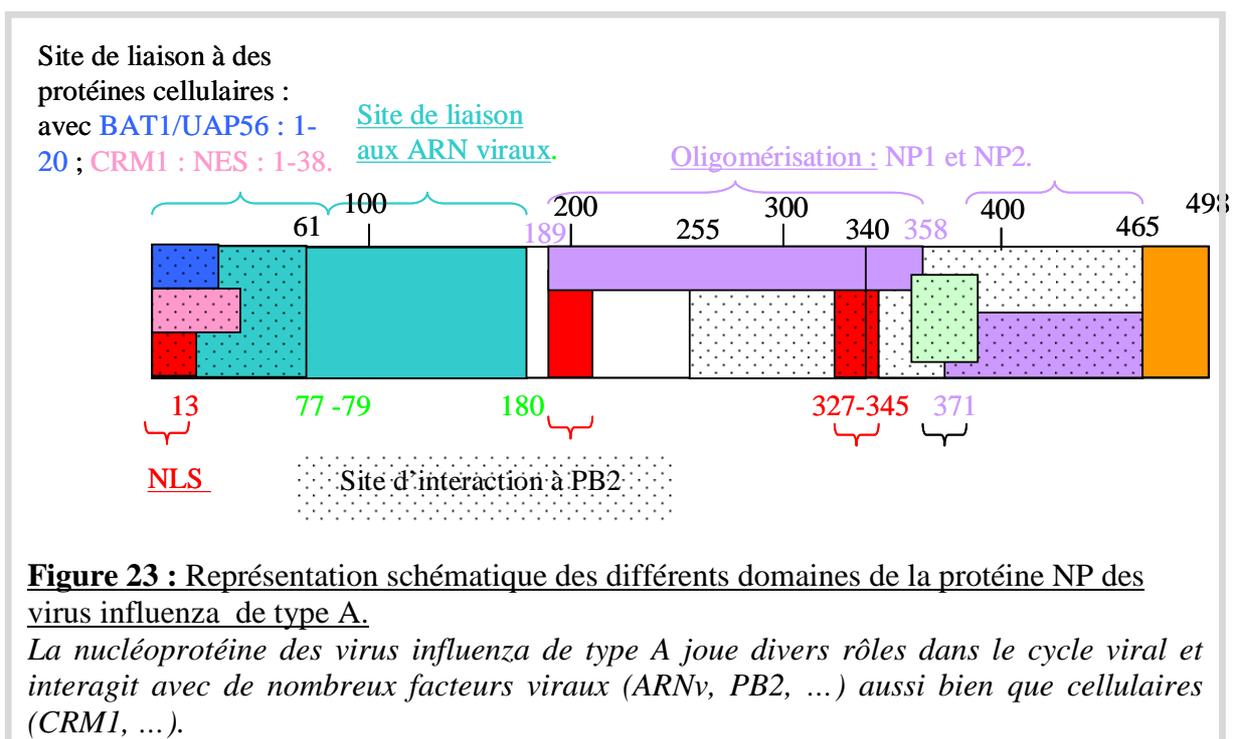
La reconnaissance du récepteur s'effectue au niveau du domaine globulaire de HA1. Certains AA de cette région contrôlent la spécificité de la liaison au récepteur (AA 226-228, situés au niveau du site antigénique D de H3). Ainsi, une protéine HA comprenant une glutamine en position 226 se liera préférentiellement à un acide sialique lié en $\alpha 2,3$, tandis qu'un résidu leucine à la même position orientera la molécule vers les acides sialiques liés en $\alpha 2,6$ (Figure 22). A l'inverse, le remplacement d'une sérine par une tyrosine change la spécificité de liaison pour un acide sialique lié en $\alpha 2,3$ en $\alpha 2,6$.



6) Le segment 5 : NP.

La nucléoprotéine NP (**Figure 23**), unique produit du segment NP, est une phosphoprotéine basique. D'un poids moléculaire d'environ 56 kDa, cette protéine est très conservée au sein des virus influenza de type A.

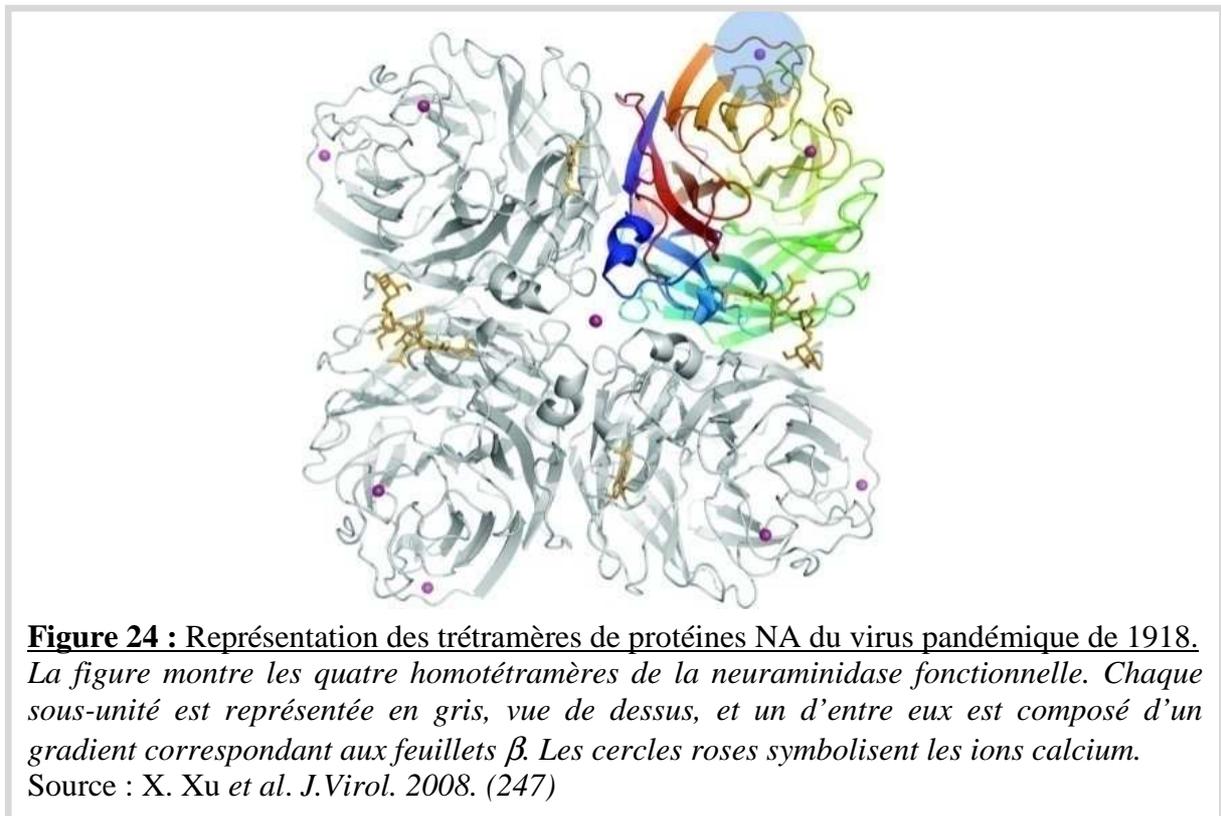
La protéine NP est la deuxième protéine la plus représentée au sein de la particule virale, chaque virion en comprenant environ 1000 (119). Elle permet l'encapsulation de l'ARNv. La protéine NP se lie à l'ARN de manière aspécifique : l'extrémité aminotermine de la protéine se lie aux ARNv sur toute leur longueur (4, 38). Chaque RNPv comprend entre 37 et 97 protéines NP.



En plus de son rôle structural, la nucléoprotéine NP intervient à de nombreuses étapes du cycle de réplication des virus influenza de type A. Lors des étapes précoces, la protéine NP facilite l'import des RNPv jusqu'au noyau grâce à ses NLS (*nuclear localization signal*). La protéine NP joue également un rôle dans la synthèse d'ARN dans le noyau (98). Il semblerait que sa présence soit nécessaire à la transcription de longs segments d'ARN, bien que le complexe polymérase viral soit suffisant pour initier cette synthèse (96). La protéine NP interagit d'ailleurs avec deux sous-unités du complexe polymérase viral, PB1 et PB2 (17), suggérant un rôle possible dans la régulation de l'activité de la polymérase virale, en particulier au niveau du passage transcription-réplication. Aucune interaction avec PA n'a à ce jour été démontrée.

7) Le segment 6 : NA.

La forme active de la neuraminidase des virus influenza de type A se compose d'homotétramères présents à la surface de la particule virale (**Figure 24**). L'étude de cette protéine a débuté peu après l'identification du virus lui-même. Appelée dans un premier temps RDE, pour *receptor-destroying enzyme*, elle est renommée neuraminidase par Gottschalk en 1957.

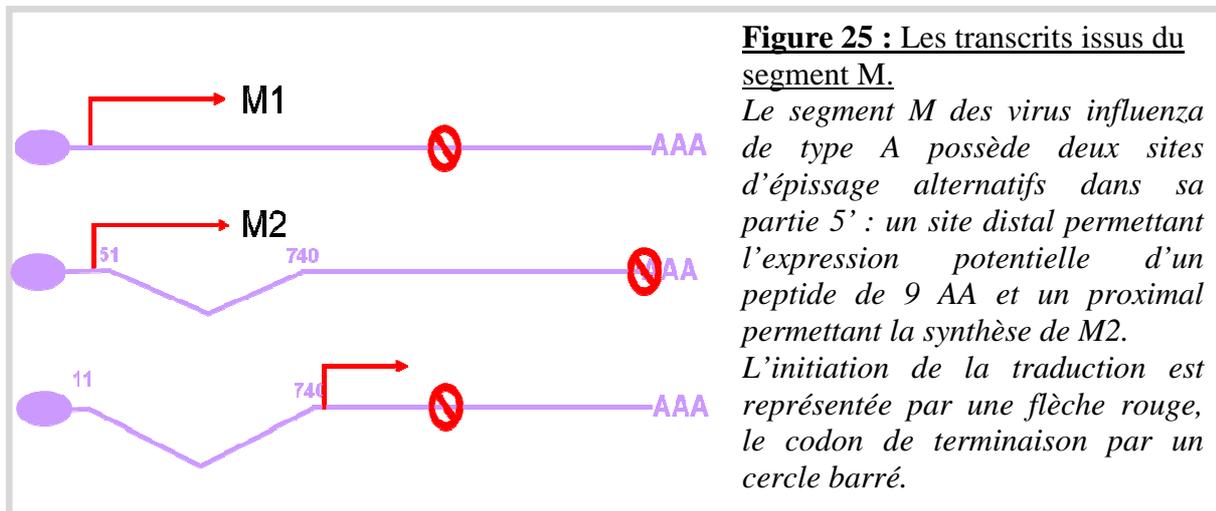


La protéine NA est ancrée dans la membrane virale par une série d'AA hydrophobes proches de son extrémité aminotermine. L'exodomaine possède l'activité sialidase, permettant la libération des virions néosynthétisés. Ceci a été démontré, notamment, par les travaux des équipes de J.T. Seto (1966) ou encore de P. Palese (1974). L'activité sialidase de la protéine NA prévient l'agrégation des virions au cours des étapes tardives du cycle viral, et facilite la propagation des virus à travers le mucus (139). Cette fonction de la protéine NA la rend attractive en tant que cible pour des agents antiviraux. Récemment, le rôle de la protéine dans la mise en place d'infections bactériennes secondaires a été avancé (145, 187), notamment en promouvant l'adhésion des bactéries au niveau des poumons.

Il a été montré l'existence d'un équilibre entre les activités antagonistes des deux glycoprotéines de surface, les protéines HA et NA (231).

La protéine NA correspond également au deuxième antigène majeur des virus influenza de type A. Des poulets vaccinés avec des polypeptides purifiés correspondant à l'exodomaine de la NA sont protégés lors d'une expérience de *challenge*. Cependant, cette inhibition peut ne pas être liée à la reconnaissance de sites antigéniques par le système immunitaire, mais par un blocage de l'activité enzymatique de la protéine.

8) Le segment 7 : M.



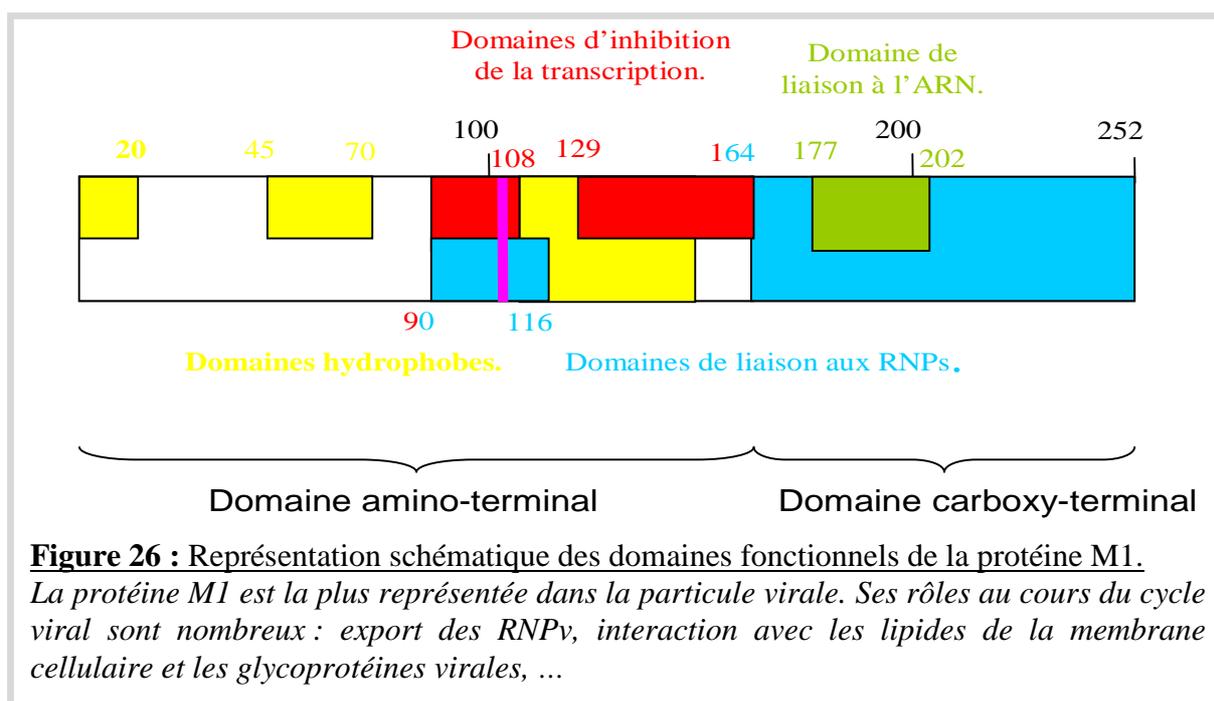
Le segment M est transcrit en trois ARNm au cours du cycle viral. Seuls deux d'entre eux interviennent dans la traduction d'une protéine, correspondant à M1 et M2 (Figure 25).

a. La protéine de matrice M1.

La protéine M1 des virus influenza de type A est le composant le plus abondant au sein de la particule virale. Elle est constituée de 252 AA très conservés. La protéine M1 fait le lien entre la membrane lipidique, les queues cytoplasmiques des protéines membranaires, et les RNPv (253), en tapissant la face interne de la membrane des particules virales.

La protéine M1 intervient à différents stades du cycle viral. Elle régule l'export nucléaire des RNPv néosynthétisés, en association avec la protéine NEP (1), prévenant également leur réentrée dans le noyau (136). Il a été montré qu'elle pouvait interagir avec les RNPv (**Figure 26**) et ainsi inhiber leur transcription (236). Aucune interaction avec la nucléoprotéine NP n'avait été démontrée (99) jusqu'aux travaux de S. L. Noton (164).

De plus, l'oligomérisation de la protéine M1 est un point critique dans divers aspects de l'assemblage et du bourgeonnement des virus (exclusion des protéines cellulaires au niveau du virion, concentration des composants viraux sous la membrane ...).



b. Le canal à protons M2.

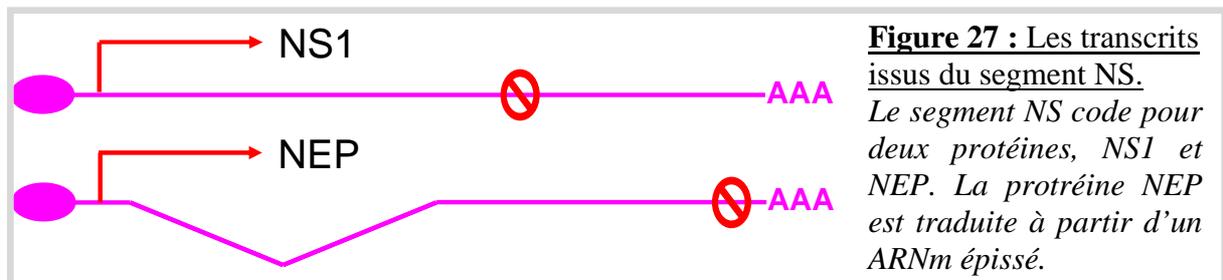
La protéine M2 est une protéine transmembranaire de type II de 96 ou 97 AA. La forme active est composée d'homotétramères de M2 reliés entre eux par des ponts disulfure (94, 216). Cette protéine comporte un ectodomaine en sa partie aminotermine, une seule hélice transmembranaire et une queue cytoplasmique en sa partie carboxyterminale. Cette

protéine est largement localisée dans la membrane plasmique des cellules infectées, bien que quelques molécules, entre 23 et 60, soient incorporées dans la membrane virale (120, 255).

En 1992, L. H. Pinto et ses collaborateurs ont montré que la protéine M2 était un canal à ions (179). Son rôle se situe lors de l'entrée du virus, d'avantage documenté par la suite. Il a été montré que la partie cytoplasmique jouait un rôle dans l'activité canal à protons (223) et récemment, P. A. Nguyen et ses collaborateurs ont mis en évidence un changement de conformation du domaine intracellulaire de la protéine M2 pH-dépendant (159).

9) Le segment 8 : NS

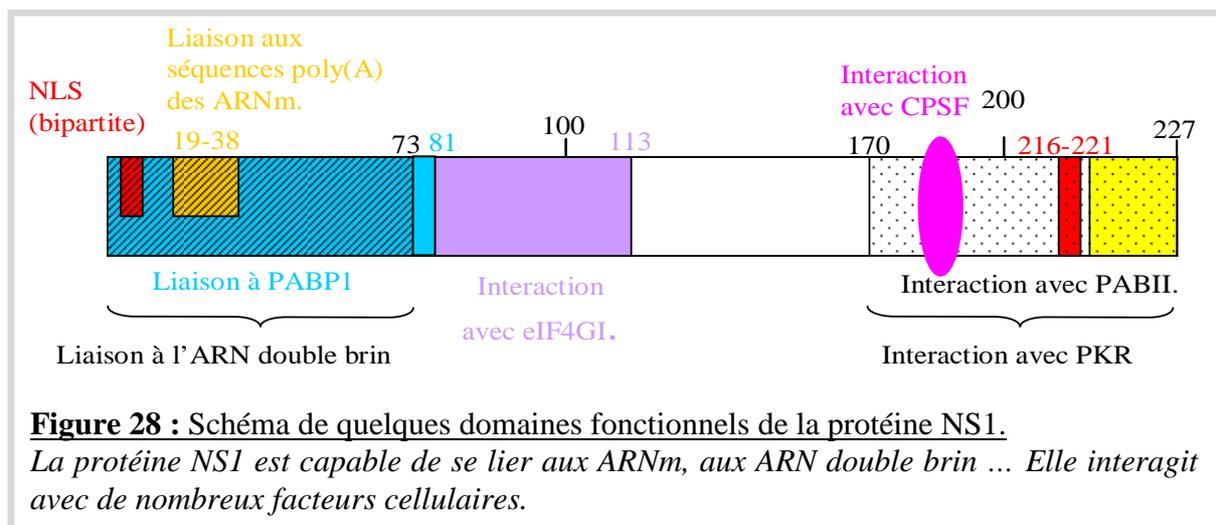
Le segment NS code pour deux protéines, NS1 et NS2, rebaptisée récemment NEP (**Figure 27**).



a. La protéine non structurale 1 (NS1).

La protéine non structurale 1 (NS1) est codée par un ARNm du segment 8. Sa taille varie en fonction des souches de 230 à 237 AA (**Figure 28**), pour un poids moléculaire approximatif de 46 kDa. Cependant, dans la nature, les protéines NS1 tronquées à leur extrémité carboxyterminale de 15 à 30 AA ne sont pas rares (214). Des analyses phylogénétiques ont mis en évidence que les protéines NS1 pouvaient être séparées en deux groupes, les allèles A et B. L'allèle A regroupe des protéines NS1 de virus possédant un spectre d'hôtes aviaire, et toutes celles issues des virus humains, porcins et équins, tandis que les protéines NS1 appartenant à l'allèle B proviennent exclusivement de virus aviaires (130).

La protéine NS1 comporte deux domaines. Le domaine aminoterminal, les résidus 1 à 73, permet la liaison à l'ARN double brin de manière aspécifique. Le domaine carboxyterminal, dit effecteur, permet principalement l'interaction avec des facteurs cellulaires. Ces deux domaines participent à la dimérisation de la protéine NS1.



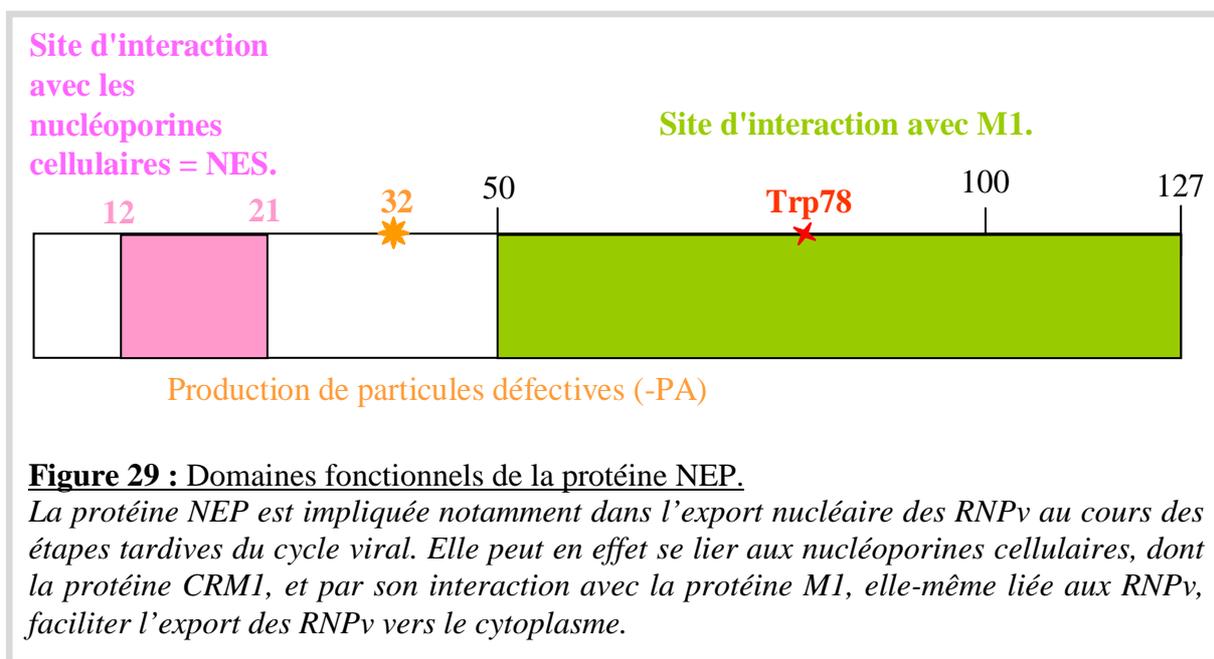
Dans les cellules infectées, la protéine NS1 se localise majoritairement au niveau du noyau, où elle interagit avec les structures des *nuclear domain 10* (ND10) ou corps nucléaires (201), bien qu'une quantité non négligeable de protéines NS1 soit localisée au niveau du cytoplasme, en particulier lors des phases tardives (75).

La protéine NS1 possède de multiples rôles au cours de l'infection. Dans un premier temps, elle régule l'épissage, inhibant la synthèse de NEP (64, 128), bien que le mécanisme mis en œuvre ne soit pas clairement défini. La protéine NS1 contrôle également la réplication des ARNV durant l'infection, de même qu'elle augmente la traduction des ARNm viraux, sans affecter celle des ARNm cellulaires (45).

Le rôle le plus étudié de la protéine NS1 est celui d'inhibiteur de la réponse immunitaire des cellules infectées, en particulier des interférons (IFN). Cependant, les propriétés antagonistes de la protéine NS1 par rapport aux IFN α/β sont spécifiques à la souche étudiée. La protéine NS1 serait capable d'inhiber l'induction de l'IFN- β au niveau pré-transcriptionnel par blocage de l'activation des facteurs de transcription IRF-3, NF κ B et c-Jun/ATF-2 (131, 218, 233) en se liant au senseur cellulaire RIG-I (83) aussi bien qu'au niveau post-transcriptionnel par rétention des ARNm de la cellule hôte. De plus, la protéine NS1 peut directement bloquer les fonctions de deux protéines, la 2'-5'-oligoadenylate synthetase (OAS) (150), et la *dsRNA-dependent serine/threonine protein kinase* R (PKR) (151). Elles correspondent à des protéines antivirales cytoplasmiques en reconnaissant l'ARN double brin. Elles jouent également un rôle dans la réponse immunitaire innée en induisant la synthèse d'IFN- β et l'apoptose cellulaire (77).

b. La protéine d'export nucléaire (NEP, anciennement NS2)

La deuxième protéine issue du segment NS est dérivée de l'ARNm de NS1 par épissage et est traduite en une protéine d'environ 14,2 kDa de 121 AA (**Figure 29**). Cette protéine est retrouvée dans le noyau des cellules infectées (201), grâce à son NLS, et a été nommée NS2 pour protéine non structurale 2 (102), bien que sa présence dans les virions ait été démontrée par J. C. Richardson et R. K. Akkina (190). La protéine NS2 participe à différentes étapes du cycle viral, notamment dans l'export nucléaire des RNPv néosynthétisés. R. E. O'Neill et ses collaborateurs en 1998 ont montré que la protéine NS2, renommée alors NEP pour *nuclear export protein*, joue un rôle dans l'export des RNPv en interagissant avec la protéine CRM1 (*Chromosome region maintenance 1*) (165). Le modèle proposé comporte ainsi un complexe d'export dans lequel la protéine NEP interagit *via* sa région aminotermine avec la protéine CRM1, et *via* sa région carboxy-terminale avec la protéine de matrice M1, elle-même liée aux RNPv (1). L'interaction de la protéine NEP avec la protéine M1 a été démontré (190). Il a été également montré que la protéine NEP interagissait avec plusieurs autres nucléoporines, pouvant ainsi être responsable du recrutement de la machinerie d'export.

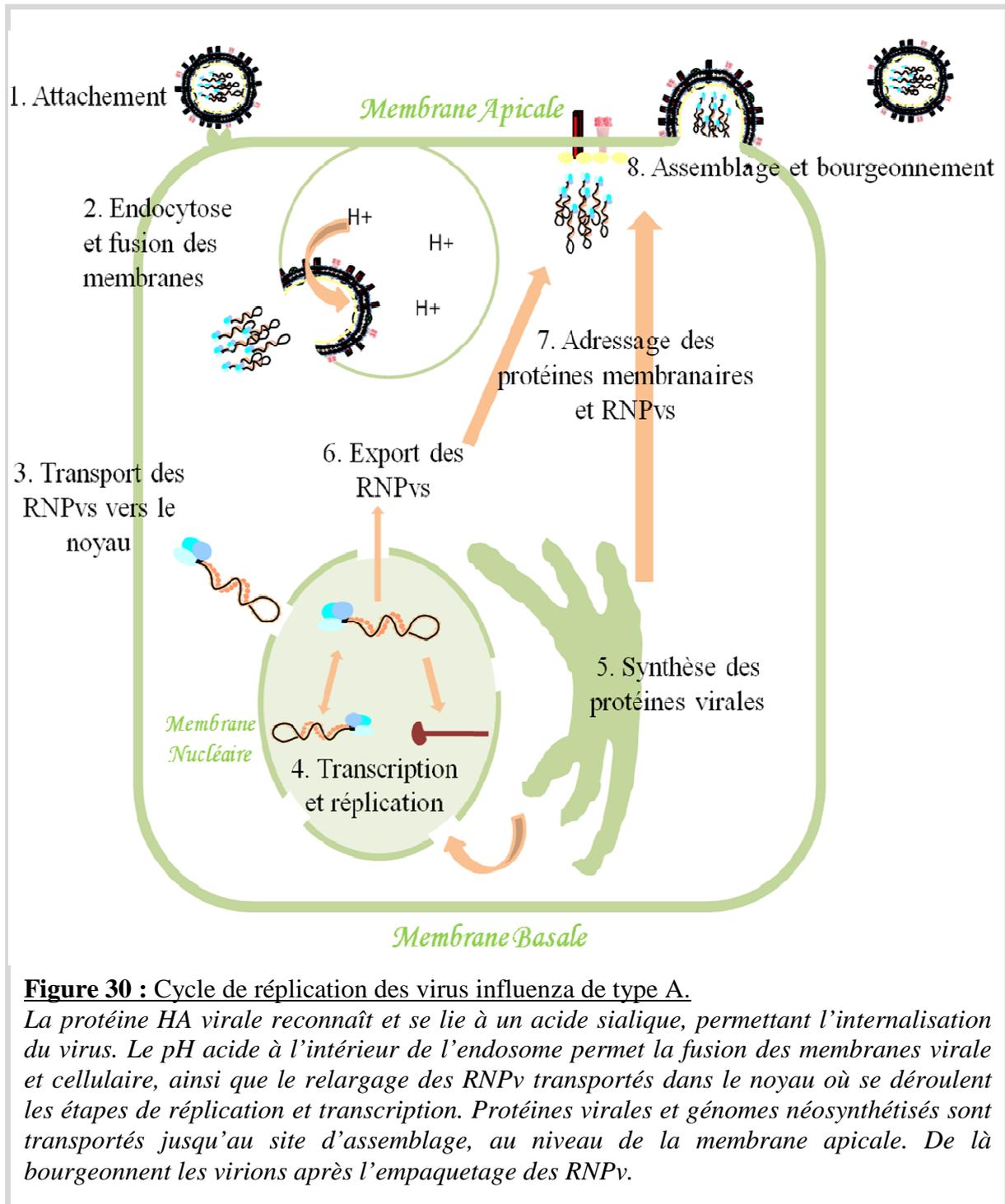


L'équipe de R. Bullido a montré que la protéine NEP inhibait la synthèse d'ARN, réduisant les taux d'ARNv, d'ARNc et d'ARNm (24), sans être toxique pour les cellules bien que plusieurs travaux (52, 97) n'aient pu démontrer un rôle de la protéine NEP dans les mécanismes de transcription/réplication. Ils ont utilisé un segment PB2 recombiné exprimant

la protéine CAT. Plus récemment, N. C. Robb et ses collaborateurs ont montré que la protéine NEP régule la transcription ainsi que la réplication des virus influenza de type A (191). Ils mettent également en évidence une différence dans les ratios ARNm:ARNc en infection par rapport aux tests avec seules les protéines nécessaires à la transcription/réplication. Leurs résultats ne sont pas en accord avec ceux de R. Bullido et ses collaborateurs. En effet, avec l'augmentation de la quantité de protéine NEP, ils observent une diminution de l'accumulation des ARNm, mais une augmentation de celle des ARNc. L'équipe de N. C. Robb n'a pas utilisé de gènes rapporteurs mais a regardé les différentes espèces (ARNm, ARNc et ARNv) pour tous les segments natifs. Ils ont pu montrer que la présence de la protéine NEP augmentait la quantité d'ARNc de PA de manière surprenante (191). L'implication de la protéine NEP dans la réplication a été montrée par une étude portant sur un mutant de cette protéine position 32 dans NEP du virus Wa-182, dérivé de A/WSN/33 (H1N1) entraîne la production de particules défectives interférentes ne possédant pas le segment PA complet mais des espèces sous-génomiques issues de ce segment (168), ceci a également pu être montré pour les segments PB1 et PB2 après plusieurs passages de ce virus (169).

Il semblerait également que le rôle de la protéine NEP dans l'export nucléaire des RNPv ne soit pas lié à ses fonctions régulatrices des étapes de transcription/réplication. En effet, une mutation dans un domaine essentiel pour la liaison à M1 n'affecte pas cette capacité de NEP (191).

3. Le cycle viral (Figure 30).

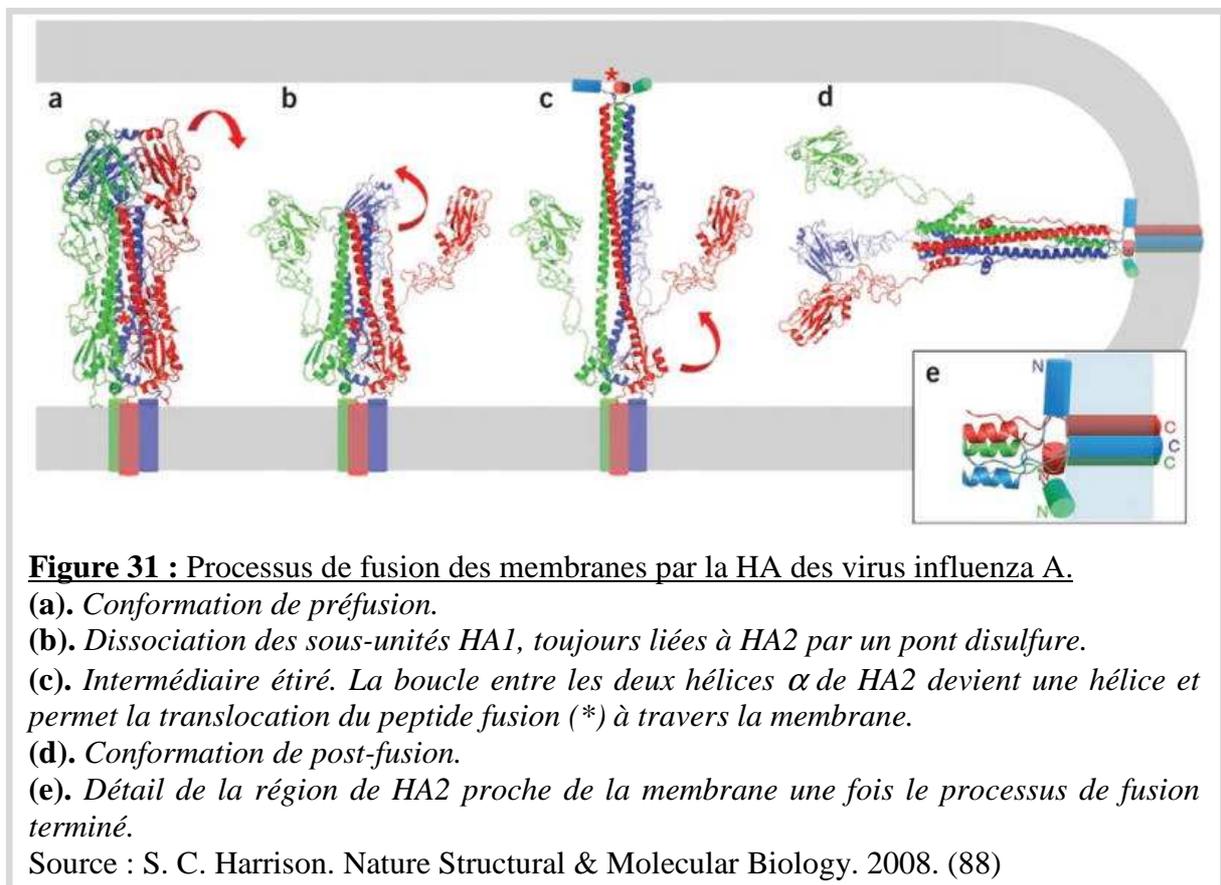


1) Reconnaissance du récepteur et attachement du virus.

La face externe des membranes plasmiques des cellules eucaryotes est tapissée par un manteau de glucides nommé glycocalix. Ses fonctions principales sont la reconnaissance

intercellulaire, l'adhésion des cellules et leur protection contre des agressions mécaniques, chimiques... La plupart des sucres qui constituent le glycocalix se termine par des acides sialiques. Ces structures sont ainsi impliquées dans l'ancrage de virus tels les paramyxovirus. Les trimères de protéines HA des virus influenza de type A permettent leur attachement au niveau des cellules de l'hôte à la surface de la particule virale. Cet ancrage est fonction de la reconnaissance de différents types d'acides sialiques (acide N-acetyl- ou N-glycolylneuraminique), le type de liaison au galactose (α 2-3 ou α 2-6 principalement) et la composition en sialyloligosaccharides à la surface de la cellule (71). Cette reconnaissance sera davantage documentée par la suite.

2) Fusion des membranes virale et cellulaire.

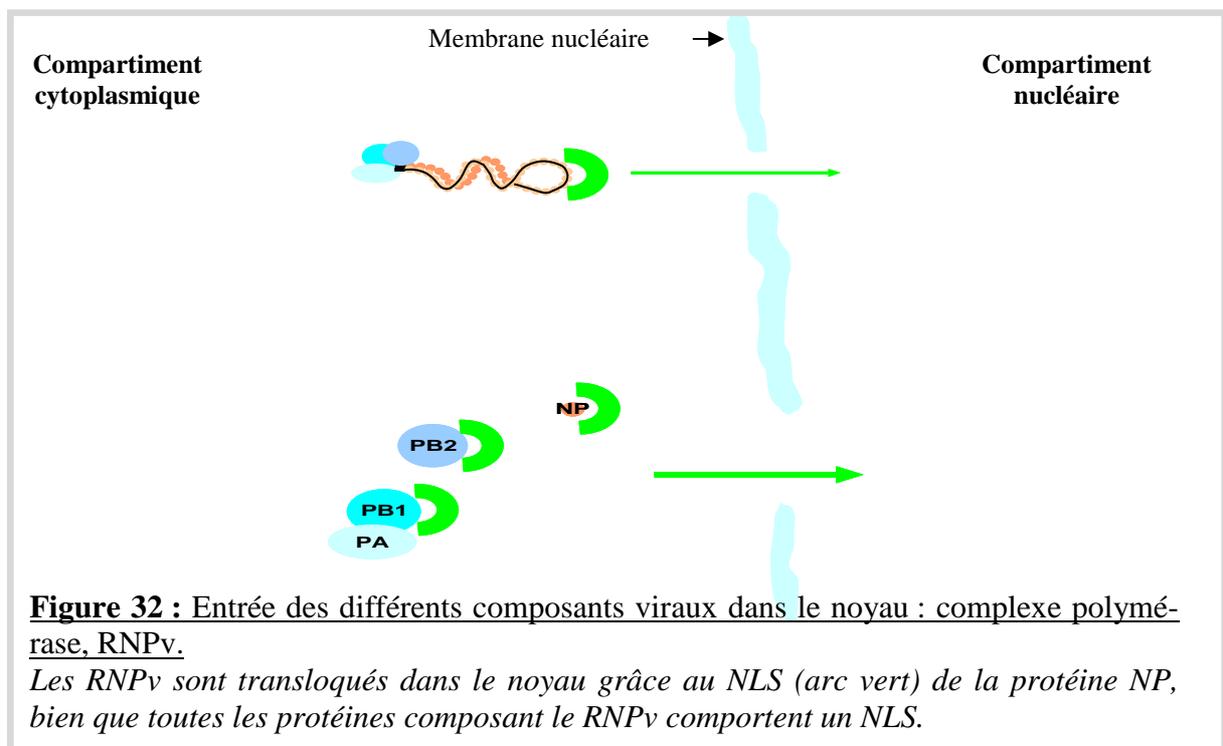


Une fois ancré sur les acides sialiques de la cellule hôte, le virion est internalisé dans un compartiment endosomal par des mécanismes clathrine-dépendants et -indépendants (195). Le virus échappe à la dégradation à l'intérieur de l'endosome en fusionnant sa membrane avec celle de l'endosome, conduisant au relargage des RNPv dans le cytoplasme de la cellule hôte. Cette étape est assurée par deux protéines virales. Le faible pH provoque un changement

conformationnel de la protéine HA (**Figure 31**), permettant d'exposer le peptide fusion (206) qui permet la fusion entre la membrane virale et la membrane endosomale (86, 230), formant un pore pour le passage des RNPv (Figure 28). Parallèlement, les ions hydrogène présents dans l'endosome sont transportés à l'intérieur de la particule virale *via* le canal à protons M2. Cette acidification interne va permettre aux RNPv d'être dissociés de la protéine de matrice M1 et d'être relargués dans le cytoplasme (136).

3) Transport des RNPv jusqu'au noyau.

Une fois dans le cytoplasme, les RNPv sont importés dans le noyau pour les étapes de transcription et de réplication. Ces RNPv ont un diamètre d'environ 15 nm pour une longueur comprise entre 50 et 100 nm, leur permettant d'emprunter le complexe de pore nucléaire qui peut transloquer des composants jusqu'à 39 nm de diamètres (176). La translocation des RNPv dans le noyau se fait par un mécanisme actif (137). Aucune étude n'a encore permis d'affirmer si ces RNPv étaient transloqués dans le noyau ensemble, ou si chacun d'entre eux entrait de manière indépendante.



Des RNPv purifiés injectés dans le cytoplasme d'une cellule sont rapidement accumulés dans le noyau (111). Chacun des RNPv possède l'information nécessaire pour ce processus, chaque protéine qui le compose (PB1, PB2, PA et NP) comportant un NLS.

Cependant, la nucléoprotéine NP semble être la seule protéine virale impliquée dans la translocation nucléaire des RNPv (136, 246) (**Figure 32**): des complexes comportant uniquement des protéines NP couplées à de l'ARN peuvent être transportés dans le compartiment nucléaire (40, 173).

4) *Transcription et réplication du génome.*

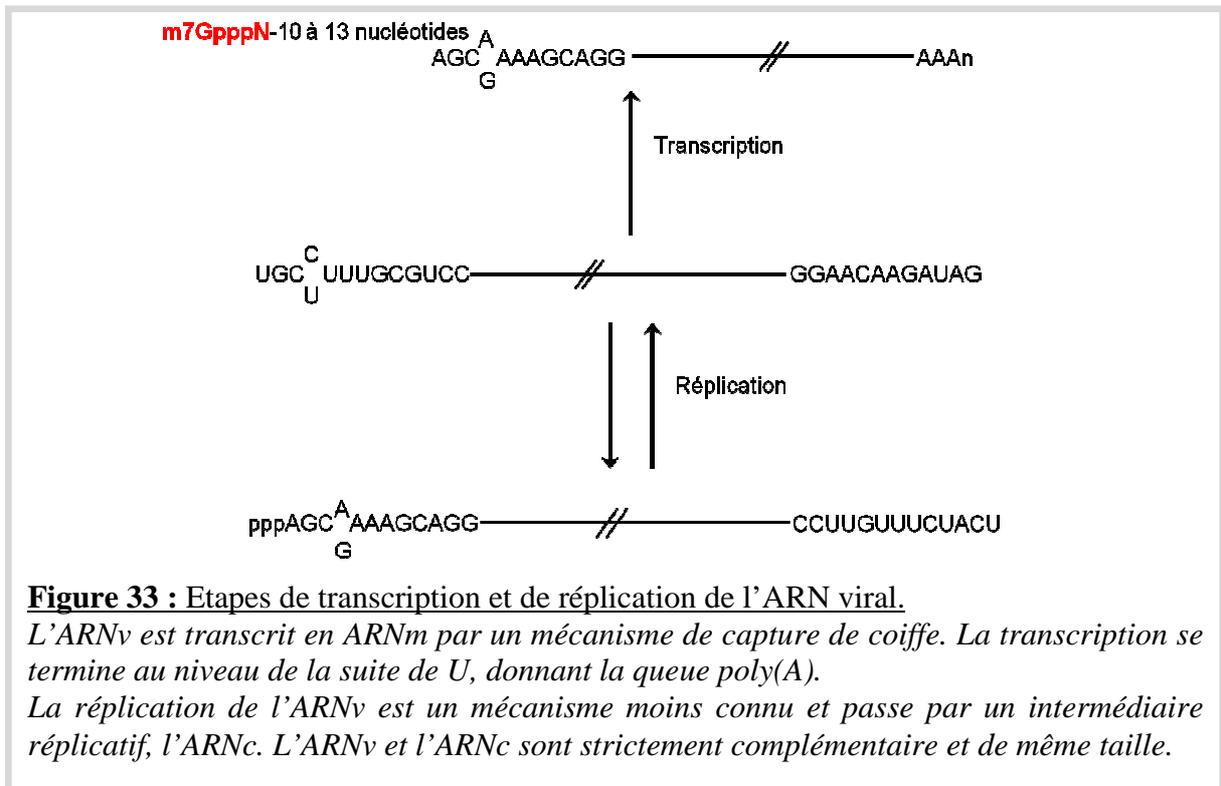
Les virus à ARN ne peuvent pas utiliser l'ARN polymérase II cellulaire qui s'appuie sur une matrice ADN. La plupart de ces virus se multiplie dans le cytoplasme des cellules infectées. Les virus influenza constituent l'une des exceptions car leur réplication se déroule dans le noyau, probablement car deux des huit ARNm nécessitent un épissage, se basant sur les composants cellulaires présents au niveau du noyau.

Le complexe polymérase des virus influenza prend en charge aussi bien la transcription que la réplication (**Figure 33**). Ces deux processus sont régis par des mécanismes différents. Afin de ne pas être dégradés par les 5' exonucléases cellulaires, les ARNm doivent être coiffés. L'ARN polymérase des virus influenza étant incapable de coiffer ses propres ARNm, un mécanisme de reconnaissance et clivage de la coiffe des ARNm cellulaires a été mis en place. Dans un premier temps, la polymérase se lie au promoteur des ARNv, formé par l'appariement des extrémités 3' et 5', provoquant ainsi un changement conformationnel du complexe. Dans un deuxième temps, la coiffe est reconnue par la protéine PB2, avec la coopération de la protéine PB1. La protéine PA clive le pré-ARNm cellulaire 10 à 13 nucléotides après la coiffe préférentiellement au niveau d'une purine. Ces deux dernières étapes nécessitent la présence des trois sous-unités du complexe polymérase grippal. La terminaison de la transcription nécessite l'interaction de la polymérase avec les séquences 5' de la matrice et se situe au niveau du signal de polyadénylation, consistant en une série de 5 à 7 résidus uracile (U) au, située entre 15 et 22 nucléotides en amont de l'extrémité 5' de l'ARNv (183).

Les gènes des virus influenza de type A peuvent se diviser en deux groupes : gènes précoces (*pb1*, *pb2*, *pa*, *np*, *ns1* et *nep*) et gènes tardifs (*ha*, *na*, *m1* et *m2*) (103, 118). Ce contrôle s'effectue au niveau de la transcription (54) mais également au niveau de la traduction (250).

