



**HAL**  
open science

# Étude des mécanismes moléculaires gouvernant le réassortiment génétique des virus Influenza de type A

Boris Essere

► **To cite this version:**

Boris Essere. Étude des mécanismes moléculaires gouvernant le réassortiment génétique des virus Influenza de type A. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10119 . tel-00867756

**HAL Id: tel-00867756**

**<https://theses.hal.science/tel-00867756>**

Submitted on 30 Sep 2013

**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.

Thèse de l'université de Lyon  
Délivrée par  
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD

**DIPLOME DE DOCTORAT**

SPECIALITE : VIROLOGIE

ECOLE DOCTORALE : ÉVOLUTION ECOSYSTEME MICROBIOLOGIE MODELISATION

(Arrêté du 7 août 2006)

Présentée et soutenue publiquement le 14 juin 2010

Par

M. Boris ESSERE

**Etude des mécanismes moléculaires gouvernant le Réassortiment Génétique des virus  
Influenza de type A**

Directeur de thèse : **Pr. Bruno LINA**

Co-directeur : **Dr. Vincent MOULES**

JURY : **Pr. Sylvie VAN DER WERF**  
**Dr. Gaëlle SIMON**  
**Dr. Jean Claude DESENCLOS**  
**Dr. Isabelle LEGASTELOIS**

Thèse de l'université de Lyon  
Délivrée par  
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD

**DIPLOME DE DOCTORAT**

SPECIALITE : VIROLOGIE

ECOLE DOCTORALE : ÉVOLUTION ECOSYSTEME MICROBIOLOGIE MODELISATION

(Arrêté du 7 août 2006)

Présentée et soutenue publiquement le 14 juin 2010

Par

M. Boris ESSERE

**Etude des mécanismes moléculaires gouvernant le Réassortiment Génétique des virus  
Influenza de type A**

Directeur de thèse : **Pr. Bruno LINA**

Co-directeur : **Dr. Vincent MOULES**

JURY : **Pr. Sylvie VAN DER WERF**  
**Dr. Gaëlle SIMON**  
**Dr. Jean Claude DESENCLOS**  
**Dr. Isabelle LEGASTELOIS**

## REMERCIEMENTS

Pour commencer je tenais à remercier le **Pr. Bruno LINA** pour m'avoir accueilli dans son équipe. Je voulais exprimer ma profonde gratitude pour les efforts qu'il a réalisés afin que j'achève mon travail dans les meilleures conditions possibles.

Je remercie aussi le **Dr. Vincent Moulès** d'avoir accepter de co-encadrer ce travail, ainsi que pour ces précieux conseils, sa disponibilité et son écoute. Je salue sa souplesse et l'ouverture d'esprit qui m'ont laissé une marge de liberté pour mener à bien ce travail de recherche.

Je ne voudrais pas non plus oublier de remercier **Matthieu Yver**, **Fabienne Giroux** et **Anthony Martinez** pour leur aide inestimable, le dynamisme dont ils ont fait preuve, mais aussi pour les nombreuses discussions sur les aspects scientifiques et techniques qui m'ont permis de résoudre des difficultés rencontrées.

Mes remerciements s'adressent aussi à l'ensemble du personnel du laboratoire VirPath EMR 4610 qui, par des discussions, suggestions ou contributions, ont participé à la qualité de ce travail et particulièrement les camarades du 2<sup>ème</sup> étage qui ont contribué à créer une incroyable ambiance de travail.

Je voudrais adresser mes remerciements au **Dr. Isabelle Legastelois**, au **Pr. Sylvie Van Der Werf**, au **Dr Gaëlle Simon**, ainsi qu'au **Dr Jean-Claude Desenclos** qui m'ont fait l'honneur d'accepter de faire partie de mon jury de thèse.

Enfin j'adresse mes plus sincères remerciements aux personnes très importantes pour moi au quotidien qui sont les membres de ma familles, mes amis proches qui m'ont toujours soutenu et encouragé malgré mon manque de disponibilité.

A Mauricia Atse



*A mes parents Fidèle et Brigitte ESSERE*

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	M. le Professeur L. Collet
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur J-F. Mornex
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur G. Annat
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur D. Simon
Secrétaire General	M. G. Gay

## *COMPOSANTES SANTE*

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. Etienne
Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly
UFR d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. Locher
Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. Matillon
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. Farge

## *COMPOSANTES SCIENCES ET TECHNOLOGIE*

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. Le Professeur F. Gieres
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. C. Collignon
Observatoire de Lyon	Directeur : M. B. Guiderdoni
Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon	Directeur : M. le Professeur J. Lieto
Institut Universitaire de Technologie A	Directeur : M. le Professeur C. Coulet
Institut Universitaire de Technologie B	Directeur : M. le Professeur R. Lamartine
Institut de Science Financière et d'Assurance	Directeur : M. le Professeur J-C. Augros
Institut Universitaire de Formation des Maîtres	Directeur : M R. Bernard

# Résumé

La grippe, infection respiratoire virale fréquente, est due aux virus Influenza. Leur génome est constitué par huit molécules d'ARN de polarité négative retrouvés sous la forme de complexe ribonucléique (RNPv). Au cours du cycle viral, il a été démontré que les régions terminales des segments de gène étaient cruciales pour l'incorporation sélective des huit RNPv à l'intérieur des particules virales. Par des techniques d'interaction *in vitro* et de tomographie électronique, nous avons montré que les segments de gène du virus H3N2 interagissaient entre eux par des interactions ARN/ARN impliquant leurs régions de packaging. Nos résultats suggèrent que la mise en place de ce réseau permettrait la formation d'un complexe supra macromoléculaire multi-segmenté permettant l'incorporation d'un jeu complet des huit RNPv dans les particules virales néosynthétisées.

En raison de la nature segmentée du génome viral, des phénomènes de réassortiment génétique peuvent avoir lieu lors d'une co-infection. Afin de définir les mécanismes responsables de la restriction observée lors de ce phénomène, nous avons évalué le taux de réassortiment génétique *in vitro* entre le virus humain H3N2 et le virus aviaire H5N2. Nos résultats suggèrent que le mécanisme gouvernant l'incorporation sélective des segments de gènes, régulerait le réassortiment génétique. Nous avons montré que la modulation de l'interaction ARN/ARN entre les segments de gènes HA et M permet d'augmenter le taux d'incorporation du segment de gène HA H5 dans le fond génétique du virus humain, pré-requis pour l'émergence de virus pandémique.

# Title.

## ***Study of Molecular Mechanisms of Influenza Virus Genetic Reassortment***

### **Abstract**

The Flu is a frequent viral infectious disease caused by the Influenza viruses. Their genomes are composed by eight negative single-stranded RNA organised as vRNPs. During the viral cycle, the terminal non-coding and coding regions of viral genome have been shown to be crucial for the selective incorporation of a complete set of the eight vRNPs into influenza viral particles. Band shift assay and electron tomography allowed us to show that all gene segments interact together by RNA/RNA interactions involving their packaging region. Our results suggest that the eight genomic vRNAs are selected and packaged as an organized supramolecular complex held together between identified packaging regions into neo-synthesized virions.

Due to genome segmented nature, genetic reassortment can occur during co-infection. In order to identify molecular mechanisms responsible for the observed restriction during the genetic reassortment, we have developed a new competitive reverse genetic strategy allowing us to evaluate the genetic reassortment between H3N2 and H5N2 viruses. Our results suggest that mechanism controlling the packaging should regulate genetic reassortment. We have shown that the modulation of RNA/RNA interaction between HA and M gene segment have allowed us to increase HA H5 gene segment incorporation rate into a viral human genetic background, prerequisite for pandemic virus emergency.

## **MOTS CLEFS.**

Virus Influenza de type A – virus aviaire - réassortiment génétique – empaquetage-  
interaction ARN/ARN

## **KEYWORDS.**

Influenza A virus – genetic reassortment – packaging – RNA/RNA interaction

## Table des matières

Résumé.....	6
Title.....	7
Study of Molecular Mechanisms of Influenza Virus Genetic Reassortment.....	7
Abstract .....	7
Index des tableaux.....	13
Abréviations. ....	14
I/ INTRODUCTION.....	18
1. Historique .....	18
2. Classification et Nomenclature .....	18
3. Mécanisme d'évolution des virus grippaux.....	20
3.1. Glissements antigéniques (Drift).....	20
3.2. Cassures antigéniques (Shift) .....	20
4. Organisation et structure de la particule virale des virus influenza de type A .....	21
4. 1. Présentation générale .....	21
4. 2. Le génome viral. ....	22
4. 3. Les protéines virales .....	23
5. Le Cycle Viral.....	40
5.1. L'attachement .....	40
5.2. L'Endocytose.....	41
5.3. Import nucléaire des RNPv .....	41
5.4. La Transcription/Réplication Virale .....	42
5.5. Export nucléaire des RNP viraux.....	44
5.6. Incorporation des constituants viraux dans les particules virales néo-synthétisées .....	45
5.7. Le Bourgeonnement .....	46
6. Eco- Epidémiologie .....	46
6.1.écologie .....	46
6.2. Epidémiologie .....	47
6.3. Traitements .....	55
7. Empaquetage des RNPv dans la particule virale .....	58
7.1. Hypothèses .....	58
7.2. Incorporation sélective des RNPv.....	60

8. Le Réassortiment génétique.....	64
8.1. Le Réassortiment Génétique des virus humains <i>in vivo</i> .....	64
8.2. Le Réassortiment Génétique inter sous-type <i>in vivo</i> .....	64
8.3. Compatibilité et facteur de virulence des segments aviaires .....	76
Problématique de l'étude.....	77
II/ Résultats : partie A.....	80
1. Interactions <i>in vitro</i> des segments d'ARNv .....	81
A. Etude des interactions ARN/ARN <i>in vitro</i> entre segments de gènes .....	81
B. Implication des extrémités du segment de gènes, dans les interactions ARN/ARN .....	83
C. Interaction ARN/ARN entre les segments de gènes NA et M .....	85
D. Identification des nucléotides impliqués dans l'interaction entre les ARNv 6 et 7 .....	86
E. Implication de la NP dans les interactions ARN/ARN <i>in vitro</i> .....	88
F. Organisation interne des RNPv dans la particule virale bourgeonnante .....	89
2. Travaux réalisés dans le cadre de ma Thèse de Doctorat .....	93
3. Conclusions-Discussion : partie A.....	96
III/ Résultats: partie B.....	99
1°/ Etude du Réassortiment génétique <i>in vitro</i> entre les virus H3N2 et H5N2.....	101
2°/ Incorporation du segment de gène H5 sur un fond génétique du virus humain MO .....	103
3°/ Le réseau d'interaction ARN/ARN gouverne l'incorporation sélective du segment de gène HA aviaire dans le fond génétique du virus humain MO .....	110
4°/ L'extrémité 3' de la région codante du segment de gène M est impliquée dans l'incorporation du segment de gène HA aviaire dans un fond génétique du virus humain MO .....	113
5°/ Modulation de l'incorporation des segments de gène HA sur un fond génétique du virus humain MO.....	115
IV/ CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	116
CONCLUSIONS .....	116
V/ ANNEXES.....	123
1. Annexe 1: Publication 1.....	123
2. Annexe 2: Publication 2.....	137
3. Annexe 3: Publication 3.....	138
4. Annexe 4 : Matériels et Méthodes.....	145
1. Matériels.....	145
2. Méthodes .....	150
VI/ Bibliographie.....	155

## Index des figures

Figure 1 : Représentation schématique de l'organisation des virus Influenza de type A...	21
Figure 2 : Organisation schématique d'un segment de gène (ARNv).....	22
Figure 3: Représentation schématique des domaines fonctionnels des protéines PB1, PB2, PA et NP.....	26
Figure 4 : Organisation structurale du RNP viral des virus Influenza de type A.....	28
Figure 5 : Représentation schématique des modèles de structures secondaires de l'ARN suite à aux appariements des extrémités 5' et 3'.....	29
Figure 6 : Structure tridimensionnelle de la HA des virus Influenza A.....	30
Figure 7: Agencement structural de trimère HA à l'état pré-fusion.....	32
Figure 8 : Structure cristallographique de du tétramère la NA de A (H1N1) de 1918.....	33
Figure 9 : Représentation de la structure 3D de la protéine de matrice M1 des virus Influenza de type A.....	34
Figure 10: Représentation schématique du canal à proton M2 .....	35
Figure 11 : Transcrits M1 et M2 issus de l'épissage alternatif du segment 7.....	36
Figure 12: Structure des domaines N et C-terminal des protéines NS des virus Influenza A	37
Figure 13 : Modèle d'export nucléaire des RNPv.....	38
Figure 14 : Transcrits PB1 et PB1-F2 issus du segment 2 .....	38
Figure 15: Représentation schématique du cycle réplcatif des virus Influenza A.....	40
Figure 16 : Import nucléaire des RNPv dans le complexe du pore nucléaire.....	42
Figure 17 : Domaines fonctionnelles de l'ARN polymérase.....	43
Figure 18 : Transmission intra-humaine du virus Influenza A .....	48
Figure 19 : Hôtes des virus Influenza.....	50
Figure 20: Représentation des événements de Réassortiment Génétique responsable des pandémies des virus Influenza de type A du XXe siècle.....	53
Figure 21: Historique des événements de réassortiment génétique du virus A (H1N1)v... 54	
Figure 22: Description schématique du mode d'action des inhibiteurs du canal à proton M2	56
Figure 23: Description du mode d'action des INA.....	57
Figure 24 : Représentation schématique des modèles d'incorporation des RNPv à l'intérieur de la particule virale.....	59
Figure 25 : Observation en ME de coupe de virus Influenza de type A bourgeonnant.....	60
Figure 26 : Représentation schématique des séquences impliquées dans l'incorporation sélective des segments de gènes du virus Influenza de type A.....	63



Figure 27 : Représentation schématique d'un réassortiment génétique entre un virus humain et un virus aviaire chez le porc.....	65
Figure 28: Exemple du réassortiment génétique du virus aviaire A (H5N1).....	66
Figure 29: Diversité génétique des virus A(H5N1) : récapitulatif des différents clades et sous-clades (A) et génotypes (B) définis dans la classification des virus influenza A(H5N1)....	68
Figure 30 : Histoire évolutive du virus A (H1N1)v.....	69
Figure 31 : Caractérisation des virus H5 réassortants issu de la co-infection des virus H3N2 et H5N1 d'après Jackson et al 2009.....	71
Figure 32 : Composition génomique des virus réassortants après co-infection avec les virus A (H1N1)v et H5N1 d'après Octaviani et al 2010.....	73
Figure 33 : Génotypes des virus réassortants entre les virus Yokohama H3N2 et Prague H7N7 d'après Li et al 2008.....	75
Figure 34 : Implication d'Emilie Fournier et moi-même sur les projets de recherche de la collaboration entre l'unité VirPath CNRS FRE 3011 (Lyon) et de l'unité UPR9002 CNRS (Strasbourg).....	78
Figure 35: Interactions <i>in vitro</i> entre les segments d'ARNv. ....	82
Figure 36: Localisation des régions de l'ARNv 7 interagissant avec les segments 1, 4, et 6 84	
Figure 37: Cartographie en solution sur une région de l'ARNv 7 au sein de particules virales entières.....	87
Figure 38: Interaction de l'ARNv 7 sauvage et de L'ARNv 7 $\Delta$ 100 5' avec l'ARNv6 en présence de la NP.....	88
Figure 39: Observation d'un tomogramme d'une particule virale révélant l'organisation des RNPv à l'intérieur de la particule virale.....	90
Figure 40 : Tomogrammes de 5 particules virales H3N2 obtenus par tomographie.....	91
Figure 41 : Reconstruction 3D des particules virales P1 et P4 et représentations schématiques de la disposition relative des RNPv à l'intérieur de la particule virale H3N2.....	92
Figure 42 : Effet des mutations S71 et R73 sur la cinétique de réplication du virus recombiné H3N2.....	94
Figure 43: Représentation schématique et résultat de la compétition pour l'incorporation de l'ARNv du segment 7 (sauvage versus muté).....	95
Figure 44: Cinétique de réplication des virus réassortants de l'étude.....	106
Figure 45: Représentation schématique de la génétique inverse compétitive.....	107
Figure 46: Construction du segment de gène chimérique H5M.....	109
Figure 47: Interactions <i>in vitro</i> entre les ARNv M et HA des virus MO et FI.....	112

Figure 48: Construction du segment de gène M5' .....	114
Figure 49 : Schéma descriptif de la transcription des plasmides pHW2000.....	149
Figure 50 : Représentation schématique de la technique de génétique inverse.....	151

## **Index des tableaux**

Tableau 1 : Fonctions et rôle des protéines virales des virus Influenza de type A.....	22
Tableau 2 : Compositions génomiques des virus réassortants HA H5 issus de la co-transfection des systèmes de Génétique Inverse de H3N2 et H5N2.....	101
Tableau 3 : Compositions génomiques des virus réassortants HA H5 issus de la co-infection des systèmes de Génétique Inverse de H3N2 et H5N2.....	101
Tableau 4 : Compositions génomiques des virus réassortants de l'étude produit par génétique inverse.....	102
Tableau 5: Taux d'incorporation des segments de gène mis en compétition dans notre stratégie de Génétique Inverse compétitive.....	103

# Abréviations.

## A

A: Adénine

AA : acide aminés

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire

AMV : Avian Myeloblastosis Virus

ANT 3 : Adenine Nucleotide Translocase 3

ARN DI : ARN Défectifs Interférents

ARN : Acide RiboNucléique

ARNc : ARN complémentaire

ARNm : ARN messenger

ARNv : ARN viral

## B

BET : Bromure d'Ethidium

BSA : Bovine Serum Albumin

## C

C: Cytosine

CDC: Center for Disease and Control

CMV : Cytomégalovirus

CPSF : Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor

CRM1 : Chromosome Maintenance Region 1

CTP : Cytidine Tri-Phosphate

Cys : Cystéine

## D

Da : Dalton

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMS : Di Méthyl Sulfate

dNTP : désoxyNucléoside Tri Phosphate

DTT : Dithiothréitol

## **E**

ECP : Effet CytoPathogène

EMEM : Eagle's Minimum Essential Medium

EMSA : ElectroMobility Shift Assay

## **G**

G : Guanine

GDP : Guanosine Di-Phosphate

GFP : Green Fluorescent Protein

Glu : Glutamate

Gly : Glycine

GP : Glycoprotéine

GROG : Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe

GTP : Guanosine Tri-Phosphate

## **H**

HA : Hémagglutinine

His : Histidine

HPAI : High Pathogenic Avian Influenza

## **I**

IFN : Interféron

IL1- $\beta$  : Interleukine 1- $\beta$

INA : Inhibiteur de la Neuraminidase

INVS : Institut National de Veille Sanitaire

## **L**

LPAI : Low Pathogenic Avian Influenza

## **M**

M: Protéine de Matrice

MDCK: Madin Darby Canin Kidney

min: minute

MOI : Multiplicity of Infection

## **N**

NA : Neuraminidase

NEP : Nuclear Export Protein  
NES : Nuclear Export Signal  
NEP : Nuclear Export Protein  
ng : nanogramme  
NLS : Nuclear Localisation Signal  
nm : nanomètre  
NP : Nucléoprotéine  
NPC : Nuclear Pore Complex  
NS : Non Structural protein  
NS1-BP : NS1 Binding Protein

## O

OAS : OligoAdénylate Synthase  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé

## P

PA : Protein acid  
PABPII : Poly-A Binding Protein II  
PAHO : Pan American Health Organisation  
PB1 : Protein basic 1  
PB2 : Protein basic 2  
PBS : Phosphate Buffered Salin  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PKR : Protein Kinase R  
pmole : picomoles  
PolI : Polymérase I  
PolII : Polymérase II

## R

RBS : Receptor Binding Site  
RE : Reticulum Endoplasmique  
RNC : Région Non Codante  
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire  
RNP : RiboNucléoProtéine  
RNPv : RiboNucléoProtéine virale  
RT : Reverse Transcription

## **S**

SA : Sialic Acid

Sec. : seconde

SVF : Serum de Veau Foetal

## **T**

TBE : Tris Borate EDTA

TCID<sub>50</sub> : Median tissue culture infective dose

THOV : THOgoto Virus

TNF $\beta$  : tumor Necrosis Factor  $\beta$

TRANSIMS : TRansportation ANalysis SIMulation System

Trp : Tryptophane

Tyr : Tyrosine

## **U**

U: Uracile

## **W**

WHO : World Health Organisation

WSN : Wisconsin

# I/ INTRODUCTION

## 1. Historique

La grippe est une infection respiratoire virale fréquente, observée partout dans le monde. La première référence à une épidémie de grippe est un document d'Hippocrate qui, il y a 2400 ans, a décrit une épidémie de toux, suivie de pneumonies et autres symptômes typiques, à Perinthus dans le nord de la Grèce. Depuis, de nombreuses épidémies ont été décrites.

Avant la découverte de l'agent étiologique cette maladie, elle fut très longtemps considérée comme bactérienne. En effet Pfeiffer isola en 1892 des bactéries en forme de tige isolées à partir de sécrétions nasales de patients infectés par influenza, il nomma cette bactérie *Bacillus influenzae* (ou Pfeiffer's bacillus). Cependant certains éléments ont rapidement mis le doute sur la validité de cette découverte, notamment l'implication de ces bactéries dans d'autres maladies humaines telles que le choléra et la peste. L'optimisation des techniques de filtration a permis ainsi à Peter Olitsky et Frederick Gates d'exclure l'hypothèse bactérienne de la grippe. En effet l'agent infectieux de la grippe obtenu à partir de sécrétions nasales de patients infectés (1918) conserve son pouvoir infectieux lorsqu'Olitsky et Gates injectent au lapin le filtrat, obtenu après « passage » dans un filtre de Berkefeld (filtrant les bactéries).

Mais ce n'est qu'en 1931 que le physicien Richard Shope, par filtration de mucus de patients infectés, a démontré que cette maladie n'était pas due à une bactérie. Le premier isolement d'un virus a été réalisé en 1933.

## 2. Classification et Nomenclature

Les virus influenza appartiennent à la famille des Orthomyxoviridae qui comprennent cinq genres : les *Influenzavirus* (A, B et C), les *Thogotovirus* et les *Isavirus*.

Les virus influenza peuvent être différenciés en trois genres A, B et C selon les propriétés antigéniques de leurs protéines NP et M1. Les virus influenza A et B exposent à leur surface

deux types de glycoprotéines (hémagglutinine et neuraminidase) alors que les virus de type C exposent une glycoprotéine unique nommée HEF. Les virus influenza de type A sont les virus les plus étudiés car ils sont responsables d'épidémies saisonnières de grippe et peuvent être responsable de pandémies. Alors que l'infection des oiseaux sauvages, principal réservoir des virus de type A, est digestive et reste généralement asymptomatique, l'infection chez l'homme se caractérise par une atteinte des voies respiratoires supérieures, nez, gorge et des bronches. L'infection dure une semaine environ et est associée à une forte fièvre, des maux de tête, des myalgies importantes, une toux sèche et une fatigue persistante durant une à deux semaines. Les virus influenza de type B infectent principalement l'homme et donnent des signes cliniques similaires à ceux observés avec les virus influenza A. Ces virus sont regroupés en lignage de la même manière que les virus influenza de type C. Les virus de type C ne provoquent pas de pathologie sérieuse chez l'homme et restent à l'heure actuelle, des virus peu étudiés. Au cours de mon travail je vais me focaliser uniquement sur les virus influenza de type A.

La nomenclature des virus grippaux décrit successivement le type viral, l'hôte d'origine pour les souches animales uniquement, le lieu d'isolement, le numéro de souche, l'année d'isolement (exemple : A/Moscow/10/99). Pour les virus de type A les différents sous-types sont définis en fonction des caractéristiques antigéniques des deux glycoprotéines de surface : l'Hémagglutinine (HA), protéine de surface majoritaire et la Neuraminidase (NA) (figure 1). A l'heure actuelle, 16 sous-types d'Hémagglutinine (H1 à H16) et 9 sous-types de Neuraminidase (N1 à N9), ont été isolés chez les oiseaux sauvages. Les sous-types viraux circulant actuellement chez l'homme sont des virus H1N1 et H3N2.



### **3. Mécanisme d'évolution des virus grippaux**

Il existe chez les virus Influenza deux mécanismes responsables de la variabilité génétique des virus : les glissements antigéniques et les cassures antigéniques. Ces processus sont respectivement dus à la nature ARN du génome viral et à sa nature segmentée.

#### **3.1. Glissements antigéniques (Drift)**

Les virus Influenza sont soumis à une instabilité génétique responsable d'accumulation de mutations, et plus particulièrement au niveau des segments de gènes codant les GP de surface, qui peuvent être responsable de variations antigéniques. Cette instabilité est due à l'activité de l'ARN polymérase ARN-dépendante virale. En effet le complexe polymérase viral est responsable de l'accumulation de mutations (1 pour  $10^5$  par cycle répliatif) et ne possède pas d'activité correctrice. Les HA des virus humains évoluent bien plus rapidement que les segments internes car la pression de sélection exercée par le système immunitaire de l'hôte est plus importante vis-à-vis des épitopes des glycoprotéines de surface. Cette dérive antigénique entraîne donc l'émergence de nouveaux variants responsables des épidémies saisonnières et nécessite donc une réactualisation annuelle de la composition vaccinale.

Parmi les virus influenza de type A, les virus A (H5N1) présentent une très forte dérive antigénique responsable en 2008, de l'identification de 10 clades et de 10 sous clades au sein du clade 2 (Donis et al., 2008). En ce qui concerne le virus A (H1N1) 2009, après 9 mois de circulation, toutes les souches analysées restent apparentées à la souche vaccinale A/California/07/2009.

#### **3.2. Cassures antigéniques (Shift)**

En raison de la nature segmentée du génome des virus Influenza, des phénomènes de réassortiment génétique, c'est-à-dire des échanges de segments de gènes, peuvent avoir lieu lors de la co-infection d'un hôte par plusieurs souches virales. Ce brassage génétique a été responsable de l'émergence des virus responsables des dernières pandémies : grippe asiatique de 1957, grippe de Hong Kong de 1968 et grippe H1N1 de 2009. On parle de cassure antigénique quand le changement observé modifie le sous-type de la HA ou de la NA du

virus. C'est le porc, hôte intermédiaire (c'est-à-dire pouvant être infecté à la fois par les virus humains et aviaire), qui participe entre autre à l'émergence de ces nouveaux sous-types [81-85]. Le mécanisme du réassortiment génétique sera abordé plus en détail dans le paragraphe I.9.

## 4. Organisation et structure de la particule virale des virus influenza de type A

### 4. 1. Présentation générale

Les virus influenza de type A sont des virus enveloppés de 80 à 120 nm de diamètre, retrouvés sous forme sphérique, ovoïde ou filamenteuse [1]. La particule virale est constituée d'une enveloppe lipidique hérissée de spicules constituées par les glycoprotéines de surface HA et NA.

En plus des glycoprotéines de surface, l'enveloppe virale comporte deux autres protéines virales : la protéine de matrice, M1, qui sous-tend l'ensemble de l'enveloppe virale et tapisse la face interne de l'enveloppe virale, et la protéine transmembranaire M2 qui s'organise en tétramères formant un canal ionique (figure 1).

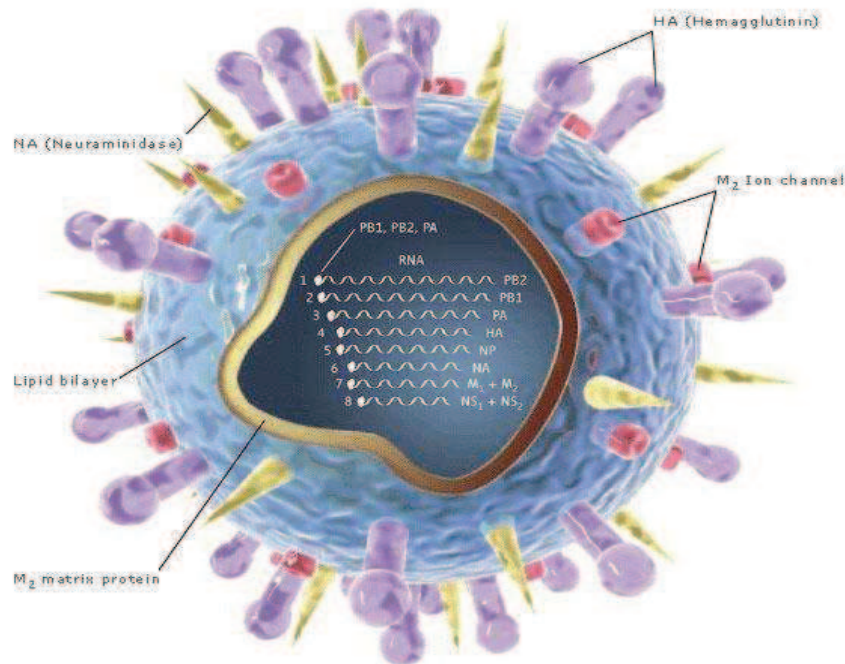


Figure 1 : Représentation schématique de l'organisation des virus Influenza de type A

## 4. 2. Le génome viral.

Le génome des virus influenza de type A est composé de huit segments d'ARN monocaténaire de polarité négative (ARN<sub>v</sub>), organisés en complexes ribonucléoprotéiques (RNP<sub>v</sub>). Chaque molécule d'ARN génomique est recouverte de nucléoprotéines (NP) et associé à un complexe ARN polymérase ARN dépendant constitué par les protéines PA, PB1 et PB2.

Les segments de gènes viraux s'organisent de façon similaire pour tous les Orthomyxovirus. Chaque segment d'ARN<sub>v</sub> comporte une région codante, flanquée de part et d'autre de régions non codantes. Ces dernières contiennent des régions spécifiques à chaque segment de gène ainsi qu'une séquence conservée, commune à tous les ARN<sub>v</sub> (figure 2). En effet, les 12 nucléotides de l'extrémité 3' et les 13 de l'extrémité 5' sont conservés pour tous les segments de gène de toutes les souches d'influenza A. Partiellement complémentaires, elles s'associent pour former une structure secondaire en épingle à cheveux ou en tire-bouchon, retrouvée au niveau des RNP<sub>v</sub>. Les segments génomiques sont de tailles variables et codent pour 12 protéines virales. Ces protéines seront regroupées en 3 catégories : les protéines du complexe polymérase, les glycoprotéines de surface et les protéines codées par les segments de gène internes (tableau 1).

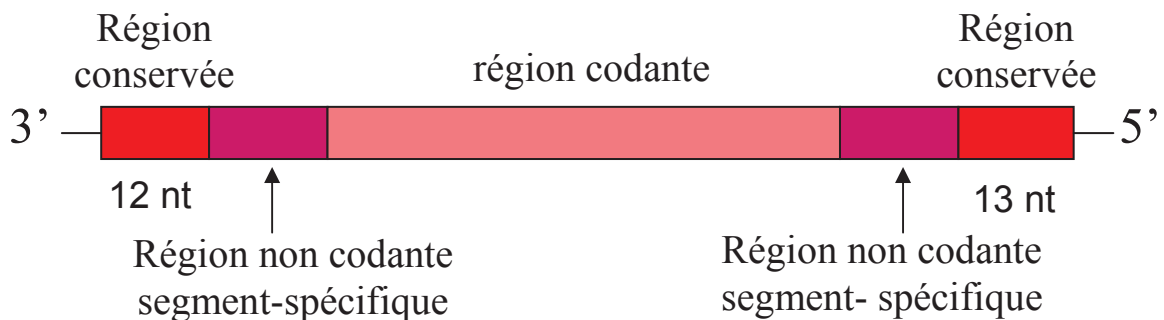


Figure 2 : Organisation schématique d'un segment de gène (ARN<sub>v</sub>)

Segment	Taille Segment (nucléotides)	Protéines	Séquence protéique (aa)	Principales fonctions/rôles
1	2341	PB2	759	Reconnaissance et fixation de la coiffe
2	2341	PB1	757	Activité endonucléase, porte l'activité ARN polymérase
		PB1-F2	87	Protéine pro-apoptotique
		N40	718	Fonction inconnue
3	2233	PA	716	Capture de la coiffe
4	1778	HA	566	Attachement au récepteur cellulaire, fusion des membranes de l'endosome et du virus
5	1565	NP	498	Régulation Transcription/réplication, export nucléaire des RNPv
6	1413	NA	454	Destruction récepteur à la surface des cellules infectées, activité sialidase (propagation néo-virions)
7	1027	M1	252	Assure architecture interne virus, assure export nucléaire des RNPv
		M2	97	Acidification intérieur virion, canal à proton
8	890	NS1	230	Inhibition réponse antivirale
		NEP	121	Export nucléaire des RNPv

**Tableau 1 : Fonctions et rôle des protéines virales des virus Influenza de type A**

*Le génome des virus influenza de type A comporte 8 segments de gènes codant 11 ou 12 protéines selon le sous-type du virus (PB1-F2 n'est pas ubiquitaire chez les virus Influenza de type A).*

### 4. 3. Les protéines virales

#### 4. 3. a. Les protéines du complexe polymérase

Le complexe polymérase est composé de l'association en hétérotrimère des protéines basiques PB1 et PB2 et de la protéine acide PA, pour former un complexe ARN polymérase ARN dépendant. Ce complexe assure la réplication du génome viral pour produire l'ARN

complémentaire (ARNc), lui-même servant de matrice pour la synthèse des ARNv génomiques. Le même complexe assure aussi la transcription du génome viral pour la synthèse des ARN messagers viraux. Au sein du complexe, chaque protéine a un rôle particulier (figure 3).

#### **4. 3. a. 1. La Protéine Basique 2 (PB2)**

La Protéine Basique 2, codée par le segment 1, est une des sous-unités du complexe polymérase virale. Cette protéine de 759 acides aminés (aa) et de 86kD interagit avec la protéine PB1 par son extrémité C-terminale [2] [3] pour former un hétérotrimère PB2-PB1-PA. La protéine NP pouvant interagir avec l'extrémité C-terminale de la protéine PB2, une compétition entre les protéines NP et PB1 pour interagir avec PB2 pourrait avoir un rôle fonctionnel dans la transition transcription/réplication [4]. L'analyse de la structure, définie par RMN, a permis d'identifier un signal de localisation nucléaire bi-partite [5]. La protéine PB2 reconnaît et capture la coiffe m<sup>7</sup>GTP des ARN pré-messagers cellulaires afin de permettre l'initiation de la transcription. [6].

La protéine PB2 porte des acides aminés définis comme des déterminants d'espèces comme le résidu en position 627. Ce résidu est une lysine pour la majorité des virus humains tandis qu'un acide glutamique est retrouvé chez les virus aviaires [7]. La substitution E627K est associée à une meilleure activité polymérase dans les cellules de mammifères à 37°C.

La substitution d'un aa asparagine (Asn) à la place d'un acide aspartique (Asp) en position 701 semble jouer un rôle à la fois dans la spécificité d'espèce mais aussi dans la virulence des virus influenza. En effet, en présence d'un résidu Asn, l'interaction entre la protéine PB2 et l'importine serait renforcée ce qui favoriserait son importation nucléaire et donc le recrutement des sous-unités du complexe polymérase dans le noyau. Une plus grande disponibilité de la sous-unité PB2 dans le noyau augmenterait les activités de transcription et de réplication virale dans les cellules de mammifères. La mutation Asn701Asp n'a pas d'impact dans les cellules aviaires ce qui indique que cette mutation favoriserait l'adaptation d'un virus influenza aviaire chez les mammifères.

#### **4. 3. a. 2. La Protéine Basique 1 (PB1)**

La Protéine Basique 1, protéine de 86kD et 757aa, est codée par le segment 2. PB1 constitue la plateforme d'assemblage du complexe polymérase, s'associant aux protéines PB2 et PA par ses extrémités C-terminale et N-terminale respectivement [8]. Des travaux ont démontré que PB1 pouvait interagir aussi avec la NP bien que la zone d'interaction n'ait pas encore été déterminée [9].

La protéine PB1 se lie à l'ARN et possède l'activité ARN-polymérase, les interactions avec les protéines PB2 et PA étant essentielles à cette activité [10, 11] (figure 3).

#### **4. 3. a. 3. La protéine acide (PA)**

La protéine acide est une protéine de 716aa et de 84kD codée par le segment 3. C'est une phosphoprotéine de la famille des sérines protéases de type chymotrypsine [12]. Elle interagit avec PB1 par des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes [10] au niveau de son extrémité C-terminale, permettant la translocation de PB1 au niveau du noyau [13]. Pendant longtemps son rôle n'était pas défini. Dans un premier temps, il a été montré que PA pouvait se lier à une protéine cellulaire de type activateur de transcription [14]. Récemment, plusieurs travaux de cristallographie ont révélé que cette sous-unité du complexe polymérase porte l'activité endonucléase [15, 16]. Elle permettrait le clivage de la coiffe aboutissant à l'obtention d'un fragment qui sera utilisé comme amorce pour initier la synthèse d'ARN messagers (figure 3).

#### **4. 3. a. 4. La Nucléoprotéine (NP)**

La NP est une protéine de 58kD, composée de 49aa, codée par le segment 5. C'est la deuxième protéine la plus représentée dans la particule virale. La protéine NP est une phosphoprotéine riche en résidus arginine et fortement chargés positivement à pH neutre. Une boucle terminale constituée de trois feuillets  $\beta$  permet l'assemblage de la protéine en trimère, forme majoritaire en solution [17]. La protéine NP se lie à l'ARN viral génomique et à son complémentaire à raison d'une NP tous les 24 nucléotides [18].

Elle joue un rôle dans les étapes précoces du cycle viral. En effet la NP facilite l'import des RNPv jusqu'au noyau grâce à ses deux Nucleor Localization Signal (=NLS). L'analyse de la structure de la protéine montre que le premier NLS, situé en N-terminal de la protéine, est non-conventionnel [19] et semble être le seul fonctionnel tandis que le deuxième NLS, bi-partite conventionnel, serait inaccessible [20] (figure 3)

La protéine NP jouerait un rôle dans la régulation de la transcription/réplication du génome viral. La NP interagit avec les protéines virales PB1, PB2 et M1 et avec un grand nombre de protéines cellulaires (pour revue voir [21]; [9]).

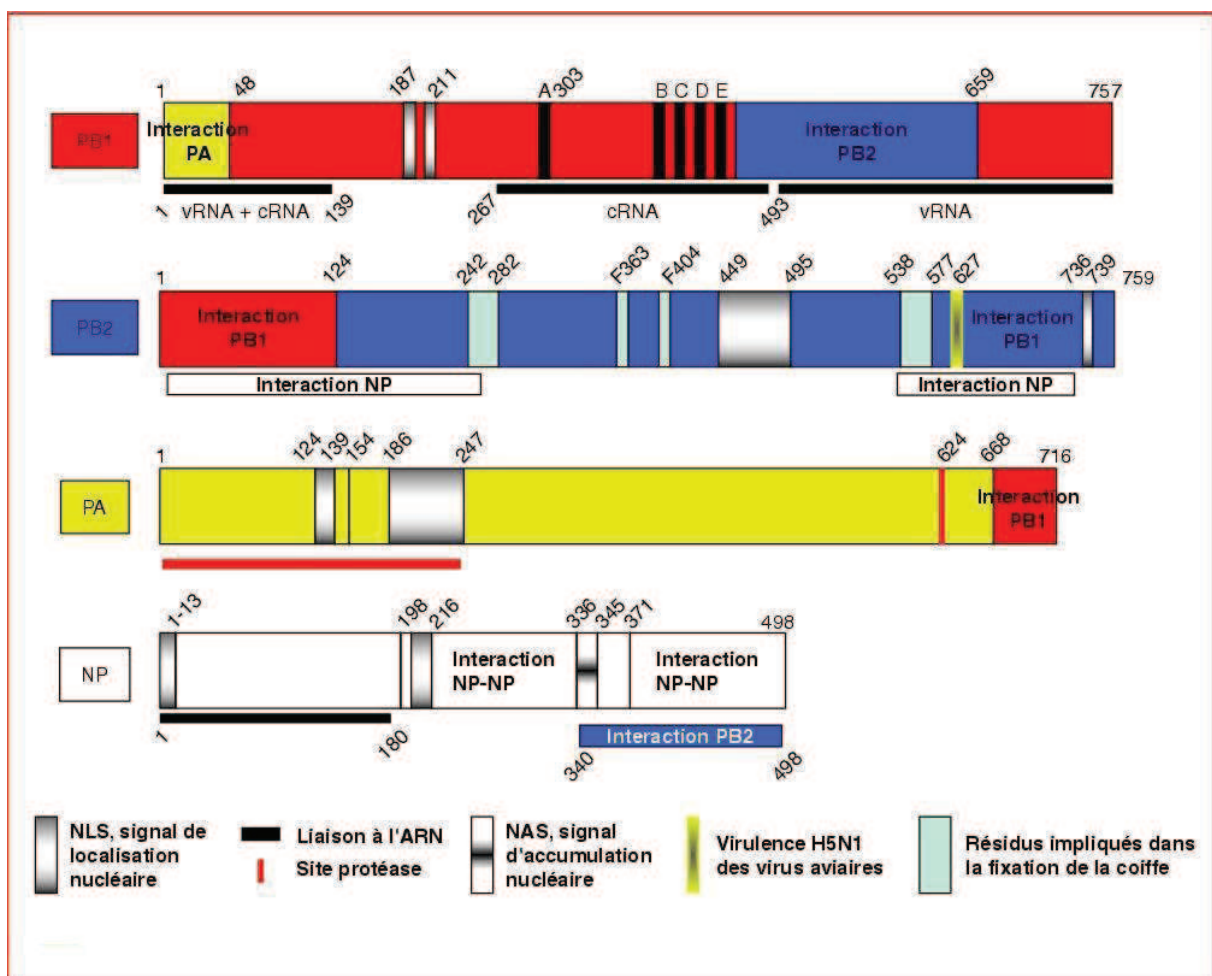


Figure 3: Représentation schématique des domaines fonctionnels des protéines PB1, PB2, PA et NP d'après (Akarsu et al 2006).

#### 4. 3. a. 5. Le complexe RNPv

L'organisation des segments de gènes des virus influenza est similaire pour tous les segments (figure 2). Les extrémités 3' et 5', respectivement de 12 et 13 nucléotides conservés pour toutes les souches virales, jouent un rôle particulier dans l'organisation du RNPv (figure 4)

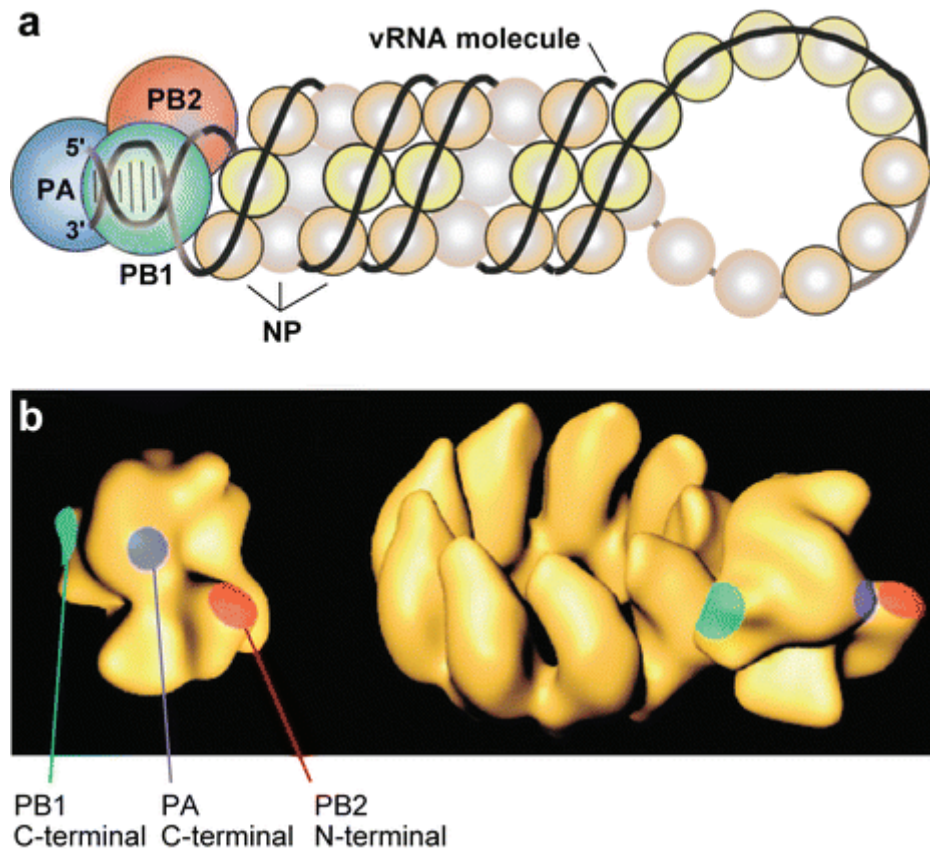
Les 11 nucléotides de la région 5' de l'ARNv seraient impliqués dans la l'interaction avec l'ARN polymérase [22].

Ces résultats confirment les précédentes observations issues des travaux de Tiley, L.S., et al., 1994 [23] qui semblent indiquer l'existence d'une séquence spécifique d'interaction localisée dans la région 5' des ARNv. Dans ce modèle l'extrémité 5' agit indépendamment de l'extrémité 3' et ne nécessite donc pas d'interaction ARN/ARN entre ces deux régions.

Le modèle actuellement admis décrit une association entre les régions conservées 3' et 5' partiellement complémentaires des ARNv. Elle permet l'obtention d'une structure secondaire déterminante pour la transcription et la réplication (initiation et terminaison). Deux types d'associations ont été proposés pour les extrémités 5' et 3' : association en manche de poêle (panhandle) et l'association en tire-bouchon (corkscrew) (figure 5).

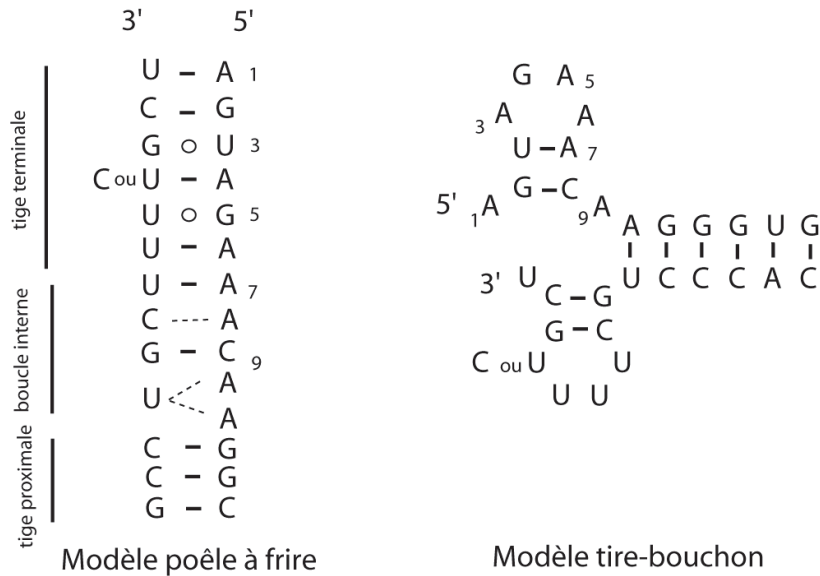
Le modèle en manche de poêle a été proposé suite à des observations en microscopie électronique de RNP purifiés [24]. Cependant les observations effectuées lors de travaux plus récents remettent en question les premières hypothèses. Inspirés des travaux et du modèle en fourche proposé par Fodor et al, 1993 et Fodor et al 1994, les travaux effectués par Flick et al 1996, suggèrent une structure en tire-bouchon. Ce second modèle, qui ne semble stable qu'en présence de protéines, permettrait la liaison de l'ARN polymérase à l'ARNv et ARNc, initiant la transcription et la réplication [25, 26]. Les observations issues des travaux en spectroscopie par RMN sur les ARNv *in vitro* semblent montrer qu'en absence des protéines du complexe polymérase, les ARNv adopteraient une conformation en manche de poêle.





**Figure 4 : Organisation structurale du RNP viral des virus Influenza de type A d'après [7]**

**a :** Représentation schématique de l'organisation des RNPv. Les sphères bleues représentent les monomères de NP avec la molécule d'ARNv associée. La molécule d'ARN simple brin est « enroulée » dans une structure en épingle à cheveux avec une courte région de duplex due à l'association des extrémités des régions 5' et 3'. Cette région constitue le site de liaison pour le complexe polymérase viral. **b :** Représentation 3D de la structure d'un RNP de virus influenza



**Figure 5 : Représentation schématique des modèles de structures secondaires de l'ARN suite à aux appariements des extrémités 5' et 3'.**

#### **4. 3.b. Les glycoprotéines de surface (GP)**

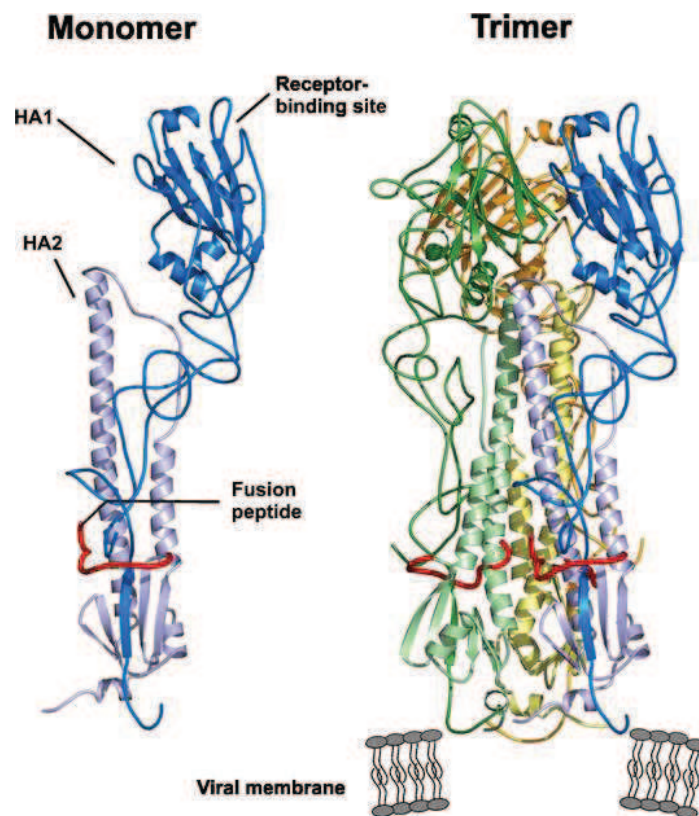
Les glycoprotéines de surface, constituées par les hémagglutinines et les neuraminidases sont enchâssées dans l'enveloppe virale provenant de la membrane cytoplasmique cellulaire. Elles sont synthétisées par les ribosomes liés au réticulum endoplasmique. Elles empruntent ensuite le système de Golgi où elles subissent des modifications post traductionnelles, avant d'être insérées dans la membrane cytoplasmique.

##### **4. 3.b. 1. L'Hémagglutinine (HA)**

L'Hémagglutinine, codée par le segment 4, est une GP de 76kD dont la séquence protéique varie entre 562 et 566aa selon le sous-type viral. Constituant l'antigène majeur du virus ciblé par le système immunitaire de l'hôte, cette protéine assure deux fonctions principales : (i) la détermination de la spécificité d'espèce par reconnaissance à la surface de la cellule cible de récepteurs spécifiques constitués par des acides sialiques présents au niveau des glycoprotéines membranaires cellulaires ; (ii) la fusion de la membrane virale avec celle de l'endosome permettant la libération du génome viral dans le cytoplasme de la cellule infectée.

Son extrémité N-terminale possède un peptide signal permettant son adressage et son ancrage à la membrane cytoplasmique de la cellule infectée est assuré par l'extrémité C-terminale. La HA comporte différents domaines : un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique. Assemblée en homotrimer, on distingue la partie extracellulaire constituée d'une partie « linéaire » d'hélices  $\alpha$  et d'une partie globulaire en feuillets  $\beta$  contenant le site de fixation au ligand (acides sialiques) [27, 28]

La HA est synthétisée dans le réticulum endoplasmique sous forme d'un précurseur HA<sub>0</sub>. Pour que le virus soit infectieux, le précurseur HA<sub>0</sub> doit être clivé en HA<sub>1</sub> (environ 47 KDa) et HA<sub>2</sub> (environ 29 KDa) lors du bourgeonnement des virus néo-synthétisés ou une fois relargué. Les deux sous-unités HA<sub>1</sub> et HA<sub>2</sub> restent liées par un pont disulfure (figure 6).