La réplication du génome viral est, contrairement à la transcription, coiffe-indépendante. Ce processus demeure assez méconnu. La réplication virale se déroule en deux étapes. Dans un premier temps, une copie complète de l'ARNv est synthétisée, l'ARN complémentaire ou ARNc. C'est ensuite cet ARNc qui sert de matrice pour la synthèse du

nouvel ARNv. Cette étape nécessite la nucléoprotéine NP qui permet alors de dépasser la suite de U, et ainsi d'obtenir une copie complète de l'ARN viral (14).

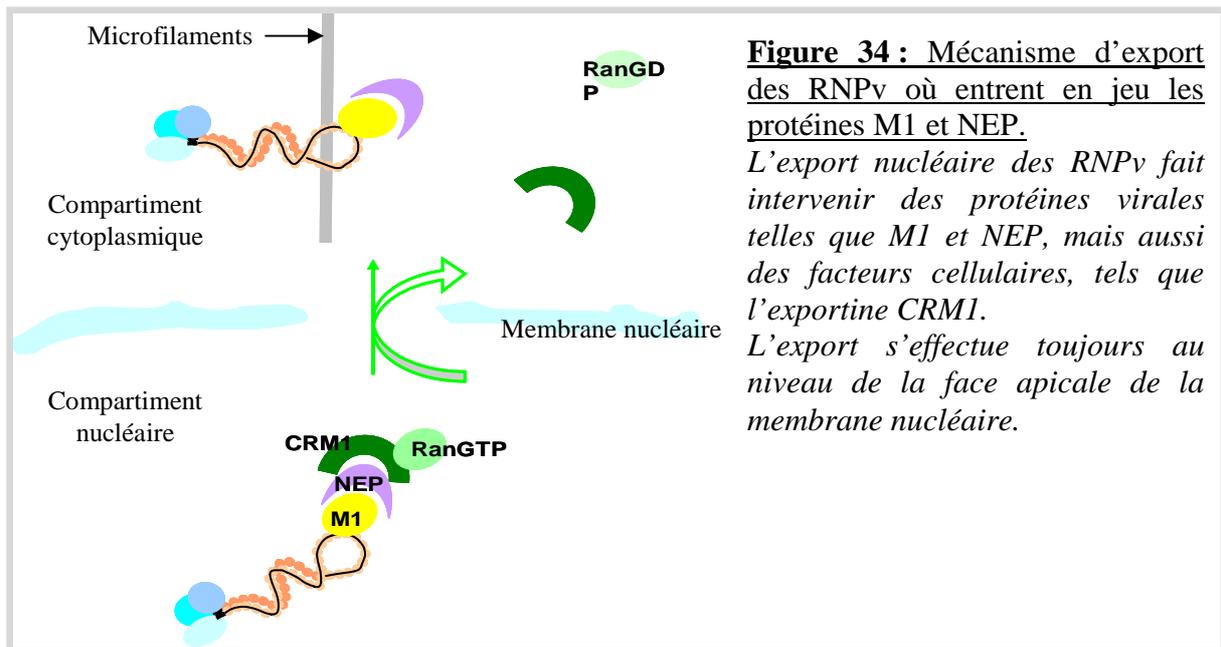


5) Export des RNPv et transport jusqu'aux radeaux lipidiques.

L'export des RNPv ne débute qu'au moment de l'expression des gènes tardifs, en particulier la protéine de matrice M1. La liaison de la protéine de la matrice avec les RNPv est la résultante d'interactions protéine-protéine mais également ARN-protéine. Les premières expérimentations montraient le rôle de la protéine M1 dans l'export nucléaire des RNPv, prévenant également une nouvelle entrée de ces complexes (243).

Plus récemment, il a été montré qu'une autre protéine virale participait à ce processus, la protéine NEP pouvant se lier d'une part à la protéine M1, et d'autre part à une nucléoporine CRM1 (voir chapitre III.2.i.b) (**Figure 34**). La protéine NEP comporte au niveau de son extrémité N-terminal un motif NES (*nuclear export signal*) $_{12}ILMRMSKMQL_{21}$ impliqué dans sa liaison avec CRM1. Ainsi, la protéine NEP joue le rôle de pont entre les complexes M1-RNPv et la protéine CRM1, l'extrémité N-terminale de la protéine M1 interagissant avec le résidu tryptophane 78 de la protéine NEP tandis que l'extrémité C-terminale de cette dernière s'associe à la nucléoporine. Par cette association, les motifs NLS des protéines NP et M1 sont masqués, évitant ainsi un retour des RNPv dans le noyau (23, 136).

Cependant, les protéines NEP et M1 ne semblent pas être les seules protéines virales impliquées dans l'export nucléaire de RNPv. En effet, les travaux de D. Elton montrent une interaction entre les protéines CRM1 et NP, bien qu'aucun NES ou site de liaison à la protéine CRM1 n'ait été retrouvé dans la nucléoprotéine (51). Il n'est pas exclu que le processus d'export des RNPv soit effectué *via* différents mécanismes. Les différents intermédiaires de phosphorylation des protéines virales intervenant dans l'export nucléaire des RNPv semblent jouer un rôle dans ce processus.



Les RNPv sont ensuite transloqués dans le cytoplasme par l'intermédiaire du complexe de pore nucléaire au niveau de la face apicale (51). Leur trajet jusqu'au site de bourgeonnement s'effectue vraisemblablement par le biais du cytosquelette, plus particulièrement les microfilaments d'actine. La nucléoprotéine NP peut s'associer aux microfilaments en absence de toute autre protéine virale, tout comme la protéine M1. Récemment, il a été montré que les protéines NP se localisaient au niveau des microtubules également (152). Ce mécanisme a déjà été décrit pour d'autres virus, le virus Sendai par exemple.

6) Acheminement des protéines jusqu'à la membrane apicale.

Après traduction au niveau des polysomes du réticulum endoplasmique (RE), les protéines NA et M2 ainsi que le précurseur HA0 entrent dans la lumière du RE pour y subir

des modifications post-traductionnelles. La protéine M2 n'est pas glycosylée mais sa présence est nécessaire pour la maturation de la protéine HA. Les protéines HA et NA sont transloquées dans le RE grâce à une flipase, une protéine de translocation. Un peptide signal de 16 AA au niveau du précurseur HA0 permet sa translocation dans le réticulum endoplasmique où se déroule la N-glycosylation. Elle consiste en la fixation de sucres sur le groupement amine porté par l'asparagine du motif Asparagine-X-Thréonine/Sérine où X peut être n'importe quel acide aminé excepté la proline. De plus, les protéines vont se replier et s'oligomériser. Les protéines peuvent alors transiter dans le cytoplasme par l'intermédiaire de vésicules jusqu'à l'appareil de Golgi. La glycosylation va se poursuivre et se terminer au niveau du Golgi *cis* et médian mais c'est dans le *Trans Golgi Network* (TGN) que se produisent les étapes les plus importantes. L'activité canal à protons de M2 va équilibrer le pH entre le TGN et le cytoplasme, permettant la maturation de la protéine HA. C'est également dans le TGN que va s'effectuer l'adressage des protéines membranaires. Les cellules polarisées comportent deux types de membranes, apicale et basolatérale, qui sont différentes de par la présence de radeaux lipidiques ou *rafts*, composés principalement de glycosphingolipides et de cholestérol, au niveau de la membrane apicale. Ces structures dynamiques sont insolubles dans des détergents ioniques comme le Triton X-100 et sont appelées *detergent insoluble glycolipids* ou DIGs. L'insertion des protéines virales membranaires s'effectue à cet endroit ainsi que, par la suite, le bourgeonnement. Les cellules polarisées possèdent deux voies principales pour acheminer les protéines à la membrane : un trajet direct entre le TGN et la membrane ou un chemin indirect vers la face basolatérale avec exo- puis transcytose et retour vers la membrane apicale. Les protéines membranaires des virus influenza utilisent la voie directe, médiée par l'ancre glypiée (glycosyl-phosphatidylinositol) de la protéine NA, ou une association de la protéine HA avec les sphingolipides. Si les glycoprotéines HA et NA sont intégrées aux radeaux lipidiques, M2 au contraire ne semble pas y être associée (203). Une fois à la membrane plasmique, le précurseur HA0 est clivé au niveau de l'AA 329, une arginine, en deux sous-unités liées par un pont disulfure, HA1 et HA2.

Le mode de transport des autres composants viraux n'est pas clairement défini. Les virus bourgeonnent au niveau des membranes apicales des cellules polarisées, telles que les cellules MDCK (*Madin Darby canine kidney*), mais également des cellules non polarisées, telles que les cellules BHK (*baby Hamster kidney*) ou 293T. La protéine M1 ne comporte aucun déterminant permettant un adressage apical. Cependant, sa capacité à interagir avec les lipides, les RNPv ou encore les queues cytoplasmiques des glycoprotéines HA et NA, peut expliquer son transport. Le choix du lieu de bourgeonnement semble imputé au transport

spécifique des RNPv. Un adressage basolatéral de la protéine HA ne perturbe pas le bourgeonnement des virus au niveau apical des cellules (11, 154). Les RNPv, ainsi que la nucléoprotéine NP, se situent au niveau de la membrane apicale, de manière indépendante aux protéines HA, M1 ou NEP (26). L'export nucléaire des RNPv par les pores situés vers la face apicale pourrait expliquer cette constante.

7) Empaquetage du génome viral et assemblage.

L'assemblage et le bourgeonnement des virus influenza de type A requièrent la présence de trois composants viraux, l'enveloppe virale, la protéine M1 et les RNPv. Ces éléments doivent donc interagir entre eux. La façon dont ces divers composants atteignent le lieu de bourgeonnement a été décrite dans la partie II.3.6.

Pour être infectieux, un virus influenza doit contenir un exemplaire de chaque RNPv, c'est à dire un empaquetage de huit segments d'ARNv. Deux modèles ont été proposés pour l'incorporation de ces segments de gènes, l'incorporation aléatoire et l'incorporation sélective.

L'hypothèse de l'incorporation aléatoire suppose que le virus est capable d'incorporer de manière spécifique ses ARNv, mais non de différencier les différents segments. Tous les segments des virus influenza posséderaient ainsi une séquence d'empaquetage commune. Cette théorie se base sur différentes observations dont des virus influenza comportant plus de huit segments de gènes (55, 202). Les travaux de C. T. Bancroft et T. G. Parslow notamment ont montré que l'incorporation de différents segments de gènes de virus influenza de type A ne se faisait pas de manière spécifique (9).

Les études actuelles tendent vers l'hypothèse d'un empaquetage spécifique de ces RNPv. Cette théorie suppose que chaque groupe de RNPv possède un signal d'empaquetage spécifique. Ainsi, au moment de l'assemblage des nouveaux virions, une sélection est possible entre ARNv et les autres ARN (cellulaires, ARNm ou ARNc), mais également au sein de ces ARNv, optimisant alors le processus. En effet, les huit ARNv sont retrouvés dans les particules virales dans des quantités quasi équimolaires (147), bien que ces mêmes segments ne soient pas en quantités équivalentes dans les cellules infectées (16, 237). Ainsi, pour tous les segments des virus influenza de type A, des séquences nécessaires à l'empaquetage ont été décrites (segment HA (237), segments NA (69) et NS (68), segments PB1 (47), PB2 (124) et PA (156), segments NP (173) et M (174)). De plus, l'arrangement spécifique des RNPv au sein de la particule (163) suggère des interactions au niveau des acides nucléiques, ou à un niveau protéique. L'empaquetage sélectif des RNPv au sein de la

particule virale n'explique pas le fait que les RNPv ne semblent pas essentiels au processus de bourgeonnement.

8) *Bourgeonnement et libération de nouvelles particules virales.*

Le rôle des différentes protéines virales dans le bourgeonnement est sujet à controverse. L'implication des protéines HA ou M1, bien que démontrée semble contradictoire. Les travaux sur des *virus like particles* (VLP) des équipes de T. Latham et J. M. Galarza ou de l'équipe de B. J. Chen indiquent que la protéine HA seule est capable de provoquer le bourgeonnement (32, 121). Il a été montré par des études de génétique inverse que des mutations dans la queue cytoplasmique de la protéine HA ne modifiaient pas ce processus. La protéine M1, considérée par P. Gomez-Puertas et ses collaborateurs comme la protéine initiant le bourgeonnement, n'est pas nécessaire selon les travaux de B. J. Chen (79). Des mutants dans la queue cytoplasmique de la protéine NA montrent une morphologie de la particule virale altérée (107). La protéine semble également jouer un rôle important dans l'assemblage des nouveaux virions et leur morphologie.

L'initiation du bourgeonnement (**Figure 35**) fait intervenir des composants cellulaires (membrane lipidique) et viraux (protéines d'enveloppe et M1). Les RNPv sont incorporés dans la particule sous l'effet de deux forces opposées : la poussée des filaments d'actine et la courbure initiée par les lipides et les protéines virales. Les clichés de microscopie montrent que les RNPv sont placés de manière perpendiculaire par rapport au plan de bourgeonnement (163). Le bourgeonnement se termine par la scission de la particule néosynthétisée et de la cellule infectée (**Figure 35**). Il semblerait que cette étape soit limitante dans le cycle viral, seulement 10 % des virus étant relargués.

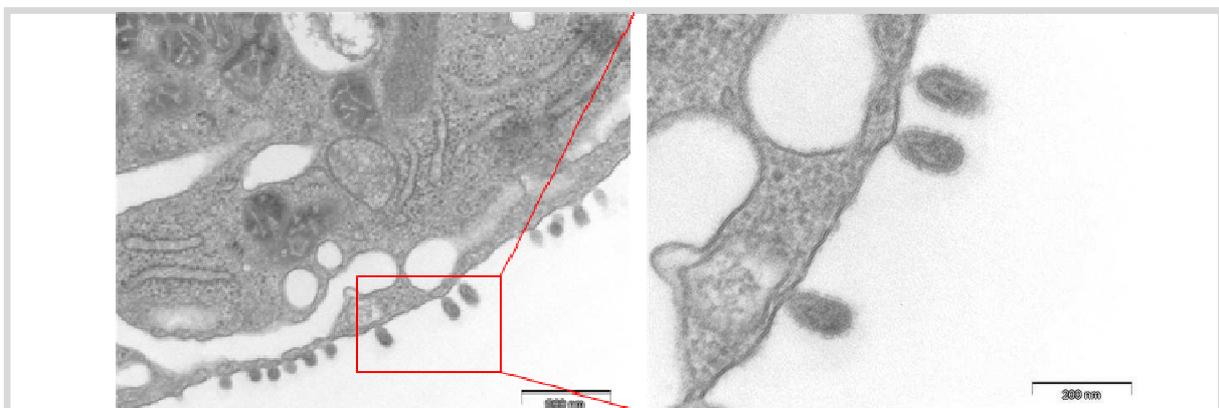


Figure 35 : Clichés de microscopie électronique de virus influenza bourgeonnant (virus A/California/7/2004 (H3N2)).

(a). *Différents stades de bourgeonnement.*
(b). *Agrandissement de la fin du.*

Source : Vincent Moulès, CNRS FRE 3011.

L'agrégation des virions par liaison de la protéine HA aux acides sialiques de la cellule est prévenue par l'activité sialidase de la protéine NA. L'équilibre entre les activités antagonistes des deux protéines de surface majeures des virus influenza de type A est nécessaire pour un relargage optimal des virions à ce stade. Un virus contenant une protéine NA possédant une affinité trop faible pour son substrat, l'acide sialique, et une protéine HA trop affine serait agrégé à la surface des cellules.

4. L'évolution des virus influenza de type A.

1) *La dérive antigénique.*

Il existe chez les virus influenza un taux de mutation de 5×10^{-5} changement par nucléotide et par cycle de réplication, c'est-à-dire environ un nucléotide muté par génome et par réplication (49) du aux erreurs du complexe polymérase viral. F. Carrat et A. Flahault ont déterminé la fréquence des substitutions au niveau des nucléotides ainsi que des acides aminés pour le gène *ha* et la protéine HA, en fonction du type, du sous-type ou du lignage (**Tableau 4**) (27). Dans les cas où des pressions de sélection, telles que des anticorps neutralisants ou des antiviraux, sont présentes durant les cycles de réplication, à l'échelle de l'hôte ou de la population, les mutants possédant un avantage sélectif (un échappement à la pression de sélection par exemple) pourront devenir des variants dominants. Cependant, une pression de sélection s'effectue également sur les protéines afin que celles-ci demeurent fonctionnelles.

Type	Substitutions nucléotidiques (par site par an)	Substitutions en aminoacides (par site par an)	Tableau 4 : <u>Fréquences des substitutions en nucléotides et AA des différents types de virus influenza circulant chez l'homme (gène <i>ha</i> et protéine HA).</u>
A/H3	0,0057	0,0097	<i>D'après F. Carrat et A. Flahault.</i>
A/H1	0,0038	0,0058	<i>Lignage 1 : B/Yamagata/16/88</i>
B lignage I	0,0014	0,0022	<i>Lignage 2 : B/Victoria/2/87.</i>
B lignage II	0,0024	0,0034	

Si des déterminants antigéniques localisés sur les protéines HA ou NA sont affectés par ces mécanismes, où la pression de sélection opérant correspond à la réponse immunitaire de l'hôte, ce processus prend le nom de dérive antigénique ou *antigenic drift* (56). La variation des protéines HA des virus influenza de type A est estimée à 4×10^{-3} substitution par nucléotide par site et par an, se traduisant par une mutation de 1 % de la séquence en acides aminés au niveau de la protéine en un an (197).

Ces mutations ponctuelles ne changent finalement que peu l'antigénicité des protéines virales, expliquant les épidémies hivernales. Du fait de la proximité antigénique, la population conserve une immunité partielle contre ces nouveaux variants, sans toutefois que le système immunitaire ne parvienne à enrayer totalement la propagation du virus.

2) La cassure antigénique.

La cassure antigénique, appelée *antigenic shift*, est le résultat d'un changement soudain et profond dans les déterminants antigéniques, c'est à dire des changements dans les sous-types au cours d'un cycle de réplication. Ce processus apparaît dans une cellule infectée par deux, ou plus, virus influenza de type A de différents sous-types. Les virions alors produits auront une combinaison de segments de gènes des différents virus parentaux. Ce fut le cas pour les virus des pandémies de 1957 (H2N2) et de 1968 (H3N2) qui étaient le fruit d'un réassortiment entre virus humain et aviaire (110), tous deux ayant conservé sur un fond humain des segments de gène aviaires codant pour les protéines HA et PB1, le segment aviaire de la NA ayant été retrouvé chez le virus de 1957 (**Figure 10**). Les récents travaux de l'équipe de G. J. D. Smith ont permis de montrer que les segments aviaires ont circulé dans les virus ayant un spectre d'hôtes humain plus de cinq années avant le début de la pandémie (207). Ceci a également été vérifié pour certains segments du virus pandémique de 1918, qui n'aurait pas franchi la barrière d'espèce de manière totale mais segment par segment.

Ces virus issus d'une cassure antigénique rencontrent des populations immunologiquement naïves face à leurs antigènes, pouvant provoquer une pandémie. Cependant, le caractère pandémique d'un virus est plus complexe et fait intervenir de nombreuses propriétés intrinsèques au virus lui-même (pathogénicité résultant par exemple de la présence de la protéine PB1-F2, stabilité génétique du virus, capacité répliquative importante ...).

III. Epidémiologie de la grippe.

1. Réservoir naturel du virus.

Bien que des épidémies touchant de manière exceptionnelle les oiseaux aient été observées depuis le Moyen Age avec des explications assez fantaisistes, la première véritable description d'une « peste aviaire » a été réalisée par E. Perroncito en 1878 dans le nord de l'Italie. Le germe *Typhus exudatious gallinarum* est né. Si en 1901, l'agent pathogène de la « peste aviaire » est identifié comme étant un virus filtrant, il faudra attendre 1955 pour faire le lien entre « peste » aviaire et grippe humaine.

Les oiseaux d'eaux sauvages, plus particulièrement des Ordres des Anseriformes et des Charadriiformes (**Figure 36**), ont été reconnus comme réservoir naturel de l'influenza aviaire. Ils ont été identifiés comme responsables potentiels de la dissémination rapide et massive du virus. L'infection des oiseaux aquatiques est le plus souvent asymptomatique (240). Le virus se répliquant dans le tractus intestinal est relargué dans les fèces permettant ainsi un cycle de réinfection par voie oro-fécale.



Figure 36 : Oiseaux considérés comme réservoir naturel des virus influenza de type A.

(a). *L'ordre des Anseriformes, comprenant trois familles, est composé notamment des canards (photo), des oies, ou encore des cygnes.*

Source : <http://www.wormsandgermsblog.com>

(b). *L'ordre des Charadriiformes comprend 18 familles d'oiseaux aquatiques, réparties en 3 sous-ordres. Les mouettes, avocettes (photo), et pingouins font partie de cet ordre.*

Source : <http://www.parc-ornithologique-du-teich.com>

Chez les volailles domestiques, les infections par les virus influenza sont caractérisées par une virulence extrêmement faible ou extrêmement élevée. La forme dite faiblement pathogène ne provoque que des symptômes bénins (plumage ébouriffé, ponte moins fréquente...) et peut facilement passer inaperçue. La forme hautement pathogène a des

conséquences bien plus graves. Elle se propage très rapidement dans les élevages et provoque une pathologie polyviscérale, dont le taux de létalité peut avoisiner 100 %. La mort de l'animal survient fréquemment dans les 48 heures.

2. Transmission inter-espèce de la maladie.

Les oiseaux aquatiques sont à l'origine des virus responsables de maladies chez l'Homme ou d'autres populations animales, mais leur rôle dans le maintien ou la propagation de l'agent infectieux est assez limité.

Les barrières inter-espèces sont franchies de manière sporadique, par des souches d'influenza qui s'établissent chez des espèces alternatives telles que le porc, les mammifères marins ou l'homme. Les souches faiblement pathogènes pour les oiseaux aquatiques, peuvent évoluer en forme hautement pathogène après un transfert inter-espèce (240). Au fur et à mesure que ces virus se sont établis chez un nouvel hôte, ils évoluent rapidement pour s'adapter à ce nouvel environnement. Comme énoncé dans la partie I.5.2, il semblerait que les virus influenza de type A ne franchissent pas les barrières d'espèces de manière globale mais segments par segments, au cours de multiples épisodes de réassortiments.

La restriction d'hôte d'un virus influenza de type A intervient à différents niveaux, notamment par rapport à la spécificité de reconnaissance de la protéine HA (217). Les virus influenza aviaires ont une spécificité de liaison à un acide sialique lié en $\alpha 2,3$, ce qui correspond aux récepteurs retrouvés au niveau des cellules épithéliales intestinales (intestin, colon, jejunum et cecum mais pas dans le duodenum). Les virus humains ont un tropisme pour les acides sialiques liés en $\alpha 2,6$, récepteurs majoritaires au niveau des cellules non ciliées de l'épithélium respiratoire, les acides sialiques liés en $\alpha 2,3$ étant plutôt représentatifs des cellules ciliées (140). Les virus équins présentent un tropisme respiratoire avec une spécificité aux acides sialiques liés en $\alpha 2,3$, les plus représentés dans le tractus respiratoire équin. Les virus porcins ont la capacité de reconnaître les acides sialiques liés en $\alpha 2,3$ aussi bien qu'en $\alpha 2,6$. De plus, le mucus humain présente des acides sialiques liés en $\alpha 2,3$, tandis que le mucus équin comporte des acides sialiques liés en $\alpha 2,6$.

3. Transmission inter-humaine des virus influenza.

Des particules virales sont excrétées dès qu'une personne malade ou en période d'incubation de la maladie expire, éternue ou tousse. Par conséquent, dès lors qu'une

personne saine respire l'air chargé de particules virales, elle peut être contaminée. La vie en communauté favorise la contagion (transports en communs, bureaux ...). Le virus de la grippe peut également se transmettre par simple contact avec des objets inanimés (surfaces inertes (13) combiné téléphonique, poignées de porte, billets de banque (220)...).

Les virus influenza peuvent demeurer infectieux malgré des conditions de températures, pH, salinité de l'eau ou encore les expositions aux rayons ultra-violet (UV) défavorables. Ainsi, la demi vie d'infectivité est de 2 à 3 semaines dans de l'eau à une température de + 4°C. Cependant, les virus influenza sont facilement inactivés par des désinfectants alcoolisés ou les aldéhydes.

4. La grippe et l'hiver.

La saison de la grippe s'étend généralement de novembre à mars dans l'hémisphère Nord et d'avril à octobre dans l'hémisphère Sud.

De nombreuses explications ont été avancées pour expliquer le caractère hivernal des épidémies de grippe : regroupements plus importants dans des espaces clos, système immunitaire affaibli par manque de vitamine D ou de mélatonine, direction des mouvements d'air dans la haute atmosphère, diminution des rayons UV, sensibilité des muqueuses avec les différences de température ... Cependant, la plupart de ces explications ne sont pas convaincantes.

En 2007, A. C. Lowen et ses collaborateurs ont montré que la température ainsi que l'humidité relative avaient un impact sur la transmission des virus influenza A. Une faible humidité relative permettrait une meilleure transmission des virus par évaporation des gouttelettes, facilitant leur diffusion, tandis qu'une faible température intervient au niveau des muqueuses, rendant le virus plus stable et sa propagation plus facile (127).

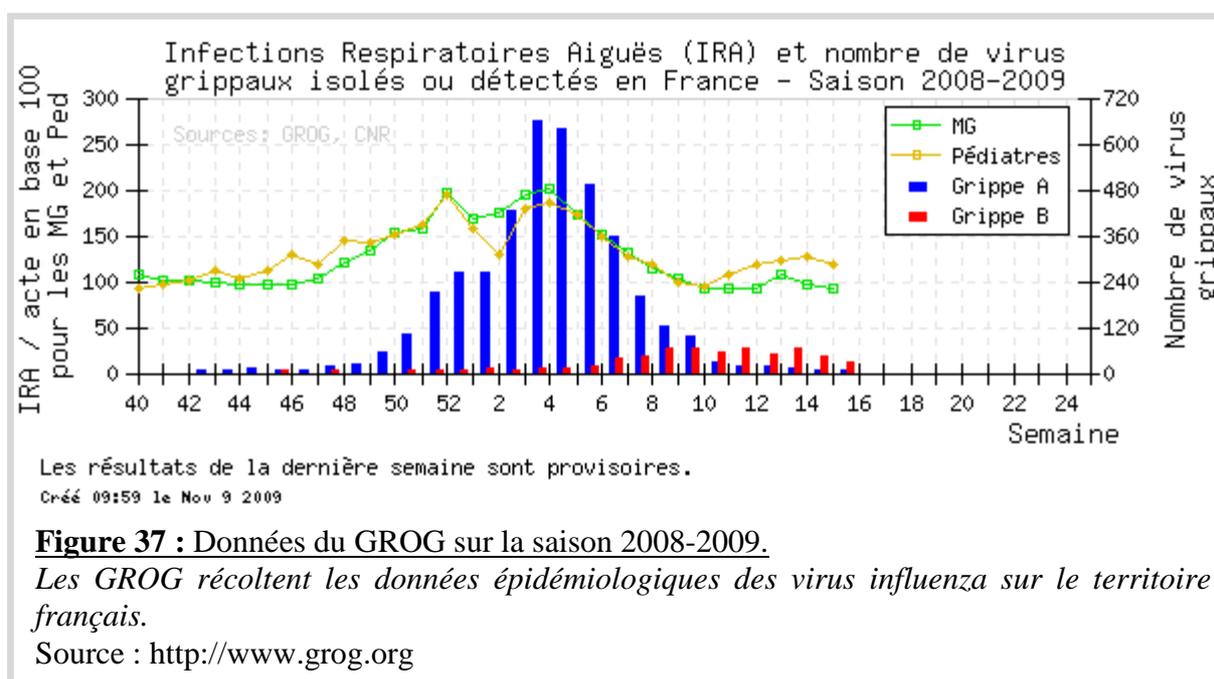
Une étude portant sur les lipides des membranes des virus influenza de type A a mis en évidence les différentes phases de ces lipides, contenant notamment du cholestérol. Il semblerait qu'à faible température, les membranes des virus influenza soient plus « rigides », rendant le virus plus résistant (182).

IV. Prévention et contrôle.

1. Les réseaux de surveillance.

La détection précoce de l'arrivée de l'épidémie peut limiter son incidence sur le système de soins. La connaissance des souches de virus influenza en circulation permet d'assurer l'adéquation de la composition des vaccins, réactualisée chaque année. Ainsi, en France, différents organismes consignent l'évolution des virus grippaux sur le territoire : les groupes régionaux d'observation de la grippe (GROG) (**Figure 37**), le réseau national téléinformatique des maladies transmissibles (RNTMT), plus connu sous le nom de réseau sentinelles (INSERM Unité 444) et l'institut de veille sanitaire (InVS).

Différents organismes coordonnent la surveillance des virus influenza A au niveau européen. L'*European influenza surveillance scheme* (EISS) regroupe 34 pays dont la France. Il contribue à la détermination des souches vaccinales ainsi qu'aux plans de préparation pour les pandémies. Le centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC pour *European centre for disease prevention and control*) est en charge du renforcement de la surveillance des maladies et des systèmes d'alerte précoces. L'ECDC intervient à différents niveaux de la lutte contre la grippe. Il favorise le développement de programmes nationaux de santé publique afin de diminuer l'impact des épidémies. Il améliore également le niveau de préparation à l'échelon national, européen et mondial et participe au développement de la recherche.



Depuis plus de 50 ans, le réseau mondial de surveillance de la grippe a joué un rôle central dans les efforts mondiaux de lutte contre la grippe sous toutes ses formes et s'est révélé un exemple de coopération internationale.

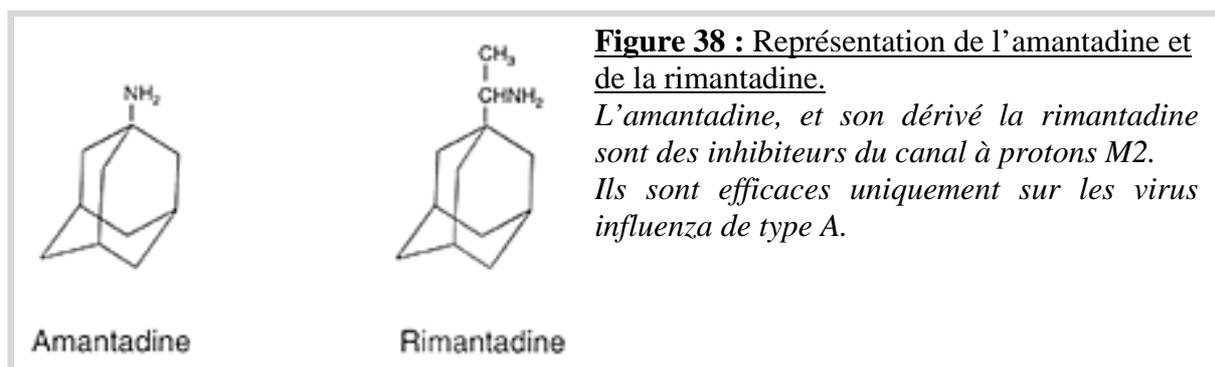
Dès sa création en 1947, l'OMS désire élaborer un système de surveillance virologique à l'échelle mondiale. Il dispose aujourd'hui de 4 grands centres mondiaux (Atlanta, Londres, Melbourne et Tokyo), collectant les données de 110 centres nationaux de référence répartis dans 83 pays (dont deux en France). Un autre centre collaborateur situé à Memphis, Tennessee se consacre principalement à l'étude de l'écologie de la grippe chez l'animal. Deux fois par an, l'OMS organise une consultation entre les centres collaborateurs et les principaux laboratoires de référence impliqués dans la sélection et la mise au point des vaccins antigrippaux afin de passer en revue les résultats des analyses récentes. Les centres aident à suivre l'évolution des virus et leur sensibilité aux antiviraux.

Ce réseau sert également de mécanisme d'alerte pour l'émergence de virus influenza à caractère pandémique.

2. Les antiviraux.

1) *L'amantadine et ses dérivés.*

L'amantadine, tout comme son dérivé la rimantadine, est un inhibiteur du canal à protons M2 (**Figure 38**). Au-delà de son utilisation contre les virus influenza, l'amantadine est utilisée pour le traitement de la maladie de Parkinson en jouant sur le taux de dopamine présent dans le cerveau, bien que ses mécanismes d'action ne soient pas clairement définis (15). De plus, elle peut être combinée à une thérapie utilisant les interférons pour soigner les patients atteints d'une hépatite C chronique, pour lesquels le traitement contre cette maladie n'avait pas fonctionné (125).



L'amantadine est efficace contre tous les sous-types de virus influenza A circulants chez l'homme (H1N1, H2N2 et H3N2), mais pas contre les virus aviaires de sous-type H5N1 ayant infecté des hommes, ni sur les virus influenza B. L'amantadine et la rimantadine ont des effets similaires concernant la prévention et le traitement des virus influenza A. L'amantadine se lie à la région transmembranaire de la protéine M2, bloquant le canal à protons et empêchant ainsi le relargage des RNPv dans le cytoplasme (232).

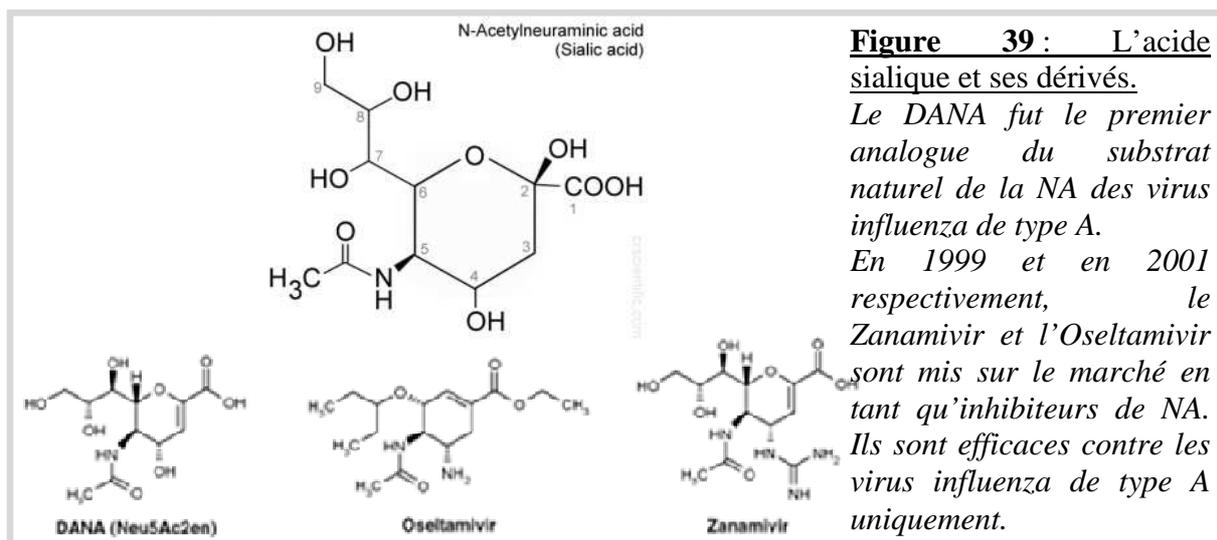
L'utilisation de l'amantadine a été associée à une grande émergence de mutants résistants. En effet, il a été montré entre 1994 et 2005 une augmentation mondiale comprise entre 0.4 et 12.3 % de la proportion de virus influenza A résistants à l'amantadine (20). Plus récemment, aux Etats-Unis d'Amérique, 91 % des virus influenza A(H3N2) isolés de patients contenaient une mutation conférant une résistance à l'amantadine et à la rimantadine. A ce jour, tous les virus A(H3N2) isolés portent des mutations conférant une résistance à l'amantadine (données GROG).

La prise d'amantadine provoque de nombreux effets secondaires (106). Les syndromes gastro-intestinaux sont les plus fréquents. Des effets réversibles sur le système nerveux peuvent être observés. Des études comparatives ont montré que ces réactions indésirables sont plus courantes avec l'amantadine qu'avec la rimantadine (106).

2) *Les inhibiteurs de neuraminidase.*

Les inhibiteurs de la protéine NA (INA) correspondent à des analogues structuraux de l'acide sialique et font office de compétiteurs, en prenant la place de cet acide sialique dans la poche catalytique de l'enzyme (227). Ces INA sont décrits depuis le début des années 1970 mais il faudra attendre 1993 et le développement du zanamir par M. Von Itzstein pour admettre que la protéine NA est une cible thérapeutique de choix. Ces antiviraux, contrairement aux inhibiteurs du canal à protons comme l'amantadine, sont actifs contre les virus influenza de type A et B. Les INA sont généralement bien tolérés par rapport aux inhibiteurs du canal à protons M2 (48, 67).

Un analogue de l'acide sialique nommé DANA permettait une inhibition non spécifique de la protéine NA (**Figure 39**). Cependant, aucune inhibition n'était constatée chez les modèles expérimentaux (souris ou furet). L'étude de la protéine NA ainsi que de son interaction avec son substrat, l'acide sialique, ont permis de synthétiser des molécules possédant une plus forte affinité pour la protéine NA (34) par localisation du site catalytique de l'enzyme.



Ainsi le zanamivir (Tamiflu®) et l'oseltamivir (Relenza®), introduits respectivement sur le marché en 1999 et 2001, ont vu le jour (**Figure 39**). La présence d'inhibiteurs de neuraminidase entraîne l'agrégation des virus à la surface des cellules (149), et réduit la propagation des virions dans le mucus ainsi que l'infectivité virale.

Avant l'hiver 2007-2008, les cas de résistance se révélaient de manière très sporadique. *In vitro*, certaines mutations telles que E119V, R292K, H274Y, et R152K ont été associées à une résistance à l'oseltamivir (148). D'autres, telles que la mutation R292K, induisent des enzymes non fonctionnelles, les virus les possédant ont un *fitness* inférieur (105). Il est donc probable que ces virus n'aient pas un impact important en santé publique (25, 105).

Au cours de cet hiver 2007-2008, sont apparues de nombreuses souches A(H1N1) résistantes, principalement liées à la présence de la mutation H274Y, conférant une résistance à l'oseltamivir (**Figure 40**). La répartition géographique de ces virus résistants était inégale, l'Europe possédant le plus fort taux, 25 %, avec des disparités selon les pays. Un gradient Nord-Ouest à Sud-Est était visible. L'émergence de ces virus résistants semble indépendante de l'utilisation d'antiviraux. La large diffusion de ces virus au cours de l'hiver suivant, semble due à une optimisation de la balance des protéines HA/NA au sein des virus A(H1N1).

Les mutations de résistance au zanamivir sont plus délétères pour la réplication virale du fait d'une grande similarité de structure entre l'acide sialique et l'inhibiteur (**Figure 39**). Il n'a pas été observé d'augmentation de la proportion de virus résistant au zanamivir à ce jour.

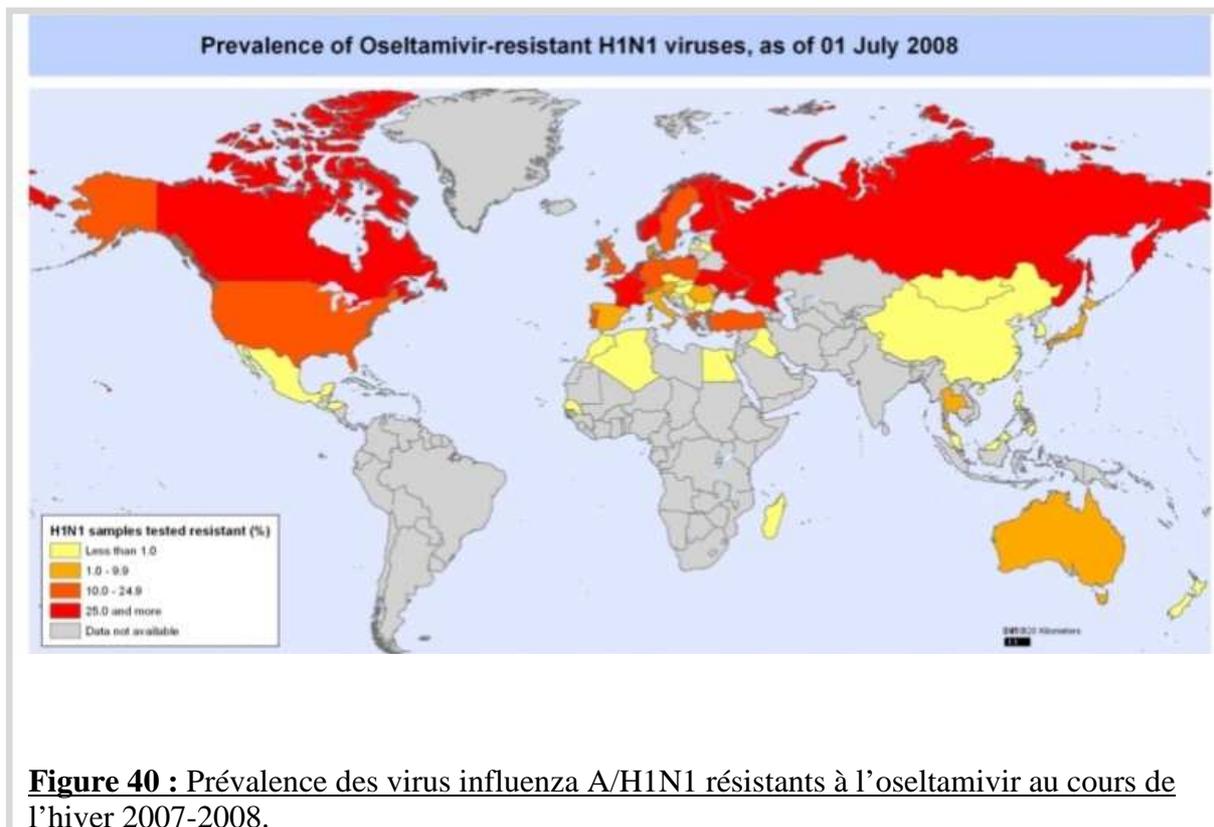


Figure 40 : Prévalence des virus influenza A/H1N1 résistants à l’oseltamivir au cours de l’hiver 2007-2008.

L’apparition de virus résistants à l’oseltamivir a commencé à se généraliser au cours de l’hiver 2007-2008, avec des virus apparentés à la souche A/Brisbane/59/2007 (H1N1).

Données OMS.

3. Le vaccin antigrippal.

1) *Généralités sur les vaccins.*

Avant la période gréco-romaine, les maladies étaient considérées comme des manifestations divines ou des ancêtres, à la suite d’un manquement à des règles de vie. Ces croyances ont vite été reprises par des *shamans* ou autres meneurs dans le but d’instiller la terreur, afin de contrôler les mentalités humaines. Aucune prophylaxie ne pouvait donc être utilisée. Bien que de nombreuses études aient été effectuées concernant la transmission des maladies, la résistance à des infections répétées ou encore l’hygiène, tout ce savoir a été perdu lors de la chute de l’empire gréco-romain aux alentours de 400 après J.C..

Les chinois se prémunissaient de la variole en s’inoculant des sécrétions issues de patients. Cette pratique fut introduite en Europe dès le début du XVIIIème siècle. E. Jenner, médecin anglais, remarque que les valets de ferme qui trayaient les vaches atteintes de *cow pox* étaient épargnés lors des épidémies de variole. Ils présentaient seulement des pustules au niveau des mains. E. Jenner a démontré en 1796 que l’inoculation du virus bovin de la vaccine prévenait l’infection par une souche virulente. E. Jenner a découvert un remède préventif contre la variole. Ce remède reçut le nom de vaccin. Le mot vaccin (du latin *vacca*,

la vache) fut d'abord l'appellation de la maladie du *cow pox* de la vache. Les personnes portant des pustules de *cow pox* étaient dits atteints de vaccine, ou encore vaccinées. Le mot est resté pour désigner toute substance que l'on inocule chez un individu pour le préserver d'une maladie.

A la suite d'E. Jenner, un autre homme a permis la mise au point des vaccins ainsi qu'une meilleure compréhension des agents pathogènes et des maladies. L. Pasteur, agrégé de sciences physiques et docteur ès sciences, est célèbre notamment pour l'élaboration du vaccin contre la rage (-1885). Cependant, il avait déjà effectué des travaux sur d'autres maladies telles que la maladie du vin, le choléra des poules ou le charbon du mouton. C'est en 1881 que L. Pasteur immunise des moutons contre cette maladie, après injection d'une culture atténuée de bacille du charbon. Cette expérience qui lui valut l'incrédulité du monde scientifique fut renouvelée la même année à Pouilly-le-Fort, sur cinquante moutons (50). Sa réussite intégrale offrit un succès retentissant à L. Pasteur. Au début des années 1880, il entreprend l'étude de la rage. Il montre que l'agent pathogène est trop petit pour être visible au microscope et que c'est un microbe filtrant. Cet agent pathogène sera nommé virus rabique. L. Pasteur met au point la vaccination des chiens par un traitement à base d'injection de moelle durant 13 jours. Le 6 juillet 1885, J. Meister est amené par sa mère après avoir été mordu par un chien enragé. L. Pasteur tente le remède qu'il a mis au point sur les chiens afin de sauver l'enfant de neuf ans. Le jeune J. Meister fut sauvé à la suite de 12 inoculations (50). Il faudra ainsi attendre la fin du XIX^{ème} siècle pour voir la vaccinologie prendre tout son sens, notamment avec des savants tels que L. Pasteur (comme nous l'avons vu), R. Koch (postulats de Koch) ou E. Von Behring (travaux sur les toxines diphtérique et tétanique).

Ainsi, en 1919, de nombreux phénomènes avaient été décrits et de nombreux vaccins, tant contre des bactéries que contre des virus, avaient vu le jour. De nos jours, de nombreux agents pathogènes ont pu être éradiqués (variole ...) et de nombreuses maladies contrôlées (grippe ...), bien que pour certaines aucun vaccin ne soit encore établi (SIDA, malaria ...)

2) *Historique du vaccin antigrippal.*

Le développement du vaccin contre la grippe a débuté dès les années 1930, le premier virus influenza de type A humain ayant été isolé en 1933. En 1932, R. Shope écrit qu'une administration de virus vivants prévenait les risques de pneumonie chez le furet. Les premiers tests d'immunisation sur l'animal ont été effectués aux Etats-Unis d'Amérique par F. Magill (66) et en Angleterre par C. H. Andrewes et W. Smith (7). En 1935, W. Smith, C. H. Andrewes et P. Laidlaw ont montré que les furets produisaient des anticorps neutralisants

après une injection de suspension virale. En 1936, des résultats encourageants sont obtenus par F. Magill et T. Francis Jr suite à l'immunisation de sujets humains par une suspension virale issue de tissu embryonnaire. Au cours de cette même année, ils définissent des variants antigéniques chez les souches humaines. Les souches A/Puerto Rico/8/24 (PR8) et un virus de Philadelphie, antigéniquement semblables avec des sérums équin ou de furet, peuvent être différenciées grâce à l'utilisation de sérum souche-spécifique de lapin. Ces résultats seront vite confirmés par F. M. Burnet (1937) et C. H. Andrewes (1937). De nombreuses études d'immunisation sont alors menées sur des sujets humains. Nous pouvons citer par exemple l'équipe de J. Stokes Jr en 1937 et ses vaccins vivants, C. H. Andrewes et W. Smith en 1937 avec du virus inactivé au formaldéhyde ou encore l'équipe de C. H. Stuart-Harris en 1938.