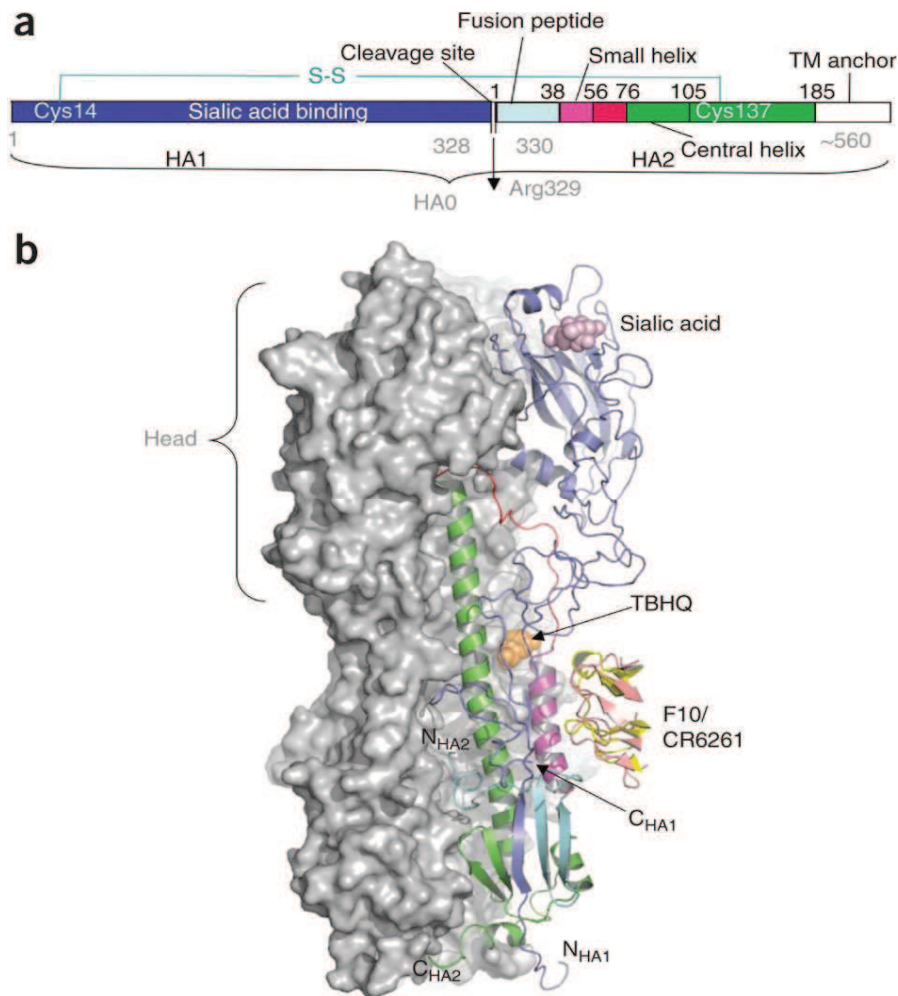


**Figure 6 : Structure tridimensionnelle de la HA des virus Influenza A d'après Amorij et al 2008**

Le clivage est assuré par des protéases de type trypsine ou protéases intracellulaires de type furine, présentes au niveau des muqueuses respiratoires et digestives. Le clivage s'effectue au niveau de l'Arginine en position 329 entraînant un changement conformationnel, démasquant la séquence hydrophobe de la HA<sub>2</sub> et révélant le peptide de fusion indispensable à la fusion des enveloppes virales et endosomales. Le clivage des précurseurs HA<sub>0</sub> des virus de sous-type

H1 et H3 infectant l'homme serait catalysé par une sérine protéase produite par les cellules de l'épithélium des bronches [29]. Cependant, les protéases responsables du clivage des HA<sub>0</sub> des virus aviaires sont inconnues. La virulence de virus Influenza de type A aviaire dépend cependant de la composition en acides aminés du site de clivage du précurseur HA<sub>0</sub>. Les différences leur permettent d'être clivés par des enzymes différentes, localisées dans différents sites de l'organisme hôte. Les virus faiblement pathogènes, dont le site de clivage possède un seul résidu arginine ne peuvent être clivés que par des enzymes de type trypsine. Alors que pour les virus hautement pathogènes présentant un site de clivage multibasique, les précurseurs HA<sub>0</sub> peuvent être clivés par des protéases de type furines, ubiquitaires et présentes dans de nombreux sites chez l'hôte. Ces virus hautement pathogènes sont à l'origine d'une infection systémique, chez l'oiseau comme chez l'homme, le plus souvent mortelle (figure 7).

L'attachement de la HA aux récepteurs est assuré par le Récepteur Binding Site (RBS). Il existe plusieurs récepteurs pour les virus influenza A. La spécificité de liaison aux récepteurs étant déterminée par certains aa du RBS, cette spécificité entraîne une restriction d'hôte. Par exemple, les virus humains présentant une HA possédant une leucine en position 226 et se liera préférentiellement à un acide sialique lié en  $\alpha$  2,6, présents au niveau des cellules épithéliales supérieur chez l'homme. Les virus aviaires avec une HA comportant un résidu glutamine dans cette même position entraînera une liaison préférentielle à un acide sialique lié en  $\alpha$ 2,3, qui se trouve au niveau du tractus intestinal chez l'oiseau.



**Figure 7: Agencement structurel de trimères HA à l'état pré-fusion (Source : Das et al, Nature Structural and Molecular Biology 2010)**

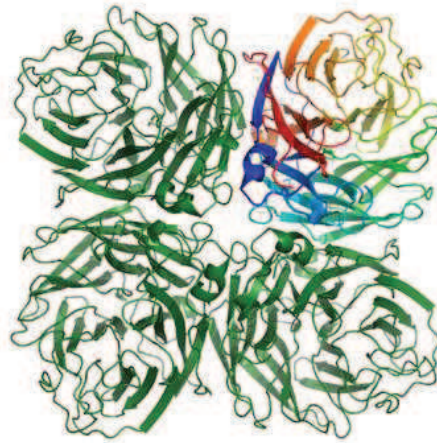
*a* : Représentation schématique des différents domaines du précurseur HA<sub>0</sub> des virus Influenza A

*b* : Représentation du trimère HA (HA1+HA2)

#### 4. 3.b. 2. La Neuraminidase NA

La Neuraminidase (NA) est une protéine de 50kD et de 454aa codée par le segment 6. Elle est présente à la surface des virions sous forme de tétramère (figure 8). Elle est constituée d'une courte partie transmembranaire, qui ancre la protéine dans la bicouche lipidique (constitué d'une série d'aa hydrophobe à son extrémité N-terminale) et d'un domaine externe composé d'une tête et une tige. La tête correspond à la partie variable de la protéine et porte les sites antigéniques de neutralisation. Exprimée dans la phase tardive du cycle viral au niveau du

Réticulum Endoplasmique, elle subit comme la HA des modifications postraductionnelles notamment des glycosylations lui permettant d'aboutir à sa forme active. La NA assure trois fonctions majeures : (i) faciliter le relargage des virus néo-synthétisés en hydrolysant les liaisons HA-acides sialiques en fin de cycle viral (Lamb and RM., 1996) ; (ii) cliver les acides sialiques présents dans les mucus des tissus épithéliaux pour accéder plus facilement à la cellule cible en début de cycle viral [30]; (iii) assurer la désialidation des HA des néo virions .



**Figure 8 : Structure cristallographique du tétramère de la NA de A (H1N1) de 1918 (Source : X. Xu et al J.Virol. 2008)**

Les fonctions des deux glycoprotéines de surface étant complémentaires, une balance fonctionnelle entre ces deux protéines existe pour l'optimisation du cycle viral. Le virus doit présenter une affinité pour les acides sialiques via les Hémagglutinines pour initier un cycle viral mais doit avoir une activité neuraminidasique suffisante pour permettre le relargage des virions néo-synthétisés. L'utilisation d'inhibiteurs de la neuraminidase, principales molécules antivirales actuellement utilisées, a pour conséquence une agrégation des particules virales au niveau de la membrane cytoplasmique de la cellule infectée et une diminution drastique de la dissémination des virus. Des mutations compensatoires au niveau de la neuraminidase et/ou de l'hémagglutinine (modification de l'affinité) peuvent apparaître *in vitro* et *in vivo* [31]. En effet il a été identifié huit acides aminés (R-118, D-151, R-152, R-224, E-276, R-292, R-371, and Y-406) sont appelés résidus catalytiques dus à leur contact direct avec le substrat ou qui sont critiques pour la fonction de la NA. Ainsi que dix autres (E-119, R-156, W-178, S-179, D-198, I-222, E-227, E-277, N-294, and E-425) qui sont appelés résidus de structure à cause de leur implication dans la stabilisation de la structure du site actif.



#### 4. 3.c. Les Protéines codées par les segments de gène internes

##### 4. 3.c. 1. La Protéine de Matrice de type 1 (M1)

La protéine de matrice M1 est la protéine la plus abondante de la particule virale. C'est une protéine de 252aa et de 28kD codée par le segment 7. Principalement cette protéine participe à l'architecture du virus (figure 9). Elle tapisse la face interne de l'enveloppe virale et interagit d'une part avec la bicouche lipidique cellulaire, par interactions électrostatiques via son domaine N-terminal mais aussi avec les RNPv via son domaine central. En s'associant avec la Nuclear Export Protein (=NEP), M1 assure l'export nucléaire des RNPv néo-synthétisés du noyau vers le cytoplasme [32]. La protéine M1 interagit avec les queues intra cytoplasmiques des protéines transmembranaires HA, NA et M2 (pour revue [33]) via des domaines encore non caractérisés. Elle assure des fonctions essentielles lors de différentes étapes du cycle viral [34]. Lors des étapes précoces du cycle viral, l'acidification de l'endosome médiée par des ATPases cellulaires (autour de pH5) permet une acidification secondaire de l'intérieur de la particule virale par un transport des ions H<sup>+</sup> depuis l'endosome via le canal à protons formé par le tétramère de protéines M2. Ce transport des ions H<sup>+</sup> dans le virus entraîne la libération du génome dans le cytoplasme. En fin de cycle, elle influence également l'assemblage du virus et son bourgeonnement [35]. Pour finir, des régions de la protéine M1 semblent être essentielles à l'inhibition de la transcription virale [36].

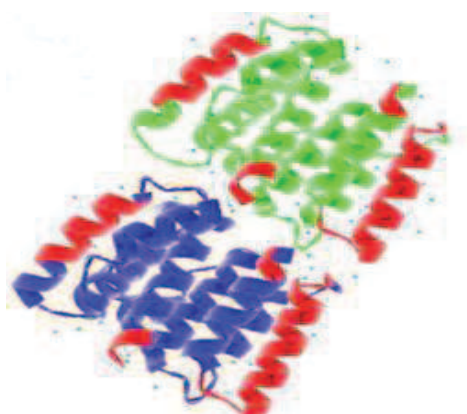


Figure 9 : Représentation de la structure 3D de la protéine de matrice M1 des virus Influenza de type A (adaptée de Goh et al, J.Virol., 2008)

#### 4. 3.c. 2. La protéine M2

M2 est une protéine transmembranaire de 97aa et de 11 kD issue de l'épissage alternatif du segment 7 [37] (figure 11). Cette protéine qui s'organise en homotétramère et dont la structure fut déterminée par RMN [38], joue le rôle de canal à proton [39] (figure 10). Elle est présente en faible nombre de copies (20 à 60 protéine M2 par virion).

L'activité du canal à proton est régulée par le pH : un pH neutre ou basique entraîne la fermeture du canal alors qu'un pH acide (=5) permet l'ouverture du canal. Son rôle est primordial en phase précoce du cycle viral. En effet après endocytose du virion, l'acidification de l'endosome (médiée par des ATPases cellulaires) provoque un changement de conformation de la protéine M2 aboutissant à l'ouverture du canal responsable du changement de conformation de la HA. Le peptide de fusion de la HA permet la fusion des membranes virale et endosomale entraînant la dissociation du virus et la libération du génome viral dans le cytoplasme de la cellule infectée. La conformation fermée du canal ionique M2 pendant le transport dans l'appareil de Golgi-trans permet de maintenir la protéine HA dans sa conformation à pH neutre [40]. De plus, la protéine M2 participerait au recrutement des protéines virales et des RNPv lors de l'assemblage du virus en phase tardive du cycle viral en interagissant avec la protéine M1 [41].

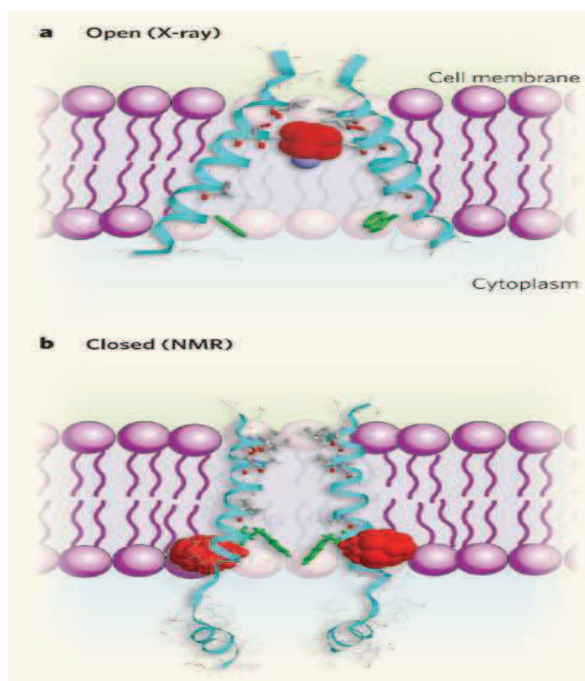


Figure 10: Représentation schématique du canal à proton M2 (Source : Miller et al, 2008, Nature).

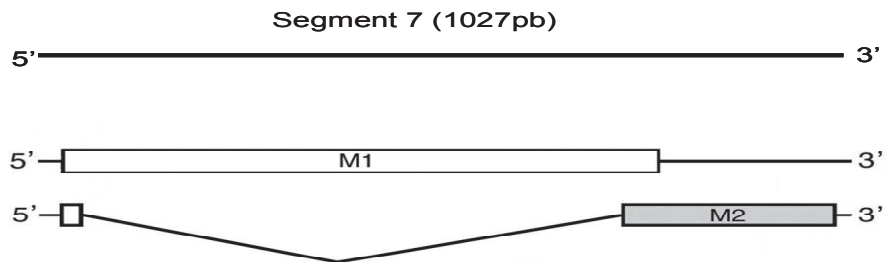


*a* : représentation du canal à proton ouverte

*b* : représentation fermée du canal à proton

La structure cristallographique de M2 représentée au sein de la bicouche lipidique.

Ces structures furent précédemment déterminées par cristallographie au rayon X [42] mais aussi confirmées par cette même équipe par RMN.



**Figure 11 : Transcrits M1 et M2 issus de l'épissage alternatif du segment 7**

#### **4. 3.c. 3. La protéine Non Structurale 1 (NS1)**

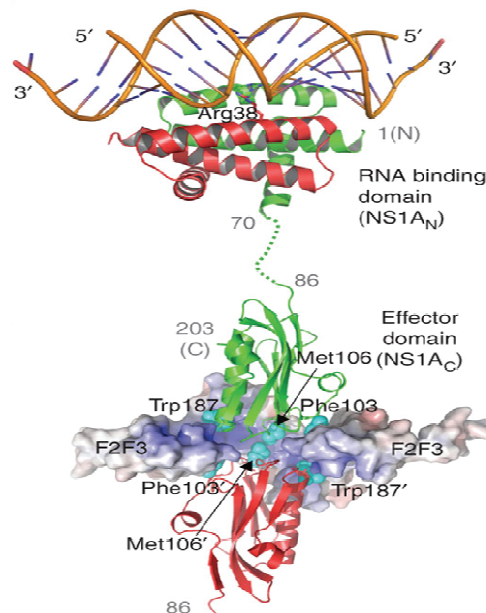
La protéine Non Structurale 1, codée par le segment 8, est exprimée uniquement dans les cellules infectées (et n'est pas retrouvée dans la particule virale). La protéine NS1 régule l'épissage de son propre transcrit et l'export de son ARNm [43]. Cette protéine de 27kD et de 230 à 237aa selon le virus, comporte deux domaines participant à sa dimérisation. La région N-terminale (aa 1 à 73) permet la liaison à l'ARN de manière aspécifique alors que la région C-terminale interagit avec des facteurs cellulaires. Cette protéine virale ne possède pas d'activité enzymatique. NS1 est majoritairement localisée dans le noyau des cellules infectées avec une proportion plus faible dans le cytoplasme [44] (figure 12).

On distingue deux allèles du gène codant NS1 appelés A et B. L'allèle A est retrouvé chez les virus humains, porcins et équins alors que l'allèle B est exclusivement détecté chez les virus aviaires [45]. Le rôle du type d'allèle dans la virulence et la pathogénicité des souches est encore peu clair.

La protéine NS1 possède de nombreuses fonctions. En effet cette protéine inhibe la réponse interféron (IFN) lors de l'infection virale. Les IFN de type 1 comme IFN $\alpha$  et IFN $\beta$  sont des cytokines solubles secrétées par les cellules en réponse à une infection virale. Ces cytokines

entraînent une cascade d'activation aboutissant à l'expression de plus de 300 gènes antiviraux (pour revue voir [46]).

Cette inhibition est principalement due à l'inhibition du facteur RIG I. Cette molécule est l'un des premiers intermédiaires de la voie de signalisation aboutissant à la transcription de l'IFN $\beta$  [46]. NS1 intervient aussi en régulant l'export des ARNm cellulaires en les séquestrant grâce à une interaction avec CPSF30 et PABPII. Ces interactions empêchent la polyadénylation des messagers ainsi que leur export [47]. NS1 bloquerait aussi la réponse antivirale en bloquant l'action des facteurs antiviraux PKR [48] et OAS [49].



**Figure 12: Structure des domaines N et C-terminaux des protéines NS des virus Influenza A (adapté de Das et al, Nature Structural et Molecular Biology)**

*La région N-terminale forme un hétéro-dimère stable qui se lie de manière non-spécifique à l'ARN. La région C-terminale contient le domaine effecteur.*

#### **4. 3.c. 4. La Nuclear Export Protein (NEP)**

La NEP est une petite protéine de 14 kD et de 121aa produite par l'épissage alternatif du segment 8 (anciennement appelé NS2) qui joue un rôle fondamental lors de l'export nucléaire. Comme son nom l'indique, la région N-terminale de NEP contient un Nuclear Export Signal (NES) qui va interagir avec CRM1 ainsi qu'avec les RNPv via son domaine C-terminal [32]

pour assurer l'export (figure 13). De plus des travaux menés par Bullido et ses collaborateurs semblent démontrer un rôle d'inhibition de la synthèse d'ARNv par la protéine NEP [50].

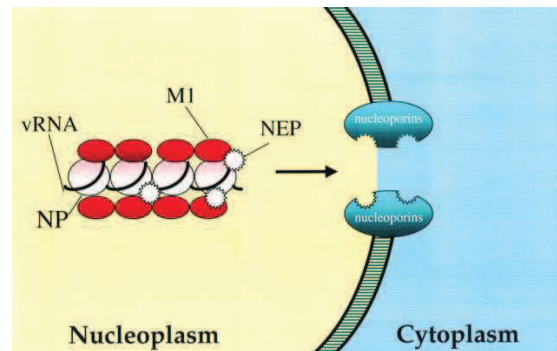


Figure 13 : Modèle d'export nucléaire des RNPv (Source: Robert et al, EMBO J., 1998)

#### 4. 3.c. 5. La protéine PB1-F2

PB1-F2 est la 2<sup>ème</sup> protéine codée par le segment 2 par son 2<sup>ème</sup> cadre de lecture (figure 14). Cette protéine de 87 aa récemment identifiée [51] induit l'apoptose médiée par les mitochondries [52]. Elle cible les membranes interne et externe de la mitochondrie grâce à une séquence d'adressage C-terminale non conventionnelle et perturbe la fonction de la mitochondrie [53]. En effet, PB1-F2 interagit avec ANT3 et VADC1 induisant la formation de pores dans la membrane permettant la libération de cytochrome C [52]. Cette protéine est aussi impliquée dans la pathogénèse virale chez les souris [54]. Il fut récemment démontré qu'elle cible et détruit les macrophages alvéolaires [55].

La fonction pro-apoptotique de PB1-F2 fait de cette protéine virale un facteur de virulence important. La destruction du tissu pulmonaire due à l'infection virale peut être favorable à la surinfection bactérienne (*Staphylococcus aureus*) [56].

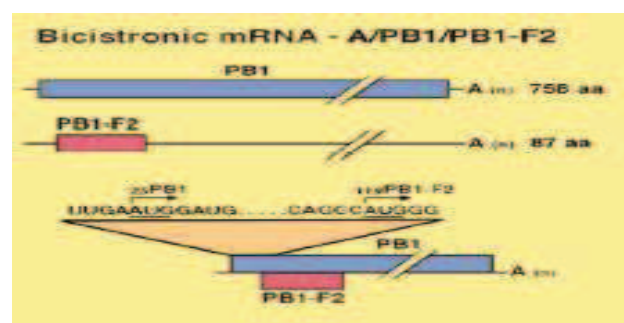


Figure 14 : ARNm PB1 et PB1-F2 issus du segment 2

#### **4. 3.c. 6. La protéine N40**

De récents travaux ont permis l'identification d'une 12ème protéine codée par le segment 2 : N40 [57]. Cette protéine, codée à partir d'un codon d'initiation présent dans le même cadre de lecture que celui de la protéine PB1, correspond à la protéine PB1 déléetée de 40 aa de sa région N-terminale. Elle possède le même domaine fonctionnel que la protéine PB1 (à l'exception du site de liaison à la protéine PA). Les études menées sur cette protéine semblent montrer que la protéine N40 seule, n'est pas essentielle pour la réplication du virus. Ces études ont montré une interdépendance des protéines codées par le segment 2 : l'abolition de l'expression de N40 entraîne une augmentation de l'expression de PB1-F2 et inversement. Son rôle dans le cycle viral n'est cependant à l'heure actuelle pas clairement défini.

## 5. Le Cycle Viral

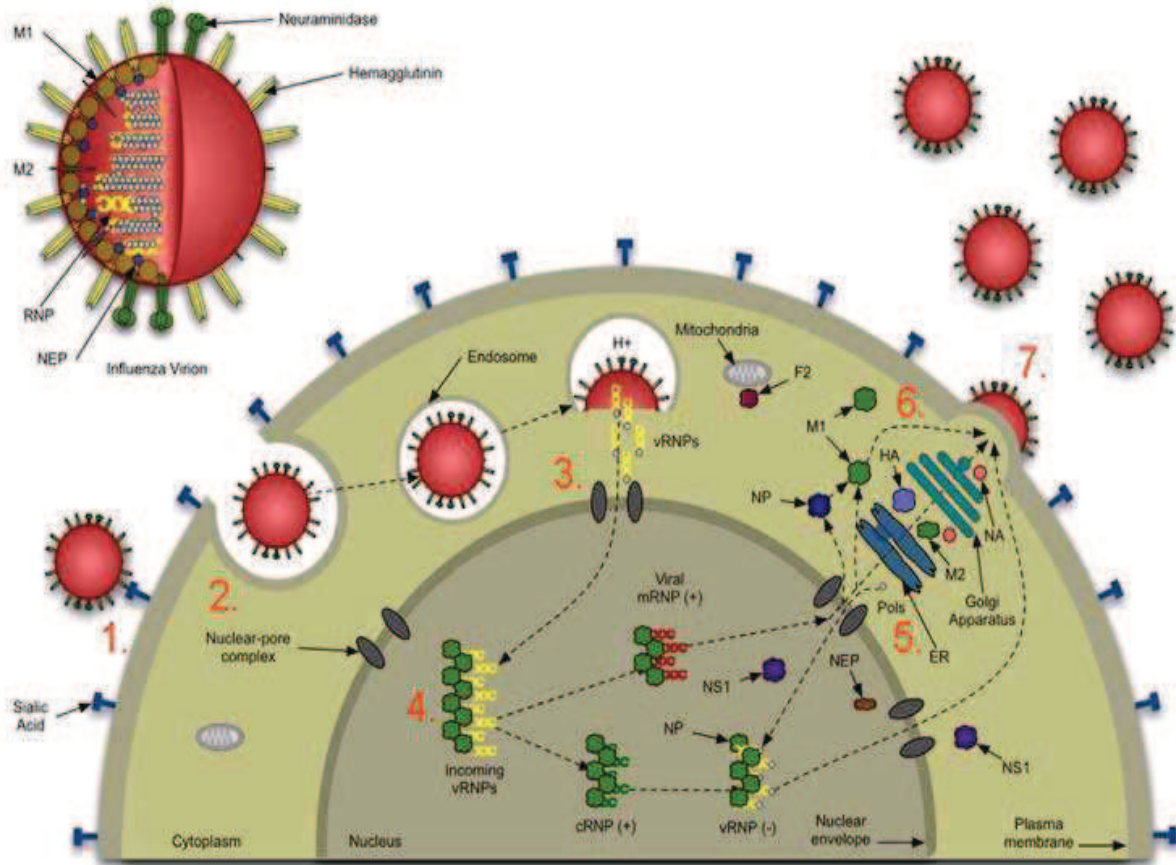


Figure 15: Représentation schématique du cycle répliquatif des virus Influenza A adapté de Molecular modeling of hemagglutinin from Influenza Viruses

### 5.1. L'attachement

Le glycocalix des cellules cibles des virus Influenza (couche de polyholosides présents à la surface des cellules eucaryotes) est composé de glycoprotéines dont le sucre terminal est l'acide sialique. La particule virale initie son cycle viral en se fixant par ses HA sur les acides sialiques cellulaires présents à la surface du pôle apical des cellules cibles [58]. La région responsable de l'interaction HA-récepteur s'appelle le RBS (=Receptor Binding Site). La nature du RBS dépend de l'origine du virus : les HA des virus Influenza A humain ont une affinité particulière pour acides sialiques liés par des liaisons  $\alpha 2,6$  (tractus respiratoire

supérieur), alors que les HA des virus aviaires s'attachent préférentiellement aux acides sialiques de conformation  $\alpha$ 2,3 (tractus intestinal). Le mécanisme de reconnaissance par la HA est modulé par l'activité sialidase de la neuraminidase [59].

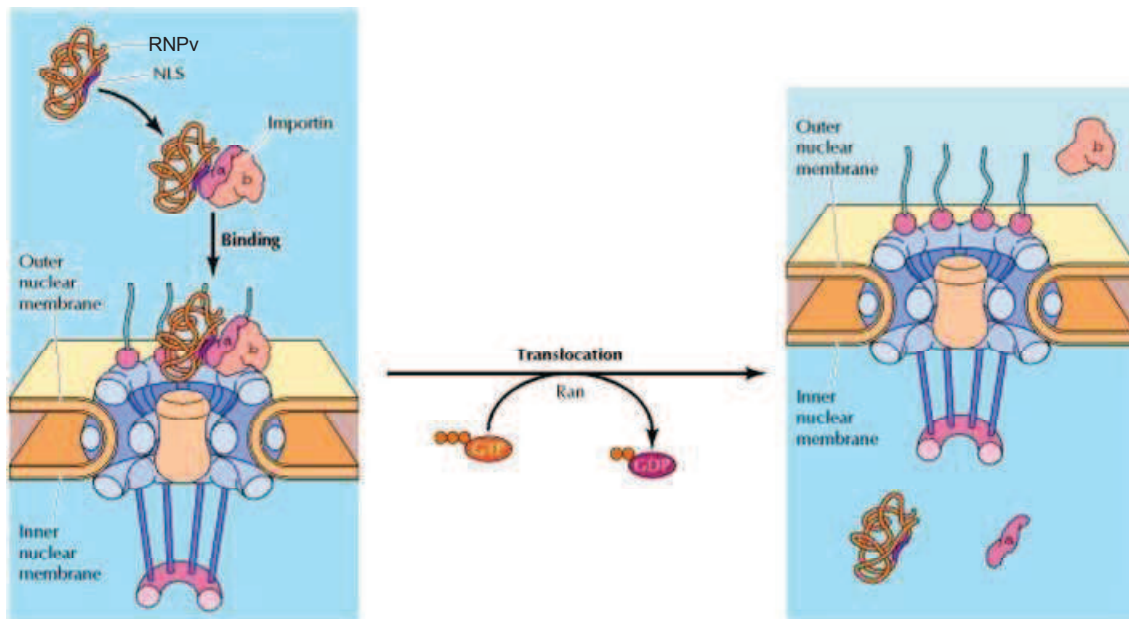
## **5.2. L'Endocytose**

La particule virale est internalisée dans une invagination de la membrane plasmique qui forme une vésicule d'endocytose par un mécanisme clathrine-dépendant et indépendant [60]. Après endocytose, le virus est retrouvé dans un endosome précoce.

L'acidification de l'endosome est médiée par des ATPases cellulaires conduisant à une modification conformationnelle de l'HA et qui aboutit à l'exposition du peptide de fusion. Celui-ci initie la fusion de la bicouche lipidique virale avec la membrane endosomale [61]. De plus, l'acidification intra-endosomale active les canaux ioniques constitués par la protéine virale M2, responsable de l'acidification de la particule virale. La diminution du pH est responsable de la dissociation des RNP viraux de la couche de protéine matricielle M1 qui tapisse la face interne de la membrane virale. Ces deux événements pH dépendants - fusion des membranes virales et endosomales via l'HA et dissociation de M1 des RNP viraux - permettent la libération des 8 segments génomiques dans le cytoplasme de la cellule infectée.

## **5.3. Import nucléaire des RNPv**

Le génome viral va être libéré dans le cytoplasme et les RNPv vont être transloqués dans le noyau grâce à un des signaux NLS présents au niveau des nucléoprotéines. En raison de la taille des RNPv (10 à 20 nm), la translocation nucléaire nécessite un système de transport actif. Elle est médiée par un mécanisme dépendant du gradient nucléocytoplasmique Ran-GDP Ran-GTP. Les RNPv, via le NLS de la NP, vont être reconnus par l'importine  $\alpha$  qui sera elle-même reconnue par l'importine  $\beta$  pour être transloquée dans le noyau (figure 16).



**Figure 16 : Import nucléaire des RNPv dans le complexe du pore nucléaire**

Les RNPv sont transportés à travers le complexe du pore nucléaire en deux étapes. Le RNPv (possédant NLS dans la NP) est reconnu par l'importine  $\alpha$ , formant un complexe avec l'importine  $\beta$ . L'Importine  $\beta$  se lie aux filaments cytoplasmiques du complexe du pore nucléaire, permettant le transport des RNPv au pore nucléaire. Les RNPv et l'importine  $\alpha$ , sont transloqués par le complexe du pore nucléaire dans une seconde étape nécessitant de l'énergie fournie par l'hydrolyse de du GTP de la protéine Ran.

Adapté de "The Nuclear Envelope and Traffic between the Nucleus and Cytoplasm" de Cell

## 5.4. La Transcription/Réplication Virale

Le génome viral va être transcrit et répliqué dans le noyau par l'intermédiaire de l'ARN polymérase virale. Les ARNv génomiques vont être transcrits en ARNc qui sert de matrice à la répllication et en ARNm pour la synthèse des protéines virales.

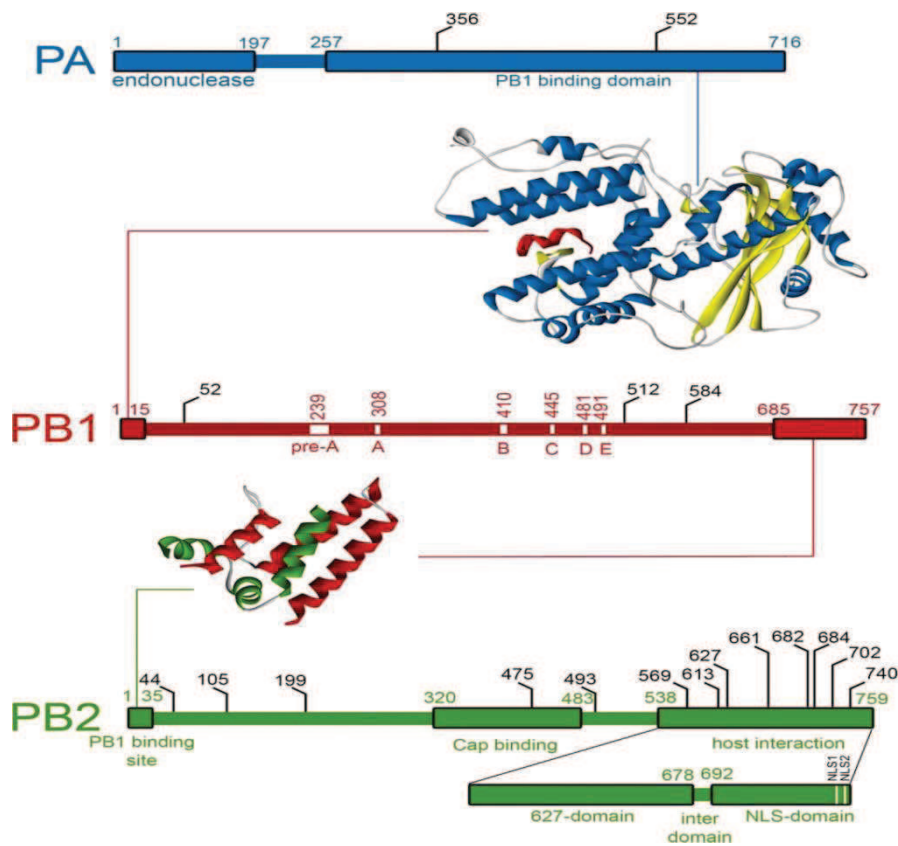
### 5.4.a. La transcription : synthèse des ARN messagers.

La transcription aboutit à la synthèse d'ARNm coiffés et possédant une queue polyA qui seront ensuite exportés vers le cytoplasme pour être traduits.

L'association de l'extrémité 5' de l'ARNv à la protéine PB1 induit un changement de conformation du complexe polymérase qui permet, à la protéine PB2, de capturer la coiffe



m<sup>7</sup>G des ARN pré-messagers cellulaires (cap snatching) [62]. L'interaction du complexe polymérase virale avec le domaine C-terminal de la grande sous-unité de l'ARN polymérase II cellulaire augmenterait l'efficacité de ce mécanisme [63]. La sous-unité PB1 recrute dans un deuxième temps l'extrémité 3' de l'ARNv. L'appariement des extrémités 3' et 5' de l'ARNv induit l'activation de l'activité endonucléase de la sous-unité PA qui clive l'ARNm en aval de la coiffe. Ce produit de clivage sert d'amorce à la transcription [15]. L'élongation de l'ARNm, assurée par la sous-unité PB1, s'effectue par copie de la matrice ARNv jusqu'au signal de polyadénylation (5 à 7 uraciles) localisé à environ 15 à 22 nucléotides de l'extrémité 5' (figure 17). Le complexe polymérase viral induit alors la synthèse d'une queue polyA allant de 60 à 350 résidus [64]. Les ARN messagers viraux peuvent ensuite subir des étapes de maturation et d'épissage, puis sont exportés vers le cytoplasme.



**Figure 17 : Domaines fonctionnels de l'ARN polymérase**

*Les représentations linéaires des 3 sous-unités de l'ARN polymérase sont annotées pour montrer les domaines caractérisés. Les résidus impliqués dans l'adaptation à l'hôte sont représentés en noir. La structure des régions d'interaction PA-PB1 et PB1-PB2 est représentée par des hélices de couleur.*



#### **5.4.b. La Réplication : synthèse des ARN génomiques**

La réplication du génome viral passe par la synthèse d'ARNc, complémentaires aux ARNv qui serviront de matrice pour la synthèse de nouvelles copies d'ARNv. L'ARNc n'est pas coiffé et ne possède pas de queue poly-A. La synthèse de novo d'ARNc a lieu à partir du premier nucléotide 3' de la matrice ARNv et ne nécessiterait pas d'amorce. Contrairement aux ARNm, les ARNc sont encapsidés par la NP de manière co-transcriptionnelle pour former des RNPc qui seront ensuite utilisés comme matrice pour la synthèse de copies d'ARNv.

Les mécanismes de régulation de la synthèse d'ARNc et d'ARNv sont aujourd'hui encore mal connus. Alors que la synthèse des ARNv augmente considérablement au cours du temps, le nombre de copies d'ARNc reste faible tout au long du cycle viral.

La protéine NP semble jouer un rôle central dans la régulation de ce mécanisme. En effet, NP semble être essentielle pour l'élongation de l'ARNc mais pas pour l'initiation de la réplication [22]. La protéine NP modifierait la structure de l'ARNv et les propriétés fonctionnelles du complexe polymérase en interagissant directement avec eux [9, 65]. Les protéines virales PA, PB2, NEP, PB1-F2 et NS1 pourraient interagir avec la machinerie de réplication pour réguler la synthèse des ARNc et ARNv [66-68]. Pour finir, on ne peut pas exclure le rôle de facteurs cellulaires dans la régulation de la réplication comme suggéré dans certaines études [69-71].

#### **5.5. Export nucléaire des RNP viraux**

L'export nucléaire des RNPv met en jeu des interactions ARN/protéines, permettant une association des RNPv avec les protéines M1. Ce processus fait aussi intervenir la NEP qui joue un rôle clef dans cette étape. Des expériences *in vitro* montrent que le domaine C-terminal de M1 se lie au RNPv néo-synthétisés tandis que son domaine N-terminal, qui possède un signal NES (Nuclear Export Signal) se fixe à la protéine NEP. Cette interaction va permettre au complexe d'être pris en charge par CRM1. Appartenant à la superfamille des importines $\beta$ , CRM1 est une exportine utilisée par de nombreuses molécules cellulaires, qui va permettre aux RNPv d'être exportés dans le cytoplasme de la cellule hôte. Une fois dans le cytoplasme, l'interaction entre M1 et la NP masque son motif NLS empêchant ainsi son retour dans le noyau [72].

D'autres hypothèses ont été émises concernant notamment l'implication de la NP dans l'export nucléaire des RNPv. Ces hypothèses remettent en cause le rôle central de la NEP s'appuyant notamment sur l'observation d'une distribution de NEP inchangée lors du blocage de CRM1 [73]. L'existence d'interaction entre les protéines CRM1 et NP qui ne possède pas de NLS [74] permet d'envisager l'existence de différentes voies d'export nucléaire.

## **5.6. Incorporation des constituants viraux dans les particules virales néo-synthétisées**

### **5.6.a. Transport des RNPv jusqu'à la membrane apicale : site d'assemblage des virions**

L'assemblage de la particule virale se déroule au niveau de la membrane cytoplasmique et plus particulièrement au site d'assemblage où l'ensemble des composants viraux doivent être présents (RNPv, les protéines HA, NA, M1 et M2) [35].

Le transport des glycoprotéines HA et NA est effectué grâce à des peptides signaux localisés dans leur domaine transmembranaire. Ils interagissent avec les composants des radeaux lipidiques [75], zone de la membrane plasmique cellulaire, composée principalement de glycosphingolipides et de cholestérol. L'association des GP aux radeaux lipidiques détermine le site de bourgeonnement apical. Il semblerait cependant que la sélection du site d'assemblage ne soit pas uniquement due à la protéine transmembranaire HA. Des travaux ont montré qu'une mutation de la HA permettant son adressage au site baso-latéral de la cellule n'altérerait pas le site de bourgeonnement [76]. La localisation du site d'assemblage pourrait donc faire intervenir des éléments de la cellule hôte mais aussi d'autres composants viraux.

Le transport de la protéine M1 et des RNPv vers le site d'assemblage est moins bien défini. M1 joue un rôle central dans le processus de bourgeonnement. L'expression de la protéine M1 permet à elle seule la production de pseudo-particules virales [34]. M1 peut interagir à la fois avec les lipides membranaires et avec la NP, l'ARNv et les queues cytoplasmiques des glycoprotéines HA et NA [36, 77, 78]. Les RNPv migrent jusqu'au site d'assemblage en utilisant le réseau d'actine et interagissent avec les composants des radeaux lipidiques et la protéine M1 [79].

### **5.6.b. Empaquetage des RNPv dans la particule virale**

La constitution d'une particule virale infectieuse nécessite l'incorporation d'un jeu complet des huit segments de gène dans la particule virale néo-synthétisée. De nombreuses études ont été menées pour caractériser les mécanismes responsables de l'incorporation du génome viral. Ainsi, deux modèles ont été proposés sur la production des virus infectieux: le modèle d'incorporation aléatoire des segments de gène viraux et le modèle d'incorporation sélective. Ces mécanismes seront décrits dans le paragraphe I.8

### **5.7. Le Bourgeonnement**

Dernière étape du cycle viral, le bourgeonnement des particules virales semble principalement impliquer les protéines virales HA, NA et M1. En effet, bien qu'il soit admis que l'incorporation de M1 dans la membrane plasmique crée une asymétrie dans la bicouche lipidique qui initie le bourgeonnement [34], de récents travaux sur la production de particules pseudo-virales, ont montré l'implication de HA et NA dans ce processus [80].

Le relarguage des particules virales néo-synthétisées est effectué grâce à l'activité sialidase de la NA. En hydrolysant les liaisons entre les acides sialiques et les HA, la neuraminidase va empêcher l'agrégation des particules virales à la surface des cellules infectées mais aussi favoriser leurs disséminations dans le mucus respiratoire.

## **6. Eco- Epidémiologie**

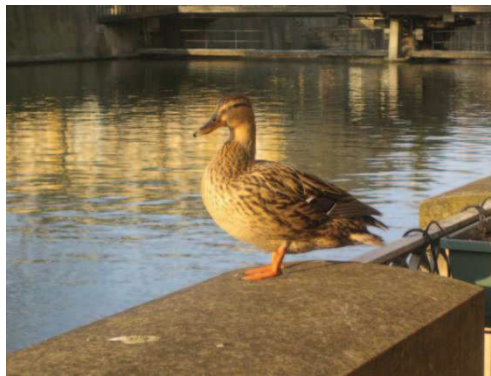
### **6.1.écologie**

Les oiseaux sont le réservoir naturel des virus Influenza de type A. Chez les oiseaux d'élevages et sauvages, la transmission de l'infection se fait par voie digestive. Le tractus intestinal étant le lieu de réplication du virus, l'excrétion des virus (dans les fientes) va permettre un cycle de réinfection par voie oro-fécale. Cependant chez les volailles domestiques, l'infection par des virus aviaires peut causer deux grandes formes de pathologies qui se distinguent par une virulence faible ou forte. Les virus aviaires dits faiblement pathogènes (LPAI) n'occasionnent généralement que des symptômes légers (par exemple le

gonflement du plumage et chute de la production d'œufs); l'infection peut aisément passer inaperçue. Les virus aviaires hautement pathogène, dite HPAI (observés uniquement avec les sous-types H5, H7) ont des effets beaucoup plus spectaculaires. Ils se propagent très rapidement dans les élevages de volaille, entraînant un taux de mortalité qui peut approcher les 100 %, souvent dans les 48 heures post-infection. Ce statut de HPAI est lié à l'apparition de HA présentant un site de clivage polybasique.

Les sous-types viraux infectant l'homme sont les virus A (H1N1) et A (H3N2).

Les porcs sont des hôtes importants dans l'écologie des virus influenza A car ils sont sensibles à l'infection par les virus influenza A aviaires et humains, ils permettent leur réplication. Ils sont donc des hôtes potentiels pour le réassortiment génétique des virus Influenza A d'origines aviaire et humaine.



## 6.2. Epidémiologie

### 6.2.a. Clinique chez l'homme

La grippe saisonnière est une infection respiratoire aiguë. Cette maladie sévit dans les régions tempérées, sur un mode épidémique saisonnier essentiellement en hiver. Le tableau clinique se traduit par une trachéo-bronchite simple, associant des signes locaux (rhinite, toux, maux de gorge...) et des signes généraux (céphalées, fièvre élevée d'apparition brutale, frissons, myalgies...).

Une grande majorité de sujets guérissent en quelques jours sans traitement. Cependant des complications peuvent survenir chez des populations fragiles comme les immunodéprimés, les personnes âgées ou déjà atteintes de maladies respiratoires ou cardiovasculaires et les nourrissons.

## 6.2.b. Mode de transmission

### 6.2.b. 1. La transmission interhumaine

La contamination interhumaine se produit par voie aérienne (par l'intermédiaire de microgouttelettes excrétées par des sujets infectés lors de la toux ou d'éternuements). Elle peut aussi se faire par contact rapproché avec une personne infectée, ou encore par le contact avec des objets touchés et donc contaminés par une personne malade (exemple : une poignée de porte) (figure 18).



**Figure 18 : transmission interhumaine du virus Influenza A**

*Adapté de <http://www.pratique.fr/transmission-grippe-a-h1n1-comment-virus-transmet-actuellement.html> et <http://influenza.h5n1.over-blog.com/categorie-316379.html>*

### 6.2.b. 2. La transmission inter-espèce

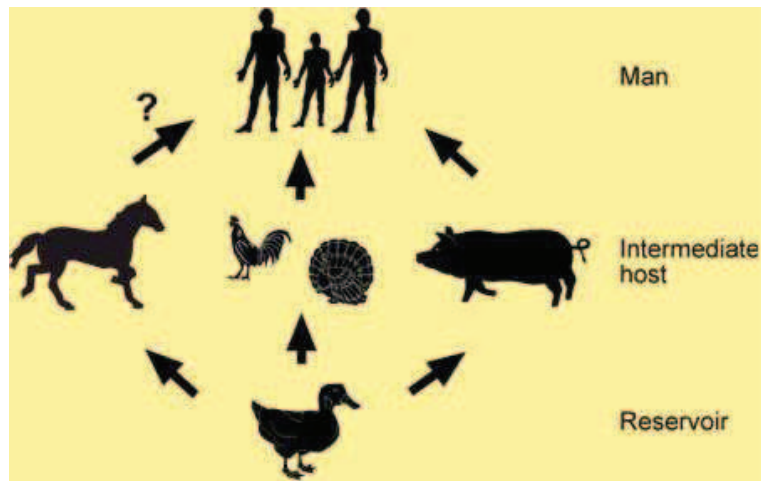
Les virus se transmettent facilement entre les individus d'une même espèce. Par exemple, chez l'oiseau, la transmission est facilitée par le regroupement de nombreux oiseaux dans des petits points d'eau douce ou saumâtre, dans lesquels il peut être retrouvé de très nombreuses particules virales éliminées dans les excréta des oiseaux infectés.

Naturellement, il existe une «barrière d'espèce», empêchant les agents infectieux de passer entre les espèces. Cette restriction d'hôte intervient à différents niveaux notamment lors de la reconnaissance des récepteurs cellulaires par la HA. Les virus influenza humains ont une affinité particulière pour ces récepteurs porteurs d'acides sialiques de type  $\alpha$  2,6 prépondérants à la surface des cellules du tractus respiratoire humain alors que les virus

aviaires s'attachent préférentiellement aux récepteurs de type  $\alpha$  2,3 plus abondants à la surface des cellules du tractus digestif aviaire.

Concernant la protéine PB2, des études réalisées en culture cellulaire, ont montré que l'acide aminé en position 627 était déterminant pour la définition de la spécificité d'espèce [86] mais aussi pour le pouvoir pathogène des virus A (H5N1) chez la souris. Les virus aviaires faiblement pathogènes possèdent un acide glutamique (Glu) en position 627 et ils induisent peu de symptômes chez la souris, alors que les virus humains saisonniers et les virus aviaires hautement pathogènes, qui présentent une lysine (Lys), sont responsables d'une infection sévère chez la souris [87]. La présence d'une lysine en 627 améliorerait la capacité de réplication du virus dans les cellules de mammifères à 37°C, plutôt qu'à 41°C, température optimale de croissance chez le poulet [88]. Plus récemment, Li et al ont décrit une meilleure activité du complexe polymérase à 33°C plutôt qu'à 37°C, si il possédait la protéine PB2 porteur d'une lysine en position 627 [89]. L'acquisition par un virus aviaire d'un résidu lysine en position 627 améliorerait donc sa réplication à 33°C, qui est la température des voies aériennes supérieures chez l'homme, pouvant ainsi favoriser son infectiosité et sa transmission

Cependant, de manière épisodique, les virus Influenza peuvent franchir la barrière d'espèce. Un changement par mutation de la séquence en acides aminés de ce site de liaison de l'HA pourrait suffire pour qu'un virus aviaire s'adapte à l'homme. De plus, le réservoir de virus grippaux chez les porcs joue un rôle important dans le risque de transmission des virus aviaires à l'homme (figure 19). En effet, les cellules épithéliales du tractus respiratoire du porc co-expriment les deux types d'acides sialiques reconnus par les virus humains et aviaires. Il constitue donc un hôte intermédiaire (= « creuset de mélange ») à l'intérieur duquel, des événements de réassortiment génétique peuvent avoir lieu permettant *in fine* l'émergence de virus pouvant franchir la barrière d'espèce.



**Figure 19 : Hôtes des virus Influenza**

Adapté de <http://influenza.h5n1.over-blog.com/article-714366.html>

### **6.2.b. 3. Diffusion épidémique chez l'homme**

Les épidémies de grippe surviennent chaque année au cours de l'automne et de l'hiver dans les régions tempérées. Elles provoquent des hospitalisations et des décès principalement parmi les groupes à haut risque (très jeunes, personnes âgées ou maladies chroniques). En France métropolitaine, le réseau Sentinelles estime, qu'entre 700 000 et 4,6 millions de personnes consultent pour un syndrome grippal lors d'une épidémie. En moyenne, 2,5 millions de personnes seraient concernées chaque année (selon l'InVS). Au niveau mondial, ces épidémies annuelles sont responsables d'environ trois à cinq millions de formes graves, et de 250 000 à 500 000 décès (selon l'O.M.S.). La plupart des décès associés à la grippe dans les pays industrialisés surviennent parmi les personnes âgées de 65 ans ou plus. Dans certains pays tropicaux, les virus grippaux circulent tout au long de l'année avec un ou deux pics au cours de la saison des pluies.

### **6.2.b. 4. Diffusion pandémique**

Les pandémies de grippe sont provoquées par l'apparition d'un virus totalement différent des souches précédentes, contre lequel, très peu d'individus sont immunisés. Généralement, il s'agit de l'émergence d'un virus appartenant à un sous-type différent des virus ayant circulé les années précédentes (HA et/ou NA différentes) ou d'un virus de même sous-type mais



d'origine différente (aviaire ou porcine). Une pandémie est une épidémie mondiale touchant approximativement 30% de la population.

Au cours de l'histoire, les pandémies de grippe ont été bien décrites. En règle générale, elles apparaissent à intervalles de 10 à 50 ans et provoquent de nombreux décès chez les enfants et les personnes âgées ou atteintes de pathologies graves. Des documents grecs datant de 412 avant notre ère font état de possibles flambées de grippe, mais ils ne sont pas très précis. Cependant certains documents historiques suggèrent l'existence d'au moins treize pandémies de grippe depuis 1580.

#### α. Grippe « espagnole »

L'une des pires pandémies enregistrées est celle de la « grippe espagnole » (1918-1920), qui a touché 50 % de la population mondiale et provoqué 20 à 50 millions de morts dans le monde. Son surnom « grippe espagnole » vient du fait que seule l'Espagne - non impliquée dans la Première Guerre mondiale - a pu, en 1918, publier librement les informations relatives à cette épidémie. Les journaux français parlaient donc de la « grippe espagnole » qui faisait des ravages « en Espagne » sans mentionner les cas français qui étaient tenus secrets pour ne pas faire savoir à l'ennemi que l'armée était affaiblie. La souche pandémique, originaire de Chine, est probablement arrivée en France à bord d'un bateau en avril 1918. De là, l'infection s'est propagée aux combattants de la Première Guerre mondiale avant de gagner l'ensemble de l'Europe. Elle a gagné rapidement les États-Unis, où le virus aurait muté devenant plus virulent. Elle diffusa à travers l'Europe, puis dans le monde entier par ses colonies.

La première vague modérée, survenue au printemps 1918, fut suivie d'une seconde vague de septembre à novembre 1918. La mortalité observée fut de 2,5%, c'est-à-dire 25 fois plus élevée que la mortalité mesurée lors d'une épidémie saisonnière (0,1%). Enfin, une troisième vague aussi meurtrière, submergea la planète au cours de l'année 1919. La mortalité élevée associée à cette pandémie, touchant principalement les sujets jeunes, reste encore partiellement inexplicite.

La souche virale responsable de cette pandémie est une souche A (H1N1) d'origine aviaire et hautement pathogène pour l'homme, qui ne contient cependant pas de site de clivage multibasique. L'étude du génome du virus a pu être effectuée par séquençage d'ARN viral extrait de biopsies de poumons d'une victime cryo-conservée dans du permafrost [90]. Cette



étude révèle que ce virus n'est vraisemblablement pas issu d'un réassortiment génétique, mais serait un virus aviaire qui s'est adapté à l'homme *in toto*.

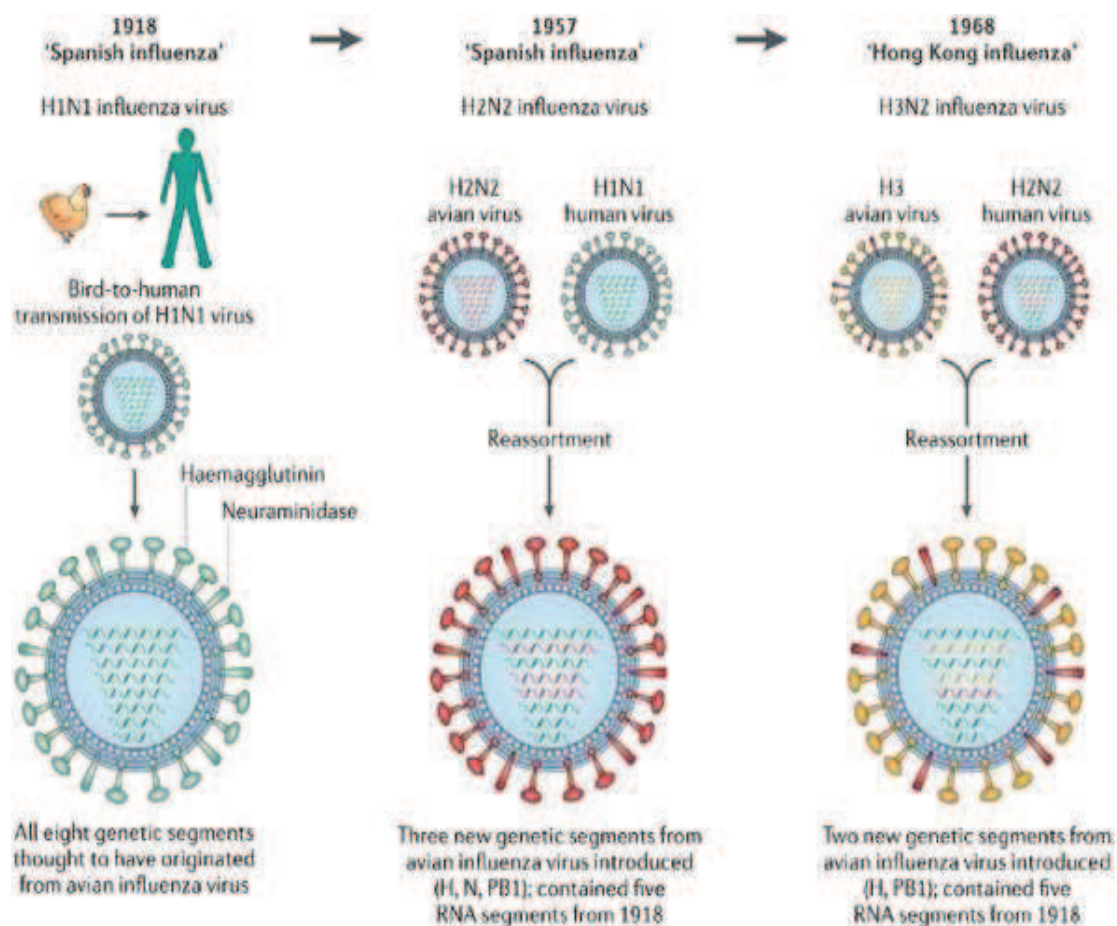
L'étude de la pathogenèse de ce virus, chez le primate, en utilisant des virus recombinés obtenus par génétique inverse, a montré qu'il provoquait une infection du tractus respiratoire sans dissémination systémique [91]. La mortalité semble avoir été liée à la survenue de pneumonies virales mais aussi à des surinfections bactériennes dont les conséquences ont été lourdes du fait de l'absence d'antibiotiques à cette époque [92]. L'analyse du génome viral a permis de mettre en évidence des signatures humaines au niveau de la HA, de la NA et du complexe polymérase [90] (figure 20).