Deux techniques ont permis un développement plus rapide des vaccins antigrippaux. En 1935, la culture de virus sur œuf de poule embryonnés est rendue possible par E. W. Godpasture (172). Elle sera vite adaptée aux virus influenza. W. Smith et F. M. Burnet, en 1935, décrivent de manière indépendante une culture des virus influenza sur la membrane chorio-allantoïque (43). L'inoculation dans les cavités allantoïque ou amniotique sera effectuée plus tard, entre 1940 et 1941 par F. M. Burnet ou encore W. Henle et L. A. Chambers. La découverte de l'inhibition de l'hémagglutination en 1941 par G. K. Hirst ainsi que L. McClelland et R. Hare a également beaucoup accéléré la recherche sur les virus influenza car il est maintenant possible de mesurer la concentration d'anticorps de manière rapide, reproductible et peu onéreuse. En 1942, il apparaît que les vaccins inactivés concentrés sont efficaces contre une infection naturelle. Au début des années 1940, les vaccins contre les virus influenza sont monovalents, dirigés contre les virus de sous-type H1N1 (37, 172).

A partir des années 60, un vaccin bivalent voit le jour, offrant une immunité contre les virus A(H2N2) et B. Enfin, le vaccin antigrippal tel qu'il nous est connu aujourd'hui, trivalent, est introduit à la fin des années 70, suite à la réintroduction des virus de sous-type H1N1 (142).

3) Mode de fabrication du vaccin antigrippal.

Le vaccin antigrippal tel qu'il est connu actuellement correspond donc en réalité à un mélange de trois souches, permettant ainsi une protection contre les trois virus influenza circulant majoritairement dans la population : A(H1N1), A(H3N2) et B.

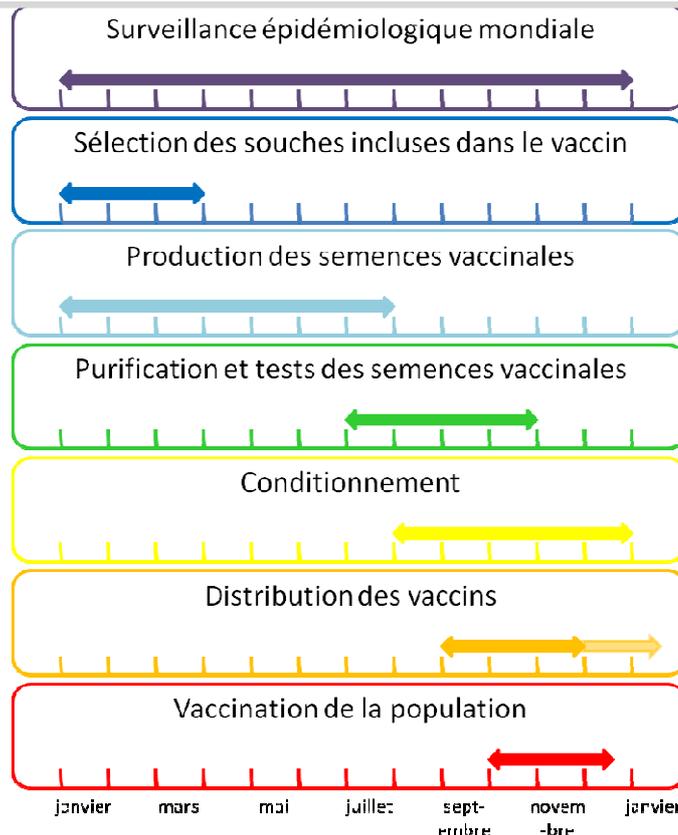


Figure 41 : La fabrication des vaccins antigrippaux dans le temps.

Six à sept mois sont nécessaires pour la production des vaccins antigrippaux. Cependant, la nécessité d'une surveillance épidémiologique constante effectuée par les organismes habilités s'étale sur une année entière.

Ces données correspondent à celles de la production des lots vaccinaux pour l'hémisphère nord.

La dérive antigénique (abordée dans la section II.4.1) impose une surveillance complexe et coordonnée des virus influenza circulants de type A, et de type B (section IV). Deux fois par an, les données de ces surveillances sont analysées par les centres collaborateurs de l'OMS. Les virus circulant dans l'hémisphère nord sont analysés en février, afin de déterminer quels variants sont susceptibles de provoquer une épidémie au cours du prochain hiver. Parallèlement, les souches pour l'hémisphère sud sont choisies en septembre. Ce sont ainsi environ trois mille virus A(H3N2) qui sont analysés antigéniquement par les centres collaborateurs de l'OMS, dont le dixième est analysé de manière génétique par séquençage de HA1. A partir du moment de la détermination des souches de référence qui seront incluses dans le vaccin antigrippal, les industriels ont environ six mois pour produire et délivrer les doses de vaccin (**Figure 41**). Au cours des vingt-neuf dernières saisons grippales, dix neuf changements dans les souches de référence A(H3N2) ont été enregistrés, contre dix pour les souches A(H1N1) et quinze pour les souches B.

Depuis le début des années 70, les semences vaccinales utilisées pour la production du vaccin antigrippal sont issues d'un réassortiment entre les souches de référence choisies par l'OMS et PR8. Cette souche est avirulente et permet d'obtenir de bons rendements sur œufs de poule. Les semences vaccinales de type B correspondent quant à elles aux souches circulantes, aucun équivalent de PR8 n'ayant été trouvé pour les virus influenza de type B.

Chaque souche vaccinale est produite de manière indépendante vis-à-vis des deux autres. Une des souches de référence de type A et la souche PR8 sont injectées dans un œuf de poule embryonné (il faut compter environ 20 à 30 œufs pour cette première étape). La présence d'anticorps anti-H1 de PR8 prévient la production de virus ne possédant pas les antigènes souhaités. Les virus réassortants sont ensuite sélectionnés selon leur vitesse de réplication, c'est à dire leur pouvoir répliatif.

Une fois les souches candidates produites, les antigènes de surface sont testés afin de confirmer qu'elles présentent ceux de la souche de référence pour une réelle utilisation à large échelle. De plus, leurs propriétés antigéniques doivent demeurer stables au cours des divers passages sur œufs nécessaires à la production des vaccins.

Une fois les différentes composantes du vaccin vérifiées, la production réelle peut commencer. Les semences sont envoyées aux entreprises pharmaceutiques produisant le vaccin antigrippal. Les virus sont alors propagés sur œufs de poule embryonnés (une dose par œuf). Après une incubation de trois jours, les œufs sont mirés puis placés une nuit entre 2 et 8°C afin de tuer les embryons. Cette étape favorise également la clarification du liquide allantoïque. Le liquide allantoïque est récolté et clarifié. Suivent des étapes d'inactivation au formaldéhyde (ou B-propiolactone). Afin d'obtenir un produit purifié, de nombreuses étapes de filtrations et centrifugations sont nécessaires. Les virus sont ensuite concentrés. Ces étapes sont à ce jour toutes automatisées. Les traitements (traitement au détergent, au sodium dodecyl sulfate, addition d'adjuvant ...) dépendent du type de vaccin (**Figure 42**). Un conservateur, le thiomersal, est ajouté à la plupart des doses de vaccin inactivé.

Chaque dose de vaccin doit contenir 15 µg de HA de chaque virus. Une fois les antigènes dilués, les trois semences vaccinales sont rassemblées pour former le vaccin final. Des tests de qualité sont effectués afin de tester le vaccin avant commercialisation : inactivité du virus pour les vaccins inactivés, stérilité microbienne, dosages des substances chimiques et des antigènes de surface.

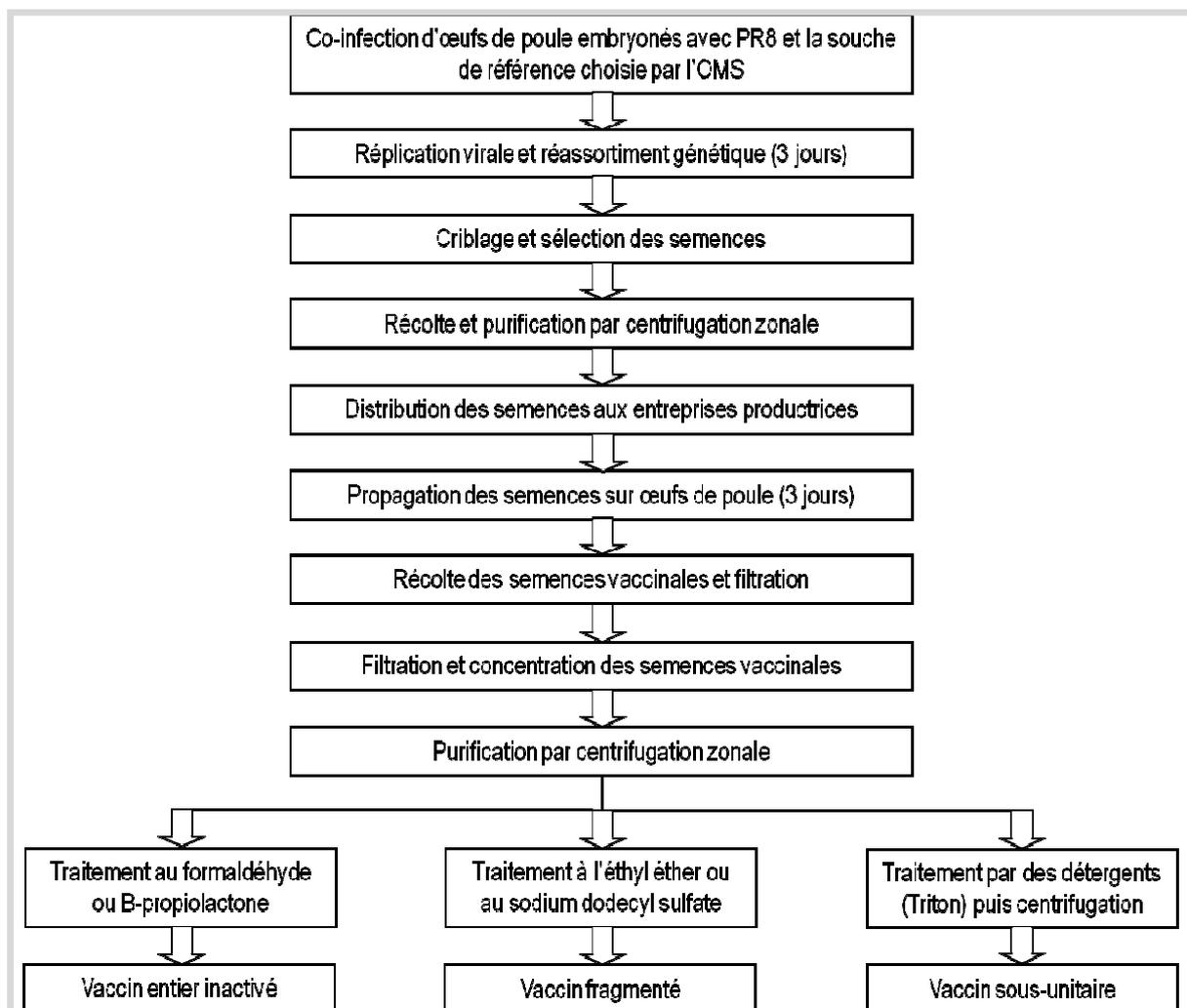


Figure 42 : Mode de fabrication des vaccins antigrippaux.

Les vaccins antigrippaux contiennent trois souches de virus influenza : deux souches de type A (H1N1 et H3N2), produites par coinfection avec un virus atténué PR8) et une souche de type B.

4) Les différents types de vaccins.

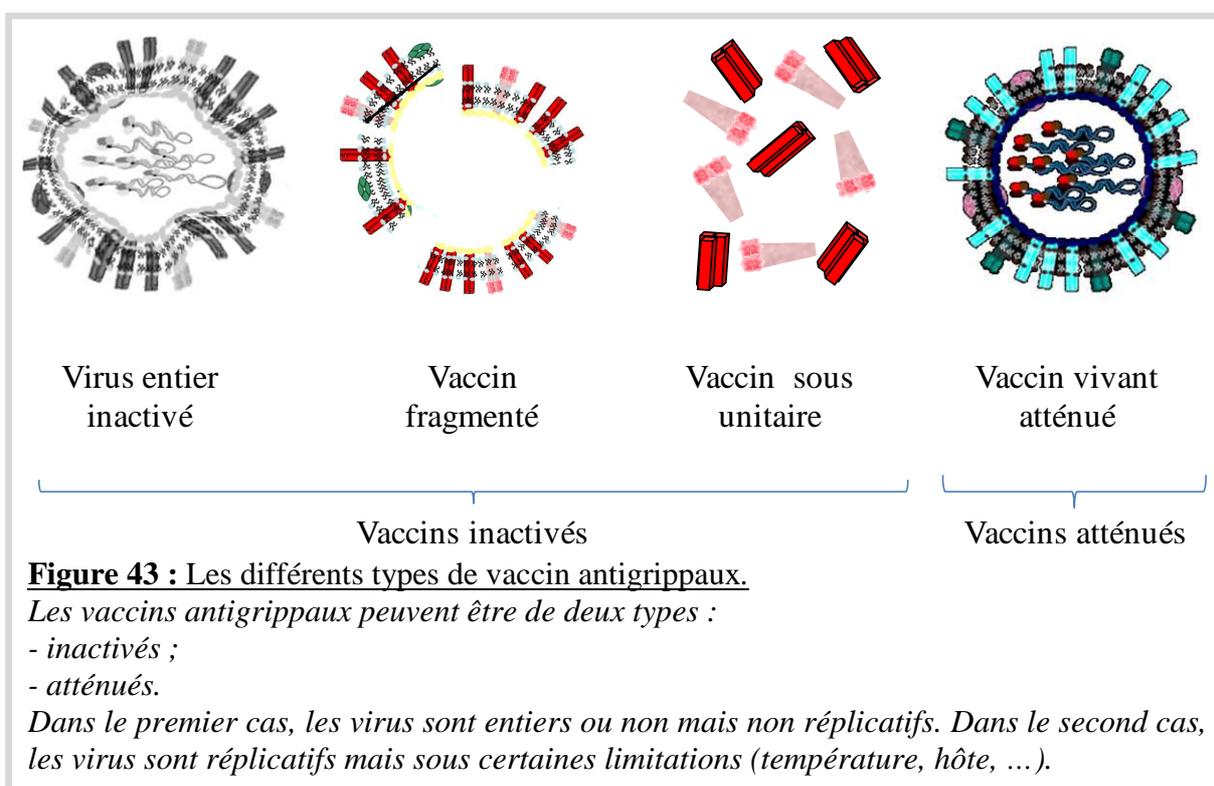
a. Les vaccins inactivés.

Les vaccins inactivés (**Figure 43**) représentent plus de 90 % des vaccins vendus dans le monde. Ils comprennent les vaccins constitués de virus entiers, les vaccins fragmentés (*split vaccine*), les vaccins sous-unitaires (*sub-unit vaccine*) ou à base de virosomes. Les fragments contenus dans ces vaccins sont ainsi majoritairement les protéines antigéniques des virus influenza, la HA et la NA. Ils peuvent ou non contenir un adjuvant (MF39 ou AS03 par exemple) permettant l'augmentation de leur efficacité. En effet, un vaccin inactivé avec un

adjuvant à base d'aluminium contenant entre 1,9 et 7,5 µg de HA est aussi efficace qu'un vaccin inactivé avec 15 µg de HA sans adjuvant (10).

Les vaccins inactivés contenant les virus entiers sont considérés comme plus immunogènes dans les populations naïves (160). Ils semblent également associés à de plus hautes fréquences d'effets indésirables par rapport aux autres types de vaccins, particulièrement chez les enfants (212). Ce type de vaccin représente environ un tiers de toute la production de vaccins antigrippaux (données OMS). Les vaccins fragmentés sont les plus représentés, ils ont moins réactiogènes.

Les vaccins inactivés sont habituellement administrés par voie intramusculaire, et sont généralement bien tolérés. Ils sont indiqués pour toute personne de plus de six mois, sans contre indication spéciale.



b. Les vaccins atténués.

Les vaccins atténués (**Figure 43**) sont composés de virus vivants, possédant un défaut de répliation. Ces virus peuvent être sensibles à la température (*ts* pour *temperature sensitive*), adaptés au froid (*ca* pour *cold adapted*) ou restreint par rapport à l'hôte (*hr* pour *host range*). Pour les vaccins *ca*, l'atténuation de la souche receveuse est effectuée par passages successifs à basse température allant de 33 à 25 °C. Cette souche receveuse sera ensuite coïnfectée avec la souche circulante selon le procédé classique de production des

semences vaccinales. Les semences *ts* comportent des mutations limitant la croissance à 37-39°C. La croissance virale est possible dans le tractus respiratoire supérieur, stimulant ainsi la réponse immunitaire locale. Il est dépourvu de conservateur cependant, son autorisation de mise sur le marché est limitée aux personnes en bonne santé dont l'âge est compris entre 5 et 49 ans. La transmission du virus vaccinal à des personnes exposées non immunisées semble très rare.

Ils sont administrés par voie intranasale.

Deux vaccins vivants atténués dérivés de la souche A/Leningrad/134/57 (H2N2) et B/USSR/60/69 ont reçu des autorisations de mise sur le marché en Russie (192). Aux Etats-Unis d'Amérique, un vaccin présentant les phénotypes *ca*, *ts* et atténué basé sur les souches A/Ann Arbor/6/60 et B/Ann Arbor/1/66 a été licencié en 2003. A la différence des vaccins inactivés, ils induisent une immunité mucoale en plus des immunités cellulaire et systémique.

5) *L'efficacité du vaccin antigrippal.*

L'efficacité d'un vaccin est définie comme le pourcentage de réduction des malades entre deux populations, une vaccinée, l'autre non. Elle peut être calculée selon la formule de Greenwood et Yule (1915).

L'efficacité du vaccin antigrippal est différente selon les individus auxquels il est administré, mais également selon la correspondance entre les antigènes présents dans le vaccin et ceux des souches circulantes au cours de la saison. Le vaccin antigrippal, dans le cas d'une bonne corrélation antigénique, prévient entre 80 et 90 % des maladies grippales (85). Une étude a montré que dans le cas de personnes âgées (plus de 60 ans), les symptômes grippaux ne sont réduits que de 33 %. Le vaccin antigrippal permet chez les personnes âgées de prévenir les hospitalisations ou les décès (158).

La similarité antigénique des souches contenues dans le vaccin avec les souches circulantes au cours de la saison est également un facteur d'efficacité. En effet, une différence de 4 unités lors du test d'inhibition d'hémagglutination, ou une distance antigénique de 2 unités entre ces deux souches est considérée comme suffisante pour justifier une réactualisation du vaccin du fait d'une mauvaise adéquation ne permettant pas une protection optimale de la population (194).

6) *Les perspectives.*

Malgré l'efficacité du vaccin antigrippal tel qu'il est connu depuis plus de 30 ans, de nouvelles approches sont envisagées afin de contrer les difficultés liées à ce type de production. La production de vaccins antigrippaux basée sur des œufs de poule embryonnés est coûteuse en temps et en équipements. La virulence des virus aviaires tels H5N1 pour les embryons justifiait l'utilisation d'autres supports pour la production de vaccins pandémiques. De plus, si la production sur œufs de poule embryonnés possède des avantages tels que la connaissance et le retour sur la technique, elle présente également de nombreux inconvénients : coûts élevés de production, nécessité d'obtenir des œufs, déchets importants, criblages des réassortants...

a. Vaccins ADN

L'efficacité des vaccins ADN exprimant HA, NP, M2, ou NP/M1 a pu être démontrée sur divers modèles animaux. En effet, la possibilité d'obtenir une protection après injection intramusculaire de cassette d'expression d'ADN a été démontrée pour la première fois par J. A. Wolf en 1990. Les vaccins ADN exprimant les protéines HA et NA ne sont pas délivrés par injections. Dans le cas des virus influenza, il semblerait que ces vaccins permettent une bonne protection au cours de challenges effectués avec des virus homologues ou hétérologues. Ils provoquent une immunité cellulaire aussi bien qu'humorale. De plus, les délais de production d'ADN sont courts.

b. Vaccins universels

Afin d'éviter une réactualisation annuelle du vaccin antigrippal, l'utilisation de protéines plus conservées a été envisagée, notamment la protéine NP (196) ou le domaine extracellulaire de la protéine M2 (58, 258) qui ont déjà démontré une bonne protection. Il a été montré que la vaccination par M2 permettait une bonne protection (224).

c. Production sur cellules

La technique de génétique inverse permet la production de virus réassortants possédant une constellation génétique déterminée par les plasmides utilisés pour la transfection des cellules. Cet outil permet en une semaine de produire de grandes quantités de

virus possédant un contenu génétique défini. Cette technique alternative permet également la culture des virus aviaires et d'éviter de nombreux aspects négatifs de la culture sur œufs.

Les cellules Véro (161), MDCK (126), Per.C6 (117) sont évaluées pour leur utilisation dans ce domaine.

Actuellement, des vaccins dits « cellulaires » sont déjà mis sur le marché (Optaflu® produit sur cellules MDCK, ou le vaccin anti-A/California/7/2009 (H1N1) Celvapan® produit sur Vero).

Des cellules d'insectes semblent également de bons candidats pour la production de protéines immunogènes grâce à des baculovirus recombinants.

V. L'emballage des RNPv.

1) La nécessité de huit segments.

En 2006, l'organisation interne des virus influenza de type A est révélée par T. Noda et ses collaborateurs. Les RNPv sont agencés au sein de la particule virale en une structure particulière : un segment central qu'encadrent les sept autres (163). Tous les virus influenza de type A présentent cette même organisation interne. La position des différents RNPv dans cet arrangement n'est pas déterminée.

En 2003, Y. Fujii et ses collaborateurs montrent que le virus A/WSN/33 se réplique mieux quand il possède huit segments, bien qu'aucune protéine ne soit synthétisée à partir de leurs constructions basées sur le segment NA (69). Plus récemment, de Wit et ses collaborateurs ont montré que le virus PR8 présente une meilleure répllication lorsqu'il contient huit segments de gènes. Le segment PA de ce virus a été remplacé par un représentant sous-génomique de 1100 ou de 400 nucléotides environ (46). Afin de pouvoir former un complexe polymérase fonctionnel, la protéine PA est apportée par *trans*-complémentation dans les cellules MDCK infectées.

Il semblerait donc qu'un ensemble de huit segments soit nécessaire pour une répllication virale optimale, même si tous les constituants ne sont pas présents dans le génome proprement dit mais apportés par *trans*-complémentation.

2) Un emballage sélectif des segments, ...

L'emballage des RNPv au site d'assemblage fait intervenir des mécanismes spécifiques à chaque segment. La théorie du modèle sélectif pour l'emballage des RNPv dans la particule virale au moment du bourgeonnement des nouveaux virions se base sur trois observations : (i) dans la particule virale chaque RNPv est retrouvé dans des quantités quasi-équimolaires (146), (ii) les taux relatifs des RNPv ne sont pas les mêmes dans la cellule infectée (16, 209) et (iii) que les particules interférantes contiennent des représentants sous-génomiques de RNPv sauvages.

G. L. Smith et A. L. Hay montrent en 1985 que dans la cellule infectée, les taux des différentes espèces de RNPv ne sont pas identiques (16) bien que chaque représentant soit incorporé au sein de la particule virale.

Les représentants sous-génomiques ou ARN interférants défectifs ont conservés entre 150 et 300 nucléotides des extrémités de l'ARNv. Concernant le segment NA, des séquençages de segments NA de sous-type N2 délétés de manière naturelle ont permis de mettre en évidence que ces représentants sous-génomiques conservaient au minimum les 40 nucléotides situés à leurs extrémités. L'étude de mutants produisant des particules interférantes tels le mutant Wa-182 a permis de délimiter des régions conservées dans les segments sous-génomiques. Ces régions ont donc été considérées comme nécessaires pour l'incorporation de l'ARN. T. Odagiri et ses collaborateurs ont démontré que les ARN interférants défectifs PA étaient en compétition avec les ARNv dont ils sont issus pour leur incorporation dans les virions (167). L'incorporation des autres segments testés (les segments PB2 et NS) n'est pas affectée. Les deux extrémités non codantes des différentes espèces d'ARNv jouent un rôle dans cette compétition.

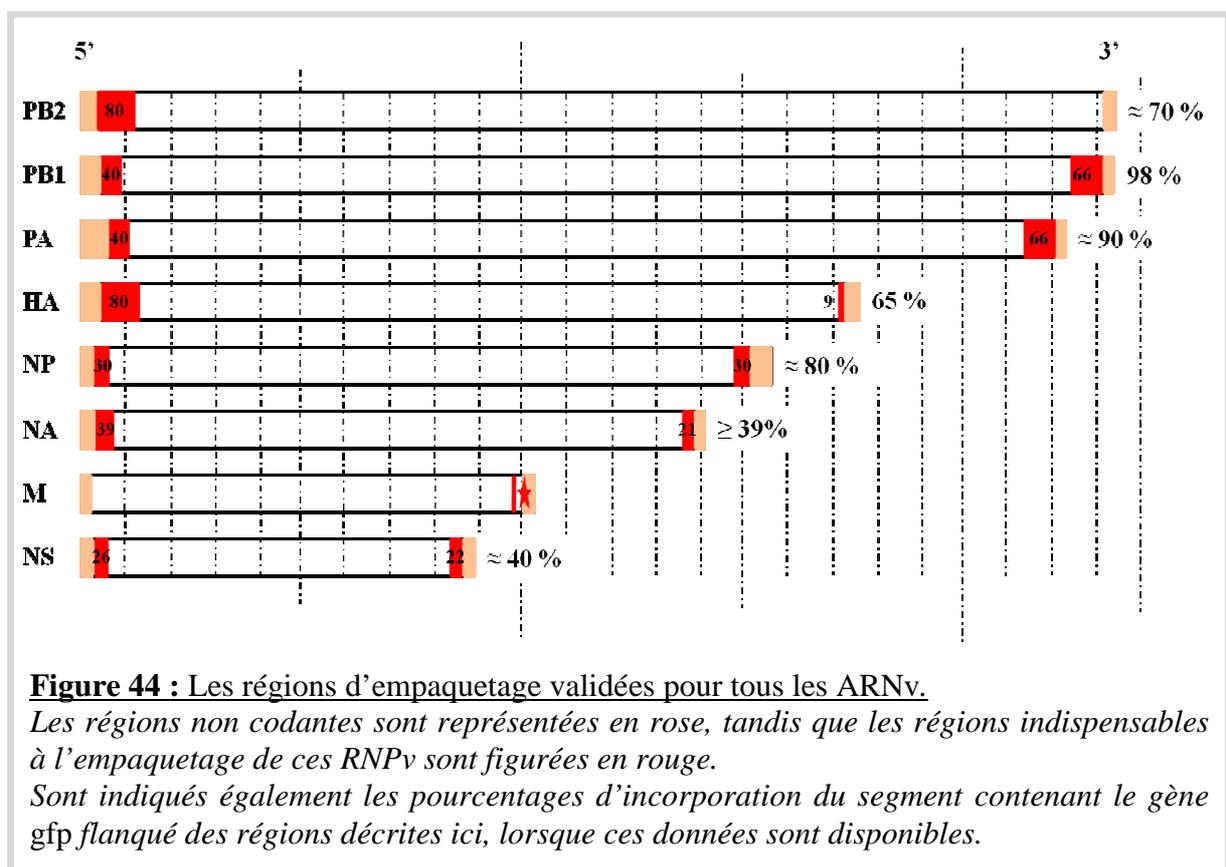
3) ... des séquences spécifiques pour l'emballage des segments, ...

L'hypothèse de l'incorporation sélective des RNPv au moment de l'assemblage fait intervenir des séquences segment-spécifiques nécessaires à l'incorporation du génome dans les particules virales. De telles séquences ont été déterminées pour de nombreux virus à ARN (coronavirus (35), Sindbis virus (242), rétrovirus (42) ...).

Les études menées afin de déterminer les séquences nécessaires à cette incorporation sont effectuées principalement par deux grandes équipes : celle de Y. Kawaoka et celle de P. Palese. Chacune de ces équipes travaille sur un virus particulier, tous deux des virus adaptés au travail de laboratoire, respectivement A/WSN/33 (H1N1) et PR8. Le virus PR8 a

précédemment été décrit. Le virus A/WSN/33 correspond à un variant neurotrope adapté chez la souris de la souche A/Wilson-Smith/33 (H1N1) (153, 235), elle est donc éloignée génétiquement des virus humains circulants ou encore des virus aviaires. L'étude des mécanismes généraux des virus influenza de type A sur un unique virus ne rend pas compte de la différence réelle de ces virus (sous-types, spectre d'hôtes...) et complique la mise en place de tels travaux sur des virus « circulants ». Il est important d'être critique envers les résultats obtenus pour ces virus lors d'études sur d'autres souches. Ainsi, Q. Gao et P. Palese ont utilisé des régions d'empaquetage pour les segments HA et NS plus longues que celles décrites pour A/WSN/33 (H1N1) au cours d'une de leur étude sur le virus PR8 (73).

Les régions des ARNv nécessaires à leur incorporation ont été identifiées par construction de segments recombinants. Seules sont conservées les extrémités de l'ARNv, de plus en plus courtes, encadrant le gène *gfp* (*green fluorescent protein*). Le pourcentage d'incorporation de chaque construction a ensuite été calculé. Concrètement, le nombre de virus exprimant une fluorescence dans les cellules est rapportée au nombre de virus total. Lorsque le pourcentage d'incorporation du segment GFP chute brutalement, la région déléetée est considérée comme indispensable à l'empaquetage. C'est ainsi que les 21 premiers nucléotides de l'extrémité 3' de l'ARNv NA ont été montrés comme nécessaires dans l'incorporation de ce RNPv (69) (**Figure 44**).



A l'heure actuelle, de telles séquences ont été décrites pour tous les segments (**Figure 44**). D'après ces études, il semblerait que pour tous les segments les deux extrémités jouent un rôle dans l'incorporation du RNPv, à l'exception du segment PB2. La figure 44 montre que les régions codantes sont plus largement sollicitées pour ce processus. L'impact des régions non codantes ne peut être réellement appréhendé du fait de leur rôle dans les processus de réplication/transcription. Les travaux de M. Bergmann et de ses collaborateurs n'indiquent pas de rôle des régions Uni12, Uni13 ou des régions non codantes du segment NA de A/WSN/33 dans le processus d'incorporation, à l'inverse des étapes de transcription/réplication (16).

4) ... Mais également des mécanismes plus complexes !!!

Il semblerait cependant que le mécanisme d'empaquetage des segments des virus influenza de type A soit plus complexe. Il est intéressant de noter que, au cours des études visant à définir les régions nécessaires à l'incorporation des RNPv, les pourcentages d'incorporation des segments contenant le gène *gfp* flanqué des séquences d'encapsidation supposées des différents segments de gènes ne sont pas élevés, certains étant proches de 50 %. Récemment, l'étude de Q. Gao et P. Palese ébranle quelque peu les fondements de la théorie de l'empaquetage sélectif (73). En effet, ils montrent qu'un virus (PR8) peut incorporer deux segments possédant les mêmes extrémités d'empaquetage mais codant pour deux protéines différentes : un virus PR8 comporte huit segments dont le segment HA natif, et le segment NS possédant les extrémités d'empaquetage du segment HA (et inversement). Ces constructions montrent qu'un virus est capable d'incorporer deux segments comportant les mêmes régions d'empaquetage, hypothèse qui va à l'encontre du modèle de l'incorporation sélective. Ces observations semblent étayer l'existence des régions d'empaquetage internes permettant la production de tels virus.

Plusieurs travaux ont également montré l'interdépendance des différents segments pour leur incorporation tendant à prouver l'existence d'interactions entre les segments au moment du processus d'empaquetage. Ces hypothèses sont évoquées notamment par Y. Muramoto et ses collaborateurs. Leur étude visait à déterminer les régions nécessaires à l'empaquetage des segments codant pour les sous-unités du complexe polymérase viral (virus d'étude : A/WSN/33). Ils montrent que l'incorporation d'un segment influence l'incorporation d'autres segments (156). Ils évoquent le terme de « hiérarchie » pour l'empaquetage des différents RNPv du virus, tout en mettant en avant un rôle central du segment PB2, segment pour lequel les répercussions sur les autres RNPv sont les plus

drastiques. De semblables conclusions sont tirées dans l'étude de G. A. Marsh et ses collaborateurs. Ils montrent que des mutations dans les régions conservées des segments codant pour les sous-unités du complexe polymérase entraînent des modifications dans l'incorporation des autres segments avec plus ou moins d'effets, selon les segments. De telles mutations au niveau du segment PB2 sont néfastes pour l'incorporation de cinq segments (PB1, PA, NP, M et NS) (135). Leurs différentes observations, renforcées par l'organisation interne des RNPv au sein de la particule virale, semblent corroborer la présence d'interactions entre segments. Des exemples d'associations entre segments, au niveau d'appariement de bases ARN, sont notamment vérifiés pour certains virus au moment de la réplication (virus *Flock house* (famille des *Nodaviridae*, genre *Alphanodavirus*), ou le virus mosaïque nécrotique du trèfle violet (famille des *Tombusviridae*, genre *Dianthovirus*) (69).

Objectifs

Une des étapes clefs du cycle viral des virus influenza de type A est l'emballage des segments au moment de l'assemblage des nouvelles particules virales. Des échanges de segments lors d'une coinfection d'une cellule par différents virus influenza de type A peuvent provoquer l'apparition de virus à caractère pandémique. Ainsi, la compréhension des mécanismes régissant l'emballage des segments devient un enjeu dans la lutte contre ces virus.

Mon travail de doctorat s'est articulé autour du processus d'emballage des segments chez les virus influenza de type A et m'a permis d'étudier deux phénomènes qui en découlent. En effet, c'est le processus de recombinaison, lors d'une coinfection d'un œuf de poule embryonné, qui permet la production des semences vaccinales, comme il a été évoqué dans la partie IV.3.2. De même, l'incorporation de segments modifiés, permettrait de mieux comprendre l'emballage de ces segments, notamment les régions du segment ou encore les pré-requis nécessaires. De tels segments modifiés ont permis de définir les régions nécessaires à leur incorporation (*CF* partie V de l'introduction).

Dans la première partie des résultats, des semences vaccinales utilisées au cours des hivers 1996-97 à 2007-2008 ont été analysées afin de connaître avec précision leur contenu génétique. Ces réassortants vaccinaux sont considérés dans la littérature comme possédant les six segments internes de la souche PR8 complétés par les deux segments codant pour les protéines HA et NA de la souche de référence, constellation génétique appelée 6:2. Actuellement, les semences vaccinales sont produites par coinfection d'œufs de poule embryonnés et leur contenu génétique n'est pas analysé. Actuellement, les autorités sanitaires, notamment l'OMS (organisation mondiale de la santé) souhaiteraient que la production de ces semences se déroule sur lignées cellulaires. Treize semences vaccinales de sous-type H3N2 ont été entièrement séquencées, à l'exception des segments HA et NA qui sont l'une des exigences des producteurs permettant de conférer l'immunité contre la souche circulante. L'analyse de ces semences vaccinales nous a conduits à formuler l'hypothèse d'une incorporation sélective des segments à laquelle nous avons tenté de répondre par une étude sur cellules grâce à des expériences de compétition. Cette étude a été menée sur cellules afin de donner des renseignements sur l'emballage des segments des virus influenza de type A dans le cadre d'une production cellulaire des semences vaccinales. Le but de ce travail a été de tester l'incorporation de deux segments identiques mais d'origine virale différente.

Dans la seconde partie des résultats, l'incorporation d'un segment hétérologue a été étudiée, sur la base d'un virus neuraminidase-indépendant à l'état natif (H3N-), isolé de patients. L'étude des mécanismes dirigeant l'incorporation d'un segment hétérologue devrait permettre de mieux comprendre l'empaquetage des segments au cours de la réplication des virus influenza de type A. De plus, un tel virus transgénique serait un outil important pour la compréhension de la biologie de ces virus. En effet, l'incorporation de segments permettant l'expression de protéines dont il est possible de suivre la progression permettrait d'étudier les étapes précoces du cycle de réplication des virus influenza de type A. De tels vecteurs pourraient devenir des outils permettant de mieux comprendre la biologie fondamentale de ces virus. Différents segments neuraminidase basés sur le segment NA du virus A/Moscow/10/99 (H3N2) ont été construits : tronqués, contenant une région non codante ou un gène rapporteur, *gfp*, *luciférase*, ou *chloramphénicol-acétyl transferase (cat)*. La capacité du virus H3N- à incorporer un segment neuraminidase natif a dû être vérifiée. La synthèse de protéines issues du transgène (*cat*, *luc* ou *gfp*) a été contrôlée par transfection. Chaque groupe de segments modifiés (tronqués, non codant ou contenant un transgène) apporte un élément de réponse afin déterminer un élément nécessaire à leur incorporation, de même que la détermination des régions du segment NA natif conservées.

Matériels et Méthodes.

I. Matériels.

1. Biologie Cellulaire.

1) Cellules

Cellules MDCK – ATCC: CCL-34.

Cellules 293T – ATCC: CRL-11268.

2) Milieux de Culture et compléments.

Milieu UltraMDCK – Lonza – Référence : BE12-749-Q.

Milieu EMEM – Lonza – Référence : BE12-125F.

Milieu DMEM 1g/L glucose – Lonza : 12-707F.

Pénicilline/Streptomycine – Lonza – Référence : 17-602E.

L-Glutamine – Lonza – Référence : 17-605E.

Milieu OptiMEM – Invitrogen – Référence : 31985-047.

Milieu MEM 2x – Invitrogen – Référence : 21935-028.

Trypsine « Virus » – Roche – Référence : 10 109 819 001.

Trypsine « Cellule » – Lonza – Référence : BE17-160E.

PBS 1x without Ca or Mg – Lonza – Référence : 17-516F/12.

Sérum de veau foetal – Lonza – Référence : DE14-801F.

PBS 10 x – Euromedex – Référence : ET330.

3) Plastiques.

Flasques T175 cm² – Dutscher – Référence : 353112.

Flasques T75 cm² – Dutscher – Référence : 353136.

Flasques T25 cm² – Dutscher – Référence : 353014.

Pipettes 25 mL – Dutscher – Référence : 357535.

Pipettes 10 mL – Dutscher – Référence : 607180.

Pipettes 5 mL – Dutscher – Référence : 606180.

Boîtes de Pétri 60 mm – Dutscher – Référence : 356401.
Plaques 6 puits avec couvercle – Dutscher – Référence : 353046.
Plaques 24 puits avec couvercle – Dutscher – Référence : 353047.
Plaques 48 puits avec couvercle – Greiner Bio-one – Référence : 677 180.
Plaques 96 puits avec couvercle – Dutscher – Référence : 353072.
Plaques 96 puits fond conique – NUNC – 249570.
Pointes à filtre 1-20 µL – Starlab – Référence : S1120-1810.
Pointes à filtre 20-200 µL – Starlab – Référence : S1120-8810.
Pointes à filtre 100-1000 µL – Starlab – Référence : S1122-1830.
Tubes 50 mL – Starlab – Référence : A1450-0200.
Tubes 15mL – Starlab – Référence : A1415-0200.

4) *Anticorps.*

Anticorps antiNP T17C2 .

Anticorps secondaire : Alexa Fluor® 633 goat anti-mouse IgG (H+L) (2 mg/mL) – Invitrogen
– Référence : A21050.

5) *Appareillage.*

Etuve : Sanyo – Modèle : MCO-175.

Poste de sécurité Microbiologique : Heraus – Modèle : H512.

Agitateur de plaques – Heidolph – Modèle : Inkubator –1000/duomax1030.

Microscope : Olympus – Modèle : CK2.

Microscope à fluorescence : AxioVert 135 – Zeiss.

Caméra : AxioCam – Zeiss.

6) *Autres.*

Superfect transfection reagent – Qiagen – Référence : 303107.

Agar Noble – BD – Référence : 214220.

Cellule de Malassez – Dutscher – Référence : 140501.

CaCl₂ – Sigma Aldrich – Référence : C1016.

2-[N-Morpholino] ethanesulfonic acid – Sigma Aldrich – Référence : 69890.

2-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid – Sigma Aldrich – Référence : M8639.
Glycine – Sigma Aldrich – Référence : 241261.
PFA – Sigma Aldrich – Référence : P6148-500g.
Tween 20 – Euromedex – Référence : 2001-B.
KH₂PO₄ – Sigma Aldrich – Référence : P5655.
K₂HPO₄ – Sigma Aldrich – Référence : P2222.
Triton X-100 – Euromedex – Référence : 2000B.
DTT – Euromedex – Référence : EU0006D.
MgSO₄ – Sigma Aldrich – Référence : M2643.
Beetle Luciferin – Promega – Référence : E106A.
ATP – Sigma Aldrich – Référence : A6559.
EDTA – Euromedex – Référence : EU0007B.
Coenzyme A – Sigma Aldrich – Référence : 27590.

2. Biologie Moléculaire.

1) Enzymes de restriction.

AarI – Fermentas – Référence : ER1582.
Esp3I / BsmBI – Fermentas – Référence : ER0451.
EcoRI – Euromedex – Référence : EN-114S.
BamHI – Euromedex – Référence : EN-103S.
NcoI – Euromedex – Référence : EN-123S.
NdeI – Fermentas – Référence : ER0581.
DpnI – Euromedex – Référence : EN-160S.
MunI – Fermentas – Référence : ER0751.

2) Autres enzymes.

Herculase II – Agilent – Référence : 600675.
PfuUltraII – Agilent – Référence 600670.
Go Taq – Promega – Référence : M8307.
T4 DNA ligase – Euromedex – Référence : 09-06112.

MMulV-RT – Euromedex – Référence : 06-21-050000.

AMV-RT – Promega – Référence : M5101.

Klenow Fragment – Euromedex – Référence : 09-01111.

RNase-Free DNase Set – QIAGEN – Référence : 79254.

3) Amorces.

a. Clonage dans pHW2000 des produits d'amplification correspondant au segment entier.

Uni12 : 5'- AGCGAAAGCAGG -3'.

Aar-PB2-F1 : 5'- TATTCACCTGCCTCAGGGAGCGAAAGCAGGCA -3'.

Aar-PB2-R2341 : 5'- ATATCACCTGCCTCGTATTAGTAGAAACAAGGCATT -3'.

Aar-PB1-F1 : 5'- TATTCACCTGCCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTC -3'.

Aar-PB1-R2341 : 5'- ATATCACCTGCCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTCGT -3'.

Aar-PA-F1 : 5'- TATTCACCTGCCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTAC -3'.

Aar-PA-R2233 : 5'- ATATCACCTGCCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTACT -3'.

HA-F1 : 5'- TATTCACCTGCCTCAGGGAGCGAAAGCAGGGG -3'.

HA-R1-AarI : 5'- ATATCACCTGCCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGT -3'.

NP s : 5'- TTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTAGAT -3'.

Bm-NP-1565R : 5'- ATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTATTTTTG -3'.

Bm-M-1 : 5'- TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGTAG -3'.

Bm-M-1027R : 5'- ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT -3'.

Bm-NS-1 : 5'- TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTG -3'.

Bm-NS-890R : 5'- ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT

b. Amorces utilisées pour le changement des extrémités d'empaquetage de PB1 PR8.

PB1-DerMut-S : 5'- GATCTGTTCCACCATTGAAGAACTCAGACGGCAAAAATAGTG -3'.

PB1-DerMut-AS : 5'- CACTATTTTTGCCGTCTGAGTTCTTCAATGGTGGAACAGATC -3'.

PB1-partie 5'-S : 5'- AGCGAAAGCAGGCAAACC -3'.

PB1-partie 5'-AS : 5'- AGGAGGTATGTCGGTACCCTGT -3'.

PB1-partie 3'-S : 5'- TACAGCCATGGGACAGGAAC -3'.
 PB1-partie 3'-AS : 5'- GTACTTTTTTACGGAACAAAGATGA -3'.
 PB1-ScreenP/M-S : 5'- CAGAAATGCTAGCAAGCATCG -3'.
 PB1-ScreenP/M-AS : 5'- TCAATGGTGGAACAGATCTTCAT -3'.
 PB1-ScreenMPM/M-S : 5'- AGCGAAAGCAGGCAAACC -3'.
 PB1-ScreenMPM/M-AS : 5'- AGCCTTCCAGACTCATTGGC -3'.
 FluAs : 5'-CTTCTAACCGAGGTCGAAACGTA-3'.
 FluAas : 5'-GGTGACAGGATTGGTCTTGTCTTTA-3'.
 TaqMan Probe : 5'- fam-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGAG-BHQ -3'.

c. Amorces utilisées pour construire les segments NA modifiés.

Ba-NA-1VM : 5'- TATTCCGTCTCAGGGAGCAAAGCAGGAGT -3'.
 Ba-NA-1413RVM : 5'- ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAG -3'.
 GFP-EcoRI-S : 5'- GAATTCTAAATGGTGAGCAAGGG -3'.
 GFPStopStop-BamHI-AS : 5'- TGGATCCTTATTACTTGTACAGCTCGT -3'.
 IRES-GFP-S : 5'- AAGAATTCTAAGCCCCTCTCCCT -3'.
 IRES-GFP-AS : 5'- ATTCATATGTTACTTGTACAGCTCGT C -3'.
 Muta-DelTAA-S : 5'- GCATTTCAAGCAATATGAATGCAACATGGTGAGCAAGGGCG
 AGGA -3'.
 Muta-DelTAA-AS : 5'- TCCTCGCCCTTGCTCACCATGTTGCAATTCATATTGCTTGAAA
 TGC -3'.
 Muta-Eco+24-S :
 5'- CAAAAGATAATAACGAATTCGCTCTGTTTCTCTCACCATTGCCAC -3'.
 Muta-Eco+24-AS :
 5'- GTGGCAATGGTGAGAGAAACAGAGCGAATTCGTTATTATCTTTTG -3'.
 Muta-Eco.140-S : 5'- GCATTTCAAGCAATATGAATTCAACTCCCCCCAAAC -3'.
 Muta-Eco.140-AS : 5'- GTTTGGGGGGGAGTTGAATTCATATTGCTTGAAATGC -3'.
 Muta-Bam31-S : 5'- ACTATGGAACAGGCTCATGGATCCTGATGGGGCGGACATC -3'.
 Muta-Bam31-AS : 5'- GATGTCCGCCCCATCAGGATCCATGAGCCTGTTCCATAGT-3'.
 NAINV-BamEco-S : 5'- AAGGATCCAAACTCCCCC -3'.
 NAINV-BamEco-AS : 5'- AAAGAATTCAAAGCAATGGCTACTG -3'.
 CAT-sens : 5'- AAAGAATTCTAAATGGAGAAAAAATCACTG -3'.
 CAT-Asens : 5'- GGATCCTTACGCCCCGC -3'.
 Luc-Sens : AAAGAATCCCTAAATGGCTTCCAAG

Luc-A.Sens : AAAGGATCCTTACTGCTCGTTCTT
NA-s : 5'- TATTCGTCTCAGGGAGCAAAGCAGGAGT -3'.
NA-as : 5'- ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAG -3'.
NS-s : 5'- AGCAAAAGCAGGGTGACAAA -3'.
NS-as : 5'- AGTAGAAACAAGGGTGTTTTTTATCATT -3'.

d. Amorces utilisées pour le séquençage des plasmides.

pHW2000sens : 5'- AAGCAGAGCTCTCTGGCTAAC -3'.
pHW2000Pol2S : 5'- AGCAAAAACAGGAAGGCAAA -3'.
pHW2000antiSens : 5'- CCGGGGGAGGTATATCTTT -3'.