### *β. Grippe asiatique (1957/1958)*

D'origine chinoise, cette pandémie s'est développée de l'hiver 57 au printemps 58, en deux vagues. Le virus impliqué était de sous type A (H2N2). Elle a également entraîné des complications pulmonaires graves, chez les jeunes adultes en bonne santé, mais moins fréquemment que lors de la grippe « espagnole ». Au total, on estime que cette grippe a directement été responsable d'environ 1 million de morts dans le monde, dont 70000 aux Etats Unis (figure 20).

### *γ. Grippe de Hong-Kong (1968)*

Provenant de Hong-Kong, le virus de cette pandémie s'est répandu à partir de l'été 68. On estime que cette grippe très sévère a fait directement plus d'un million de morts dans le monde, dont 33800 aux Etats Unis et 18.000 en France (Figure 20).



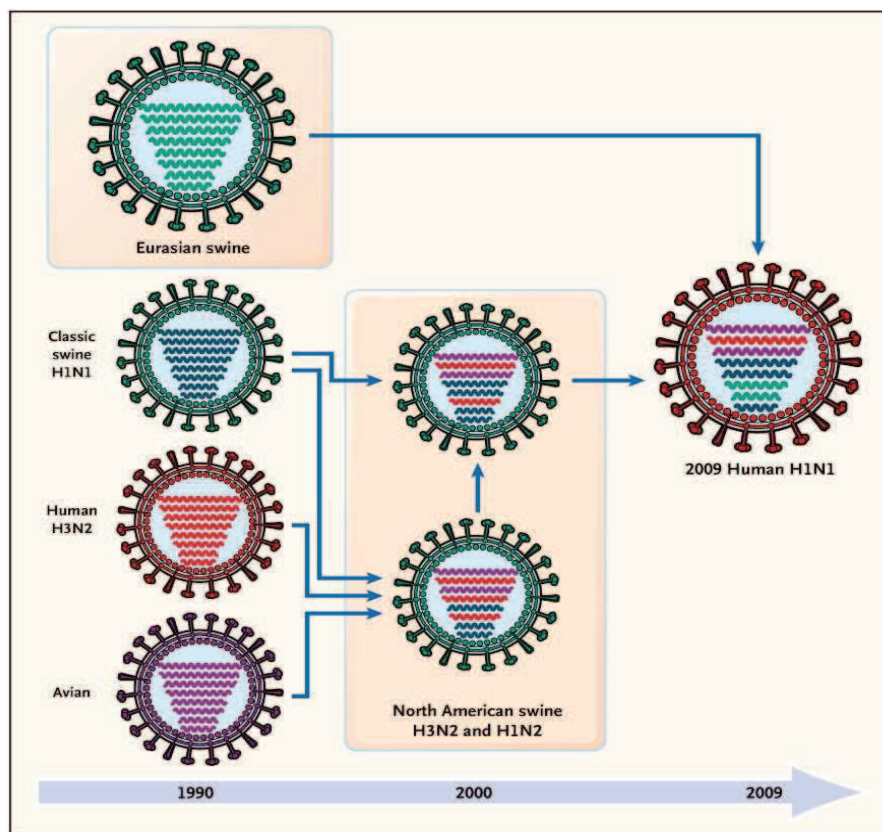
**Figure 20: Représentation des événements de réassortiment génétique responsable des pandémies des virus Influenza de type A au XXe siècle adapté de De Clercq et al 2006 from Nature drugs reviews**

#### Δ. Pandémie 2009/2010 A (H1N1)v

En février 2009, l'introduction d'un nouveau virus A (H1N1)v d'origine porcine, déclencha une nouvelle épidémie mondiale. En mars et avril 2009, 1300 cas de grippe anormalement virulente ont été détectés au Mexique provoquant la mort de 81 personnes. Les autorités de Mexico informèrent l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et la PAHO (Pan American Health Organization) d'une probable épidémie. Aux Etats-Unis, le CDC (Centers for Disease Control) identifia le virus A(H1N1)v dans deux prélèvements, indépendamment collectés, dans le sud de la Californie, mi-avril. Fin avril, la diffusion internationale et l'existence de cas groupés de transmission interhumaine imposa à l'OMS d'augmenter le niveau d'alerte pandémique de la phase 3, 4 puis rapidement à la phase 5 (dissémination interhumaine dans au moins deux pays, signe d'une pandémie imminente). Le 11 juin 2009, l'OMS a décidé le passage en phase 6, l'état de pandémie a été déclaré. A partir de la mi-juillet 2009, l'OMS a

cessé son dénombrement systématique des cas confirmés. Elle reste attentive aux taux de mortalités qui s'il s'élevait, traduiraient une possible évolution du virus A (H1N1).

L'étude génétique de cette nouvelle souche virale montre qu'elle est composée d'une mosaïque de gènes. En effet elle se trouve être le fruit du réassortiment génétique entre le virus porcin appelé « triple réassortant porcins » qui circule chez le porc au USA depuis les années 1990 (comportant des segments internes porcins issus du lignage classique, des segments aviaires et un segment humain) et un autre virus porcin de lignage eurasiatique. (Figure 21).



**Figure 21: Historique des événements de réassortiments génétiques du virus A (H1N1)v**

Adapté de <http://thefastertimes.com/globalpandemics/2009/08/01/swine-flu-bringing-the-pandemic-out-of-the-box/>

Après plusieurs mois de circulation, plus de 23000 virus ont été analysés, ils sont apparentés antigéniquement à la souche vaccinale A/California/07/2009. Ces virus ne possèdent pas de facteurs de virulence particuliers mais son segment de gène HA semble phylogénétiquement proche du segment de gène HA du virus de 1918 ayant circulé chez l'homme jusqu'en 1957,

qui a été réintroduit en 1977. Cette observation permet d'envisager que les personnes ayant fait une infection grippale entre 1918 et 1977 aient pu garder une certaine immunité résiduelle vis-à-vis de ce virus.

## **6.3. Traitements**

### **6.3.a. Vaccination**

Il n'existe pas actuellement de thérapie totalement efficace pour traiter les infections dues au virus de la grippe. La prévention par la vaccination reste donc la meilleure arme en terme de santé publique pour lutter contre l'infection grippale. La composition vaccinale est définie chaque année par l'OMS en raison de la dérive antigénique des souches circulantes. Le vaccin grippal contient les antigènes viraux des souches A, (A (H1N1) et A (H3N2)) et de la souche B prototypes.

Le processus classique de production de vaccin consiste dans un premier temps en l'obtention de semences vaccinales sur œuf, pour chacune des trois souches prototypes déterminées, ayant des caractéristiques antigéniques optimisées pour la production sur œuf. Pour les virus de type A, chaque semence vaccinale est issue d'un processus de réassortiment génétique entre la souche prototype et le virus A/PuertoRico/8/10/34 (H1N1) (PR8) qui possède des capacités répliquatives optimales en œuf. Un processus de sélection permet l'obtention du réassortant vaccinal qui possède les glycoprotéines HA et NA de la souche prototype sur le fond génétique du virus PR8 (composition "6+2"). Les antigènes de surface sont testés afin de confirmer qu'ils 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 de vaccins. Dans la plupart des cas, la production des vaccins grippaux s'effectue sur des œufs de poule fécondés de neuf à douze jours. Le virus vaccinal est injecté dans des milliers d'œufs, qui sont alors incubés pendant deux à trois jours permettant ainsi la réplication virale. Le liquide allantoïque récolté contient alors une concentration importante de virus vaccinaux. Ces virus sont partiellement purifiés et inactivés par traitement chimique. Les glycoprotéines de surface sont purifiées et constituent le principe actif du vaccin qui va contenir 15µg de HA de chaque virus. Une fois les antigènes dilués, les trois semences vaccinales sont assemblées pour former le vaccin final.

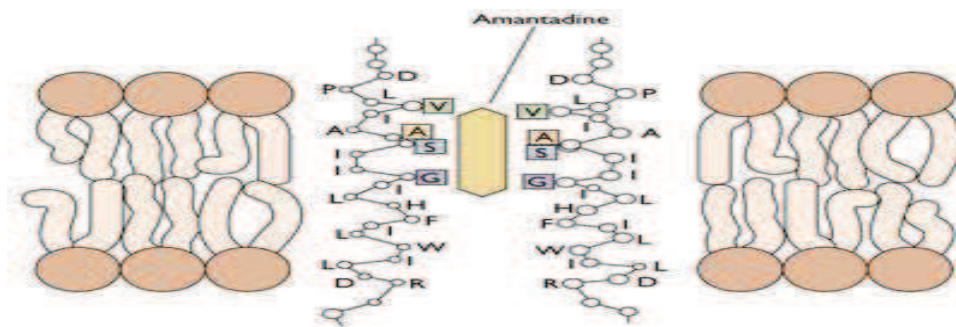
### 6.3.b. Les antiviraux

En raison de la difficulté de vacciner certaines populations à risque comme les enfants très jeunes et les personnes âgées et de faire face rapidement à une infection, une approche thérapeutique a été développée depuis plusieurs années.

#### 1. Les amantadines et rimantadines

Il s'agit de la première catégorie de molécules antivirales. Ces molécules se fixent dans la lumière du canal ionique et bloquent de façon réversible le passage des protons (figure 22). L'inhibition du canal à proton M2 va empêcher l'acidification de l'intérieur de la particule virale consécutive à l'internalisation du virus dans les endosomes. La décapsidation ne peut donc s'effectuer, bloquant ainsi la libération des RNPv qui ne pourront être transloquer dans le noyau où s'effectue la réplication virale.

Ces molécules ont été responsables de l'apparition de virus résistants, et provoquent de fréquents effets secondaires lors de leur utilisation. Ces molécules antivirales dirigées contre la protéine virale M2 ont rapidement été abandonnées au profit des molécules antivirales dirigées contre la Neuraminidase (INA).



**Figure 22: Description schématique du mode d'action des inhibiteurs du canal à proton M2**

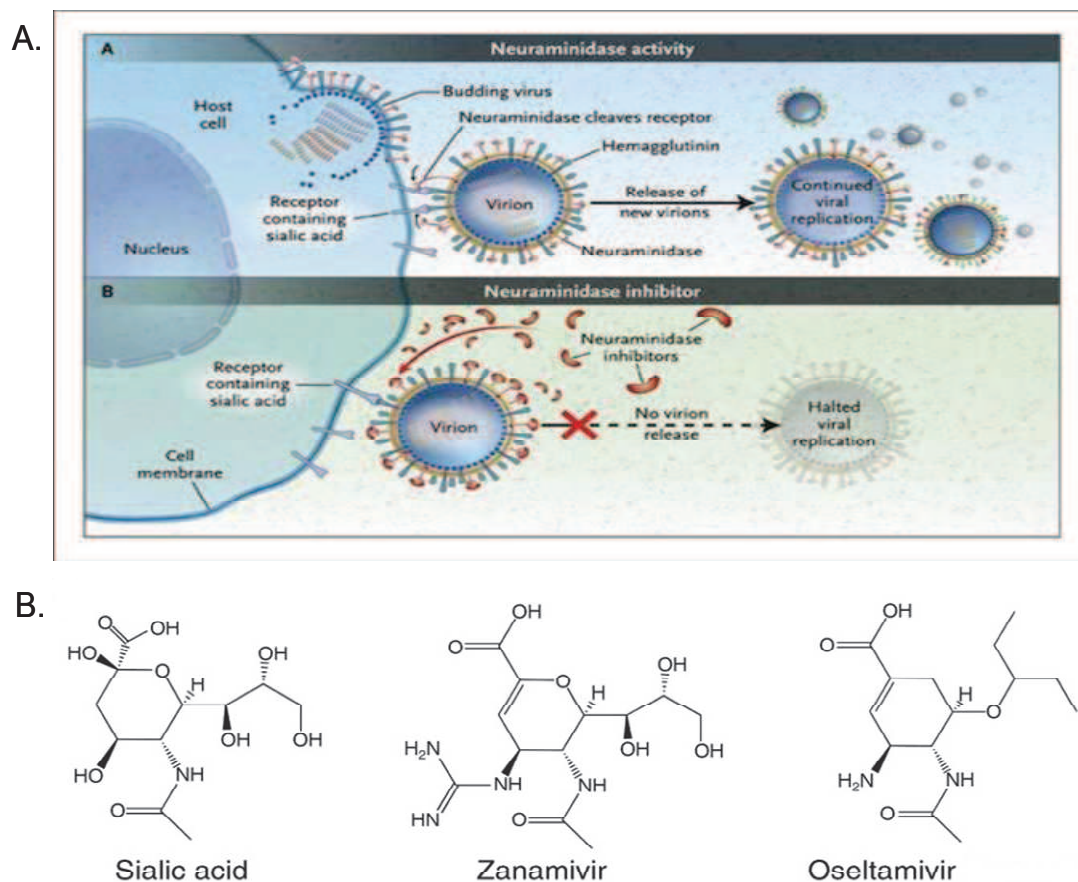
*L'amantadine est une molécule antivirale qui bloque le canal à proton M2, inhibant ainsi la réplication virale.*



## 2. Les inhibiteurs de la NA (INA)

Les INA, l'oseltamivir et le zanamivir (commercialisés respectivement sous le nom de Tamiflu® et Relenza®), sont des analogues structuraux de l'acide sialique, substrat de la Neuraminidase (figure 23).

Efficaces si le traitement est débuté dans les 48 heures post-infection, il réduit le détachement et la dissémination des virions néo-synthétisés.



**Figure 23: Description du mode d'action des INA**

*A : Mécanisme d'action des INA (Source : Moscona et al, N.Eng J.Med, 2005).*

*Les INA sont des analogues structuraux de l'acide sialique qui se fixent à sa place dans la poche catalytique de l'enzyme. Leur présence bloque l'activité sialidase de la NA empêchant la libération des particules virales ainsi que sa dissémination dans le mucus.*

*B : Structure chimique de l'acide sialique ainsi que de ces analogues structuraux.*

Le phénomène de résistance aux molécules antivirales, peut survenir par l'apparition de mutations « spontanées » par la dérive antigénique, due à la fréquence d'erreur de l'ARN polymérase (ex : mutation H275Y responsable de la résistance à l'oseltamivir des souches H1N1 circulantes). Cependant la pression de sélection due à une utilisation des molécules antivirales peut aussi permettre l'émergence de souches résistantes (ex : mutation S31N responsable de la résistance aux amantadanes).

Contrairement aux adamantanes, l'apparition de résistance aux inhibiteurs de neuraminidase était un phénomène rare jusqu'en 2007. De 1999 à 2002, moins de 1 % des souches étaient résistantes. On a pu observer au cours des dernières années une augmentation régulière du taux de résistance pour les souches A (H1N1) saisonnières. Des mutations ont été retrouvées au niveau du gène de la neuraminidase modifiant ses propriétés enzymatiques.

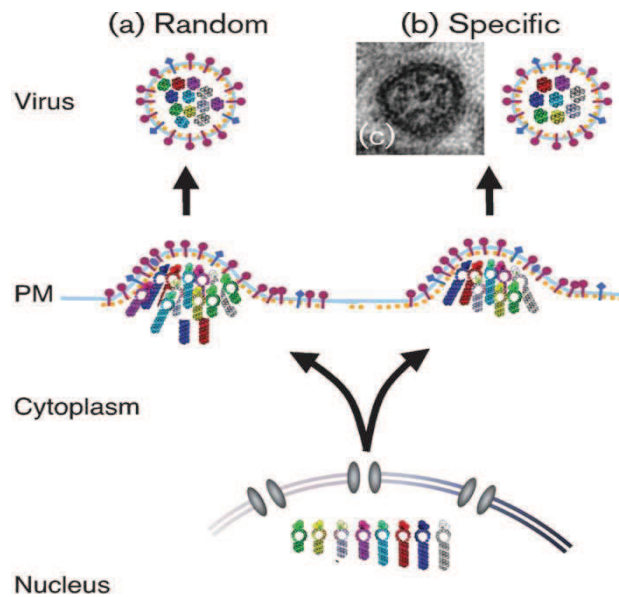
Celles-ci peuvent toucher des acides aminés du site catalytique et/ou des acides aminés structuraux, stabilisateurs de ce site. Lorsque les acides aminés catalytiques sont mutés, le site actif de la neuraminidase est modifié entraînant une diminution de l'activité enzymatique. Les mutations sur les acides aminés structuraux entraînent une diminution de l'affinité du substrat pour son site actif, conduisant à une diminution de la sensibilité aux inhibiteurs de neuraminidase [31].

La fixation de l'oseltamivir modifie la conformation du site actif, contrairement au zanamivir dont la structure est plus proche de l'acide sialique. Ceci expliquerait un taux plus important de mutation de la neuraminidase après traitement par oseltamivir [93].

## ***7. Empaquetage des RNPv dans la particule virale***

### **7.1. Hypothèses**

L'incorporation du génome viral dans les particules virales néo-synthétisées est une étape clef du cycle viral. En raison de la nature segmentée du génome, deux modèles d'encapsulation du génome peuvent être suggérés : (i) un modèle d'incorporation aléatoire ou (ii) un modèle d'incorporation sélective des segments de gène.



**Figure 24 : Représentation schématique des modèles d'incorporation des RNPv à l'intérieur de la particule virale (adapté de Hutchinson et al, 2008).**

*Les huit RNPv migrent vers la membrane plasmique apicale (PM) où ils interagissent avec d'autres protéines structurales virales et de nouvelles particules virales sont formées par bourgeonnement.*

*a) le modèle aléatoire propose plus de huit RNPv incorporés de manière non-spécifiques. Une proportion raisonnable de virions contient au moins une copie de chaque segment de gène.*

*b) le modèle sélectif propose des signaux spécifiques d'incorporation sur chaque segment de gène. Les particules virales ainsi formées contiennent une copie de chaque segment de gène.*

L'incorporation aléatoire des segments de gène a, dans premier temps, été suggérée du fait qu'il était possible de produire, par génétique inverse, des virus contenant plus de huit RNPv. Enami et ses collaborateurs ont ainsi produit et maintenu sur plusieurs passages en culture cellulaire, un virus recombiné contenant un segment 8 dupliqué (chacun codant pour une des deux protéines non structurale NS) [94]. Toutefois, en utilisant des segments de gène recombinés (contenant des gènes rapporteurs), différentes études ont rapporté que les extrémités non traduites des segments de gène HA, NA, NP et NS avaient un rôle dans l'encapsidation de ces segments de gène et leurs incorporations dans les particules virales [95]. L'incapacité de maintenir ces virus recombinés non infectieux sur plusieurs cycles n'a pas pu permettre de contrôler l'incorporation de ces segments de gènes après plusieurs cycles.



La probabilité théorique d'encapsider un représentant de chacun des huit RNPv (probabilité de 1/416) et le fait que le ratio de chaque segment de gène dans la particule virale est équimolaire, sont des arguments en faveur un mécanisme sélectif d'incorporation [96, 97]. Des données récentes ont complètement remis en cause le modèle aléatoire d'encapsidation du génome viral et confortent le modèle d'incorporation sélective.

## 7.2. Incorporation sélective des RNPv

### 7.2. a. Architecture génomique interne

L'optimisation des techniques d'observation en microscopie électronique a permis des études plus précises et poussées sur l'architecture génomique interne des virus Influenza de type A. L'observation de coupes de particules virales en microscopie électronique révèle que lors du bourgeonnement, les RNPv sont organisées selon un modèle précis (figure 25). En effet les coupes transversales de particules virales révèlent une organisation spécifiques des RNPv à l'intérieur des particules virales H1N1 avec 7 segments entourant un segment central [98, 99]. Cette observation est compatible avec la présence de signaux spécifiques à l'intérieur de chaque segment d'ARN qui permettent l'incorporation d'un jeu complet de huit RNPv.

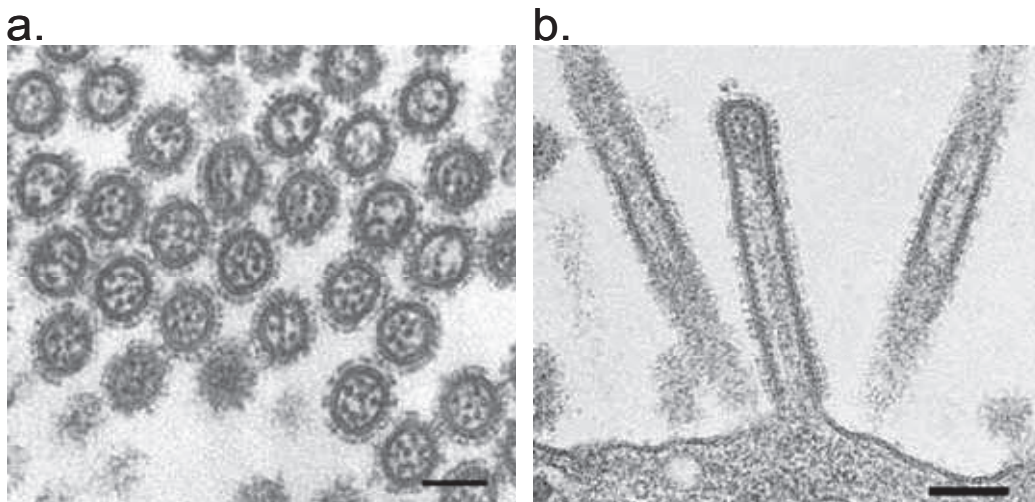


Figure 25: Observation en ME de coupe de virus Influenza de type A bourgeonnant adapté de Noda et al, 2010

*a. Les particules virales transversalement coupées montrent un arrangement bien organisé des huit RNPv dans les virions. Certains virions contiennent moins de huit RNPv parce qu'ils diffèrent en longueur. Ainsi, le nombre de RNP observés dans les virions varie en fonction de l'endroit où les virions bourgeonnants sont transversalement coupés. Bar; 100 nm*

*b. Coupe longitudinale de virions filamenteux bourgeonnant. Les RNP en forme de tige sont associés à l'enveloppe à l'extrémité distale du virion bourgeonnant. Ils sont présents uniquement à l'extrémité distale du virion. Bar; 100 nm*

Les hypothèses actuelles s'orientent aussi vers ce modèle, qui nécessite la présence de structures spécifiques au sein de chaque RNPv aboutissant à leur incorporation organisée dans la particule virale. Des études menées sur ce mécanisme, par différentes équipes, ont permis d'identifier les séquences spécifiques signaux d'encapsidation de chaque segment de gène pour leur incorporation, en utilisant des méthodes parfois assez différentes.

## **7.2. b. Identifications de régions impliquées dans l'incorporation des segments de gènes**

Les travaux menés par l'équipe de Y. Kawaoka ont permis d'identifier des régions impliquées dans l'incorporation des RNPv. Leur méthode utilisée est basée sur l'étude de virus recombinants pour lesquels un gène rapporteur codant pour la GFP est cloné en phase; l'expression de ce gène rapporteur constituant un indicateur de l'incorporation du segment de gène. En parallèle l'expression du gène est évaluée par RT PCR quantitative. Dans le plasmide recombinant, des jeux de délétions sont effectuées dans les régions codantes et non codantes afin de déterminer les régions minimales nécessaires à l'incorporation du segment de gène recombinant dans la particule virale [100-107] (figure 26).

Parallèlement à cette approche utilisée par l'équipe de Y. Kawaoka, l'équipe de P. Digard a utilisé une méthodologie basée sur l'étude de régions conservées pour déterminer la localisation des séquences impliquées dans l'empaquetage des RNPv. Leur hypothèse repose sur le fait que ces séquences putatives, agissant en cis, sont soumises à une sélection fonctionnelle et doivent donc être conservées [108-110]. Ces analyses ont identifié des codons avec de faibles niveaux de variations synonymes à des positions où la variation aurait pu être

possible. L'analyse des huit segments du génome démontre que ces codons conservés se situeraient essentiellement dans les régions terminales de chaque segment de gène des virus H1N1.

De plus amples informations ont pu être apportées sur la localisation des séquences impliquées dans l'incorporation des RNPv. Des mutations ponctuelles de nucléotides au niveau des régions précédemment définies comme importantes pour ce mécanisme leur ont permis d'identifier des nucléotides déterminants pour l'encapsidation.

Les travaux menés jusqu'à ce jour ont permis de mettre en évidence, pour tous les segments de gènes des virus H1N1 (A/PuertoRico/8/34 et A/WSN/33), des séquences impliquées dans l'incorporation des RNPv dans la particule virale (figure 26). Bien que les deux extrémités contribuent à l'incorporation des RNPv, l'extrémité 5' semble être plus importante pour les segments 1-3 [102, 104], alors que l'extrémité 3' contribue plus à ce mécanisme pour les segments 6 et 8 [103, 111]

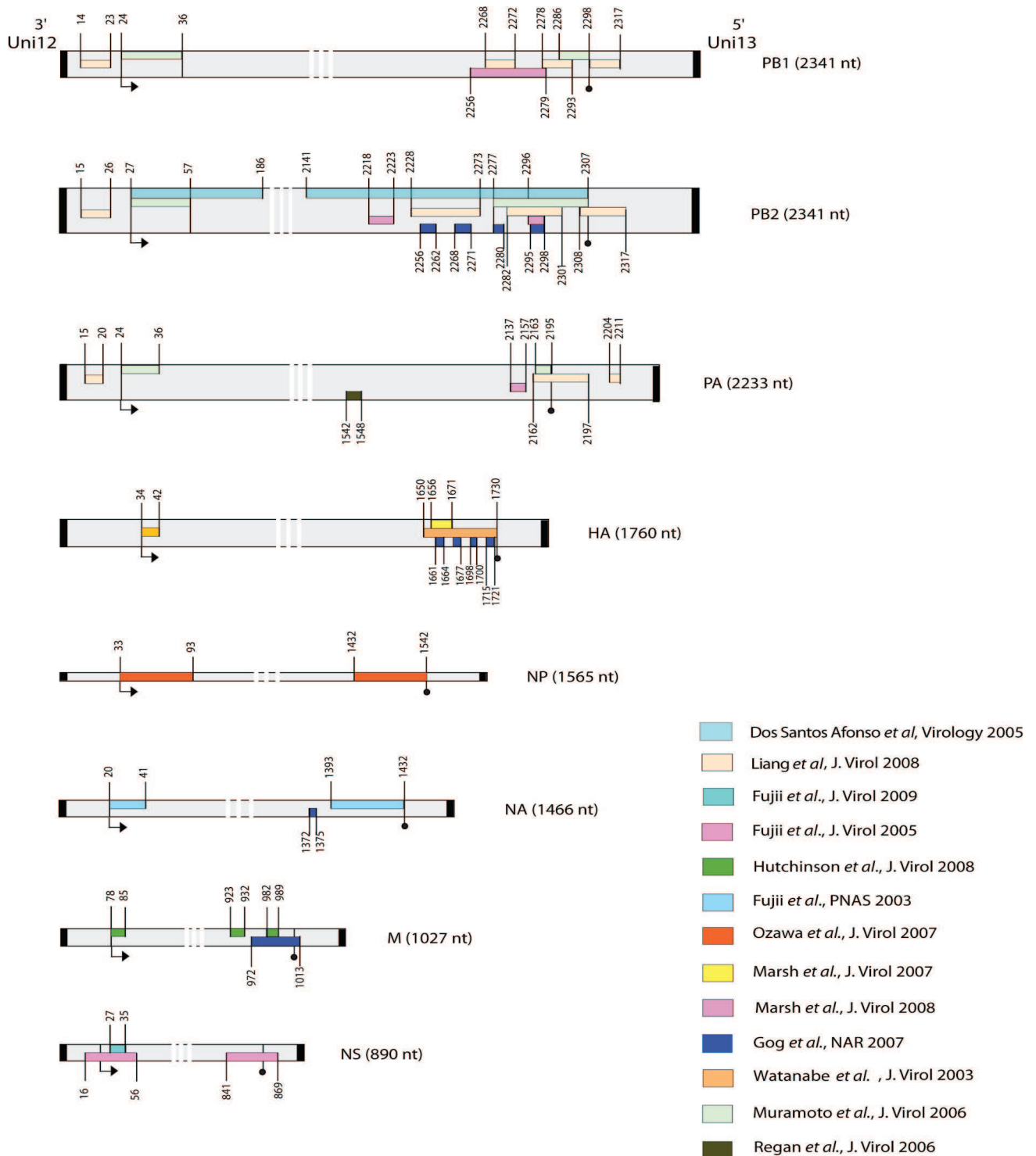
Il est important de noter certaines divergences, entre les équipes, sur la localisation des séquences qui semblent impliquées dans l'incorporation sélective des RNPv. La méthodologie utilisée par l'équipe de Y. Kawaoka intégrant le gène rapporteur GFP en phase, peut introduire un biais du fait d'un raccourcissement important de la taille du segment de gène recombiné par rapport à la taille du segment de gène initial. En effet il a été montré que la longueur des séquences impliquées dans l'empaquetage était tout aussi importante que la séquence elle-même [112].

L'essentiel des travaux menés sur ce mécanisme ont été réalisés avec des souches de sous-types H1N1. L'équipe de Y. Kawaoka travaille principalement sur la souche A/WSN/33 (WSN), qui est une souche fréquemment utilisée en laboratoire, et l'équipe de P. Digard travaille sur la souche vaccinale A/PR/8/34 (PR8).

Cependant malgré les divergences observées, ces travaux ont permis de localiser des séquences qui semblent impliquées dans l'incorporation sélective des RNPv. Les analyses bioinformatiques des séquences des virus Influenza de type A ont affiné ces résultats jusqu'à déterminer des nucléotides importants impliqués dans ce mécanisme.

L'ensemble de ces résultats suggère une organisation spécifique des RNPv dans la particule virale où les segments de gène seraient sélectionnés et empaquetés dans un complexe supramoléculaire. La formation de ce complexe pourrait être liée à la mise en place d'interaction de type ARN/ARN, protéine/ARN ou protéine/protéine, permettant

l'incorporation d'un jeu complet de huit segments de gène dans les particules virales néo-synthétisées.



**Figure 26 : Représentation schématique des séquences impliquées dans l'incorporation sélective des segments de gènes du virus Influenza de type A.**

*Les segments d'ARN sont orientés de l'extrémité 3' à l'extrémité 5'. La flèche représente le codon initiateur de traduction et le rond noir correspond au codon stop.*

## **8. Le Réassortiment génétique**

Le réassortiment génétique constitue un des supports de l'évolution des virus grippaux, au même titre que la dérive antigénique. En raison de la nature segmentée de leur génome, les virus influenza de type A peuvent échanger leur(s) segment(s) de gène lors de la co-infection d'un hôte par des virus différents. C'est un phénomène qui reste fréquemment observé entre virus d'un même sous-type et constitue un mécanisme d'évolution important [81]. Cependant le processus de réassortiment génétique est beaucoup plus rare entre deux virus de sous-type différents, et peut conduire à l'émergence de nouveaux sous-types lors de l'assemblage des virus.

### **8.1. Le Réassortiment Génétique des virus humains *in vivo***

Le réassortiment génétique est un mécanisme permettant de générer de la diversité génétique au sein des virus Influenza. L'analyse du génome de virus humains circulants montre une hétérogénéité des virus, avec parfois des changements majeurs par réassortiment génétique entre les multiples souches co-circulantes [113]. De plus, le réassortiment génétique entre deux virus appartenant au même sous-type peut engendrer des changements considérables aboutissant par exemple au transfert de la résistance aux antiviraux à des souches circulantes initialement sensibles [114], ou son inverse [115].

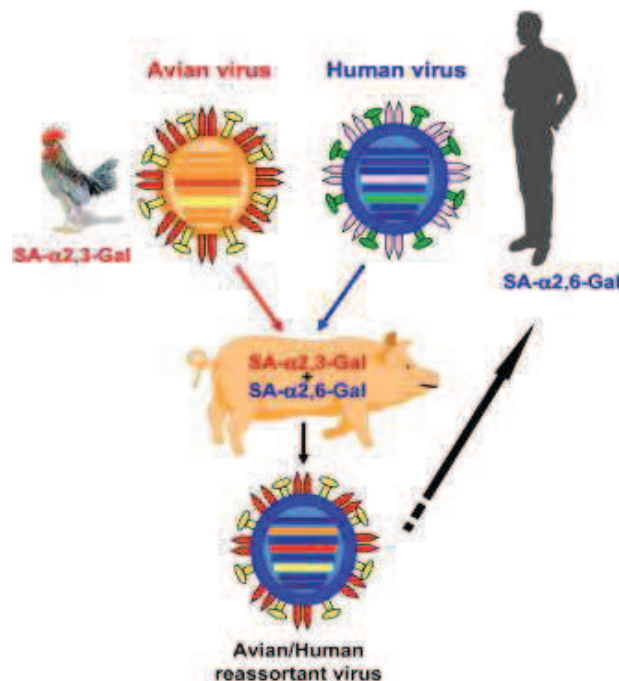
### **8.2. Le Réassortiment Génétique inter sous-type *in vivo***

#### **8.2.a. Rôle du porc dans le processus de Réassortiment Génétique**

Le porc joue un rôle important dans l'émergence de virus réassortants inter sous-type. En effet, les cellules épithéliales du tractus respiratoire du porc co-expriment les récepteurs glucidiques principaux (acides sialiques) des virus grippaux humains ( $\alpha 2,6$ ) mais aussi aviaires ( $\alpha 2,3$ ). La co-infection de cellules porcines par des particules virales d'origine différentes peut engendrer des nouveaux sous-types par réassortiment génétique (figure 27).

D'où l'hypothèse que le porc pourrait jouer un rôle d'intermédiaire pour l'émergence de virus réassortants entre des sous-types humains et aviaires, et faciliter leur transmission dans la population humaine [116].

Le suivi des virus Influenza dans les élevages porcins s'avère donc fondamental. Cette surveillance permet d'ailleurs d'observer régulièrement l'émergence de nouveaux sous-types tels que les sous-types H3N1 [117], H1N2 [118], H1N1 [119, 120]. L'analyse phylogénétique de virus porcins a aussi révélé des événements multiples de réassortiment génétique, aboutissant aux souches circulant actuellement chez le porc [121].



**Figure 27 : Représentation schématique d'un réassortiment génétique entre un virus humain et un virus aviaire chez le porc, de Naffakh et al, 2009.**

*Les virus aviaires se lient préférentiellement aux récepteurs porteurs d'acides sialiques liés au galactose par une liaison  $\alpha 2, 3$  (SA- $\alpha 2,3$ -Gal) , tandis que les virus humains se lient de préférence aux SA- $\alpha 2,6$ -Gal. La sensibilité des porcs à la fois des virus aviaires et humains, est liée à la présence à la fois des deux SA- $\alpha 2,3$ -Gal et SA- $\alpha 2,6$ -Gal sur les cellules de l'épithélium trachéal. Ainsi la co-infection avec un virus humain et un virus aviaire, facilitée par des contacts fréquents entre les porcs domestiques, avec les oiseaux, et les humains peuvent donner aboutir à l'émergence de virus présentant de nouvelles compositions génomiques.*

### **8.2.b. L'émergence de virus pandémiques**

De par l'importante hétérogénéité des sous-types des virus Influenza de type A, le phénomène de réassortiment génétique, entre sous-types différents, constitue un processus de brassage génétique important pouvant aboutir à l'émergence de nouveaux virus potentiellement pathogènes. En effet ce processus fut responsable de l'émergence des virus pandémiques de la Grippe Asiatique de 1957 et de la Grippe de Hong Kong de 1968. Dans la pandémie de 1957, le réassortiment génétique entre une souche aviaire H2N2 et la souche circulante humaine H1N1 aurait permis une incorporation des segments de gènes aviaires PB1, HA et NA sur le fond génétique du virus humain. Pour la pandémie de 1968, les segments PB1 et HA d'une souche aviaire ont été incorporés sur le fond génétique du virus humain H2N2 circulant chez l'homme [122]. L'incorporation de segments de gènes aviaires sur un fond génétique humain a donc permis à ces virus d'échapper au système immunitaire humain en présentant des glycoprotéines de surface différentes de glycoprotéines des virus circulants humains. Cette incorporation leur confère aussi une meilleure transmissibilité ainsi qu'une virulence accrue [123].

### **8.2.c. Exemple d'émergence de virus réassortants**

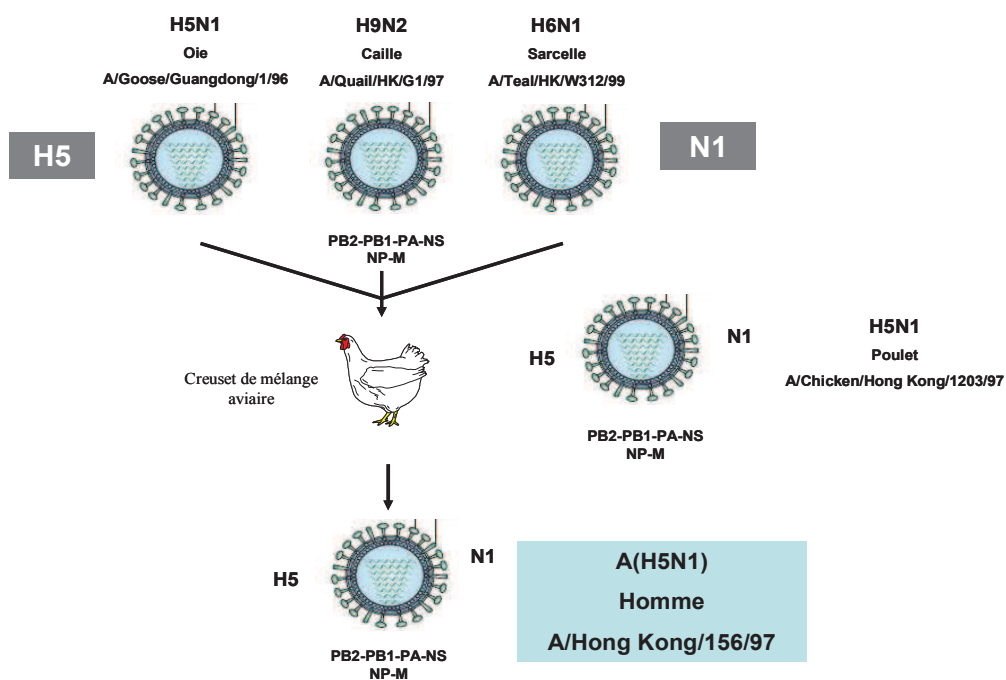
#### *1. Exemple du virus influenza aviaire (HPAI) H5N1 chez l'oiseau*

Les épidémies d'infections liées à des virus aviaires hautement pathogènes (HPAI) étaient relativement rares jusqu'en 1990. En 1997, un virus H5N1 hautement pathogène pour les espèces aviaires a été isolé chez des volailles d'élevage à Hong Kong. Ce virus est le produit de multiples événements de réassortiment génétique (figure 28).

C'est cette année que l'infection humaine par le virus H5N1 a été rapportée pour la première fois à Hong Kong (18 cas dont six décès). Cependant l'abattage systématique de la volaille sur l'île ainsi que des mesures de désinfection mirent fin à l'épizootie. Entre 1997 et 2002, ce virus a été isolé à Hong Kong, en Corée du Sud et en Chine. Le virus émergea à nouveau chez l'homme en 2003 avec deux cas dont un décès, suite à un nouvel épisode de grippe aviaire à Hong Kong. Le virus A (H5N1) a évolué et des souches antigéniquement différentes de celle identifiée à Hong Kong furent responsables en 2004 d'épizooties de grippe aviaire au Sud Viêt-Nam et en Thaïlande.



Chez l'homme, environ 493 cas d'infections par le virus A (H5N1) ont été détectés à la date du 9 avril 2010 et 292 décès ont été rapportés sur trois continents. Le tableau clinique de l'infection chez l'homme est particulièrement sévère et révélant une mortalité importante (52 %), bien qu'il ne possède pas la structure moléculaire de surface lui permettant de se lier aisément aux récepteurs des cellules épithéliales respiratoires humaines. Ce virus possède une très mauvaise capacité de dissémination chez l'homme, contrairement au virus A(H1N1)v 2009 qui semble très bien diffuser chez l'homme mais n'entraîne qu'un nombre limité d'infections fatales. La menace actuelle repose sur le risque de réassortiment génétique entre ces deux virus.



**Figure 28: exemple du réassortiment génétique du virus aviaire A (H5N1)**

*Le virus A (H5N1), hautement pathogène isolé en 1997 chez des volailles d'élevage à Hong Kong, est issu du réassortiment génétique entre le triple réassortant entre les souches A (H5N1) de l'Oie, A (H9N2) de la Caille, et A (H6N1) de la Sarcelle, avec le virus A (H5N1) du Poulet.*

Ces virus A (H5N1) présentent une très forte dérive antigénique. A partir d'un ancêtre commun isolé en 1996, A/Goose/Guangdong/1/96, en 2008, 10 clades (0-9) et 10 sous-clades au sein du clade 2 ont été définis pour représenter la diversité de ces virus (figure 29). Ces variations génétiques importantes pourraient s'expliquer par une forte circulation inter-espèce chez l'oiseau et les mammifères, à l'origine d'une forte pression de sélection.



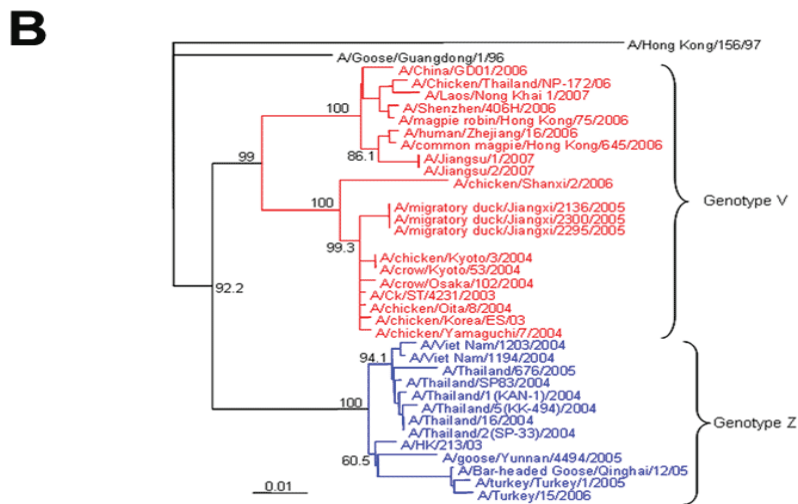
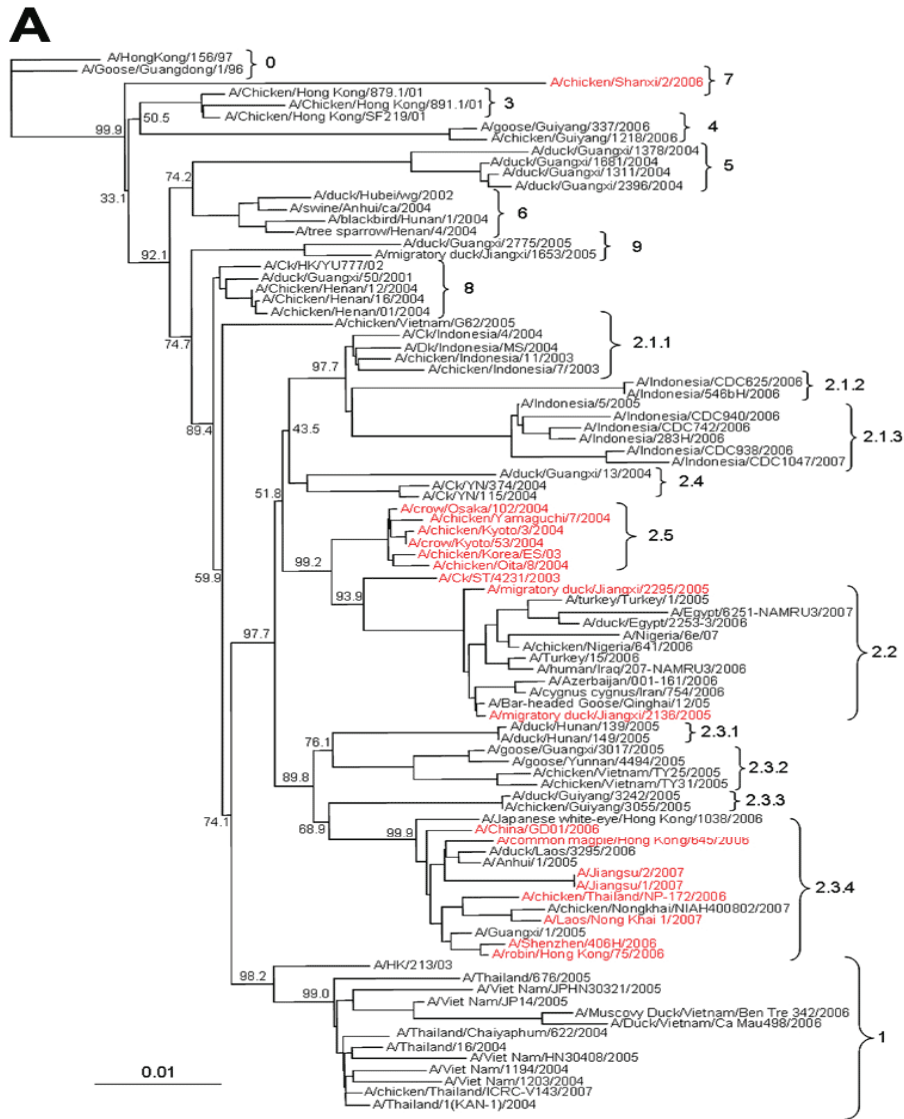


Figure 29: Diversité génétique des virus A (H5N1) : récapitulatif des différents clades et sous-clades (A) et génotypes (B) définis dans la classification des virus influenza A (H5N1).

## 2. Exemple du virus influenza A (H1N1)v pandémie 2009

Un exemple de réassortiment génétique contemporain reste celui responsable de la pandémie de 2009, aboutissant à l'émergence du virus A (H1N1)v. Ce virus est issu du réassortiment génétique entre un virus porcin appelé triple réassortant porcin de sous-type H1N1 et d'un autre virus porcin du lignage eurasiatique [124]. Le triple réassortant porcin est un virus circulant chez le porc, aux USA, depuis les années 90. Il possède une constellation de segments de gènes internes comprenant des segments internes porcins issus du lignage classique (HA, M, NP et NS), des segments de gène aviaires (PB2 et PA) et un segment de gène humain (PB1) (figure 30). Malgré une pathogénicité toute relative, ce virus a acquis, par réassortiment génétique, la capacité de se répliquer et de se transmettre efficacement dans la population humaine. La dissémination de ce virus a engendré des répercussions sanitaires et économiques considérables dans le monde entier soulignant ainsi l'incidence que peut engendrer le réassortiment génétique chez les virus Influenza de type A

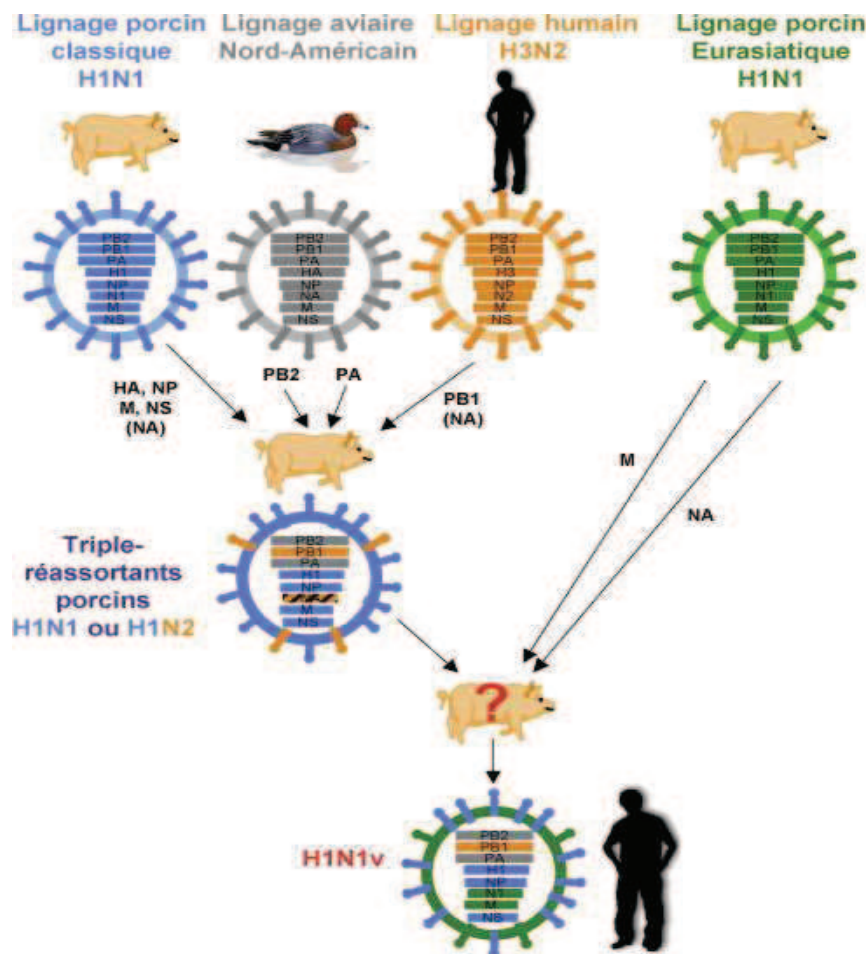


Figure 30 : Histoire évolutive du virus A (H1N1)v de [125].

Des analyses phylogénétiques ont permis d'établir l'origine de chacun des segments de gène du virus pandémique A (H1N1)v introduit dans la population humaine en 2009. Les segments de gène NA et M dérivent d'un virus porcin H1N1 du lignage eurasiatique. Les autres segments de gène dérivent d'un virus porcin H1N1 ou H1N2 triple-réassortant porcin/humain/aviaire, apparenté à ceux qui circulent dans les élevages de porcs nord-américains depuis la fin des années 1990. Chez ces virus triple-réassortants, les segments de gène PB2 et PA dérivent d'un virus aviaire, le segment PB1 dérive d'un virus H3N2 humain, les segments HA, NP, M, NS dérivant d'un virus H1N1 dit du lignage « porcin classique ». Selon que ces virus sont de sous-type H1N1 ou H1N2, le segment NA dérive d'un virus H1N1 « porcin classique » ou d'un virus H3N2 humain.

### **8.2.d. Génération de virus réassortants en laboratoire**

#### *1. La co-infection in vivo*

Afin d'étudier s'il était possible de générer des virus réassortants possédant le segment de gène HA H5 aviaire *in vivo* l'équipe de Ruben O. Donis du Centre Disease Control and Prevention (=CDC) a co-infecté des furets par les virus H3N2 humain (A/Wyoming/3/03) et H5N1 hautement pathogène aviaire (A/Thailand/16/04) [126]. L'analyse génotypique des virus issus de sécrétions nasales de ces furets a révélé que des événements de réassortiment génétique entre ces souches sont survenus *in vivo* pour 9% des virus analysés. Ils sont susceptibles d'avoir eu lieu dans les voies aériennes supérieures. Au vu de l'incidence relativement élevée des virus réassortants possédant la HA du virus aviaire (34% de virus réassortants), il est raisonnable de conclure qu'une poursuite d'exposition des hommes et animaux au virus A (H5N1) et au virus saisonnier A (H3N2) augmenterait le risque de générer des virus réassortants possédant le segment de gène HA H5 à partir des voies aériennes supérieures. Il est intéressant de noter que l'étude de la composition génomique des virus réassortants possédant le segment de gène HA H5, ne révèle que cinq compositions génomiques différentes (figure 31). La comparaison des cinétiques de croissance de ces virus réassortants montre une réduction des titres viraux dans les sécrétions nasales des furets infectés par rapport au virus parental H5N1. De façon intéressante, il n'a jamais été observé de virus possédant uniquement le segment de gène HA H5 sur un fond génétique humain.

H5 HA reassortant	Origin of the indicated influenza virus gene segment <sup>a</sup>								No. of reassortant isolates (total no. of viruses in:		
	HA	NA	PB1	PB2	PA	NP	M	NS	Ferret 1 (140)	Ferret 2 (100)	Ferret 3
Thai16:Wyom03-NA	T	W	T	T	T	T	T	T	4	0	0
Thai16:Wyom03-NA-NP-M-NS	T	W	T	T	T	W	W	W	1	0	0
Thai16:Wyom03-NA-NS	T	W	T	T	T	T	T	W	1	0	0
Thai16:Wyom03-M-NS	T	T	T	T	T	T	W	W	0	0	1
Thai16:Wyom03-PB1	T	T	W	T	T	T	T	T	2	0	2

<sup>a</sup> W, gene derived from Wyom03 parental virus; T, gene derived from Thai16 parental virus.

**Figure 31 : Caractérisation des virus réassortants possédant le segment de gène HA H5 issu de la co-infection des virus H3N2 et H5N1 d'après Jackson et al 2009.** *Les caractéristiques de croissance des virus réassortants des cinq virus réassortants possédant le segment de gène HA H5 ont été évaluées sur deux modèles cellulaires mammifères : les MDCK (cellules rénales canines) et les A549 (cellules épithéliales de poumon). La cinétique de répllication a été examinée après une infection à faible MOI ( $10^{-4}$ ). Tous les virus réassortants se répliquent avec une cinétique de croissance plus lente que celle du virus parental H5N1.*

## 2. Le Réassortiment Génétique *in vitro*

Malgré l'incidence majeure de ce processus sur la biologie du virus, peu de choses sont connues concernant la mécanistique du réassortiment génétique. Une grande majorité de ces études se sont intéressées plus particulièrement aux événements de réassortiment génétique entre une souche humaine et une souche d'un autre réservoir (aviaire, équin etc....) qui peuvent permettre, à terme, l'émergence de virus potentiellement pandémiques. Au final deux types de méthodologie permettant l'étude du mécanisme du réassortiment génétique ont été mis au point en laboratoire: (i) la co-infection *in vitro*, (ii) et la co-transfection des systèmes de génétique inverse des virus d'intérêts.

### α. La co-infection *in vitro*

Dans le but de d'étudier l'évolution probable du virus A (H1N1)v pandémique, de nombreux travaux ont été menés. Des études effectuées dans notre laboratoire sur ce mécanisme, ont montré la possibilité d'émergence de virus réassortants entre le virus pandémique A (H1N1)v 2009 et le virus A/Brisbane/59/2007 (possédant une résistance naturelle à l'oseltamivir). Certains virus réassortants ont acquis par réassortiment génétique, la NA du virus A/Brisbane présentant la mutation H275Y responsable de la résistance à

l'oseltamivir [127]. Une méthodologie identique a été réalisée par l'équipe de Y. Kawaoka sur la compatibilité génétique entre les souches A (H1N1)v pandémique de 2009 et la souche aviaire hautement pathogène H5N1 [128]. Le criblage du fond génétique des virus issus d'événements de réassortiment génétique sur MDCK entre ces deux souches, semble révéler une forte compatibilité entre ces souches (85% de virus réassortants sur les 59 clones criblés). L'étude de la composition génomique des virus réassortants révèle 33 génotypes différents. Il est intéressant de noter que parmi ces différentes compositions, aucune d'entre elles n'arborent un segment de gène HA H5 isolé sur le fond génétique du virus H1N1 (figure 32). Ces résultats suggèrent que des événements de réassortiment génétique entre ces deux souches sont susceptibles de se produire en cas de co-infection chez un hôte « intermédiaire ». Par conséquent la surveillance et des mesures appropriées de confinement sont essentielles afin de minimiser ce risque notamment chez le porc.