4) Plasmides.

peGFP-N1 – Clontech – Référence : #6085-1 (GenBank Accession #U55762).
pIRES 2eGFP – Clontech – Référence : #6029-1.
pHW2000.
pHW2000PolII~~del~~ = pHW2000 délété du promoteur de l'ARN polymérase II.
pBC-SK – Stratagene – Référence : 212215.
pR7-FluA-hRLuc(-) (mis au point par le Dr Nadia Naffakh, Institut Pasteur, Paris).

5) Appareillage.

Thermocycleur – TECHNE – Référence : TC3000.
Thermocycleur – TECHNE – Référence : TC312.
Thermocycleur – Applied Biosystem – Référence : GeneAmp PCR Syst 9700.
Système de migration – Advance – Référence : Mupid exU.
Spectrophotomètre – Eppendorf – Modèle : Biophotomètre.
Cuve de spectrophotométrie Uvette – Dutscher – Référence : 033189.
SpeedVac – Savant – Modèle : DNA110.

6) *Autres.*

NucleoSpin plasmid – Macherey Nagel – Référence : 740588.250.

NucleoSpin Extract II – Macherey Nagel – Référence : 740609.250.

NucleoSpin RNA virus – Macherey Nagel – Référence : 740956.250.

NucleoBond PC100 – Macherey Nagel – Référence : 740573.100.

Nucleobond tampon S1, 500 ml – Macherey Nagel – Référence : 740516.1.

Nucleobond tampon S2, 500 ml – Macherey Nagel – Référence : 740517.1.

Nucleobond tampon S3, 500 ml – Macherey Nagel – Référence : 740518.1.

dNTP Master Mix – Eurogentec – Référence : NU-0010-50.

Agarose – Euromedex – Référence : D5-E.

BET – Euromedex – Référence : EU0070.

Tris base (2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol) – Euromedex – Référence : 200923-A.

Glacial acetic acid – BDH – Référence : 200-580-7.

EDTA – Euromedex – Référence : EU0007-B.

Ethanol 96 % – Elvetech services.

Smartladder – Euromedex – Référence : MW-1700-10.

3. Bactériologie.

LB Broth – AthénaES – Référence : 0102.

Tryptone – Euromedex – Référence : UT8750.

Extrait de levure – Euromedex – Référence : 1112-A.

NaCl – Euromedex – Référence : UY2010.

Agar bactériologique – Euromedex – Référence : 1330.

Boîtes de Pétri 10 mm – Greiner Bio-one – Référence : 633 184.

Tubes 10 mL – Dutscher – Référence : 080040.

Pipettes Pasteur non contonnées – Dutscher – Référence : 042000.

Ampicilline – Euromedex – Référence : EU0700-D.

Kanamycine – Euromedex – Référence : EU0420-A.

Bactéries compétentes E.cloni 10G – Lucigen – Référence : 60107-4.

Filtres seringue 0.2 µm – Dutscher – Référence : 146617.

Seringue 20 ml – Dutscher – Référence : 300613.

4. Informatique.

DNAMAN – Lynnon Corporation.

Clone 5 Manager – Scientific & Educational Software.

Primer 3 – Steve Rozen and Helen J. Skaletsky.

Support double digest – Fermentas.

TM Calculator – Applied biosystems.

NCBI Blast – NCBI.

Influenza Sequence Database sur le site de l'EISS.

AxioVision Release 4.6.3 – Zeiss.

II. Méthodes.

1. Lignées Cellulaires et Virus.

1) *Lignées cellulaires.*

Les cellules MDCK sont maintenues dans du milieu UltraMDCK complétement avec de la L-Glutamine (2 mM), et de la Pénicilline/Streptomycine (100 IU/ml and 100 µg/ml respectivement). Les cellules 293T sont maintenues dans du *Dulbecco's Modification of Eagle's Medium* (DMEM) complétement en sérum de veau fœtal (10 %), en L-Glutamine (2mM), et en Pénicilline/Streptomycine (100 IU/ml and 100 µg/ml respectivement).

Les virus sont cultivés sur des cellules MDCK en utilisant le milieu *Eagle's Minimal Essential Medium* (EMEM) supplémenté en L-Glutamine (2 mM), en Pénicilline/Streptomycine (100 IU/ml and 100 µg/ml respectivement) et en trypsine pancréatique bovine (1 µg/ml).

2) *Virus.*

Les virus influenza de type A ont été aimablement donnés par le CNR grippe Sud. Le virus A/Réunion/586/2004 (H3N-), isolé d'un patient présentant des symptômes grippaux s'est révélé résistant aux INA. Une étude biomoléculaire a permis de mettre en évidence l'absence du segment codant pour la NA.

3) Bactériologie.

1) Milieux et antibiotiques.

Les bactéries sont mises en culture dans du milieu LB : 20 grammes de poudre LB par litre d'eau. Le pH est vérifié et ajusté à 7,5 si besoin.

Les clones bactériens sont isolés sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB contenant 1,2 gramme d'agar bactériologique par litre et l'antibiotique de sélection (ampicilline à une concentration de 100 mg/l ou kanamycine à une concentration de 35 mg/l). L'antibiotique est ajouté au milieu LB agar après chauffage et refroidissement.

Lors de leur transformation, les bactéries sont mises en culture dans du milieu 2TY contenant : 16 grammes de tryptone, 5 grammes d'extrait de levure et 5 grammes de chlorure de sodium dans un volume de 1 litre d'eau distillée. Le pH est vérifié et ajusté si besoin à 7,5.

La stérilisation des milieux s'effectue par autoclavage 20 minutes à 120 °C.

Des solutions stock d'antibiotiques sont préparées de manière stérile :

- Ampicilline : 100 mg/ml.
- Kanamycine : 50 et 35 mg/ml.

Les solutions sont filtrées (0,22 µm) avant d'être congelées à -20°C.

2) Protocole de préparation des bactéries compétentes.

Des bactéries compétentes sont mises en culture dans 2 ml de milieu LB sans antibiotique sur la nuit, à 37 °C sous agitation. Le lendemain, 200 ml de milieu LB sans antibiotique sont ensemencés avec les 2 ml de préculture et incubés à 37 °C sous agitation. La densité optique (DO) à 600 nm est mesurée à intervalle régulier afin d'obtenir une culture en phase exponentielle de croissance, soit une différence de DO entre le milieu non ensemencé et la culture comprise entre 0,2 et 0,3. Une fois ce palier atteint, les bactéries sont incubées 15 minutes dans la glace puis répartis dans des tubes de 50 ml. Après une centrifugation à 2500 tours par minutes pendant 10 minutes à 4 °C, les surnageants sont éliminés et les culots sont repris dans 10 ml d'une solution stérile de CaCl₂ à 0,1 M. Les tubes sont incubés 30 minutes à 0 °C. Après une centrifugation à 2500 tours par minutes pendant 10 minutes à 4 °C, les surnageants sont éliminés et les culots sont repris dans 1 ml d'une solution stérile de CaCl₂ à 0,1 M contenant 30 % de glycérol. Les bactéries sont aliquotées sous 50 µl dans des tubes de 0,5 ml et conservées à -80 °C.

3) Transformation de bactéries compétentes.

100 ng de plasmides ou 5 µl du mélange de ligation sont ajoutée à 50 µl de bactéries compétentes. Après une incubation de 5 minutes dans la glace, un choc thermique de 30 secondes à 37 °C est effectué avant de remettre les bactéries 5 minutes dans la glace. Sous hotte, 100 µl de milieu 2TY sans antibiotique sont ajoutés. Les bactéries sont alors incubées à 37°C, sous agitation pendant 30 minutes. Les bactéries sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB Agar avec l'antibiotique souhaité.

La boîte est incubée sur la nuit à 37 °C.

4) Préparation de culture liquide.

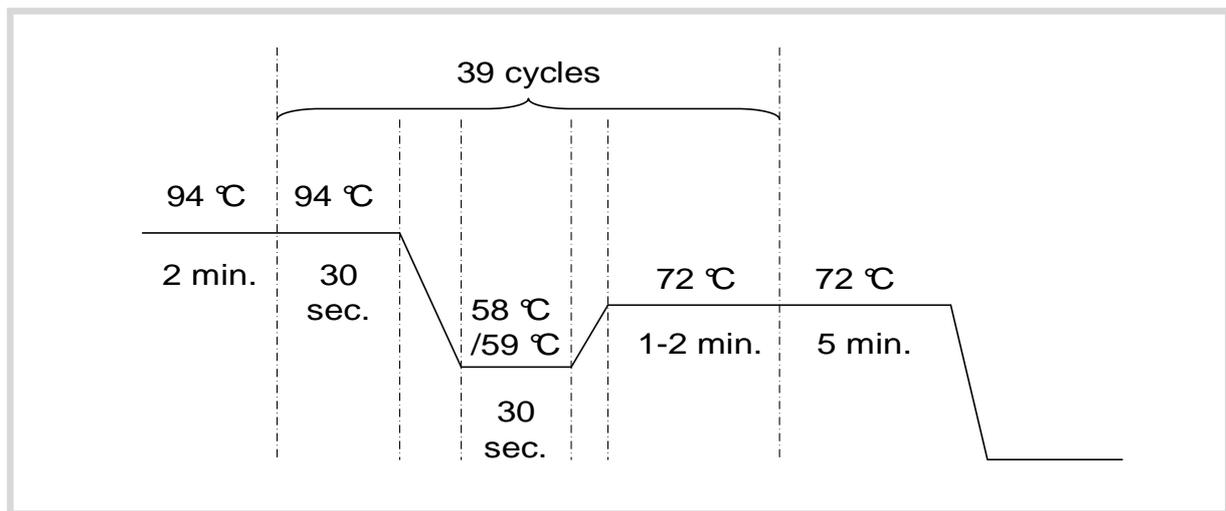
Les bactéries sont mises en culture dans du milieu LB contenant l'antibiotique de sélection (ampicilline à une concentration de 100 mg/l ou kanamycine à une concentration de 35 mg/l). 2 ml de ce milieu dans un tube de 10 ml sontensemencés avec un clone bactérien prélevé à l'aide d'un cône stérile. Les bactéries sont incubées à 37 °C sur la nuit, sous agitation.

2. Plasmides.

1) Mise en place du système de génétique inverse à huit plasmides permettant la production de virus A/Réunion/586/2004 (H3N-).

Les ARNv du virus H3N- ont été extraits grâce au kit NucleoSpin RNA virus. Une étape de *reverse transcription* (RT) a été réalisée avec une amorce universelle (amorce Uni 12). 10 µL d'ARNv sont ajoutés à 300 ng d'Uni12 et incubés 5 minutes à 70 °C. L'enzyme MuIV-RT (10 U), les dNTPs (1 mM), le tampon et l'eau sont ajoutés afin d'obtenir un volume réactionnel de 20 µL. La réaction de RT se déroule à 42 °C pendant 1 heure, suivie d'une étape de dénaturation de l'enzyme à 65 °C pendant 5 minutes.

Les ADNc ainsi obtenus servent de matrice à une *polymerase chain reaction* (PCR) segment spécifique. Ces amorces permettent d'intégrer à chaque extrémité du produit PCR les sites des enzymes de restriction *AarI* (PB2, PB1, PA et HA) ou *BsmBI* (NP, M et NS). 2 µL d'ADNc sont ajoutés à un mélange de dNTPs, d'amorces segment spécifiques, de l'enzyme Herculase II et son tampon dans un volume final de 50 µL. Les conditions du cycle sont décrites ci-après.



La taille des produits PCR est vérifiée sur gel d'agarose (1 %). Après purification, les produits d'amplification sont digérés par *AarI* ou *BsmBI* (3 heures à 37 °C en présence de DTT pour une digestion avec *BsmBI*). Ces ADN digérés sont purifiés et quantifiés avant d'être clonés dans le plasmide pHW2000 (digéré avec l'enzyme *BsmBI*). La ligation est effectuée selon la formule :

$$\text{Masse}_{\text{insert}} [\text{ng}] = 125 \times \text{Taille}_{\text{insert}} [\text{pb}] / \text{Taille}_{\text{vecteur}} [\text{pb}]$$

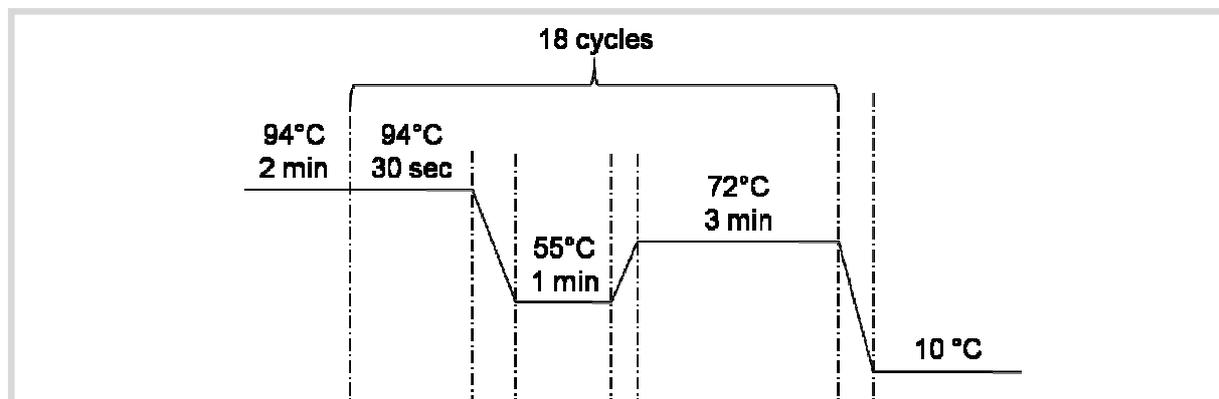
Un mélange contenant les bonnes proportions d'ADN insert et d'ADN vecteur, l'enzyme (T4 DNA ligase) et son tampon, dans un volume final de 10 µl est incubé une heure à température ambiante. Après ce temps, 5 µl du mélange est transformé dans 50 µl de bactéries *E. coli*. La sélection se fait par addition d'ampicilline au milieu bactérien.

Quelques clones bactériens (5-10) sont mis en culture et leur ADN plasmidique est extrait afin de vérifier la présence de l'insert.

2) Plasmides codant pour les segments NA modifiés.

Le plasmide de base pour la construction des plasmides codant pour les segments NA modifiés est NA M10/pHW2000PolII~~del~~. Pour l'insertion des divers inserts, le plasmide a été modifié par mutagenèse dirigée au niveau de la région correspondant au segment NA. Un site *EcoRI* a été ajouté à la position 46 ou à la position 141. Un site *BamHI* a été ajouté à la position 1391 (amorces Muta-Bam31-S et -AS). Un site *BamHI* est déjà présent en position 1032. Pour chaque mutagenèse, 50 ng de matrice sont ajoutés à un mélange de dNTP,

d'enzyme PfuUltraII et de son tampon, des amorces (125 ng), de 0,5 µl de DMSO, de 3 µl de Quicksolution dans un volume final de 50 µl. Les conditions de PCR sont décrites ci-dessous.



Les différents inserts sont amplifiés à partir de plasmides commerciaux (sauf pour la NA inversée (NA inv)) grâce à des jeux d'amorces spécifiques :

- le gène *gfp* : à partir de pN1eGFP, avec les amorces GFP-EcoRI-S et GFPStopStop-BamHI-AS.
- la NA inv : à partir du plasmide NA de A/Moscow/10/99 (H3N2, M10)/pHW2000PolIIIdel, avec les amorces NAinv-BamEco-S et NAinv-BamEco-AS.
- le gène *luciférase (luc)* : à partir du plasmide pR7-FluA-hRLuc(-), avec les amorces Luc-Sens et Luc-A.Sens
- le gène *chloramphénicol acétyltransférase (cat)* : à partir du plasmide pBC-SK, avec les amorces CAT-sens et CAT-Asens.

Les inserts sont amplifiés par PCR avec l'enzyme Herculase II, dans un volume réactionnel de 50 µl. Après purification sur gel d'agarose, l'insert est digéré pendant 2 heures à 37 °C par les enzymes *EcoRI* et *BamHI*. Après une purification sur colonne, l'insert est quantifié.

Les différents plasmides NA M10/pHW2000PolIIIdel mutés sont digérés par les enzymes de restriction *EcoRI* et *BamHI* dans du tampon Tango 2x, pendant 2 heures à 37 °C. Le vecteur est purifié sur gel d'agarose et quantifié.

Les extrémités cohésives obtenues après digestion des plasmides présentant les sites de restriction *EcoRI*₄₆ et *BamHI*₁₃₉₁ ou *EcoRI*₁₄₁ et *BamHI*₁₀₃₂ sont comblées afin de permettre une ligation du plasmide sur lui-même.

Après une ligation d'une heure à température ambiante, 5 µl du mélange est transformé dans 50 µl de bactéries compétentes *E. coli* sur une boîte Pétri contenant du LB-Agar supplémenté en ampicilline.

Des clones bactériens sont mis en culture dans du LB supplémenté en ampicilline et leur ADN plasmidique est extrait afin de tester l'insertion du gène d'intérêt.

3. Extraction des plasmides.

Les plasmides sont extraits à partir de 2 ml de culture de bactéries après une nuit à 37 °C. Les bactéries sont culottées dans un tube de 2 ml par centrifugation à 13000 tours par minute pendant 1 minute. Le surnageant est éliminé et le culot est repris avec 100 µl de tampon S1 contenant de la RNase. 200 µl de tampon S2 sont ajoutés et le mélange est homogénéisé par retournements. Après une incubation à température ambiante de 3 minutes, 150 µl de tampon S3 sont ajoutés. Le mélange est homogénéisé par retournement. Après une centrifugation de 8 minutes à 10000 tours par minute, le surnageant est ajouté à 800 µl d'éthanol 100 % dans un tube propre. Après une incubation de 2 minutes à température ambiante, le tube est centrifugé 5 minutes à 10000 tours par minute. Le surnageant est éliminé et le culot est rincé avec 500 µl d'éthanol 70 %. L'excès d'éthanol est éliminé au SpeedVac pendant une dizaine de minutes. Le culot est enfin repris dans 50 µl d'eau stérile.

Un dosage au spectrophotomètre est réalisé à la dilution au vingtième afin de connaître la concentration en ADN contenue dans le tube.

4. Extraction des ARNv avec traitement à la DNase.

150 µl de surnageant de culture sont prélevés. L'extraction d'ARN est effectuée à l'aide du kit NucleoSpin RNA virus. 600 µl du tampon AV1 contenant le *carrier RNA* sont ajoutés aux 150 µl de surnageant et le mélange est incubé 5 minutes à 70 °C après avoir été passé 15 secondes au vortex. 600 µl d'éthanol 96-100 % sont ensuite ajoutés et un traitement de 15 secondes au vortex est effectué. 700 µl de ce mélange sont passés sur une colonne et une centrifugation d'une minute de 8000 tours par minute est effectuée. Cette étape est répétée une seconde fois. La colonne est lavée avec 500 µl de tampon AW. Après une centrifugation d'une minute de 8000 tours par minute, 35 µl de tampon RDD et 5 µl de DNase I sont ajoutés dans la colonne. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante, la colonne est lavée avec 600 µl de tampon AV3 supplémenté en éthanol 96-100 % et centrifugée pendant 1 minute à 8000 tours par minute. Un ultime lavage avec du tampon AV3 (200 µl) est effectué. Après une centrifugation d'une minute à 8000 tours par minute, 50 µl d'eau sans RNase sont ajoutés et la colonne est incubée 1 à 2 minutes à température

ambiante. La colonne est enfin centrifugée dans un tube eppendorf de 1,5 ml 1 minute à 8000 tours par minutes.

L'ARN ainsi purifié est conservé à -20 °C.

5. Test des différents plasmides.

1) Test des plasmides codant pour les segments du virus H3N-.

Chaque plasmide codant pour un segment du virus H3N- est testé de manière indépendante sur un fond génétique H3N2 M10. Un mélange des huit plasmides codant pour les huit segments du génome viral (sept de M10 et un de H3N-) sont cotransfectés dans des cellules 293T (pour plus de détails, se référer à la section 2.4 de l'article).

2) Fonctionnalité des segments exprimant un transgène.

Les plasmides codant pour un segment NA exprimant un transgène sont testés par cotransfection avec un complexe polymérase viral (PB2, PB1, PA et NP). Un microgramme de chaque plasmide est mélangé à 50 µl de Superfect et 300 µl d'OptiMEM. Ce mélange est incubé dix minutes à température ambiante, ajouté à 2,5 ml d'OptiMEM puis est réparti sur un tapis de 293T d'une confluence de 40-60 % préalablement lavé avec de l'OptiMEM. Les cellules sont incubées trois heures à 37 °C, sous CO₂. Le milieu est alors remplacé par de l'OptiMEM supplémenté avec 0,3 % de *bovine serum albumin*, après un lavage avec ce milieu.

24 heures post-transfection, l'expression de GFP est vérifiée par microscopie électronique.

48 heures post-transfection, l'expression de Luciférase est contrôlée par un test d'activité.

La validation de l'expression du gène *cat* n'a pas été effectuée.

6. Production de virus recombinants par génétique inverse à huit plasmides.

Se référer à la section 2.4 de l'article.

7. Cinétique de répllication des virus produits par génétique inverse.

Les virus comportant un fond génétique H3N- et une NA modifiée sont produits grâce à la technique de la génétique inverse. Après deux amplifications successives sur cellules MDCK, les virus sont quantifiés par titrage infectieux. Après un lavage avec du milieu d'infection, les puits d'une plaque 96 puits de cellules MDCK confluentes sont infectés par des dilutions décroissantes de virus, avec 4 puits par dilution. 24 heures post-infection, le milieu d'infection est changé. La détermination du titre infectieux se fait par test d'hémagglutination et par la méthode statistique de Reed et Munch.

8. Immunofluorescence anti-NP.

Des cellules à confluence dans une boîte de Pétri 30 mm sont infectées par différents virus. A 24 heures post-infection, les cellules sont fixées au PFA à 4 % pendant 30 minutes à 4 °C. Après cette incubation, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS. Un ml de PBS contenant 0,2 % de Triton X-100 est ajouté. Un ml de solution de blocage (PBS contenant 0,1 % de Tween 20 et 1 % de SVF) est ajouté et le mélange est incubé 30 minutes à température ambiante. Après avoir retiré la solution de blocage, 500 µl d'anticorps primaire (anti-NP, T17C2) dilué au centième est ajouté et est incubé 1 heure à 37 °C. Les cellules sont ensuite lavées au PBS contenant 0,1 % de Tween 20. 500 µl d'une dilution au deux-centième de l'anticorps secondaire anti-souris et le mélange est incubé 30 minutes à l'obscurité. Les cellules sont lavées au PBS contenant 0,1 % de Tween 20 puis au PBS seul. Les cellules sont conservées à 4 °C et observées au microscope à fluorescence.

9. Préparation des hématies et test d'hémagglutination.

Pour cette étude, seuls des globules de cobaye ont été utilisés, les virus de sous-types H3N2 récents, tels que le virus H3N-, n'hémagglutinent pas les hématies de poule. Les hématies sont conservées dans du tampon Elsevier. 2 ml de culot de globules rouges sont remis en suspension dans du tampon Salk (85 g de NaCl, 6,8 g de KH₂PO₄, 1,5 g de NaOH qsp. 500 ml, pH = 7, à diluer au 1/20 dans de l'eau stérile). Après une centrifugation à 4 °C à 3000 tours par minute pendant 5 minutes, le surnageant est éliminé et du tampon Salk est ajouté pour remettre en suspension le culot d'hématies. Ces deux étapes sont répétées une fois. Les globules rouges sont centrifugés à 4 °C 10 minutes à 3000 tours par minute. Le

surnageant est éliminé et le culot d'hématies est repris dans un volume de tampon Salk afin d'obtenir une concentration finale en hématie de 0,8 % (volume/volume). Avant chaque utilisation, une vérification de l'absence d'hémolyse et une remise en suspension douce des hématies sont nécessaires.

Afin de tester la présence de virus dans un surnageant de culture, dans une plaque 96 puits à fond conique sont ajoutés 50 µl de tampon Salk, 50 µl de surnageant de culture et 50 µl de solution de globules rouges à 0,8 %. Après une incubation d'environ une heure à température ambiante, la lecture peut être effectuée.

10. Analyse de l'encapsulation des segments NA.

1) Activité neuraminidase.

25 µL de surnageant de culture non dilué sont mis en présence du tampon de réaction dans une plaque 96 puits : acide 2-[NMorpholino] ethanesulfonique pH 5.8 (32.5mM), et CaCl₂ (4mM). 50µL d'acide 2-(4-methylumbelliferyl)-α-D-N-acetylneuraminique (100µM) sont ajoutés. La plaque est incubée une heure à 37 °C. La réaction est arrêtée par addition de 150 µL de tampon glycine (50mM, pH 10,4). La fluorescence est quantifiée par un fluorimètre MXR (longueur d'ondes d'excitation : 355 nm ; longueur d'ondes d'émission : 460 nm). Chaque surnageant est testé en duplicate.

2) Présence de la protéine GFP.

L'incorporation des segments permettant l'expression d'une GFP est testée par observation au microscope à fluorescence à 24, 48 et 72 heures.

3) Présence de la protéine LUC.

48 heures post-transfection avec les plasmides codant pour le complexe polymérase, et la nucléoprotéine NP, les cellules sont récoltées, culottées et congelées une nuit à -20 °C. Après décongelation, 300 µl de tampon de lyse sont ajoutés et le mélange est incubé 10 à 15 minutes à 4 °C. Les tubes sont centrifugés 2 minutes à 10000 rpm. Le surnageant est récolté.

100 μ l de substrat sont ajoutés à 100 μ l d'échantillon au moment de la mesure au luminomètre.

Solution de tampon de lyse :

9,15 ml K₂HPO₄ 100 mM

0,85 ml KH₂PO₄ 100 mM

20 μ l Triton X-100 (0,2 % final)

10 μ l DTT 1 M (1 mM final)

Substrat :

2,5 ml Tris Acetate pH 0,1 M 7,8

410 μ l DTT 1 M

2,5 μ l EDTA 0,5 M

46,7 μ l MgSO₄ 1 M

340 μ l CoA 10 mM

125 μ l ATP 50 mM

590 μ l Luciférine 10 mM

5,98 ml Eau stérile

4) Analyse biomoléculaire.

Avant chaque amplification des virus produits en génétique inverse, 150 μ l de surnageant sont collectés. L'ARNv est extrait et une étape de digestion de l'ADN plasmidique résiduel est réalisée sur la colonne. Une fois les ARN isolés, une PCR dirigée contre le segment NS est réalisée. Après une étape de RT segment aspécifique, le segment NA est amplifié (amorces NA-s et -as). Pour chaque réaction de PCR, un témoin négatif et un témoin positif (plasmide inclus dans l'expérience de génétique inverse) sont effectués. La taille des amplifiats est validée par dépôt sur gel d'agarose.

11. Analyse bioinformatique des segments NA modifiés.

Différents segments NA naturels ont été analysés par bioinformatique afin de voir la longueur du segment, la composition en nucléotides, les zones conservées selon les sous-types. Les séquences ont été recueillies dans l'*Influenza Sequence Database* (166). Elles ont

été analysées à l'aide du logiciel DNAMAN et les données ainsi obtenues ont été traitées sur Excell. Les virus utilisés pour cette étude sont présentés dans le tableau 5.

Deux autres séquences de segments NA ont été ajoutées à cette étude. Ils codent pour des protéines NA de virus influenza de type A humains : A/Hong Kong/1/68 (H3N2) (numéro d'accèsion : AF348184) et A/Canada/rv504/2004 (H7N3) (numéro d'accèsion : CY015008). De même que les délétions visualisées dans des segments NA de virus de sous-type A(H3N2) (apparentés antigéniquement à A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) ou A/California/7/2004 (H3N2)) (**Tableau 6**).

Numéro	Sous-type	Nom	Numéro d'accèsion
1	H1N1	A/Hamburg/4/2009	GQ166217
2	H1N1	A/Puerto Rico/8/34	
3	H5N1	A/American wigeon /California/HKWF1174/2007	CY033358
4	H3N2	A/Moscow/10/99	
5	H9N2	A/bird /Guangxi/A1/2006	EU086288
6	H2N3	A/environment /California/7286/2008	CY039694
7	H7N3	A/cinnamon teal/Bolivia/4537/2001	DQ525412
8	H8N4	A/northern shoveler /California/AKS273/2007	CY039550
9	H12N4	A/laughing gull /Delaware/94/2000	CY005359
10	H2N5	A/mallard /Alberta/884/1984	CY003873
11	H6N5	A/American wigeon /California/HKWF371/2007	CY032706
12	H4N6	A/mallard /California/7766/2008	CY039741
13	H3N6	A/Duck /Nanchang/8-174/2000	CY005464
14	H7N7	A/Equine /Prague/1/56	U85989
15	H5N7	A/shorebird /Delaware/75/2004	CY004978
16	H4N8	A/bufflehead /California/HKWF205/2007	CY032894
17	H3N8	A/Equine /Alaska/1/91	L06578
18	H10N8	A/environment /Dongting Lake/Hunan/3-9/2007	GQ325651
19	H11N9	A/green winged teal /California/AKS1305/2008	CY039534
20	H2N9	A/laughing gull /New Jersey/75/1985	CY003865

Tableau 5 : Les différents NA utilisés au cours de l'étude bioinformatique.

Les neuf sous-types de neuraminidase sont représentés, ainsi que différents hôtes. Les numéros d'accèsion sont indiqués.

	Extrémités 5'	Extrémité 3'
NA tronquée naturelle 1	1-273	1286-1467
NA tronquée naturelle 2	1-258	1385-1467
NA tronquée naturelle 3	1-286	1206-1467
NA tronquée naturelle 4	1-260	1394-1467
NA tronquée naturelle 5	1-319	1416-1467
NA tronquée naturelle 6	1-223	1322-1467
NA tronquée naturelle 7	1-166	1342-1467
NA tronquée naturelle 8	1-301	1246-1467
NA tronquée naturelle 9	1-223	1427-1467
NA tronquée naturelle 10	1-159	1236-1467
NA tronquée naturelle 11	1-257	1322-1467
NA tronquée naturelle 12	1-256	1322-1467

Tableau 6 : Régions conservées des segments NA retrouvés de manière naturelle.

Tous les segments NA tronqués inscrits dans ce tableau sont de sous-type N2 et apparentés aux virus A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) ou A/California/7/2004 (H3N2).

Etude des semences vaccinales

- Résultats -

Mon travail de thèse s'est articulé autour de deux axes principaux qui s'appuient sur un processus encore méconnu du cycle de réplication des virus influenza de type A, l'empaquetage des RNPv. Cette étape clef peut notamment diriger le réassortiment lors d'une coinfection d'une cellule avec deux souches de virus influenza de type A.

Les virus influenza sont des pathogènes humains et animaux présents sur la totalité du globe. Afin de limiter l'impact des épidémies et d'endiguer les pandémies, la vaccination est la pierre angulaire de la protection contre les virus influenza. Les vaccins antigrippaux confèrent une triple protection, immunisant contre les sous-types circulants dans la population humaine, soit A(H1N1), A(H3N2) et B. Les différentes souches vaccinales composant le vaccin sont produites sur œufs de poule embryonnés, et pour les souches de type A par coinfection entre une souche avirulente mais possédant un fort pouvoir répliatif sur œuf, PR8 et une des deux souches de référence. Les recombinants qui seront inclus dans le vaccin sont sélectionnés sur deux critères : un fort pouvoir répliatif et la présence des antigènes de surface de la souche de référence. La composition génomique interne de ces souches n'est pas analysée. Actuellement, un effort constant est effectué par les industries pharmaceutiques afin de promouvoir d'autres modes de production des vaccins antigrippaux, notamment l'utilisation de la technique de génétique inverse sur des lignées cellulaires homologuées par l'OMS.

Dans un premier temps, une analyse sur les souches vaccinales a été effectuée, permettant de mettre en évidence l'hétérogénéité du contenu génétique de ces souches. Treize souches vaccinales de sous-type H3N2 obtenues de fabricants et commercialisées depuis l'hiver 1996-97 ont été séquencées. Nous avons ainsi pu montrer que la majorité des souches vaccinales n'étaient pas comme les rapports officiels pouvaient le faire penser des virus de constellations 6:2, c'est-à-dire les deux segments codant pour les antigènes majeurs de la souche de référence en association avec le fond génétique de PR8. Tous les segments d'origine A(H3N2) sont représentés au moins une fois dans les souches vaccinales testées, bien qu'ils ne soient pas incorporés avec le même taux. Le segment PB1 est le segment d'origine A(H3N2) est le plus représenté dans les souches vaccinales analysées.

Une étude sur les interactions entre segments a pu être menée sur cellules en se basant sur les différences dans l'incorporation des segments suite à cette analyse, bien que les souches vaccinales soient produites par coinfection sur œuf de poule embryonné. En effet, les vaccins antigrippaux tendent de plus en plus à être produits par génétique inverse sur lignées cellulaires. Cependant, l'utilisation de cette technique impose de connaître la constellation optimum permettant le meilleur rendement, la plus forte concentration en

glycoprotéines ... Pour ces raisons, nous avons voulu étudier l'incorporation du segment PB1 d'origine H3N2 en présence de différents fonds génétiques, composés de mosaïques de segments H3N2/H1N1.

Cette étude a fait l'objet d'une publication soumise au journal *Vaccine* (ci-jointe).

Reassortment patterns of H3N2 influenza vaccine seeds reveal a high frequency of incorporation of H3N2 PB1 segment.

Corinne Bergeron^a, Maude Bouscambert-Duchamp^{a,b}, Vincent Moulès^a, Martine Valette^b, Alan Hay^c, Bruno Lina^{a,b}, Michèle Ottmann^{a*}.

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

^b Laboratoire de virologie, centre de Biologie et de Pathologie Est, Centre National de Référence Grippe France Sud, Hospices Civils de Lyon, 59 boulevard Pinel, 69677 Bron cedex, Lyon, France.

^c The National Institute for Medical Research, The Ridgeway, Mill Hill, London, NW7 1AA, UK.

* Corresponding author :

Mailing address: CNRS FRE 3011, Laboratoire de Virologie et Pathologie Humaine

Faculté de médecine RTH Laennec

7-11 rue Guillaume Paradin

69372 Lyon cedex 08

Telephone: +33(0)4 78 77 10 85

Fax: +33 (0)4 78 77 87 51

E-mail : michele.ottmann@univ-lyon1.fr

ABSTRACT

Influenza vaccine seeds produced in chicken eggs are selected through HA and NA surface glycoproteins antigenicity, as well as through high replicative ability. Here we characterize the genetic content of thirteen H3N2 influenza vaccine seeds used in the recent past. Interestingly, sequence analysis of the vaccine seeds shows reassortment events leading to different PR8:H3N2 segment constellations, ranging from the expected 6:2 to 2:6 constellations. H3N2 PB1 is the principal segment incorporated in the tested vaccines seeds, therefore H3N2 or PR8 PB1 segment competition experiments using plasmid-based reverse genetics in cell line result in different segment incorporations depending on the genetic background. This study highlights the diversity of reassortments resulting from coinfection with two influenza A virus strains and the complexity of molecular mechanisms involved in this event.

Key words: human influenza virus ; H3N2 ; vaccine ; genome.

Running title: Genetic content of Influenza H3N2 vaccine seeds

1. INTRODUCTION

Influenza A viruses are members of the *Orthomyxoviridae* family [1]. Their genomes consist of eight single-stranded RNA segments of negative polarity [2]. The influenza genome evolves via two ways: antigenic shift and antigenic drift. Antigenic shift corresponds to a genetic rearrangement of segments of different viral origins during a coinfection event and might result in emergence of pandemic virus [3]. Antigenic drift is due to frequent mutations during replication step by the viral polymerase complex: the viruses can be antigenically different and cause epidemics [4].

Vaccination is the cornerstone of influenza prevention, and constant survey must occur as a result of antigenic drift. Vaccines are protective if the strains composing them antigenically match with circulating strains. World health organization (WHO) coordinates influenza survey program and twice a year, reference strains included in vaccines of north and south hemispheres are send to manufacturers. Influenza vaccines are trivalent, including representative surface antigens of the three major subtypes circulating in humans: A(H1N1), A(H3N2) and B. Epidemic vaccines are prepared almost entirely from viruses grown in the allantoic cavity of 9- to 11-days-old embryonated chicken eggs [5]. Each type A vaccine seed is produced by coinfection of chicken eggs with one selected reference strain (A(H1N1) or A(H3N2)) and with the acceptor strain, A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (PR8), an attenuated human strain with high growth performances. Vaccine seeds are selected on two criteria: high growth properties and presence of reference strain major antigens, i.e. hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) proteins. However, vaccine production in chicken eggs presents different disadvantages such as time consumption and cumbersome method. In recent years, several manufacturers have explored alternative approaches using accredited mammalian cell lines, e.g. African Green monkey kidney (Vero) cells [6], Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells [7] or PER.C6 cells [8]. In the future, plasmid-based reverse genetics could be applied for the production of viruses from selected plasmids (for review see [9] and [10]).

In this study, we analyzed the segment constellation of thirteen H3N2-based vaccine seeds in order to define their exact genetic content. Our results reveal that H3N2 internal segments were more present in the vaccine seeds than expected. As PB1 segment was the most incorporated H3N2 internal segment in analyzed vaccine seeds produced on eggs, we focused our analysis on its selective incorporation in viral particles on MDCK cell line. Competition experiments between PR8 and A/Moscow/10/99 (H3N2) (M10) PB1 segments, i.e. A/Panama/2007/99 (H3N2)-like strain, suggest that the genetic background is involved in the PB1 incorporation process.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Cells and viruses

MDCK cells (ATCC: CCL-34) were maintained in UltraMDCK Medium (Lonza) supplemented with 2 mM L-Glutamine (Lonza) and Penicillin/Streptomycin (100 IU/ml and 100 µg/ml respectively, Lonza). Viruses were propagated in MDCK cells using Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM, Lonza) supplemented with 2 mM L-Glutamine (Lonza), Penicillin/Streptomycin (100 IU/ml and 100 µg/ml respectively, Lonza) and 1 µg/mL pancreatic bovine trypsin (Roche Applied Bioscience). 293T human embryonic kidney cells (ATCC: CRL-11268) were cultured in Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM, Lonza) with 10% deplemented foetal calf serum, L-Glutamine (2 mM) and Penicillin/Streptomycin (100 IU/ml and 100 µg/ml respectively).

Vaccine seeds obtained from manufacturers were kindly provided by the Centre National de Référence Grippe France Sud.

2.2. *Plasmids*

Plasmids encoding M10 and PR8 viruses were developed in collaboration with the Dr Alan Hay's laboratory (MRC). Briefly, cDNA full length PCR amplification was cloned in pHW2000 plasmid [11].

A PB1 segment containing the PR8 PB1 open reading frame (ORF) flanked by M10 extremities containing the packaging regions, i.e. MPM segment, was constructed (see Figure 2). In order to obtain PB1-M10 cDNA 3' extremity, PB1-PR8/pHW2000 was mutated at position 2280 by site-directed mutagenesis (forward primer 5'-GATCTGTTCCACCATTGAAGAACTCAGACGGCAAAAATAGTG-3' and reverse primer 5'-CACTATTTTTGCCGTCTGAGTTCTTCAATGGTGGAACAGATC-3'). Two overlapping PCR products were used to amplify in a third round an entire PB1 segment, corresponding to MPM segment. In a first step, PCR was performed on PB1-M10/pHW2000 for the selective amplification of respectively cDNA 5' 118 first nucleotides of M10 PB1 segment (forward primer 5'-AGCGAAAGCAGGCAAACC-3' and reverse primer 5'-AGGAGGTATGTCGGTACCCTGT-3'). In a second step, mutated PB1-PR8/pHW2000 was used to amplify the 3' 2,223 nucleotides (forward primer 5'-TACAGCCATGGGACAGGAAC-3' and reverse primer 5'-GTACTTTTTTACGGAACAAAGATGA-3'). These two PCR products shared 14 complementary nucleotides which annealed during an additional PCR to form a full length PB1 segment, i.e. MPM segment. This last PCR product was cloned in pHW2000 plasmid.

2.3. *Vaccine seed sequencing*

Thirteen H3N2 vaccine seeds were analyzed (Table 1). Viral RNAs (vRNA) were extracted directly from virus-containing allantoic fluid (150 µl) using RNA isolation kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's instructions. vRNAs were eluted in 50 µl of nuclease-

free water. A reverse-transcription step was performed with an Uni12 primer (5'-AGCGAAAGCAGG-3') and 10 µl of extracted vRNA, in a total volume of 20 µl for 5 min at 70°C, followed by 1 h at 42°C and 5 min at 65°C. Fragment of each eight viral cDNA were generated from 2 µl of cDNA using GoTaq DNA polymerase (Promega) and the following PCR cycling conditions: 2 min at 94°C, followed by 39 cycles of amplification (30 sec at 94°C, 1 min at 57 or 58°C, and 2 min at 72°C) and a final extension step of 3 min at 72°C. Primer sequences are available on request. All PCR products were verified by agarose gel electrophoresis and purified using NucleoSpin Extract II (Macherey Nagel). After purification, sequencing was performed by Eurofins MWG Operon or GATC Biotech. The sequences of the internal segments of vaccine seeds were compared with corresponding PR8 or H3N2 reference strain sequences when available in sequence database. A nucleotide blast analysis was performed using Influenza Sequence Database [12].

2.4. *Generation of reassortant viruses by reverse genetics*

293T cells were seeded in 60 mm dishes to reach 40–60% confluency the next day. A mix of 1 µg of each plasmid was incubated for 10 min with 50 µl of Superfect (Qiagen) and 300 µl of OptiMEM (Invitrogen). This mixture was added to 2.5 ml of OptiMEM and poured onto the cells which were previously washed once with OptiMEM. The cells were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 3 h. OptiMEM was replaced by OptiMEM with 0.3% BSA, after one wash with medium. At 24 h post-transfection, pancreatic bovine trypsin (Roche Applied Bioscience) was added at the final concentration of 1 µg/ml. At three days post-transfection, supernatants were harvested and centrifuged.

2.5. *PB1 segment competitions*

Three different genetic backgrounds were used in this study: HA/NA background (internal segments of PR8 with HA and NA segments of M10), HA background (internal and NA segments of PR8 with HA segment of M10) and NA background (internal and HA segments of PR8 with NA segment of M10). Several competitions between two different PB1 encoding plasmids were performed, PR8 PB1/pHW2000 and M10 PB1/pHW2000 or MPM PB1/pHW2000 and M10 PB1/pHW2000 with HA/NA, HA and NA genetic backgrounds.

At day 3 post-transfection, supernatants were collected and viruses were isolated using plaque assays. Confluent monolayers of MDCK cells were inoculated with 10-fold serial dilutions of influenza virus and incubated at 37°C with 5% CO₂. After 1 h, cells were washed with medium, overlaid with MEM containing 0.55 % of agar (BD Biosciences) and incubated at 37°C with 5% CO₂. After two days, plaque-purified isolated viruses were grown in 48-well plate containing confluent MDCK cells. Two days post-infection, viruses were harvested and the viral origin of the incorporated PB1 segment was identified as described below. All competition experiments were performed twice independently.

2.6. *Identification of PB1 segment in reassortant viruses*

The PB1 segment incorporated in the recombinant viruses obtained from competition assays was identified by the presence or not of a specific restriction site in PCR products. For M10/PR8 competition experiments, after RNA extraction (Macherey Nagel) and a RT step, a 1,144 bp fragment of PB1 segment was amplified with specific primers (forward primer 5'-CAGAAATGCTAGCAAGCATCG-3' and reverse primer 5'-TCAATGGTGGAACAGATCTTCAT-3') using 5 µl of cDNA and GoTaq DNA polymerase (Promega) with the following conditions: 2 min at 94°C and 39 cycles of amplification (30 sec at 94°C, 1 min at 58°C, and 3 min at 72°C), and 3 min at 72°C. BamHI (Euromedex)

digestion of PCR products resulted in two fragments of 889 and 255 pb for PR8 PB1 fragment, whereas M10 PCR products were not digested (no BamHI site).

To identify PB1 segment of recombinant viruses obtained with MPM PB1/pHW2000 and M10 PB1/pHW2000 competitions, PCR amplification of a 512 bp PB1 fragment using a specific set of primers (forward primer 5'-AGCGAAAGCAGGCAAACC-3' and reverse primer 5'-AGCCTTCCAGACTCATTGGC-3') in the following PCR conditions: 2 min at 94°C, followed by 39 cycles of amplification (30 sec at 94°C, 1 min at 59°C, and 1 min at 72°C), and 3 min at 72°C. MunI (Fermentas) digestion of PCR products resulted in two fragments of 227 and 285 pb for M10 PB1 fragment, whereas MPM PCR products were not digested by MunI.

2.7. *Growth kinetics of reassortant viruses*

After two amplifications on MDCK cells, reassortant viruses titers were determined in the same cells and expressed as 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀): confluent monolayers of MDCK cells in 25 cm² flasks were infected with recombinant viruses (PR8, M10, PR8:M10 6:2 and 5:3 reassortants) at a multiplicity of infection (MOI) of 0.0001. After incubation 1 h at 37°C, cells were washed with supplemented EMEM medium. Samples of supernatants (160 µl) were collected at 16, 22, 32, 40 and 50 h post-infection. The vRNA was extracted using the QIAmp viral RNA mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. vRNAs were eluted in 60 µl of the manufacturer buffer.

2.8. *Quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR)*

RT-qPCR was based on measurement of vRNA copy number of the M segment. For amplification of a fragment of the M gene segment, the following primer set was used: forward primer FluAs 5'-CTTCTAACCGAGGTCGAAACGTA-3' and reverse primer

FluAas: 5'-GGTGACAGGATTGGTCTTGTCTTTA-3' and TaqMan probe 5'-fam-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGAG-BHQ-3'. All influenza A subtypes M vRNAs were amplified using these primers. To generate the amplification control, a 574 bp fragment of the M cDNA of A/New Caledonia/20/1999 (H1N1) was cloned into pBluescript KS (+) plasmid under T7 promoter (Stratagene). RT-qPCR reactions of RNA specimens and cDNA standards were conducted in a total volume of 50 µl with Superscript III One Step quantitative RT-PCR System with Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen) and primers and probes at optimized concentrations (primers 400 nmol and probe 200 nmol) in a 96-well optical reaction plate (Applied Biosystem). Thermal cycling parameters were 15 min at 50°C, 2 min at 95°C, and 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 sec and annealing/extension at 60°C for 40 min. RT-qPCR were performed using an ABI prism® 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem).

2.9. *Nucleotide sequence accession numbers*

The nucleotide sequences obtained in this study were available from GenBank under accession numbers CY045983 to CY046060.