Afin de définir une nouvelle stratégie pour améliorer l'ingénierie des vaccins vivants atténués, l'équipe de Peter Palese a produit des virus mutants par génétique inverse. Ils ont produit des virus possédant un fond génétique PR8 et des segments de gènes chimériques (HA possédant les extrémités des segments de gènes NS ainsi que l'inverse) d'une part, ou des virus possédant ces segments de gènes chimériques ayant aussi des mutations silencieuses dans les régions identifiées comme déterminantes pour l'empaquetage des RNPv d'autre part.[129]. La co-infection de ces virus avec le virus PR8, leur a permis d'évaluer la capacité de ces segments de gènes à subir des événements de réassortiment génétique. Le criblage des segments de gènes des virus issus de la co-infection, isolés par plages de lyse, révèle une absence des segments de gènes chimériques mutés dans leur région d'encapsidation. Leurs résultats suggèrent l'existence d'un lien entre le phénomène d'incorporation des segments de gènes dans la particule virale et le mécanisme du réassortiment génétique.

Genetic composition of progeny viruses								Frequency
PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	9
<b>PB2</b>	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	1
PB2	<b>PB1</b>	PA	HA	NP	NA	M	NS	1
PB2	PB1	<b>PA</b>	HA	NP	NA	M	NS	2
PB2	PB1	PA	<b>HA</b>	NP	NA	M	NS	1
PB2	PB1	PA	HA	NP	<b>NA</b>	M	NS	3
PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	<b>M</b>	NS	4
<b>PB2</b>	PB1	PA	HA	NP	NA	<b>M</b>	NS	2
PB2	PB1	<b>PA</b>	HA	NP	<b>NA</b>	M	NS	1
PB2	PB1	PA	<b>HA</b>	NP	NA	<b>M</b>	NS	1
PB2	PB1	PA	HA	NP	<b>NA</b>	<b>M</b>	NS	4
<b>PB2</b>	<b>PB1</b>	PA	<b>HA</b>	NP	NA	M	NS	1
<b>PB2</b>	PB1	PA	<b>HA</b>	NP	NA	<b>M</b>	NS	1
<b>PB2</b>	PB1	PA	HA	NP	<b>NA</b>	<b>M</b>	NS	2
PB2	<b>PB1</b>	PA	<b>HA</b>	NP	NA	M	<b>NS</b>	1
PB2	<b>PB1</b>	PA	HA	NP	<b>NA</b>	<b>M</b>	NS	1
PB2	PB1	<b>PA</b>	HA	NP	<b>NA</b>	<b>M</b>	NS	2
PB2	PB1	PA	<b>HA</b>	NP	NA	<b>M</b>	NS	1
PB2	PB1	PA	HA	NP	<b>NA</b>	<b>M</b>	<b>NS</b>	5
<b>PB2</b>	PB1	<b>PA</b>	HA	NP	<b>NA</b>	M	<b>NS</b>	1
PB2	<b>PB1</b>	PA	HA	<b>NP</b>	NA	M	NS	1
PB2	<b>PB1</b>	<b>PA</b>	HA	NP	<b>NA</b>	<b>M</b>	NS	2
PB2	PB1	<b>PA</b>	<b>HA</b>	NP	NA	<b>M</b>	NS	1
PB2	PB1	PA	HA	NP	<b>NA</b>	<b>M</b>	<b>NS</b>	1
PB2	PB1	<b>PA</b>	HA	NP	<b>NA</b>	<b>M</b>	NS	1
PB2	PB1	PA	HA	NP	<b>NA</b>	<b>M</b>	<b>NS</b>	1
PB2	<b>PB1</b>	<b>PA</b>	HA	NP	NA	<b>M</b>	NS	2
PB2	<b>PB1</b>	PA	HA	NP	<b>NA</b>	M	<b>NS</b>	1
PB2	<b>PB1</b>	PA	HA	NP	NA	<b>M</b>	<b>NS</b>	1
<b>PB2</b>	PB1	<b>PA</b>	<b>HA</b>	NP	NA	M	<b>NS</b>	1
PB2	<b>PB1</b>	PA	HA	NP	<b>NA</b>	<b>M</b>	<b>NS</b>	1
<b>PB2</b>	<b>PB1</b>	PA	HA	NP	NA	<b>M</b>	NS	1
<b>PB2</b>	<b>PB1</b>	PA	HA	NP	NA	<b>M</b>	NS	1
<b>PB2</b>	<b>PB1</b>	PA	HA	NP	NA	<b>M</b>	NS	1
<b>PB2</b>	<b>PB1</b>	PA	HA	NP	NA	<b>M</b>	NS	1
<b>PB2</b>	<b>PB1</b>	PA	HA	NP	NA	<b>M</b>	NS	1
<b>PB2</b>	<b>PB1</b>	PA	HA	NP	NA	<b>M</b>	NS	1
<b>PB2</b>	<b>PB1</b>	PA	HA	NP	NA	<b>M</b>	NS	1

Figure 32 : Composition génomique des virus réassortants après co-infection avec les virus A H1N1 SOV 2009 et H5N1 adapté d'Octaviani et al, 2010 .

*Les cellules M2CK ont été infectées avec les virus H1N1v et H5N1 (MOI 5 et 1 respectivement). Les surnageants de culture ont été récoltés 8h post-infection et la composition génomique a été déterminée pour chaque virus réassortants. Les segments de gènes sont indiqués en gras pour les segments provenant de H1N1v et normalement pour H5N1. Fréquence désigne le nombre de virus purifiés avec les génomes ; n=59.*

### β. La co-transfection de systèmes de génétique inverse

Les mécanismes moléculaires mis en œuvre au cours d'événements de réassortiment génétique étant peu connus, les systèmes de génétique inverse ont permis de s'intéresser aux facteurs de restriction du réassortiment génétique entre le virus humain A (H3N2) (A/Yokohama/2017/03) et virus équin A (H7N7) circulant (A/equine/Prague/1/56) [130]. L'identification de 29 génotypes de réassortants différents sur les 256 combinaisons possibles (sur les 120 virus criblés) leur a laissé envisager l'existence éventuelle d'un phénomène de

restriction du réassortiment génétique (figure 33). En s'intéressant à la composition génomique des complexes polymérase des virus réassortants, ils ont détectés seulement 6 combinaisons sur les 16 possibles (sur les 120 virus criblés). Ainsi, en se focalisant sur l'étude de l'activité des différents complexes polymérase et en mettant en lumière la coopération entre les protéines PB2 et PA, leur étude a révélé une restriction protéique dans la formation des complexes polymérase pour la constitution des RNPv. Il est intéressant de relever qu'il n'est retrouvé aucun virus réassortant possédant le segment de gène HA H7 seul sur le fond génétique H3N2. De manière intéressante ce segment de gène est toujours incorporé dans le fond génétique humain avec le segment de gène M du virus équin. Leurs résultats révèlent finalement un rôle fondamental d'une compatibilité des gènes du complexe polymérase pour la constitution de virus réassortants. Il fut démontré par la suite que cette restriction, au niveau de la formation des RNPv joue un rôle capital pour le franchissement de la barrière d'espèce en relevant l'importance de l'activité du complexe polymérase en interaction avec des facteurs hôtes cellulaires [7].

TABLE 1.

Genotypes of reassortant viruses between Prague (H7N7) and Yokohama (H3N2) viruses<sup>a</sup>

Genotype	Gene origin <sup>b</sup>								Frequency (no. of viruses)
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	
A1	Y	Y	P	Y	P	Y	P	Y	6
A2	Y	Y	P	Y	P	Y	Y	Y	5
A3	Y	Y	P	Y	P	P	P	P	4
A4	Y	Y	Y	Y	P	Y	Y	Y	11
A5	Y	Y	Y	P	P	Y	P	Y	1
A6	Y	Y	Y	Y	P	Y	P	Y	23
A7	Y	Y	Y	Y	P	P	P	P	6
A8	Y	Y	Y	Y	P	P	Y	Y	2
A9	Y	Y	P	Y	P	Y	P	P	4
A10	Y	Y	Y	Y	P	Y	P	P	14
A11	Y	Y	P	Y	P	Y	Y	P	1
A12	Y	Y	Y	Y	Y	P	Y	Y	3
A13	Y	Y	Y	Y	P	P	P	Y	14
A14	Y	Y	P	Y	Y	Y	P	P	1
A15	Y	P	P	Y	P	P	Y	Y	2
A16	Y	P	P	Y	P	Y	P	Y	1
A17	Y	Y	Y	Y	Y	P	Y	P	1
A18	Y	Y	Y	P	P	P	P	Y	1
A19	Y	Y	Y	Y	Y	P	P	Y	1
A20	Y	Y	Y	Y	Y	Y	P	P	2
A21	Y	P	P	Y	P	Y	P	P	1
A22	Y	Y	Y	Y	P	Y	Y	P	1
A23	Y	Y	P	Y	P	P	P	Y	4
A24	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	4
A25	Y	Y	Y	Y	Y	P	P	P	1
A26	Y	Y	Y	Y	Y	Y	P	Y	1
A27	Y	P	P	Y	P	P	P	Y	3
A28	Y	Y	P	Y	P	P	Y	Y	1
A29	Y	P	P	Y	Y	P	P	P	1
No. of viruses possessing the respective Yokohama segment/total no. of viruses	120/120	112/120	86/120	118/120	15/120	76/120	31/120	83/120	

**Figure 33 : Génotypes des virus réassortants entre les virus Yokohama H3N2 et Prague H7N7 adapté de Li et al, 2008.**

*Les cellules 293T ont été transfectées avec les plasmides permettant à la fois la synthèse des ARNv des virus H3N2 Prague et H7N7 Yokohama, avec aussi les plasmides permettant l'expression des quatre protéines du complexe polymérase du virus WSN. Les surnageants ont été utilisés pour purifier les virus issus de cette co-transfection par plaque de lyse. Les génotypes des virus purifiés sur plaque ont été déterminés par des PCR spécifiques de la souche pour chaque segment de gène.*



### 8.3. Compatibilité et facteur de virulence des segments aviaires

L'utilisation des systèmes de génétique inverse a permis de mettre en place des études plus poussées permettant d'étudier la compatibilité des souches humaines A (H3N2) A/Wyoming/3/2003 et A (H5N1) A/Thailand/16/2004 et d'identifier d'éventuels facteurs de virulence. Ainsi une équipe du CDC a démontré au cours d'une étude *in vitro*, utilisant les systèmes de génétique inverse codant pour les virus humains A (H3N2) et aviaires A (H5N1), une bonne compatibilité entre ces deux types de virus circulants. Ils ont étudié non seulement les caractéristiques de croissance des virus obtenus mais aussi les capacités répliquatives et de virulence d'une majorité de virus potentiellement pandémiques [131]. Il s'agit de 63 combinaisons possibles ( $2^6-1$ ) car la constitution de virus pandémiques, nécessite l'incorporation de segments de gène HA et NA aviaires dans le fond génétique humain. L'approfondissement de cette étude sur l'ensemble des 254 virus réassortants possibles, a mis en évidence un rôle déterminant du segment de gène PB2 humain. Les virus réassortants possédant ce segment de gène présentent tous des activités de transcription plus fortes, de meilleures capacités répliquatives, et une plus forte virulence [89].

# Problématique de l'étude

A l'heure actuelle les hypothèses sur l'encapsidation du génome viral s'orientent vers un modèle d'incorporation sélective des RNPv. Différentes études ont caractérisé, sur chaque segment de gène, des régions impliquées dans l'incorporation d'un représentant de chacun des huit segments de gène dans la particule virale néo-synthétisée. Il a été suggéré que ces régions, dites « régions de packaging » agiraient *en trans*, et que l'incorporation d'un segment de gène influencerait sur l'incorporation d'un autre. Cette hypothèse implique l'existence d'un lien physique entre les segments par des interactions de type ARN/ARN, ARN/protéines ou protéines/protéines permettant la formation d'un macro-complexe comportant les huit RNPv.

En raison de la nature segmentée du génome viral, des événements de réassortiment génétique peuvent avoir lieu lors de la co-infection d'une cellule hôte par plusieurs virus. Ce processus génétique est responsable, entre-autre, de modification de virulence des souches saisonnières circulantes, mais surtout de l'émergence de virus potentiellement pandémiques. A l'heure actuelle, nous n'avons pas d'informations sur les mécanismes qui contrôlent et régulent ce phénomène. L'analyse des données épidémiologiques et phylogénétiques montre que ce processus génétique est régulièrement retrouvé lorsque des virus de même sous-type sont impliqués dans une co-infection, mais reste un événement rare lorsque des virus de sous-type et/ou d'origine différents sont à l'origine de la co-infection.

Notre laboratoire s'est associé en 2007 avec le laboratoire UPR9002 CNRS dirigé par le Dr R. Marquet (Strasbourg) pour mettre en place un projet de recherche visant à (i) caractériser les mécanismes responsables de l'incorporation sélective du génome viral d'un virus influenza humain contemporain H3N2 et (ii) de définir l'impact de ces mécanismes sur les événements de réassortiment génétique pouvant avoir lieu entre le virus humain H3N2 et un virus aviaire H5N2 (Figure 34).

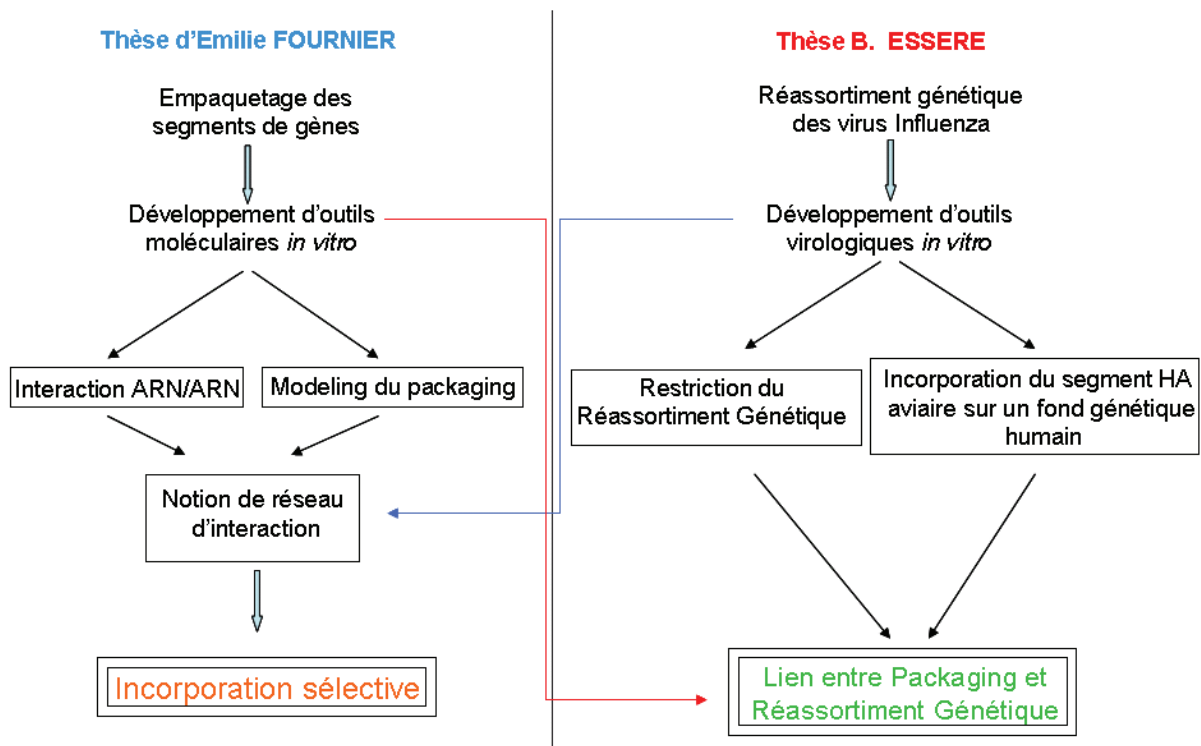


Figure 34 : Implication d'Emilie Fournier et moi-même sur les projets de recherche de la collaboration entre l'unité VirPath CNRS FRE 3011 (Lyon) et de l'unité UPR9002 CNRS (Strasbourg).

Ce projet de recherche fait appel aux expertises des deux laboratoires. L'équipe strasbourgeoise a développé des outils moléculaires pour caractériser les interactions de type ARN/ARN pouvant avoir lieu entre les segments de gènes d'un virus humain H3N2. Les régions de packaging décrites dans la littérature semblent être impliquées dans la mise en place d'un réseau d'interaction ARN/ARN permettant l'incorporation d'un jeu complet de huit segments de gènes dans les particules virales néo-synthétisées (encapsulation du génome viral, Thèse E. Fournier soutenue en novembre 2010). Notre laboratoire a développé des outils virologiques permettant de compléter les données moléculaires d'interactions mais surtout de définir un lien fonctionnel entre la mise en place d'un réseau d'interaction et la capacité de produire des virus réassortants lors de processus de réassortiment génétique entre un virus humain H3N2 et un virus aviaire H5N2.

Mon projet de thèse s'est donc organisé en deux parties : (i) le développement d'outils virologiques pour confirmer les hypothèses définies lors de la détermination du réseau d'interaction du virus humain H3N2 *in vitro* (encapsulation du génome viral) et (ii) la mise en

évidence pour la première fois d'une relation fonctionnelle entre l'incorporation sélective du génome viral et le processus de réassortiment génétique entre un virus humain et un virus aviaire *in vitro*.

## II/ Résultats : partie A

### An interaction network linking the influenza A virus genomic RNA segments

Emilie Fournier<sup>1,\*</sup>, Vincent Moules<sup>2,\*</sup>, **Boris Esserez**<sup>2</sup>, Jean-Christophe Paillart<sup>1</sup>, Annie Cavalier<sup>3</sup>, Jean-Paul Rolland<sup>3</sup>, Daniel Thomas<sup>3</sup>, Bruno Lina<sup>2</sup> & Roland Marquet<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Architecture et Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg, CNRS, IBMC, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France. <sup>2</sup>Virologie et Pathologie Humaine, Université Lyon 1, FRE 3011 CNRS, Faculté de Médecine RTH Laennec, 69008 Lyon, France. <sup>3</sup>Interactions Cellulaires et Moléculaires, Université Rennes 1, UMR 6026 CNRS, Campus de Beaulieu, bâtiment 13, 35042 Rennes, France.*

*\*These authors contributed equally to this work.*

(En soumission, le 15/02/11)

#### Problématique

Le génome des virus Influenza de type A est composé de huit segments d'ARN de polarité négative, organisés en RNPv. La constitution d'une particule virale nécessite l'incorporation d'un jeu de complet des huit RNPv pour devenir infectieuse. Des études menées sur l'encapsidation du génome viral convergent vers un modèle d'incorporation sélectif. Elles ont décrit le rôle de certaines séquences d'ARNv appelées « séquences de packaging » ou « séquences spécifiques d'encapsidation », localisées aux extrémités des segments de gènes. Ces études ont suggéré le rôle d'interactions de type ARN/ARN entre les segments de gène permettant la formation d'un complexe macro-complexe multi-segmenté et donc de l'incorporation d'un représentant de chacun des huit RNPv dans la particule virale néo-synthétisée.

C'est dans ce contexte que nous avons développé une étroite collaboration avec le laboratoire UPR9002 dirigé par le Dr Roland Marquet à Strasbourg. Le but de cette collaboration est de montrer dans un premier temps, l'existence d'interactions de type ARN/ARN pour expliquer la fonction des signaux spécifiques d'encapsidation du génome viral pour un virus humain contemporain H3N2. Cette première partie du projet a été l'objet du travail d'Emilie Fournier

(thèse soutenue à Strasbourg en Décembre 2010). Après une description des résultats obtenus par Emilie Fournier, je présenterai en détails les résultats correspondant à mon implication dans cette première partie du projet de recherche.

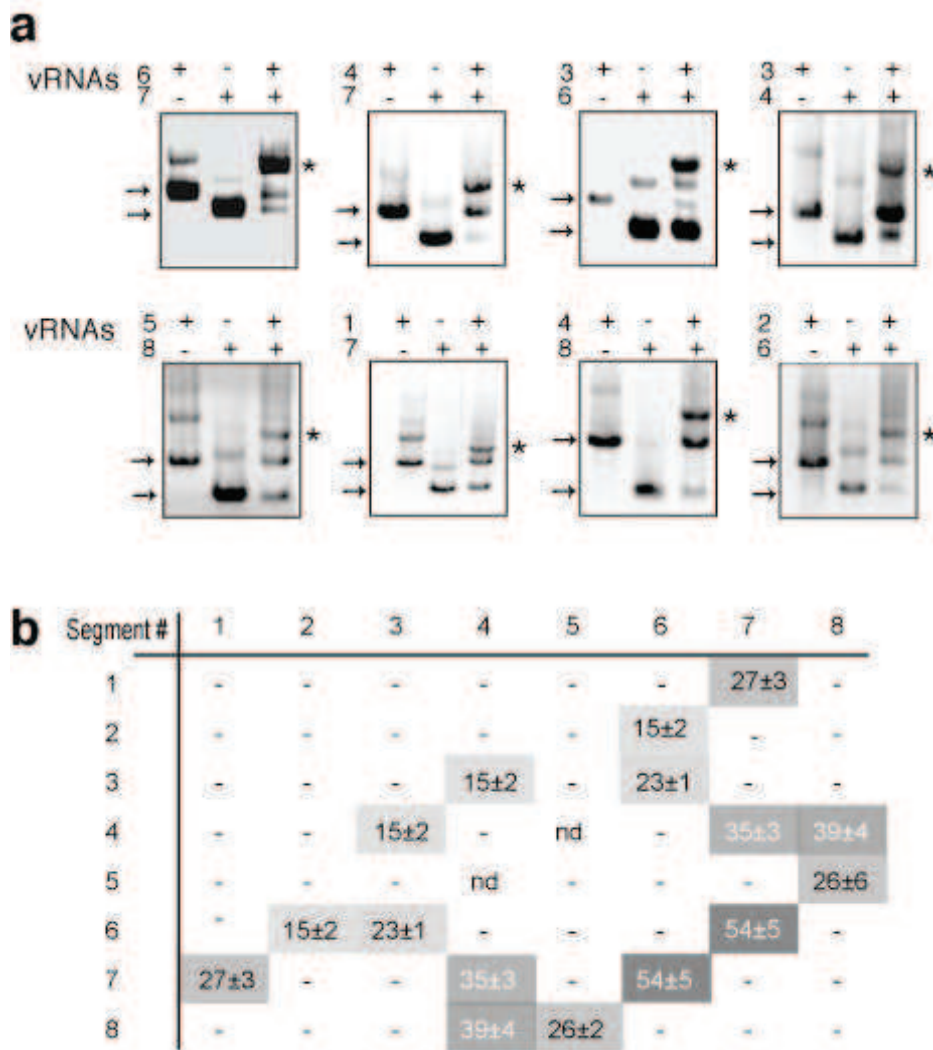
**Travaux réalisés dans le cadre de la Thèse de Doctorat d'Emilie Fournier.**

## **1. Interactions *in vitro* des segments d'ARNv**

### **A. Étude des interactions ARN/ARN *in vitro* entre segments de gènes**

L'empaquetage des segments de gènes repose sur un phénomène sélectif. Des séquences impliquées dans ce mécanisme ont été identifiées sur les souches H1N1 A/WSN/33 et A/Puerto Rico/8/34. Ces résultats suggèrent l'existence d'un lien physique entre les séquences de packaging des différents segments de gène pour l'incorporation d'un génome viral complet.

Afin de valider cette hypothèse une approche *in vitro* a été mise au point, basée sur le principe de retard sur gel en condition dénaturante ou Electrophoretic Mobility Shift Assay (=EMSA). Ainsi le clonage des segments de gènes du virus humain H3N2 A/Moscow/10/99 a été réalisé dans le plasmide pUC2000, plasmide pUC57 modifié contenant le MCS (Multiple Cloning Site) du plasmide de génétique inverse pHW2000 et d'un promoteur T7. La fabrication du plasmide pUC2000 et le clonage des segments de gènes ont été réalisés à Lyon. La transcription par ce promoteur permet l'obtention des ARNv de polarité négative. E. Fournier a testé la formation de complexe ARN/ARN des segments de gènes deux par deux en co-transcription par EMSA. Sur les 28 couples d'interactions possibles testés, seulement huit interactions ARN/ARN ont été détectées. Celles-ci ne sont pas toutes identiques en termes de quantité de dimères formés (figure 35). Ces interactions permettent de relier tous les ARN viraux en un seul réseau d'interaction.



**Figure 1**

**Figure 35: Interactions *in vitro* entre les segments d'ARNv.**

*a*, Analyse des Interactions ARN/ARN sur gel agarose. Les ARNv seuls sont indiqués par des flèches et les complexes intermoléculaires sont marqués par des astérisques.

*b*, Quantification des complexes formés. Le poids des fractions d'ARN migrant comme des complexes intermoléculaires est exprimé sous forme de moyenne  $\pm$ SEM ( $n = 3$  à 19).

*nd*: Non déterminé parce que la formation du complexe hétérodimérique ne pouvait pas être établie, en raison de l'éventuel chevauchement avec les homodimères d'ARN -:<10 % complexe.

## **B. Implication des extrémités du segment de gènes, dans les interactions ARN/ARN**

Nous sommes donc partis du postulat selon lequel les extrémités des segments de gènes des virus Influenza de type A contiennent les signaux spécifiques d'encapsidation des RNPv. Par extension des résultats obtenus par les équipes de P. Digard et Y. Kawaoka, nous avons tenté de démontrer que ces régions étaient ainsi impliquées dans le réseau d'interaction pour H3N2. Pour valider notre hypothèse nous avons effectué des délétions sur les extrémités de segments de gènes 4, 6 et 7 du virus H3N2 et E. Fournier a étudié leurs interactions *in vitro*, deux à deux, par EMSA. L'ensemble des résultats obtenus valide notre hypothèse (figure 36a). Les régions terminales des extrémités de gène précédemment identifiées comme hébergeant les signaux d'encapsidation sont impliquées dans des interactions ARN/ARN *in vitro*. Ces résultats suggèrent que le mécanisme moléculaire responsable de l'incorporation des RNPv dans la particule virale, met en jeu des interactions de type ARN/ARN entre les RNPv au niveau de régions localisées aux extrémités des segments de gène



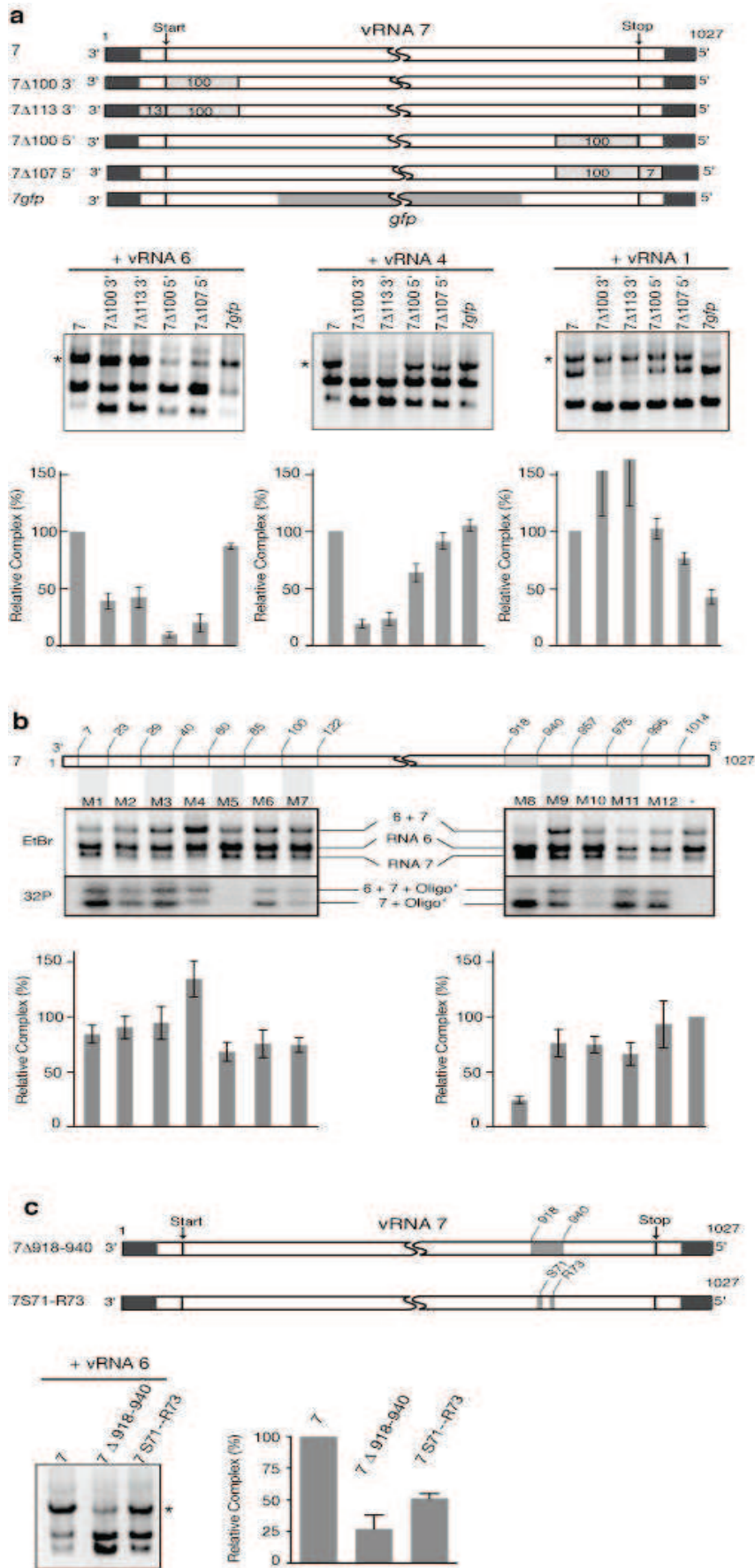


Figure 2

**Figure 36: Localisation des régions de l'ARNv 7 interagissant avec les segments 1, 4, et 6**

**a,** Délétions dans les régions terminales ou la substitution du gène GFP de la région centrale ont été utilisées pour localiser les régions de l'ARNv 7 interagissant avec les segments 1, 4, et 6.

**b,** La région interagissant avec l'ARNv 6 a été identifiée en utilisant des oligonucléotides. EtBr: coloration au bromure d'éthidium; 32P: autoradiographie des oligonucléotides radiomarqués.

**c,** La délétion ou la substitution dans la région 918-940 de l'ARNv 7 affecte l'interaction avec l'ARNv 6.

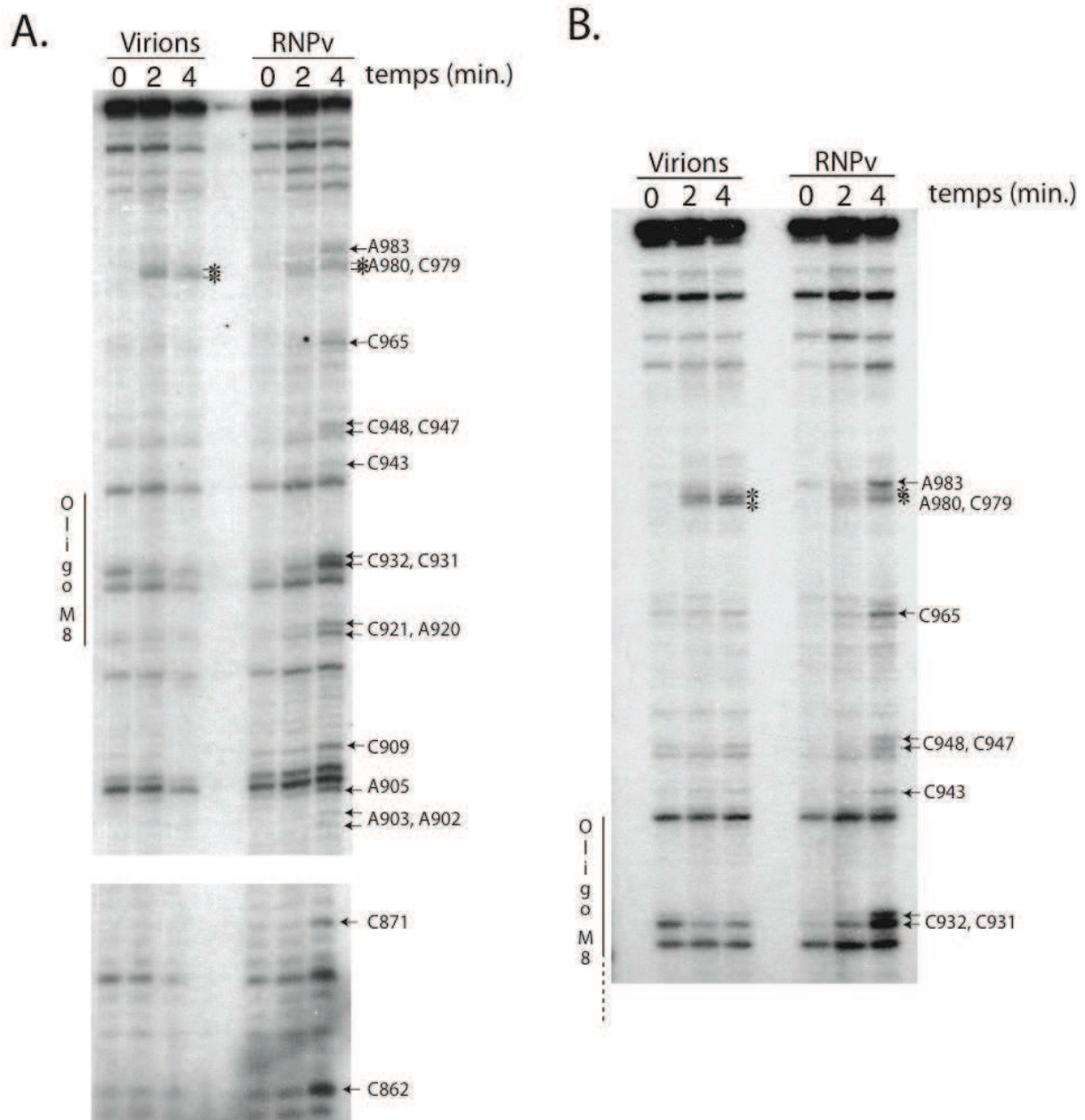
La mutation S71-R73 correspond à la substitution des nucléotides 924, 925, 926, 930 et 932. En A et C, les complexes intermoléculaires sont marqués par des astérisques. Les variations de la quantité de complexe sont données en moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 3$  à  $7$ ). Note : l'orientation de l'ARN négatif est de l'extrémité 3' à l'extrémité 5'.

### **C. Interaction ARN/ARN entre les segments de gènes NA et M**

Afin de définir plus précisément les régions impliquées dans l'interaction entre les gènes NA et M (interaction forte), E. Fournier a combiné l'approche de retard sur gel en condition dénaturante, à l'utilisation d'oligonucléotide antisens. Ces oligonucléotides antisens ajoutés lors de la transcription *in vitro* des ARN viraux sont complémentaires des régions localisées aux extrémités du segment de gène 7. Si l'oligonucléotide ajouté cible un ou plusieurs nucléotides impliqués dans l'interaction ARN/ARN, la quantité de complexe formée diminue (figure 36b). L'analyse des données montre que l'ajout de différents oligonucléotides lors de la transcription *in vitro* nous a permis d'affiner la zone d'interaction entre les segments de gènes 6 et 7. L'ajout du nucléotide M8 a un effet particulièrement marquant. En effet il réduit de moitié la quantité de complexe 6/7 sur l'interaction NA/M. Ce résultat suggère donc que la région de l'ARNv 7 complémentaire à l'oligonucléotide M8 (région 918-940) contient les nucléotides impliqués dans l'interaction avec le segment de gène 6. Cette zone comporte les codons précédemment identifiés comme jouant un rôle déterminant dans l'incorporation du segment 7 du virus H1N1 [96]. La mutation de quelques nucléotides entraîne aussi une inhibition de la production des particules virales infectieuses H1N1 par perturbation du mécanisme d'encapsidation des RNPv [96].

## **D. Identification des nucléotides impliqués dans l'interaction entre les ARNv 6 et 7**

Dans le but de déterminer de manière plus précise la région et plus particulièrement les nucléotides impliqués dans l'interaction ARNv 6-7, les virus furent soumis à un traitement par le Diméthylsulfate (=DMS). Ce traitement chimique modifie les nucléotides Adénosine et Cytosine (respectivement position Watson et Crick N1 et N3) lorsqu'ils ne sont pas appariés. Le traitement de particules virales purifiées intactes ainsi que des RNPv dissociés permet d'obtenir un profil de réactivité de l'ARNv à la sonde chimique (figure 37). Ce dernier révèle quinze positions qui deviennent réactives quand les RNPv sont dissociés dont treize localisées entre les positions 902 et 982. Parmi eux quatre nucléotides sont situés dans la région 918-940 qui est complémentaire à l'oligonucléotide M8. Il est important de noter que les nucléotides C931 et C932 ont précédemment été identifiés comme déterminants dans l'incorporation du segment de gène M pour le virus H1N1 [96]. De plus aucun nucléotide au niveau de l'extrémité 5' de l'ARNv devient réactif suite au traitement par le DMS, indiquant que la zone est protégée, probablement par le complexe polymérase.



**Figure 37 : Cartographie en solution sur une région de l'ARNv 7 au sein de particules virales entières.**

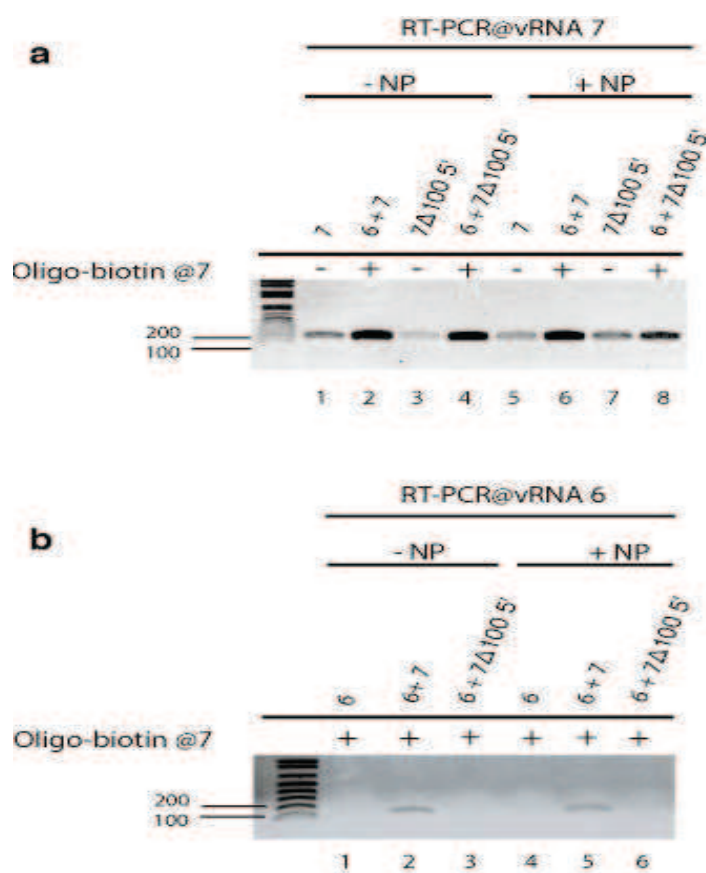
*A. Image d'un gel après un temps de migration court.*

*B. Image d'un gel contenant les mêmes échantillons que le gel présenté en A. après un temps de migration long.*

*Pour A et B : les temps d'exposition à la sonde chimique sont indiqués en haut du gel (0, 2 min, 4min). La région de l'ARNv 7 complémentaire de l'oligonucléotide M8 est indiquée à gauche du gel. Les positions nucléotidiques devenant réactives à la sonde chimique après dissociation des RNPv sont indiquées à droite.*

## E. Implication de la NP dans les interactions ARN/ARN *in vitro*.

Les segments de gène sont organisés en complexes ribonucléoprotéiques (RNPv). Chaque molécule d'ARN génomique est recouverte de nucléoprotéines (NP) et associée à un exemplaire du complexe polymérase. La méthodologie développée pour démontrer l'existence des interactions ARN/ARN entre les segments de gène est effectuée sans complexe polymérase ni nucléoprotéines. Dans le but de vérifier l'influence éventuelle de la NP dans la formation de complexe ARN/ARN, E. Fournier a mis au point une technique de rétention sur billes magnétiques recouvertes de streptavidine. La présence d'oligonucléotide biotinylé complémentaire de la région 3' de l'ARNv 7 sur les billes, va permettre la fixation de l'ARNv 7. L'analyse de la fraction retenue par RT-PCR après élution des ARNv 7 (muté et sauvage) ainsi que de l'ARNv 6 sont similaires, en présence ou absence de la NP (figure 38).



**Figure 38: Interaction de l'ARNv 7 sauvage et de l'ARNv 7  $\Delta 100$  5' avec l'ARNv6 en présence de la NP.** Un oligonucléotide biotinylé complémentaire de l'extrémité 3' de l'ARNv 7 mutant et sauvage est utilisé pour retenir les complexes sur des billes magnétiques. Des PCR spécifiques des segments de gène ont été utilisées pour détecter l'ARNv 7 (a) et ARNv 6 (b) retenus sur les billes en l'absence ou en présence de la NP.



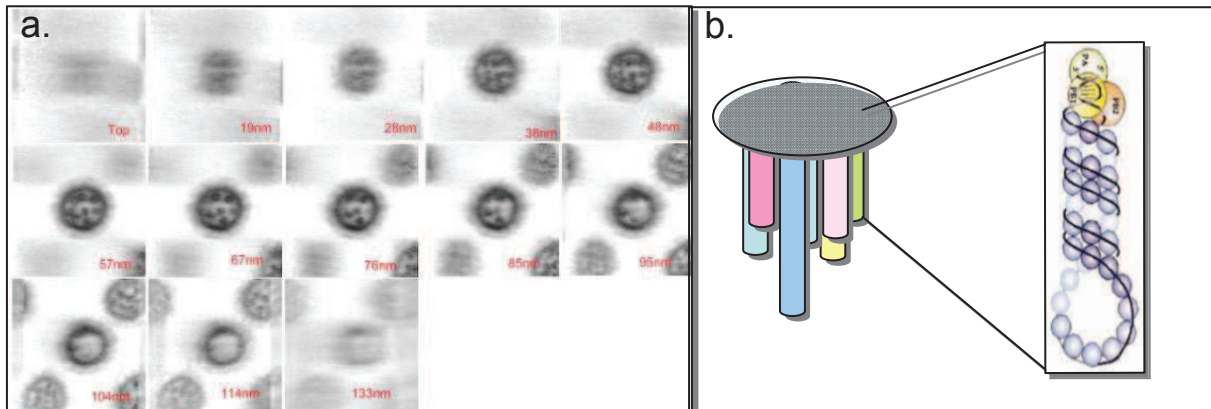
## F. Organisation interne des RNPv dans la particule virale bourgeonnante

Les études précédemment menées sur l'architecture des complexes RNPv dans la particule virale par microscopie électronique, révèlent que les RNPv sont organisés selon un modèle distinct [98]. En effet les coupes transversales de particules virales révèlent une organisation spécifique des RNPv à l'intérieur de la particule virale H1N1 avec 7 segments entourant un segment central [98, 132]. L'organisation des huit RNPv dans la particule virale conforte l'idée d'une incorporation sélective des segments de gène. Les éléments obtenus par notre approche *in vitro* indiquent qu'au sein de la particule virale les RNPv sont maintenus entre eux via des interactions ARN/ARN.

Afin de relier nos données moléculaires d'interaction avec une organisation spécifique des huit RNPv dans la particule virale, nous avons observé (i) des coupes de virus H3N2 en microscopie électronique et (ii) des particules virales en tomographie. L'observation des coupes de virus en microscopie électronique valide l'organisation particulière des RNPv dans les particules virales H3N2. Les conclusions issues des travaux de Noda et al (2006,2010) sur l'organisation des RNPv à l'intérieur de la particule, suggèrent que les RNPv seraient organisés d'une manière bien distincte (avec un RNPv central entouré par les sept autres) et que les complexes polymérase seraient assemblés au niveau d'une plateforme située au pôle distal de la particule virale en bourgeonnement. Ainsi les RNPv sont alignés à partir de cette plateforme, et suspendus tel un fagot.

Pour confirmer cette hypothèse et pour potentiellement définir les positions relatives de chaque segment de gène dans la particule virale, nous avons mis en place une nouvelle stratégie basée sur l'observation de particules virales en tomographie et la reconstruction en 3D du génome viral. En effet cette reconstruction nous a permis de retrouver la disposition précédemment observée des RNPv dans la particule virale avec un segment central entouré des 7 autres. De plus les RNPv semblent être assemblés au niveau d'une plateforme qui comprendrait au moins 75 à 310 nucléotides à l'extrémité du segment d'ARN, qui inclurait les signaux d'encapsidation précédemment décrits. Il est très intéressant de noter qu'à l'exception de cette plateforme, on ne retrouve pas d'autres contacts entre les RNPv, à l'exception d'une potentielle interaction pouvant correspondre à celle détectée *in vitro* entre les ARNv 7 et 1. L'analyse des données tomographiques nous a permis de définir la position de certains segments de gènes en fonction de leur taille (figure 39). Les trois segments de gène du complexe polymérase (les trois plus grands) sont retrouvés dans une distribution triangulaire

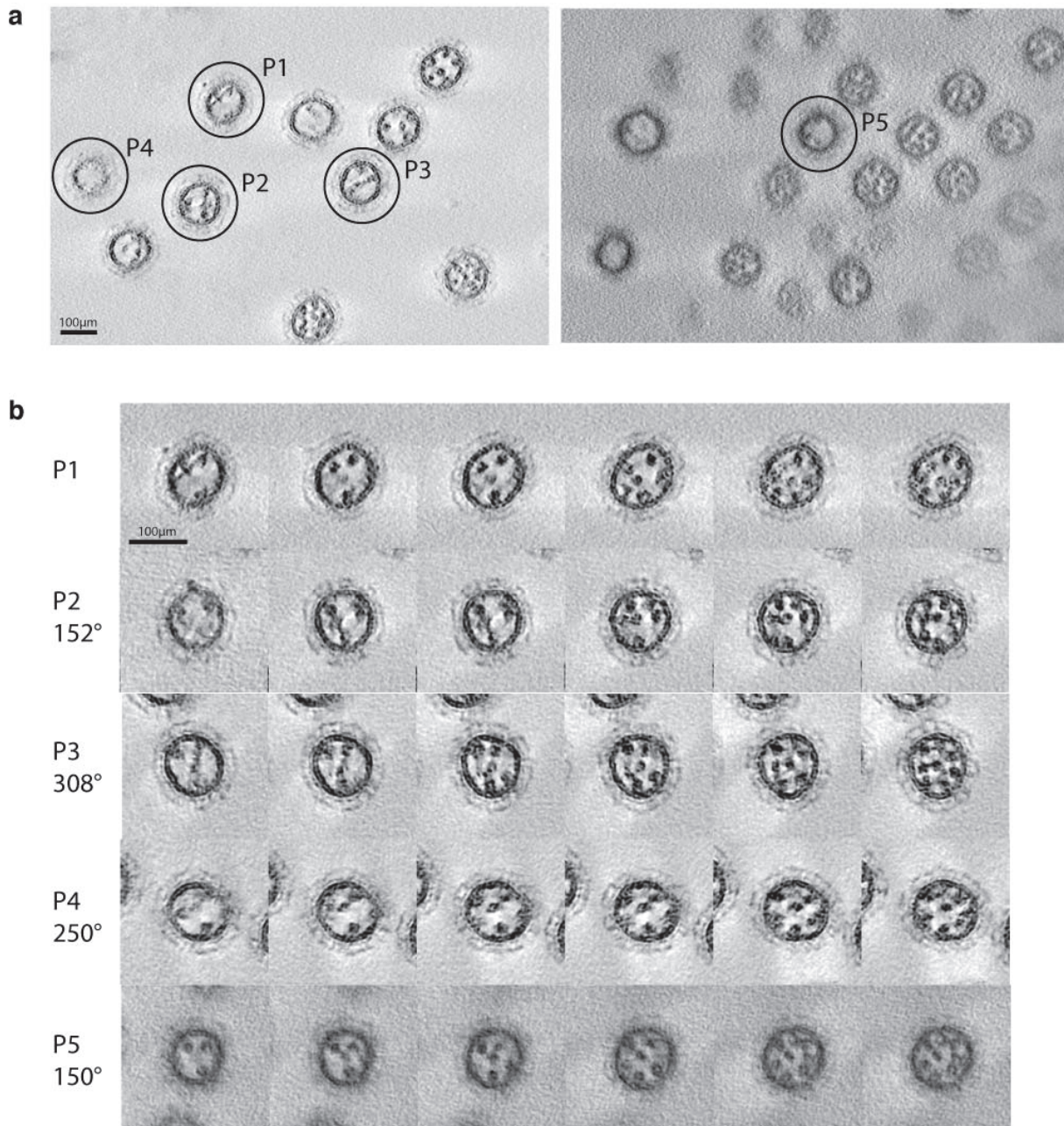
dans toutes les particules virales observées (figure 40b vignette P1, 1ère image). La position du 4ème segment le plus long, c'est-à-dire le segment de gène HA, semble être centrale pour toutes les particules observées (figure 40b vignette P1, 2ème image). Cependant, les quatre autres segments de gène sont plus difficiles à positionner en raison de leurs tailles très proches.



**Figure 39 : Observation d'un tomogramme d'une particule virale révélant l'organisation des RNPv à l'intérieur de la particule virale.**

*a. tomogramme d'une particule virale du virus A (H3N2) observée en microscopie électronique*

*b. représentation schématique de la disposition d'un RNPv à l'intérieur de la particule virale.*

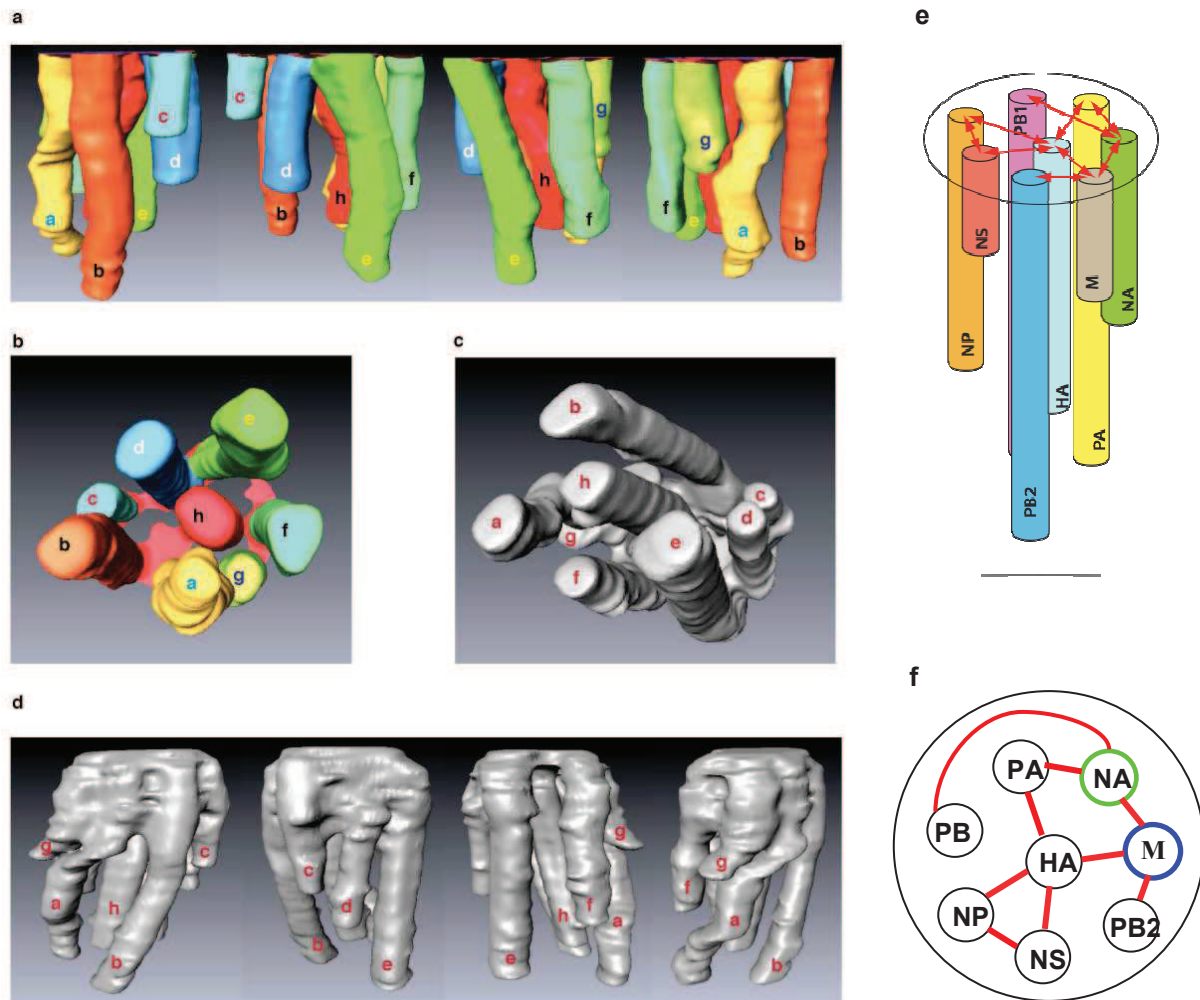


**Figure 40 : Tomogrames de 5 particules virales H3N2 obtenus par tomographie**

*a. deux champs de vue uniques indiquant cinq virions, nommé P1 à P5 ont été sélectionnés pour une analyse plus approfondie.*

*b. coupes transversales successives des particules virales P1 à P5 suivant un long axe de haut en bas*





**Figure 41 : reconstruction 3D des particules virales P1 et P4 et représentations schématiques de la disposition relative des RNPv à l'intérieur de la particule virale H3N2.**

*Vue de côté (a, d) et vue du dessous (b, c) des reconstructions 3D obtenues par le logiciel AMIRA, des RNPv à l'intérieur des particules P1 (a, b) et P4 (c, d) sur la base des expériences de tomographies.*

*Représentations schématiques de la position des RNPv à l'intérieur de la particule virale vue de côté e et de dessus f.*

Grâce à l'ensemble des tomogrammes (figure 40), une disposition relative des RNPv du virus H3N2 a ainsi pu être établie à l'intérieur de la particule virale (figure 41f). Cette disposition relative des segments de gènes est en adéquation avec les données expérimentales d'interactions collectées *in vitro*. En effet ces résultats confortent l'idée selon laquelle les RNPv interagissent entre eux, formant un réseau dans lequel chaque RNPv est engagé dans au moins une interaction avec un autre segment de gène. La distribution des RNPv à l'intérieur

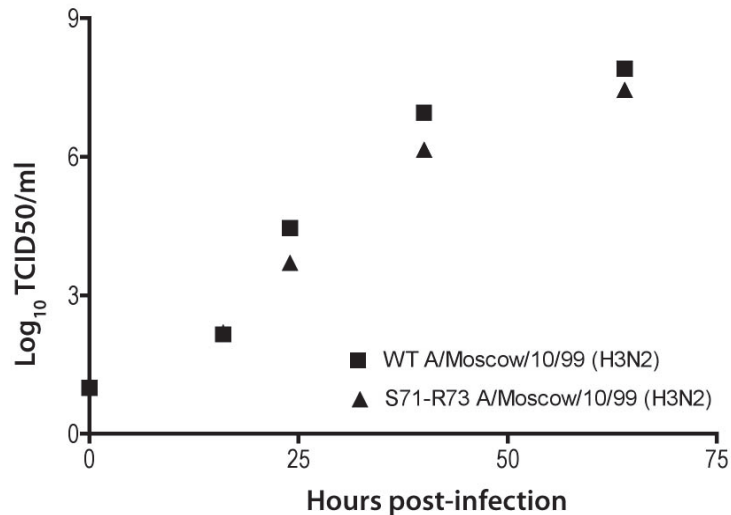
de la particule virale a été retrouvée pour des toutes les particules observées. Le segment de gène HA, effectuant quatre interactions, se retrouve en position centrale dans ce réseau.

## ***2. Travaux réalisés dans le cadre de ma Thèse de Doctorat***

### *Etude de l'effet des mutations S71 R73 sur la biologie du virus et l'incorporation du segment de gène M*

La stratégie mise en place par l'équipe de P. Digard leur a permis de déterminer des séquences signaux spécifiques localisées au niveau des extrémités terminales des segments de gènes et plus particulièrement, des codons impliqués dans l'empaquetage des RNPv. De précédentes études menées par son équipe sur le virus A (H1N1) PR8, ont montré que les mutations silencieuses des codons S71 et R73 du segment de gène M affectaient la croissance du virus, mais entraînaient aussi une perturbation importante de l'assemblage du virions et du mécanisme d'encapsidation des RNPv. Notre approche *in vitro* d'étude des interactions ARN/ARN suggérant que ces codons se situent dans la zone d'interaction de l'ARNv 7 avec l'ARNv 6.

Les techniques et outils virologiques développés au laboratoire nous ont permis d'évaluer l'impact de ces mutations sur les capacités répliquatives du virus H3N2 (figure 42). La cinétique de répliquon du virus recombiné H3N2 comportant les codons S71 et R73 comportant des mutations silencieuses (S71 : codon WT : UCU remplacé par codon AGC et R73 : codon WT : AGG remplacé par codon CGC) est légèrement différente de celle du virus recombiné WT avec une diminution du titre infectieux d'un facteur 10 à 36 heures post infection. Cette diminution est identique à celle observée pour le virus recombiné H1N1 comportant ces mutations [96].



**Figure 42 : Effet des mutations S71 et R73 sur la cinétique de réplication du virus recombiné H3N2.**

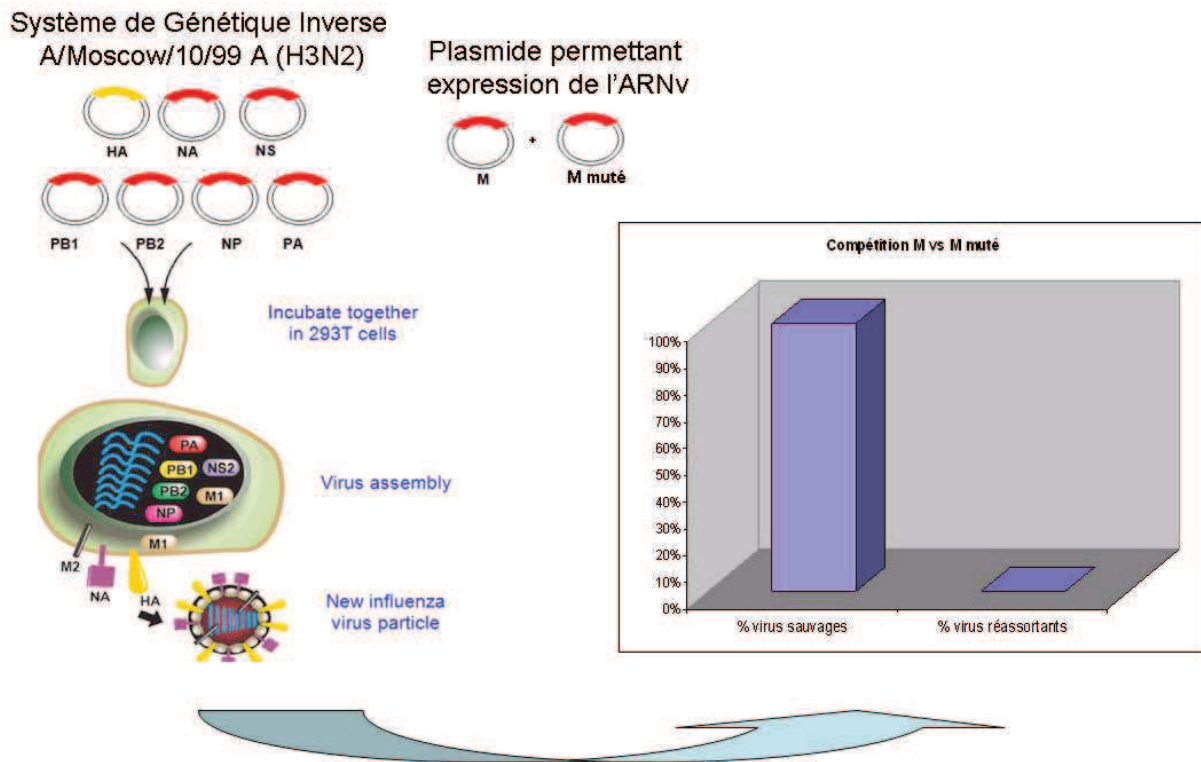
Les cellules MDCK ont été infectées à une MOI de  $10^{-4}$  par le virus H3N2 A/Moscow/10/99 produit par génétique inverse d'une part et par le virus H3N2 recombiné portant les mutations silencieuses au niveau des codons 71 et 73 de la protéine M2. La libération de la descendance virale a été suivie au cours du temps, par détermination de la dose infectant 50% des cellules en culture (DICT<sub>50</sub>). Les données obtenues correspondent à la moyenne des résultats obtenus sur deux expériences indépendantes.

Les observations et hypothèses issues de leurs travaux indiquent que cette baisse du titre serait due à un défaut dans l'emballage des RNPv. Notre approche *in vitro* d'étude des interactions ARN/ARN indique que ces positions correspondraient à la zone d'interaction du de l'ARNv 7 avec l'ARNv 6. Cependant notre méthodologie ne nous a pas permis d'observer un impact de ces mutations sur l'interaction observée entre ces deux segments de gène.

Dans le but d'identifier l'impact de ces mutations sur l'incorporation du segment de gène M, nous avons développé une stratégie *in vitro* nous permettant de déterminer le taux d'incorporation de l'ARNv du segment de gène M muté lorsque celui ci est en compétition avec le segment de gène M sauvage. Cette stratégie repose sur la production de virus recombinant par génétique inverse compétitive. La transfection de cellules 293T par les 8 plasmides du système de génétique inverse du virus H3N2 plus le plasmide codant l'ARNv du

segment de gène M muté, permet la mise en place d'une compétition entre ces deux segments de gènes M pour leur incorporation dans les particules virales néo-synthétisées.

Le surnageant de la génétique inverse est utilisé pour l'obtention de plages de lyse sur cellules MDCK. Les virus purifiés sont amplifiés sur cellules MDCK et les segments de gènes M sont amplifiés spécifiquement par PCR et séquencés (figure 43).



**Figure 43: Représentation schématique et résultat de la compétition pour l'incorporation de l'ARN du segment 7 (sauvage versus muté).**

Des plages de lyse à partir de cellules MDCK infectées par le virus H3N2 recombiné WT et par le virus H3N2 recombiné muté ont été réalisées comme contrôle. Un total de 72 sur 281 virus purifiés (25,6%) ont été analysés par séquençage (segment 7). L'analyse du segment 7 des 72 virus purifiés aléatoirement prélevés démontre que dans le contexte de la production de virus, les codons S71 et R73 ont un impact majeur sur l'incorporation sélective du segment 7 (0% d'incorporation du segment M muté). Nos données montrent que les régions de l'ARNv 7 permettant l'interaction avec le segment de gène 6, correspondent aux régions de packaging des virus humains H1N1 et H3N2.

### 3. Conclusions-Discussion : partie A

Les résultats obtenus par les différents groupes travaillant sur cette problématique (P. Digard et Y. Kawaoka entre autres) tendent à démontrer que le phénomène d’empaquetage des segments de gènes serait un phénomène sélectif. Leurs travaux ont mis en évidence l’existence de séquences spécifiques d’encapsulation présentes aux extrémités des segments de gène et ont suggéré l’existence d’interaction entre les segments de gènes.

L’utilisation d’une approche *in vitro* de retard sur gel nous a permis de tester toutes les interactions ARN/ARN possibles. Seules huit interactions ont été retrouvées sur les 28 possibles, permettant cependant de relier tous les ARN viraux dans un même réseau. Cette méthodologie nous a donc permis de démontrer que *in vitro*, les segments d’ARN génomiques seraient impliqués dans un seul réseau d’interaction où les RNPv interagiraient entre eux. Par extension des résultats des travaux effectués par les équipes de P. Digard et Y. Kawaoka, nous avons étudié l’effet de la délétion de régions, définies comme hébergeant des régions impliquées dans l’encapsulation des segments de gène, sur les interactions ARN/ARN observées. Nos résultats suggèrent que les interactions ARN/ARN entre les segments de gène s’effectueraient au niveau des séquences spécifiques d’encapsulation. En se focalisant sur le segment 7, l’utilisation de DMS, pour tester l’accessibilité de l’interaction avec la région de l’ARN, en virions natifs et après dissociation des RNPv, nous a permis d’affiner la zone d’interaction entre les segments 7 et 6. Ce résultat tend à démontrer que les interactions ARN/ARN entre les segments de gènes, par leurs régions d’encapsulation, s’effectueraient par des appariements de bases directes.

Il existe cependant une limite technique à notre méthode d’analyse des interactions ARN/ARN. En effet, dans notre système, l’étude des interactions a été effectuée en absence de NP. Cependant les résultats obtenus en utilisant cette protéine démontre que sa présence n’affecterait pas la spécificité des interactions. De plus, les travaux menés sur la structure cristalline et l’utilisation de sonde chimique d’ARNv indiquent que la NP augmenterait l’accessibilité des bases ARN [133]. Ceci pourrait faciliter les interactions intermoléculaires entre les ARNv plutôt que les empêcher.

La tomographie électronique nous a permis d’obtenir plusieurs reconstructions 3D de génomes viraux révélant une organisation particulière des RNPv au sein de la particule virale. Le segment de gène HA qui interagit avec 4 autres segments dans les expériences de retard

sur gel, semble avoir une position centrale dans le complexe macromoléculaire formé par les huit RNPv.

Nos résultats confirment le modèle dans lequel les huit segments d'ARN génomique sont sélectionnés et empaquetés sous la forme d'un complexe, où les segments de gènes sont maintenus ensemble par des appariements de base directe via les séquences signaux d'encapsidation.

Au cours de notre étude nous nous sommes intéressées à l'implication des régions définies comme hébergeant les régions d'encapsidation des gènes, dans les interactions ARN/ARN entre segments de gènes. Malgré des résultats indiquant une implication de ces régions dans les interactions entre les segments de gènes, l'existence de séquences signaux au niveau de la région centrale n'est pas à exclure [134]. De plus, bien que les séquences signaux d'encapsidation aient été définies pour les souches H1N1 WSN et PR8, il est intéressant d'observer que leurs mutations n'empêchent pas la formation de particules virales infectieuses [96]. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une flexibilité du mécanisme impliquant l'existence de plusieurs régions d'encapsidation qui pourraient être dispersés sur un même segment de gène. Il est donc possible d'envisager une localisation différente des séquences spécifiques d'encapsidation selon la souche étudiée. Il serait alors intéressant de définir les réseaux d'interactions des souches H1N1 prises comme modèles d'études pour la caractérisation des séquences de packaging. Des données préliminaires obtenues au laboratoire semble suggérer que les réseaux d'interactions pourraient être sous-type dépendent.

En conclusion, cette étude suggère que la mise en place d'un réseau d'interaction ARN/ARN permettrait la formation du complexe supra macromoléculaire multi segmenté (huit RNPv), permettant l'incorporation d'un génome viral complet au stade tardif du cycle viral. La mise en place de ce réseau serait gouvernée par les régions de packaging localisées sur chacun des huit segments de gènes.

Nous pouvons nous poser la question de savoir de quelle manière ce mécanisme d'incorporation sélective pourrait participer et contrôler l'émergence de virus réassortants, issus d'un processus de réassortiment génétique.

**La deuxième partie de mon projet de thèse a donc eu pour but de mettre en lumière l'implication du mécanisme d'empaquetage spécifique des segments de gènes dans le phénomène de Réassortiment Génétique**



## III/ Résultats: partie B

### Incorporation of avian HA gene segment in human influenza genetic background

**Boris ESSERE**<sup>1</sup>, Matthieu YVER<sup>1</sup>, Emilie FOURNIER<sup>2</sup>, Fabienne GIROUX<sup>1</sup>, Yi PU LIN<sup>3</sup>, HAY Alan<sup>3</sup>, Manuel ROSA-CALATRAVA<sup>1</sup>, Roland MARQUET<sup>2</sup>, John SKEHEL<sup>3</sup>, Bruno LINA<sup>1</sup>, and Vincent MOULES<sup>1\*</sup>

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

*2. UPR9002 du CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue René Descartes, Strasbourg 67084 cedex, France*

*3. Virology department. National Institute for Medical Research, The Ridgeway, NW1 London, United Kingdom*

*4. Laboratoire de Virologie, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, 59, Boulevard Pinel, 69677 Bron cedex, France*

*\* Corresponding author*

(En préparation)

#### **Contexte scientifique.**

La constitution d'une particule virale infectieuse nécessite l'incorporation sélective d'un représentant de chacun des huit RNPv, et celle-ci semble être gouvernée par la mise en place d'un réseau d'interaction ARN/ARN entre les segments de gène. La nature segmentée du génome viral permet des phénomènes de réassortiment génétique, c'est-à-dire des échanges de segments de gènes, lors d'une co-infection au sein d'une cellule hôte. Ce processus de brassage génétique permet l'émergence de nouveaux sous-types pouvant aboutir à l'émergence de virus potentiellement pandémiques. En effet des événements de réassortiment génétique furent responsables de l'émergence entre autre des virus pandémiques de la Grippe Asiatique de 1957, de la Grippe de Hong Kong de 1968 et du virus H1N1v de 2009. La dissémination de ces virus a engendré des répercussions sanitaires et économiques considérables dans le monde entier soulignant ainsi l'incidence que peut engendrer ce processus de brassage génétique.



De façon intéressante, on remarque que quelque soit la méthodologie utilisée *in vitro* (co-infection de cellules MDCK ou co-transfection) [89, 127, 128] ou *in vivo* (co-infection chez le furet) [126]), les études menées sur le réassortiment génétique n'ont jamais permis d'observer l'émergence de virus réassortant possédant une HA « étrangère » seule, sur un fond génétique humain, l'incorporation d'une HA « étrangère » s'effectuant toujours en association avec d'autres segments de gènes. De plus, le nombre de génotypes différents des virus réassortants issus d'un processus de réassortiment génétique entre deux virus génétiquement distincts, reste faible par rapport à une quantité théorique de 256 compositions génomiques possible. Ces observations suggèrent un phénomène de restriction lors du processus de réassortiment génétique lorsque des virus de sous-type différents sont impliqués.

Cette restriction a, entre-autre, été observée lorsque les 256 compositions génomiques possibles entre les virus H5N1 et H3N2 ont été produites par génétique inverse. En effet 27,3% de ces compositions génomiques n'ont pas permis de produire des particules virales infectieuses [89]. Il a été suggéré que cette restriction pourrait être due à une incompatibilité protéique et/ou à une incompatibilité génomique entre les segments de gène des virus parentaux.

Nous nous sommes intéressés dans ce projet à savoir si l'incorporation sélective du génome, c'est-à-dire la mise en place d'un réseau d'interaction ARN/ARN entre les segments de gènes pouvait jouer un rôle dans le phénomène de restriction génomique observé lors d'un processus de réassortiment génétique entre deux virus génétiquement distincts. Nous sommes plus particulièrement intéressés à la capacité d'incorporer un segment de gène codant pour une HA aviaire sur un fond génétique d'un virus humain circulant, pré requis pour l'obtention d'un virus potentiellement pandémique.

La collaboration avec l'unité UPR9002 CNRS (Strasbourg) nous a permis d'effectuer une étude utilisant l'expertise des deux laboratoires. On a pu ainsi utiliser les outils développés lors de la première partie de ma thèse (EMSA) et mettre en place de nouvelle stratégie *in vitro* (génétique inverse compétitive) ce qui nous a permis d'évaluer l'implication de la mise en place du réseau d'interaction ARN/ARN dans le phénomène de restriction observé lors du réassortiment génétique.

## **1<sup>o</sup> Etude du Réassortiment génétique *in vitro* entre les virus H3N2 et H5N2**

Nous avons dans un premier temps évalué la capacité de produire des virus réassortants comportant une HA aviaire, par réassortiment génétique *in vitro* entre le virus aviaire H5N2 A/Finch/England/2051/94 (FI) et le virus humain H3N2 A/Moscow/10/99 (MO), en utilisant les deux approches expérimentales utilisées par les équipes ayant travaillé sur ce phénomène [128, 130] (BSL2).

Dans un premier temps, des cellules 293T ont été co-transfectées par les deux jeux de plasmides de génétique inverse (permettant la production de particules virales infectieuses) des virus MO et FI. Cette méthodologie permet une équimolarité des segments de gènes lors du processus de réassortiment génétique sans tenir compte des paramètres virologiques des deux virus parentaux. Les virus issus de cette co-transfection ont été isolés et purifiés par plage de lyse, et l'origine de chaque segment de gène a été déterminée soit par la réalisation de RT-PCR spécifiques, soit par l'analyse du profil de digestion enzymatique de produit PCR. Afin de réduire le criblage nous ne nous sommes intéressés qu'aux virus réassortants possédant le segment de gène HA H5 sur un fond génétique du virus humain; ces virus représentant les virus potentiellement pandémiques. L'analyse de 100 clones issus de cette co-transfection confirme le fait que le segment de gène HA H5 n'a jamais été incorporé seul sur le fond génétique du virus humain (Tableau 2). En effet les 21 virus HA H5 purifiés ont incorporé au moins les segments de gène M et PA du virus FI. Il est aussi très intéressant de noter que le criblage du fond génétique de ces virus ne révèle que 6 compositions génomiques différentes sur les 128 compositions génomiques possibles ( $2^7$ ), révélant des titres infectieux à 48h sur cellules MDCK très différents (tableau 2).

Ce résultat confirme l'existence d'un phénomène de restriction dans le processus de réassortiment génétique entre les deux virus parentaux testés.

Genotype	Origine des segments								Fréquence des virus	T.I. à 48h (log DICT50/50µL)
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS		
B1	FI	MO	FI	FI	FI	MO	FI	MO	8	8.3
B2	MO	MO	FI	FI	MO	MO	FI	MO	5	8.3
B3	FI	FI	FI	FI	FI	MO	FI	MO	3	8
B4	FI	FI	FI	FI	FI	MO	FI	FI	3	7.6
B5	MO	FI	FI	FI	FI	FI	FI	MO	1	6.6
B6	MO	MO	FI	FI	MO	FI	FI	FI	1	6.8
Nbre de H5 possédant segment										
FI/Nbre total de virus H5	14/21 (71%)	7/21(38)	21/21(100%)	21/21(100%)	15/21(71%)	2/21(14%)	21/21(100%)	4/21(19%)	21	

**Tableau 2: Compositions génomiques des virus réassortants possédant le segment de gène HA H5 issus de la co-transfection des systèmes de Génétique Inverse H3N2 et H5N2**

Dans l'éventualité où certains paramètres virologiques pourraient favoriser le réassortiment génétique et plus particulièrement l'incorporation du segment de gène HA H5 sur le fond génétique du virus humain, nous avons réalisé la co-infection de cellules MDCK par les virus MO et FI à moi 5 ; les deux virus présentant des profils de réplikatifs proches (tableau 4). Le surnageant de la co-infection a été récolté 10h après l'infection et utilisé pour réaliser des plages de lyse. L'analyse des 100 virus purifiés, a révélé des similitudes par rapport aux résultats précédemment obtenus en co-transfection (Tableau 3). En effet, le segment de gène HA H5 a pratiquement toujours été incorporé dans les virus réassortants, en association avec au moins les segments de gène PA et M du virus FI (à l'exception de A3). De plus, bien que les compositions génomiques des virus réassortants possédant le segment de gène HA H5 soient différentes entre les deux approches expérimentales, il n'a été retrouvé que 7 génotypes différents sur les 128 génotypes possibles.

Genotype	Origine des segments								Fréquence des virus	T.I. à 48h (log DICT50/50µL)
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS		
A1	MO	MO	FI	FI	MO	MO	FI	MO	5	8.3
A2	FI	FI	FI	FI	MO	MO	FI	MO	4	7.3
A3	MO	MO	FI	FI	MO	MO	MO	MO	3	8.3
A4	MO	MO	FI	FI	FI	MO	FI	MO	3	7.5
A5	MO	FI	FI	FI	MO	MO	FI	MO	2	7.5
A6	MO	FI	FI	FI	MO	MO	FI	MO	2	7.5
A7	MO	FI	FI	FI	FI	MO	FI	MO	1	7.3
Nbre de H5 possédant segment										
FI/Nbre total de virus H5	4/20 (20%)	9/20 (45%)	20/20(100%)	20/20(100%)	4/20(20%)	0/20(10%)	17/20(85%)	0/20(0%)	20	

**Tableau 3: Compositions génomiques des virus réassortants possédant le segment de gène HA H5 issus de la co-infection entre les virus H3N2 et H5N2**

L'ensemble de ces données confirme celles obtenues dans la littérature ainsi que l'observation des compositions génomiques des virus pandémiques de 1957 et 1968, à savoir que l'incorporation d'un segment de gène HA non humain (aviaire, porcine ou équine) dans le fond génétique d'un virus humain circulant est toujours associée à l'incorporation d'autres segments de gène. De façon, surprenante, les segments de gènes M et/ou PA sont systématiquement associés au segment de gène HA H5. Nos données confirment l'existence d'un phénomène de restriction au sein du processus de réassortiment génétique conduisant à la production d'un faible nombre de virus réassortants présentant des compositions génomiques différentes.

## ***2° Incorporation du segment de gène H5 sur un fond génétique du virus humain MO***

Lors de nos précédents travaux, quelque soit l'approche expérimentale utilisée, nous n'avons jamais observé de virus réassortants possédant uniquement le segment de gène HA H5 du virus FI sur le fond génétique du virus humain MO. Nous avons cependant montré qu'il était possible de produire ce virus réassortant (virus MOH5) par génétique inverse et que ce virus présente une cinétique de répllication et un titre infectieux similaires à ceux observés pour le virus MO (Figure 44a.), ( $10^{6,6}$  TCID<sub>50</sub>/50µL et  $10^{6,33}$  TCID<sub>50</sub>/50µL respectivement pour MO et MOH5) (tableau 4).

Génotypes	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS	T.I.à 48h(log DICT50/50µL)
MO	MO	MO	MO	MO	MO	MO	MO	MO	6.6
FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	7.5
MOH5	MO	MO	MO	FI	MO	MO	MO	MO	6.33
MOH5M	MO	MO	MO	FI*	MO	MO	MO	MO	7
MON2	MO	MO	MO	MO	MO	FI	MO	MO	6.33
MOM	MO	MO	MO	MO	MO	MO	FI	MO	7
MOMH5	MO	MO	MO	FI	MO	MO	FI	MO	6.33
MOM3'	MO	MO	MO	MO	MO	MO	MO*	MO	6.33
MOM3'H5	MO	MO	MO	FI	MO	MO	MO*	MO	6.33
MOPAH5	MO	MO	FI	FI	MO	MO	MO	MO	6.5
MONPH5	MO	MO	MO	FI	FI	MO	MO	MO	6.33

**Tableau 4: Composition génomique des virus réassortant de l'étude produit par génétique inverse**

*MO\**: segment de gène M du virus MO possédant l'extrémité 3' du segment M du virus FI

Dans le but d'évaluer la capacité d'incorporer le segment de gène HA H5 du virus FI sur le fond génétique du virus humain MO, nous avons mis au point une nouvelle stratégie de génétique inverse compétitive, basée sur la transfection de cellules 293T avec 9 plasmides : 8 plasmides du système de génétique inverse du virus MO auxquels sont ajoutés le plasmide comportant l'ADN du segment de gène HA aviaire. Lors de l'assemblage des virus recombinés dans les cellules 293T, une compétition s'effectue entre les segments de gènes HA humain et aviaire pour leur incorporation dans les particules virales néo-synthétisées.

Nous avons dans un premier temps transfecté les cellules 293T par des quantités équimolaires des 9 plasmides et le taux d'incorporation du segment de gène HA H5 sur le fond génétique MO a été déterminé par RT-PCR spécifique H3/H5 à partir de virus purifiés par plage de lyse (Figure 45). Le criblage de l'origine de la HA de 96 clones (25,3% des 379 clones obtenus), ne révèle aucune incorporation du segment de gène HA H5 sur le fond génétique MO (tableau 5).

Nous avons reproduit cette méthodologie en transfectant cette fois-ci deux fois moins de plasmides codant l'ARNv du segment de gène HA H3 (500ng) et l'analyse de 48 virus purifiés, par RT-PCR spécifique H3/H5, ne montre, de nouveau, aucune incorporation du segment de gène HA H5 dans le fond génétique du virus humain (tableau 5).

Nos données expérimentales confortent l'incorporation préférentielle du segment de gène HA H3 dans le fond génétique du virus H3N2 lorsque celui-ci est en compétition avec le segment de gène HA H5. La capacité de produire *in vitro* le virus recombinant MOH5 qui présente des capacités répliquatives importantes, suggère une incompatibilité génomique entre le segment de gène HA H5 et les segments de gènes du virus MO.

Compétition	Origine des segments								segment en compétition	Pourcentage d'incorporation de H5
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS		
H3/H5	MO	MO	MO	/	MO	MO	MO	MO	H3/H5	0%
H3(500ng)/H5	MO	MO	MO	/	MO	MO	MO	MO	H3/H5	0%
N2 hum/N2av	MO	MO	MO	MO	MO	/	MO	MO	N2hum/N2av	20,80%
H3/H5M	MO	MO	MO	/	MO	MO	MO	MO	H3/H5M	43,60%
M FI H3/H5	MO	MO	MO	/	MO	MO	FI	MO	H3/H5	70%
M* H3/H5	MO	MO	MO	/	MO	MO	MO*	MO	H3/H5	60%
M**H3/H5	MO	MO	MO	/	MO	MO	MO**	MO	H3/H5	0%

**Tableau 5: Taux d'incorporation des segments mis en compétition dans notre stratégie de G.I. compétitive**

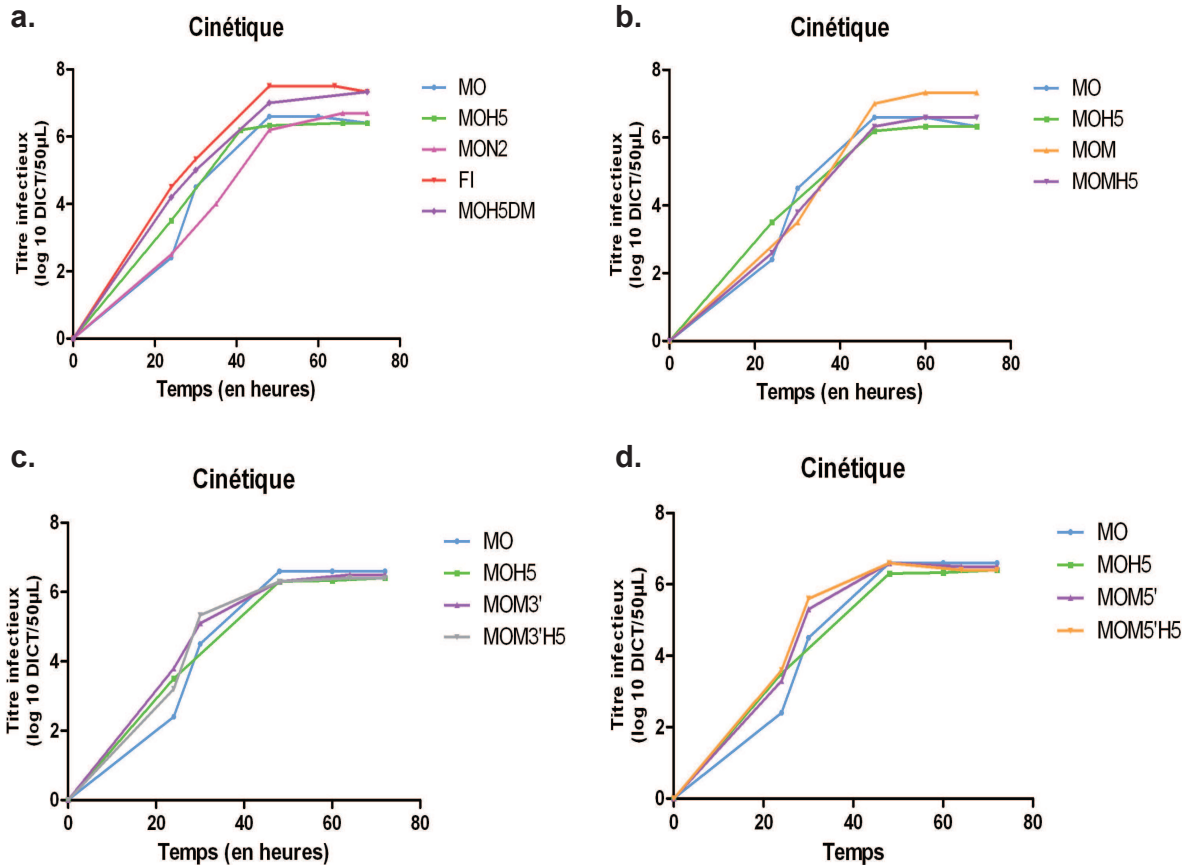
*M\**: segment de gène M du virus MO possédant l'extrémité 3' du segment M du virus FI

*M\*\**: segment de gène M du virus MO possédant l'extrémité 5' du segment M du virus FI

Les séquences nucléotidiques des segments de gènes HA H3 et HA H5 présentent 49,18% d'homologie. Afin de définir un lien possible entre le pourcentage d'homologie nucléotidique entre deux segments de gènes et leur capacité à s'intégrer dans un fond génétique donné, nous avons utilisé notre approche de génétique inverse compétitive pour mettre en compétition les segments de gènes NA des virus MO et FI présentant un pourcentage d'homologie nucléotidique de 82,61%. Malgré une activité neuraminidase légèrement plus faible de la NA N2 du virus FI par rapport à celle du virus MO, la modification éventuelle de la balance fonctionnelle HA/NA du virus réassortant MON2 a peu de répercussion sur les caractéristiques répliquatives sur cellules MDCK. De plus, le choix de ce segment de gène nous affranchit d'éventuel(s) problème(s) d'incompatibilité protéique.

Les virus MO et MON2 ont été produits par génétique inverse et présentent un titre infectieux et une cinétique de répliquaison très proche ( $10^{6,6}$  TCID<sub>50</sub>/50μL et  $10^{6,33}$  TCID<sub>50</sub>/50μL respectivement pour les virus MO et MON2) (tableau 4 et figure 44a). L'analyse de 96 sur 250 virus purifiés issus de la génétique inverse compétitive montre que 20,8 % des virus purifiés ont incorporé le segment de gène NA N2 du virus FI (tableau 5).

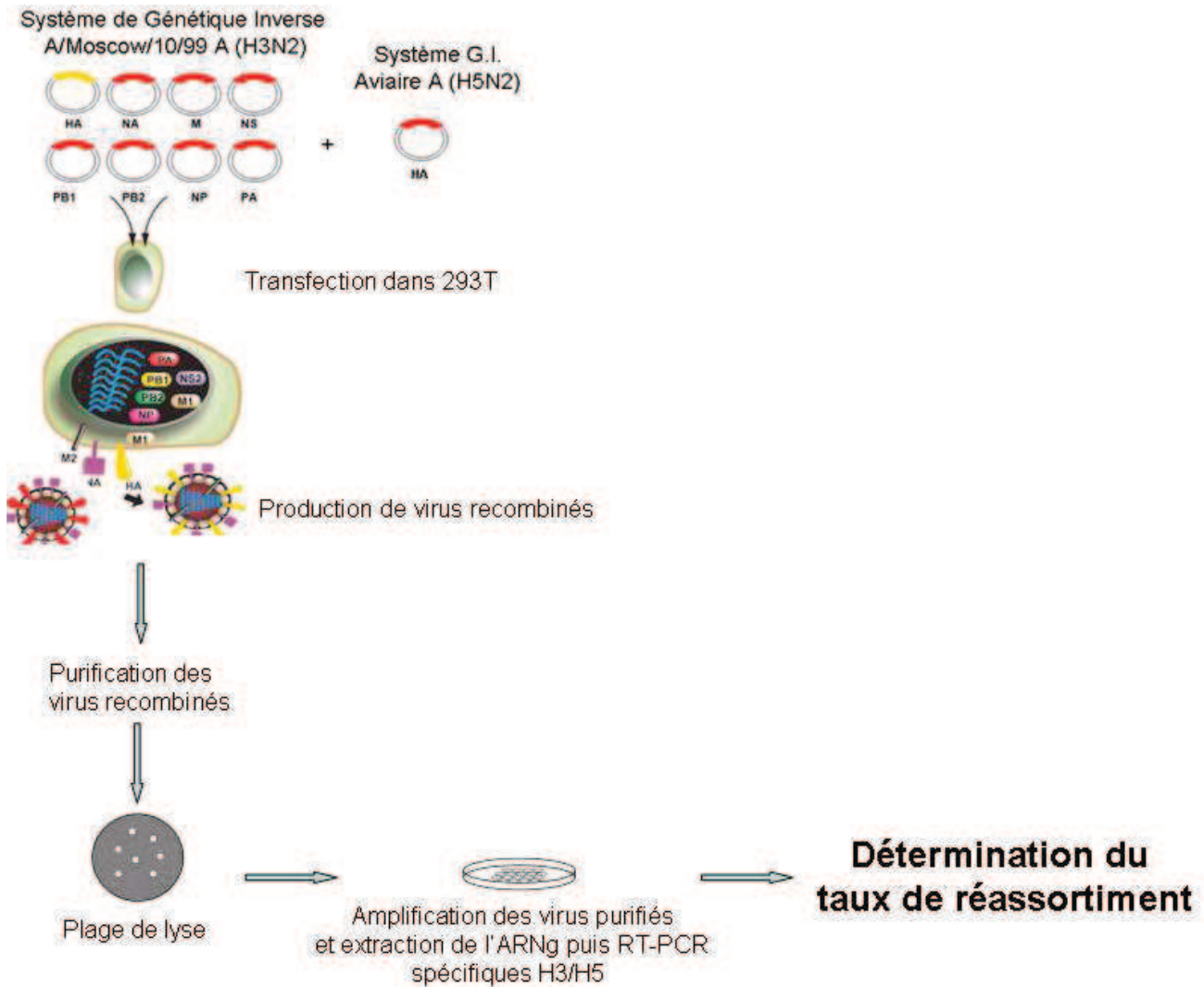
En conclusion, ces données suggèrent donc que le faible pourcentage d'homologie observé entre les segments de gènes HA H3 et HA H5 pourrait être responsable de l'incapacité du segment de gène HA aviaire à s'incorporer dans le fond génétique du virus humain. Au cours de l'étape de packaging du génome viral, un processus semble permettre au segment de gène HA H3 d'être « sélectionné » pour être encapsidé dans les particules virales néo-synthétisées.



**Figure 44: Cinétique de répllication des virus réassortants de l'étude**

Les virus produits par génétique inverse sont titrés selon la méthode de Reed and Munch, après avoir été amplifiés. Des T25 de MCDK en confluence ont été infectées à MOI  $10^{-4}$  et les surnageants prélevés à 7h, 10, 24h, 30h, 48h, 64h et 72h ont été titrés selon la méthode de Reed and Munch. **a.** Cinétiques de virus correspondant à la 1ère partie de l'étude sur le Réassortiment génétique. **b.** Cinétiques des virus parentaux et de la 2ème partie de l'étude. **c.** Cinétiques des virus de la dernière partie de l'étude sur le réassortiment génétique possédant le segment de gène M muté dans les 100 premiers nucléotides du côté 3' avec les virus parentaux. **d.** Cinétiques des virus de la dernière partie de l'étude sur le réassortiment génétique possédant le segment de gène M muté dans les 100 derniers nucléotides du côté 5'.





**Figure 45: Représentation schématique de la génétique inverse compétitive.**

*Les cellules 293T sont transfectées par les plasmides permettant la compétition pour l'incorporation de l'ARNv du segment 4, dans les particules virales. Le surnageant est récolté et les virus recombinants sont isolés et purifiés par des plages de lyse. Les virus purifiés sont amplifiés, l'ARNg est extrait et l'origine des HA incorporées est déterminée par une RT PCR spécifique.*

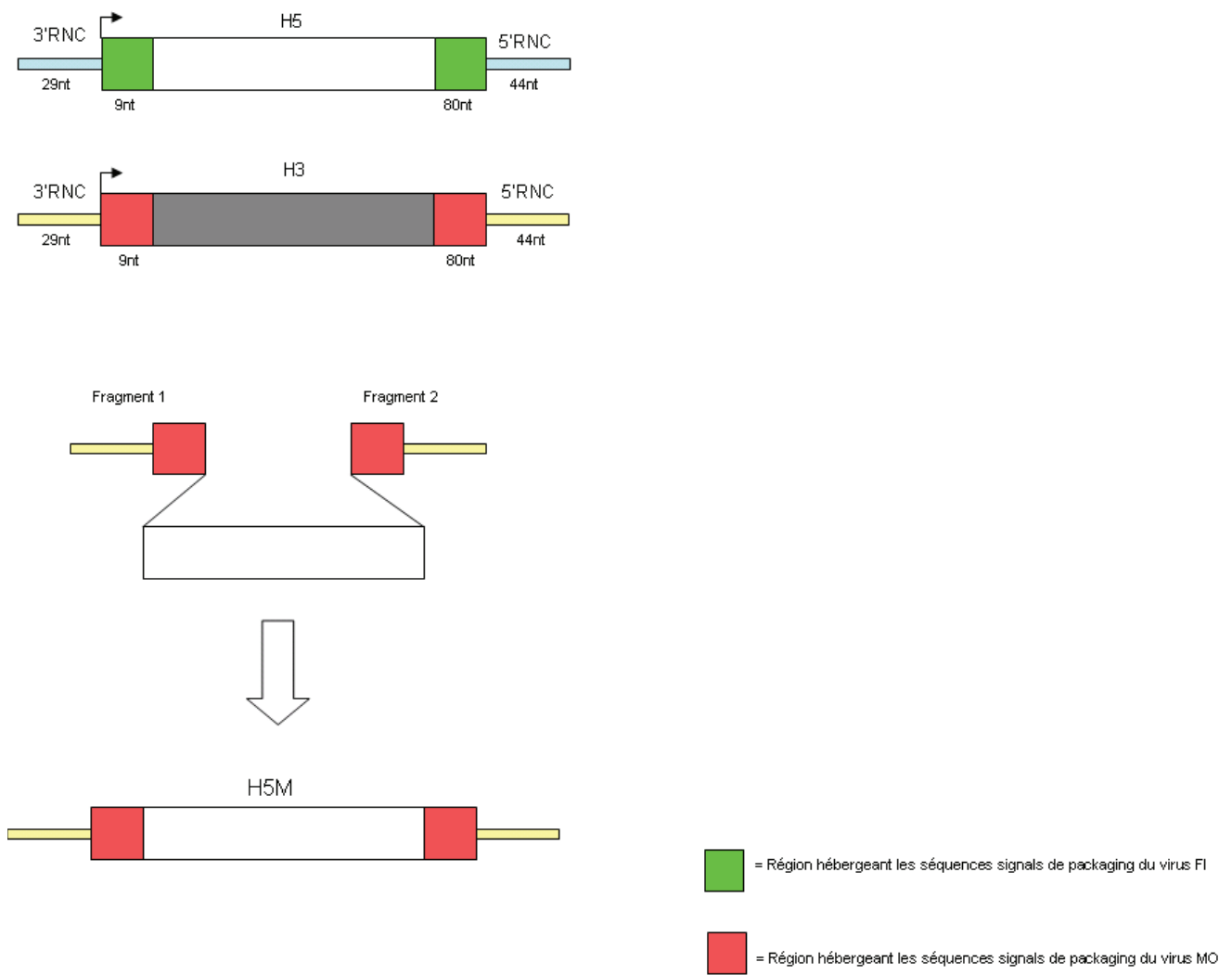
Nos approches expérimentales de réassortiment génétique et notre stratégie de génétique inverse compétitive montrent que le segment de gène HA H5 ne peut pas s'incorporer seul dans le fond génétique du virus humain et qu'une incompatibilité génomique semble en être la cause. Des études récentes ont décrit le rôle de régions de 9 et 80 nt, localisées respectivement aux extrémités 3' et 5' de la région codante dans l'incorporation

sélective du segment de gène HA des virus H1N1 A/WSN/33 [101]. La comparaison de ces régions dites de « packaging » des segments de gènes HA des virus MO et FI révèle un pourcentage d'homologie de 12,5% et 55,4% pour les régions 3' et 5' respectivement (100 nucléotides pour chaque extrémité). Nous avons donc cherché à évaluer l'implication du faible taux d'homologie des régions de packaging, sur l'absence d'incorporation du segment de gène HA H5 dans le fond génétique du virus humain.

Nous avons donc construit un segment de gène HA H5 chimérique possédant les séquences d'encapsidation du segment de gène HA H3 (ARNv H5M). Nous avons déterminé le taux d'incorporation de ce segment chimérique dans le fond génétique du virus MO par génétique inverse compétitive, en utilisant la même stratégie à neuf plasmides décrites ci-dessus. Les extrémités 3' et 5' du segment HA H3 ont été amplifiées par PCR puis liguées au produit PCR correspondant à la séquence codante du segment de gène HA H5 sans les séquences d'encapsidation (figure 46). Les virus MO et MOH5M ont été produits par génétique inverse. Ces virus présentent un titre infectieux et une cinétique de réplication similaires ( $10^{6,6}$  TCID<sub>50</sub>/50μL et  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/50μL pour MO et MOH5M respectivement) (tableau 4 et figure 44a).

L'analyse de 96 virus purifiés, par RT-PCR spécifique H3/H5, sur les 232 clones isolés (41,4%) révèle une incorporation du segment de gène HA H5M dans 44% des clones étudiés (tableau 5).

Ces données suggèrent un rôle des régions de packaging du segment de gène HA H3 dans son incorporation préférentielle dans le fond génétique du virus MO.



**Figure 46: Construction du segment de gène chimérique H5M.**

*Le cadre de lecture ouvert HA du virus H5N2 (blanc) est amplifié par PCR de même que les régions codantes terminales 3' et 5' du segment de gène HA du virus H3N2 (rouge). Une ligation est effectuée suivie d'une PCR permettant d'amplifier le segment de gène chimérique H5M. Ce produit PCR sera par la suite cloné dans le vecteur de génétique inverse pHW2000 $\Delta$ pol2.*

### **3<sup>e</sup> Le réseau d'interaction ARN/ARN gouverne l'incorporation sélective du segment de gène HA aviaire dans le fond génétique du virus humain MO**

Lors de la première partie de mon travail de thèse, nous avons montré, par une approche *in vitro* de retard sur gel, que les segments de gène du virus MO interagiraient entre eux via la mise en place d'un réseau d'interaction ARN/ARN, impliquant leurs régions terminales hébergeant les régions de packaging. Les segments de gène seraient sélectionnés et empaquetés dans un complexe supramoléculaire où, le segment de gène HA occuperait une position centrale dans ce réseau d'interaction.

Sachant que les régions de packaging du segment de gène HA jouent un rôle dans la capacité du segment de gène HA H3 à s'incorporer lorsque celui-ci est en compétition avec le segment de gène HA H5, nous nous posons la question de savoir si les interactions ARN/ARN impliquant le segment de gène HA, jouent un rôle dans ce phénomène. Le segment de gène HA H3 interagissant avec les segments de gènes NP, NS, M et PA, nous avons fait l'hypothèse que l'une ou plusieurs de ces interactions ARN/ARN pourraient être responsables de l'absence d'incorporation du segment de gène HA H5.

Nous avons donc décidé d'évaluer le rôle que pourrait jouer ces différents segments de gène sur l'incorporation du segment de gène HA H5 par notre stratégie de génétique inverse compétitive. Pour cela, nous avons dans un premier temps produit par génétique inverse les virus MONP, MOH5NP, MONS, MOH5NS, MOM, MOMH5, MOPA et MOH5PA (Tableau 4) et amplifiés ces virus sur cellules MDCK. L'analyse des titres infectieux de ces virus montre que seules les compositions génomiques MOH5PA, MOM et MOMH5 permettaient l'obtention de particules virales infectieuses. Nous avons donc décidé de nous focaliser sur le rôle que pourrait jouer le segment de gène M du virus FI dans l'incorporation du segment de gène HA H5 dans le fond génétique du virus MO.

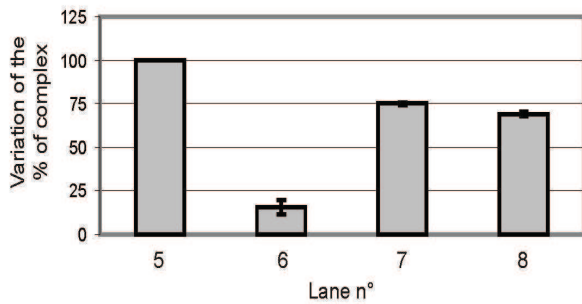
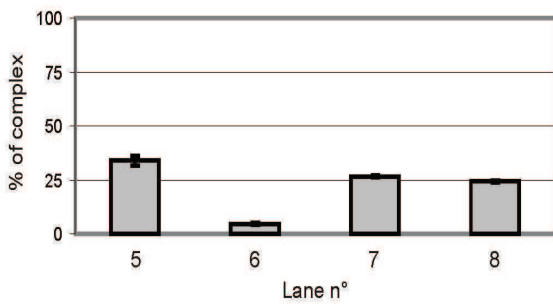
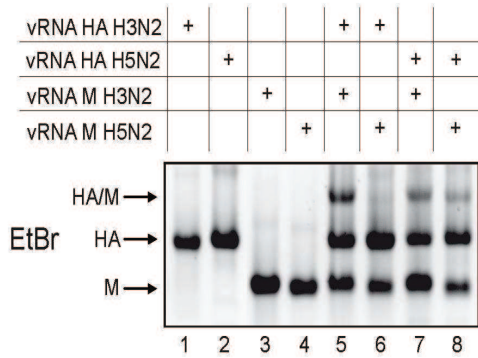
Nous nous sommes d'abord intéressés aux interactions ARN/ARN entre le segment de gène M du virus FI avec les segments de gènes HA des virus MO et FI (Figure 47). Les résultats obtenus montrent que les ARN<sub>v</sub> HA du virus FI interagissent avec les ARN<sub>v</sub> M du virus FI mais de façon plus faible que celles observées entre les ARN<sub>v</sub> HA H3 et M du virus MO.

Dans le but de déterminer si cette baisse d'interaction observée pourrait moduler l'incorporation du segment de gène HA H5 dans le fond génétique du virus MO, nous avons utilisé notre stratégie de génétique inverse compétitive et mis en compétition les segments de gène HA des virus MO et FI pour leur incorporation dans le fond génétique du virus MO comportant le segment de gène M du virus FI (7 segments de gènes du virus MO et deux segments de gènes du virus FI). Les virus MOM et MOMH5 présentent des titres infectieux et des cinétiques de répllication très proches ( $10^7$  TCID<sub>50</sub>/50μL et  $10^{6,33}$  TCID<sub>50</sub>/50μL pour les virus MOM et MOH5M respectivement) (tableau 4 et figure 44b).

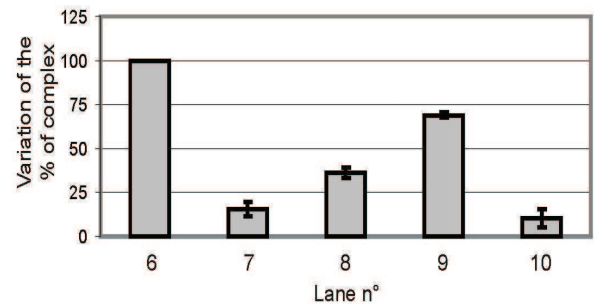
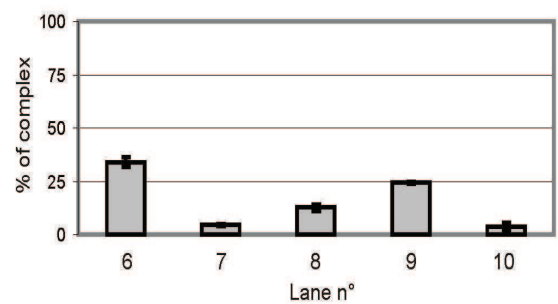
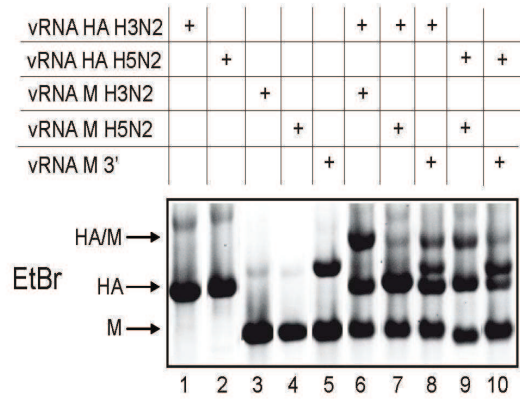
L'analyse par RT-PCR spécifique H3/H5 de 96 clones sur les 280 virus purifiés (34,3%) révèle que 70% des clones analysés ont incorporé le segment de gène HA H5 (tableau 5).

La modulation des interactions entre les ARNv HA et M, par le remplacement du segment de gène M humain par celui de l'aviaire, semble favoriser l'incorporation du segment de gène HA H5 dans le fond génétique du virus humain.

**A**



**B**



**Figure 47: Interactions *in vitro* entre les ARNv**

**A.** analyse de la formation de complexe ARN/ARN par EMSA entre les ARNv HA (H3N2, H5N2) et M (H3N2, H5N2) **B.** analyse de la formation de complexe ARN/ARN par EMSA entre les ARNv HA (H3N2, H5N2) et M (H3N2, H5N2 et M3'). La quantité de complexe formée (% du matériel total contenu dans chaque piste) est une moyenne issue de 3 expériences différentes.

#### **4° L'extrémité 3' de la région codante du segment de gène M est impliquée dans l'incorporation du segment de gène HA aviaire dans un fond génétique du virus humain MO**

Nous avons montré qu'*in vitro*, les segments de gènes du virus MO interagissaient entre eux pour former un réseau d'interaction ARN/ARN. Les extrémités des segments de gènes, qui hébergent les séquences de packaging, semblent être impliquées dans la mise en place de ce réseau. Au sein de ce réseau, le segment de gène M est impliqué dans des interactions moléculaires avec les segments de gènes HA, NA et PB2 (résultats partie A, figure 35). Nous avons montré que l'extrémité 3' de la région codante du segment de gène M interagissait avec le segment de gène HA alors que la région centrale et l'extrémité 5' interagissait respectivement avec les segments de gène PB2 et NA.

Afin de confirmer le rôle du segment de gène M du virus FI dans l'incorporation du segment de gène HA H5 dans le fond génétique du virus MO et notamment le rôle des régions de packaging, nous avons produit un segment de gène M humain chimérique (ARNv M3'). Ce segment de gène chimérique possède l'extrémité 3' du segment de gène M aviaire qui interagit avec le segment de gène HA. La comparaison des 100 premiers nucléotides de l'extrémité 3' du segment de gène M entre les souches MO et FI révèle 5 substitutions nucléotidiques. Par mutagenèse dirigée, nous avons introduit les substitutions C/T (31e), T/C (55e), T/C (70e), A/G (74e), A/G (94e) dans la séquence du segment de gène M du virus MO. Ces 5 substitutions ne modifient pas la séquence protéique de la protéine M1. Nous avons produit par génétique inverse les virus MOM3' et MOM3'H5 présentant des titres infectieux à 48h ( $10^{6,33}$  TCID<sub>50</sub>/50µL pour les deux virus) (tableau 4) et des cinétiques de répllication proches de celles observées pour les virus MO et MOH5 (Figure 44c).