3. RESULTS

3.1. *Sequence analysis of vaccine seeds*

Thirteen vaccine seeds among the manufacturers seeds used between the 1996-1997 and 2007-2008 seasons were sequenced to detail their gene constellation (Table 1). Sequence of glycoproteins-encoding segments were not analyzed, since the presence of H3N2 antigens (HA and NA) in these seeds was a selection criteria. Sequences of the internal segments (PB1, PB2, PA, NP, M and NS) of vaccine seeds were compared with corresponding PR8 or H3N2

reference strain sequences whenever possible, and a nucleotide blast analysis was performed [12].

The coinfections between PR8 and the virus strains: A/Panama/2007/99, A/Wyoming/3/2003, A/Wisconsin/67/2005 and A/Brisbane/10/2007, generated two different reassortant viruses. Four vaccine seeds presented a 6:2 segment constellation (IVR108, NYMC X-147B, NYMC X-161B and IVR147 A). The nine remaining strains were a mosaic of internal PR8/H3N2 segments, ranging from one to four H3N2 segments completed by PR8 ones. No vaccine seeds, among the thirteen tested, contained more than four H3N2 internal segments. One internal segment from H3N2 virus (NP or PB1), i.e. 5:3 reassortant, was incorporated in three vaccine seeds, RESVIR9, RESVIR17A and IVR147 B. Four vaccine seeds corresponded to 4:4 reassortant viruses (Table 2). They had incorporated two H3N2 internal segments: PB1 and NP (RESVIR17B and NYMC X-147A), PB2 and NP (IVR135) or PB1 and M segments (X-157). Two vaccine seeds presented the complete polymerase complex from H3N2 (the 3:5 reassortant IVR139 and the 2:6 reassortant NYMC X-161). The H3N2 PA segment was always incorporated with both H3N2 PB2 and PB1 segment. These encoded proteins form a homologous polymerase complex.

If the majority of segments originated from PR8, internal segments of reference H3N2 viruses were also incorporated (Figure 1). Overall, 54 % of the vaccine seeds (7 out of 13) contained H3N2 PB1 segment, which was thus the most incorporated H3N2 segment. H3N2 NP segment was present in 4 out of 13 (31%) of the vaccine seeds. H3N2 PB2 and PA segments represented respectively 23% and 15% of total segments. Finally, H3N2 M and NS segments were detected once in the thirteen seeds analyzed (8%).

Aside from segments determination, reassortant viruses presented five different PR8:H3N2 gene constellations (Table 2). All internal H3N2 segments were incorporated at least once in vaccine seeds. 30 % of the tested vaccine seeds (4 out of 13) contained a 6:2 gene composition. One quarter of vaccine seeds presented a 5:3 constellation. About one-third of analyzed seeds incorporated two H3N2 internal segments, leading to 4:4 reassortants. One

seed (IVR139) presented a 3:5 constellation and one another (NYMC X-161) a 2:6 constellation.

3.2. PB1 genotyping in PB1 segment competitions in HA/NA, HA and NA genetic backgrounds

As H3N2 PB1 segment was the most representative in vaccine seeds, we pursued our analysis on its selective incorporation in viral particles. PB1 segment competition experiments between PR8 and M10 were performed in cell line. Two plasmids encoding PB1 segment, from different viral origins (M10, PR8 or MPM), were added to three different genetic backgrounds, as a mixture of seven plasmids (PB2, PA, NP, M and NS from PR8 and with different HA and NA from either PR8 or M10) (Figure 3). Each resulting segment combination was successfully rescued in preliminary reverse genetics experiments.

For PB1 segment competition between PR8 and M10 in a genetic background corresponding to expected segment composition HA/NA in vaccine seeds (PB2, PA, NP, M, and NS segments from PR8 and HA and NA derived from M10), 24% of the reassortant viruses incorporated the M10 PB1 (mean of two experiments, 20 and 22 viral clones tested). In the case of HA background defined as M10 HA segment in a PR8 genetic background, the M10 PB1 segment was never incorporated into the reassortant viruses (25 and 23 viral clones tested). For NA background (M10 NA segment in a PR8 genetic background), 72% of reassortant viruses contained M10 PB1 segment (mean of two experiments: 24 and 22 reassortant viruses analyzed).

To test whether 3' and 5' extremities containing packaging regions of PB1 segment were involved in its incorporation, a chimeric PB1 segment was constructed composed of PR8 PB1 ORF and M10 segment extremities (MPM) (Figure 2). The capacity of MPM PB1 plasmid to encode a functional PB1 protein was tested and confirmed by polymerase complex activity assay (data not shown). Competition experiments between MPM and M10 PB1 were

performed in the HA/NA, HA and NA genetic backgrounds (Figure 3). Respectively 21% (19 and 20 reassortant viruses tested) and 20% (15 and 31 viruses) of the reassortant viruses produced with HA/NA and NA genetic backgrounds incorporated the M10 PB1 segment. In HA genetic background, MPM PB1 segment was found in all tested reassortant viruses (20 and 22). Competition assays between PR8 and MPM PB1 segments led to 76 % of PR8 PB1 segment in reassortant viruses (data not shown).

3.3. *Kinetic Growth of reassortant viruses*

To assess the replicative capacity of a PR8:H3N2 virus presenting a 6:2 segment constellation virus containing a H3N2 PB1 segment, four viruses were produced by plasmid-based reverse genetics: M10, PR8, and two reassortant viruses, containing either M10 or PR8 PB1 segment in a PR8:M10 6:2 constellation (5:3 and 6:2 reassortant respectively). Their viral titers and growth performances were compared by infection at MOI of 0.0001 in MDCK cells. Figure 4 shows the growth profiles of the four reassortant viruses. At 40 h post-infection, the plateau was reached. The four viruses showed the same pattern of replication. However, between 22 and 35 h post-infection, a subtle discrepancy was observed between parental, i.e. M10 and PR8, and reassortant strains. Parental strains presented higher titers (> 0.5 log) than those of reassortant viruses. Within each group, the differences did not exceed 0.5 log.

4. DISCUSSION

Reassortment events in influenza viruses occur in a non random way [13] based on putative segments associations during packaging [14] and functional cooperation of proteins [15]. Influenza vaccines seeds produced by coinfection are selected upon two criteria: high yields and presence of reference virus antigens, but internal genetic composition was never determined. In this study, we sequenced thirteen H3N2 vaccine seeds to define their genetic

composition. Incorporation of H3N2 internal segment(s) in vaccine seeds was never mentioned before in spite of works based on reassortment events between PR8 and H3N2 viruses [13] [16]. Numerous studies considered that influenza vaccine seeds corresponded to 6:2 reassortants, i.e. PR8 genetic background completed with reference strain glycoproteins-encoding segments [5, 17-19]. We demonstrate here that two thirds of vaccine seeds contained a mosaic of internal segments from the two viral origins, PR8 and H3N2 reference strain. Internal H3N2 segments were not incorporated with the same rate even if all of them have been packaged at least once. H3N2 M segment was encountered only once in analyzed vaccine seeds, despite the association of M proteins with others viral constituents [20] [21] [15] and compatibility degree described between HA and M segments [22]. However, our results are in agreement with the study of Lubeck *et al* showing a preferential incorporation of PR8 M segment in high yields reassortant viruses from coinfection experiments between PR8 and H3N2 viruses in cell line [13]. Interestingly, H3N2 PA segment was incorporated only in association with H3N2 PB2 and PB1 segments suggesting a role of PA in the polymerase complex stability [23] [24] or in nuclear transport of the polymerase subunits [25].

PB1 segment is the most representative H3N2 segment incorporated in analyzed vaccine seeds. Eventually, the vaccine seeds production on eggs would be replaced by plasmid-based reverse genetics on cell line. To this end, we investigated the selective incorporation of H3N2 PB1 segment in MDCK cell line. PB1 protein corresponds to the catalytic polymerase subunit [26] and is involved in genome transcription/replication, in association with PB2 [27], PA [28] and NP [29]. PB1 segment reassorts more frequently than the others internal segments [30]. Phylogenetic studies reported that 1957, 1968 and 2009 pandemic viruses have incorporated a heterologous PB1 segment [31-32]. Addition of exogenous PB1 segment, more particularly from an avian origin, has been shown to increase replication yields [33], polymerase activity [23] [34] or virulence [24]. Moreover, higher replication of PR8:H5N2 5:3 reassortant (with avian HA, NA and PB1 segments) than 6:2 constellation was described [33].

In this study, we performed competition assays by plasmid-based reverse genetic to measure selective incorporation of H3N2 PB1 segment in cell. Regarding 5:3 reassortments containing H3N2 HA, NA and PB1 segments in vaccine seeds and competition assays, the rate of H3N2 PB1 segment incorporation is same magnitude order. Our results suggest that production system might not be the driving force for PB1 segment incorporation.

As no M10 PB1 segment was incorporated in reassortant viruses with HA background and three quarters with NA background, it suggests a linkage between PB1 and NA homologous segments during packaging step (PR8 PB1-NA and M10 PB1-NA segment interactions). Our study suggests other putative segment interactions such as M10 HA and PR8 PB1 segment interaction in HA/NA background competitions. In this latter case, despite the presence of the M10 NA segment, we observed the selective incorporation of PR8 PB1 segment maybe due to its interaction with M10 HA segment. Such connexions between segments during packaging have already been reported by Marsh *et al.* and Muramoto *et al.* for A/WSN/33 (H1N1) and PR8 viruses [14, 35]. Interestingly, the use of chimera PB1 segment reveals other regions involved in packaging mechanism than those described previously [36].

In this study, we show that genetic content of vaccine seeds is a mosaic of parental strains. This observation highlights the importance of determination of optimal genetic composition in the case of production of vaccine seed by plasmid-based reverse genetics. Packaging process involves complex molecular mechanisms at RNA or protein(s) levels which can be directed by viral sub-type or replicative support. Finally, the biological relevance of the presence of H3N2 PB1 segment in vaccine seeds as well as in the novel 2009 H1N1 pandemic influenza virus needs to be further explored.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge Dr Stephanie Corjon and Pr Pierre Boulanger for a critical reading of the manuscript and for their helpful discussions. Thanks are due to Sylvaine Faure for technical resources.

6. REFERENCES

- [1] Wright PF, Neumann G., Kawaoka Y. Orthomyxoviruses, 5 th ed: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- [2] Ritchey MB, Palese P, Kilbourne ED. RNAs of influenza A, B, and C viruses. J Virol 1976 May;18(2):738-44.
- [3] Smith GJD, Bahl J, Vijaykrishna D, Zhang J, Poon LLM, Chen H, et al. Dating the emergence of pandemic influenza viruses. Proc Natl Acad Sci U S A 2009 Jul;106(28):11709-12.
- [4] Webster RG BW. Textbook of influenza. In: Nicholson Kg WRGHAI, editor.: Oxford: Blackwell Science, 1998: 109-19.
- [5] Gerdil C. The annual production cycle for influenza vaccine. Vaccine 2003 May;21(16):1776-9.
- [6] Nicolson C, Major D, Wood JM, Robertson JS. Generation of influenza vaccine viruses on Vero cells by reverse genetics: an H5N1 candidate vaccine strain produced under a quality system. Vaccine 2005 Apr;23(22):2943-52.
- [7] Liu J, Shi X, Schwartz R, Kemble G. Use of MDCK cells for production of live attenuated influenza vaccine. Vaccine 2009 Jun.
- [8] Koudstaal W, Hartgroves L, Havenga M, Legastelois I, Ophorst C, Sieuwerts M, et al. Suitability of PER.C6 cells to generate epidemic and pandemic influenza vaccine strains by reverse genetics. Vaccine 2009 Apr;27(19):2588-93.

- [9] Neumann G, Kawaoka Y. Reverse genetics systems for the generation of segmented negative-sense RNA viruses entirely from cloned cDNA. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004;283:43-60.
- [10] Subbarao K, Katz JM. Influenza vaccines generated by reverse genetics. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004;283:313-42.
- [11] Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 May;97(11):6108-13.
- [12] Macken C, Lu H, Goodman J, Boykin L. Options for the Control of Influenza IV. In: Osterhaus NC, Hampson AW, editors.: Amsterdam: Elsevier Science, 2001: 103-6.
- [13] Lubeck MD, Palese P, Schulman JL. Nonrandom association of parental genes in influenza A virus recombinants. *Virology* 1979 May;95(1):269-74.
- [14] Marsh GA, Rabadan R, Levine AJ, Palese P. Highly conserved regions of influenza A virus polymerase gene segments are critical for efficient viral RNA packaging. *J Virol* 2008 Mar;82(5):2295-304.
- [15] Ito T, Kawaoka Y, Ohira M, Takakuwa H, Yasuda J, Kida H, et al. Replacement of internal protein genes, with the exception of the matrix, in equine 1 viruses by equine 2 influenza virus genes during evolution in nature. *J Vet Med Sci* 1999 Aug;61(8):987-9.
- [16] Voeten JT, Brands R, Palache AM, van Scharrenburg GJ, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, et al. Characterization of high-growth reassortant influenza A viruses generated in MDCK cells cultured in serum-free medium. *Vaccine* 1999 Apr 9;17(15-16):1942-50.
- [17] Neumann G, Fujii K, Kino Y, Kawaoka Y. An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Nov 15;102(46):16825-9.
- [18] Subbarao K, Joseph T. Scientific barriers to developing vaccines against avian influenza viruses. *Nat Rev Immunol* 2007 Apr;7(4):267-78.

- [19] Wood JS, Robertson JS. Reference viruses for seasonal and pandemic influenza vaccine preparation. *Influenza Other Respi Viruses* 2007 Jan;1(1):5-9.
- [20] Ali A, Avalos RT, Ponimaskin E, Nayak DP. Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J Virol* 2000 Sep;74(18):8709-19.
- [21] Enami M, Enami K. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins stimulate the membrane association of the matrix protein. *J Virol* 1996 Oct;70(10):6653-7.
- [22] Scholtissek C, Stech J, Krauss S, Webster RG. Cooperation between the hemagglutinin of avian viruses and the matrix protein of human influenza A viruses. *J Virol* 2002 Feb;76(4):1781-6.
- [23] Li OTW, Chan MCW, Leung CSW, Chan RWY, Guan Y, Nicholls JM, et al. Full factorial analysis of Mammalian and avian influenza polymerase subunits suggests a role of an efficient polymerase for virus adaptation. *PLoS ONE* 2009;4(5):e5658.
- [24] Li C, Hatta M, Watanabe S, Neumann G, Kawaoka Y. Compatibility among polymerase subunit proteins is a restricting factor in reassortment between equine H7N7 and human H3N2 influenza viruses. *J Virol* 2008 Dec;82(23):11880-8.
- [25] Fodor E, Smith M. The PA subunit is required for efficient nuclear accumulation of the PB1 subunit of the influenza A virus RNA polymerase complex. *J Virol* 2004 Sep;78(17):9144-53.
- [26] Obayashi E, Yoshida H, Kawai F, Shibayama N, Kawaguchi A, Nagata K, et al. The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature* 2008 Aug;454(7208):1127-31.
- [27] Sugiyama K, Obayashi E, Kawaguchi A, Suzuki Y, Tame JRH, Nagata K, et al. Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA polymerase. *EMBO J* 2009 Jun;28(12):1803-11.

- [28] Guu TSY, Dong L, Wittung-Stafshede P, Tao YJ. Mapping the domain structure of the influenza A virus polymerase acidic protein (PA) and its interaction with the basic protein 1 (PB1) subunit. *Virology* 2008 Sep;379(1):135-42.
- [29] Biswas SK, Boutz PL, Nayak DP. Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J Virol* 1998 Jul;72(7):5493-501.
- [30] Khiabani H TV, Rabadan R. Inter-Host Reassortment Patterns in Swine Influenza Viruses. 2009.
- [31] Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* 1989 Nov;63(11):4603-8.
- [32] Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 2009 Jun 25;459(7250):1122-5.
- [33] Rudneva IA, Timofeeva TA, Shilov AA, Kochergin-Nikitsky KS, Varich NL, Ilyushina NA, et al. Effect of gene constellation and postreassortment amino acid change on the phenotypic features of H5 influenza virus reassortants. *Arch Virol* 2007;152(6):1139-45.
- [34] Naffakh N, Massin P, Escriou N, Crescenzo-Chaigne B, van der Werf S. Genetic analysis of the compatibility between polymerase proteins from human and avian strains of influenza A viruses. *J Gen Virol* 2000 May;81(Pt 5):1283-91.
- [35] Muramoto Y, Takada A, Fujii K, Noda T, Iwatsuki-Horimoto K, Watanabe S, et al. Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J Virol* 2006 Mar;80(5):2318-25.
- [36] Liang Y, Huang T, Ly H, Parslow TG. Mutational analyses of packaging signals in influenza virus PA, PB1, and PB2 genomic RNA segments. *J Virol* 2008 Jan;82(1):229-36.

Table 1

Reference strain	A/Nanchang /933/95	A/Sydney/5 / 97	A/Panama/ 2007/99		A/Kumamoto /102/2002	A/Wyoming/3/200 3		A/New York/55/2004	A/Wellington /1/2004	A/Wisconsin/67/2 005		A/Brisbane/ 10/2007	
Reassortant name	RESVIR9	IVR108	RESVIR 17A	RESVIR 17B	IVR 135	NYMC X-147A	NYMC X-147B	NYMC X-157	IVR 139	NYMC X-161B	NYMC X-161	IVR147 A	IVR147 B
Batch		22 99	A02 00	07 2000	11/2003	ZK 260104-1	10 20 03	11 04	22 20 04	10 04	24 05	E2E8	A04/07
PB2	PR8	PR8	PR8	PR8	H3	PR8	PR8	PR8	H3	PR8	H3	PR8	PR8
PB1	PR8	PR8	H3	H3	PR8	H3	PR8	H3	H3	PR8	H3	PR8	H3
PA	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	H3	PR8	H3	PR8	PR8
HA													
NP	H3	PR8	PR8	H3	H3	H3	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8
NA													
M	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	H3	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8
NS	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	PR8	H3	PR8	PR8
Segment constellation PR8:H3N2	5:3	6:2	5:3	4:4	4:4	4:4	4:4	6:2	4:4	3:5	6:2	2:6	6:2 5:3

Table 2

Segment constellation PR8:H3N2	6:2	5:3	4:4	3:5	2:6
Number of vaccine seeds	4	3	4	1	1

LEGENDS TO FIGURES AND TABLES

Table 1.

Gene constellation in vaccine seeds. Viral RNAs of thirteen H3N2-based vaccine seeds were isolated directly from virus-containing allantoic fluid. After a RT step, specific segment PCRs were performed. All PCR products were purified and sequenced to determine the viral signature, i.e. PR8 or reference H3N2 strains. While vaccine seeds selection is based on the presence of reference strains antigens, i.e. HA and NA, analysis of the two glycoprotein-encoding segments was not performed.

Table 2.

Distribution of vaccine seeds depending on their genetic composition.

Figure 1.

Distribution of each segment depending on their viral origin PR8 or H3N2 reference strain in the thirteen analyzed vaccine seeds.

Figure 2.

Construction of MPM PB1 plasmid (A) driving the expression of MPM PB1 segment (B)

A. Construction of MPM PB1 segment. A site directed mutagenesis (★) had been performed on PB1-PR8/pHW2000 (in white) to obtain 5' M10 PB1 extremity. Two PCR experiments had been performed, one leading to the amplification of the 3' extremity 118 nucleotides of M10 PB1 (in grey), the second leading to amplification of 2223 nucleotides of the 5'

extremity of mutated PR8 PB1. These two PCR products shared 14 nucleotides to reconstruct full-length PB1 during a third round of PCR.

B. Schematic representation of MPM PB1 segment.

Grey regions symbolize M10 PB1 extremities, while white regions represented PR8 PB1 internal region. Black regions corresponded to conserved sequences (Uni12, Uni13, initiation and termination codons).

Figure 3.

M10/PR8 and M10/MPM PB1 competition assays with different genetic backgrounds. A plasmid containing PR8 PB1 ORF flanked by M10 PB1 extremities was constructed. Plasmid-based reverse genetics experiments with nine plasmids (seven corresponding to the desired genetic background added to M10 PB1 and PR8 or MPM segments) were performed and viral reassortants were plaque purified. The incorporated PB1 segment in reassortant viruses was discriminated by enzymatic digestion on RT-PCR products.

Figure 4.

Growth kinetics of recombinant viruses in MDCK cell line. MDCK cells were infected with recombinant virus produced by plasmid-based reverse genetics (PR8 (■), M10 (▲), PR8:M10 6:2 reassortant (□) and 5:3 reassortant (○)) at a MOI of 0.0001. At 16, 22, 32, 40 and 50 h post-infection, 150 µl of supernatant were collected and vRNAs were extracted. Viral titres were determined by RT-qPCR.

Figure 1

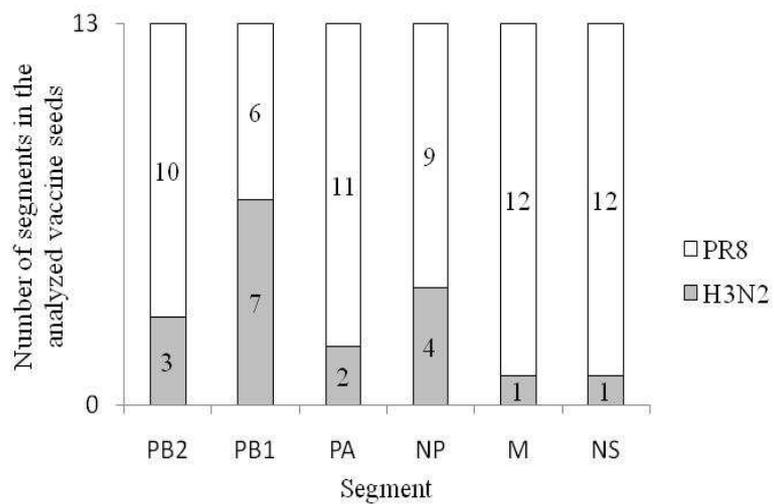


Figure 2.

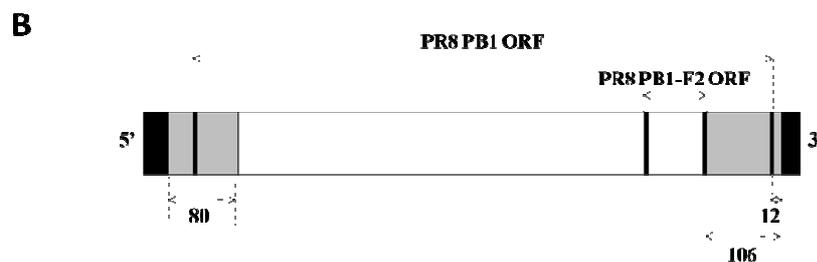
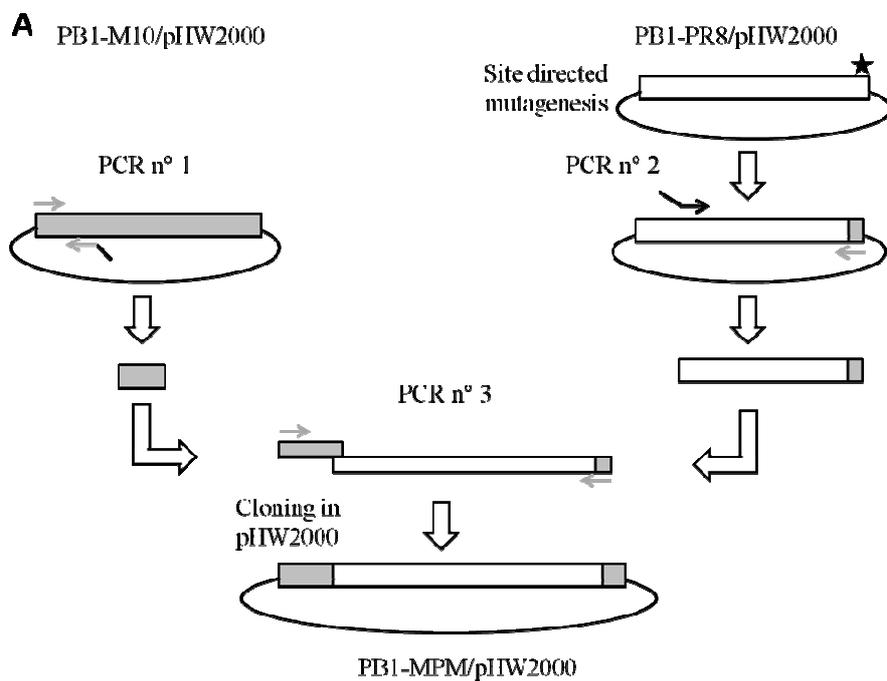


Figure 3

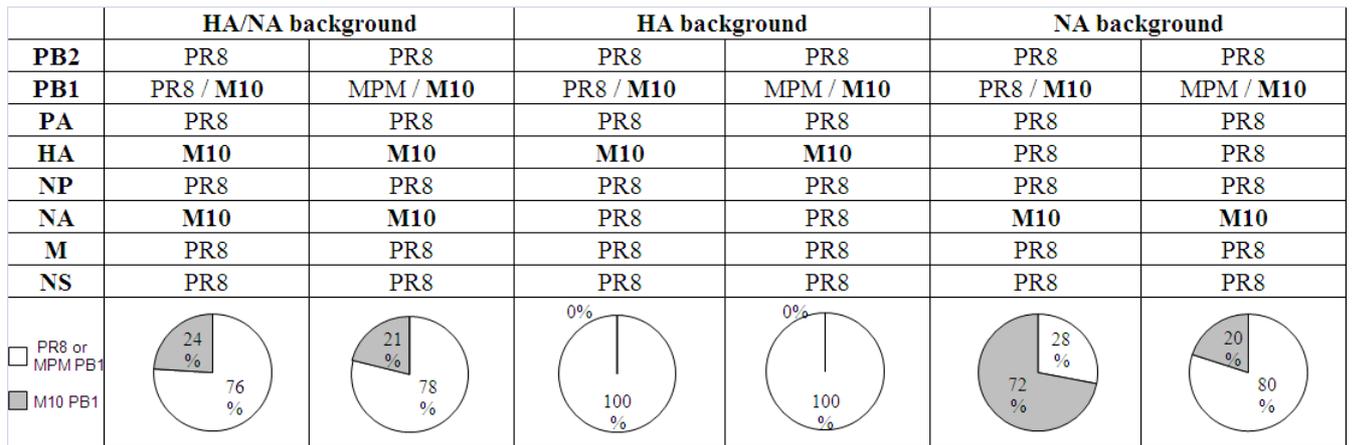
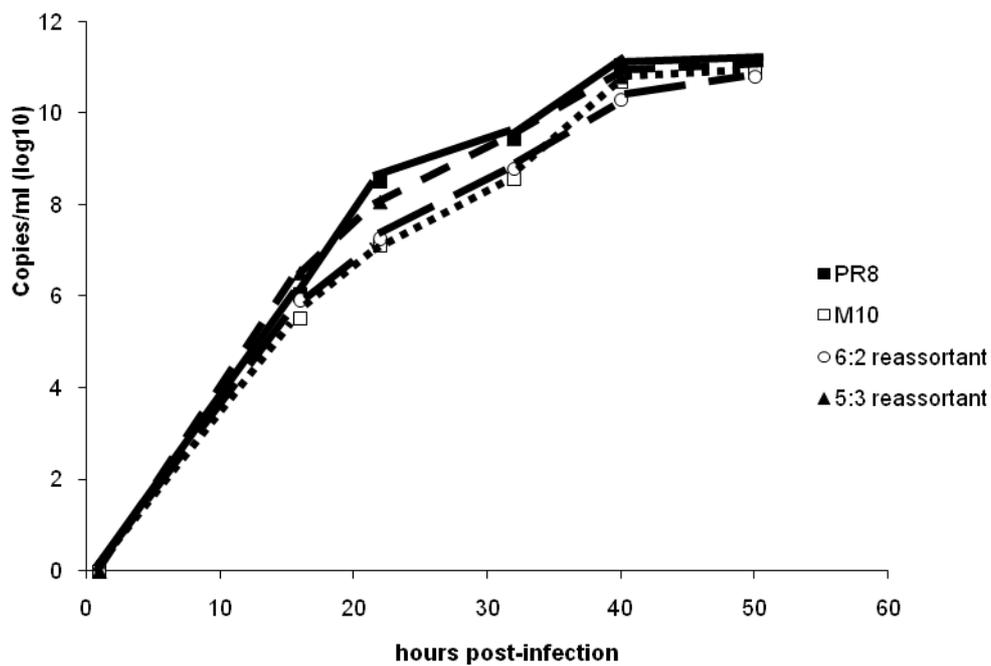


Figure 4.



Etude des semences vaccinales

- Discussion -

L'apparition de virus réassortants lors d'une coinfection d'une cellule avec deux virus influenza de type A n'est pas aléatoire (129). Elle est basée sur des interactions sélectives entre segments au cours de l'incorporation des RNPv (135) et ensuite sur des compatibilités protéiques (104, 202), pour une survie et une dissémination du virus réassortant. Une étude a été menée sur treize souches dérivées de souches de sous-type H3N2, afin de déterminer leur composition génomique. Il a ainsi été montré que les souches vaccinales ne sont pas composées uniquement des segments internes du virus accepteur PR8 et des segments codant pour les glycoprotéines des souches de référence. Elles correspondent pour la plupart à des réassortiments plus complexes. En effet, les deux tiers de ces souches possèdent un ou plusieurs segments de gène internes de la souche de référence donneuse. Bien que tous les segments internes d'origine A(H3N2) ne soient pas incorporés de manière identique, tous ont pu être retrouvés dans au moins une souche vaccinale. Les segments internes d'origine A(H3N2) les moins incorporés dans les souches testées sont les segments M et NS, tandis que le segment PB1 est présent dans plus de la moitié des souches testées. Il est également intéressant de remarquer que des virus issus d'une même coinfection ne comportent pas le même ensemble de segments de gène.

Le fait que le segment M d'origine A(H3N2) ne soit rencontré que dans une souche vaccinale sur les treize testées est surprenant bien que le phénotype à fort pouvoir répliatif ait été associé dans beaucoup de travaux à la présence du segment M d'une souche possédant elle-même un fort pouvoir répliatif (129, 229, 251-252). Une association entre la protéine HA et les deux protéines issues du segment M a été avancée (5, 53, 104). Les protéines HA et NA recrutent la protéine M1 au niveau des radeaux lipidiques, notamment par les domaines cytoplasmiques des deux glycoprotéines (31, 241). L'étude phylogénétique des virus influenza équin a mis en évidence un lien entre les segments codant pour les glycoprotéines et le segment M (104). Tous les segments internes à l'exception du segment M des virus équin A(H7N7) ont été remplacés progressivement par ceux de virus équin A(H3N8). C. Scholtissek et ses collaborateurs ont montré différents degrés de compatibilité entre les segments M et HA en fonction des hôtes des virus. Un segment HA aviaire en association avec un segment M humain permet la production de particules infectieuses, tandis que l'association inverse n'est pas viable (202). Il semblerait dans notre cas que la présence du segment M d'un virus A(H3N2) en association avec les segments codant pour les glycoprotéines de surface homologues ne soit pas nécessaire à l'établissement d'un phénotype à fort pouvoir répliatif. Ceci peut s'expliquer par la proximité des segments M étudiés au cours de ce travail. Une étude récente montre l'évolution du segment M des virus influenza de type A en fonction de différents paramètres tels que l'hôte, le sous-type, l'année

d'isolement... Il apparaît que les segments M des virus A(H1N1) et A(H3N2) sont très proches phylogénétiquement. Les segments M humains sont éloignés des segments aviaires (70).

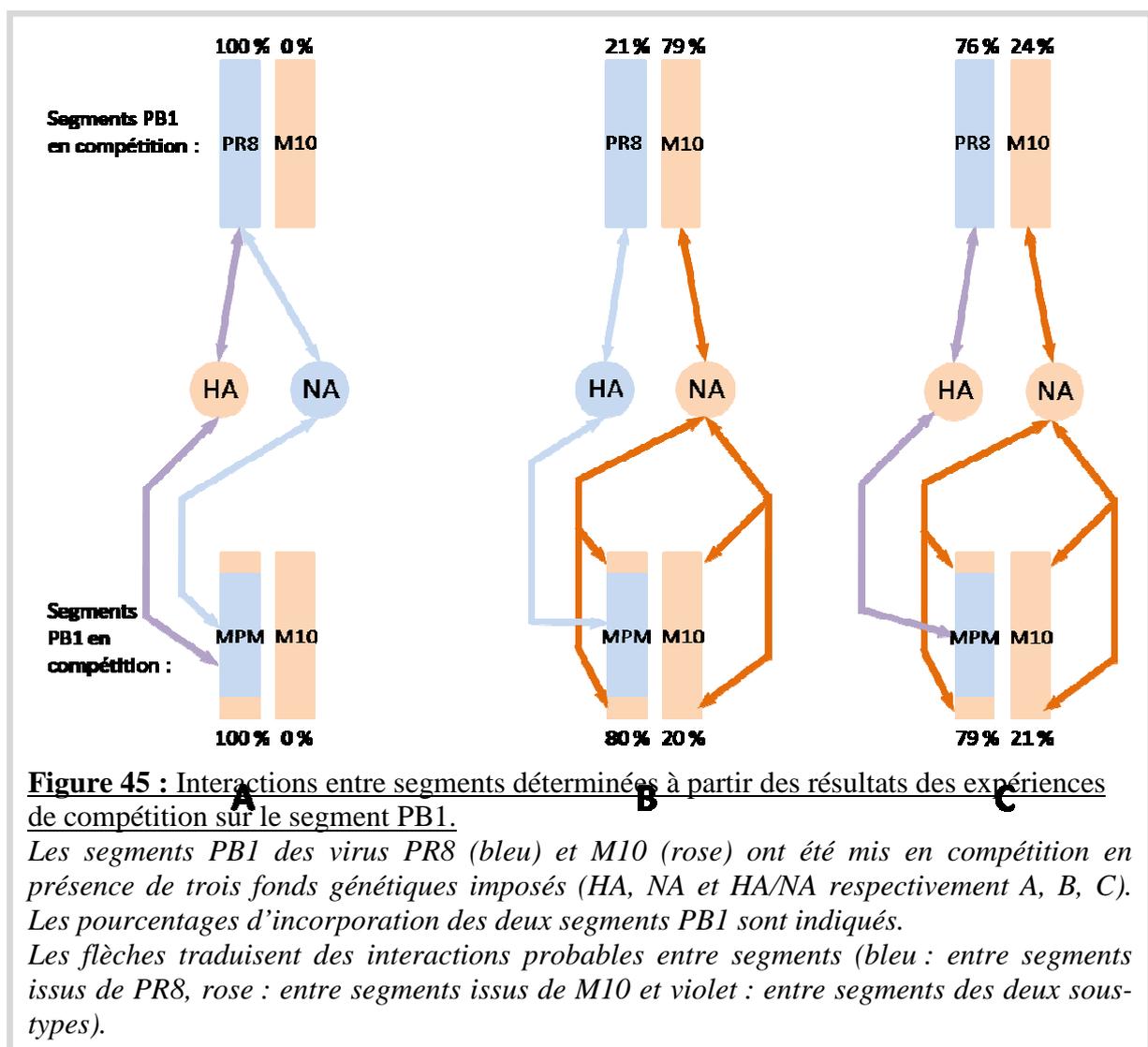
Au cours de l'analyse des séquençages des segments des semences vaccinales, une seule interaction entre segments a pu être mise en évidence. Le segment PA de la souche de référence A(H3N2) n'est retrouvé dans les semences vaccinales qu'en présence des segments codant pour les deux autres sous unités du complexe polymérase viral, les protéines PB1 et PB2. Les segments PB1 et PB2 d'origine A(H3N2) peuvent être incorporés indépendamment des segments codant pour les deux autres sous-unités du complexe polymérase. L'origine différente d'une protéine PA en association avec les deux sous unités ne semble donc pas conduire à un réassortant possédant un fort pouvoir répliatif, pouvant être dus à un défaut de stabilité au niveau du complexe polymérase viral (122-123) ou encore à un mauvais transport nucléaire des protéines synthétisées dans la cellule hôte (63). L'incapacité d'un segment PA hétérologue aux deux autres sous-unités du complexe polymérase viral a été démontrée dans différentes études. C. Li et ses collaborateurs ont montré que la protéine PA devait avoir la même origine que les segments codant pour les deux autres sous unités du complexe polymérase pour maintenir l'activité de ce complexe (122). De même, au cours d'une autre étude, 75 % des réassortants produits entre des virus de sous-type H5N1 et H3N2 possèdent un segment PA de même origine virale par rapport à PB1 et PB2 (123). D'un point de vue antigénique, les protéines PB1 et PB2, du fait de leur rôle capital dans la réplication présentent une dérive génétique plus lente que la protéine PA (81). Les protéines PA et NP évoluent en fonction du type d'hôtes (81).

Le segment interne d'origine H3N2 le plus incorporé dans les semences vaccinales étudiées est le segment PB1, présent dans plus de la moitié des semences vaccinales analysées. La capacité de réassortiment du segment PB1 a été montrée par H. Khiabani et ses collaborateurs. En analysant les segments de 142 souches de virus influenza porcins, ils ont pu mettre en évidence que le segment PB1 était plus fréquemment échangé que les autres segments internes (112). De plus, lors des deux dernières pandémies du XX^{ème} siècle, le segment PB1 d'origine aviaire était présent sur un fond humain, en association avec au minimum un des segments codant pour les glycoprotéines de surface aviaires (110). L'incorporation d'un segment PB1 exogène, notamment d'origine aviaire, induit dans de nombreuses études une augmentation de la réplication virale (193), de l'activité de la polymérase virale (123, 157), de la capacité d'adaptation (123) ou encore de la virulence (122, 144). Récemment, un travail portant sur les semences vaccinales issues d'un réassortiment entre PR8 et la souche pandémique A/California/7/2009 (H1N1) montre l'augmentation de la

réplication d'un réassortant 5:3 comportant le segment PB1 de la souche pandémique par rapport au réassortant 6:2 (234). Le segment PB1 de la souche pandémique de 2009 correspond à un segment d'origine A(H3N2) humain. Cependant, dans notre étude, aucune amélioration du taux de réplication sur cellules MDCK n'a été observé pour le réassortant PR8:M10 5:3, par rapport au virus 6:2.

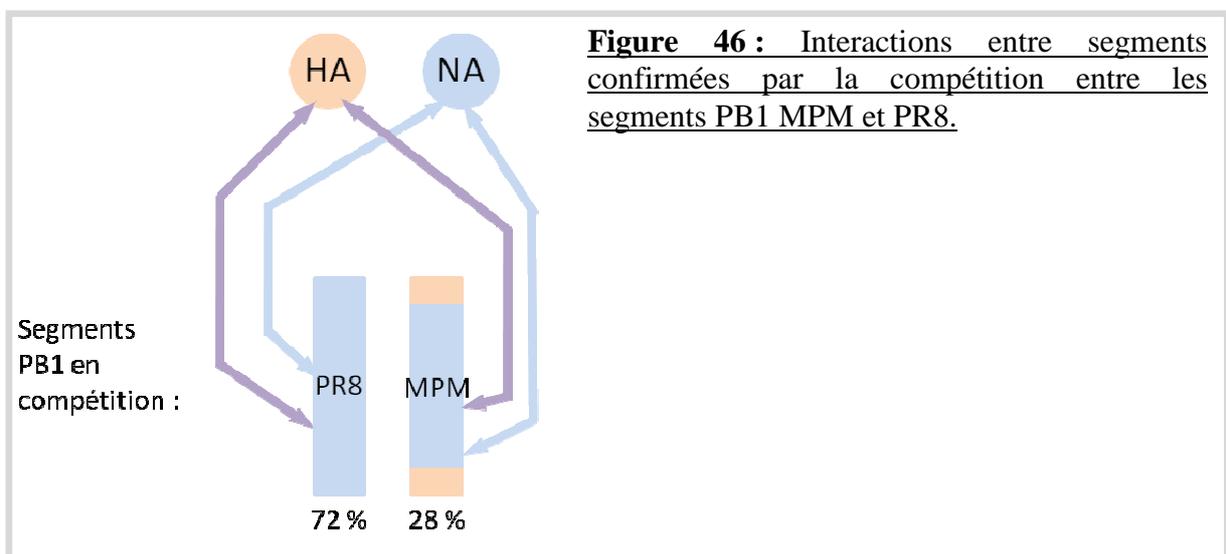
Du fait de la proximité des résultats entre les expériences de compétition menées sur cellules MDCK et les analyses des séquences des semences vaccinales produites sur œufs, le support de coinfection ne semble pas être déterminant dans l'incorporation sélective du segment PB1 du virus M10, ce qui n'est pas le cas du fond génétique utilisé.

Les résultats de nos expériences de compétition ont permis de mettre en évidence des interactions probables entre segments, favorisant ainsi l'incorporation d'un segment PB1 par rapport à l'autre. En effet, le fait qu'aucun des réassortants testés ne comportent le segment PB1 du virus M10 en présence du fond génétique HA tandis que les trois quarts l'ont incorporé lorsque le fond génétique NA est imposé semble conforter l'hypothèse d'une interaction entre les segments NA et PB1, quel que soit le virus considéré (**Figure 45**).



Une interaction entre les segments HA des deux virus et le segment PB1 de PR8 est envisagée.

La construction du segment PB1 chimère comprenant l'ORF de la protéine PB1 de PR8 encadré par les extrémités du segment PB1 de M10 a permis de cartographier de manière plus précise les interactions supposées précédemment déterminées. En effet, les résultats des compétitions permettent de positionner les régions d'interactions : extrémités du segment modifiées (segments NA et PB1 de M10) ou région codante non mutée (segments HA et PB1). D'autres régions que les seules extrémités des segments sont donc nécessaires à leur empaquetage. Ces résultats ont été confirmés par la compétition entre les segments PB1 MPM et de PR8 avec le fond génétique HA, les deux segments PB1 ayant pu être incorporés dans les particules (**Figure 46**).



Construction d'un vecteur viral

- Résultats -

Bien que les virus influenza soient des virus à ARN négatifs, de nombreux travaux ont mis en avant la possibilité de les utiliser afin de construire des vecteurs viraux avant la mise en place de la technique de génétique inverse. En 1989, W. Luytjes et ses collaborateurs remplacent le segment NS du virus PR8 par le gène *cat* encadré par les extrémités non codantes du segment NS (132). Les mécanismes d'incorporation ne sont pas franchement évoqués, les régions non traduites, essentielles pour les processus de transcription/réplication ainsi que pour la formation des RNPv doivent être conservées (132). Ainsi, en 1994, N. Percy et ses collaborateurs écrivent : “*Foreign sequences might be permanently expressed in an influenza virus genome if they were incorporated as a part of a viral segment*”. Historiquement, deux segments ont servi de vecteurs chez les virus influenza de type A : les segments NS et NA.

Suite à la découverte que les virus influenza de type A pouvaient se répliquer sans leur protéine NS1 (virus d'étude : PR8) dans des systèmes cellulaires déficients en interférons (76), le gène *ns1* a été remplacé par celui de la *gfp* (114), puis par celui permettant la synthèse d'une interleukine 2, avec succès (113).

La protéine NA des virus influenza de type A possède des délétions drastiques lorsque ces virus sont propagés sur des cellules possédant moins d'acides sialiques (101). Cette protéine, dans le cas du virus A/WSN/33 (H1N1), n'est pas obligatoire pour initier plusieurs cycles d'infection (205). Plus récemment, le gène *ha* de virus tels que A/WSN/33 ou PR8 a été remplacé par le gène codant pour une protéine possédant les fonctions d'hémagglutinine et de neuraminidase (la glycoprotéine du vesicular stomatitis virus (238), ou la glycoprotéine *hemagglutinin, esterase, and fusion* (HEF) des virus influenza de type C (72)). La fonction de la protéine NA étant portée par une autre protéine, elle devient accessoire et son gène peut donc être un autre (codant pour une protéine GFP par exemple...). Cependant, à l'heure actuelle, les virus ayant servi de base pour ces constructions de vecteurs viraux étaient des virus dits de laboratoire, A/WSN/33 ou PR8.

Au cours de l'hiver 2003-2004, le centre national de référence Influenza France Sud a isolé des virus ne possédant pas, à l'état naturel, de segment NA. Nous avons alors en main les outils pour construire un virus influenza vecteur basé sur un virus circulant. Nous nous sommes appuyés sur les travaux antérieurs, bien qu'effectués sur des souches de laboratoire.

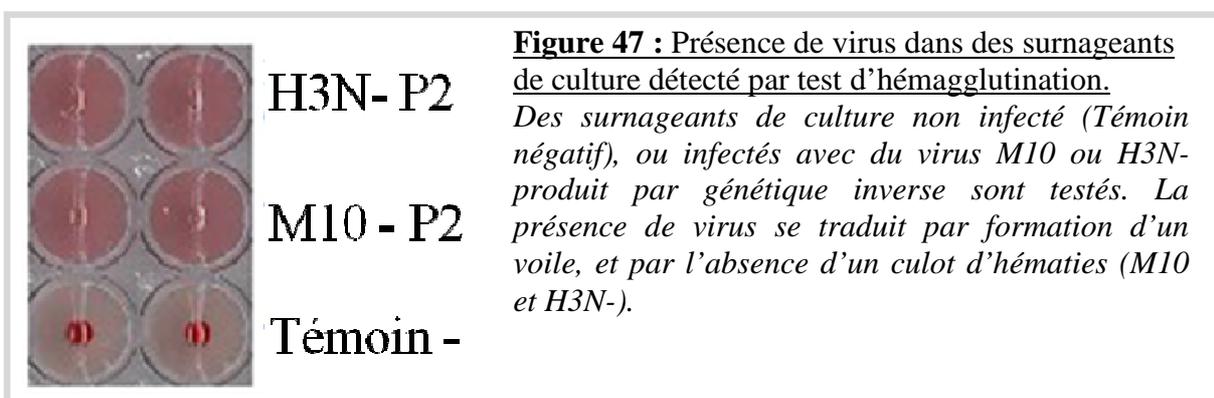
Différentes constructions sur la base du segment NA du virus A/Moscow/10/99 (H3N2) ont été réalisées, afin de valider l'incorporation du segment, ou d'exprimer un transgène, *gfp*, *cat* ou *luc*.

Production de virus H3N- par génétique inverse.

Chaque plasmide permettant la production par génétique inverse du virus H3N- a été testé de manière indépendante sur le fond génétique de M10. Après validation, les sept plasmides codant pour l'ensemble du génome de H3N- ont été utilisés afin de produire le virus H3N-. 48 heures post-transfection, le surnageant est récolté et les virus produits sont amplifiés sur cellules MDCK. A 40 heures post-infection, des effets cytopathiques (ECP) sont observés. 5 jours post-infection, le surnageant est récolté et une nouvelle amplification sur cellules MDCK est réalisée. La présence de virus dans le deuxième passage est évaluée par différentes méthodes : test d'hémagglutination, visualisation des ECP, PCR dirigée contre le segment NS et NA et immunofluorescence.

Lors du test d'hémagglutination, un voile est observé pour les surnageants correspondant à des cellules infectées par le virus M10 et par le virus H3N-. Un culot d'hématies est visible pour le témoin négatif (**Figure 47**).

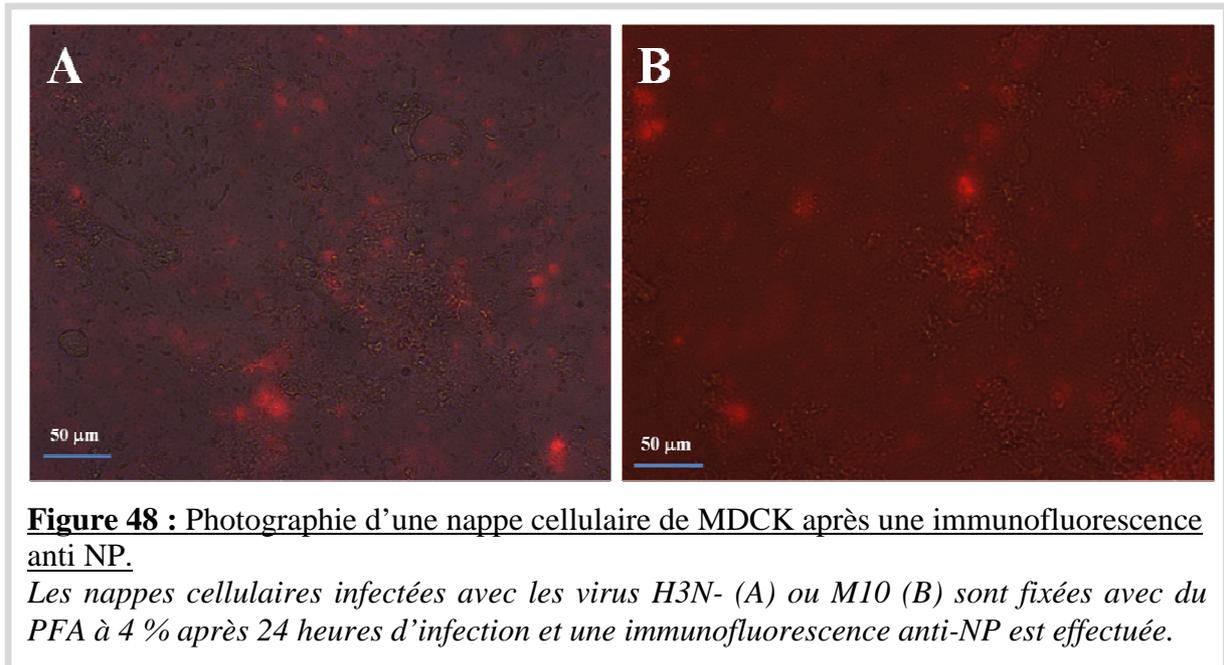
L'apparition d'ECP est visualisée au microscope. Les cellules sont observées à différents temps post-infection afin de suivre l'évolution de l'infection (**Figure 50**). Le virus H3N- présente une cinétique de réplication plus lente qu'un virus H3N2 de type M10.



La présence du segment NS, marqueur moléculaire de l'infection, et l'absence de segment NA sont mises en évidence par PCR, après une étape de RT non spécifique. L'absence d'amplification des segments à partir de l'ARN confirme l'absence de plasmides, ou une quantité insuffisante pour une amplification. De plus, un test d'activité neuraminidase a été effectué sur le surnageant de virus H3N-, confirmant l'absence de protéine NA fonctionnelle (**Figure 50**).

La présence de protéines NP, bon marqueur de l'infection, est validée par immunofluorescence sur des cellules MDCK, 24 heures post-infection. Les cellules non

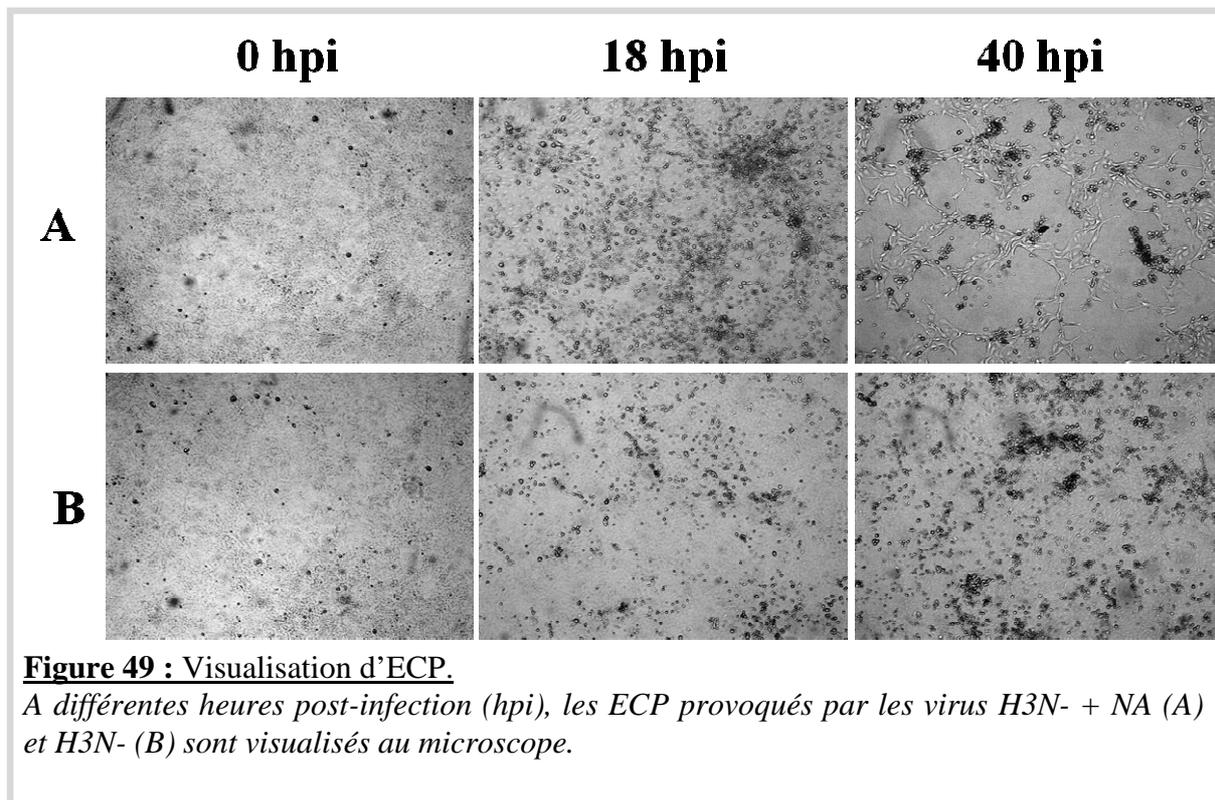
infectées ne présentent aucune fluorescence, à l'inverse des cellules infectées par le virus H3N- ou par le virus M10 (**Figure 48**).



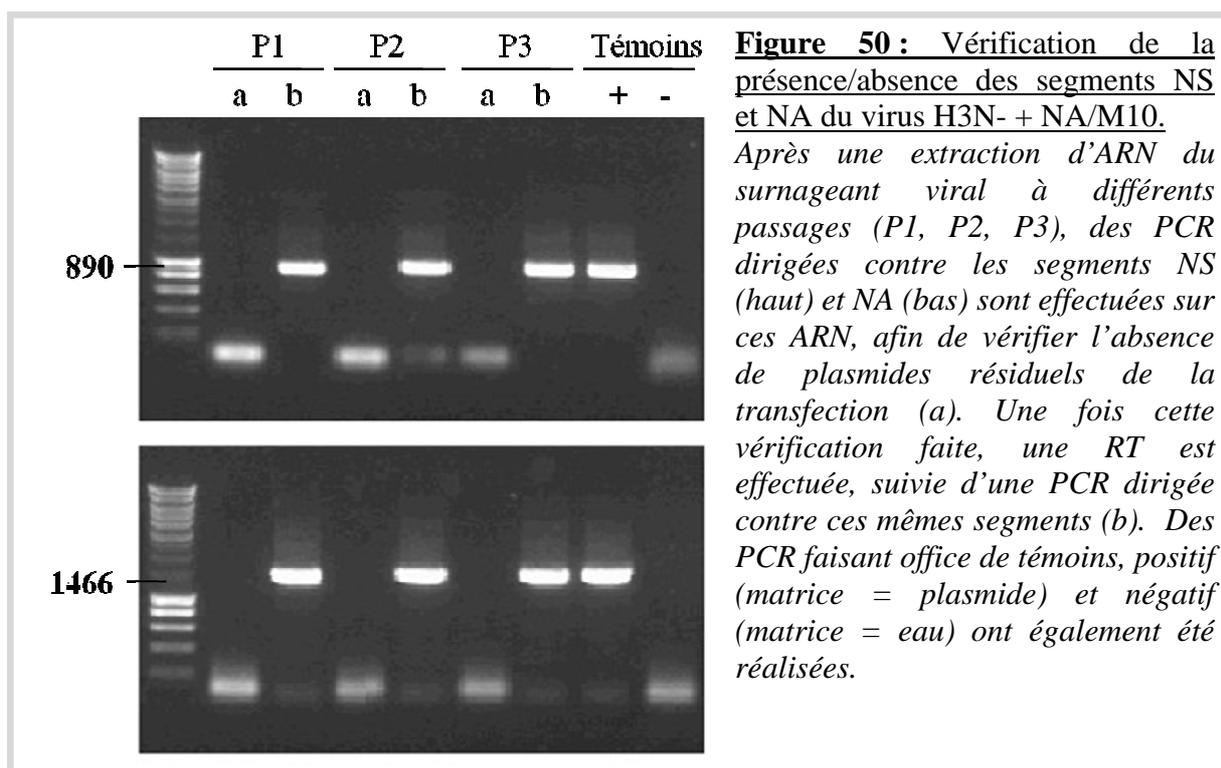
Le virus H3N-, isolé de patient, a pu être produit dans les conditions de laboratoire à partir de sept plasmides.

Caractérisation de virus H3N- comportant un segment N2 fonctionnelle.

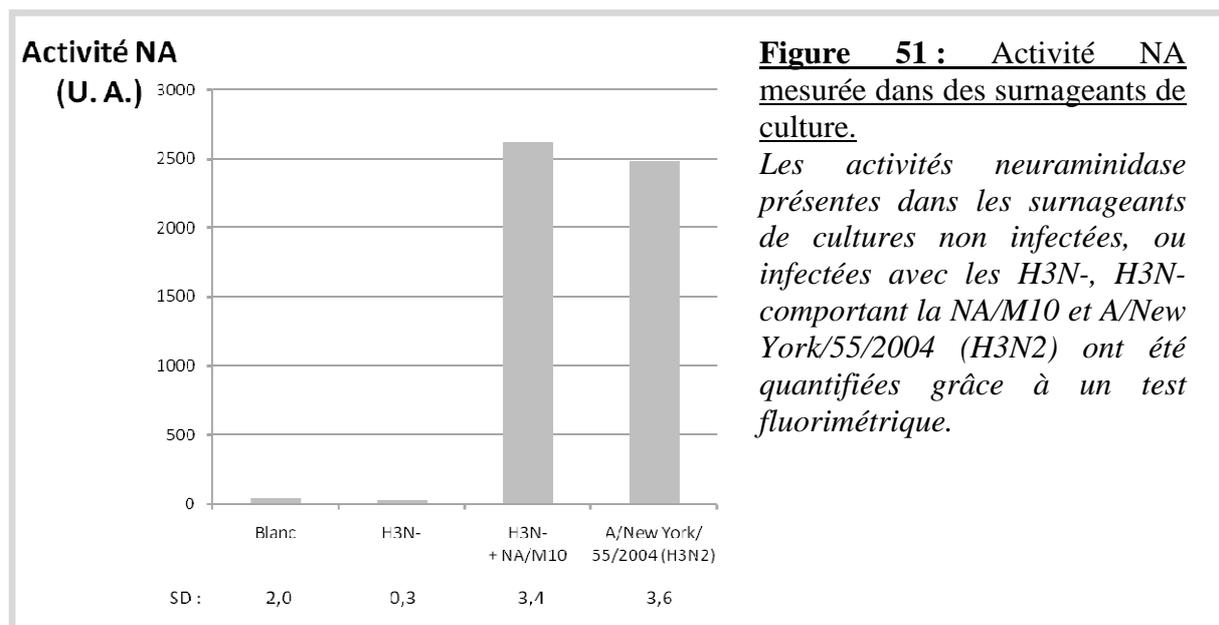
Nous avons testé la capacité du virus H3N- à incorporer un segment codant pour une NA fonctionnelle. Un mélange contenant les sept plasmides permettant la synthèse du virus H3N- ainsi que le plasmide NA/pHW2000PolII~~del~~ codant pour le segment NA de M10 (NA/M10) ont été transfectés dans des cellules 293T. Le surnageant obtenu après 3 jours de transfection a été utilisé pour infecter des cellules MDCK. Les ECP ont pu être visualisés à partir de 20 heures post-infection (**Figure 49**). Le virus H3N- + NA présente une cinétique plus rapide que le virus parental contenant sept segments



Après chaque amplification sur cellules MDCK, l'ARNv est extrait et une PCR est effectuée sur cet ARN (**Figure 50**). Une fois confirmée l'absence de plasmides résiduels, une RT est réalisée. L'amplification des segments NS et NA à partir de l'ADNc montre respectivement la présence de virus et l'incorporation du segment NA natif (**Figure 50**).



La présence de protéines NA fonctionnelle a été évaluée grâce à un test fluorimétrique. Le substrat utilisé, l'acide 2-(4-méthylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminique est clivé en un produit coloré par la NA. L'activité neuraminidase est donnée en unité arbitraire (U. A.). Aucune activité n'est détectée pour le surnageant du virus H3N- ($29 \pm 0,3$ U. A.). Le niveau d'activité du virus H3N- comportant la NA/M10 ($2617 \pm 3,4$ U. A.) est comparable à celui d'une souche H3N2 commune, ici A/New York/55/04 (H3N2) ($2488 \pm 3,6$ U. A.) (**Figure 51**).



Afin de connaître la proportion de virus H3N- ayant incorporé un segment NA/M10, les virus sont isolés grâce à la technique des plages de lyse. Après isolation suivie par une étape d'amplification sur cellules MDCK, une partie du surnageant est récoltée et l'ARNv est extrait. Des PCR dirigées contre les segments NA et NS sont réalisées, après une étape de RT non spécifique. Aucune amplification n'a été visualisée pour NS lorsque la matrice correspond à l'ARN. Une amplification pour les segments NS et NA a été observée pour les PCR réalisées avec l'ADNc. Sur 34 virus testés, correspondant à des plages de lyse de différents diamètres (allant de 1 à 3 mm), deux virus n'ont pas permis d'obtenir une amplification du segment NA, soit 6 %. Le phénotype taille de plages n'est pas corrélé à la présence du segment NA (un virus présentant une plage de lyse de 1mm, l'autre de 3 mm).

Expression de gène rapporteur par un segment NA modifié.

Différents transgènes ont été évalués dans un contexte transcriptionnel. Le plasmide NA/M10 a servi de matrice pour la construction des différents plasmides permettant la synthèse de segments NA modifiés. Une partie de la région codante de la NA a été remplacée par un gène rapporteur (*gfp*, *luc* ou *cat*), tout en conservant les extrémités codantes considérées nécessaires à l'empaquetage du segment dans un contexte d'infection. L'expression de différents gènes rapporteurs insérés dans le segment NA (**Figure 52**) a été testée par cotransfection avec les plasmides codant pour les trois sous-unités du complexe polymérase et pour la NP du virus H3N- dans des cellules 293T.

L'expression de la protéine GFP a été visualisée au microscope à fluorescence. 24 heures post-transfection, la protéine GFP est exprimée dans les cellules 293T, tandis qu'aucune fluorescence n'est visible dans les cellules transfectées avec les plasmides codant pour les sous unités du complexe polymérase et la NP de H3N- (**Figure 53**).

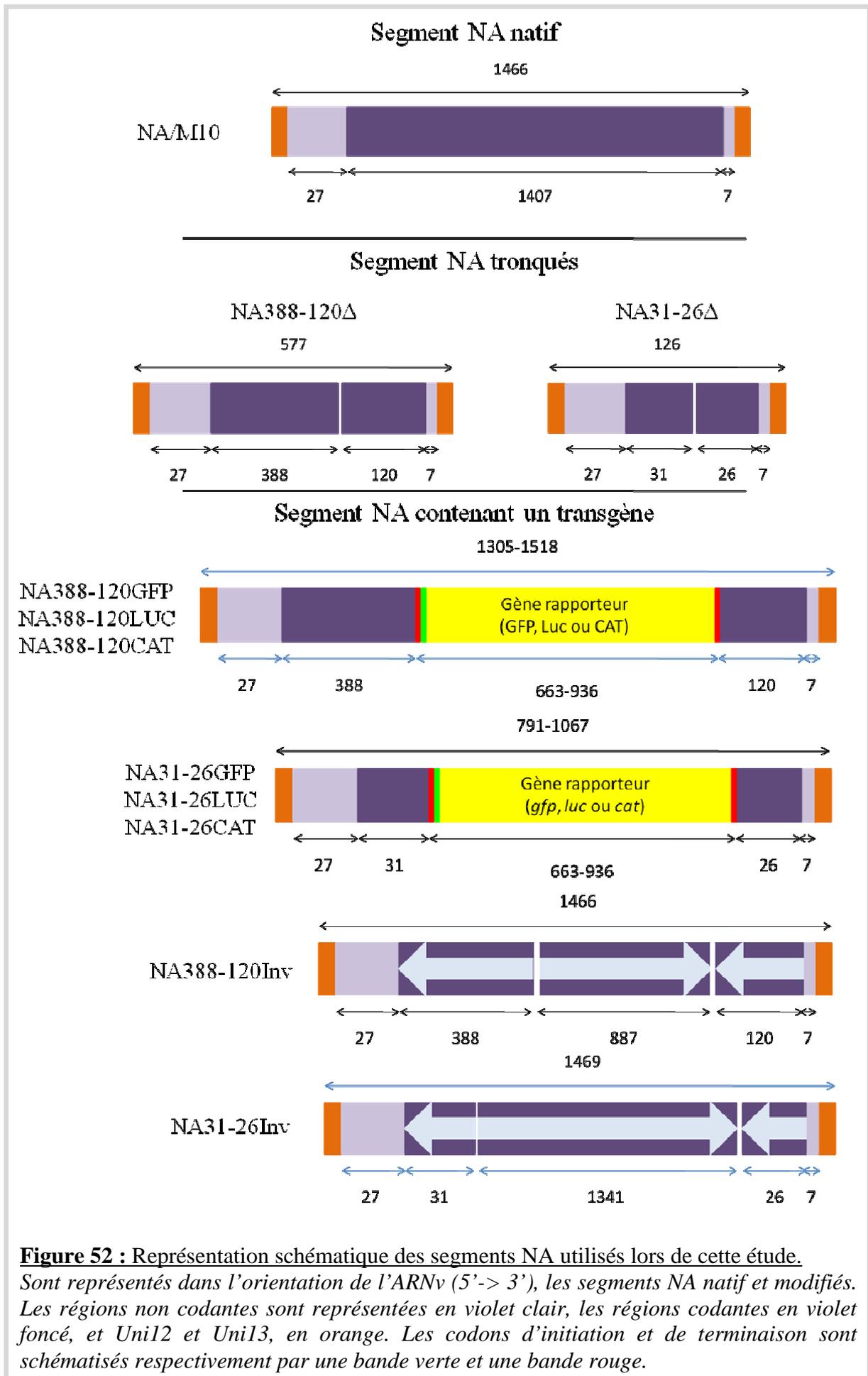


Figure 52 : Représentation schématique des segments NA utilisés lors de cette étude. Sont représentés dans l'orientation de l'ARNv (5' -> 3'), les segments NA natif et modifiés. Les régions non codantes sont représentées en violet clair, les régions codantes en violet foncé, et Uni12 et Uni13, en orange. Les codons d'initiation et de terminaison sont schématisés respectivement par une bande verte et une bande rouge.

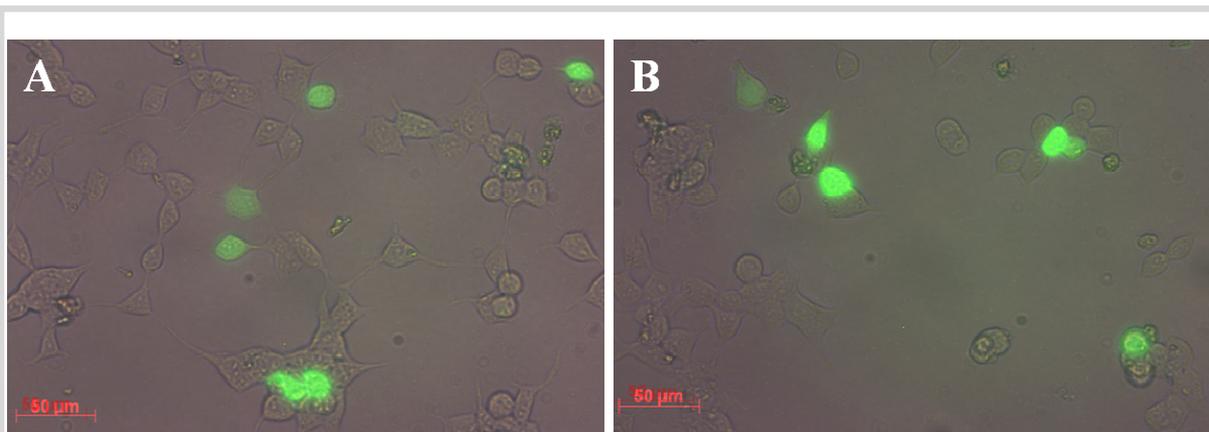


Figure 53 : Expression du gène rapporteur *gfp* en contexte transcriptionnel.

*Des cellules 293T sont transfectées avec les plasmides permettant l'expression des protéines du complexe polymérase et de la NP du virus H3N-, ainsi qu'un segment codant pour une NA exprimant le transgène *gfp* (A : NA388-120GFP ; B : NA31-26GFP). 24 heures post-transfection, les cellules sont observées au microscope à fluorescence*

L'expression de la protéine LUC a été quantifiée par un test d'activité 48 heures post-transfection sur des cellules 293T. Une activité luciférase a pu être détectée de l'ordre de 185.000 unités (témoin négatif : 150 unités ; témoins positif (plasmide PGL-3) : 6.510.000 unités). Des problèmes de reproductibilité ont été associés à ces expériences, bien que l'expression de la protéine LUC ait toujours été observée.

Du fait de la lourdeur du protocole pour quantifier l'activité CAT, le transgène n'a pas été testé en transfection en condition de transcription.

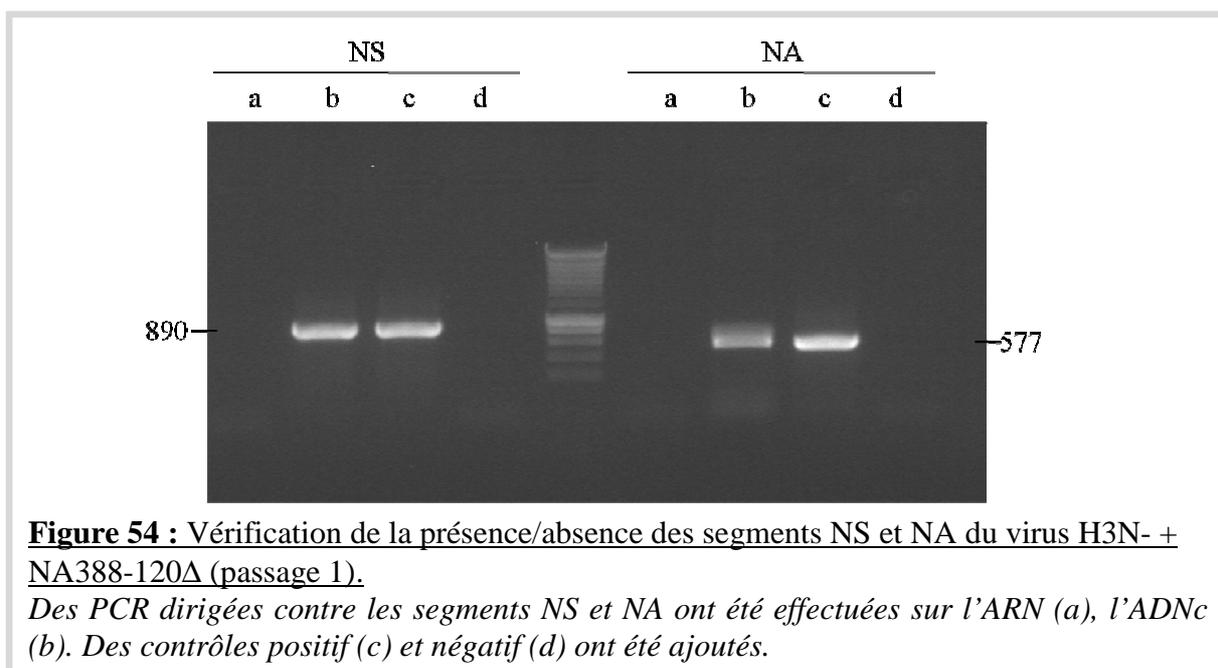
Incorporation de différents segments NA modifiés dans les particules.

La capacité du virus H3N- à incorporer un segment NA comportant un transgène a été évaluée à l'aide de différentes constructions plasmidiques.

Incorporation des segments NA tronqués et des segments NA possédant une région inversée.

Deux plasmides codant pour un segment NA tronqué ont été construits à partir du plasmide NA/M10. Ils codent pour les segments NA388-120 Δ et NA31-26 Δ (**Figure 52**).

Les virus H3N- + NA388-120 Δ et H3N- + NA31-26 Δ ont été produits par génétique inverse. Une PCR est effectuée sur l'ARN ainsi que sur l'ADNc des surnageants de culture (**Figure 54**). Les PCR réalisées sur la matrice ARN sont négatives pour les segments NS et NA, prouvant l'absence de plasmides résiduels. Nous pouvons remarquer une amplification pour le segment NS et NA (taille : 577 paires de bases) sur la matrice ADNc prouvant la présence de virus et l'incorporation du segment NA388-120 Δ .



Le virus H3N- + NA31-26 Δ n'a pu être amplifié sur MDCK, il n'a donc pas été possible de vérifier l'incorporation du segment NA31-26 Δ .

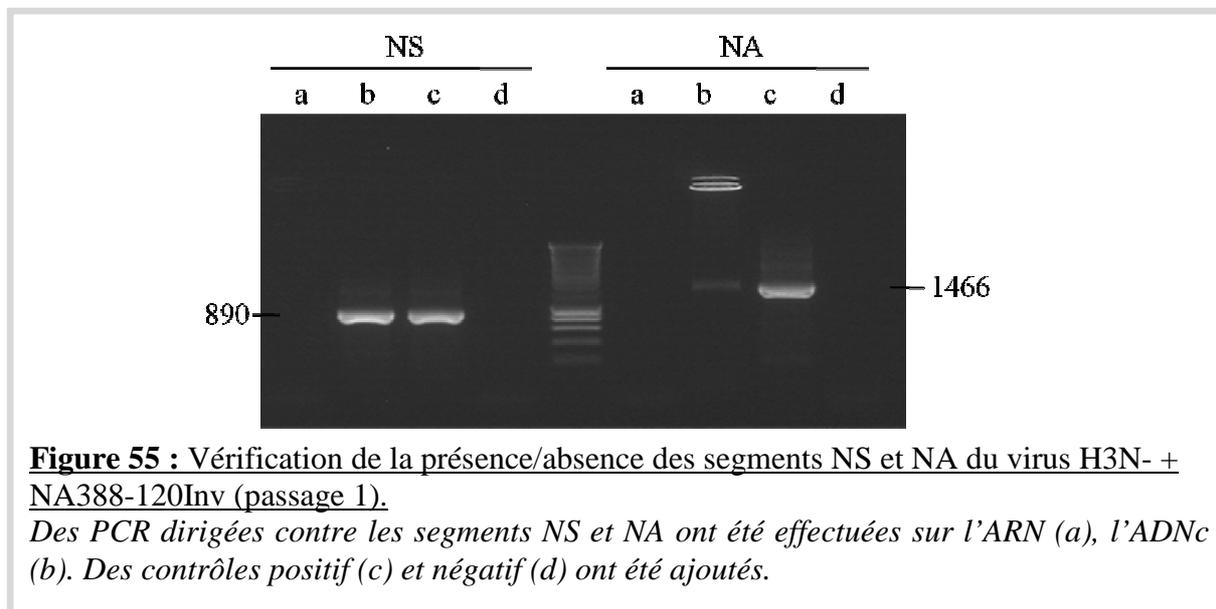
Le virus H3N- est capable d'incorporer un segment tronqué de type N2, NA388-120 Δ , contenant les extrémités codantes et non codantes du segment NA de M10.

Deux plasmides ont été construits afin de produire un segment NA contenant une région inversée de ce dernier, NA388-120Inv et NA31-26Inv (**Figure 52**).

Les plasmides permettant la production du virus H3N- sont cotransfectés avec le plasmide codant pour le segment NA388-120Inv ou NA31-26Inv dans des cellules 293T. Les ARN sont extraits à partir du surnageant du passage 1 et des PCR dirigées contre les segments NS et NA sont effectuées sur l'ARN et l'ADNc. Aucune amplification n'est visible pour les PCR ayant pour matrice l'ARN tandis que les segments NS et NA sont amplifiés lorsque la

matrice correspond à l'ADNc (**Figure 55**). La présence de virus ainsi que l'incorporation du segment NA388-120Inv sont confirmées.

Le virus H3N- + NA31-26Inv n'a pu être amplifié sur MDCK, ne permettant pas de conclure sur l'incorporation de ce segment.



Le virus H3N- est capable d'incorporer un segment comportant les extrémités codantes et non codantes permettant l'emballage du segment tronqué encadrant une région interne ne codant pas pour une protéine NA fonctionnelle.

Incorporation des segments NA contenant le gène *gfp*.

Deux plasmides codant pour un segment NA exprimant une GFP ont été construits. Ils diffèrent quant à la taille de la région codante de la NA conservée à chaque extrémité et sont nommés NA388-120GFP et NA31-26GFP (**Figure 52**). Ces segments comportent respectivement 1305 et 854 nucléotides. Après avoir validé l'expression du transgène par transfection, des virus H3N- sont produits par cotransfection des sept plasmides permettant la production de virus et un des deux plasmides NAGFP. A chaque passage, la présence de virus ainsi que l'incorporation du segment GFP est vérifiée par deux méthodes : observation au microscope à fluorescence et PCR dirigée contre les segments NA et NS.

Aucune fluorescence n'est détectée au niveau des cellules MDCK, quelque soit l'heure post-transfection observée ou le passage analysé (données non montrées).

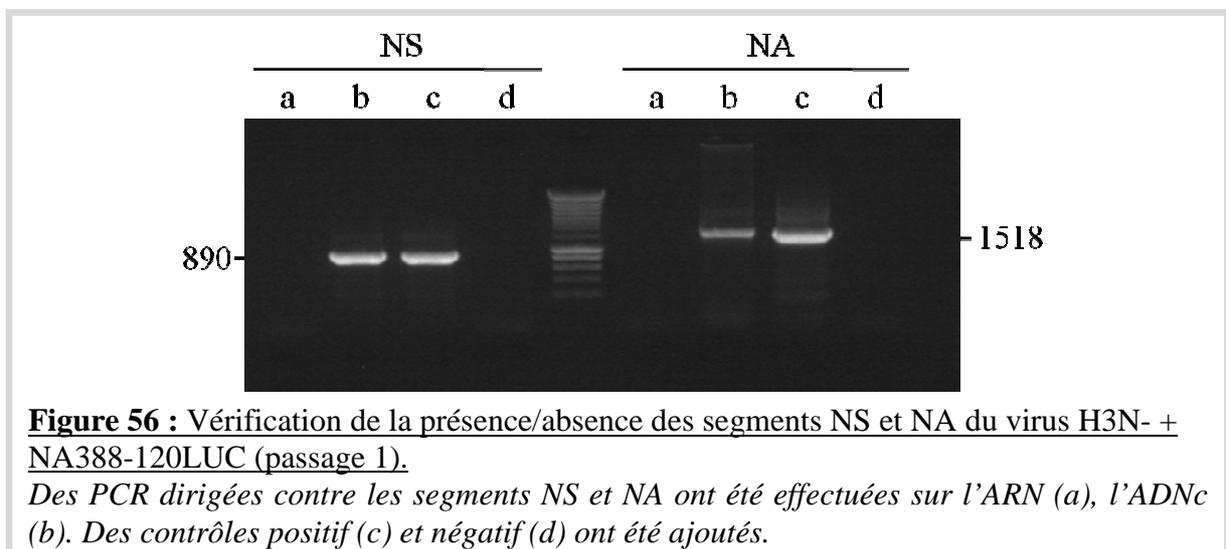
Une amplification du segment NS est observée pour tous les passages, confirmant la présence de virus. Aucune amplification n'est visible pour le segment NA. L'absence d'amplification du segment NS suite à une PCR sur les ARN démontre l'absence de plasmides utilisés lors de la transfection.

Le virus H3N- n'incorpore pas les segments comportant le transgène GFP.

Incorporation des segments NA contenant le gène *luciférase*.

Deux segments codant pour le gène *luc* flanqué des extrémités du segment NA du virus M10 ont été testés en transfection avec les sept plasmides permettant la synthèse des segments du virus H3N- : NA388-120LUC et NA31-26LUC (**Figure 52**). L'incorporation des segments NA388-120LUC et NA31-26LUC est vérifiée par biologie moléculaire (**Figure 56**). Les PCR dirigées contre les segments NS et NA effectuées sur l'ARN sont négatives, celles réalisées sur l'ADNc sont positives.

Le virus H3N- comportant le segment NA31-26LUC n'a pu être amplifié sur cellules MDCK, ne permettant pas de conclure sur l'incorporation de ce segment.

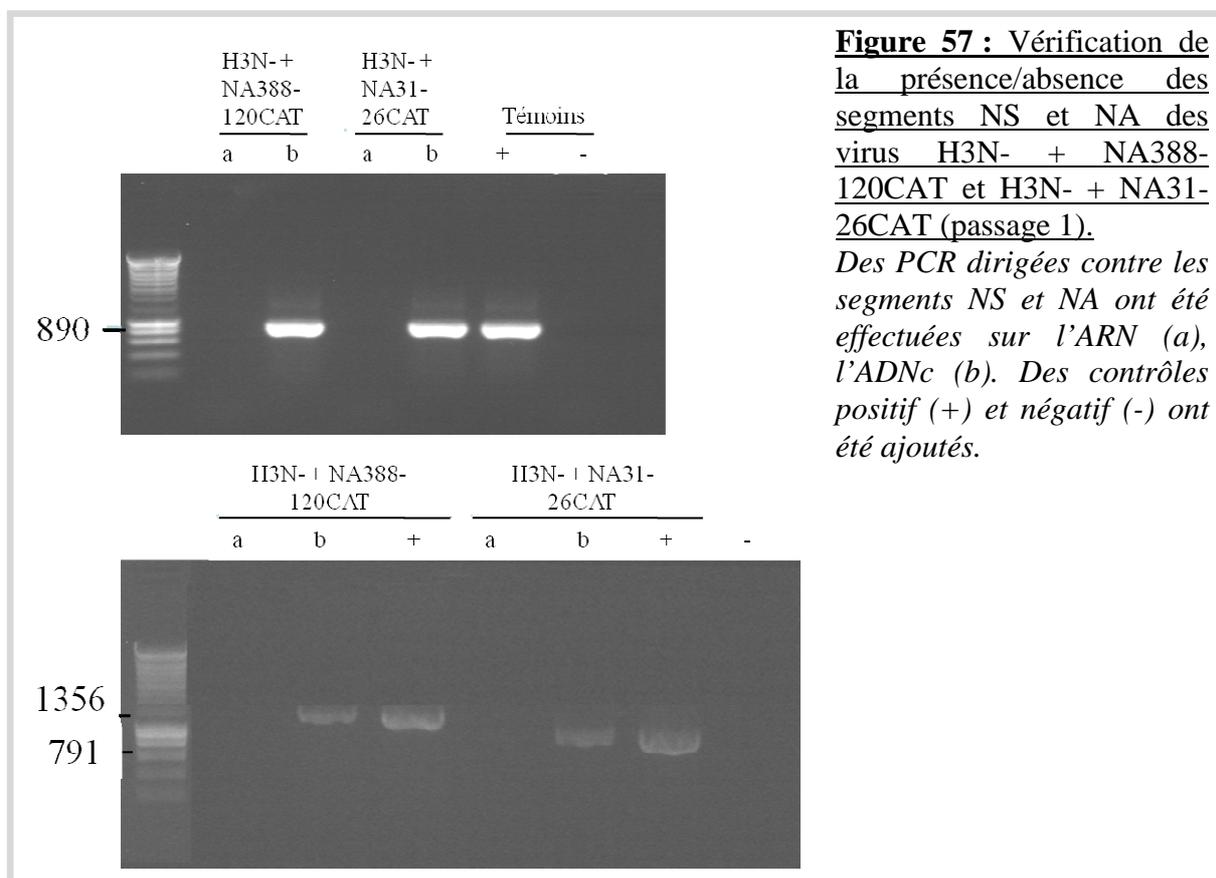


Le virus H3N- incorpore un segment NA modifié exprimant le gène *luc*.

Incorporation des segments NA contenant le gène *cat*.

Un des plasmides permettant la synthèse des segments NA contenant le gène *cat* (NA388-120CAT et NA31-26CAT (**Figure 52**)) a été transfecté avec les sept plasmides de génétique inverse du virus H3N-. Après un passage sur cellule MDCK, le surnageant est récolté et l'ARN extrait et traité à la DNase I. Une PCR dirigée contre les segments NS et NA est effectuée sur l'ARN, ainsi que sur l'ADNc (**Figure 57**).

Nous pouvons détecter des marqueurs de l'infection (PCR ADNc (NS) positive et PCR ARN (NS) négative) et une amplification est visible pour les deux segments NACAT : NA388-120CAT et NA31-26CAT. Le même profil est observé pour le passage 2.



Le virus H3N- incorpore des segments NA exprimant le gène *cat*. Les séquences nécessaires à l'empaquetage du segment NA de type N2 se situent au niveau des extrémités : les 31 premiers nucléotides de la région codante 5' et les 26 premiers de la région codante 3' de l'ARNv.

Analyse bioinformatique des segments NA.

Régions conservées aux extrémités du segment NA.

Vingt segments NA ont été alignés dans l'orientation ARNv afin de voir les régions conservées, pouvant être indispensables à l'étape d'empaquetage de ce segment. L'extrémité 3' contenant Uni12 comporte plus de régions homologues que la région 5' contenant Uni13. Bien que la région 3' non codante présente des similitudes pour tous les segments testés, la région codante est plus conservée, quelque soit le sous-type considéré (**Figure 58**). Les 8 premiers nucléotides de la région codante en 3' sont conservés pour tous les sous-types et spectres d'hôtes testés, de même que les nucléotides 10-11, 13-14, 16-17, 20 et 23, donnant la séquence consensus :

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
 U A C U U A G G (u/a/c) U U (a/g) G U (c/u) U U (c/u) (u/g/a) A (u/g/a) (u/g/a) A

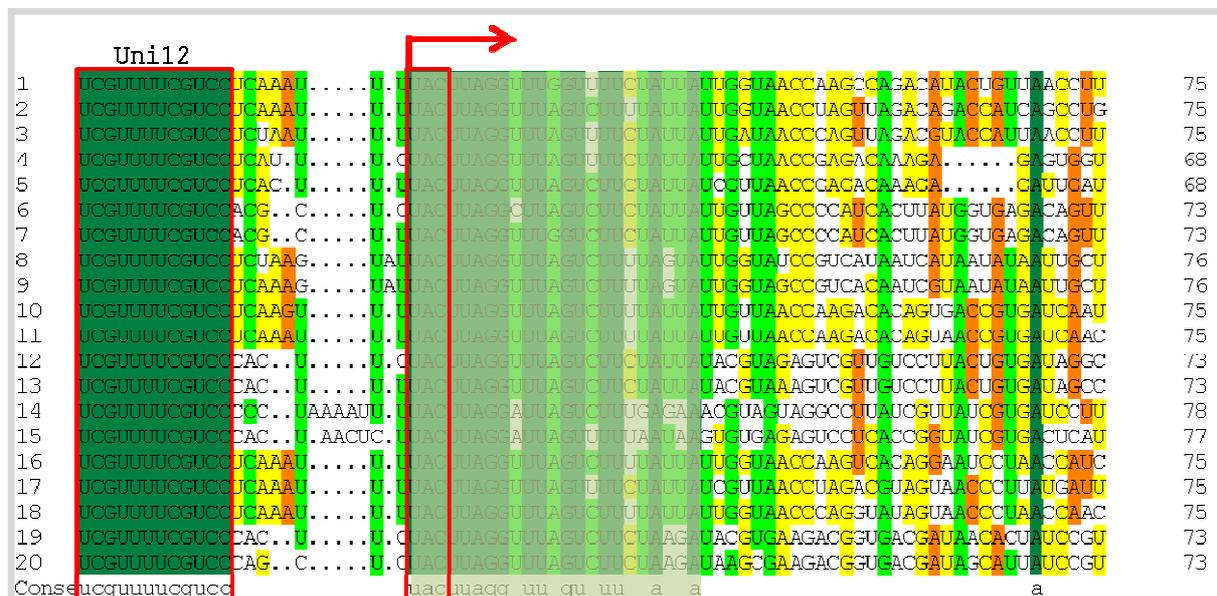


Figure 58 : Alignement de l'extrémité 3' de 20 segments NA (sens ARNv, orienté 3'-5').

Les extrémités 3' de 20 segments NA ont été alignées à l'aide du logiciel DNAMAN.

Légende :

100 % d'homologie : vert foncé ;

>75 % d'homologie : vert clair ;

>50 % d'homologie : jaune ;

>25 % d'homologie : orange.

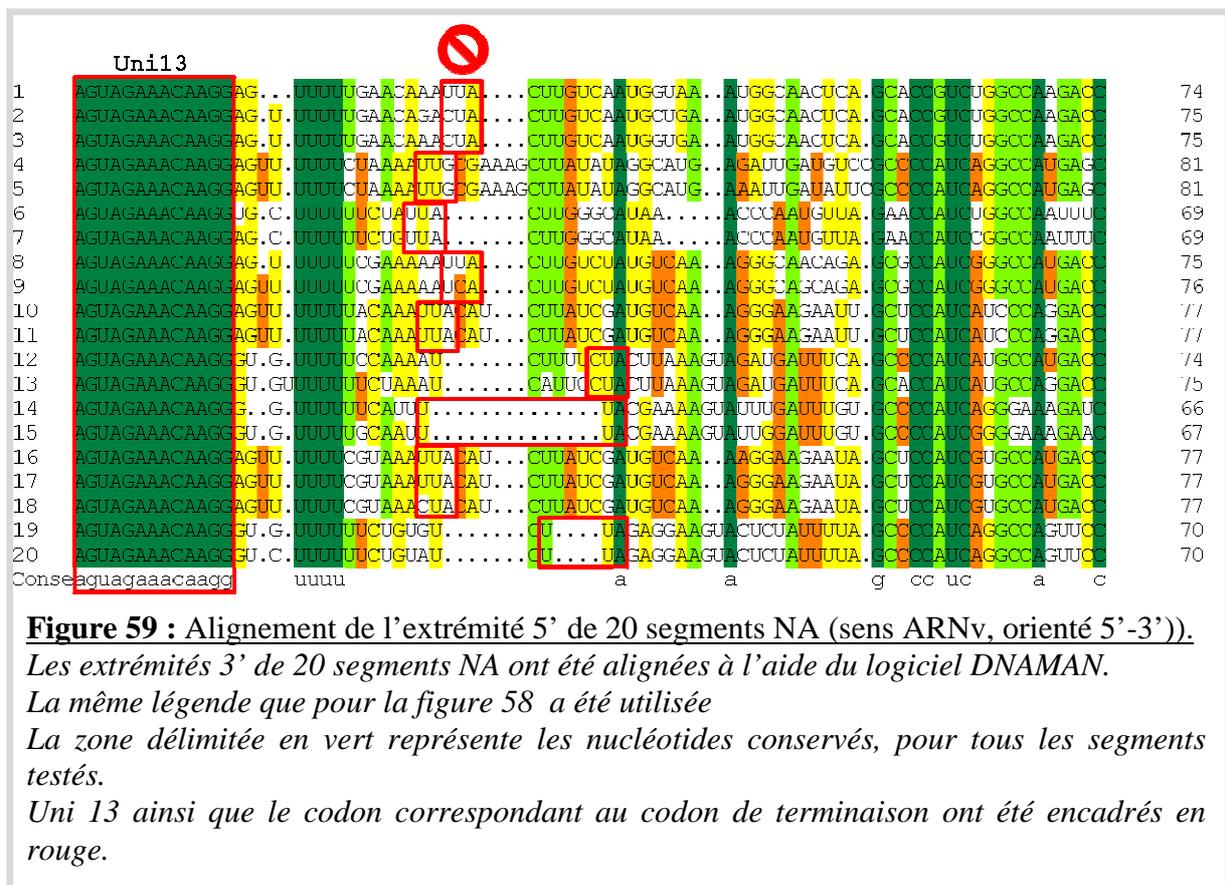
La zone délimitée en vert représente les nucléotides conservés, pour tous les segments testés.

Le codon correspondant au codon d'initiation (UAC) ainsi que Uni12 ont été encadrés en rouge.

Cependant, pour les nucléotides 1 à 18, la séquence aminoacide est identique quel que soit le segment considéré. On obtient la séquence protéique consensus suivante :

Met – Leu – Gly – Leu –Phe – Val

L'extrémité 5', contenant Uni13 est quant à elle moins conservée (**Figure 59**). Le codon de terminaison des différentes NA n'est pas présent au même site selon les sous-types, ceci déterminant la taille de la protéine (**Tableau 3**). Les seuls éléments constants dans les différents segments NA sont la région Uni13 ainsi que la suite d'uracile (bien que sa longueur elle-même ne soit pas constante...).



Composition en nucléotides des différents segments NA analysés.