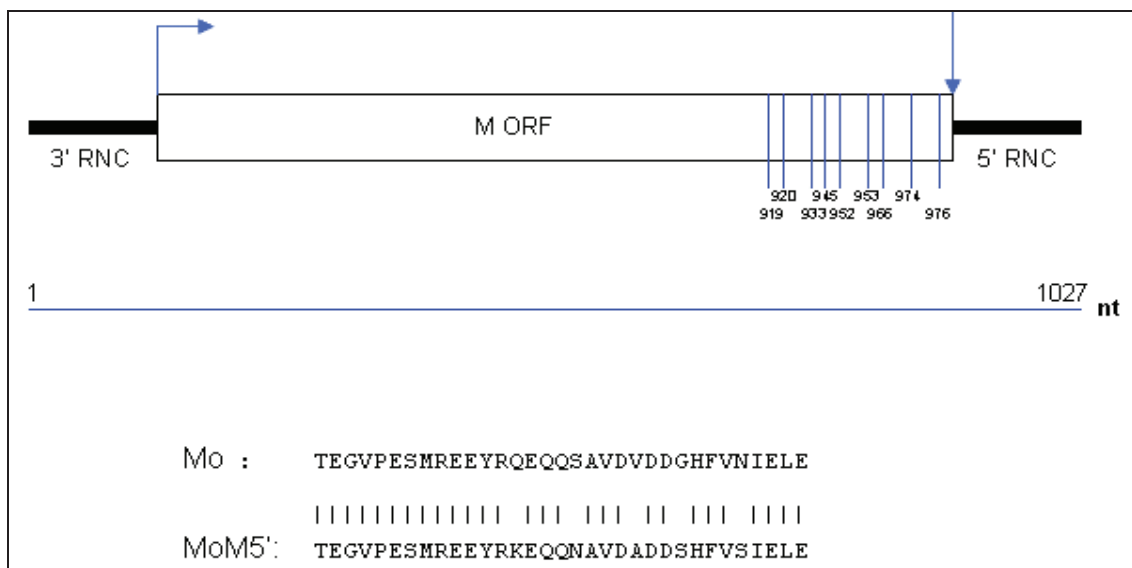
La génétique inverse compétitive entre les segments de gènes HA des virus FI et MO auxquels sont ajoutés 7 plasmides de génétique inverse du virus MO dont le plasmide codant pour l'ARNv chimérique M3' a été réalisée. L'analyse par RT-PCR spécifique H3/H5 de 96 virus purifiés sur les 273 virus isolés et purifiés obtenus par la réalisation de plaque de lyse à partir du surnageant, révèle un taux de 60% des virus ayant incorporé le segment de gène HA H5.

Afin de confirmer le rôle de l'extrémité 3' du segment de gène M dans l'incorporation du segment de gène HA H5, nous avons produit un segment de gène M chimérique comportant



les 100 derniers nucléotides de l'extrémité 5' du segment de gène M aviaire, correspondant à la modification de 9 nucléotides. L'extrémité 5' du segment de gène M du virus MO interagit avec le segment de gène NA. (Résultats partie A, figure 36). Il est cependant important de noter que la modification des 9 nt est responsable de la modification de la séquence en acides aminées (figure 47). Nous avons cependant montré que les virus MOM5' et MOH5M5' présentaient des caractéristiques virologiques similaires (tableau 4 et figure 43d). La réalisation d'une compétition de gène entre H3 et H5 lorsque le segment de gène M chimérique M5' est imposé dans le fond génétique du virus MO montre une incorporation préférentielle du segment de gène H3 dans le fond génétique MO (tableau 5).

La modification de l'extrémité 3' du segment de gène M humain, en modulant l'interaction moléculaire ARN/ARN entre les segments de gènes HA et M, permet l'incorporation du segment de gène HA H5 dans le fond génétique humain.



**Figure 48: Construction du segment de gène M5'.**

*La comparaison des 100 nucléotides des segments de gène M MO et FI révèle 9 substitutions côté 5'. Les mutations de cette région ont été obtenues par des mutagénèses dirigées et entraînent les modifications de la séquence protéique de la protéine M2 (comparaison des 33 derniers aa relevé ci-dessus).*

## **5<sup>e</sup> Modulation de l'incorporation des segments de gène HA sur un fond génétique du virus humain MO**

Afin de confirmer l'impact de l'extrémité 3' du segment de gène M sur l'incorporation du segment de gène HA aviaire à l'échelle d'un virus, nous avons mis au point une nouvelle stratégie *in vitro* basée sur l'infection de cellules préalablement transfectées. Des cellules 293T ont été préalablement transfectées par le plasmide de génétique inverse comportant le segment de gène HA H5 et immédiatement infectées par les virus MO ou MOM3' à MOI 2 pendant 24 heures. La réplication des deux virus sur cellules 293T a été comparée en déterminant le titre infectieux à 48 heures post-infection ( $10^{5,6}$  TCID<sub>50</sub>/50µL et  $10^{5,33}$  TCID<sub>50</sub>/50µL pour les virus MO et MOM3' respectivement) (tableau 4 et figure 43c). Au stade tardif du cycle viral, l'ARNv HA H5 issus de la transcription par la polymérase de type 1 et l'ARNv HA H3 issu de la réplication virale sont en compétition pour être encapsidé dans les particules virales néo-synthétisées. Au total, 144 virus purifiés (pour chaque infection) ont été analysés par RT-PCR spécifique H3/H5 et l'analyse des données montre une incorporation de 12,5% et de 37,5% du segment de gène HA H5 respectivement pour l'infection par les virus MO et MOM3'.

Ce résultat confirme la capacité de produire un virus réassortant comportant le segment de gène HA H5 sur le fond génétique du virus humain H3N2 en modulant la séquence nucléotidique de la région d'encapsidation 3' du segment de gène M, région impliquée dans la mise en place de l'interaction moléculaire avec le segment de gène HA.

# IV/ CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

## CONCLUSIONS

Le phénomène de réassortiment génétique est un important support de l'évolution des virus Influenza. Un virus réassortant comportant des segments de gènes d'origine aviaire ou porcine possédant le segment de gène HA peut potentiellement être pathogène pour l'homme et être responsable d'une pandémie.

Les différentes études menées sur ce mécanisme ont montré que l'incorporation d'un segment de gène HA étranger sur un fond génétique humain s'effectuait toujours avec l'incorporation d'autres segments de gène (Li, Hatta et al. 2010; Octaviani, Ozawa et al. 2010; Ottmann, Duchamp et al. 2010, Jackson, Van Hoeven et al. 2009) soulignant l'existence éventuelle d'un phénomène de restriction. D'autres éléments sont en faveur de cette hypothèse, en effet, qu'ils s'agissent d'études reposant sur la méthodologie de co-transfection des systèmes de génétique inverse H3N2 et H7N7, co-infection *in vivo* chez le furet par les souches H3N2 et H5N1, ou la co-infection *in vitro* des souches H1N1 et H5N1 [126, 128, 130], on observe peu de génotypes différents par rapport à la totalité des compositions génomiques possibles (respectivement 29, 32 et 33 génotypes différents). Parmi ce nombre limité de génotypes observés de virus réassortants, ceux qui possèdent une HA étrangère sont encore plus restreints (respectivement 2 génotypes réassortants possédant le segment de gène HA H7, 5 génotypes réassortants possédant le segment de gène HA H5, et 19 génotypes réassortants possédant le segment de gène HA H5). Dans le but d'évaluer l'assemblage de virus réassortants possédant le segment de gène HA de H5 sur un fond génétique humain par réassortiment génétique, nous avons d'une part effectué des co-infections des cellules MDCK par les virus H3N2 MO et H5N2 FI à des MOI identiques et co-transfecté des cellules 293T par les plasmides de génétique inverse des systèmes MO et FI. Le criblage des virus réassortants issus de ces deux méthodologies nous a permis d'observer 6 et 7 compositions génomiques différentes respectivement pour la co-transfection et la co-infection, sur les 128 compositions génomiques possibles ( $2^7$  puisqu'on n'a criblé uniquement le fond génétique des virus réassortants ayant incorporé le segment de gène HA H5). Ces résultats sont en

concordance avec les données de la littérature. Il est intéressant de noter que dans notre étude, les compositions génomiques retrouvées par ces deux méthodologies sont différentes (à l'exception d'une composition retrouvée pour les deux techniques A1=B2 tableau 2 et 3). Les paramètres virologiques mis en jeu dans l'émergence de virus réassortants par la technique de co-infection (notamment l'absence d'équimolarité des segments de gènes) pourrait expliquer en partie les différences observées. De manière intéressante les segments de gènes PA et M aviaires sont toujours incorporés sur le fond génétique des virus réassortants comportant le segment de gène HA H5. Il semblerait que la présence de ces segments de gène soit nécessaire pour l'obtention de virus réassortants possédant le segment de gène HA H5.

Pour ce qui concerne plus spécifiquement le segment de gène HA H5, nos études comme celles de la littérature, confirment l'absence d'intégration isolé de ce segment de gène, quelque soit la méthodologie utilisée. Cette absence d'incorporation isolée d'un segment de gène HA d'origine aviaire dans le fond génétique du virus humain est à rapprocher de l'observation fonctionnelle de la composition génétique des virus pandémiques de 1957 et de 1968. L'analyse de ces virus montre que les segments de gènes HA ont été incorporés en association avec les segments de gènes aviaires NA et/ou PB1.

L'obtention d'un faible nombre de génotypes différents lors d'un événement de réassortiment génétique entre deux virus génétiquement distincts et l'incapacité de produire un virus réassortant possédant la HA étrangère sur le fond génétique d'un virus humain suggère l'existence d'une incompatibilité protéique et/ou génomique entre les segments de gène et les protéines virales. Li et al, 2008 ont montré qu'une incompatibilité protéique au niveau des éléments du complexe polymérase viral pouvait être à l'origine de compositions génomiques ne permettant pas la production de virus réassortant infectieux [130]. A l'heure actuelle, il existe très peu de données sur les mécanismes qui contrôlent le réassortiment génétique et sur une potentielle incompatibilité génomique qui pourrait être à l'origine du faible taux de réassortiment génétique observé entre deux virus génétiquement différents.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la production de virus réassortants comportant un segment de gène HA aviaire sur le fond génétique d'un virus humain H3N2. Alors qu'il est possible de produire par génétique inverse des virus recombinés comportant des segment de gènes HA aviaires (H5N1), porcins (H1N1) ou équins (H7N7) sur le fond génétique du virus humain H3N2, présentant des capacités répliquatives importantes, aucun de ces virus ont pu être obtenu par un événement de réassortiment génétique que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Li, Hatta et al. 2010; Octaviani, Ozawa et al. 2010; Ottmann, Duchamp et al. 2010, Jackson, Van Hoeven et al. 2009). L'analyse des génotypes des virus réassortants obtenus par

des événements de réassortiment génétique *in vitro* entre le virus aviaire H5N2 et le virus humain H3N2 et les capacités répliquatives du virus recombiné MOH5 confortent ces observations. Ces données suggèrent qu'une incompatibilité génomique pourrait expliquer ce phénomène de restriction

Nous avons alors émis l'hypothèse que le pourcentage d'homologie des séquences nucléotidiques pouvait influencer sur la capacité du segment de gène HA H5 à s'incorporer sur le fond génétique de virus humain. La comparaison des séquences nucléotidiques entre les segments de gènes HA H3 et H5 montre un pourcentage d'homologie de séquence de 49,18%. Notre stratégie de génétique inverse compétitive confirme l'incapacité d'incorporer le segment de gène HA H5 dans le fond génétique du virus MO lorsque celui-ci est en compétition avec le segment de gène HA H3. Cependant, nous avons montré que le segment de gène NA N2 du virus aviaire, présentant une homologie de séquence nucléotidique de 82.61% avec son homologue humain, pouvait s'incorporer dans le fond génétique du virus humain dans 20.8% des cas lorsque celui-ci est en compétition avec le segment de gène NA N2 humain. Ces données suggèrent une corrélation entre le pourcentage d'homologie nucléotidique des segments de gènes et leurs capacités à s'incorporer dans un fond génétique donné. Cette hypothèse est en corrélation avec le fait d'obtenir peu de virus réassortant présentant des génotypes différents lorsque deux virus génétiquement distincts sont impliqués dans des événements de réassortiment génétique.

Nous nous sommes donc demandé, dans un deuxième temps, si ce défaut d'incorporation observé pour le segment de gène HA H5 n'était pas directement lié à une forte divergence des régions spécifiques d'encapsidation. Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons construit un segment de gène HA H5 possédant les régions d'encapsidations du segment de gène HA H3 dont les régions ont été identifiées par Watanabe et al en 2003 [101]. La modification des extrémités du segment de gène HA H5, a pour conséquence l'incorporation du segment de gène chimérique HA H5 dans le fond génétique humain dans 43.6% des virus obtenus, lorsque ce dernier est en compétition avec le segment de gène HA H3. Les régions de packaging du segment de gène HA H3 semblent donc être impliquées dans l'incorporation préférentielle de ce segment de gène dans le fond génétique humain lorsque celui-ci est mis en compétition avec le segment de gène HA H5. La faible homologie de séquence nucléotidique

des extrémités des segments de gène HA H5 et H3 pourrait expliquer l'incapacité de produire le virus réassortant MOH5 par réassortiment génétique.

Nous avons précédemment montré que les segments de gène du virus MO interagissaient entre eux par des interactions ARN/ARN, et seraient empaquetés dans les particules virales néosynthétisées via la mise en place d'un complexe supramoléculaire où le segment de gène HA occuperait une position centrale dans ce réseau. Ayant précédemment suggéré un lien entre le pourcentage d'homologie des régions de packaging du segment de gène HA et la capacité de ce segment de gène à s'incorporer dans un fond génétique donné, nous avons cherché à savoir si les interactions ARN/ARN impliquant le segment de gène HA H3 pouvait être impliquées dans l'absence d'incorporation du segment de gène HA aviaire. Devant l'incapacité de produire des virus recombinés comportant les segments de gènes PA et NS aviaires, nous nous sommes focalisés sur l'impact de l'interaction ARN/ARN HA-M.

L'analyse des interactions entre les segments de gène HA et M des virus MO et FI (figure 45) semble indiquer que l'incorporation du segment de gène HA H5, en compétition avec le segment de gène HA H3, pourrait être favorisé par le segment de gène M du virus FI. En effet l'interaction entre les ARNv HA H3 et M du virus FI étant beaucoup plus faible que l'interaction entre le segment de gène HA H3 et le segment de gène M humain, cette diminution d'interaction permettrait une incorporation du segment de gène HA H5 plus facilement lorsque celui-ci est en compétition avec le segment de gène HA humain. La production de virus réassortant par génétique inverse compétitive confirme le rôle du segment de gène M aviaire dans la production de virus réassortants comportant le segment de gène HA H5, puisque 70% des virus purifiés obtenus comportent le segment de gène HA aviaire. La présence du segment de gène M aviaire dans le fond génétique du virus humain permet l'incorporation du segment de gène HA H5 en modulant l'interaction ARN/ARN HA-M. Cette observation est tout à fait en corrélation avec le fait que tous les virus réassortants comportant le segment de gène HA H7 possède le segment de gène M du virus équin [130]. Il est de plus très intéressant de noter que, dans notre étude aussi bien lors de la co-infection que lors de la co-transfection des systèmes de génétique inverse des virus MO et FI, le segment de gène M du virus FI était aussi toujours (à l'exception d'un génotype) associé au segment de gène HA du virus FI.

Nous avons montré que le segment de gène PA du virus FI est systématiquement présent dans les virus réassortants comportant le segment de gène HA H5. Notre méthodologie ne nous

permet pas aujourd'hui de définir si l'interaction ARN/ARN HA-PA est impliquée, de la même manière que l'interaction HA-M, dans l'incorporation du segment de gène aviaire dans le fond génétique du virus humain. Il est cependant envisageable que l'incorporation du segment de gène PA aviaire dans le fond génétique humain, confère aux virus réassortants des propriétés répliquatives plus importantes.

Afin de confirmer l'implication du réseau d'interaction entre les segments de gène du virus MO sur la capacité de produire des virus réassortants comportant le segment de gène HA aviaire et notamment le rôle de l'interaction HA-M, nous avons produit un segment de gène M humain chimérique possédant l'extrémité 3' du segment de gène M aviaire. Cette extrémité héberge la région impliquée dans l'interaction avec le segment de gène HA. La production de virus réassortant par génétique inverse compétitive confirme le rôle de l'extrémité 3' du segment de gène M, dans la capacité de produire des virus comportant le segment de gène HA H5 (60% des virus purifiés possèdent le segment de gène HA aviaire). La modification de 5 nucléotides au niveau de l'extrémité 3' du segment de gène M humain permet la diminution de l'intensité de l'interaction ARN/ARN entre les segments de gènes HA et M. La modulation de cette interaction permettrait au segment de gène HA H5 de venir prendre la place du segment de gène HA H3 dans le complexe macromoléculaire lors de l'incorporation du génome viral dans les particules virales néo-synthétisées. Cette observation a été confirmée à l'échelle d'un virus lorsque des cellules transfectées (mimant une cellule infectée par le virus FI) et infectées par le virus humain recombiné comportant le segment de gène M chimérique, permettent l'émergence de virus réassortants comportant le segment de gène HA H5 sur le fond génétique du virus humain.

Outre les différences nucléotidiques entre les segments de gène, il existe aussi une incompatibilité protéique lors d'un processus de réassortiment génétique. Cette incompatibilité semble être associée au faible nombre de génotypes différents lors d'un processus de réassortiment génétique ; cette incompatibilité protéique touche principalement les protéines du complexe polymérase [130]. Cependant, nos données suggèrent une incompatibilité génomique qui semble avoir un impact très fort sur la capacité de produire des virus réassortants infectieux.



Cette incompatibilité génomique pourrait être gouvernée par la mise en place des réseaux d'interactions entre les segments de gènes, le mécanisme moléculaire permettant l'incorporation d'un jeu complet de huit segments de gènes dans les particules virales néo-synthétisées. L'incapacité de produire le virus MOH5 par réassortiment génétique ou tout autre virus réassortant comportant uniquement un segment de gène HA aviaire, porcins ou équins sur un fond génétique humain suggère cette hypothèse. Des données préliminaires obtenues au laboratoire montrent que les réseaux d'interactions ARN/ARN seraient différents entre les sous type viraux. L'hypothèse d'un contrôle du réassortiment génétique par les mécanismes moléculaires de l'incorporation sélective du génome viral est en adéquation avec le fait que de multiples événements de réassortiment génétique impliquant des virus de sous-types différents sont souvent nécessaires pour l'obtention de virus réassortants. Les compositions génomiques particulières observées pour le virus pandémique H1N1 et pour le virus aviaire hautement pathogène H5N1 appuie cette hypothèse. On peut tout à fait imaginer que l'incorporation d'un segment de gène d'un virus donné peut permettre l'incorporation d'un segment de gène d'un autre virus dans un fond génétique d'un troisième virus. De plus, le fait que des événements de réassortiment génétique sont régulièrement observés entre des virus de même sous-type et de même origine confirme notre hypothèse.

### ***Perspectives.***

Notre méthodologie ne nous a pas permis de définir le rôle du segment de gène PA aviaire dans l'incorporation du segment de gène HA H5 dans le fond génétique de H3N2, alors que ce segment de gène est systématiquement retrouvé associé au segment de gène HA dans les virus réassortants obtenus par réassortiment génétique *in vitro*. Il serait intéressant de constater, dans notre modèle d'assemblage, une éventuelle synergie des segments de gènes M et PA. Le segment de gène PA aviaire participe-t-il à l'incorporation du segment de gène HA H5 ou permet-il aux virus réassortants d'acquérir une activité polymérase optimisée et donc des capacités répliquatives plus importantes ? La quantification de l'activité polymérase de complexes polymérases hétérogènes (FI/MO) pourra apporter des éléments de réponse.

Au cours de notre étude nous avons montré qu'en modulant le réseau d'interaction, et plus particulièrement l'interaction entre les segments de gènes HA et M par l'intermédiaire de substitutions au niveau de l'extrémité 3' du segment de gène M, nous avons la possibilité de produire des virus comportant le segment de gène HA H5 sur le fond génétique du virus

humain. La comparaison des 100 premiers nucléotides des extrémités 3' des segments de gènes M des virus MO et FI révèle 5 substitutions nucléotidiques. Il n'est cependant pas à exclure que ces 5 nucléotides ne jouent pas tous un rôle dans l'interaction HA-M. L'utilisation de notre système de génétique inverse compétitive permettrait de définir quels sont les nucléotides nécessaires et suffisants pour obtenir l'incorporation du segment de gène HA aviaire.

Pour finir, nous souhaitons définir les mutations au niveau des régions de packaging des segments de gènes du virus humain H3N2 qui permettraient d'incorporer les segments de gènes aviaires portant les principaux facteurs de virulence (HA, NS et PB1) par un unique événement de réassortiment génétique. Ces mutations pourraient être regroupées sous le nom de « mutation d'adaptation au réassortiment génétique ». Cette étude sera réalisée aussi pour le virus humain H1N1 et pour les segments de gènes du virus aviaire hautement pathogène H5N1. Nos résultats suggèrent qu'en étudiant et définissant les réseaux d'interaction des virus circulants, on pourrait potentiellement anticiper les compositions génomiques des futurs virus réassortants potentiellement pathogènes pour l'homme et de définir les virus candidats

Cette approche peut aussi être utilisée pour la production de semence vaccinale à façon, en optimisant leur processus de production. Nous avons montré au laboratoire que certaines compositions génomiques de semences vaccinales H3N2 permettaient une meilleure production d'antigènes vaccinaux (ajout du segment de gène PB1). La modification du fond génétique du virus A/PuertoRico/8/34 (optimisation des régions de packaging) permettra d'obtenir des réassortants vaccinaux optimisés à façon pour un haut niveau de réplication en œuf ou en cellule.

# V/ ANNEXES

## 1. Annexe 1: Publication 1

An interaction network linking the influenza A virus genomic RNA segments

Emilie Fournier<sup>1,\*</sup>, Vincent Moules<sup>2,\*</sup>, **Boris Esserez**, Jean-Christophe Paillart<sup>1</sup>, Annie Cavalier<sup>3</sup>, Jean-Paul Rolland<sup>3</sup>, Daniel Thomas<sup>3</sup>, Bruno Lina<sup>2</sup> & Roland Marquet<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Architecture et Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg, CNRS, IBMC, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France. <sup>2</sup>Virologie et Pathologie Humaine, Université Lyon 1, FRE 3011 CNRS, Faculté de Médecine RTH Laennec, 69008 Lyon, France. <sup>3</sup>Interactions Cellulaires et Moléculaires, Université Rennes 1, UMR 6026 CNRS, Campus de Beaulieu, bâtiment 13, 35042 Rennes, France.*

*\*These authors contributed equally to this work.*

En Soumission (15 février 2011)

# A supramolecular assembly formed by influenza A virus genomic RNA segments

Emilie Fournier<sup>1</sup>, Vincent Moules<sup>2</sup>, Boris Essere<sup>2</sup>, Jean-Christophe Paillart<sup>1</sup>, Jean-Daniel Sirbat<sup>1</sup>, Catherine Isel<sup>1</sup>, Annie Cavalier<sup>3</sup>, Jean-Paul Rolland<sup>3</sup>, Daniel Thomas<sup>3</sup>, Bruno Linaz and Roland Marquet<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Architecture et Reactivite de l'ARN, Universite de Strasbourg, CNRS, IBMC, 15 rue Rene Descartes, 67084 Strasbourg, Virologie et Pathologie Humaine, Universite Lyon 1, FRE 3011 CNRS, Faculte de Medecine  
<sup>2</sup>RTH Laennec, 69008 Lyon and Interactions Cellulaires et Moleculaires, Universite Rennes 1, UMR 6026 CNRS, Campus de Beaulieu, Batiment 13, 35042 Rennes, France

Received September 19, 2011; Revised and Accepted October 13, 2011

## ABSTRACT

The influenza A virus genome consists of eight viral RNAs (vRNAs) that form viral ribonucleoproteins (vRNPs). Even though evidence supporting segment-specific packaging of vRNAs is accumulating, the mechanism ensuring selective packaging of one copy of each vRNA into the viral particles remains largely unknown. We used electron tomography to show that the eight vRNPs emerge from a common 'transition zone' located underneath the matrix layer at the budding tip of the virions, where they appear to be interconnected and often form a star-like structure. This zone appears as a platform in 3D surface rendering and is thick enough to contain all known packaging signals. In vitro, all vRNA segments are involved in a single network of inter-molecular interactions. The regions involved in the strongest interactions were identified and correspond to known packaging signals. A limited set of nucleotides in the 5' region of vRNA 7 was shown to interact with vRNA 6 and to be crucial for packaging of the former vRNA. Collectively, our findings support a model in which the eight genomic RNA segments are selected and packaged as an organized supramolecular complex held together by direct base pairing of the packaging signals.

Usually, selective packaging of the vRNA is achieved by the specific binding of a viral structural protein to a packaging signal solely present in this RNA. This general problem reaches an additional level of complexity in viruses whose genome is segmented, as in the Orthomyxoviridae family. Among these viruses, Influenza A viruses are an important threat for public health (1). The influenza A virus genome consists of eight single-stranded negative-sense RNA segments ranging from 890 to 2341 nt that are associated with nucleoprotein (NP) and a heterotrimeric polymerase complex (2), and appear as individual ribonucleoprotein complexes (vRNPs) inside an enveloped filamentous or spherical structure (3–7). The eight vRNAs have a common organization: a long central coding region (in antisense orientation) is flanked by relatively short segment-specific untranslated regions (UTRs) and by two partially complementary terminal promoters (12 nt at the 3'-end and 13 nt at the 5'-end). These are conserved between segments and impose a panhandle structure to the vRNPs (8,9). As the natural transmission of influenza A viruses is initiated at low multiplicity of infection (m.o.i.), viral particles that do not incorporate at least one copy of each genomic segment will fail to replicate (10).

Two models have been proposed for the packaging of the vRNAs into influenza A viral particles: a random model and a segment-specific model, but growing evidence supports the existence of a specific packaging mechanism (10). First, genetic evidence indicated that influenza A virions normally incorporate exactly eight vRNAs (11–13). Second, electron microscopy of a variety of influenza A virus strains repeatedly showed that seven vRNPs are organized around a central one (3–5,7). In elongated and filamentous viral particles, the vRNPs contact the

## INTRODUCTION

The packaging machinery of RNA viruses must discriminate the genomic viral RNA (vRNA) against a variety of cellular RNAs, and, most often, other viral RNA species.

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 388417054; Fax: +33 388602218; Email: r.marquet@ibmc-cnrs.unistra.fr

The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as joint First Authors.

matrix layer at one of the hemispherical cap of the virions, which has been identified as their budding tips (3,7). Third, defective interfering RNAs generated from the vRNA segments revealed the presence of segment-specific packaging signals within 100 to 300 nt from each end of the vRNAs [for a review, see Ref. (10)]. Fourth, reverse genetics experiments using segments in which a reporter gene was substituted for most of the central coding region pointed to the existence of segment-specific packaging signals located in the 3' and 5' terminal regions of every influenza A genomic vRNA (14–21). Finally, sequence analysis showed that the most conserved codons tend to accumulate in the terminal packaging regions, and point mutations identified single nucleotides or short nucleotide clusters required for optimal packaging of several vRNAs (5,22,23).

Despite these studies, the molecular basis underlying segment-specific packaging of influenza A vRNAs remains elusive. Here, we used electron tomography, native gel electrophoresis and capture of RNA complexes on magnetic beads to visualize vRNPs inside virions and analyse the interactions between vRNAs. Collectively, our findings support a model in which the eight genomic RNA segments are selected and packaged as an organized supra-molecular complex held together by direct base pairing of the packaging signals.

## MATERIALS AND METHODS

### Electron tomography

Madin–Darby canine kidney (MDCK) cells were infected with A/Moscow/10/99 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) virus at low m.o.i. After 24 h, cells and viruses were fixed, stained and embedded in epon as described (6). Tilt series of uranyl-stained 150–200 nm thick sections were acquired on a Tecnai G2 Sphera electron microscope (FEI Company, Eindhoven, The Netherlands) operating at 200 kV. Digital images were automatically recorded on a CCD camera (Gatan Ultrascan 1000) at Å25 000 nominal magnification (pixel size 0.46 nm) over a tilt range of Å60 to +60 with 1 increments. The images in the tilt series were pre-processed and aligned with or without gold Educial markers. The eTomo graphical user interface of the IMOD tomography package was used to calculate the 3D reconstruction (24). The Enal tomograms were calculated by weighted backprojection. Individual virions were extracted from the calculated tomograms and denoised using an iterative median filter (25). The 3D volumes were imported into the 3D visualization software AMIRA (Mercury Computer Systems, Merignac, France) for visualization, manual segmentation and surface rendering.

### Plasmids and cloning

A/Moscow/10/99 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) cDNAs were cloned between the Bsmbl sites of pUC2000 vectors starting from the reverse genetic plasmids (6). These vectors were derived from pUC19 by introducing a PstI restriction site, removing the multiple cloning site cassettes and inserting a T7 promoter, the cloning cassette of pHW2000 containing

two Bsmbl sites, and a unique restriction site (Eco47III, Bsh1236I or Ecl136II) between the PstI and EcoRI sites.

### In vitro transcription and electrophoretic mobility shift assay

DNA templates digested with Eco47III, Bsh1236I or Ecl136II were co-transcribed in vitro for 3 h and RNA complexes were analysed by native agarose gel electrophoresis as described (26), except that the samples were treated with 5 U of RNase-free DNaseI (Roche) and that phenol–chloroform extraction was omitted. Briefly, linearized plasmids were incubated in 10 ml reactional volume containing 40 mM Tris–HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM spermidine, supplemented with 5 mM DTT, 4 mM of each NTP, 1 U RNaseI (Promega), 0.05 mg/ml BSA, 0.05% Triton X-100 and 0.5 ml of home-made T7 RNA polymerase. After 3 h of incubation, samples were treated with 5 U of RNase-free DNase I (Roche) for 1 h at 37 C, supplemented with 2 ml loading buffer and loaded on a 0.8% agarose gel containing 0.01% ethidium bromide. Electrophoresis was performed for 4 h at 150 V at 4 C in a buffer containing Tris 100 mM, borate 85 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.1 mM. Gels were analysed using a Gel Doc (Bio-Rad) imager and the Quantity One software. The weight fraction (%) of the RNA mass corresponding to each band in a lane was determined, and the percentage of intermolecular complex was determined by dividing the weight fraction of the corresponding band by the sum of the weight fractions of all bands in the lane. Integrity of the RNAs was routinely checked by denaturing gel electrophoresis.

### Nucleoprotein overexpression and purification

The expression plasmid coding for NP was a kind gift of Dr Yizhi Jane Tao (Department of Biochemistry and Cell Biology, Rice University, Houston, USA). Overexpression and purification were performed according to their published protocols (27). Briefly, NP was expressed in BL21-DE3 Escherichia coli cells. After centrifugation, the cell pellet was resuspended in 50 mM Tris–HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM b-mercaptoethanol, treated with lysozyme (1 mg/ml) for 30 min at 4 C and sonicated. After treatment with DNase I (2.5 mg/ml) and RNase A (5 mg/ml), and centrifugation (30 min at 17 000 g at 4 C), NP was recovered from the supernatant by chromatography using a Ni-NTA affinity column (Qiagen) followed by a HiTrap Heparin HP column (Pharmacia) as described (27). The purified protein was concentrated on a centricon 30 K (Amicon) device and stored at 4 C in 50 mM Tris–HCl pH 7.5, 100 mM NaCl.

### Analysis of vRNA complexes on magnetic beads

Wild-type vRNA 7 and vRNA 7A100 5' with a 3' extension were transcribed in vitro from plasmids linearized with AatII. After transcription, 20 pmol of a 16-mer biotinylated oligonucleotide complementary to the 3' extension, NP (1 protein/24 nt) and NaCl (100 mM) were added to the reaction mixture (20 ml final volume) and incubated at 37 C. vRNA 6 was incubated with NP in parallel and after 30 min, the two vRNAs were mixed and incubated

together for a further 30 min at 37 C. M-280 magnetic beads (Invitrogen, 20 ml) were added and the complexes were allowed to bind for 30 min at room temperature. The beads were washed twice, then treated with 100 ml formaldehyde 95%, EDTA 10 mM. After ethanol precipitation, vRNA aliquots were reverse transcribed with AMV RT (MP Biomedicals) and amplified by PCR using Dream-Taq polymerase (Fermentas) and segment-specific primers.

#### Oligonucleotide mapping experiments

Oligodeoxyribonucleotides complementary to vRNA 7 were added to the in vitro transcription reaction (10 mM final concentration, including 10 000 cpm of purified 5<sub>0</sub>-[<sup>32</sup>P]-labelled oligonucleotide). After electrophoresis and visualization of the RNA species under UV light, gels were fixed in 10% (v/v) trichloroacetic acid and dried at room temperature.

#### Cell culture, reverse genetics, virus growth kinetics and competition experiments

MDCK cells were purchased from Cambrex Bioscience (ATCC, CCL34), Walkersville, MD, USA. Cells were passaged twice weekly in serum free Ultra-MDCK medium (Cambrex Bioscience) supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), penicillin (225 U/ml) and streptomycin (225 mg/ml) (Cambrex Bioscience, Walkersville, MD, USA). 293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% foetal calf serum and supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), penicillin (225 U/ml) and streptomycin (225 mg/ml) (Cambrex Bioscience, Walkersville, MD, USA). All cells were maintained at 37 C with 5% CO<sub>2</sub>.

Wild-type and mutant A/Moscow/10/99 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) recombinant viruses were produced by reverse genetics as described earlier (6,28). Briefly, the cDNA corresponding to the different genes of the wild-type and mutant viruses were cloned into the pHW2000 vector (28) allowing expression of both corresponding vRNAs and viral proteins. Plasmids were mixed with Superfect reagent (Qiagen) in Opti-MEM (GIBCO-BRL), according to the manufacturer's instructions and added to 293T cells in six-well tissue culture plates. At 48-h post-transfection, viruses in the culture supernatant were harvested and used to infect MDCK cells. After two passages on MDCK cells, titres were measured using standard methods (6).

In competition experiments, 1 mg of wild-type plasmid and 1 mg of the plasmid coding for segment 7 with the S71-R73 mutation were mixed with Superfect reagent (Qiagen) in Opti-MEM (GIBCO-BRL) and added to 293T cells. To define the rate of incorporation of the mutated vRNP into infectious viral particles, plaque purification in MDCK cells was carried out from the supernatant of the transfected cells. Plaque-purified viruses from two independent experiments were analysed by RT-PCR specific for the M segment and sequencing.

## RESULTS

The 8 vRNPs are interconnected in a transition zone located underneath the matrix layer at the budding tip of the influenza A viral particles

Electron microscopy and tomography previously revealed the typical '7+1' disposition of the influenza A vRNPs within viral particles (3-5,7) and showed that the vRNPs contact the matrix layer at the budding tip of the virions (3,7). In some images, pairs of vRNPs appeared to be locally in close proximity, but whether such contacts represented specific interactions with functional significance could not be determined (7). Here, we used electron tomography to visualize the internal organization of virions of the contemporary human influenza A/Moscow/10/99 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) virus budding from MDCK cells 24-h post-infection. Two large fields of view revealed 10 and 12 viral particles in which individual vRNPs were visible as dots (Figure 1A). Eight particles, named P1-P8, with a low background and distinguishable vRNPs were selected for detailed analysis (Figure 1B; Supplementary Figure S1 and Supplementary Movies S1A and S1B). As previously observed by electron microscopy (7), the number of dots gradually increases from the bottom to the top of the viral particles, up to a point where the eight individual vRNPs can be distinguished (Figure 1B, panels P1-1-P1-5 and P3-1-P3-5, and Supplementary Movies S1A and S1B). We also recorded a tomogram providing longitudinal views of a viral particle still attached to the cell from which it is budding (Figure 1C). These views show that the vRNPs contact the matrix layer at the budding tip of the virion, in agreement with previous electron microscopy data (7). In the cross sections, between the zone where the eight vRNPs are individually visible as round dots and the matrix layer, there is a 'transition zone' where the dots progressively become smaller and elongated. Density progressively becomes visible between these dots, which appear to be interconnected, often giving rise to a star-like structure (Figure 1B, panels P1-6-P1-8 and P3-6-P3-8, and Supplementary Figure S1). These data strongly suggest that vRNP/vRNP interactions take place in this transition zone.

We were able to obtain 3D rendering of the vRNP surface of particles P1-P4 (Figure 2; Supplementary Figure S2 and Supplementary Movies S2A and S2B). In the four particles, eight vRNPs of different length hang from a common platform that includes the 'transition zone' of the tomograms close to the top of the viral particles, below the matrix layer, where the vRNPs appear to be interconnected (Figure 2C). The density of the tomograms corresponding to the matrix layer, which is visible all around the viral particles has been omitted from the 3D surface rendering, but the density between the 'transition zone' and the matrix layer is continuous (Figure 2C). We systematically measured the thickness of the platform between adjacent outer vRNPs in P1, P2 and P3. The platform thickness varied from 5 nm between segments a and b of P2 to 23.1 nm between segments d and e in P1. The mean thickness of the platform was 13.3 ± 2 nm in P1, 13.8 ± 2.1 nm in P2



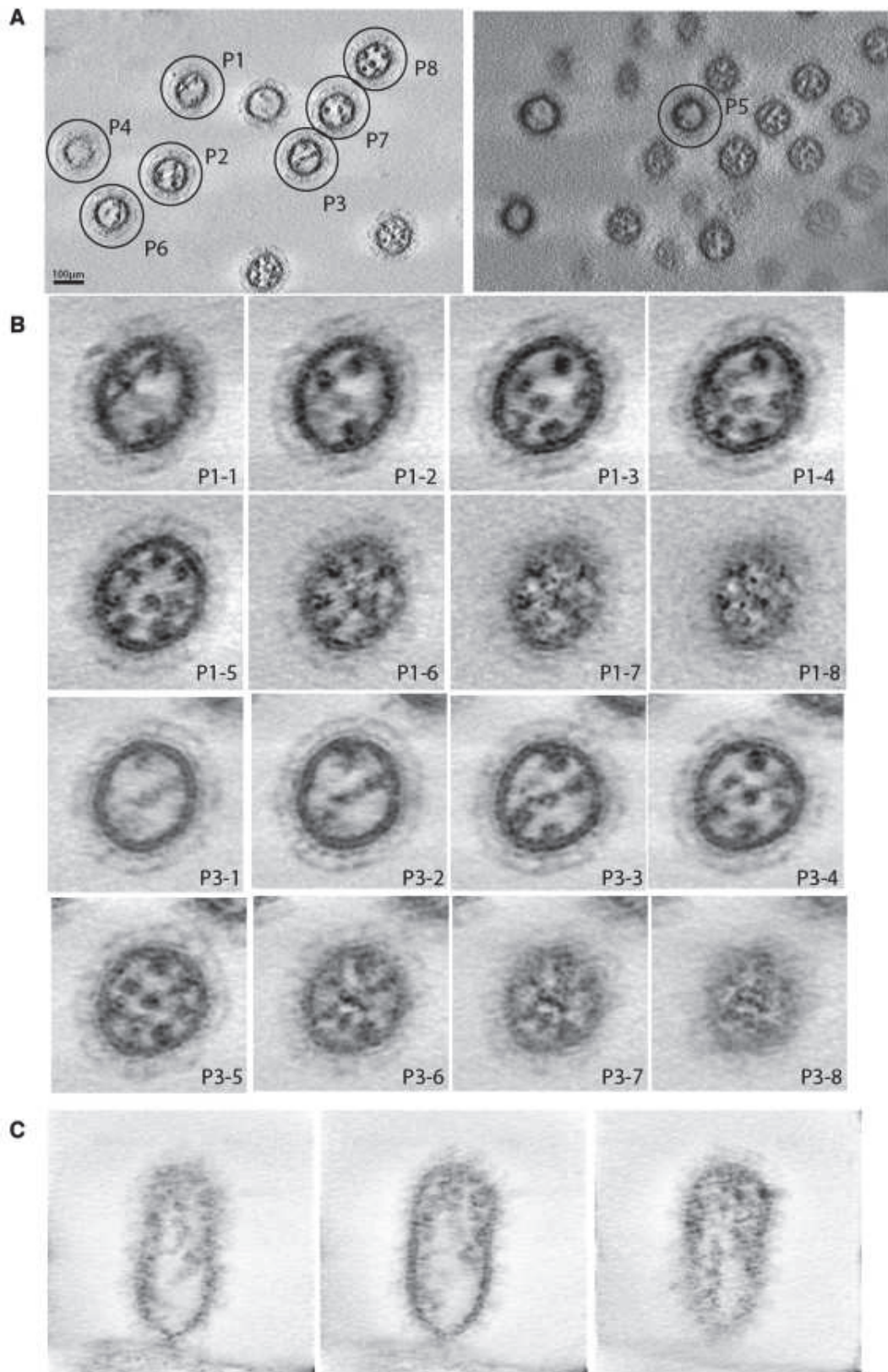


Figure 1. Electron tomography of budding H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> influenza A virions. (A) Two single fields of view indicating eight virions, named P1–P8, that have been selected for further analysis. (B) Transversal sections of viral particles P1 (Panels P1-1–P1-8) and P3 (Panels P3-1–P3-8). (C) Longitudinal sections of a viral particle attached to the cell from which it is budding.



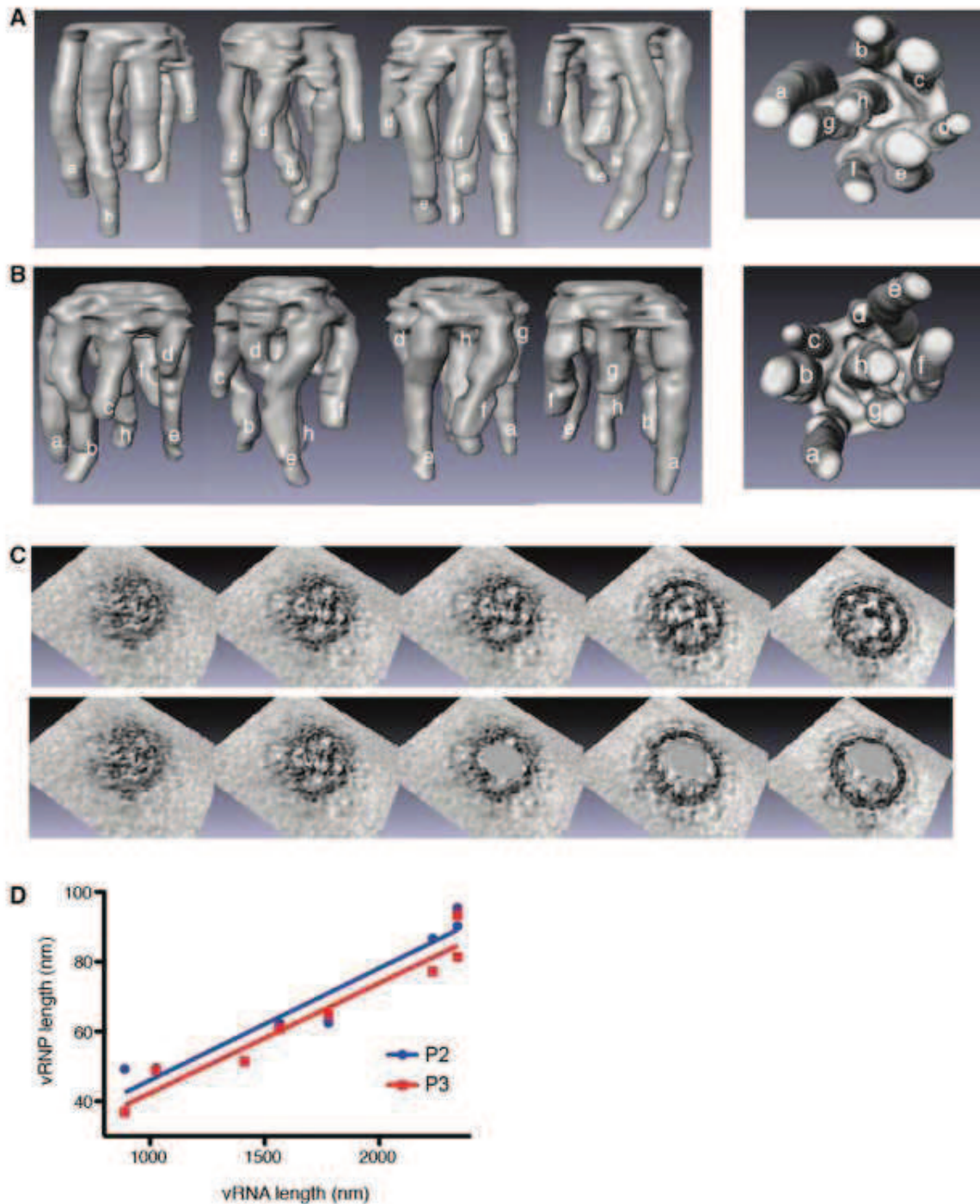


Figure 2. 3D surface rendering of the vRNPs in budding H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> influenza A virions. (A and B). Side and bottom views of the 3D surfaces of the interior of particles P2 (A) and P3 (B). vRNPs are labelled anticlockwise from a to g, starting with the two longest adjacent vRNPs, and h is the central vRNP. (C) Views of the top of P2 without (upper panel) or with superimposition of the 3D surfaces. (D) Correlation between the length of the vRNPs and the length of the vRNAs. The length of the vRNPs measured in the 3D-reconstructions of P2 (blue dots) and P3 (red squares) is plotted against the length of the vRNAs. The compaction factor of the vRNAs in the vRNP is calculated from the slope of the lines (slope =  $0.032 \pm 0.004$  for P2 and  $0.032 \pm 0.003$  for P3).

and  $17.5 \pm 0.8$  nm in P3. The platform of P4 was thicker (up to 30 nm), and this was likely the consequence of a lower signal over noise ratio for this particle. We thus omitted this particle when comparing the thickness

(averaged over P1, P2 and P3) of the platform between successive vRNPs: it ranged from  $9.9 \pm 1.9$  nm between segments f and g to  $20.0 \pm 1.6$  nm between segments d and e. Importantly, in general, no contact between

vRNPs was observed outside the platform. The only exception was observed in particle P3, in which the tip of vRNP d and the middle of vRNP e are in close proximity (Figure 1C and Supplementary Figure S2B). As this contact was not reproducibly observed, its significance, if any, is unclear.

Within the virions, vRNPs adopt the hairpin conformation previously observed at high resolution for an artificial mini-vRNP (8,9), and the 'transition zone' most likely contains the polymerase complex associated with the ends of each vRNA, as well as the terminal regions of these RNAs. To determine the compaction factor of the vRNPs in particles P2 and P3, we plotted the length of the vRNPs determined from the 3D-reconstructions as a function of the known length of the vRNAs (Figure 2D). The mean compaction value derived from the slope of the lines is 31–32 nt/nm. Taking this compaction factor into account, our data indicate that the platform of virions P1, P2 and P3 can incorporate a mean value of 206–271 nt, ranging from 153 nt between segments f and g to 310 nt between segments d and e.

In vitro, the packaging signals mediate interactions between the viral RNA segments

It has been proposed that the packaging signals might be involved in intermolecular base pairing (16). As identification of intermolecular interactions between vRNAs using virology approaches has not been successful yet, we tried to identify such interactions using an in vitro approach. We cloned the segments of the human influenza A/Moscow/10/99 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) virus under the control of a T7 promoter, and we co-transcribed all possible RNA pairs in vitro and analysed the RNA/RNA interactions by native gel electrophoresis (Figure 3 and Supplementary Figure S3). Even though some vRNAs formed low amounts of homodimers when transcribed alone, these complexes almost completely disappeared to the expense of intermolecular complexes in the co-transcription experiments. Each vRNA formed clearly visible complexes with at least one other RNA segment. In most cases, the band corresponding to the complex was easily identified owing to its migration relative to the monomeric and homodimeric bands and to the fact that it was only present

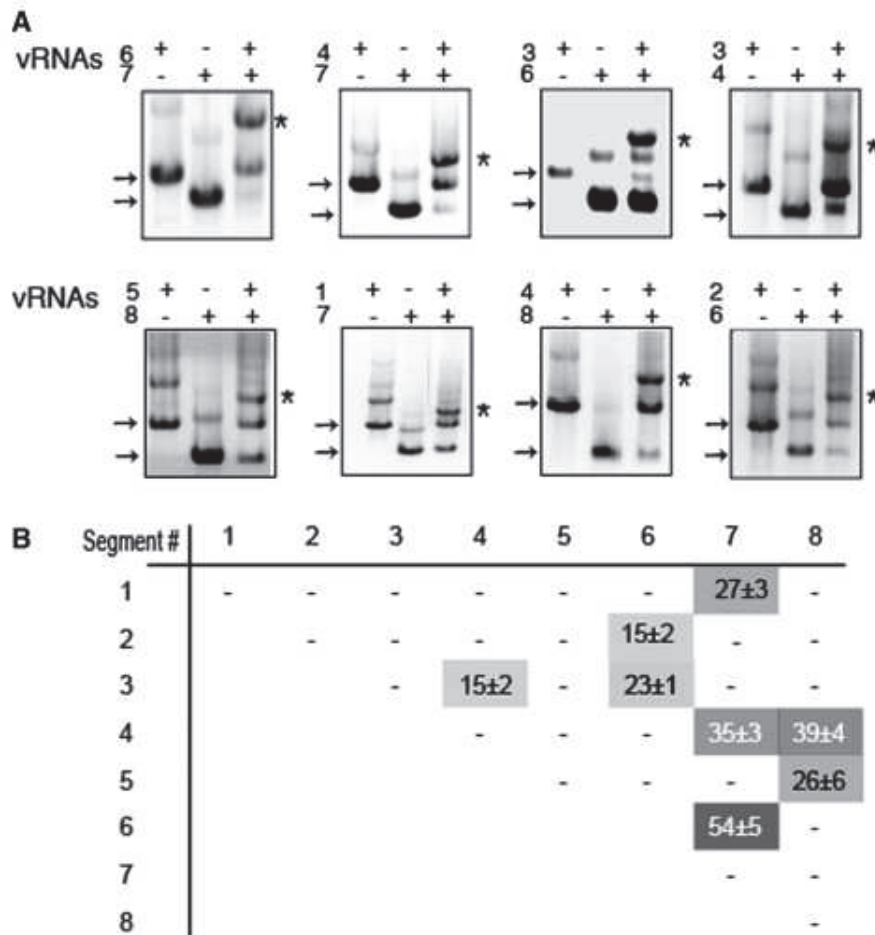


Figure 3. In vitro interactions between vRNAs. (A) Analysis of the RNA/RNA interactions by native agarose gel electrophoresis. Individual vRNAs are indicated by arrows and intermolecular complexes are marked by asterisks. (B) Quantification of the complexes. The weight fraction (%) of the RNA mass migrating as an intermolecular complex is expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3A19$ ).  $\Delta$ , <10% complex. The grey levels (on a 0–100 scale) directly correspond to the percentage of complex formed.

when two vRNAs were co-transcribed (Figure 3A). Only in the cases of vRNAs with similar lengths, were we unable to discriminate between the heterodimeric complex and homodimers (Supplementary Figure S3). However, in these cases, when both vRNAs were co-transcribed, the percentage of homo/heterodimer was lower than the added percentages of homodimers when each vRNA was transcribed individually, suggesting these vRNA pairs did not interact (Supplementary Figure S3). Out of 28 possible intermolecular interactions, 8 were reproducibly detected, while the remaining ones were weak or undetectable (Figure 3 and Supplementary Figure S3). Not all interactions have the same stability, as the RNA mass engaged in intermolecular complexes ranged from 15% to 54% (Figure 3). Noticeably, the eight strongest interactions are sufficient to interconnect all vRNA segments in a single interaction network.

To test whether this network might be relevant to the selective packaging of the vRNPs, we analysed the effect of deletions in the terminal regions of the vRNAs, where the segment-specific packaging signals are located (5, 15, 16, 19, 22, 23), on the three strongest interactions detected in our assay, namely the interactions between vRNAs 6 and 7, 4 and 8, and 4 and 7 (Figure 3B).

Deleting 100 nt in the 5' region of vRNA 6 reduced the interaction with vRNA 7 by 2.5-fold (Figure 4A and B). Similarly, this interaction was reduced 10-fold by a 100 nt deletion in the 5' region of vRNA 7 (Figure 4B). On the other hand, deletions in the 3' region of either vRNA 6 or vRNA 7 had no significant effect on the interaction between these vRNAs. Concerning the interaction between vRNAs 4 and 8, deleting 97 or 100 nt at the 5' end of the coding region of vRNA 4 or 8 reduced complex formation by 2- and 2.5-fold, respectively, whereas deletions at the 3' end of the coding regions of vRNA 4 or 8 did not impair this interaction (Figure 4A and C). A somewhat different picture was observed with the interaction between vRNAs 4 and 7 (Figure 4A and D). Deletions in the 3' and 5' regions of vRNA 7 both impacted this interaction, even though the deletion in the 3' region had a more dramatic effect (4-fold, versus a 35% reduction). On the contrary, deletions at the 3' or the 5' end of the coding region of vRNA 4 had no significant impact on this interaction. It is possible that the region(s) of vRNA 4 interacting with vRNA 7 is (are) located either in the UTRs or in a more central part of the coding region. However, we cannot exclude the existence of stable redundant interactions involving both terminal domains of the coding region of vRNA 4.