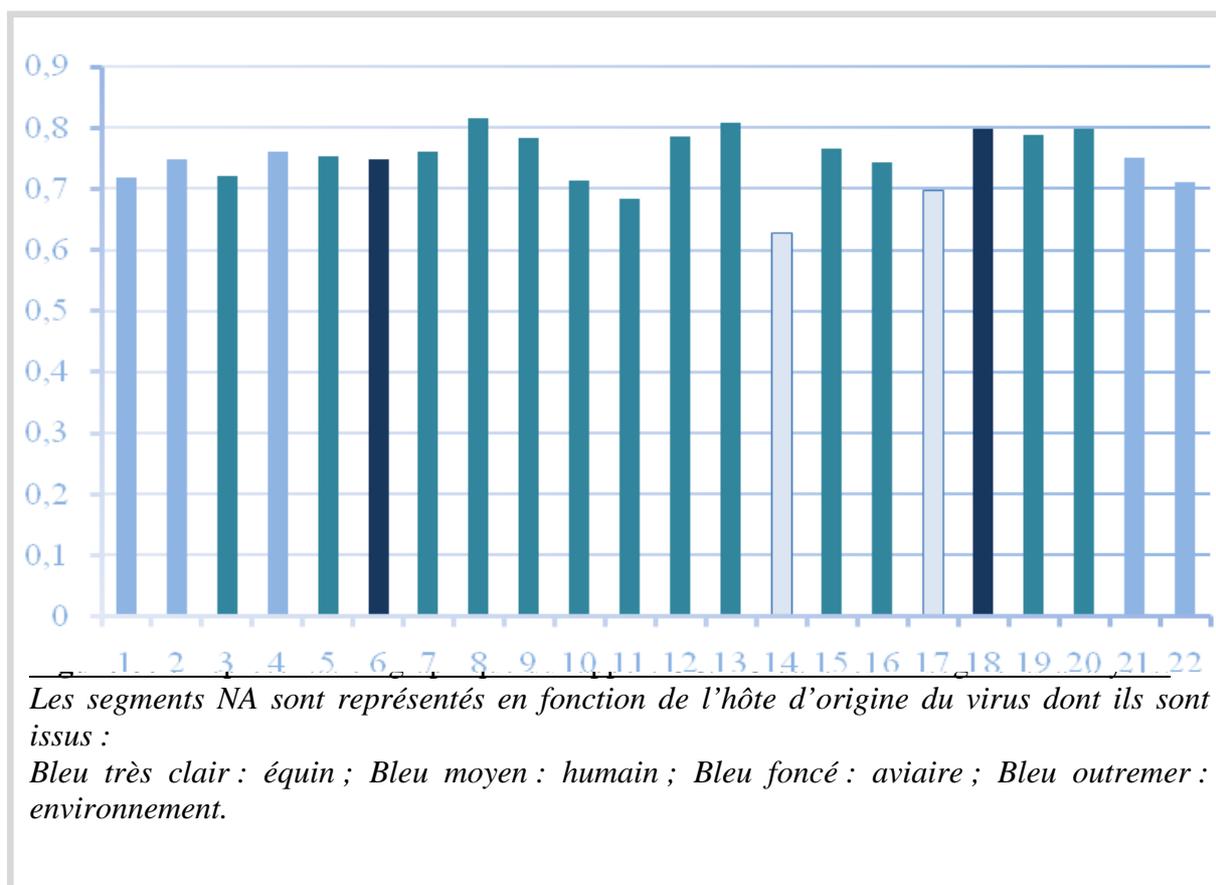
Les vingt segments NA étudiés au cours de la précédente étude ont été analysés du point de vue de leur composition en nucléotides. Deux segments ont été ajoutés, codant pour des protéines NA de virus influenza de type A humains : A/Hong Kong/1/68 (H3N2) et A/Canada/rv504/2004 (H7N3). Suite à ces analyses, il apparaît que tous les segments NA,

quelle que soit leur origine possèdent la même composition en nucléotides (**Tableau 7 et Figure 60**). Le pourcentage des nucléotides adénine est compris entre 21,1 et 27,2 pour les 22 virus testés, celui de cytosine, entre 20,3 et 26,8. Celui des nucléotides guanine et uracile est compris respectivement entre 17 et 20,7 et 29,9 et 37,6. Le pourcentage des purines (nucléotides adénine et guanine) est légèrement en dessous de 50 %, compris entre 41,8 et 45,2. Tous les segments présentent un déficit en guanine/cytosine par rapport aux adénine/uracile, le rapport GC/AU étant compris entre 0,7 et 0,81 (**Figure 60**). La moyenne pour les vingt-deux virus analysés est de 0,75 avec une déviation standard de 0,04.

NA	souche	%								GC/AU	CU/AG	taille
		A	C	G	U	Py (CU)	Pu (AG)	GC	AU			
N1	1	26,1	23,1	18,7	32,1	55,2	44,8	41,8	58,2	0,72	1,23	1457
	2	27	25	17,8	30,2	55,2	44,8	42,8	57,2	0,75	1,23	1413
	3	27,2	23,9	17,9	30,9	54,8	45,1	41,8	58,1	0,72	1,22	1458
N2	4	25,7	23,8	19,4	31,1	54,9	45,1	43,2	56,8	0,76	1,22	1466
	5	26,3	24,4	18,6	30,8	55,2	44,9	43	57,1	0,75	1,23	1466
N3	6	24,2	22,8	20	33	55,8	44,2	42,8	57,2	0,75	1,26	1453
	7	23,8	22,8	20,4	33	55,8	44,2	43,2	56,8	0,76	1,26	1453
N4	8	25	25,9	19	30,1	56	44	44,9	55,1	0,81	1,27	1462
	9	25,6	25	18,9	30,5	55,5	44,5	43,9	56,1	0,78	1,25	1463
N5	10	26,2	24,2	17,4	32,2	56,4	43,6	41,6	58,4	0,71	1,29	1469
	11	26,3	23,6	17	33,1	56,7	43,3	40,6	59,4	0,68	1,31	1469
N6	12	22,1	24,3	19,7	33,9	58,2	41,8	44	56	0,79	1,39	1464
	13	21,1	24	20,7	34,3	58,3	41,8	44,7	55,4	0,81	1,39	1465
N7	14	23,9	20,3	18,2	37,6	57,9	42,1	38,5	61,5	0,63	1,38	1458
	15	22,7	23,6	19,7	33,9	57,5	42,4	43,3	56,6	0,77	1,36	1461
N8	16	24,9	25,1	17,5	32,5	57,6	42,4	42,6	57,4	0,74	1,36	1460
	17	25,1	23,4	17,7	33,9	57,3	42,8	41,1	59	0,70	1,34	1460
	18	25,8	26,8	17,7	29,9	56,7	43,5	44,5	55,7	0,80	1,30	1460
N9	19	21,7	23,1	21	34,2	57,3	42,7	44,1	55,9	0,79	1,34	1460
	20	21,6	23,4	21	34,1	57,5	42,6	44,4	55,7	0,80	1,35	1460
N2	A/Hong Kong/1/68 (H3N2) (AF348184)*	26	24,1	18,7	31,1	55,2	44,7	42,8	57,1	0,75	1,23	1467
N3	A/Canada/rv504/2004 (H7N3) (CY015008)*	24,4	22,6	18,5	33,4	56	42,9	41,1	57,8	0,71	1,31	1453

Tableau 7 : Composition en nucléotides des différents segments NA étudiés.

En plus des 20 segments NA étudiés précédemment, deux ont été ajoutés, codant pour des NA de virus influenza de type A humains ().*



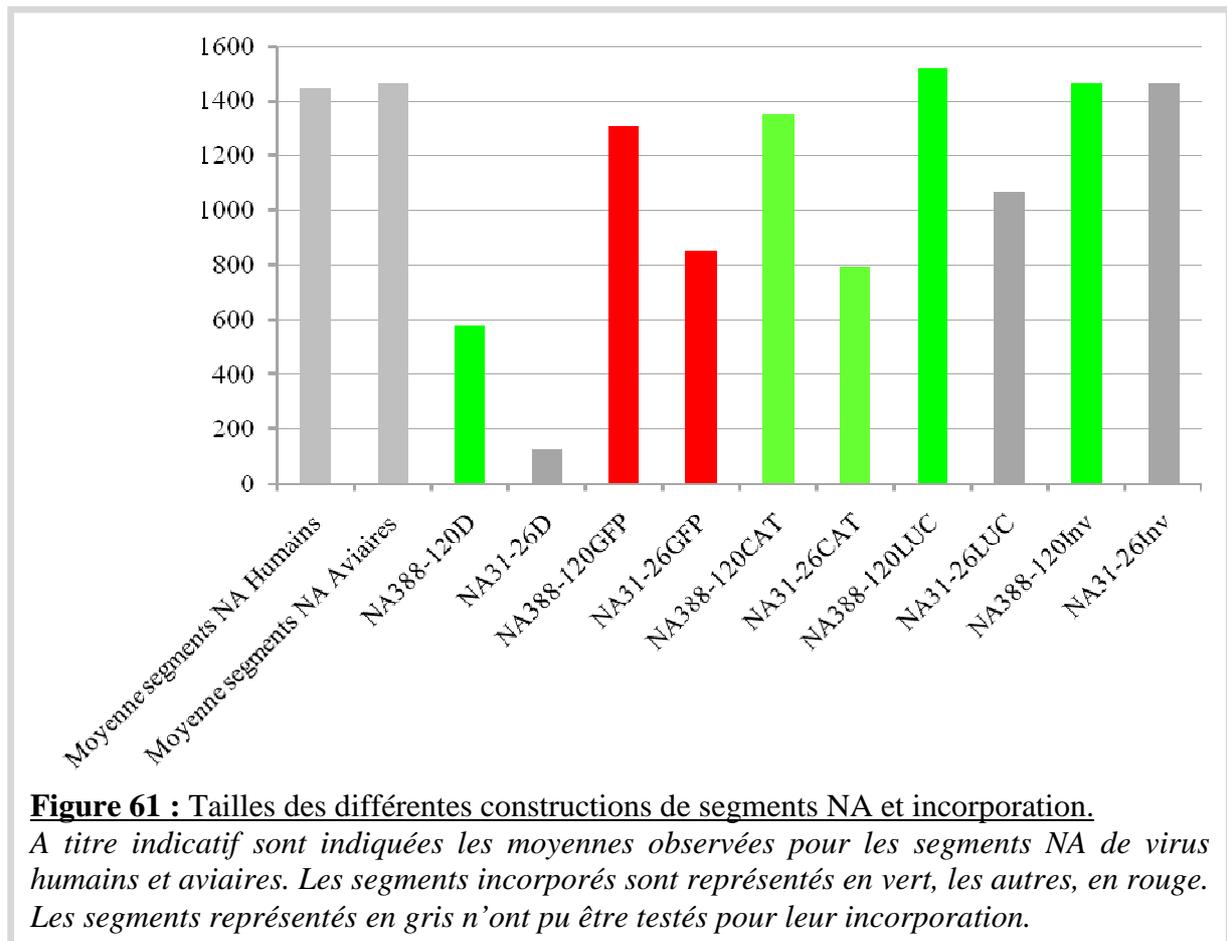
Analyse bioinformatique des segments NA modifiés.

Les différentes constructions effectuées au cours de ce travail ont été analysées afin de pouvoir les comparer à des segments NA natifs. Leur taille respective, ainsi que leur composition en nucléotides ont été analysées (**Tableau 8** et **Figures 61**).

souche	% U	% G	% C	% A	% Py (C/T)	% Pu (A/G)	% GC	% AT	GC/AT	CT/AG	Taille
Moyenne segments NA Humains	30,9	18,7	24,2	26,2	55,1	44,9	42,9	57,1	0,7516	1,2295	1444,3
Moyenne segments NA Aviaires	32,7	19,3	24,2	23,8	56,96	43,1	43,5	56,5	0,7708	1,3249	1462,5
NA388-120Δ	31	18	23,7	27,2	54,7	45,2	41,7	58,2	0,716495	1,210177	577
NA31-26Δ	38,1	18,3	17,5	26,2	55,6	44,5	35,8	64,3	0,556765	1,249438	126
NA388-120GFP	20,1	26,1	26,4	27,4	46,5	53,5	52,5	47,5	1,105263	0,869159	1305
NA31-26GFP	26,5	30,9	26,5	16,2	53	47,1	57,4	42,7	1,344262	1,125265	854
NA388-120CAT	28,9	19,9	23,2	28	52,1	47,9	43,1	56,9	0,757469	1,087683	1356
NA31-26CAT	28,7	21,1	22	28,2	50,7	49,3	43,1	56,9	0,757469	1,028398	791
NA388-120LUC	26,7	23,7	26,3	23,3	53	47	50	50	1	1,12766	1518
NA31-26LUC	25,7	26,1	26,7	21,5	52,4	47,6	52,8	47,2	1,118644	1,10084	1067
NA388-120Inv	31,1	19,4	23,8	25,7	54,9	45,1	43,2	56,8	0,760563	1,217295	1466
NA31-26Inv	31,1	19,4	23,8	25,7	54,9	45,1	43,2	56,8	0,760563	1,217295	1466

Tableau 8 : Composition en nucléotides et taille des différentes constructions.

A titre indicatif sont indiquées les moyennes observées pour les segments NA de virus humains et aviaires.



Pour les segments contenant une grande partie des extrémités du segment NA, les tailles des constructions sont relativement proches du segment NA/M10, comprises entre 1305 et 1518 nucléotides. Le segment NA388-120 Δ a une taille située au niveau des segments NA tronqués natifs (**Tableau 6**), tandis que le segment NA31-26 Δ est plus petit (126 nucléotides contre le plus court segment tronqué analysé de 263 nucléotides).

Suite à l'analyse bioinformatique, nous pouvons remarquer que les constructions sont très hétérogènes quant à leur composition en nucléotides. Si certains segments sont proches des ratios des segments NA natifs (NA388-120 Δ , NA388-120CAT, NA388-120LUC et NA31-26CAT), d'autres présentent une plus grande proportion de GC : NA388-120GFP, NA31-26GFP et NA31-26 LUC. Le segment NA31-26 Δ possède quand à lui une proportion de GC plus faible que le segment NA/M10.

Les segments contenant une région inversée ont par définition la même taille et la même composition en nucléotide que le segment sauvage.

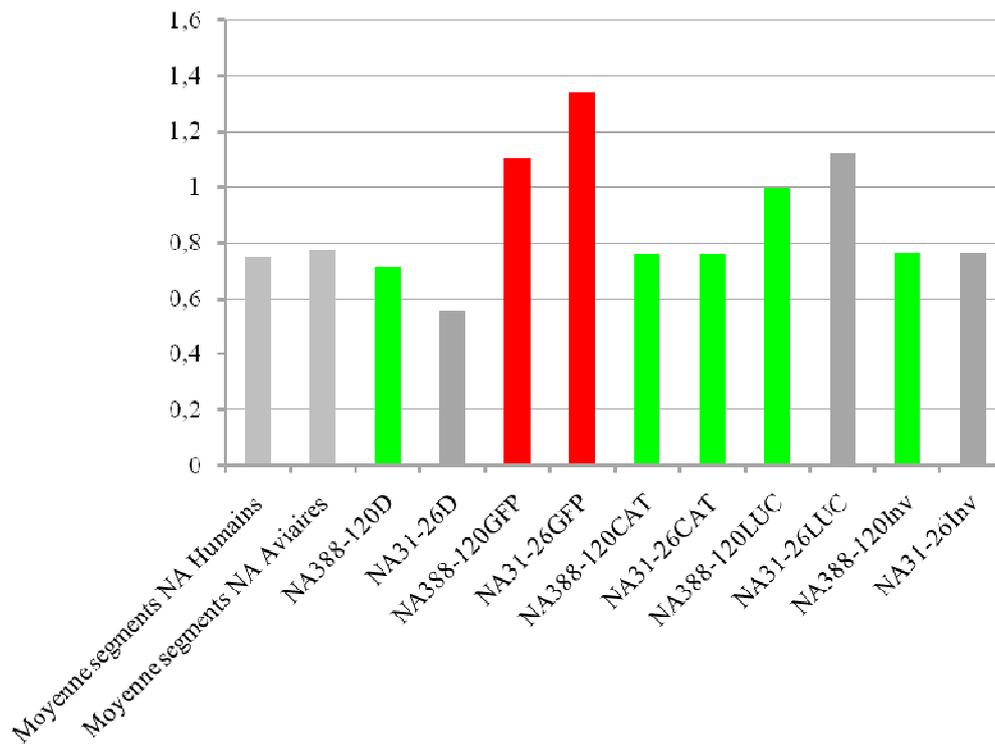


Figure 62 : Composition en nucléotides des différentes constructions et incorporation.

A titre indicatif sont indiquées les moyennes observées pour les segments NA de virus humains et aviaires. Les segments incorporés sont représentés en vert, les autres, en rouge.

Les segments représentés en gris n'ont pu être testés pour leur incorporation.

La caractérisation du virus A/Réunion/586/2004 (H3N-) est en cours de rédaction.

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

V Moules¹, O Ferraris¹, O Terrier¹, E Guidice², M Yver¹, JP Rolland², M Bouscambert-Duchamps^{1,6}, C Bergeron¹, M Ottmann¹, E Fournier³, A Traversier¹, L Yipu⁵, A Hay⁵, M Valette^{1,6}, R Marquet³, M Rosa-Calatrava¹, G. Schoehn⁴, D Thomas² and B Lind^{1,6}.

VM and OF work equally

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

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

3 - UPR9002 du CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue René Descartes, Strasbourg 67084 cedex, France. C.Isel@ibmc.u-strasbg.fr

4 - Unit for Virus Host Cell Interaction, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS, 6 rue Jules Horowitz, 38042 Grenoble cedex 9, France

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

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

We analysed the susceptibility to neuraminidase (NA) inhibitors of human influenza A and B viruses detected in patients with acute respiratory infection between 2002 and 2005. Overall, 788 viruses have been tested for their NA activity by using a fluorometric assay. We detected two H3 viruses lacking NA activity and harbouring an oseltamivir resistant phenotype in a cellular-based assay. The lack of NA or truncated NA gene segment was confirmed for these two viruses by the analysis of the genomic vRNAs distribution on acrylamid gel. From these initial observations, we investigated the impact of the lack of the NA on the viral replication, viral morphology and virulence of these newly discovered A (H3N0) viruses. We showed that both the HA and PB1 genes segment of H3N0 viruses were involved to generate infectious H3 human influenza without NA activity *in vitro*. We have also detected two aminoacids substitutions in the PB1 proteins which could play an important role the NA deficient viruses.

La publication décrivant la construction du virus influenza vecteur est en cours de rédaction.

Internal sequences as well as extremity regions are important for foreign segment in type A influenza virus.

Bergeron C.¹, Lamsaddar S., Ferraris O.¹, Lina B.^{1,2}, Ottmann M.¹

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

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

Isolation from patients of H3N2 type A influenza virus lacking neuraminidase (NA) segment (named H3N0) allowed us to consider the construction of an influenza virus vector, by incorporating NA segments modified from A/Moscow/10/99 virus (H3N2). Reverse genetic system based on this H3N0 virus was constructed. The addition of an eighth segment, coding or not for a functional NA protein, for *in vitro* viral production increased the viral replication compared with native seven-segment virus. The incorporation of segments with NA extremities but containing different transgenes ie *chloramphenicol acetyl-transferase* (*cat*), *green fluorescent protein* (*gfp*) and *luciferase* (*luc*) was assayed. None of the segments containing the *gfp* gene was incorporated within the viral particle, whereas the segments containing the *cat* or *luc* genes were successfully incorporated. Taking all together, our results suggest that even if extremities regions are wellknown to be required in packaging process for A(H1N1) viruses, internal sequences could also play a role in NA segment incorporation for the A(H3N2) virus.

Construction d'un vecteur viral

- Discussion -

Les virus recombinants exprimant un transgène, notamment un gène codant pour une GFP, ont permis de comprendre les mécanismes d'infection de nombreux virus, par la détermination des cellules cibles ou par le suivi de l'infection virale. La visualisation au microscope confocal de VLP (*virus like particle*) comprenant la protéine native VP6 de rotavirus (famille des *Réoviridae*) ainsi qu'une protéine fusion GFP (ou Dsred)-VP2 a permis de récolter des données sur l'entrée des rotavirus dans des cellules permissives (30). De telles études sur le virus de la rougeole (famille des *Paramyxoviridae*, genre *Morbillivirus*) ont montré que le tractus respiratoire, puis les ganglions lymphatiques correspondaient aux premiers sites d'infection, et non l'épithélium (90). Un gène rapporteur a été introduit dans le génome du virus de la maladie de Newcastle (NDV, famille des *Paramyxoviridae*, genre *Rubulavirus*) (3, 74), afin d'étudier le tropisme de ce virus ou encore pour la mise en place de vecteurs viraux. La mise au point de la technique de génétique inverse pour la production de virus à l'aide d'un ensemble de plasmides (93, 180) a révolutionné les études génétiques.

Généralement, les virus influenza de type A utilisés au cours de ses travaux correspondent à des souches de laboratoire bien établies telles que PR8 ou A/WSN/33 (H1N1) (72, 113, 205, 238). L'isolement chez un patient d'une souche de virus influenza de type A ne présentant pas de segment NA à l'état natif (57), H3N-, a été à l'origine du projet de construction d'un vecteur influenza répliatif contenant un gène rapporteur (*gfp*, *luciférase* ou *cat*) dans un segment NA de virus A(H3N2).

Le virus H3N- s'est révélé capable d'incorporer un segment NA natif hétérologue, codant pour une protéine NA fonctionnelle. Nous avons remarqué que la présence d'un segment codant pour une protéine NA fonctionnelle dans le génome du virus H3N- permettait d'augmenter sa réplication, par rapport au virus H3N- ne comportant que 7 segments.

La détermination des séquences nécessaires à l'empaquetage du segment NA est en accord avec les travaux de Y. Fujii et de son équipe qui a montré que les extrémités codantes du segment NA du virus A/WSN/33 (H1N1) étaient importantes pour son incorporation (69), notamment les 20 à 25 premiers nucléotides de chaque extrémité codante. L'incorporation du segment correspondant à un segment NA tronqué démontre que les régions nécessaires à l'incorporation d'un segment NA de type N2 sont situées au niveau des extrémités de ce segment. Il semblerait que les régions codantes et non codantes interviennent donc dans l'empaquetage des segments du virus influenza de type A. L'impact des régions non codantes ne peut cependant pas être appréhendé du fait de leur rôle essentiel dans les mécanismes de transcription/réplication. En effet, des études ont montré que des mutations au niveau des

séquences non codantes auraient un impact négatif sur les étapes des transcription/réplication, ces séquences correspondant à des régions régulatrices clef pour ces processus.

L'alignement des différents segments NA, tout hôte confondu (virus aviaires, humains, équins ou issus de l'environnement), montrent des régions conservées à l'extrémité 3' de l'ARNv mais non à l'extrémité 5'. Ces données ne peuvent cependant pas être attribuées exclusivement à la conservation de motifs ARN pour le processus d'empaquetage, ces régions étant situés au niveau de la partie codante. En effet, les AA 1 à 6 sont conservés pour toutes les protéines NA étudiées. Une dégénérescence au niveau du troisième nucléotide du codon est observée, la pression de sélection pouvant s'exercer au niveau protéique. Le facteur taille, du moment que le segment étudié est plus petit que le segment natif, ne semble pas être déterminant pour l'incorporation, des segments NA tronqués pouvant être incorporés (577 nucléotides pour le segment modifié NA388-120 Δ et de 263 à 547 nucléotides pour les segments NA tronqués naturels analysés au cours de cette étude). Nous n'avons pas testé au cours de l'étude des segments ayant une taille supérieure à un segment NA naturel. Chaque groupe de segments modifiés (tronqués, inversés ou exprimant un transgène) donne un renseignement sur l'incorporation d'un segment NA dans la particule de H3N-. Les segments tronqués montrent les régions nécessaires et suffisantes pour l'incorporation du segment NA. Les segments inversés valident le fait qu'il est possible d'incorporer un segment possédant les régions nécessaires à l'empaquetage encadrant une région non codante tandis que les segments contenant un transgène donnent des informations quant au rôle de la séquence interne dans le processus d'empaquetage.

De plus, un avantage répliatif est conféré aux virus H3N- ayant incorporé un segment additionnel, tronqué ou présentant une région inversée, confirmant la nécessité de huit segments pour une répliation optimale. Ce fait avait déjà été montré pour les virus PR8 et A/WSN/33 (H1N1) (46, 69). Le virus H3N- peut donc être considéré comme un virus neuraminidase-indépendant. Une telle augmentation de la répliation montre l'importance d'un jeu de huit segments dans le processus d'empaquetage, laissant supposer des interactions entre les différents segments favorisant leur incorporation dans la particule.

Des études ont montré que les virus influenza de type A peuvent incorporer des segments exprimant un gène rapporteur, notamment le gène *gfp*, nos constructions contenant ce transgène ne sont pas incorporées dans les particules virales. A l'inverse, les segments construits sur le même modèle mais exprimant les protéines LUC ou CAT sont incorporés dans les particules virales. Les séquences d'empaquetage ayant été validées par l'incorporation des segments tronqués, inversés ou contenant un autre transgène, il s'agit probablement d'une anomalie de la région codante de la protéine GFP. Il semble donc que les

extrémités seules ne jouent pas un rôle dans l’empaquetage des segments des virus influenza de type A, la région interne participe également à ce processus.

Le virus H3N- n’incorpore pas le segment accessoire contenant le transgène *gfp*, il est en effet capable de se répliquer sur une base de sept segments, bien qu’un ensemble de huit segments lui confère un avantage répliatif. Le fait que les segments NA contenant le transgène *gfp* ne soient pas incorporés, démontre donc une incapacité du virus H3N- à l’empaqueter. Trois hypothèses peuvent expliquer cette impossibilité d’incorporation d’un segment NA exprimant le transgène *gfp* : (i) des structures secondaires dans l’ARNv, (ii) un défaut de reconnaissance pour l’empaquetage de ce segment, ou (iii) le fond génétique H3N- ne permettant pas cette incorporation.

Les segments NA contenant le gène *gfp* présentent un plus fort taux de bases GC que les segments NA naturels : plus de 50 % contre 43 % pour les segments NA humains. Cette proportion en bases GC plus importante pourrait conduire à la formation de structures secondaires moins labiles qui pourraient être préjudiciables à l’incorporation du RNPv au sein du complexe formé par les huit segments viraux, tel qu’il a été décrit par T. Noda (163). R. Rabadan et ses collaborateurs ont montré que le segment NA présentait une séquence primaire stable, quelque soit l’hôte considéré, humain ou aviaire par rapport aux autres segments des virus influenza de type A (186). Une étude a été menée par R. Brower-Sinning et ses collaborateurs sur l’énergie de repliement des ARN codant pour les sous-unités du complexe polymérase et de la NP des virus influenza de type A, montrant son importance dans le franchissement de la barrière d’espèces (21). En effet, les virus possédant un spectre d’hôtes aviaires différent de ceux possédant un spectre d’hôtes humain quant à leur pourcentage en bases GC : les virus à spectres d’hôtes aviaires présentent un taux de bases GC plus important. Cependant, seules les régions codantes ont été analysées, laissant de côté les régions non codantes, notamment l’appariement entre les deux extrémités du segment d’ARNv, pré-requis pour la répliation des virus influenza de type A. De tels résultats concernant la proportion de dinucléotides CpG dans les génomes viraux des virus influenza de type A ont été démontré par R.B. Greenbaum en fonction des hôtes de ces derniers (82). Il est alors possible que la séquence primaire de ces segments participe à d’autres phénomènes dont l’empaquetage des segments. Cependant, nous ne parlons pas d’ARN nus dans le cas des virus influenza mais d’ARN associés étroitement au complexe polymérase à leurs extrémités, ainsi qu’à la nucléoprotéine NP sur toute leur longueur. Certaines données sont à notre disposition concernant l’exposition des bases sur la face externe des protéines NP, en revanche peu de choses sont connues sur les structures secondaires (et tertiaires) de ces

ARNv. En effet, K. Klumpp et ses collaborateurs affirment que la séquence primaire de l'ARNv n'influe pas sur la structure des RNPv, qui serait déterminée par les polymères de protéines NP (115). Cependant, en 1990, l'équipe de K. Yamanaka montre lors d'un test de digestion qu'il existe dans les RNPv des virus influenza des structures en double brin (249).

A. Honda et ses collaborateurs ont montré que les protéines NP étaient essentielles pour l'élongation des transcrits et que la réplication était altérée par l'absence de protéines NP (95). Le processus de transcription/traduction semble indépendant de la protéine NP. Les segments NA contenant le gène *gfp* sont reconnus par le complexe polymérase viral car une fluorescence est observée. Cependant, l'activité de réplication de ce même complexe n'a pas été vérifiée. Dans le cas où les protéines NP ne se lieraient pas aux segments NA contenant le gène *gfp*, nous pourrions avoir un phénomène de transcription/traduction mais non de réplication. Ainsi, des structures secondaires dans l'ARNv contenant le transgène *gfp* pourraient altérer la réplication mais non la synthèse de protéines GFP, observées au microscope à fluorescence, et, de même, gêner au du site d'empaquetage pour l'incorporation du segment.

Les virus PR8 et A/WSN/33 peuvent incorporer des segments NA de sous-type N1 exprimant une protéine GFP (69, 72, 238). L'origine des gènes *gfp* utilisés au cours de ces études n'est pas forcément mentionnée. En effet, Y. Fujii et ses collaborateurs mentionnent uniquement le nom de l'entreprise commercialisant le plasmide contenant le gène *gfp* (99 plasmides référencés dans les bases de données permettant d'extraire un gène *gfp*) (69). Ainsi, bien que tous les gènes *gfp* soient assez conservés, des mutations ponctuelles pourraient modifier le processus d'empaquetage. De plus, les segments NA de type 1 et 2 sont très différents du point de vue de leur séquence. L'insertion d'un transgène *gfp* dans un segment NA de type 2 pourrait conduire à la formation de séquences ou structures « poison », rendant impossible leur incorporation. Aucune étude n'a à ce jour été menée sur l'incorporation d'un segment NA de type N2 dans les virus influenza de type A. Il est possible d'imaginer que le sous-type viral du segment utilisé a un impact sur l'incorporation du segment.

Les mécanismes régissant l'incorporation d'un segment étranger dans le génome des virus influenza de type A sont loin d'être entièrement compris. Outre les séquences terminales des segments (tout du moins pour le segment NA), il semble exister des pré-requis au niveau de la séquence interne également. La séquence interne participe à l'empaquetage du segment, permettant ainsi d'expliquer pourquoi dans notre étude les segments contenant le transgène *gfp* ne sont pas incorporés, à l'inverse de ceux exprimant un autre gène rapporteur, tel que *luc* ou *cat*. L'empaquetage de segment contenant un gène *gfp* peut être sous-type dépendant ou

souche-spécifique, les virus PR8 et A/WSN/33 incorporant de tels segments. Aucune étude n'a été publiée sur des virus influenza vecteurs basés sur des virus circulants, et notre étude ne peut donc se baser que sur des travaux antérieurs effectués sur des virus dits de laboratoire, possédant peut-être des mécanismes régissant l'incorporation différents.

L'analyse des sémences vaccinales grippales ainsi que la construction d'un virus influenza répliquatif montrent à quel point nos connaissances sur le phénomène d'emballage des segments des virus influenza de type A sont loin d'être élucidées. En effet, bien que les extrémités des segments possèdent un rôle dans leur emballage, la contribution des régions internes serait également à envisager. Nos travaux nous ont permis de mettre en évidence des interactions probables entre segments lors de réassortiments (NA-PB1, HA-PB1). De plus, l'incorporation différentielle de segments NA modifiés contenant différents transgènes semble corroborer l'importance des régions internes dans les processus d'emballage des segments des virus influenza de type A. Notre étude a également montré que les conclusions tirées des travaux menés sur les virus A/WSN/33 (H1N1) ou PR8 peuvent-elles être appliquées aux virus circulants, qu'ils soient humains, porcins ou aviaires.

Perspectives.

Nos connaissances sur l’empaquetage des segments des virus influenza de type A sont minces. En effet, si la plupart des travaux sur ce sujet font référence à des régions d’empaquetage situées au niveau des extrémités, codantes ou non codantes, peu sont enclines à admettre l’existence de signaux internes. Or ces régions internes semblent favoriser l’incorporation sélective du segment PB1 d’origine A(H3N2) dans le cas d’un réassortiment. La détermination de ses régions internes, pour chaque segments si elles existent permettraient de mieux comprendre les phénomènes d’empaquetage et de réassortiment. De même, dans le cas où les vaccins antigrippaux seraient produits sur cellules et non plus sur œufs de poule, grâce à la technique de la génétique inverse, ces interactions hétérologues (entre segments de virus de sous-types différents) doivent être éclaircies de manière à produire des souches vaccinales stables, ayant un fort pouvoir répliatif ...

Une étude semblable pourrait être menée sur les souches vaccinales de sous-type H1N1, non étudiées ici. Il semblerait en effet que l’incorporation des segments soit sous-type spécifique et d’autres segments provenant des souches de référence seraient incorporés suite à une coinfection A(H1N1)xA(H1N1).

L’incorporation de segments hétérologues possédant un transgène permettra de suivre l’infection d’un virus influenza de type A *in vivo*. Une caractérisation plus fine du virus H3N-comportant un transgène *luciférase* pourra aboutir à une étude *in vivo* sur souris. L’imagerie en bioluminescence est basée sur la détection de la lumière émise lors de la catalyse par l’enzyme luciférase de son substrat la luciférine. Cette méthode offre la possibilité d’imager l’expression du gène de la luciférase *in vivo* de façon non invasive et ainsi d’analyser la régulation d’un gène endogène, d’évaluer l’efficacité d’un protocole de thérapie génique ou de suivre l’expression de la luciférase apportée *in trans* par un virus recombinant par exemple (171, 200, 226). Son efficacité en tant que vecteur, ou vecteur vaccin, pourra également être testée. Cette piste pourra être approfondie avec la caractérisation virologique du virus H3N-en tant que vecteur, tant au niveau du pourcentage d’incorporation de son insert, qu’au niveau de sa pathogénicité. Le fait que ces virus soient des virus à ARN nécessite de contrôler après de multiples passages, *in vitro* ainsi que *in vivo*, la persistance du transgène.

Les virus influenza de type A ont été évalués en tant que vecteurs viraux dans le cas de plusieurs maladies infectieuses (28, 44, 204), ou encore de cancer (213, 257). Ils provoquent des réponses immunitaires ciblées au niveau de leur site de répliation mais également au niveau des muqueuses. Deux équipes, celle de Y. Kawaoka et celle de P. Palese ont notamment remplacé le gène *ha* de virus A(H1N1) par des gènes codant pour des glycoprotéines exogènes, respectivement la protéine G du *vesicular stomatitis virus* (238) ou

la protéine HEF des virus influenza de type C (72). Des virus influenza de type A présentant d'autres protéines de surface pourraient être un bon objet d'études portant sur le tropisme de tels virus modifiés. La mise en place de la génétique inverse permet de les manipuler relativement facilement. Ainsi, il est possible d'augmenter l'expression du transgène par ajout d'une séquence IRES (*internal ribosome entry site*) dans le cas où cette expression ne serait pas suffisante pour étudier l'expression *in vivo* par exemple.

Une étude sur le transgène *gfp* permettrait également de mieux comprendre les restrictions observées au cours de ce travail, concernant l'incorporation des segments NA GFP. Des mutations diminuant le *ratio* en bases GC pourraient être effectuées (gène *gfp* optimisé), afin de vérifier notre hypothèse de travail.

Annexe.

Virologie

Vol. 13
n° spécial
avril 2009

XI^{es} JOURNÉES
FRANCOPHONES
DE VIROLOGIE
23-24 avril 2009

Faculté des sciences
pharmaceutiques et biologiques
Université Paris-Descartes



Avec le parrainage
de la Société Française
de Microbiologie

www.jfe.com



ISSN n° 1267-8494

P81

Construction de Virus Influenza GFP compétent pour la réplication

Bergeron C, Ottmann M, Yver M, Ferraris O, Lina B, Moulès V
Laboratoire de virologie et pathologie humaine, UCB-CNRS FRE 3011,
Faculté de médecine RTH Laennec, Lyon, France.
<bergeron_corinne@hotmail.com>

Les génomes viraux pouvant intégrer un transgène constituent un outil de grande valeur pour l'étude de la physiopathologie virale (marqueur GFP: Green Fluorescent Protein). Des systèmes artificiels existent pour les virus Influenza mais ils utilisent des virus défectifs où le squelette d'un segment a été utilisé pour y insérer le gène GFP. Dans ce cas, la production virale est réalisée dans une lignée MDCK transcomplémentante pour le gène viral manquant (Marsh J Virol. 2007 81 :9727-36; Rimmelzwaan Virus Res. 2007 129:175-81).

Des virus Influenza A dépourvus de segment 6 codant la Neuraminidase (NA) à l'état natif (virus A H3N0) ont été isolés de patients et caractérisés dans notre laboratoire. Un de ces virus Influenza répliquatifs a été utilisé pour la production d'un système de génétique inverse permettant la production de virus A (H3N0) *in vitro*. L'ajout d'un segment de gène recombiné NA-GFP nous a permis d'obtenir des virus Influenza humains infectieux exprimant la protéine GFP. Les caractéristiques de ces virus sont présentées ici.

Les segments de gènes du virus A (H3N0) de la souche A/Réunion/786/2003 ont été obtenus par RT-PCR et clonés dans un plasmide pHW2000 (Hoffmann, PNAS 2000). Le segment 6 (NA) de la souche prototype de référence A (H3N2) de l'année 2004, a été cloné dans pHW2000 où une partie de la séquence codante de NA a été remplacée par le gène codant la GFP: l'ARN viral synthétisé contient le gène de la GFP encadré par les séquences de packaging du segment 6. Plusieurs constructions, dans des contextes transcriptionnels et traductionnels différents, ont été réalisées.

Les virus recombinants produits en génétique inverse ont été obtenus par transfection de cellules 293T avec les 7 plasmides contenant les segments de gènes du virus A (H3N0) et le plasmide NA-GFP.

La cinétique de réplication des virus recombinants a été établie par RT-qPCR.

Le taux d'incorporation du segment NA-GFP dans les particules virales a été analysé sur plusieurs passages successifs sur cellules MDCK. Le nombre de plages de lyse positives pour la GFP a été rapporté à la totalité des plages de lyses dénombrées par immunofluorescence anti-NP.

La transfection des cellules 293T avec le plasmide NA-GFP et les plasmides codant pour le complexe polymérase (PB1, PB2, PA) et la nucléoprotéine (NP) a permis de visualiser la GFP, confirmant la fonctionnalité du segment pour l'expression du transgène.

Les virus Influenza GFP recombinants ont été produits, titrés et leur cinétique de réplication établie.

Les virus recombinants produits par génétique inverse supportent plusieurs cycles répliquatifs dans les cellules MDCK tout en conservant l'expression du transgène.

L'incorporation et l'expression d'un gène rapporteur par un virus Influenza A humain répliquatif a été rendue possible grâce à l'identification d'une souche virale déficiente en Neuraminidase due à l'absence du segment correspondant.

L'exploitation de cet outil permettra d'obtenir de nouvelles données sur la physiopathologie de l'infection par les virus Influenza A.

Construction de Virus Influenza GFP compétent pour la réplication

BERGERON C, OTTMANN M, LAMSADDAR S, YVER M, FERRARIS O, LINA B, MOULÈS V.

Laboratoire de Virologie et Pathologie Humaine, UCB-CNRS FRE 3011,
Faculté de Médecine RTH Laennec, 69 372 LYON cedex 08 France.

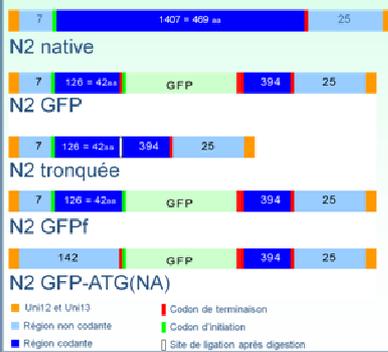
Les virus influenza sont des virus enveloppés, dont le génome est constitué de 8 segments d'ARN de polarité négative. Une partie du gène de la neuraminidase (NA) du génome des virus influenza peut être remplacée par le gène *gfp* pour le virus A/WSN/33 (H1N1) (Watanabe, J. Virol. 2003 ; Shinya, J. Virol. 2004) ou avec A/Puerto Rico/8/34 (H1N1, PR8) (Gao, J. Virol. 2008). Le gène *gfp* a été inséré en conservant la région non codante ainsi qu'une partie de la région codante du gène de la NA. L'isolement d'un virus natif ne comportant pas de NA (H3N-) nous a permis d'envisager de lui rajouter un segment exprimant la GFP.

Objectifs : 1 : Vérifier l'incorporation d'un segment N2 d'un virus H3N2 (A/Moscou/10/99) dans le virus H3N-.

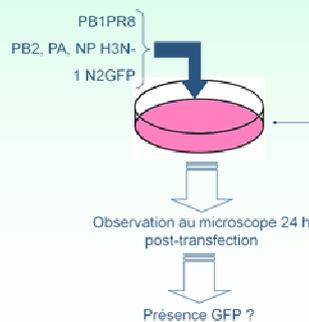
2 : Tester l'incorporation de constructions contenant le gène *gfp* (inséré dans le segment N2 de A/Moscou/10/99).

Méthodologie

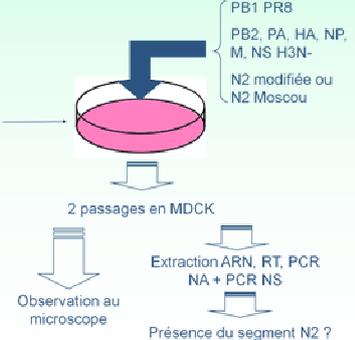
Segments en ADNc des N2 de A/Moscou/10/99 natives et modifiées



Test de fonctionnalité des N2GFP

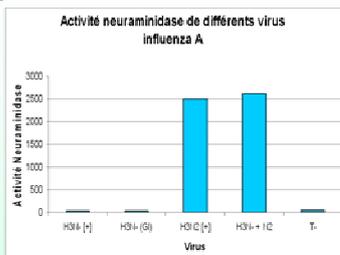


Génétique inverse : production de virus

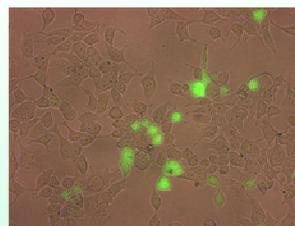


Résultats

1 - Le virus H3N- produit par génétique inverse peut incorporer un segment de gène N2



2 - Les constructions N2GFP sont fonctionnelles dans le contexte transcriptionnel (complexe polymérase = PB1 (PR8) + (PB2, PA, NP) H3N-).



3 - Les segments N2GFP ne sont pas incorporés dans le virion :

- Test HA positif => production de virus,
- Observation au microscope à fluorescence => pas de GFP,
- RT-PCR NA et NA sur les virus produits en génétique inverse.



Conclusion

La génétique inverse permet de produire *in vitro* des virus H3N-. Nous avons montré que ces virus sont capables d'incorporer le segment de gène NA d'un virus H3N2 (Résultat 1). Les segments GFP dérivés du segment N2, reconnus par le complexe polymérase viral, induisent l'expression de GFP fonctionnelle (Résultat 2). Ainsi la base pour la construction de vecteurs influenza répliquatifs exprimant une GFP est validée.

Cependant, il semblerait que ces segments ne soient pas incorporés dans les virions (Résultat 3). Cette absence d'incorporation peut être due à un fond génétique inadéquat (PB1 de PR8), à la suppression des séquences nécessaires à l'emballage du segment recombiné ou encore à l'apparition de structures secondaires au niveau de l'ARN viral.



Bibliographie.

1. **Akarsu, H., W. P. Burmeister, C. Petosa, I. Petit, C. W. Müller, R. W. H. Ruigrok, and F. Baudin.** 2003. Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *EMBO J* **22**:4646-4655.
2. **Akkina, R. K., J. C. Richardson, M. C. Aguilera, and C. M. Yang.** 1991. Heterogeneous forms of polymerase proteins exist in influenza A virus-infected cells. *Virus Res* **19**:17-30.
3. **Al-Garib, S. O., A. L. Gielkens, E. Gruys, B. P. Peeters, and G. Koch.** 2003. Tissue tropism in the chicken embryo of non-virulent and virulent Newcastle diseases strains that express green fluorescence protein. *Avian Pathol* **32**:591-6.
4. **Albo, C., A. Valencia, and A. Portela.** 1995. Identification of an RNA binding region within the N-terminal third of the influenza A virus nucleoprotein. *J Virol* **69**:3799-3806.
5. **Ali A., A. R. T., Ponimaskin E. Nayak D.P.** 2000. Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J Virol*. **74(18)**:8709-19.
6. **André, G.** 1908. La grippe, ou, Influenza.
7. **Andrewes, C., and W. Smith.** 1937. influenza: further experiments on the active immunization of mice. *Brit. J. Exp. Pathol.* **18**:43.
8. **Area, E., J. Martín-Benito, P. Gastaminza, E. Torreira, J. M. Valpuesta, J. L. Carrascosa, and J. Ortín.** 2004. 3D structure of the influenza virus polymerase complex: localization of subunit domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:308-313.
9. **Bancroft, C. T., and T. G. Parslow.** 2002. Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza a virus genome. *J Virol* **76**:7133-7139.
10. **Bardiya, N., and J. H. Bae.** 2005. Influenza vaccines: recent advances in production technologies. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**:299-305.
11. **Barman, S., L. Adhikary, Y. Kawaoka, and D. P. Nayak.** 2003. Influenza A virus hemagglutinin containing basolateral localization signal does not alter the apical budding of a recombinant influenza A virus in polarized MDCK cells. *Virology* **305**:138-152.
12. **Barry, J.** 2004. The site of origin of the 1918 influenza pandemic and its public health implications. *J Transl Med* **2**:3.
13. **Bean, B., B. M. Moore, B. Sterner, L. R. Peterson, D. N. Gerding, and H. H. Balfour, Jr.** 1982. Survival of influenza viruses on environmental surfaces. *J Infect Dis* **146**:47-51.
14. **Beaton, A. R., and R. M. Krug.** 1986. Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:6282-6286.
15. **Bennett, V. L., A. V. Juorio, and X. M. Li.** 1999. Possible new mechanism for the antiparkinsonian effect of amantadine. *J Psychiatry Neurosci* **24**:52-3.
16. **Bergmann, M., and T. Muster.** 1995. The relative amount of an influenza A virus segment present in the viral particle is not affected by a reduction in replication of that segment. *J Gen Virol* **76 (Pt 12)**:3211-3215.
17. **Biswas, S. K., P. L. Boutz, and D. P. Nayak.** 1998. Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J Virol* **72**:5493-5501.
18. **Biswas, S. K., and D. P. Nayak.** 1996. Influenza virus polymerase basic protein 1 interacts with influenza virus polymerase basic protein 2 at multiple sites. *J Virol* **70**:6716-6722.
19. **Blaas, D., E. Patzelt, and E. Kuechler.** 1982. Identification of the cap binding protein of influenza virus. *Nucleic Acids Res* **10**:4803-4812.
20. **Bright, R. A., M. jo Medina, X. Xu, G. Perez-Oronoz, T. R. Wallis, X. M. Davis, L. Povinelli, N. J. Cox, and A. I. Klimov.** 2005. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet* **366**:1175-1181.

21. **Brower-Sinning, R., D. M. Carter, C. J. Crevar, E. Ghedin, T. M. Ross, and P. V. Benos.** 2009. The role of RNA folding free energy in the evolution of the polymerase genes of the influenza A virus. *Genome Biol* **10**:R18.
22. **Bruns, K., N. Studtrucker, A. Sharma, T. Fossen, D. Mitzner, A. Eissmann, U. Tessmer, R. Röder, P. Henklein, V. Wray, and U. Schubert.** 2007. Structural characterization and oligomerization of PB1-F2, a proapoptotic influenza A virus protein. *J Biol Chem* **282**:353-363.
23. **Bui, M., G. Whittaker, and A. Helenius.** 1996. Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *J Virol* **70**:8391-401.
24. **Bullido, R., P. Gómez-Puertas, M. J. Saiz, and A. Portela.** 2001. Influenza A virus NEP (NS2 protein) downregulates RNA synthesis of model template RNAs. *J Virol* **75**:4912-4917.
25. **Carr, J., J. Ives, L. Kelly, R. Lambkin, J. Oxford, D. Mendel, L. Tai, and N. Roberts.** 2002. Influenza virus carrying neuraminidase with reduced sensitivity to oseltamivir carboxylate has altered properties in vitro and is compromised for infectivity and replicative ability in vivo. *Antiviral Res* **54**:79-88.
26. **Carrasco, M., M. J. Amorim, and P. Digard.** 2004. Lipid raft-dependent targeting of the influenza A virus nucleoprotein to the apical plasma membrane. *Traffic* **5**:979-992.
27. **Carrat, F., and A. Flahault.** 2007. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine* **25**:6852-6862.
28. **Castrucci, M. R., S. Hou, P. C. Doherty, and Y. Kawaoka.** 1994. Protection against lethal lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infection by immunization of mice with an influenza virus containing an LCMV epitope recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* **68**:3486-90.
29. **Chang, L.-Y., S.-R. Shih, P.-L. Shao, D. T.-N. Huang, and L.-M. Huang.** 2009. Novel Swine-origin Influenza Virus A (H1N1): The First Pandemic of the 21st Century. *J Formos Med Assoc* **108**:526-532.
30. **Charpilienne, A., M. Nejmeddine, M. Berois, N. Parez, E. Neumann, E. Hewat, G. Trugnan, and J. Cohen.** 2001. Individual rotavirus-like particles containing 120 molecules of fluorescent protein are visible in living cells. *J Biol Chem* **276**:29361-7.
31. **Chen, B. J., G. P. Leser, D. Jackson, and R. A. Lamb.** 2008. The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding. *J Virol* **82**:10059-70.
32. **Chen, B. J., G. P. Leser, E. Morita, and R. A. Lamb.** 2007. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. *J Virol* **81**:7111-7123.
33. **Chen, W., P. A. Calvo, D. Malide, J. Gibbs, U. Schubert, I. Bacik, S. Basta, R. O'Neill, J. Schickli, P. Palese, P. Henklein, J. R. Bennink, and J. W. Yewdell.** 2001. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* **7**:1306-1312.
34. **Colman, P. M., J. N. Varghese, and W. G. Laver.** 1983. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* **303**:41-44.
35. **Cologna, R., and B. G. Hogue.** 2000. Identification of a bovine coronavirus packaging signal. *J Virol* **74**:580-3.
36. **Coloma, R., J. M. Valpuesta, R. Arranz, J. L. Carrascosa, J. Ortin, and J. Martin-Benito.** 2009. The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. *PLoS Pathog* **5**:e1000491.
37. **Commission on Influenza, B. o. i., and o. e. d. i. t. Army.** 1944. A clinical evaluation of vaccination against influenza. *J Am Med Assoc* **124**:982.
38. **Compans, R. W., J. Content, and P. H. Duesberg.** 1972. Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol* **10**:795-800.

39. **Conenello, G. M., D. Zamarin, L. A. Perrone, T. Tumpey, and P. Palese.** 2007. A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog* **3**:1414-1421.
40. **Cros, J. F., A. García-Sastre, and P. Palese.** 2005. An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic* **6**:205-213.
41. **Crosby, A. W.** 1989. *America's Forgotten Pandemic: The Influenza of 1918.* Cambridge University Press.
42. **D'Souza, V., and M. F. Summers.** 2005. How retroviruses select their genomes. *Nat Rev Microbiol* **3**:643-55.
43. **Davenport, F. M.** 1979. The search for the ideal influenza vaccine. *Postgraduate Medical Journal* **55**:78-86.
44. **de Goede, A. L., P. H. Boers, L. J. Dekker, A. D. Osterhaus, R. A. Gruters, and G. F. Rimmelzwaan.** 2009. Characterization of recombinant influenza A virus as a vector for HIV-1 p17Gag. *Vaccine* **27**:5735-9.
45. **de la Luna, S., P. Fortes, A. Beloso, and J. Ortín.** 1995. Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J Virol* **69**:2427-2433.
46. **de Wit, E., M. I. Spronken, G. F. Rimmelzwaan, A. D. Osterhaus, and R. A. Fouchier.** 2006. Evidence for specific packaging of the influenza A virus genome from conditionally defective virus particles lacking a polymerase gene. *Vaccine* **24**:6647-50.
47. **Dos Santos Afonso, E., N. Escriou, I. Leclercq, S. van der Werf, and N. Naffakh.** 2005. The generation of recombinant influenza A viruses expressing a PB2 fusion protein requires the conservation of a packaging signal overlapping the coding and noncoding regions at the 5' end of the PB2 segment. *Virology* **341**:34-46.
48. **Doucette, K. E., and F. Y. Aoki.** 2001. Oseltamivir: a clinical and pharmacological perspective. *Expert Opin Pharmacother* **2**:1671-1683.
49. **Drake, J. W.** 1993. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:4171-4175.
50. **Eisenmeger, G.** 1941. *Sciences naturelles - Anatomie et Physiologie Humaines - Hygiène. Classe de troisième des lycées et collèges.*
51. **Elton, D., M. Simpson-Holley, K. Archer, L. Medcalf, R. Hallam, J. McCauley, and P. Digard.** 2001. Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol* **75**:408-419.
52. **Enami, K., T. A. Sato, S. Nakada, and M. Enami.** 1994. Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J Virol* **68**:1432-7.
53. **Enami M, E. K.** 1996. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins stimulate the membrane association of the matrix protein. *J Virol* **70(10)**:6653-7.
54. **Enami, M., R. Fukuda, and A. Ishihama.** 1985. Transcription and replication of eight RNA segments of influenza virus. *Virology* **142**:68-77.
55. **Enami, M., G. Sharma, C. Benham, and P. Palese.** 1991. An influenza virus containing nine different RNA segments. *Virology* **185**:291-298.
56. **Ferguson, N. M., A. P. Galvani, and R. M. Bush.** 2003. Ecological and immunological determinants of influenza evolution. *Nature* **422**:428-433.
57. **Ferraris, O., N. Kessler, M. Valette, and B. Lina.** 2006. Evolution of the susceptibility to antiviral drugs of A/H3N2 influenza viruses isolated in France from 2002 to 2005. *Vaccine* **24**:6656-9.
58. **Fiers, W., M. D. Filette, A. Birkett, S. Neiryneck, and W. M. Jou.** 2004. A "universal" human influenza A vaccine. *Virus Res* **103**:173-176.
59. **Fodor, E., M. Crow, L. J. Mingay, T. Deng, J. Sharps, P. Fechter, and G. G. Brownlee.** 2002. A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza

- virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs. *J Virol* **76**:8989-9001.
60. **Fodor, E., L. J. Mingay, M. Crow, T. Deng, and G. G. Brownlee.** 2003. A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase promotes the generation of defective interfering RNAs. *J Virol* **77**:5017-20.
 61. **Fodor, E., D. C. Pritlove, and G. G. Brownlee.** 1994. The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. *J Virol* **68**:4092-4096.
 62. **Fodor, E., B. L. Seong, and G. G. Brownlee.** 1993. Photochemical cross-linking of influenza A polymerase to its virion RNA promoter defines a polymerase binding site at residues 9 to 12 of the promoter. *J Gen Virol* **74 (Pt 7)**:1327-1333.
 63. **Fodor, E., and M. Smith.** 2004. The PA subunit is required for efficient nuclear accumulation of the PB1 subunit of the influenza A virus RNA polymerase complex. *J Virol* **78**:9144-53.
 64. **Fortes, P., A. Beloso, and J. Ortín.** 1994. Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. *EMBO J* **13**:704-712.
 65. **Fouchier, R. A. M., V. Munster, A. Wallensten, T. M. Bestebroer, S. Herfst, D. Smith, G. F. Rimmelzwaan, B. Olsen, and A. D. M. E. Osterhaus.** 2005. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* **79**:2814-2822.
 66. **Francis, F., and T. Magill.** 1935. IMMUNOLOGICAL STUDIES WITH THE VIRUS OF INFLUENZA. *J Exp Med* **62**:505.
 67. **Freund, B., S. Gravenstein, M. Elliott, and I. Miller.** 1999. Zanamivir: a review of clinical safety. *Drug Saf* **21**:267-281.
 68. **Fujii, K., Y. Fujii, T. Noda, Y. Muramoto, T. Watanabe, A. Takada, H. Goto, T. Horimoto, and Y. Kawaoka.** 2005. Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J Virol* **79**:3766-3774.
 69. **Fujii, Y., H. Goto, T. Watanabe, T. Yoshida, and Y. Kawaoka.** 2003. Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:2002-2007.
 70. **Furuse, Y., A. Suzuki, T. Kamigaki, and H. Oshitani.** 2009. Evolution of the M gene of the influenza A virus in different host species: large-scale sequence analysis. *Virol J* **6**:67.
 71. **Gambaryan, A. S., A. I. Karasin, A. B. Tuzikov, A. A. Chinarev, G. V. Pazynina, N. V. Bovin, M. N. Matrosovich, C. W. Olsen, and A. I. Klimov.** 2005. Receptor-binding properties of swine influenza viruses isolated and propagated in MDCK cells. *Virus Res* **114**:15-22.
 72. **Gao, Q., E. W. Brydon, and P. Palese.** 2008. A seven-segmented influenza A virus expressing the influenza C virus glycoprotein HEF. *J Virol* **82**:6419-26.
 73. **Gao, Q., and P. Palese.** 2009. Rewiring the RNAs of influenza virus to prevent reassortment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:15891-6.
 74. **Gao, Q., M. S. Park, and P. Palese.** 2008. Expression of transgenes from newcastle disease virus with a segmented genome. *J Virol* **82**:2692-8.
 75. **Garaigorta, U., A. M. Falcón, and J. Ortín.** 2005. Genetic analysis of influenza virus NS1 gene: a temperature-sensitive mutant shows defective formation of virus particles. *J Virol* **79**:15246-15257.
 76. **Garcia-Sastre, A., A. Egorov, D. Matassov, S. Brandt, D. E. Levy, J. E. Durbin, P. Palese, and T. Muster.** 1998. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* **252**:324-30.
 77. **Garcia, C. S., R. E. Curiel, J. M. Mwatibo, S. Pestka, H. Li, and I. Espinoza-Delgado.** 2006. The antineoplastic agent bryostatin-1 differentially regulates IFN-gamma receptor subunits in monocytic cells: transcriptional and posttranscriptional control of IFN-gamma R2. *J Immunol* **177**:2707-2716.

78. **Gibbs, J. S., D. Malide, F. Hornung, J. R. Bennink, and J. W. Yewdell.** 2003. The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *J Virol* **77**:7214-7224.
79. **Gómez-Puertas, P., C. Albo, E. Pérez-Pastrana, A. Vivo, and A. Portela.** 2000. Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol* **74**:11538-11547.
80. **González, and Ortín.** 1999. Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *EMBO J* **18**:3767-75.
81. **Gorman, O. T., R. O. Donis, Y. Kawaoka, and R. G. Webster.** 1990. Evolution of influenza A virus PB2 genes: implications for evolution of the ribonucleoprotein complex and origin of human influenza A virus. *J Virol* **64**:4893-4902.
82. **Greenbaum, B. D., A. J. Levine, G. Bhanot, and R. Rabadan.** 2008. Patterns of evolution and host gene mimicry in influenza and other RNA viruses. *PLoS Pathog* **4**:e1000079.
83. **Guo, Z., L. M. Chen, H. Zeng, J. A. Gomez, J. Plowden, T. Fujita, J. M. Katz, R. O. Donis, and S. Sambhara.** 2007. NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. *Am J Respir Cell Mol Biol* **36**:263-9.
84. **Hampson, A. W., and J. S. Mackenzie.** 2006. The influenza viruses. *Med J Aust* **185**:S39-S43.
85. **Hannoun, C., F. Megas, and J. Piercy.** 2004. Immunogenicity and protective efficacy of influenza vaccination. *Virus Res* **103**:133-138.
86. **Haque, M. E., V. Koppaka, P. H. Axelsen, and B. R. Lentz.** 2005. Properties and structures of the influenza and HIV fusion peptides on lipid membranes: implications for a role in fusion. *Biophys J* **89**:3183-3194.
87. **Hara, K., M. Shiota, H. Kido, Y. Ohtsu, T. Kashiwagi, J. Iwahashi, N. Hamada, K. Mizoue, N. Tsumura, H. Kato, and T. Toyoda.** 2001. Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 at the active site. *Genes Cells* **6**:87-97.
88. **Harrison, S. C.** 2008. Viral membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* **15**:690-8.
89. **Hemerka, J. N., D. Wang, Y. Weng, W. Lu, R. S. Kaushik, J. Jin, A. F. Harmon, and F. Li.** 2009. Detection and characterization of influenza A virus PA-PB2 interaction through a bimolecular fluorescence complementation assay. *J Virol* **83**:3944-3955.
90. **Hilleman, M. R.** 2001. Current overview of the pathogenesis and prophylaxis of measles with focus on practical implications. *Vaccine* **20**:651-65.
91. **Hillman, M.** 2002. Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, Epidemiology and control. *Vaccine* **20**:3068-3087.
92. **Hippocrate.** Oeuvres complètes d'Hippocrate (traduction par É. Littré). Elibron classique.
93. **Hoffmann, E., and R. G. Webster.** 2000. Unidirectional RNA polymerase I-polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids. *J Gen Virol* **81**:2843-7.
94. **Holsinger, L. J., and R. A. Lamb.** 1991. Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology* **183**:32-43.
95. **Honda, A., K. Ueda, K. Nagata, and A. Ishihama.** 1988. RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J Biochem* **104**:1021-6.
96. **Honda, A., K. Ueda, K. Nagata, and A. Ishihama.** 1988. RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J Biochem* **104**:1021-1026.
97. **Huang, T. S., P. Palese, and M. Krystal.** 1990. Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J Virol* **64**:5669-73.

98. **Huang, T. S., P. Palese, and M. Krystal.** 1990. Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J Virol* **64**:5669-5673.
99. **Huang, X., T. Liu, J. Muller, R. A. Levandowski, and Z. Ye.** 2001. Effect of influenza virus matrix protein and viral RNA on ribonucleoprotein formation and nuclear export. *Virology* **287**:405-416.
100. **Huarte, M., A. Falcón, Y. Nakaya, J. Ortín, A. García-Sastre, and A. Nieto.** 2003. Threonine 157 of influenza virus PA polymerase subunit modulates RNA replication in infectious viruses. *J Virol* **77**:6007-6013.
101. **Hughes, M. T., M. McGregor, T. Suzuki, Y. Suzuki, and Y. Kawaoka.** 2001. Adaptation of influenza A viruses to cells expressing low levels of sialic acid leads to loss of neuraminidase activity. *J Virol* **75**:3766-70.
102. **Inglis, S. C., T. Barrett, C. M. Brown, and J. W. Almond.** 1979. The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:3790-3794.
103. **Inglis, S. C., and B. W. Mahy.** 1979. Polypeptides specified by the influenza virus genome. 3. Control of synthesis in infected cells. *Virology* **95**:154-64.
104. **Ito, T., Y. Kawaoka, M. Ohira, H. Takakuwa, J. Yasuda, H. Kida, and K. Otsuki.** 1999. Replacement of internal protein genes, with the exception of the matrix, in equine 1 viruses by equine 2 influenza virus genes during evolution in nature. *J Vet Med Sci* **61**:987-989.
105. **Ives, J. A. L., J. A. Carr, D. B. Mendel, C. Y. Tai, R. Lambkin, L. Kelly, J. S. Oxford, F. G. Hayden, and N. A. Roberts.** 2002. The H274Y mutation in the influenza A/H1N1 neuraminidase active site following oseltamivir phosphate treatment leave virus severely compromised both in vitro and in vivo. *Antiviral Res* **55**:307-317.
106. **Jefferson, T., V. Demicheli, C. Di Pietrantonj, and D. Rivetti.** 2006. Amantadine and rimantadine for influenza A in adults. *Cochrane Database Syst Rev*:CD001169.
107. **Jin, H., G. P. Leser, J. Zhang, and R. A. Lamb.** 1997. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase cytoplasmic tails control particle shape. *EMBO J* **16**:1236-1247.
108. **Johnson, N., and J. Mueller.** 2002. Updating the accounts: global mortality of the 1918–1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med* **76**:105-15.
109. **Kawaguchi, A., T. Naito, and K. Nagata.** 2005. Involvement of influenza virus PA subunit in assembly of functional RNA polymerase complexes. *J Virol* **79**:732-744.
110. **Kawaoka, Y., S. Krauss, and R. G. Webster.** 1989. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* **63**:4603-4608.
111. **Kemler, I., G. Whittaker, and A. Helenius.** 1994. Nuclear import of microinjected influenza virus ribonucleoproteins. *Virology* **202**:1028-1033.
112. **Khiabani H, T. V., Rabadan R.** 2009. Inter-Host Reassortment Patterns in Swine Influenza Viruses.
113. **Kittel, C., B. Ferko, M. Kurz, R. Voglauer, S. Sereinig, J. Romanova, G. Stiegler, H. Katinger, and A. Egorov.** 2005. Generation of an influenza A virus vector expressing biologically active human interleukin-2 from the NS gene segment. *J Virol* **79**:10672-7.
114. **Kittel, C., S. Sereinig, B. Ferko, J. Stasakova, J. Romanova, A. Wolkerstorfer, H. Katinger, and A. Egorov.** 2004. Rescue of influenza virus expressing GFP from the NS1 reading frame. *Virology* **324**:67-73.
115. **Klumpp, K., R. W. Ruigrok, and F. Baudin.** 1997. Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *EMBO J* **16**:1248-57.

116. **Kolpashchikov, D. M., A. Honda, and A. Ishihama.** 2004. Structure-function relationship of the influenza virus RNA polymerase: primer-binding site on the PB1 subunit. *Biochemistry* **43**:5882-5887.
117. **Koudstaal, W., L. Hartgroves, M. Havenga, I. Legastelois, C. Ophorst, M. Sieuwerts, D. Zuijdgeest, R. Vogels, J. Custers, E. de Boer-Luijtz, O. de Leeuw, L. Cornelissen, J. Goudsmit, and W. Barclay.** 2009. Suitability of PER.C6 cells to generate epidemic and pandemic influenza vaccine strains by reverse genetics. *Vaccine* **27**:2588-2593.
118. **Lamb, R. A., and P. W. Choppin.** 1983. The gene structure and replication of influenza virus. *Annu Rev Biochem* **52**:467-506.
119. **Lamb, R. A., and R. M. Krug.** 2001. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In D.M. Knipe and P.M. Howky (eds), *Fields Virology*:1487-1531.
120. **Lamb, R. A., S. L. Zebedee, and C. D. Richardson.** 1985. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface. *Cell* **40**:627-633.
121. **Latham, T., and J. M. Galarza.** 2001. Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. *J Virol* **75**:6154-6165.
122. **Li, C., M. Hatta, S. Watanabe, G. Neumann, and Y. Kawaoka.** 2008. Compatibility among polymerase subunit proteins is a restricting factor in reassortment between equine H7N7 and human H3N2 influenza viruses. *J Virol* **82**:11880-11888.
123. **Li, O. T. W., M. C. W. Chan, C. S. W. Leung, R. W. Y. Chan, Y. Guan, J. M. Nicholls, and L. L. M. Poon.** 2009. Full factorial analysis of mammalian and avian influenza polymerase subunits suggests a role of an efficient polymerase for virus adaptation. *PLoS One* **4**:e5658.
124. **Liang, Y., Y. Hong, and T. G. Parslow.** 2005. cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments. *J Virol* **79**:10348-10355.
125. **Lim, J. K., D. Wooten, R. Siegel, and R. C. Cheung.** 2005. Amantadine in treatment of chronic hepatitis C virus infection? *J Viral Hepat* **12**:445-455.
126. **Liu, J., X. Shi, R. Schwartz, and G. Kemble.** 2009. Use of MDCK cells for production of live attenuated influenza vaccine. *Vaccine*.
127. **Lowen, A. C., S. Mubareka, J. Steel, and P. Palese.** 2007. Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS Pathog* **3**:1470-1476.
128. **Lu, Y., X. Y. Qian, and R. M. Krug.** 1994. The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing. *Genes Dev* **8**:1817-1828.
129. **Lubeck, M. D., P. Palese, and J. L. Schulman.** 1979. Nonrandom association of parental genes in influenza A virus recombinants. *Virology* **95**:269-274.
130. **Ludwig, S., U. Schultz, J. Mandler, W. M. Fitch, and C. Scholtissek.** 1991. Phylogenetic relationship of the nonstructural (NS) genes of influenza A viruses. *Virology* **183**:566-77.
131. **Ludwig, S., X. Wang, C. Ehrhardt, H. Zheng, N. Donelan, O. Planz, S. Pleschka, A. García-Sastre, G. Heins, and T. Wolff.** 2002. The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors. *J Virol* **76**:11166-11171.
132. **Luytjes, W., M. Krystal, M. Enami, J. D. Parvin, and P. Palese.** 1989. Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus. *Cell* **59**:1107-13.
133. **Maines, T. R., A. Jayaraman, J. A. Belser, D. A. Wadford, C. Pappas, H. Zeng, K. M. Gustin, M. B. Pearce, K. Viswanathan, Z. H. Shriver, R. Raman, N. J. Cox, R. Sasisekharan, J. M. Katz, and T. M. Tumpey.** 2009. Transmission and

- Pathogenesis of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses in Ferrets and Mice. Science.
134. **Marcotrigiano, J., A. C. Gingras, N. Sonenberg, and S. K. Burley.** 1997. Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* **89**:951-961.
 135. **Marsh, G. A., R. Rabadan, A. J. Levine, and P. Palese.** 2008. Highly conserved regions of influenza A virus polymerase gene segments are critical for efficient viral RNA packaging. *J Virol* **82**:2295-304.
 136. **Martin, K., and A. Helenius.** 1991. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* **67**:117-130.
 137. **Martin, K., and A. Helenius.** 1991. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J Virol* **65**:232-44.
 138. **Massin, P., S. van der Werf, and N. Naffakh.** 2001. Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses. *J Virol* **75**:5398-5404.
 139. **Matrosovich, M. N., T. Y. Matrosovich, T. Gray, N. A. Roberts, and H.-D. Klenk.** 2004. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol* **78**:12665-12667.
 140. **Matrosovich, M. N., T. Y. Matrosovich, T. Gray, N. A. Roberts, and H. D. Klenk.** 2004. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:4620-4.
 141. **Matsuo, H., H. Li, A. M. McGuire, C. M. Fletcher, A. C. Gingras, N. Sonenberg, and G. Wagner.** 1997. Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein. *Nat Struct Biol* **4**:717-724.
 142. **Matthews, J. T.** 2006. Egg-based production of influenza vaccines: 30 years of commercial experience. *The Bridge*.
 143. **Mazur, I., D. Anhlan, D. Mitzner, L. Wixler, U. Schubert, and S. Ludwig.** 2008. The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell Microbiol* **10**:1140-1152.
 144. **McAuley, J. L., F. Hornung, K. L. Boyd, A. M. Smith, R. McKeon, J. Bennink, J. W. Yewdell, and J. A. McCullers.** 2007. Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell Host Microbe* **2**:240-249.
 145. **McCullers, J. A., and K. C. Bartmess.** 2003. Role of neuraminidase in lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **187**:1000-9.
 146. **McGeoch, D., P. Fellner, and C. Newton.** 1976. Influenza virus genome consists of eight distinct RNA species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**:3045-9.
 147. **McGeoch, D., P. Fellner, and C. Newton.** 1976. Influenza virus genome consists of eight distinct RNA species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**:3045-3049.
 148. **McKimm-Breschkin, J., T. Trivedi, A. Hampson, A. Hay, A. Klimov, M. Tashiro, F. Hayden, and M. Zambon.** 2003. Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:2264-2272.
 149. **McNicholl, I. R., and J. J. McNicholl.** 2001. Neuraminidase inhibitors: zanamivir and oseltamivir. *Ann Pharmacother* **35**:57-70.
 150. **Min, J.-Y., and R. M. Krug.** 2006. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:7100-7105.
 151. **Min, J.-Y., S. Li, G. C. Sen, and R. M. Krug.** 2007. A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. *Virology* **363**:236-243.

152. **Momose, F., Y. Kikuchi, K. Komase, and Y. Morikawa.** 2007. Visualization of microtubule-mediated transport of influenza viral progeny ribonucleoprotein. *Microbes Infect* **9**:1422-33.
153. **Moore, T. F. J. A. E.** 1940. A study of the neurotropic tendency in strains of the virus of epidemic influenza. *J. Exp. Med* **72**:717-728.
154. **Mora, R., E. Rodriguez-Boulan, P. Palese, and A. García-Sastre.** 2002. Apical budding of a recombinant influenza A virus expressing a hemagglutinin protein with a basolateral localization signal. *J Virol* **76**:3544-3553.
155. **Munster, V. J., E. de Wit, J. M. A. van den Brand, S. Herfst, E. J. A. Schrauwen, T. M. Bestebroer, D. van de Vijver, C. A. Boucher, M. Koopmans, G. F. Rimmelzwaan, T. Kuiken, A. D. M. E. Osterhaus, and R. A. M. Fouchier.** 2009. Pathogenesis and Transmission of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Virus in Ferrets. *Science*.
156. **Muramoto, Y., A. Takada, K. Fujii, T. Noda, K. Iwatsuki-Horimoto, S. Watanabe, T. Horimoto, H. Kida, and Y. Kawaoka.** 2006. Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J Virol* **80**:2318-2325.
157. **Naffakh, N., P. Massin, N. Escriou, B. Crescenzo-Chaigne, and S. van der Werf.** 2000. Genetic analysis of the compatibility between polymerase proteins from human and avian strains of influenza A viruses. *J Gen Virol* **81**:1283-1291.
158. **Nath, S. T., and D. P. Nayak.** 1990. Function of two discrete regions is required for nuclear localization of polymerase basic protein 1 of A/WSN/33 influenza virus (H1 N1). *Mol Cell Biol* **10**:4139-4145.
159. **Nguyen, P. A., C. S. Soto, A. Polishchuk, G. A. Caputo, C. D. Tatko, C. Ma, Y. Ohigashi, L. H. Pinto, W. F. DeGrado, and K. P. Howard.** 2008. pH-induced conformational change of the influenza M2 protein C-terminal domain. *Biochemistry* **47**:9934-9936.
160. **Nicholson, K.** 2004. Limitations of currently available influenza vaccines. World Health Organization.
161. **Nicolson, C., D. Major, J. M. Wood, and J. S. Robertson.** 2005. Generation of influenza vaccine viruses on Vero cells by reverse genetics: an H5N1 candidate vaccine strain produced under a quality system. *Vaccine* **23**:2943-2952.
162. **Nieto, A., S. de la Luna, J. Bárcena, A. Portela, and J. Ortín.** 1994. Complex structure of the nuclear translocation signal of influenza virus polymerase PA subunit. *J Gen Virol* **75 (Pt 1)**:29-36.
163. **Noda, T., H. Sagara, A. Yen, A. Takada, H. Kida, R. H. Cheng, and Y. Kawaoka.** 2006. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* **439**:490-492.
164. **Noton, S. L., E. Medcalf, D. Fisher, A. E. Mullin, D. Elton, and P. Digard.** 2007. Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *J Gen Virol* **88**:2280-2290.
165. **O'Neill, R. E., J. Talon, and P. Palese.** 1998. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J* **17**:288-296.
166. **Obayashi, E., H. Yoshida, F. Kawai, N. Shibayama, A. Kawaguchi, K. Nagata, J. R. H. Tame, and S.-Y. Park.** 2008. The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature* **454**:1127-1131.
167. **Odagiri, T., and M. Tashiro.** 1997. Segment-specific noncoding sequences of the influenza virus genome RNA are involved in the specific competition between defective interfering RNA and its progenitor RNA segment at the virion assembly step. *J Virol* **71**:2138-45.
168. **Odagiri, T., and K. Tobita.** 1990. Mutation in NS2, a nonstructural protein of influenza A virus, extragenetically causes aberrant replication and expression of the PA

- gene and leads to generation of defective interfering particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:5988-92.
169. **Odagiri, T., K. Tominaga, K. Tobita, and S. Ohta.** 1994. An amino acid change in the non-structural NS2 protein of an influenza A virus mutant is responsible for the generation of defective interfering (DI) particles by amplifying DI RNAs and suppressing complementary RNA synthesis. *J Gen Virol* **75** (Pt 1):43-53.
 170. **Ohtsu, Y., Y. Honda, Y. Sakata, H. Kato, and T. Toyoda.** 2002. Fine mapping of the subunit binding sites of influenza virus RNA polymerase. *Microbiol Immunol* **46**:167-175.
 171. **Osorio, J. E., K. P. Iams, C. U. Meteyer, and T. E. Rocke.** 2009. Comparison of monkeypox viruses pathogenesis in mice by in vivo imaging. *PLoS One* **4**:e6592.
 172. **Oxford, J., R. Lampkin-Williams, and G. A.** 2008. Influenza vaccines for the future, p. 31-64. *In* R. Rappuoli and G. D. Giudice (ed.). Birhäuser Verlag Basel.
 173. **Ozawa, M., K. Fujii, Y. Muramoto, S. Yamada, S. Yamayoshi, A. Takada, H. Goto, T. Horimoto, and Y. Kawaoka.** 2007. Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication. *J Virol* **81**:30-41.
 174. **Ozawa, M., J. Maeda, K. Iwatsuki-Horimoto, S. Watanabe, H. Goto, T. Horimoto, and Y. Kawaoka.** 2009. Nucleotide sequence requirements at the 5' end of the influenza A virus M RNA segment for efficient virus replication. *J Virol* **83**:3384-3388.
 175. **Palese, P. S., M. L.** 2007. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication., p. 1647-1689. *In* D. M. K. P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, 5th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
 176. **Pante, N., and M. Kann.** 2002. Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell* **13**:425-34.
 177. **Perez, D. R., and R. O. Donis.** 2001. Functional analysis of PA binding by influenza a virus PB1: effects on polymerase activity and viral infectivity. *J Virol* **75**:8127-36.
 178. **Pérez, D. R., and R. O. Donis.** 1995. A 48-amino-acid region of influenza A virus PB1 protein is sufficient for complex formation with PA. *J Virol* **69**:6932-6939.
 179. **Pinto, L. H., L. J. Holsinger, and R. A. Lamb.** 1992. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**:517-528.
 180. **Pleschka, S., R. Jaskunas, O. G. Engelhardt, T. Zurcher, P. Palese, and A. Garcia-Sastre.** 1996. A plasmid-based reverse genetics system for influenza A virus. *J Virol* **70**:4188-92.
 181. **Poch, O., B. M. Blumberg, L. Bougueleret, and N. Tordo.** 1990. Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol* **71** (Pt 5):1153-1162.
 182. **Polozov, I. V., L. Bezrukov, K. Gawrisch, and J. Zimmerberg.** 2008. Progressive ordering with decreasing temperature of the phospholipids of influenza virus. *Nat Chem Biol* **4**:248-255.
 183. **Poon, L. L., D. C. Pritlove, E. Fodor, and G. G. Brownlee.** 1999. Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. *J Virol* **73**:3473-3476.
 184. **Potter, C. W.** 2001. A history of influenza. *J Appl Microbiol* **91**:572-9.
 185. **Pyle, G. F.** 1986. *The diffusion of influenza - Patterns and Paradigms.* Rowman & Littlefield.
 186. **Rabadan, R., A. J. Levine, and H. Robins.** 2006. Comparison of avian and human influenza A viruses reveals a mutational bias on the viral genomes. *J Virol* **80**:11887-91.
 187. **Rameix-Welti, M. A., M. L. Zarantonelli, D. Giorgini, C. Ruckly, M. Marasescu, S. van der Werf, J. M. Alonso, N. Naffakh, and M. K. Taha.** 2009. Influenza A

- virus neuraminidase enhances meningococcal adhesion to epithelial cells through interaction with sialic acid-containing meningococcal capsules. *Infect Immun* **77**:3588-95.
188. **Regan, J. F., Y. Liang, and T. G. Parslow.** 2006. Defective assembly of influenza A virus due to a mutation in the polymerase subunit PA. *J Virol* **80**:252-261.
 189. **Reid, A. H., and J. K. Taubenberger.** 2003. The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma. *J Gen Virol* **84**:2285-2292.
 190. **Richardson, J. C., and R. K. Akkina.** 1991. NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Arch Virol* **116**:69-80.
 191. **Robb, N. C., M. Smith, F. T. Vreede, and E. Fodor.** 2009. The NS2/NEP Protein Regulates Transcription and Replication of the Influenza Virus RNA Genome. *J Gen Virol*.
 192. **Rudenko, L. G., N. H. Arden, E. Grigorieva, A. Naychin, A. Rekestin, A. I. Klimov, S. Donina, J. Desheva, R. C. Holman, A. DeGuzman, N. J. Cox, and J. M. Katz.** 2000. Immunogenicity and efficacy of Russian live attenuated and US inactivated influenza vaccines used alone and in combination in nursing home residents. *Vaccine* **19**:308-18.
 193. **Rudneva, I. A., T. A. Timofeeva, A. A. Shilov, K. S. Kochergin-Nikitsky, N. L. Varich, N. A. Ilyushina, A. S. Gambaryan, P. S. Krylov, and N. V. Kaverin.** 2007. Effect of gene constellation and postreassortment amino acid change on the phenotypic features of H5 influenza virus reassortants. *Arch Virol* **152**:1139-1145.
 194. **Russell, C. A., T. C. Jones, I. G. Barr, N. J. Cox, R. J. Garten, V. Gregory, I. D. Gust, A. W. Hampson, A. J. Hay, A. C. Hurt, J. C. de Jong, A. Kielso, A. I. Klimov, T. Kageyama, N. Komadina, A. S. Lapedes, Y. P. Lin, A. Mosterin, M. Obuchi, T. Odagiri, A. D. M. E. Osterhaus, G. F. Rimmelzwaan, M. W. Shaw, E. Skepner, K. Stohr, M. Tashiro, R. A. M. Fouchier, and D. J. Smith.** 2008. Influenza vaccine strain selection and recent studies on the global migration of seasonal influenza viruses. *Vaccine* **26 Suppl 4**:D31-D34.
 195. **Rust, M. J., M. Lakadamyali, F. Zhang, and X. Zhuang.** 2004. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat Struct Mol Biol* **11**:567-573.
 196. **Saha, S., S. Yoshida, K. Ohba, K. Matsui, T. Matsuda, F. Takeshita, K. Umeda, Y. Tamura, K. Okuda, D. Klinman, K.-Q. Xin, and K. Okuda.** 2006. A fused gene of nucleoprotein (NP) and herpes simplex virus genes (VP22) induces highly protective immunity against different subtypes of influenza virus. *Virology* **354**:48-57.
 197. **Saitou, N., and M. Nei.** 1986. Polymorphism and evolution of influenza A virus genes. *Mol Biol Evol* **3**:57-74.
 198. **Sanz-Ezquerro, J. J., S. de la Luna, J. Ortín, and A. Nieto.** 1995. Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of coexpressed proteins. *J Virol* **69**:2420-2426.
 199. **Sanz-Ezquerro, J. J., J. F. Santarén, T. Sierra, T. Aragón, J. Ortega, J. Ortín, G. L. Smith, and A. Nieto.** 1998. The PA influenza virus polymerase subunit is a phosphorylated protein. *J Gen Virol* **79 (Pt 3)**:471-478.
 200. **Sato, T., S. Ramsubir, K. Higuchi, T. Yanagisawa, and J. A. Medin.** 2009. Vascular endothelial growth factor broadens lentivector distribution in the heart after neonatal injection. *J Cardiol* **54**:245-54.
 201. **Sato, Y., K. Yoshioka, C. Suzuki, S. Awashima, Y. Hosaka, J. Yewdell, and K. Kuroda.** 2003. Localization of influenza virus proteins to nuclear dot 10 structures in influenza virus-infected cells. *Virology* **310**:29-40.
 202. **Scholtissek, C., J. Stech, S. Krauss, and R. G. Webster.** 2002. Cooperation between the hemagglutinin of avian viruses and the matrix protein of human influenza A viruses. *J Virol* **76**:1781-1786.

203. **Schroeder, C., H. Heider, E. Möncke-Buchner, and T.-I. Lin.** 2005. The influenza virus ion channel and maturation cofactor M2 is a cholesterol-binding protein. *Eur Biophys J* **34**:52-66.
204. **Sereinig, S., M. Stukova, N. Zabolotnyh, B. Ferko, C. Kittel, J. Romanova, T. Vinogradova, H. Katinger, O. Kiselev, and A. Egorov.** 2006. Influenza virus NS vectors expressing the mycobacterium tuberculosis ESAT-6 protein induce CD4+ Th1 immune response and protect animals against tuberculosis challenge. *Clin Vaccine Immunol* **13**:898-904.
205. **Shinya, K., Y. Fujii, H. Ito, T. Ito, and Y. Kawaoka.** 2004. Characterization of a neuraminidase-deficient influenza A virus as a potential gene delivery vector and a live vaccine. *J Virol* **78**:3083-8.
206. **Skehel, J. J., and D. C. Wiley.** 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* **69**:531-569.
207. **Smith, G. J., J. Bahl, D. Vijaykrishna, J. Zhang, L. L. Poon, H. Chen, R. G. Webster, J. S. Peiris, and Y. Guan.** 2009. Dating the emergence of pandemic influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:11709-12.
208. **Smith, G. J., D. Vijaykrishna, J. Bahl, S. J. Lycett, M. Worobey, O. G. Pybus, S. K. Ma, C. L. Cheung, J. Raghvani, S. Bhatt, J. S. Peiris, Y. Guan, and A. Rambaut.** 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* **459**:1122-5.
209. **Smith, G. L., and A. J. Hay.** 1982. Replication of the influenza virus genome. *Virology* **118**:96-108.
210. **Smith W, A. C., Laidlaw PP.** 1933. Virus obtained from influenza patients. *Lancet* **225**:66-8.
211. **Steel, J., A. C. Lowen, S. Mubareka, and P. Palese.** 2009. Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627E/701N. *PLoS Pathog* **5**:e1000252.
212. **Stephenson, I., K. G. Nicholson, J. M. Wood, M. C. Zambon, and J. M. Katz.** 2004. Confronting the avian influenza threat: vaccine development for a potential pandemic. *Lancet Infect Dis* **4**:499-509.
213. **Strobel, I., M. Krumbholz, A. Menke, E. Hoffmann, P. R. Dunbar, A. Bender, G. Hobom, A. Steinkasserer, G. Schuler, and R. Grassmann.** 2000. Efficient expression of the tumor-associated antigen MAGE-3 in human dendritic cells, using an avian influenza virus vector. *Hum Gene Ther* **11**:2207-18.
214. **Suarez, D. L., and M. L. Perdue.** 1998. Multiple alignment comparison of the non-structural genes of influenza A viruses. *Virus Res* **54**:59-69.
215. **Subbarao, E. K., W. London, and B. R. Murphy.** 1993. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol* **67**:1761-1764.
216. **Sugrue, R. J., and A. J. Hay.** 1991. Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology* **180**:617-624.
217. **Suzuki, Y.** 2005. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biol Pharm Bull* **28**:399-408.
218. **Talon, J., C. M. Horvath, R. Polley, C. F. Basler, T. Muster, P. Palese, and A. García-Sastre.** 2000. Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J Virol* **74**:7989-7996.
219. **Taubenberger, J. K.** 2006. The origin and virulence of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Proc Am Philos Soc* **150**:86-112.
220. **Thomas, Y., G. Vogel, W. Wunderli, P. Suter, M. Witschi, D. Koch, C. Tapparel, and L. Kaiser.** 2008. Survival of influenza virus on banknotes. *Appl Environ Microbiol* **74**:3002-7.
221. **Thompson, T.** 1852. *Annals of influenza and epidemic catarrhal fever in Great Britain from 1510 to 1837.* Sydehnam Society.

222. **Tiley, L. S., M. Hagen, J. T. Matthews, and M. Krystal.** 1994. Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5' ends of the viral RNAs. *J Virol* **68**:5108-5116.
223. **Tobler, K., M. L. Kelly, L. H. Pinto, and R. A. Lamb.** 1999. Effect of cytoplasmic tail truncations on the activity of the M(2) ion channel of influenza A virus. *J Virol* **73**:9695-9701.
224. **Tompkins, S. M., Z.-S. Zhao, C.-Y. Lo, J. A. Misplon, T. Liu, Z. Ye, R. J. Hogan, Z. Wu, K. A. Benton, T. M. Tumpey, and S. L. Epstein.** 2007. Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses, including subtype H5N1. *Emerg Infect Dis* **13**:426-435.
225. **Torreira, E., G. Schoehn, Y. Fernandez, N. Jorba, R. W. Ruigrok, S. Cusack, J. Ortin, and O. Llorca.** 2007. Three-dimensional model for the isolated recombinant influenza virus polymerase heterotrimer. *Nucleic Acids Res* **35**:3774-83.
226. **Toyoshima, M., Y. Tanaka, M. Matumoto, M. Yamazaki, S. Nagase, K. Sugamura, and N. Yaegashi.** 2009. Generation of a syngeneic mouse model to study the intraperitoneal dissemination of ovarian cancer with in vivo luciferase imaging. *Luminescence* **24**:324-31.
227. **Varghese, J. N., J. L. McKimm-Breschkin, J. B. Caldwell, A. A. Kortt, and P. M. Colman.** 1992. The structure of the complex between influenza virus neuraminidase and sialic acid, the viral receptor. *Proteins* **14**:327-332.
228. **Varki, A.** 1999. Disappearing physician-scientists. *Science* **283**:791-792.
229. **Voeten, J. T., E. C. Claas, R. Brands, A. M. Palache, G. J. van Scharrenburg, G. F. Rimmelzwaan, and A. D. Osterhaus.** 1999. Generation and characterization of reassortant influenza A viruses propagated in serum-free cultured MDCK-SF1 cells. *Dev Biol Stand* **98**:77-87; discussion 89-90.
230. **Wagner, R., A. Herwig, N. Azzouz, and H. D. Klenk.** 2005. Acylation-mediated membrane anchoring of avian influenza virus hemagglutinin is essential for fusion pore formation and virus infectivity. *J Virol* **79**:6449-6458.
231. **Wagner, R., M. Matrosovich, and H.-D. Klenk.** 2002. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev Med Virol* **12**:159-166.
232. **Wang, C., K. Takeuchi, L. H. Pinto, and R. A. Lamb.** 1993. Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block. *J Virol* **67**:5585-94.
233. **Wang, X., M. Li, H. Zheng, T. Muster, P. Palese, A. A. Beg, and A. García-Sastre.** 2000. Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. *J Virol* **74**:11566-11573.
234. **Wanitchang, A., J. Kramyu, and A. Jongkaewwattana.** 2009. Enhancement of Reverse Genetics-derived Swine-Origin H1N1 Influenza Virus Seed Vaccine Growth by Inclusion of Indigenous Polymerase PB1 Protein. *Virus Res.*
235. **Ward, A. C., A. A. Azad, I. G. Macreadie, and J. L. McKimm-Breschkin.** 1993. Complete nucleotide sequence of the non-structural gene of the human influenza virus strain A/WS/33. *Nucleic Acids Res* **21**:2257.
236. **Watanabe, K., H. Handa, K. Mizumoto, and K. Nagata.** 1996. Mechanism for inhibition of influenza virus RNA polymerase activity by matrix protein. *J Virol* **70**:241-247.
237. **Watanabe, T., S. Watanabe, T. Noda, Y. Fujii, and Y. Kawaoka.** 2003. Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes. *J Virol* **77**:10575--10583.
238. **Watanabe, T., S. Watanabe, T. Noda, Y. Fujii, and Y. Kawaoka.** 2003. Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes. *J Virol* **77**:10575-83.

239. **Watowich, S. J., J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1994. Crystal structures of influenza virus hemagglutinin in complex with high-affinity receptor analogs. *Structure* **2**:719-731.
240. **Webby, R. J., R. G. Webster, and J. A. Richt.** 2007. Influenza viruses in animal wildlife populations. *Curr Top Microbiol Immunol* **315**:67-83.
241. **Webster R.G., K. Y., Bean W.J.** 1989. What is the potential of avirulent influenza viruses to complement a cleavable hemagglutinin and generate virulent strains? *Virology*. **171(2)**:484-92.
242. **Weiss, B., H. Nitschko, I. Ghattas, R. Wright, and S. Schlesinger.** 1989. Evidence for specificity in the encapsidation of Sindbis virus RNAs. *J Virol* **63**:5310-8.
243. **Whittaker, G., M. Bui, and A. Helenius.** 1996. Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons. *J Virol* **70**:2743-2756.
244. **Wiley, D. C., I. A. Wilson, and J. J. Skehel.** 1981. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature* **289**:373-8.
245. **Wise, H. M., A. Foeglein, J. Sun, R. M. Dalton, S. Patel, W. Howard, E. C. Anderson, W. S. Barclay, and P. Digard.** 2009. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol* **83**:8021-31.
246. **Wu, W. W. H., Y.-H. B. Sun, and N. Panté.** 2007. Nuclear import of influenza A viral ribonucleoprotein complexes is mediated by two nuclear localization sequences on viral nucleoprotein. *Virol J* **4**:49.
247. **Xu, X., X. Zhu, R. A. Dwek, J. Stevens, and I. A. Wilson.** 2008. Structural characterization of the 1918 influenza virus H1N1 neuraminidase. *J Virol* **82**:10493-501.
248. **Yamada, H., R. Chounan, Y. Higashi, N. Kurihara, and H. Kido.** 2004. Mitochondrial targeting sequence of the influenza A virus PB1-F2 protein and its function in mitochondria. *FEBS Lett* **578**:331-336.
249. **Yamanaka, K., A. Ishihama, and K. Nagata.** 1990. Reconstitution of influenza virus RNA-nucleoprotein complexes structurally resembling native viral ribonucleoprotein cores. *J Biol Chem* **265**:11151-5.
250. **Yamanaka, K., A. Ishihama, and K. Nagata.** 1988. Translational regulation of influenza virus mRNAs. *Virus Genes* **2**:19-30.
251. **Yasuda, J., D. J. Bucher, and A. Ishihama.** 1994. Growth control of influenza A virus by M1 protein: analysis of transfectant viruses carrying the chimeric M gene. *J Virol* **68**:8141-8146.
252. **Yasuda, J., T. Toyoda, M. Nakayama, and A. Ishihama.** 1993. Regulatory effects of matrix protein variations on influenza virus growth. *Arch Virol* **133**:283-294.
253. **Ye, Z., T. Liu, D. P. Offringa, J. McInnis, and R. A. Levandowski.** 1999. Association of influenza virus matrix protein with ribonucleoproteins. *J Virol* **73**:7467-7473.
254. **Zamarin, D., A. García-Sastre, X. Xiao, R. Wang, and P. Palese.** 2005. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog* **1**:e4.
255. **Zebedee, S. L., and R. A. Lamb.** 1988. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J Virol* **62**:2762-2772.
256. **Zell R, K. A., Eitner A Krieg R Halbhuber KJ Wutzler P.** 2007. Prevalence of PB1-F2 of influenza A viruses. *J Gen Virol*. **88**:536-46.
257. **Zheng, H., P. Palese, and A. Garcia-Sastre.** 2000. Antitumor properties of influenza virus vectors. *Cancer Res* **60**:6972-6.

258. **Zou, P., W. Liu, and Y.-H. Chen.** 2005. The epitope recognized by a monoclonal antibody in influenza A virus M2 protein is immunogenic and confers immune protection. *Int Immunopharmacol* **5**:631-635.