To corroborate the idea that packaging signals mediate interactions between vRNPs via direct vRNA-vRNA interaction, we next focused on vRNA 7 and its interaction with vRNA 6. The analysis of the RNA complexes formed *in vitro* described above did not allow the study of the intermolecular interactions taking place in the presence of NP: this protein inhibited *in vitro* transcription, and if using purified vRNAs, the vRNA/NP complexes could not be resolved on agarose gels due to aggregation (data not shown). We therefore developed an alternative protocol in which a modified vRNA 7 without or with a 100 nt deletion at the 5' end of the coding sequence was modified

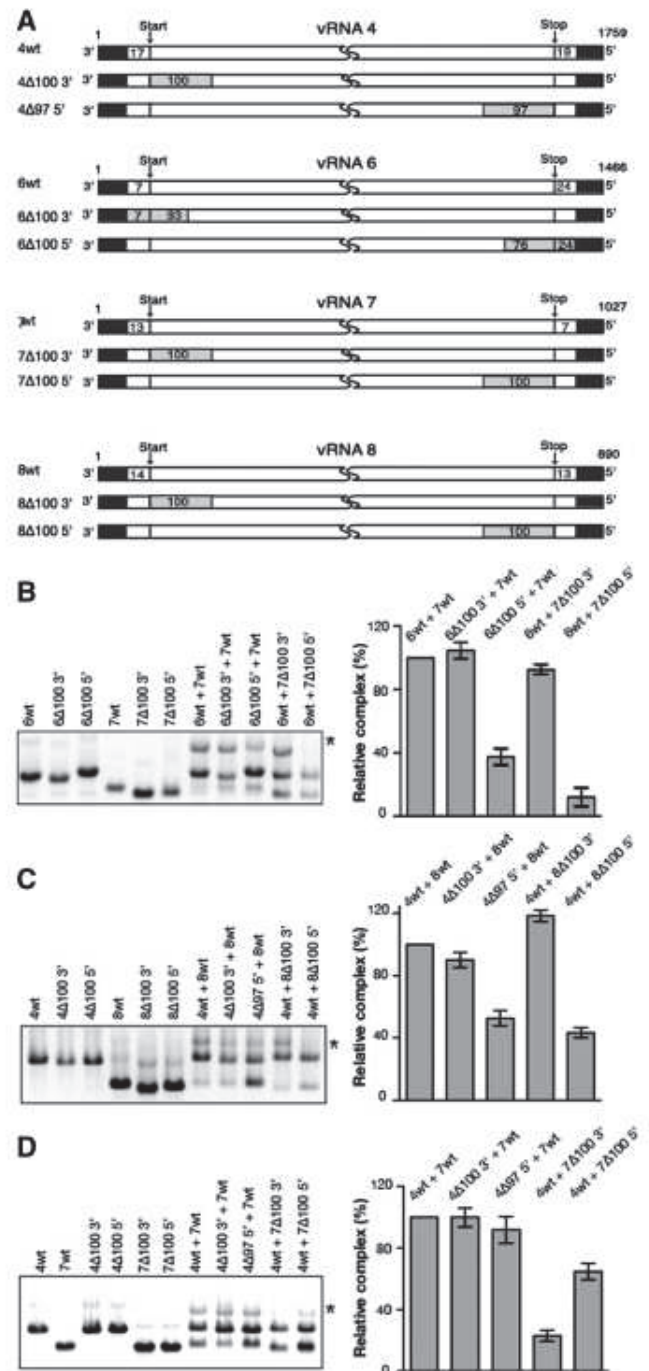


Figure 4. Effect of terminal deletions on the three strongest *in vitro* vRNA/vRNA interactions. (A) Schematic representation and nomenclature of the wild-type and mutant vRNAs. Deletions are represented by grey rectangles. Numbering of the genomic vRNAs is from 3' to 5' end. (B–D) Representative gels and quantifications are shown for interactions between wild-type or mutant vRNAs 6 and 7 (B), 4 and 8 (C) and 4 and 7 (D). Intermolecular complexes are marked by asterisks. The weight fraction (%) of the RNA mass migrating as an intermolecular complex was determined for each vRNA pair, and for each panel the intermolecular complex obtained with mutant vRNAs was normalized relative to the complex formed by the two wild-type vRNAs. Quantifications are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3 \times 10$ ).



to include a 3<sub>0</sub> overhang complementary to a biotinylated DNA oligonucleotide. Modified vRNA 7 and vRNA 6 were first transcribed and incubated separately with saturating amounts of NP. They were then incubated together, and the NP-covered vRNA 7 and vRNA 7/vRNA 6 complexes were retained on streptavidin-coated beads. Finally, vRNAs retained on the beads were detected by segment-specific RT-PCR. Even though some background binding of vRNA 7 and vRNA 7Δ100 5<sub>0</sub> to the beads was detected when the biotinylated DNA oligonucleotide was omitted, the PCR signal was stronger when it was included in the reaction mixture (Figure 5A). Binding of vRNA 6 to the beads was detected in the presence of vRNA 7, but not in its absence or in the presence vRNA 7Δ100 5<sub>0</sub> (Figure 5B) in agreement with the analysis by native gel electrophoresis (Figure 4B). Importantly, similar results were observed with 'naked' vRNAs and NP-covered RNAs (Figure 5), indicating that NP does not prevent the interaction between vRNPs 6 and 7 and that it does not affect its specificity.

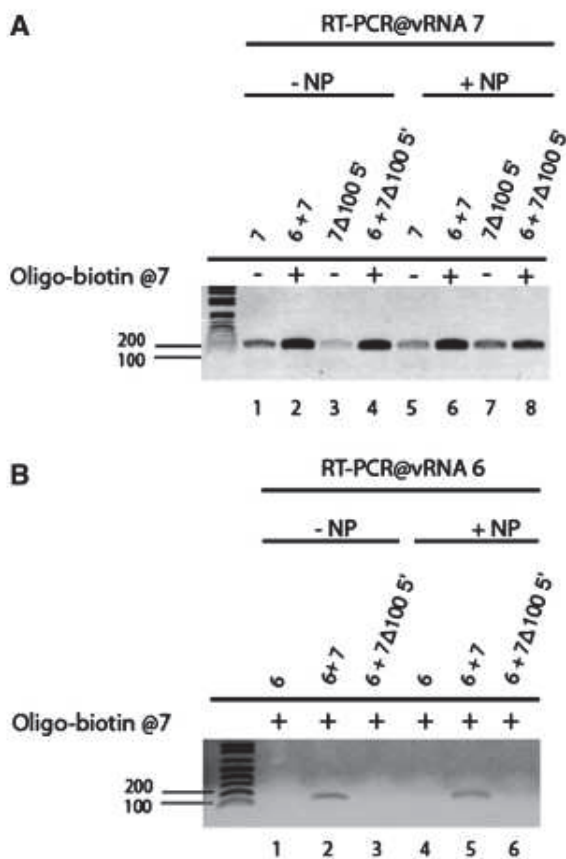


Figure 5. Interaction of wild-type vRNA 7 and vRNA 7Δ100 5<sub>0</sub> with vRNA 6 in the presence of NP. vRNA 7 without or with a 100 nt deletion at the 5<sub>0</sub>-end of the coding sequence was modified to include a 3<sub>0</sub> overhang complementary to a biotinylated DNA oligonucleotide. Modified vRNA 7 and vRNA 6 were first transcribed and incubated separately with saturating amounts of NP, then incubated together. The biotinylated DNA oligonucleotide was used to retain the complexes on magnetic beads, and segment-specific PCR was used to detect vRNA 7 (A) and vRNA 6 (B) retained on the beads in the absence (ΔNP) or in the presence of NP (+NP).

A short sequence of vRNA 7 interacts with vRNA 6 and modulates packaging of vRNA 7

Next, we used the native gel electrophoresis assay to map the region of vRNA 7 interacting with vRNA 6 more precisely by including a series of DNA oligonucleotides complementary to the former vRNA during *in vitro* transcription (Figure 6A). All oligonucleotides except M5 bound vRNA 7 to some degree under the conditions of *in vitro* transcription, suggesting that the M5 target sequence is involved in a stable intramolecular structure. Oligonucleotides M1–M7, which bind to the 3<sub>0</sub> region of vRNA 7, did not significantly inhibit the interaction with vRNA 6. One of them even increased complex formation (Figure 6A), suggesting that interactions might take place between the 5<sub>0</sub> and 3<sub>0</sub> regions of vRNA 7, and that binding of an oligonucleotide to the 3<sub>0</sub> region might facilitate intermolecular interactions involving the 5<sub>0</sub> region. Most oligonucleotides binding to the 5<sub>0</sub> region of vRNA 7 also had limited effects, except M8, which reduced formation of the vRNA 6/vRNA 7 complex by 4-fold (Figure 6A). M8 was hardly detected in the complex, further demonstrating that nucleotides 918–940 of vRNA 7 played a central role in the interaction with vRNA 6. Accordingly, deleting the corresponding sequence in vRNA 7 decreased complex formation by 4-fold (Figure 6B, mutant 7Δ918–940). Noticeably, this region encompasses the highly conserved codons S71 and R73 of protein M2 that affect influenza A/PR/8/34 virus growth, virion assembly and genome packaging (5). Importantly, when introduced in our *in vitro* system, mutations S71–R73 (i.e. substitution of nucleotides 924, 925, 926, 930 and 932) produced a 2-fold reduction of the complex formed between vRNAs 6 and 7 (Figure 6B). Thus, our results show that both codons S71 and R73 and the flanking nucleotides of segment 7 are important for the interaction with vRNA 6.

As the importance of codons S71 and R73 in genome packaging has only been demonstrated for a laboratory adapted strain of H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> influenza A virus (5), we introduced the same silent mutations in recombinant A/Moscow/10/99 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>), which is a strain that recently circulated in the human population. As compared to the wild-type virus, mutant H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> virus produced 5- to 10-fold less infectious virions (Figure 7A). We checked that S71–R73 mutations have no effect on vRNA synthesis or viral gene expression 8-h post-infection (data not shown). Expression of proteins M1 and M2 was analysed by Western blot using mouse monoclonal antibodies after infection at a m.o.i. of 4. To prove that they affect packaging of vRNA 7, we produced recombinant viruses from 293T cells transfected with equimolar amounts of the eight wild-type reverse genetics cDNA clones plus the reverse genetic cDNA clone of segment 7 containing the S71–R73 mutation (Figure 7B). This set-up allows competition between wild-type and mutant vRNA 7 for incorporation into viral particles. To determine the incorporation rate of the mutated segment 7 vRNPs into infectious viral particles, plaque purification was carried out from the supernatant of the transfected cells. A total of 72 randomly chosen plaque-purified viruses were analysed by

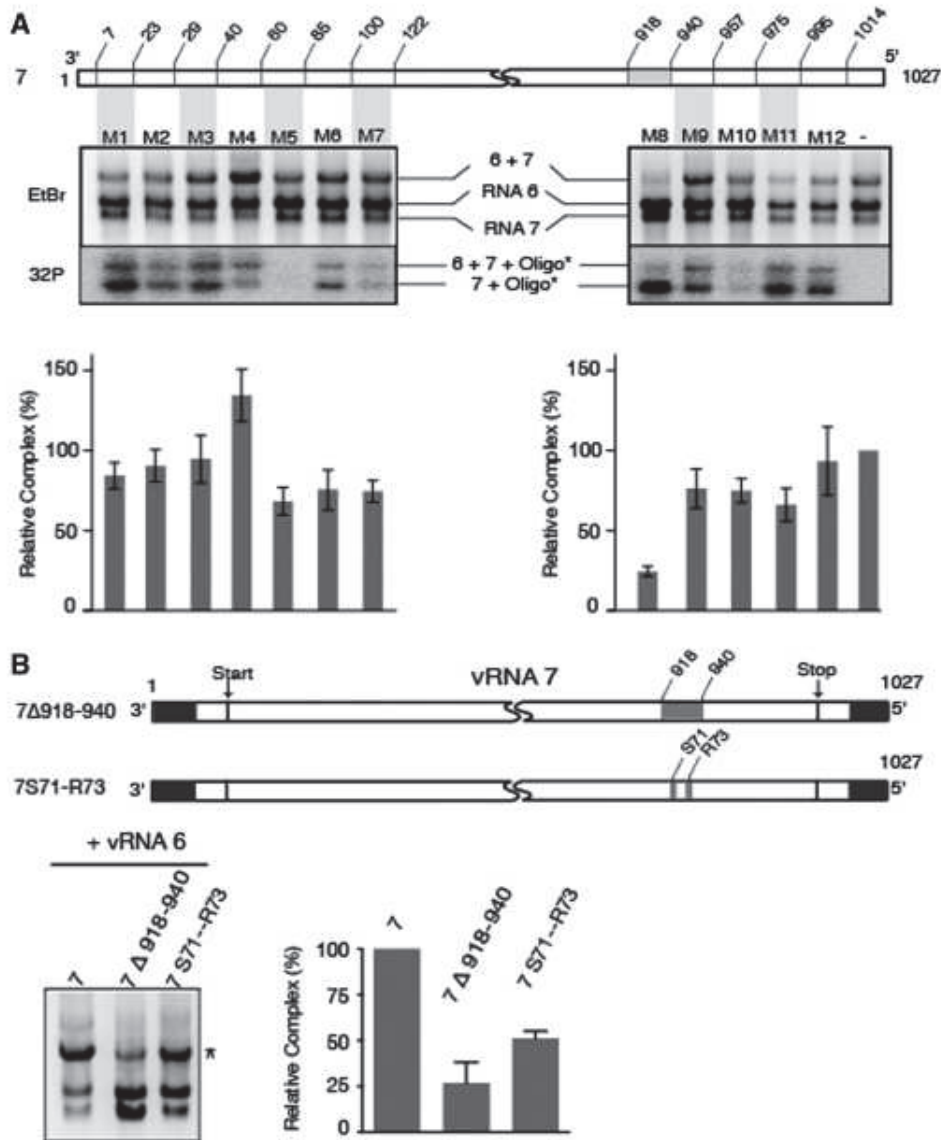


Figure 6. Precise mapping of a region of vRNA 7 interacting with vRNA 6. (A) A region interacting with vRNA 6 was identified using oligonucleotides complementary to the 3' and 5' regions of vRNA 7. A representative gel is shown. Ethidium bromide (EtBr) staining allowed quantification of the complex formed between vRNAs 6 and 7, while autoradiography of the <sup>32</sup>P radiolabelled oligonucleotides allowed to monitor binding of the DNA oligonucleotides to vRNA 7 during in vitro transcription. (B) A deletion or substitutions in the 918–940 region of vRNA 7 affect interaction with vRNA 6. Mutation S71–R73 correspond to substitution of nucleotides 924, 925 926, 930 and 932. In A and B, intermolecular complexes are marked by asterisks. Relative variations of the amount of complex were determined as in Figure 4 and are given as mean ± SEM (n = 3A7).

sequencing: all incorporated wild-type segment 7, demonstrating that codons S71 and R73 have a major impact on the selective incorporation of segment 7 (Figure 7B).

A model for the internal organization of human H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> influenza A virions

As our results suggest that the intermolecular vRNAs interactions we detected in vitro are relevant to vRNP packaging, we combined these data with our tomography data to analyse the relative disposition of vRNPs within

human H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> influenza virions (Figure 8). According to Figure 2D, it is possible to discriminate vRNAs 1, 2 and 3 from the other vRNAs, based on the length of the vRNPs, but not between them. Similarly, it is possible to discriminate vRNAs 4 and 5, on one hand, and vRNAs 6–8 (for P2) or 6 and 7 (for P3), on the other hand, from the other vRNAs. In all four 3D reconstructions, two of the three longest vRNPs are contiguous and were used as starting points for anticlockwise labelling of the vRNPs, while the third one is opposite to them (Figure 2; Supplementary Figure S2 and Supplementary Movies S1A, S1B, S2A and S2B). Even though there

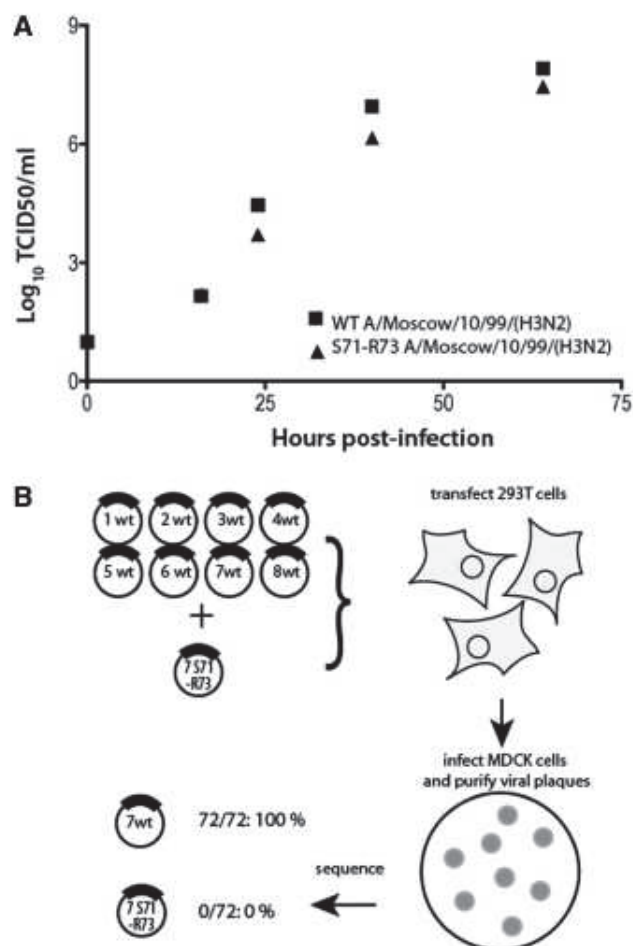


Figure 7. Effect of silent mutations S71 and R73 on viral replication and on incorporation of vRNA 7. (A) MDCK cells were infected at a m.o.i. of 10<sup>4</sup> with wild-type recombinant A/Moscow/10/99 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) virus or a virus bearing silent mutations at M2 codons 71 and 73. The release of viral progeny into the supernatant was monitored by determining the tissue culture infective dose (TCID<sub>50</sub>). Points correspond to the mean of two experiments; the data ranges are smaller than the symbol size. (B) Strategy and output of the competition experiment.

is little difference between the length of the fourth and fifth vRNPs, the fourth one was always the central one, strongly suggesting that vRNP h contains vRNA 4 (Figure 1B, panels P1-1, P1-2 and P3-2; Figure 2A–D; Supplementary Figure S2 and Supplementary Movies S1A, S1B, S2A and S2B). The central location of vRNA 4 fits with the observation that this vRNA interacts with three different partners in vitro, whereas vRNA 5 has only one partner (Figures 3, 8B and D). This in turn allows identification of vRNA 5 in the 3D reconstructions of P2 and P3. In P3, vRNA 8 can be identified as the shortest vRNP (Figures 2B, C and 8C), and it is located next to vRNA 5 in agreement with the in vitro interaction data (Figures 3 and 8D). Noticeably, the tomography data indicate that all influenza A H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> virions do not share the same internal organization, as vRNA 5 has different locations in P2 and P3 (Figure 8A and C). Note that the interaction network defines a block of four external vRNPs

comprising vRNAs 1, 7, 6 and 2 or 3, but that the orientation of this block can be deduced neither from tomography nor from the in vitro interaction network. Nevertheless, by combining the tomography data with the in vitro interaction network, and assuming that, in virions, interactions preferentially take place between close neighbours, the number of possible arrangements of the vRNPs in P2 and P3 is reduced from 5 760 to 4 (Figure 8C and D). As there are two vRNAs that are each involved in three intermolecular interactions while not interacting together (vRNAs 4 and 6), there will always be at least one interaction linking non-adjacent vRNAs, and we selected arrangements with exactly one such interaction (Figure 8C and D). Measuring the length of the vRNPs in P4 was difficult, as their upper end could not always be identified precisely. However, our data suggest that the internal organization of the vRNAs in P1 and P4 is similar to P3.

## DISCUSSION

Increasing evidence supports the notion that the eight vRNAs constituting the influenza A genome are specifically packaged into virions, but despite numerous efforts, the molecular mechanism underlying this process remains largely unknown (10). Some virology data (5,19,23,29) suggested the existence of a 'viral genome complex' that might involve direct or indirect interactions between vRNAs, but no direct evidence was provided.

Our electron tomography data (Figures 1 and 2; Supplementary Figures S1 and S2 and Supplementary Movies S1A, S1B, S2A and S2B) revealed that in budding viral particles, there is a transition zone between the matrix layer at the budding tip of the virions and the region where the eight vRNPs adopt the classical '7+1' arrangement. In this zone, which appears as a platform in the 3D surface rendering, the dots corresponding to the vRNPs progressively become elongated and interconnected in a star-like structure. The common platform from which the 8 vRNPs emerge can accommodate a mean value of 206–271 nt, ranging from 153 nt between segments f and g to 310 nt between segments d and e. Thus, the platform is thick enough to accommodate all previously defined packaging signals, which are usually located within 100 nt or less of the vRNA ends (14–23) (Figure 2). In most particles, no close contact between vRNPs was observed outside this platform, suggesting that specific interactions between vRNPs, which are a prerequisite for specific packaging, take place within the platform. This idea is supported by the connections observed between the vRNPs in the transition zone of the tomograms. We suggest that the supramolecular complex depicted in Figure 2, Supplementary Figure S1 and Supplementary Movies S2A and S2B is a key intermediate in the selective packaging of influenza A vRNPs. Several groups reported that the typical '7+1' arrangement of the vRNPs is more frequently observed in budding virions than in purified viral particles (4,7). In keeping with these observations, we have been unable to obtain a clear view of the interior of purified viruses,

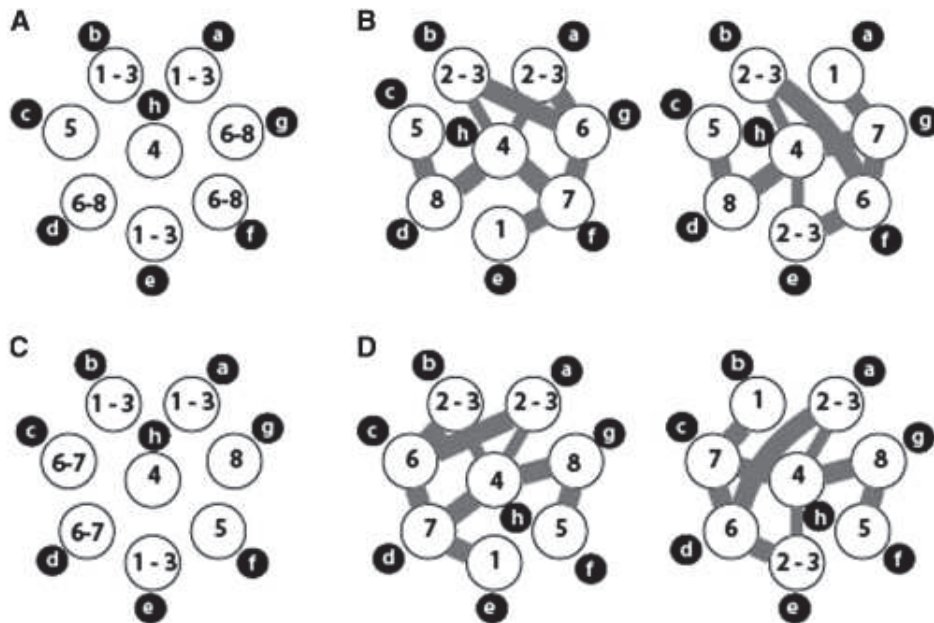


Figure 8. Possible arrangements of the vRNPs within budding H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> influenza A virions. Top views of the possible arrangements of the vRNPs in P2 (A and B) and P3 (C and D) based on tomography data alone (a and c) or incorporating the in vitro interaction data (B and D). The intermolecular RNA interactions identified in vitro are indicated by thick grey line. The two thin lines correspond to the interaction between vRNAs 3 and 4 and are mutually exclusive, depending on the actual location of vRNAs 2 and 3.

suggesting that the vRNP complex might disorganize or dissociate after budding.

Comparison of four individual viral particles showed that while distribution of the four longest vRNPs seems to be conserved amongst virions, the disposition of the shorter vRNPs is not absolutely conserved (Figures 2 and 8). The limited variability existing in the relative disposition of vRNPs between virions does not contradict the existence of segment-specific intermolecular interactions, but implies some flexibility of the vRNPs.

Selective packaging of the eight vRNAs in influenza A virions require a minimum of seven intersegment interactions. In principle, these interactions could be mediated by direct base pairing between the vRNAs, or by RNA binding proteins. As not a single cellular or viral protein able to selectively recognize a packaging signal of influenza A virus vRNAs has been identified to date (10), direct RNA interactions are our favourite hypothesis. A similar, albeit more simple, example is found in retroviruses, which package their genome as RNA homodimers (30). Here, we tested the existence of intermolecular vRNA interactions in vitro, following an approach that allowed the identification of the dimer linkage sequences of many retroviral RNAs (30,31).

In vitro, each vRNA establishes at least one intermolecular interaction and the eight vRNAs are involved in a single interaction network (Figure 3). Currently, we cannot ascertain that all interactions observed in vitro take place in vivo, and that, conversely, all inter-vRNA interactions potentially taking place in vivo can be observed in our system. We analysed the interactions at 37 °C in a buffer containing 90 mM monovalent cations,

15 mM Mg<sup>2+</sup> and 1 mM spermidine. Under the in vitro transcription conditions, 56 mM Mg<sup>2+</sup> ions are bound to the NTPs. Hence, the ionic and temperature conditions of our assay do not dramatically differ from those supposed to prevail in vivo. Moreover, the fact that the regions involved in the three strongest inter-vRNAs interactions in vitro correspond to known packaging regions (Figure 4), even when they could be narrowed down to a few nucleotides (Figure 6), strongly argues in favour of the relevance of our findings for the segment-specific mechanism of incorporation of the vRNPs in influenza A virions.

Surprisingly, two of the interactions we analysed involve vRNA pairs that have a globally parallel orientation (they involve the 5' region of both vRNAs). This does not preclude that locally the two vRNAs might adopt an anti-parallel orientation and interact via classical base pairing (Supplementary Figure S4). An analogous situation exists in retroviruses. EM pictures revealed a globally parallel orientation of the two copies of genomic RNA molecules, and such an orientation likely exists in virions to allow efficiency recombination. However, it is now known that this globally parallel orientation is maintained by locally anti-parallel interactions (30,31).

In the case of vRNA 7, we showed that a limited set of nucleotides (mutations S71–R73) is important for interaction with vRNA 6 (Figure 6). Mutations S71–R73 reduced replication of our contemporary H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> circulating strain by 5- to 10-fold (Figure 7A), in agreement with previous results obtained with a H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> laboratory strain (5). In addition, our competition experiment indicated



that this mutation has a strong negative impact on the selective incorporation of vRNA7 (Figure 7B).

Globally, terminal deletions revealed that regions containing the previously identified packaging signals play a crucial role in the vRNA/vRNA interactions we detected in vitro. Interestingly, the 5' and 3' regions of vRNA 7 are involved in interactions with different vRNA partners, an observation that fits with the fact that both terminal regions of the coding sequences are required for optimal packaging of the influenza A vRNAs (14,16,17,19–23). Note that none of the mutations that reduced intermolecular RNA interactions abolished them completely, suggesting a certain level of redundancy. Similarly, most deletions have rather limited effects on vRNA packaging (14–21).

A technical limitation of the in vitro analysis resides in the analysis of the RNA interactions in the presence of NP. Our data obtained using this protein shows that it does not affect the specificity of the interaction between vRNAs 6 and 7 (Figure 5). Unfortunately, unspecific binding of some vRNAs to the magnetic beads hindered generalization of this assay (Figure 5 and data not shown). Crystal structures of NP suggested that RNA binds at the surface of the protein oligomers (27,32), and chemical probing indicated that NP increases the accessibility of the vRNA bases (33). Thus, NP might facilitate intermolecular interactions between vRNAs, rather than prevent them. The presence of stable intramolecular RNA structures within vRNPs is unclear. A previous study with purified vRNP 8 indicated that the 5' region of this vRNA is accessible to single-strand specific probes, except for the terminal promoter (34). However, vRNPs are susceptible to RNase V1, a clear indication of the existence of base paired regions (35).

Our in vitro approach opens up the possibility to identify the intermolecular interactions between influenza A vRNAs at the nucleotide level. This would in turn allow testing of the functional role of these interactions by introducing point mutations in the interacting sequences. This work is in progress in our laboratory but is complicated by several factors. First, the bioinformatics approach is of limited use as the number of possible interactions is huge, even when deletion mutants have identified the region of the vRNAs that are involved. Second, the oligonucleotide mapping strategy we used to identify a short region of vRNA 7 interacting with vRNA 6 does not always work because some oligonucleotides do not anneal to their target in the condition of the in vitro assay. Third, as discussed above, some interactions seem to be at least partially redundant, masking the effects of deletions.

Our combined structural and biochemical approaches strongly favour a model in which the eight genomic vRNAs are selected and packaged as an organized supra-molecular complex held together by base pairing between previously identified packaging regions. As packaging of orthologous vRNAs is a prerequisite for genetic reassortment of influenza viruses, our findings also suggest that interactions between heterologous vRNAs is crucial for this process (36). Conservation of the sequences involved in the inter-vRNA interactions is likely to be a key factor in the emergence of reassortant viruses, which can generate pandemic viruses.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR online: Supplementary Figure 1–4; Supplementary Movies 1A, 1B, 2A and 2B.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Redmond Smyth for critical reading of the manuscript.

## FUNDING

Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) (fellowships to E.F.); Fondation de la

Recherche Medicale (FRM) (fellowships to E.F.) and SANOFI-PASTEUR France (to E.F., partial). Funding for open access charge: CNRS.

Conflict of interest statement. None declared.

## REFERENCES

- Horimoto, T. and Kawaoka, Y. (2005) Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**, 591–600.
- Palese, P. and Shaw, M. (2006) Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In: Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds), *Fields Virology*. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 1647–1689.
- Calder, L.J., Wasilewski, S., Berriman, J.A. and Rosenthal, P.B. (2010) Structural organization of a filamentous influenza A virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **107**, 10685–10690.
- Harris, A., Cardone, G., Winkler, D.C., Heymann, J.B., Brecher, M., White, J.M. and Steven, A.C. (2006) Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 19123–19127.
- Hutchinson, E.C., Curran, M.D., Read, E.K., Gog, J.R. and Digard, P. (2008) Mutational analysis of cis-acting RNA signals in segment 7 of influenza A virus. *J. Virol.*, **82**, 11869–11879.
- Moules, V., Ferraris, O., Terrier, O., Giudice, E., Yver, M., Rolland, J., Bouscambert-Duchamp, M., Bergeron, C., Ottmann, M., Fournier, E. et al. (2010) In vitro characterization of naturally occurring influenza H3NA-viruses lacking the NA gene segment: toward a new mechanism of resistance. *Virology*, **404**, 215–224.
- Noda, T., Sagara, H., Yen, A., Takada, A., Kida, H., Cheng, R.H. and Kawaoka, Y. (2006) Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature*, **439**, 490–492.
- Coloma, R., Valpuesta, J.M., Arranz, R., Carrascosa, J.L., Ortin, J. and Martin-Benito, J. (2009) The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. *PLoS Pathog.*, **5**, e1000491.
- Hsu, M.T., Parvin, J.D., Gupta, S., Krystal, M. and Palese, P. (1987) Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **84**, 8140–8144.
- Hutchinson, E.C., von Kirchbach, J.C., Gog, J.R. and Digard, P. (2010) Genome packaging in influenza A virus. *J. Gen. Virol.*, **91**, 313–328.
- Laver, W.G. and Downie, J.C. (1976) Influenza virus recombination: I. Matrix protein markers and segregation during mixed infections. *Virology*, **70**, 105–117.
- Lubeck, M., Palese, P. and Schulman, J. (1979) Nonrandom association of parental genes in influenza A virus recombinants. *Virology*, **95**, 269–274.
- Nakajima, K. and Sugiura, A. (1977) Three-factor cross of influenza virus. *Virology*, **81**, 486–489.
- Fujii, K., Fujii, Y., Noda, T., Muramoto, Y., Watanabe, T., Takada, A., Goto, H., Horimoto, T. and Kawaoka, Y. (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.
15. Fujii, K., Ozawa, M., Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T. and Kawaoka, Y. (2009) Incorporation of influenza A virus genome segments does not absolutely require wild-type sequences. *J. Gen. Virol.*, 90, 1734–1740.
  16. Fujii, Y., Goto, H., Watanabe, T., Yoshida, T. and Kawaoka, Y. (2003) Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 100, 2002–2007.
  17. Liang, Y., Hong, Y. and Parslow, T.G. (2005) cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments. *J. Virol.*, 79, 10348–10355.
  18. Liang, Y., Huang, T., Ly, H., Parslow, T.G. and Liang, Y. (2008) Mutational analyses of packaging signals in influenza virus PA, PB1, and PB2 genomic RNA segments. *J. Virol.*, 82, 229–236.
  19. Marsh, G.A., Hatami, R. and Palese, P. (2007) Specific residues of the influenza A virus hemagglutinin viral RNA are important for efficient packaging into budding virions. *J. Virol.*, 81, 9727–9736.
  20. Muramoto, Y., Takada, A., Fujii, K., Noda, T., Iwatsuki-Horimoto, K., Watanabe, S., Horimoto, T., Kida, H. and Kawaoka, Y. (2006) Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J. Virol.*, 80, 2318–2325.
  21. Ozawa, M., Maeda, J., Iwatsuki-Horimoto, K., Watanabe, S., Goto, H., Horimoto, T. and Kawaoka, Y. (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.
  22. Gog, J.R., Afonso, E.D.S., Dalton, R.M., Leclercq, I., Tiley, L., Elton, D., von Kirchbach, J.C., Naffakh, N., Escriou, N. and Digard, P. (2007) Codon conservation in the influenza A virus genome defines RNA packaging signals. *Nucleic Acids Res.*, 35, 1897–1907.
  23. Marsh, G.A., Rabadan, R., Levine, A.J. and Palese, P. (2008) Highly conserved regions of influenza A virus polymerase gene segments are critical for efficient viral RNA packaging. *J. Virol.*, 82, 2295–2304.
  24. Kremer, J.R., Mastrorade, D.N. and McIntosh, J.R. (1996) Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J. Struct. Biol.*, 116, 71–76.
  25. van der Heide, P., Xu, X.P., Marsh, B.J., Hanein, D. and Volkman, N. (2007) Efficient automatic noise reduction of electron tomographic reconstructions based on iterative median filtering. *J. Struct. Biol.*, 158, 196–204.
  26. Sinck, L., Richer, D., Howard, J., Alexander, M., Purcell, D.F., Marquet, R. and Paillart, J.C. (2007) In vitro dimerization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) spliced RNAs. *RNA*, 13, 2141–2150.
  27. Ye, Q., Krug, R.M. and Tao, Y.J. (2006) The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature*, 444, 1078–1082.
  28. Hoffmann, E., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hobom, G. and Webster, R.G. (2000) A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 97, 6108–6113.
  29. Hutchinson, E.C., Wise, H.M., Kudryavtseva, K., Curran, M.D. and Digard, P. (2009) Characterisation of influenza A viruses with mutations in segment 5 packaging signals. *Vaccine*, 27, 6270–6275.
  30. Paillart, J.-C., Shehu-Xhilaga, M., Marquet, R. and Mak, J. (2004) Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2, 461–472.
  31. Skripkin, E., Paillart, J.C., Marquet, R., Ehresmann, B. and Ehresmann, C. (1994) Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization in vitro. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 91, 4945–4949.
  32. Ng, A.K.-L., Zhang, H., Tan, K., Li, Z., Liu, J.-h., Chan, P.K.-S., Li, S.-M., Chan, W.-Y., Au, S.W.-N., Joachimiak, A. et al. (2008) Structure of the influenza virus A H5N1 nucleoprotein: implications for RNA binding, oligomerization, and vaccine design. *FASEB J.*, 22, 3638–3647.
  33. Baudin, F., Bach, C., Cusack, S. and Ruigrok, R.W. (1994) Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *EMBO J.*, 13, 3158–3165.
  34. Klumpp, K., Ruigrok, R.W. and Baudin, F. (1997) Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a highly functional RNP structure. *EMBO J.*, 16, 1248–1257.
  35. Yamanaka, K., Ishihama, A. and Nagata, K. (1990) Reconstitution of influenza virus RNA-nucleoprotein complexes structurally resembling native viral ribonucleoprotein cores. *J. Biol. Chem.*, 265, 11151–11155.
  36. Neumann, G., Noda, T. and Kawaoka, Y. (2009) Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, 459, 931–939.

## **2. Annexe 2: Publication 2**

### **Incorporation of avian HA gene segment in human influenza genetic background**

**Boris ESSERE**<sup>1</sup>, Matthieu YVER<sup>1</sup>, Emilie FOURNIER<sup>2</sup>, Fabienne GIROUX<sup>1</sup>, Yi PU LIN<sup>3</sup>, HAY Alan<sup>3</sup>, Manuel ROSA-CALATRAVA<sup>1</sup>, Roland MARQUET<sup>2</sup>, John SKEHEL<sup>3</sup>, Bruno LINA<sup>1</sup>, and Vincent MOULES<sup>1\*</sup>

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

*2. UPR9002 du CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue René Descartes, Strasbourg 67084 cedex, France*

*3. Virology department. National Institute for Medical Research, The Ridgeway, NW1 London, United Kingdom*

*4. Laboratoire de Virologie, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, 59, Boulevard Pinel, 69677 Bron cedex, France*

*\* Corresponding author*

(En préparation)

### **3. Annexe 3: Publication 3**

## **Cold oxygen plasma technology efficiency against different airborne respiratory viruses**

O. Terrier<sup>a,b,c</sup>, B. Essere<sup>a,b,c</sup>, M. Yver<sup>a,b,c</sup>, M. Barthélémy<sup>a,b,c</sup>, M. Bouscambert-Duchamp<sup>a,b,c,d</sup>, P. Kurtz<sup>e</sup>, D. VanMechelen<sup>e</sup>, F. Morfin<sup>a,b,c,d</sup>, G. Billaud<sup>a,b,c,d</sup>, O. Ferraris<sup>a,b,c</sup>, B. Lina<sup>a,b,c,d</sup>, M. Rosa-Calatrava<sup>a,b,c</sup>, V. Moules<sup>a,b,c</sup>

*a Université de Lyon, F-69000 Lyon, France*

*b Université Lyon 1, Faculté de médecine RTH Laennec, France*

*c CNRS FRE 3011 VirPath, Virologie et Pathologie Humaine, F-69008 Lyon, France*

*d Laboratoire de virologie, centre de Biologie et de Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, 59 boulevard Pinel, 69677 Bron cedex, Lyon, France*

*e Biozone Europe, 1 rue notre dame, F-59300 Valenciennes, France*

Publié



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jcv](http://www.elsevier.com/locate/jcv)



## Cold oxygen plasma technology efficiency against different airborne respiratory viruses

O. Terrier <sup>a,b,c</sup>, B. Essere <sup>a,b,c</sup>, M. Yver <sup>a,b,c</sup>, M. Barthélémy <sup>a,b,c</sup>, M. Bouscambert-Duchamp <sup>a,b,c,d</sup>,  
P. Kurtz <sup>e</sup>, D. VanMechelen <sup>e</sup>, F. Morfin <sup>a,b,c,d</sup>, G. Billaud <sup>a,b,c,d</sup>, O. Ferraris <sup>a,b,c</sup>,  
B. Lina <sup>a,b,c,d</sup>, M. Rosa-Calatrava <sup>a,b,c</sup>, V. Moules <sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Lyon, F-69000 Lyon, France

<sup>b</sup> Université Lyon 1, Faculté de médecine RTH Laennec, France

<sup>c</sup> CNRS FRE 3011 VirPath, Virologie et Pathologie Humaine, F-69008 Lyon, France

<sup>d</sup> Laboratoire de virologie, centre de Biologie et de Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, 59 boulevard Pinel, 69677 Bron cedex, Lyon, France

<sup>e</sup> Biozone Europe, 1 rue notre dame, F-59300 Valenciennes, France

article

info

abstract

### Article history:

Received 16 December 2008

Received in revised form 24 March 2009

Accepted 25 March 2009

### Keywords:

Influenza

Parainfluenza

Respiratory syncytial virus

Airborne transmission

Cold plasma

Germicidal ultraviolet light

**Background:** Respiratory infections caused by viruses are major causes of upper and lower respiratory tract infections. They account for an important mortality and morbidity worldwide. Amongst these viruses, influenza viruses and paramyxoviruses are major pathogens. Their transmission is mainly airborne, by direct transmission through droplets from infected cases.

**Objectives:** In the context of an influenza pandemic, as well as for the reduction of nosocomial infections, systems that can reduce or control virus transmission will reduce the burden of this disease. It may also be part of the strategy for pandemic mitigation.

**Study design:** A new system based on physical decontamination of surface and air has been developed. This process generates cold oxygen plasma (COP) by subjecting air to high-energy deep-UV light. To test its efficiency, we have developed an experimental device to assess for the decontamination of nebulized respiratory viruses. High titer suspensions of influenza virus type A, human parainfluenza virus type 3 and RSV have been tested.

**Results:** Different experimental conditions have been evaluated against these viruses. The use of COP with an internal device allowed the best results against all viruses tested. We recorded a reduction of 6.5, 3.8 and 4 log(10) TCID<sub>50</sub>/mL of the titre of the hPIV-3, RSV and influenza virus A (H5N2) suspensions.

**Conclusions:** The COP technology is an efficient and innovative strategy to control airborne virus dissemination. It could successfully control nosocomial diffusion of respiratory viruses in hospital setting, and could be useful for the reduction of influenza transmission in the various consultation settings implemented for the management of cases during a pandemic.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Background

Respiratory syncytial virus (RSV) and human parainfluenza virus type 3 (hPIV-3) infections are two leading causes of lower respiratory illness (LRI) in young children and also in elderly.<sup>1,2</sup> These infections are associated to high morbidity. Global annual mortality worldwide for RSV, for example, is estimated to be 160,000 and many efforts are actually done in order to develop vaccines and antiviral drugs against these viruses.<sup>3,4</sup> Influenza virus is one of the most important viruses responsible for upper

respiratory tract infection regarding morbidity and mortality. Prevention and treatment of influenza viruses rely on inactivated vaccines and antiviral drugs. The prospect of future influenza pandemics, potentially caused by avian influenza has raised the question of pandemics preparedness.<sup>5,6</sup>

Airborne transmission, either direct or secondary, has been postulated to be involved in the dissemination and spread of several microorganisms.<sup>7</sup> Several reports have shown that fine particle aerosols may play a role in respiratory virus infection. It is now well established for influenza virus, but it may not be the primary way of spreading for RSV and hPIV-3.<sup>7,8</sup> To protect human population, several air disinfection systems have been developed, based on different technologies. Classic approaches consist in air filtration,<sup>9</sup> ionization,<sup>10</sup> and ultraviolet irradiation.<sup>11</sup> Other recent approaches implicate air ox-

\* Corresponding author at: Université Lyon 1, F-69000 Lyon, France.  
Tel.: +33 4 78 77 10 36; fax: +33 4 78 77 87 51.  
E-mail address: [Vincent.moules@recherche.univ-lyon1.fr](mailto:Vincent.moules@recherche.univ-lyon1.fr) (V. Moules).

ation by photocatalytic process,<sup>12,13</sup> ozone<sup>14</sup> or plasma-based disinfection.

Gas plasmas can be considered as the fourth state of matter, following by order of increasing energy, the solid, liquid and gaseous states. Man-made cold gas plasmas are usually produced by subjecting a gas to an electric field. Gas plasmas are composed of ions, electrons, uncharged particles such as atoms, molecules (e.g. O<sub>3</sub>) and radicals (OH<sup>-</sup>, NO<sup>-</sup>, etc.).<sup>15</sup> These ions and uncharged particles can be in an excited state and can become to a normal state by emitting a photon or through collisions with a surface for example. These events can induce chemical reactions such as oxidations and lipid/protein peroxidations.<sup>15</sup> The possibility to use plasma-sterilizing properties was first introduced in the end of 60s and first works with a plasma made with oxygen were proposed in 1989. Nelson and Berger<sup>16</sup> have shown that O<sub>2</sub> plasma could be a very efficient biocidal tool against bacteria. More recently, Biozone scientific firm has developed a new process for the generation of a cold oxygen plasma (COP) by subjecting air by high-energy deep-UV light with a effective radiation spectrum between 180 nm and 270 nm. This cold gas plasma is composed of several species like negative and positive ions, free radical molecules, electron, UV-photons and ozone. The ozone production is controlled and maintained to a maximum level of 0.04 ppmv (parts per million by volume). This technology is dedicated to be used in human environment for the decontamination of both surface and air.

## 2. Objectives

To our knowledge, no attempts have been made to evaluate the efficiency of cold oxygen plasma against virus and more precisely airborne respiratory viruses. To address this issue we have set up an experimental device in the purpose of testing the efficiency of Biozone technology COP against nebulized preparation of three respiratory viruses of significant clinical importance: RSV, hPIV-3 and A (H5N2) influenza viruses.

## 3. Study design

### 3.1. Cells and viruses

LLC-MK2 cells (Monkey kidney cells) were obtained from American type culture collection (ATCC reference CCL-7) and were grown in Eagle's minimal essential medium (EMEM) with 5% foetal calf

serum. MDCK (Madin-Darby canine kidney cells) were obtained from American type culture collection (ATCC reference CCL-34) and were grown in ultra MDCK medium (Lonza-Biowhittaker). RSV-A Long strain and hPIV-3 C-243 strain were obtained from the ATCC (respectively ATCC VR-26 and ATCC VR-93). Since the influenza A (H5N1) virus is strongly pathogenic, the study was performed with the A (H5N2) strain chosen as the conventional research model for the influenza virus A (H5N1) strain (H5N2 A/Finch/England/2051/2001).

### 3.2. Viral production and purification

In order to produce large quantities of hPIV-3 and RSV, three 175 cm<sup>2</sup> flasks of LLC-MK2 cells were infected for each virus at a multiplicity of Infection (MOI) of 10–3<sup>17</sup> and supernatants were harvested 3 days post-infection. After a centrifugation at 1200 × g at 4 °C for 10 min, supernatants were centrifuged at 25,000 × g at 4 °C for 2 h on a 20% saccharose cushion in phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4). Viral pellets were resuspended in 50 mL of PBS; pH 7.4 and stocked at 4 °C before nebulization step. Influenza A (H5N2) strain was cultivated on MDCK cells and the viral suspension was prepared in a same way as hPIV-3 and RSV.

### 3.3. Cold oxygen plasma experimental device

The efficiency of the gas plasma process in air disinfection was studied directly by a pilot reaction core manufactured by Biozone scientific. A schematic drawing of the testing system is depicted in Fig. 1. The reaction core is composed of external and internal cold oxygen plasma device (COP) and an internal classic UV-C lamp (254 nm).

The system consists of a one-pass flow tunnel with a reaction core to be tested situated inline such that air samples can be taken before and after the reaction core. For safety, the entire system was installed in a BSL3 laboratory with the entry and exit of the flow system located inside biological safety hoods within the laboratory. Samplers to determine upstream and downstream outlet airborne levels of infectious virus were also located inside safety hoods. At the entry of the flow tunnel, a viral aerosol suspension was generated using a 6-jet Collision spray nebulizer (Model CN311, BGI, INC). The suspension was aerosolized by applying compressed air to the Collision nebulizer at 1.8 bars of pressure. Under these conditions, the mean diameter of the droplets is 1.9 μm. During these tests the air speed through the system was stabi-

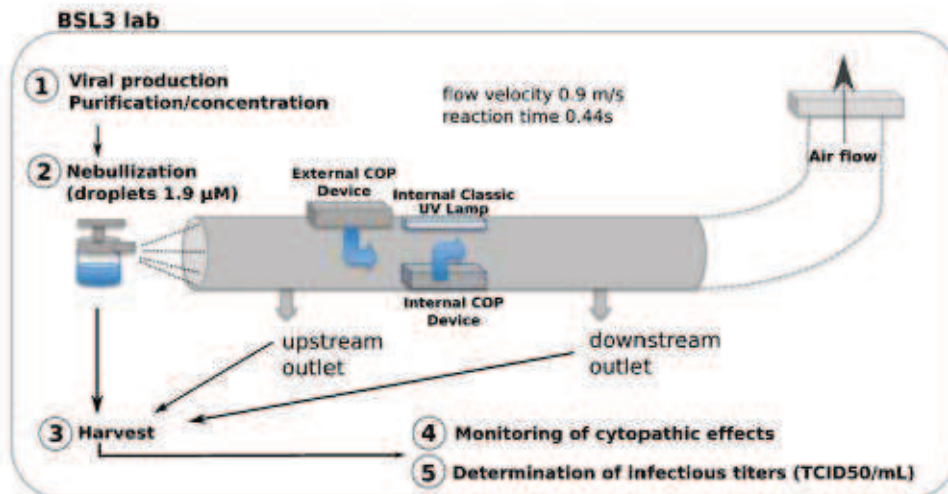


Fig. 1. Schematic representation of the experimental device and strategy used in this study.



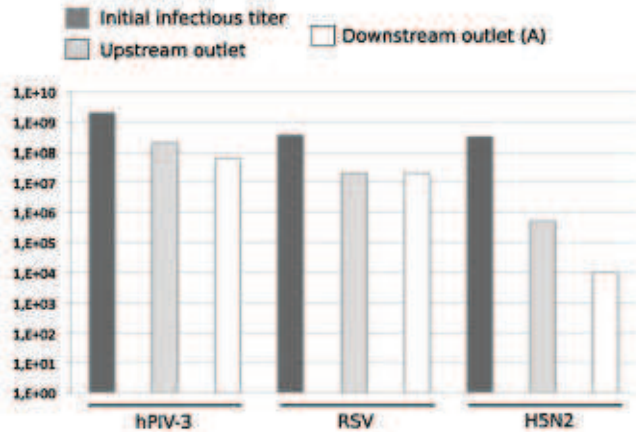


Fig. 2. Evaluation of the viral loss due to the nebulization in the experimental device. The infectious titers (TCID<sub>50</sub>/mL) of the suspensions harvested at the upstream and the downstream outlets are compared with the initial infectious titer of the viral suspensions, which have been nebulized, for hPIV-3, RSV and A (H5N2) influenza.

lized and fixed at 0.9 m/s. The virus flow was sampled during 3 min using a sampling pump and then focused onto 3 mL of collection fluid (phosphate buffer saline) in 50 mL sterile plastic tube.

Three different experimental conditions were tested four times (Fig. 3): (B) the internal classic UV germicide UV-C light lamp, (C) a COP from an external device (gas plasma only) and (D) a COP from an internal device (gas plasma and UV light).

### 3.4. Determination of viral infectious titers

The amount of infectious virus in each batch was performed by limit-dilution titration test and determination of the dilution of virus required to infect 50% of inoculated cells (TCID<sub>50</sub>/mL).<sup>18</sup> For this purpose, virally induced cytopathic effects (CPE) were checked until 96–120 h post-infection.

## 4. Results

### 4.1. Evaluation of viral load reduction due to the nebulization in the experimental system (Fig. 2)

We first evaluated the load reduction of infectious particles during the nebulization in our experimental device. The first experiment was a blind test with no UV-C light or ozone produced into the virus stream. The Collison nebulizer was filled with 30 mL of influenza A (H5N2) or RSV or hPIV-3 purified viral suspensions, with infectious titers of, respectively 10<sup>8.5</sup>, 10<sup>8.55</sup> and 10<sup>9.3</sup> TCID<sub>50</sub>/mL.

After 30 min of stabilisation, four samples were taken alternatively at the upstream outlet and at the downstream outlet, and this operation has been repeated four times to check the reproducibility. The objective was to check that infectious titers, in the suspensions harvested at upstream and downstream outlet (Fig. 1), were high enough to further evaluate the effect of different experimental conditions (e.g. UV-C/COP/COP + UV). First preliminary results have shown that the initial infectious titers had to be very high before nebulization, which implicated concentration/purification steps after viral production.

The loss of infectious particles between the initial infectious titer and the upstream outlet for hPIV-3, RSV and influenza virus A (H5N2) was respectively of the order of 0, 1.25, and 2.8 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/mL (Fig. 2). The decrease of amount of virus was very important (more than 99.8% for influenza virus A (H5N2)) but the upstream outlet infectious titers still represented non-negligible values (10<sup>9.3</sup>, 10<sup>7.3</sup>, and 10<sup>5.7</sup> respectively for hPIV-3, RSV and influenza virus A (H5N2), Fig. 2). We then measured the viral loss between upstream and downstream outlets. Surprisingly, there was no measurable loss for RSV between the two outlets. The loss of infectious particles between the upstream and the downstream outlet for hPIV-3, RSV and influenza virus A (H5N2) was respectively of the order of 0.5, 0, and 1.7 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/mL (Fig. 2). We also observed marked loss rates at this step, but the downstream outlet infectious titers still represented non-negligible values (10<sup>7.8</sup>, 10<sup>7.3</sup>, 10<sup>4</sup> respectively for hPIV-3, RSV and influenza virus A (H5N2), Fig. 2).

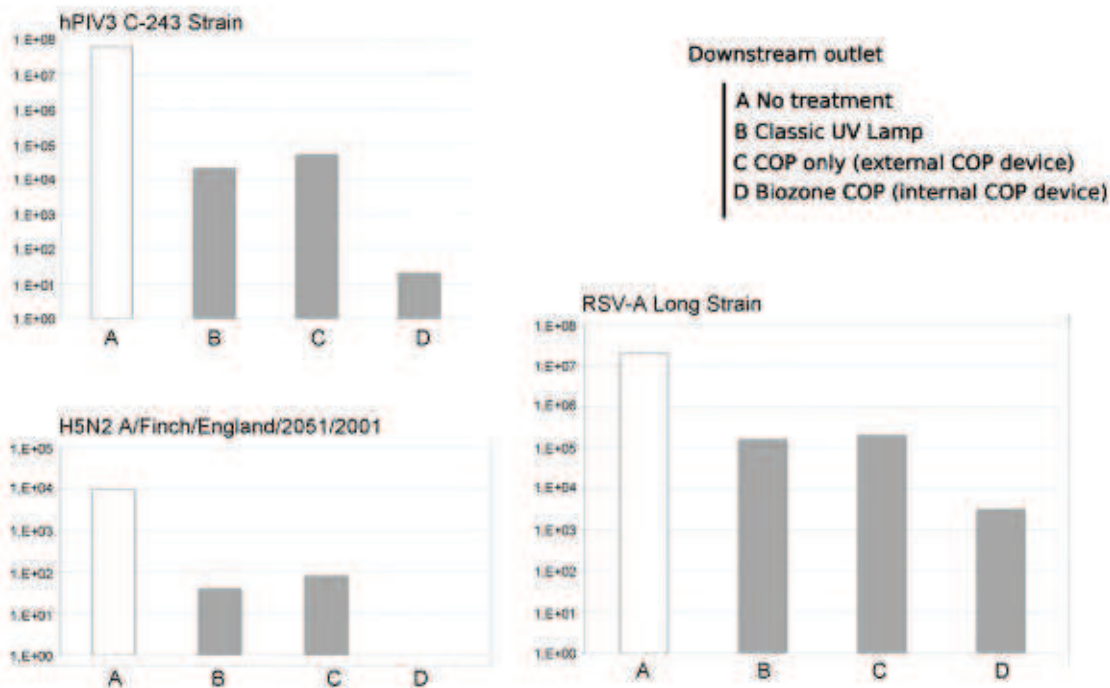


Fig. 3. Determination of downstream outlet infectious titers in different conditions for hPIV-3, RSV and A (H5N2) influenza.



Table 1  
Percentage efficiency of inactivation in the different experimental conditions (B–D, Fig. 3).

	% efficiency		
	Classic UV lamp (B)	COP only (C)	Biozone COP (D)
H5N2	99.60	99.20	>99.99
hPIV-3	99.97	99.92	>99.99
RSV	99.20	99.00	99.98

Altogether, these results have shown that it was possible to harvest, after nebulization of a highly concentrate viral suspension, significant quantities of infectious viruses despite important loss rates.

#### 4.2. Determination of downstream outlet infectious titers in different conditions (Fig. 3)

The downstream outlet infectious titers for each virus, without treatment, previously determined were used as reference values (see Fig. 3A).

We first determined the effect of the classic UV-C light without gas plasma production. The germicidal effects of classic UV-C light lamp allowed a loss of infectious titers, for hPIV-3, RSV and influenza virus A (H5N2) of respectively 3.5, 2.1 and 2.4 log(10) TCID<sub>50</sub>/mL (A versus B, Fig. 3). We then determined the effect of gas plasma (external COP device) into the virus flow. The ozone concentration was measured to be 0.05 ppmv in this stream complying with all certification levels. When the external COP device was tested, the loss of infectious particles for hPIV-3, RSV and influenza virus A (H5N2) was respectively of the order of 3.1, 2 and 2.1 log(10) TCID<sub>50</sub>/mL (A versus C, Fig. 3). The results between the two experimental conditions A and C were quite comparable. We finally determined the effect of both gas plasma and UV light (external and internal COP devices) into the virus flow. This configuration allowed a more important loss of infectious titers, for hPIV-3, RSV and influenza virus A (H5N2) of respectively 6.5, 3.8 and 4 log(10) TCID<sub>50</sub>/mL (A versus D Fig. 3).

All these results have been expressed as percentage efficiency using the following formula. Percentage efficiency = (infectious titer in A – infectious titer in B, C or D)/(infectious titer in A) × 100. The results are shown in Table 1.

#### 4.3. Monitoring of cytopathic effects: an illustration (Fig. 4)

The infectious titers were determined for the observation of infected cell monolayers. In order to illustrate the results presented in Fig. 2, we have monitored the cytopathic effect on MDCK or LLC-MK2 cells, infected with samples harvested at upstream or downstream outlets, when the internal COP device was switched on. From the 3 mL harvested at each outlet, 500 L was used to infect cell monolayers in 3.5 cm dishes. Representative photographs taken at 72 h post-infection are shown in Fig. 4. Marked cytopathic effects were observed in cell monolayers infected with samples harvested at upstream outlet, for the three viruses. The cell monolayers were totally destructured for influenza virus A (H5N2) (rounded and non-adherent cells, Fig. 4) and only partially for hPIV-3 and RSV, with multiple small characteristic foci (Fig. 4). We have not observed evident cytopathic effect in dishes infected with influenza virus A (H5N2) samples harvested at the downstream outlet; cell monolayers were similar to non-infected ones (MOCK, see Fig. 4). For hPIV-3 and RSV downstream outlet samples, only discrete cytopathic effects were visualised, with small foci (Fig. 4). Our following observations (up to 96 h post-infection) revealed that these foci were probably early syncytial structures (data not shown).

## 5. Discussion

The aim of this study was to evaluate the efficiency of a cold oxygen plasma generated by the Biozone scientific technology against different respiratory viruses. The main struggle consisted to set up an experimental device, which allowed us to test different treatments of nebulized viral suspensions. The objective was not to precisely mimic human-produced droplets but the size range appeared to be important. Only limited data are available regarding the size distribution of human-produced droplets. For influenza virus, the average diameter of droplets is of the order of the micrometer,<sup>19,20</sup> which corresponds to the average diameter of droplets generated in our study.

The first set-up experiment (Fig. 2) showed that it was possible to harvest, after nebulization of a high concentrate viral suspension, significant quantities of infectious viruses, despite important loss rates. The important loss rates could be partially explained by a rapid aggregation and consecutive particles settling between the upstream and the downstream outlets and also the liquid impingement samplers have been used to sample the air. The loss rates could be explained by a probable high relative humidity of our experimental condition that is known to affect the infectivity of airborne influenza virus, for example.<sup>21</sup> This feature can be compensated by high initial viral titers.

The UV-C light irradiation capacity to inactivate airborne viruses was not extensively studied in literature.<sup>11</sup> In early works, Jensen<sup>22</sup> has shown that the inactivation rate of UV-C on influenza (WSN strain) was greater than 99.99%. In our experimental conditions, we have found UV-C inactivation rates for A (H5N2) influenza virus, hPIV-3, and RSV, were respectively of 99.60%, 99.97% and 99.20% (Table 1). These percentages could first appear to be very close but represent lower efficiency considering the infectious titers. These differences could be explained by the number of UV-C lamp used in these two studies; only one in our study versus six lamps in the early works by Jensen<sup>22</sup> and also by differences of initial viral titers experimentally used.

In our experiment, gas plasma generated by the Biozone UV lamp is responsible for an important decrease of the viral titer for all the three respiratory viruses. One important element in the composition of a cold gas plasma is the ozone. It is well documented in the scientific literature that ozone–oxygen mixtures inactivate microorganisms including bacteria, fungi and viruses.<sup>23,24</sup> A recent study suggests that ozone inactivation of viruses occurs primarily by peroxidation of both lipid and protein.<sup>24</sup> Enveloped viruses in a thin liquid layer showed extreme sensitivity to ozone using concentrations ranging from 800 ppmv to 1500 ppmv.<sup>24</sup> The Biozone scientific COP only allows the production of 0.04 ppmv of ozone. The effect of such low ozone concentration on nebulized viral suspensions will be further examined.

Our results showed a slightly lower effect of the gas plasma versus UV-C on viral air decontamination (B and C, Fig. 3 and Table 1). When the Biozone COP was tested, percentage efficiencies were significantly higher for influenza virus A (H5N2) and RSV (0.8–0.98% enhancement). The combined effects of gas plasma and internal UV, in the Biozone device brought a high level of inactivation rate. These particular features have never been described before. Future investigations will explore the efficiency of Biozone COP on contaminated surfaces.

Altogether, the results of this study revealed marked differences in inactivation rates amongst A (H5N2), hPIV-3 and RSV. The higher inactivation rates, in the three experimental conditions, were always obtained for hPIV-3. Lower inactivation rates were obtained for influenza virus A (H5N2) and RSV (Table 1). Because of the initial infectious titers and the sensitivity of the viral assays varied, it is difficult to determine if these differences represented a specific susceptibility to the disinfection processes or just reflect

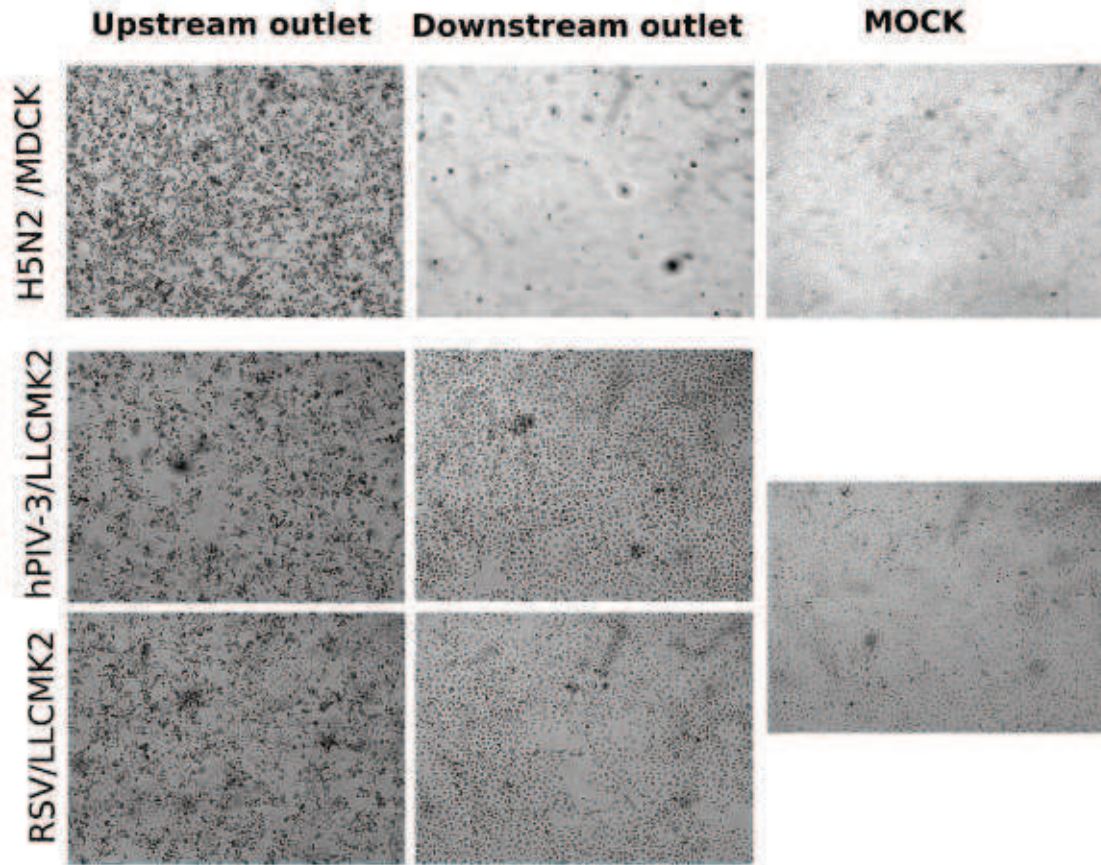


Fig. 4. Monitoring of the cytopathic effect obtained with infection of MDCK or LLC-MK2 cells with samples harvested at the upstream and downstream outlets when the internal Biozone COP was switched on.

variations or our experimental conditions. However, initial infectious titers for hPIV-3 and RSV were quite similar and the same cellular system was used. Differences of inactivation rates could be explained by viral features like the protein and lipid composition of the particle or the relative importance of the viral matrix, for example. The possible link between structural characteristics and susceptibility to UV and/or plasma will be further investigated. The efficiency against non-enveloped virus, e.g. adenovirus will be also explored.

Cold oxygen plasma technology appears to be an efficient air decontamination tool to protect human population against airborne infections. The Biozone COP commercial apparatuses are already used to prevent dissemination of multiresistant bacteria in hospital, for example. In a similar way, this new-engineered method could be used to control the airborne transmission of viruses in high-risk settings, like hospital wards for example. With the recent emergence of viral respiratory pathogens such as avian influenza virus A (H5N1), the COP technology could constitute a precious tool for the reduction of influenza transmission in the various consultation settings implemented for the management of cases during a pandemic.

#### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interests.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank all the "respiratory viruses" team in VirPath Lab for their support. A preliminary report of this

work has been presented previously at the European Society Clinical Virology meeting, at Saariselka, Finland the 12–14th March of 2008. The authors would like to acknowledge the Organising Committee and all the participants for helpful questions and discussions, which have motivated the redaction of this article. Funding source: CNRS and Biozone Europe fundings.

#### References

1. Welliver RC. Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytialvirus (RSV) infection. *J Pediatr* 2003;143(November (5 Suppl.)):S112–7.
2. Henrickson KJ. Parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev* 2003;16(April (2)):242–64.
3. <http://www.cdc.gov/rsv/about/infection.html> (10.12.2008).
4. Durbin AP, Karron RA. Progress in the development of respiratory syncytial virus and parainfluenza virus vaccines. *Clin Infect Dis* 2003;37(December (12)):1668–77.
5. Cox NJ, Subbarao K. Global epidemiology of influenza: past and present. *Annu Rev Med* 2000;51:407–21.
6. <http://www.who.int/csr/disease/influenza/pandemic/en/> (10.12.2008).
7. Goldmann DA. Transmission of viral respiratory infections in the home. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19(October (10 Suppl.)):S97–102.
8. Ansari SA, Springthorpe VS, Sattar SA, Rivard S, Rahman M. Potential role of hands in the spread of respiratory viral infections: studies with human parainfluenza virus 3 and rhinovirus 14. *J Clin Microbiol* 1991;29(October (10)):2115–9.
9. Liu R, Huza MA. Filtration and indoor air quality: a practical approach. *ASHRAE J* 1995;37:18.
10. Mitchell BW, King DJ. Effect of negative air ionization on airborne transmission of Newcastle disease virus. *Avian Dis* 1994;38(October–December(4)):725–32.
11. Brickner PW, Vincent RL, First M, Nardell E, Murray M, Kaufman W. The application of ultraviolet germicidal irradiation to control transmission of airborne disease: bioterrorism countermeasure. *Public Health Rep* 2003;118(March–April (2)):99–114.
12. Guillard C, Bui T-H, Felix C, Moules V, Lina B, Lejeune P. Microbiological disinfection of water and air by photocatalysis. *CR Chim* 2007;11(January–February (1–2)):107–13.

13. Paschoalino MP, Jardim WF. Indoor air disinfection using a polyester supported TiO photo-reactor. *Indoor Air* 2008;18(December (6)):473–9.
14. Heindel TH, Streib R, Botzenhart K. Effect of ozone on airborne microorganisms. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 1993;194(September (5–6)):464–80.
15. Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabrizian M, Yahia LH. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Int J Pharm* 2001;226(September (1–2)):1–21.
16. Nelson CL, Berger TJ. Inactivation of microorganisms by oxygen gas plasma. *Curr Microbiol* 1989;(18):275–6.
17. Terrier O, Cartet G, Ferraris O, Morfin F, Thouvenot D, Hong SS, et al. Characterization of naturally occurring parainfluenza virus type 2 (hPIV-2) variants. *J Clin Virol* 2008;43(September (1)):86–92.
18. Reed L, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hygiene* 1938;27:493–7.
19. Yang S, Lee GW, Chen CM, Wu CC, Yu KP. The size and concentration of droplets generated by coughing in human subjects. *J Aerosol Med* 2007;20(Winter (4)):484–94.
20. Fabian P, McDevitt JJ, DeHaan WH, Fung RO, Cowling BJ, Chan KH, et al. Influenza virus in human exhaled breath: an observational study. *PLoS One* 2008;3(July (7)):e2691.
21. Verreault D, Moineau S, Duchaine C. Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008;72(September (3)):413–44.
22. Jensen MM. Inactivation of airborne viruses by ultraviolet irradiation. *Appl Microbiol* 1964;12(September):418–20.
23. Hoff JC. Inactivation of Microbial agents by Chemical Disinfectants. EPA 600 S2-86 067. Office of Water. Washington, DC: US Environmental Protection Agency; 1986.
24. Murray BK, Ohmine S, Tomer DP, Jensen KJ, Johnson FB, Kirsi JJ, et al. Virion disruption by ozone-mediated reactive oxygen species. *J Virol Methods* 2008;153(October (1)):74–7.

## **4. Annexe 4 : Matériels et Méthodes**

### **1. Matériels**

#### 1. Biologie Cellulaire

##### 1) Cellules

Cellules MDCK- ATCC : CCL-34

Cellules 293T- ATCC : CRL-11268

Cellules A549-ATCC : CCL-185

##### 2) Milieux de Cultures 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 : 10109819001

Trypsine « cellule »-Lonza-Référence : BE17-160E

PBS 1x avec ou sans Mg-Lonza-Référence : 17-516F/12

Sérum de veau fœtal-Lonza-Référence : DE14-801F

PBS10x-Euromedex-Référence : ET330

##### 3) Appareillage

Etuve : Sanyo-Modèle : MCO-175

Poste de sécurité Microbiologique : Heraus-Modèle : H512

Agitateur de plaque-Heidolph- Modèle : Inkubator- 1000/duomax1030

Microscope à fluorescence : AxioCam-Zeiss

#### 4) Anticorps

FluAc - anticorps monoclonal de souris pour la détection de la protéine M1

14C2 - anticorps monoclonal de souris pour la détection de la protéine M2

Ac NS1 - anticorps monoclonal de lapin pour la détection de la protéine NS1

IgG-Alexa 633 Invitrogen- anticorps secondaire anti-souris

IgG-Alexa 488 Invitrogen – anticorps secondaire anti lapin

## 2. Biologie Moléculaire

### 1) Enzyme de restriction

AarI- Fermentas- Référence : 600675

Esp3I/BsmBI- Fermentas- Référence : ER0451

EcoRI- Euromedex- Référence : EN-114S

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

PfuUltra II- Agilent- Référence : 600670

GoTaq- Promega- Référence : M8307

T4 DNA ligase- Euromedex- Référence : 09-06112

MuIV-RT- EUromedex- Référence : 06-21-050000

AMV RT- Promega- Référence : M5101

RNase-Free DNase Set- QIAGEN- Référence : 7925

### 3) Amorces

#### a. amplification de segments de gènes pour clonage

Segment	amorce sens	amorce anti-sens	Tm
PB1	TATT <b>CACCTGCCTC</b> AGGGAGCGAAAGCAGGCA	ATAT <b>CACCTGCCTCGTATT</b> AGTAGAAACAAGGCATT	59°C
PB2	TATT <b>CACCTGCCTC</b> AGGGAGCGAAAGCAGGTC	ATAT <b>CACCTGCCTCGTATT</b> AGTAGAAACAAGGTCGT	59°C
PA	TATT <b>CACCTGCCTC</b> AGGGAGCGAAAGCAGGTAC	ATAT <b>CACCTGCCTCGTATT</b> AGTAGAAACAAGGTACT	59°C
HA	TATT <b>CACCTGCCTC</b> AGGGAGCGAAAGCAGGGG	ATAT <b>CACCTGCCTCGTATT</b> AGTAGAAACAAGGGTGT	58°C
NP	TT <b>CGTCTCA</b> AGGGAGCAAAAAGCAGGGTAGAT	AT <b>CGTCTCGTATT</b> AGTAGAAACAAGGGTATTTTTG	58°C
NA	TATT <b>CGTCTCA</b> AGGGAGCAAAAAGCAGGAGT	ATAT <b>CGTCTCGTATT</b> AGTAGAAACAAGGAG	58°C
M	TATT <b>CGTCTCA</b> AGGGAGCAAAAAGCAGGTAG	ATAT <b>CGTCTCGTATT</b> AGTAGAAACAAGGTAGTTTTT	58°C
NS	TATT <b>CGTCTCA</b> AGGGAGCAAAAAGCAGGGTG	ATAT <b>CGTCTCGTATT</b> AGTAGAAACAAGGGTGT	58°C

Tableau : Ces amorces ont été utilisées pour amplifier puis cloner les segments de gènes pour toutes les souches Influenza A, aussi bien dans le plasmide pHW2000 que le plasmide pUC 2000.

AarI :

5' **CACCTGC** (N)<sub>4</sub> ↓ 3'  
3' **GTGGACG** (N)<sub>8</sub> ↓ 5'

BsmBI :

5' **CGTCTC** (N)<sub>1</sub> ↓ 3'  
3' **GCAGAG** (N)<sub>5</sub> ↓ 5'

#### b. Mutagenèse de création du site NcoI pour suppression du promoteur pol 2

	amorce sens	amorce anti-sens	Tm
Pol2del	CTATATAAGCAGAGCTCTCCATGGCTAACTAGAGAACCC	GATATATTCGTCTCGAGAGGTACCGATTGATCTCTTGGG	80,55°C

#### c. Mutagenèse des codons S71 et R72 du segment de gène M du virus H3N2

M	amorce sens	amorce anti-sens	Tm
S71R73	CGGAAGGAGTACCTGAGAGCATGCGCGAAGAATATCGAAAGG	CCTTTGATATTCTTCGCGCATGCTCTCAGGTACTCCTCCG	75°C

#### d. Amplification des extrémités 3' et 5' du segment de gène HA du virus H5N2

H5	amorce sens	amorce anti-sens	Tm
Extr 3'	AGCAAAAGCAGGGGTCT	TTTCTCCATTTTGACAGATT	54°C
Extr 5'	TCCTTGCCATATCATGTTTTTTGCTTTGTG	ATATCACCTGCCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGT	69°C

#### e. Mutagenèse des extrémités 3' du segment de gène M H3N2

M	amorce sens	amorce anti-sens	Tm
1	GGTAGATATTGAAAGATGAGCCTTCTAACCGAGGTCTG	CGACCTCGGTTAGAAGGCTCATCTTTCAATATCTACC	79,39°C
2	CCGAGGTGCGAAACGTATGTTCTCTCTATCGTC	GACGATAGAGAGAACATACGTTTCGACCTCGG	78°C
3	GTTCTCTCTATCGTTCATCAGGCCCTCAAAAGC	GCTTTGAGGGGCTGATGGAACGATAGAGAGAAC	78,76°C



## f. Mutagénèse des extrémités 5' du segment de gène M H3N2

M	amorce sens	amorce anti-sens	Tm
1'	GGAAGAATATCGGCAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATG	CATCCACAGCACTCTGCTGTTCTGCCGATATTCTTCCC	78,8°C
2'	GCTGTGGATGTTGACGATGGTCATTTTG	CAAAATGACCATCGTCAACATCCACAGC	78°C
3'	CGATGGTCATTTTGTCAACATAGAGCTAGAGTAAAAACTACCTTG	CAAGGTAGTTTTTACTCTAGCTCTATGTTGACAAAATGACCATCG	75°C

## g. Criblage de l'origine des segments de gène

Segment	amorce sens	amorce anti-sens	Tm
PB1 H3	TAAGGCCTCTTCTAATAGATGG	AAGTCTTCCCGATAATCC	54°C
PB2	GCTGTGGATATATGCAAGGCTG	TCTCCACATCATTGACGATG	60°C
PA	CAACAAGGCATGCGAACTGAC	CAAAGAATTCTTTGGTCATGTCTTTCTC	62°C
HA H5	CCGTTGGAACATCAACACTG	CTTTGTCTGCAGCGTATCCA	58°C
NP H5	GGTCCAATCTACCGAAGGAG	TGTTTTGAAGCAGACGGAAA	58°C
NA H3	CTGACCAACACCACCATAGAGA	AAGCAATGGCTACTGCTGG	58°C
M	GACTGCAGCGTAGACGCTTTG	CGATATTCTTCCCTCATAGACTCAGG	58°C
NS H3	GTAGACCAAGAACTGAGTGATGCC	CTGATGCAAAGAGGTCCTTCC	58°C

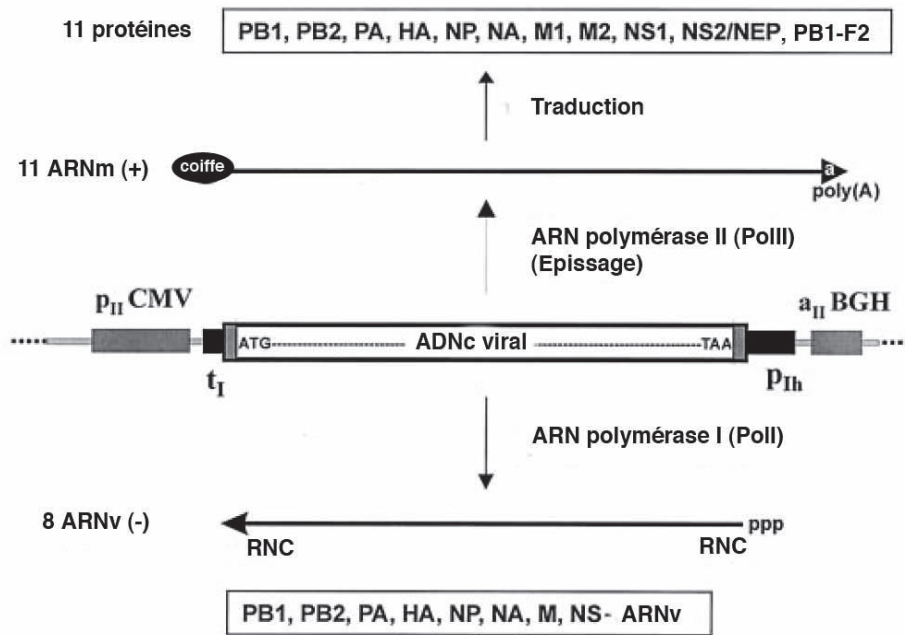
## 4) Plasmides

## a. pHW2000

Le système utilisé pour la génétique inverse est celui comportant huit plasmides. Chaque plasmide contient deux promoteurs en orientation inverse. Un promoteur polI (pIh) se trouve en amont du segment de gène, associé à un terminateur (tI). Cet ensemble (pIh - ADNc - tI) est encadré par un promoteur PolII CMV, issu du cytomégalovirus humain, placé en aval du segment de gène. Ce promoteur est associé à un signal de polyadénylation aIIBGH isolé du gène codant l'hormone de croissance bovine (figure 48).

Le promoteur PolI permet la transcription fournissant l'ARN génomique viral et la transcription à partir du promoteur PolII permet la synthèse de l'ARNm qui sera traduit pour fournir les protéines virales. Les segments d'ADNc issus du virus A/Moscou/10/99 (H3N2) sont amplifiés par PCR (la séquence des amorces est indiquée dans le tableau partie 3) puis clonés dans le plasmide pHW2000 après digestion par l'enzyme BsmBI ou AarI.





**Figure 49 : Schéma descriptif de la transcription des plasmides pHW2000 (adapté de [135]).**

*RNC : Région non codante, ARNv. La transcription initiée au promoteur PolI permet la synthèse des ARNv et la transcription initiée au promoteur PolII permet la synthèse des ARNm viraux.*

b. pHW2000 pol2 déléetée

Pour certaines expériences, la délétion du promoteur PolII est nécessaire. Cette délétion est effectuée par mutagenèse dirigée. La mutagenèse introduit un site NcoI (délétion du promoteur PolII). Après mutagenèse, la digestion par ces enzymes permet de déléter les régions du plasmide contenant les régions promotrices. Les plasmides obtenus, délétés du promoteur PolII est nommés pHW2000 $\Delta$ PolII. La transfection dans les cellules 293T par un segment de gène cloné dans ce plasmide, va permettre l'expression de son ARNv uniquement.

## 2. Méthodes

### 1) Lignées Cellulaires et Virus

#### a. Lignées cellulaires

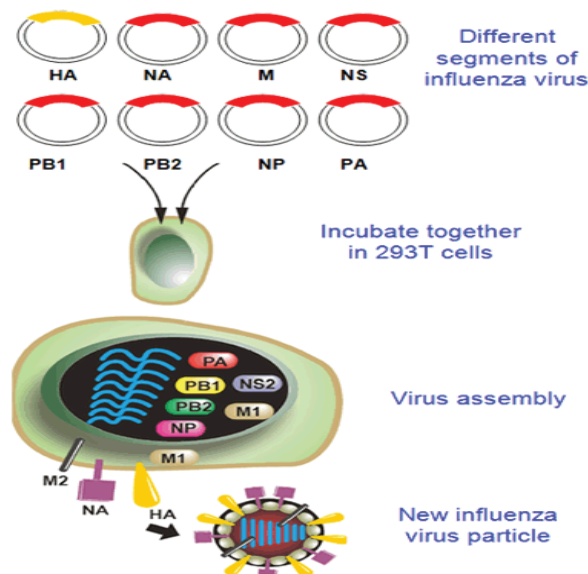
Les cellules rénales embryonnaires humaines 293T sont maintenues dans du milieu DMEM contenant 10% de veau fœtal, de la L-Glutamine (5mM) et de la Pénicilline/Streptomycine (1000IU/mL et 100µg/mL respectivement). Les cellules MDCK sont cultivées dans du sérum ultra MDCK et les cellules A549 sont maintenues dans du DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, de la L-Glutamine (5mM) et de la Pénicilline/Streptomycine (1000IU/mL et 100 µg/mL respectivement).

#### b. Virus

Les virus Influenza de type A ont été aimablement donnés par le CNR Grippe Sud. Après l'infection par les virus Influenza, les cellules MDCK et A549 ont été maintenues respectivement en EMEM et DMEM contenant TPCK-trypsine (1µg/mL).

### 2) Clonage des segments de gènes

Les plasmides des systèmes H3N2 et H5N2 sont construits de la même manière. L'ARNv des virus sont extraits puis une rétrotranscription (=RT) est effectuée en utilisant l'amorce uni12 5'-AGCAAAGCAGG-3'. L'ADNc issu de cette RT permet l'amplification, par des PCR spécifiques (I.3a. amplification de segments de gènes pour clonage), de chaque segment de gènes. Les ADN double brins obtenus subissent une digestion enzymatique par AarI ou BsmBI puis clonées dans le vecteur pHW2000 ou pHW2000ΔPolIII.



**Figure 50 : Représentation schématique de la technique de génétique inverse**

*L'utilisation d'un système de transcription dépendant de l'ARN polymérase I et I permet la reconstitution des huit RNPv d'un virus grippal de type A. Ainsi la co-transfection de 8 plasmides dans une même cellule (293T) permet la production de virus recombinants.*

### 3) La génétique Inverse

Les virus H3N2, H5N2 ainsi que les virus recombinants sont obtenus par génétique inverse conformément à ce qui fut décrit par [135]. Les cellules sont ensemencées à J-1 de manière à obtenir une confluence de entre 40-60% à J0. Le jeu de plasmides permettant la production de virus ou permettant d'effectuer des compétitions (1µg /plasmide), sont transfectés dans les cellules 293T avec le transfectant Trans IT-LT1 (MIRUS) à raison de 2µL/µg d'ADN transfecté, et du milieu OptiMEM en suivant les instructions d'utilisation. Six heures après la transfection, le milieu de transfection est remplacé par 1 mL d'OptiMEM supplémenté à 0,3% de Bovine Serum Albumine (=BSA). Vingt quatre heures après, on supplémente ce milieu avec 1mL d'OptiMEM BSA 0,3% et de la TPCK trypsin à 1µg/mL. Le surnageant de transfection est récolté après 24h et centrifugé 5 min à 3000 rpm puis dilué au ½ dans du milieu EMEM supplémenté en TPCK trypsin à 1µg/mL pour infecter des cellules MDCK en confluence sur des plaques 48 puits (=p48). Après une heure en agitation à 37°C, on ajoute 600µL de milieu EMEM supplémenté en TPCK trypsin à 1µg/mL (=milieu d'infection), la plaque est incubée à 37°C et suivit afin d'observer un effet cytopathique (=ECP) des virus (figure 50).

#### 4) Génotypage des virus réassortants

La transfection des plasmides permettant les compétitions pour l'incorporation des ARNv, sont transfectés comme décrit précédemment. Le surnageant de la transfection, dilué au ½ dans du milieu EMEM supplémenté en TPCK trypsin à 1µg/mL, est utilisé pour infecter des cellules MDCK confluentes sur des plaques 6 puits (=p6). La plaque est incubée à 37°C pendant 1h en agitation. Le milieu d'infection est retiré pour être remplacé par du milieu MEM2X supplémenté en Trypsine à 2µg/mL et compléter par de l'Agar Noble préalablement chauffé à raison d'un volume de MEM pour un volume d'Agar Noble. La plaque 6 puits est incubée à 37°C après la prise en masse de l'Agar Noble. Les virus isolés, formant des plages de lyse, sont prélevés pour infecter des p48. Les ARNv sont extraits en utilisant le kit d'extraction Nucleospin RNA virus, en suivant le manuel d'utilisation, et l'ensemble des ADNc sont obtenus par une RT utilisant l'amorce uni12 (région universelle présente sur chaque segment de gène). Afin de déterminer l'origine de chaque segment de gène, 8 paires d'amorces ont été synthétisées, basées sur la diversité de séquences des segments de gène des virus H3N2 et H5N2 (I.3.g). La forte homologie entre les séquences des segments de gène PB2, PA et M ne permettant pas de discriminer l'origine des virus par PCR, une digestion des produits PCR par les enzymes NcoI (PB2, PA) et MunI (M) permettra de discriminer leur origine.

#### 5) Criblage des virus issus de co-transfection, compétition, ou co-infection

Le surnageant des virus est récolté après infection des virus isolés par plage de lyse. L'extraction des virus est effectuée avec le kit NucleoSpin RNA Virus suivant le manuel du fabricant. Une rétrotranscription est effectuée en utilisant l'amorce uni12 5'-AGCAAAAGCAGG-3' permettant ainsi la synthèse de la totalité des ADNc. Cet ADNc est ensuite utilisé pour cribler l'origine des segments de gène préalablement mis en compétition. Le criblage des segments de gène est effectué par une PCR de 30 cycles d'amplification (95°C-1min, Tm de l'amorce-1min, 72°C-1min). Une amplification du segment de gène NS est effectuée en parallèle afin de contrôler la présence d'ADNc.

## 6) Titrage des virus

Le titre infectieux d'un virus est déterminé après infection de plaque 96 puits (=p96). La suspension virale est diluée en cascade ( $10^{-1}$  à  $10^{-9}$ ), 4 puits par dilution, avec du milieu d'infection. Les puits sont infectés à raison de 50 $\mu$ L de suspension virale diluée/puits et la plaque est incubée à 37°C. 24h après, le milieu de culture est remplacé par du milieu d'infection neuf. Après 48h, 50 $\mu$ L de chaque surnageant est mélangé avec 50 $\mu$ L de SALK 1X et 50 $\mu$ L de globules rouges de cobaye dans des p96 à fond conique qui seront incubés 1h à RT. La présence de virus est identifiée par une inhibition de l'hémagglutination des globules rouges. Cependant si les globules rouges ont sédimenté le test est négatif et la suspension testée contiendrait alors moins de  $10^5$  particules virales /mL. La détermination du titre viral est calculée par la méthode de Reed and Munch.

## 7) Cinétique de répllication des virus

Les virus d'intérêts sont titrés pour infecter des cellules MDCK confluentes en T25, avec du milieu d'infection, à une Multiplicité d'Infection (=MOI) de  $10^{-4}$  qui correspond à un virus pour 10000 cellules. Le surnageant est prélevé à différents temps post infection et le titre viral de chaque point de cinétique est déterminé par une titration selon la méthode de Reed and Munch.

## 8) Compétition par Transfection électrique suivit d'une infection

$10^6$  cellules 293T en suspension sont centrifugées 5 min à 3000 rpm et resuspendues avec 100 $\mu$ L de la solution T du kit T AMAXA. 500ng de plasmide H5 FINCH sont ajoutés dans les cellules et la transfection électrique est effectuée avec l'appareil AMAXA. Les cellules transfectées sont rincées avec du milieu DMEM supplémenté en L-Glutamine (5mM), Pénicilline/Streptomycine (5mM) et 20% de Sérum de Veau Fœtal (=SVF). L'infection des cellules transfectées est effectuée à une MOI 2 avec le virus H3N2 d'une part et le virus H3N2 muté (possédant les 5 mutations du segment 7 dans son extrémité côté uni12) pendant

8h à 37°C. Les surnageants sont ensuite récupérés pour isoler les virus par de plages de lyse aux dilutions  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$ .

## 9) Titrage selon méthode de Reed and Munch

Cette méthode permet de déterminer le titre de la suspension virale infectant 50% d'une population cellulaire donnée (DICT<sub>50</sub> : dose infectieuse 50 % en culture de tissu sensible). Des cellules MDCK réparties dans une plaque 96 puits sont infectées en triplicat par des suspensions virales diluées en cascade. La méthode de calcul de la DICT<sub>50</sub> est illustrée par un exemple où la suspension virale testée est diluée au 1/100. Chaque cupule contient 100µL de milieu d'infection (Szretter et al., 2006).

Log de la dilution de la suspension virale	Cupules contenant des cellules infectées	Cumul des cupules contenant des cellules infectées (A)	Cumul des cupules contenant des cellules noninfectées (B)	Ratio A/(A+B)	% d'infection
-5	3/3	6	0	6/6	100%
-6	2/3	3	1	3/4	75%
-7	1/3	1	3	1/4	25%
-8	0/3	0	6	0/6	0%

### Formule 1 : Calcul de la distance proportionnelle (DP)

$$DP = [(\% \text{ d'infection} > 50\%) - 50\%] / [(\% \text{ d'infection} > 50\%) - (\% \text{ d'infection} < 50\%)]$$

Application à l'exemple :  $DP = 75\% - 50\% / 75\% - 25\% = 0,5$

### Formule 2 : Calcule du Log DICT<sub>50</sub>

$$\text{Log DICT}_{50} = (\text{Log dilution} > 50\%) + (DP \times \text{Log facteur de dilution})$$

Application à l'exemple :  $\text{Log DICT}_{50} = (-6) + (0,5 \times 1) = -5,5$

□  $\text{DICT}_{50} = 10^{-5,5} / 0,1\text{mL}$  ou  $\text{DICT}_{50} = 10^{-8,5} / 1\text{mL}$

## VI/ Bibliographie

1. Calder, L.J., et al., *Structural organization of a filamentous influenza A virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(23): p. 10685-90.
2. Gonzalez, S., T. Zurcher, and J. Ortin, *Identification of two separate domains in the influenza virus PB1 protein involved in the interaction with the PB2 and PA subunits: a model for the viral RNA polymerase structure*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(22): p. 4456-63.
3. Toyoda, T., et al., *Molecular assembly of the influenza virus RNA polymerase: determination of the subunit-subunit contact sites*. J Gen Virol, 1996. **77** ( Pt 9): p. 2149-57.
4. Poole, E., et al., *Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites*. Virology, 2004. **321**(1): p. 120-33.
5. Tarendeau, F., et al., *Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(3): p. 229-33.
6. Li, M.L., P. Rao, and R.M. Krug, *The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits*. EMBO J, 2001. **20**(8): p. 2078-86.
7. Naffakh, N., et al., *Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins*. Annu Rev Microbiol, 2008. **62**: p. 403-24.
8. Ruigrok, R.W., et al., *Towards an atomic resolution understanding of the influenza virus replication machinery*. Curr Opin Struct Biol, 2010. **20**(1): p. 104-13.
9. Biswas, S.K., P.L. Boutz, and D.P. Nayak, *Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins*. J Virol, 1998. **72**(7): p. 5493-501.
10. Obayashi, E., et al., *The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase*. Nature, 2008. **454**(7208): p. 1127-31.
11. Sugiyama, K., et al., *Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA polymerase*. EMBO J, 2009. **28**(12): p. 1803-11.
12. Sanz-Ezquerro, J.J., et al., *The PA influenza virus polymerase subunit is a phosphorylated protein*. J Gen Virol, 1998. **79** ( Pt 3): p. 471-8.
13. Nieto, A., et al., *Complex structure of the nuclear translocation signal of influenza virus polymerase PA subunit*. J Gen Virol, 1994. **75** ( Pt 1): p. 29-36.
14. Huarte, M., et al., *PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators*. J Virol, 2001. **75**(18): p. 8597-604.
15. Dias, A., et al., *The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit*. Nature, 2009. **458**(7240): p. 914-8.
16. Yuan, P., et al., *Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site*. Nature, 2009. **458**(7240): p. 909-13.
17. Ye, Q., R.M. Krug, and Y.J. Tao, *The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1078-82.
18. Ortega, J., et al., *Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification*. J Virol, 2000. **74**(1): p. 156-63.



19. Cros, J.F., A. Garcia-Sastre, and P. Palese, *An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein*. *Traffic*, 2005. **6**(3): p. 205-13.
20. Weber, F., et al., *A classical bipartite nuclear localization signal on Thogoto and influenza A virus nucleoproteins*. *Virology*, 1998. **250**(1): p. 9-18.
21. Portela, A. and P. Digard, *The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication*. *J Gen Virol*, 2002. **83**(Pt 4): p. 723-34.
22. Lee, M.T., et al., *Definition of the minimal viral components required for the initiation of unprimed RNA synthesis by influenza virus RNA polymerase*. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(2): p. 429-38.
23. Tiley, L.S., et al., *Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5' ends of the viral RNAs*. *J Virol*, 1994. **68**(8): p. 5108-16.
24. Hsu, M.T., et al., *Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(22): p. 8140-4.
25. Flick, R., et al., *Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure*. *RNA*, 1996. **2**(10): p. 1046-57.
26. Flick, R. and G. Hobom, *Interaction of influenza virus polymerase with viral RNA in the 'corkscrew' conformation*. *J Gen Virol*, 1999. **80** ( Pt 10): p. 2565-72.
27. Wiley, D.C. and J.J. Skehel, *Crystallization and x-ray diffraction studies on the haemagglutinin glycoprotein from the membrane of influenza virus*. *J Mol Biol*, 1977. **112**(2): p. 343-7.
28. Watowich, S.J., J.J. Skehel, and D.C. Wiley, *Crystal structures of influenza virus hemagglutinin in complex with high-affinity receptor analogs*. *Structure*, 1994. **2**(8): p. 719-31.
29. Kido, H., et al., *Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(19): p. 13573-9.
30. Matrosovich, M.N., et al., *Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium*. *J Virol*, 2004. **78**(22): p. 12665-7.
31. Ferraris, O. and B. Lina, *Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance*. *J Clin Virol*, 2008. **41**(1): p. 13-9.
32. Akarsu, H., et al., *Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2)*. *EMBO J*, 2003. **22**(18): p. 4646-55.
33. Helenius, A., *Unpacking the incoming influenza virus*. *Cell*, 1992. **69**(4): p. 577-8.
34. Gomez-Puertas, P., et al., *Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding*. *J Virol*, 2000. **74**(24): p. 11538-47.
35. Nayak, D.P., et al., *Influenza virus morphogenesis and budding*. *Virus Res*, 2009. **143**(2): p. 147-61.
36. Watanabe, K., et al., *Mechanism for inhibition of influenza virus RNA polymerase activity by matrix protein*. *J Virol*, 1996. **70**(1): p. 241-7.
37. Lamb, R.A. and P.W. Choppin, *Identification of a second protein (M2) encoded by RNA segment 7 of influenza virus*. *Virology*, 1981. **112**(2): p. 729-37.
38. Nishimura, K., et al., *The closed state of a H<sup>+</sup> channel helical bundle combining precise orientational and distance restraints from solid state NMR*. *Biochemistry*, 2002. **41**(44): p. 13170-7.
39. Schnell, J.R. and J.J. Chou, *Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus*. *Nature*, 2008. **451**(7178): p. 591-5.

40. Ciampor, F., et al., *Evidence that the amantadine-induced, M2-mediated conversion of influenza A virus hemagglutinin to the low pH conformation occurs in an acidic trans Golgi compartment.* Virology, 1992. **188**(1): p. 14-24.
41. Chen, B.J., et al., *The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding.* J Virol, 2008. **82**(20): p. 10059-70.
42. Stouffer, A.L., et al., *Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel.* Nature, 2008. **451**(7178): p. 596-9.
43. Garaigorta, U. and J. Ortin, *Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleo-cytoplasmic transport of its own viral mRNA.* Nucleic Acids Res, 2007. **35**(14): p. 4573-82.
44. Newby, C.M., L. Sabin, and A. Pekosz, *The RNA binding domain of influenza A virus NS1 protein affects secretion of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interferon in primary murine tracheal epithelial cells.* J Virol, 2007. **81**(17): p. 9469-80.
45. Ludwig, S., et al., *Phylogenetic relationship of the nonstructural (NS) genes of influenza A viruses.* Virology, 1991. **183**(2): p. 566-77.
46. Randall, R.E. and S. Goodbourn, *Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures.* J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 1): p. 1-47.
47. Chen, Z., Y. Li, and R.M. Krug, *Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery.* EMBO J, 1999. **18**(8): p. 2273-83.
48. Li, S., et al., *Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA.* Virology, 2006. **349**(1): p. 13-21.
49. Min, J.Y. and R.M. Krug, *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, 2006. **103**(18): p. 7100-5.
50. Bullido, R., et al., *Influenza A virus NEP (NS2 protein) downregulates RNA synthesis of model template RNAs.* J Virol, 2001. **75**(10): p. 4912-7.
51. Chen, W., et al., *A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death.* Nat Med, 2001. **7**(12): p. 1306-12.
52. Zamarin, D., et al., *Influenza virus PBI-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1.* PLoS Pathog, 2005. **1**(1): p. e4.
53. Gibbs, J.S., et al., *The influenza A virus PBI-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function.* J Virol, 2003. **77**(13): p. 7214-24.
54. Zamarin, D., M.B. Ortigoza, and P. Palese, *Influenza A virus PBI-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice.* J Virol, 2006. **80**(16): p. 7976-83.
55. Coleman, J.R., *The PBI-F2 protein of Influenza A virus: increasing pathogenicity by disrupting alveolar macrophages.* Virol J, 2007. **4**: p. 9.
56. Sethi, S., *Bacterial pneumonia. Managing a deadly complication of influenza in older adults with comorbid disease.* Geriatrics, 2002. **57**(3): p. 56-61.
57. Wise, H.M., et al., *A complicated message: Identification of a novel PBI-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA.* J Virol, 2009. **83**(16): p. 8021-31.
58. Gottlieb, T.A., et al., *Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells.* J Cell Biol, 1993. **120**(3): p. 695-710.

59. Wagner, R., M. Matrosovich, and H.D. Klenk, *Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections*. Rev Med Virol, 2002. **12**(3): p. 159-66.
60. Siczekarski, S.B. and G.R. Whittaker, *Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis*. J Virol, 2002. **76**(20): p. 10455-64.
61. Skehel, J.J. and D.C. Wiley, *Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 531-69.
62. Plotch, S.J., et al., *A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription*. Cell, 1981. **23**(3): p. 847-58.
63. Engelhardt, O.G., M. Smith, and E. Fodor, *Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II*. J Virol, 2005. **79**(9): p. 5812-8.
64. Poon, L.L., et al., *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, 1999. **73**(4): p. 3473-6.
65. Newcomb, L.L., et al., *Interaction of the influenza A virus nucleocapsid protein with the viral RNA polymerase potentiates unprimed viral RNA replication*. J Virol, 2009. **83**(1): p. 29-36.
66. Huarte, M., et al., *Threonine 157 of influenza virus PA polymerase subunit modulates RNA replication in infectious viruses*. J Virol, 2003. **77**(10): p. 6007-13.
67. Mazur, I., et al., *The proapoptotic influenza A virus protein PBI-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PBI protein*. Cell Microbiol, 2008. **10**(5): p. 1140-52.
68. Min, J.Y., et al., *A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis*. Virology, 2007. **363**(1): p. 236-43.
69. Momose, F., et al., *Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis*. J Virol, 2001. **75**(4): p. 1899-908.
70. Engelhardt, O.G. and E. Fodor, *Functional association between viral and cellular transcription during influenza virus infection*. Rev Med Virol, 2006. **16**(5): p. 329-45.
71. Kumar, N., et al., *NF-kappaB signaling differentially regulates influenza virus RNA synthesis*. J Virol, 2008. **82**(20): p. 9880-9.
72. Bui, M., G. Whittaker, and A. Helenius, *Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins*. J Virol, 1996. **70**(12): p. 8391-401.
73. Digard, P., et al., *Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments*. J Virol, 1999. **73**(3): p. 2222-31.
74. Elton, D., et al., *Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway*. J Virol, 2001. **75**(1): p. 408-19.
75. Barman, S. and D.P. Nayak, *Analysis of the transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II transmembrane glycoprotein, for apical sorting and raft association*. J Virol, 2000. **74**(14): p. 6538-45.
76. Nayak, D.P., E.K. Hui, and S. Barman, *Assembly and budding of influenza virus*. Virus Res, 2004. **106**(2): p. 147-65.
77. Baudin, F., et al., *In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein*. Virology, 2001. **281**(1): p. 102-8.

78. Noton, S.L., et al., *Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 8): p. 2280-90.
79. Carrasco, M., M.J. Amorim, and P. Digard, *Lipid raft-dependent targeting of the influenza A virus nucleoprotein to the apical plasma membrane*. Traffic, 2004. **5**(12): p. 979-92.
80. Chen, B.J., et al., *Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles*. J Virol, 2007. **81**(13): p. 7111-23.
81. Schweiger, B., L. Bruns, and K. Meixenberger, *Reassortment between human A(H3N2) viruses is an important evolutionary mechanism*. Vaccine, 2006. **24**(44-46): p. 6683-90.
82. Zhou, N.N., et al., *Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs*. J Virol, 1999. **73**(10): p. 8851-6.
83. Octaviani, C.P., et al., *Reassortment between seasonal and swine-origin H1N1 influenza viruses generates viruses with enhanced growth capability in cell culture*. Virus Res, 2010.
84. Starick, E., et al., *Re-assorted pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus discovered from pigs in Germany*. J Gen Virol, 2011.
85. Zhou, H., et al., *Emergence of novel reassortant H3N2 influenza viruses among ducks in China*. Arch Virol, 2011.
86. Subbarao, E.K., W. London, and B.R. Murphy, *A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range*. J Virol, 1993. **67**(4): p. 1761-4.
87. Hatta, M., et al., *Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses*. Science, 2001. **293**(5536): p. 1840-2.
88. Massin, P., S. van der Werf, and N. Naffakh, *Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses*. J Virol, 2001. **75**(11): p. 5398-404.
89. Li, C., et al., *Reassortment between avian H5N1 and human H3N2 influenza viruses creates hybrid viruses with substantial virulence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(10): p. 4687-92.
90. Taubenberger, J.K., et al., *Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus*. Science, 1997. **275**(5307): p. 1793-6.
91. Kobasa, D., et al., *Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus*. Nature, 2007. **445**(7125): p. 319-23.
92. Morens, D.M., J.K. Taubenberger, and A.S. Fauci, *Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness*. J Infect Dis, 2008. **198**(7): p. 962-70.
93. Collins, P.J., et al., *Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants*. Nature, 2008. **453**(7199): p. 1258-61.
94. Enami, M., et al., *An influenza virus containing nine different RNA segments*. Virology, 1991. **185**(1): p. 291-8.
95. Bancroft, C.T. and T.G. Parslow, *Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza A virus genome*. J Virol, 2002. **76**(14): p. 7133-9.
96. Hutchinson, E.C., et al., *Mutational analysis of cis-acting RNA signals in segment 7 of influenza A virus*. J Virol, 2008. **82**(23): p. 11869-79.
97. McGeoch, D., P. Fellner, and C. Newton, *Influenza virus genome consists of eight distinct RNA species*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(9): p. 3045-9.
98. Noda, T., et al., *Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles*. Nature, 2006. **439**(7075): p. 490-2.



99. Moules, V., et al., *In vitro characterization of naturally occurring influenza H3NA-viruses lacking the NA gene segment: toward a new mechanism of viral resistance?* Virology, 2010. **404**(2): p. 215-24.
100. Fujii, Y., et al., *Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 2002-7.
101. Watanabe, T., et al., *Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes.* J Virol, 2003. **77**(19): p. 10575-83.
102. Liang, Y., Y. Hong, and T.G. Parslow, *cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments.* J Virol, 2005. **79**(16): p. 10348-55.
103. Fujii, K., et al., *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, 2005. **79**(6): p. 3766-74.
104. Muramoto, Y., T. Noda, and Y. Kawaoka, [*Selective packaging mechanism for influenza A virus*]. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2006. **51**(11): p. 1596-601.
105. Marsh, G.A., R. Hatami, and P. Palese, *Specific residues of the influenza A virus hemagglutinin viral RNA are important for efficient packaging into budding virions.* J Virol, 2007. **81**(18): p. 9727-36.
106. Ozawa, M., et al., *Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication.* J Virol, 2007. **81**(1): p. 30-41.
107. Ozawa, M., et al., *Nucleotide sequence requirements at the 5' end of the influenza A virus M RNA segment for efficient virus replication.* J Virol, 2009. **83**(7): p. 3384-8.
108. Gog, J.R., et al., *Codon conservation in the influenza A virus genome defines RNA packaging signals.* Nucleic Acids Res, 2007. **35**(6): p. 1897-907.
109. Liang, Y., et al., *Mutational analyses of packaging signals in influenza virus PA, PB1, and PB2 genomic RNA segments.* J Virol, 2008. **82**(1): p. 229-36.
110. Marsh, G.A., et al., *Highly conserved regions of influenza a virus polymerase gene segments are critical for efficient viral RNA packaging.* J Virol, 2008. **82**(5): p. 2295-304.
111. Fujii, Y., et al., [*The enigma of influenza virus genome packaging revealed*]. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2003. **48**(10): p. 1357-63.
112. Fujii, K., et al., *Incorporation of influenza A virus genome segments does not absolutely require wild-type sequences.* J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 7): p. 1734-40.
113. Nelson, M.I., et al., *Multiple reassortment events in the evolutionary history of H1N1 influenza A virus since 1918.* PLoS Pathog, 2008. **4**(2): p. e1000012.
114. Deyde, V., et al., *Genomic events underlying the changes in adamantane resistance among influenza A(H3N2) viruses during 2006-2008.* Influenza Other Respi Viruses, 2009. **3**(6): p. 297-314.
115. Furuse, Y., et al., *Reversion of influenza A (H3N2) virus from amantadine resistant to amantadine sensitive by further reassortment in Japan during the 2006-to-2007 influenza season.* J Clin Microbiol, 2009. **47**(3): p. 841-4.
116. Ito, T., et al., *Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential.* J Virol, 1998. **72**(9): p. 7367-73.
117. Moreno, A., et al., *Novel swine influenza virus subtype H3N1 in Italy.* Vet Microbiol, 2009. **138**(3-4): p. 361-7.
118. Yu, H., et al., *Isolation and genetic characterization of avian-like H1N1 and novel reassortant H1N2 influenza viruses from pigs in China.* Biochem Biophys Res Commun, 2009. **386**(2): p. 278-83.
119. Yassine, H.M., et al., *Characterization of triple reassortant H1N1 influenza A viruses from swine in Ohio.* Vet Microbiol, 2009. **139**(1-2): p. 132-9.

120. Naffakh, N. and S. van der Werf, *April 2009: an outbreak of swine-origin influenza A(H1N1) virus with evidence for human-to-human transmission*. *Microbes Infect*, 2009. **11**(8-9): p. 725-8.
121. Zhou, N.N., et al., *Emergence of H3N2 reassortant influenza A viruses in North American pigs*. *Vet Microbiol*, 2000. **74**(1-2): p. 47-58.
122. Belshe, R.B., *The origins of pandemic influenza--lessons from the 1918 virus*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(21): p. 2209-11.
123. Pappas, C., et al., *Single gene reassortants identify a critical role for PB1, HA, and NA in the high virulence of the 1918 pandemic influenza virus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(8): p. 3064-9.
124. Itoh, Y., et al., *In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses*. *Nature*, 2009. **460**(7258): p. 1021-5.
125. Munier, S., et al., [*Interspecies transmission, adaptation to humans and pathogenicity of animal influenza viruses*]. *Pathol Biol (Paris)*, 2010. **58**(2): p. e59-68.
126. Jackson, S., et al., *Reassortment between avian H5N1 and human H3N2 influenza viruses in ferrets: a public health risk assessment*. *J Virol*, 2009. **83**(16): p. 8131-40.
127. Ottmann, M., et al., *Novel influenza A(H1N1) 2009 in vitro reassortant viruses with oseltamivir resistance*. *Antivir Ther*, 2010. **15**(5): p. 721-6.
128. Octaviani, C.P., et al., *High level of genetic compatibility between swine-origin H1N1 and highly pathogenic avian H5N1 influenza viruses*. *J Virol*, 2010. **84**(20): p. 10918-22.
129. Gao, Q. and P. Palese, *Rewiring the RNAs of influenza virus to prevent reassortment*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(37): p. 15891-6.
130. Li, C., et al., *Compatibility among polymerase subunit proteins is a restricting factor in reassortment between equine H7N7 and human H3N2 influenza viruses*. *J Virol*, 2008. **82**(23): p. 11880-8.
131. Chen, L.M., et al., *Genetic compatibility and virulence of reassortants derived from contemporary avian H5N1 and human H3N2 influenza A viruses*. *PLoS Pathog*, 2008. **4**(5): p. e1000072.
132. Noda, T. and Y. Kawaoka, *Structure of influenza virus ribonucleoprotein complexes and their packaging into virions*. *Rev Med Virol*, 2010. **20**(6): p. 380-91.
133. Baudin, F., et al., *Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent*. *EMBO J*, 1994. **13**(13): p. 3158-65.
134. Regan, J.F., Y. Liang, and T.G. Parslow, *Defective assembly of influenza A virus due to a mutation in the polymerase subunit PA*. *J Virol*, 2006. **80**(1): p. 252-61.
135. Hoffmann, E., et al., *A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(11): p. 6108-13.