



HAL
open science

Effet de la balance hémagglutinine/neuraminidase sur la fréquence de co-infections chez les virus influenza A et impact des co-infections hétérotypiques entre virus influenza A et B

Nicolas Malausse

► To cite this version:

Nicolas Malausse. Effet de la balance hémagglutinine/neuraminidase sur la fréquence de co-infections chez les virus influenza A et impact des co-infections hétérotypiques entre virus influenza A et B. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP7229 . tel-03408533

HAL Id: tel-03408533

<https://theses.hal.science/tel-03408533>

Submitted on 29 Oct 2021

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 Doctorat Université de Paris

École doctorale BioSPC – Bio Sorbonne Paris Cité – ED 562

Unité de Génétique Moléculaire des Virus à ARN



Effet de la balance hémagglutinine/neuraminidase sur la fréquence de co-infections chez les virus influenza A et impact des co-infections hétérotypiques entre virus influenza A et B

Par Nicolas, Marc Malausse

Thèse de doctorat en Infectiologie – Spécialité Virologie

Dirigée par le Dr. Sandie Munier

Présentée et soutenue publiquement à l'Institut Pasteur de Paris, le 20 novembre 2020

Devant un jury composé de :

Président du jury : Pr. Pierre-Emmanuel Ceccaldi, Professeur des Universités, Université de Paris, France

Rapporteur : Dr. Stéphane Blanc, Directeur de recherche, INRA Montpellier, France

Rapporteur : Dr. Maria-Isabel Thoulouze, Chargée de recherche, École Nationale Vétérinaire de Toulouse, France

Examineur : Dr. Olivier Terrier, Chargé de recherche, ENS Lyon et Université Claude Bernard Lyon, France

Examineur : Dr. Roland Marquet, Directeur de recherche, Université de Strasbourg, France

Membre invité : Dr. Nadia Naffakh, Directrice de recherche, Institut Pasteur de Paris, France

Membre invité : Pr. Sylvie van der Werf, Professeur des Universités, Université de Paris, France

Directrice de thèse : Dr. Sandie Munier, Maître de Conférences, Université de Paris, France



Except where otherwise noted, this is work licensed under
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Résumé

Titre de la thèse :

Effet de la balance hémagglutinine/neuraminidase sur la fréquence de co-infections chez les virus influenza A et impact des co-infections hétérotypiques entre virus influenza A et B.

Résumé :

Les virus influenza A (IAV) et B (IBV) sont des virus appartenant à la famille des Orthomyxoviridae dont le génome est composé de huit segments d'ARN monocaténaux de polarité négative. Les virus IAV et IBV sont responsables des épidémies saisonnières de grippe chez l'Homme. Lors de la co-infection d'une cellule par différents sous-types de virus IAV, la nature segmentée du génome mène à la formation de « virus réassortants » dont le génome est composé d'un mélange des segments parentaux et pouvant avoir un potentiel pandémique. Les co-infections jouent donc un rôle majeur dans l'évolution des virus influenza en permettant la réalisation de réassortiments mais également en favorisant la complémentarité génétique entre particules virales, augmentant ainsi la diversification de la population virale. Des mécanismes permettant de favoriser ou de limiter les co-infections ont été décrits pour de nombreux virus mais sont largement méconnus pour les virus influenza. Le premier objectif de ces travaux de thèse a été d'optimiser un système probabiliste permettant la quantification des événements de co-infections homotypiques entre virus IAV par cytométrie en flux. Le second objectif a été d'utiliser ce système pour mesurer l'impact de la balance entre les activités des deux glycoprotéines de surface, l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA), sur la fréquence de co-infections. Enfin, le troisième objectif a été de mesurer l'incidence des coinfections hétérotypiques sur les capacités répliquatives des virus IAV et IBV.

Les événements de co-infection ont été quantifiés par cytométrie en flux en utilisant des couples de virus influenza recombinants dont chaque partenaire exprime un rapporteur fluorescent différent, mCherry ou GFP. Deux couples possédant des balances HA/NA plus ou moins équilibrées ont été produits et caractérisés afin de mesurer l'impact de la balance HA/NA sur le degré d'agrégation des particules virales et donc sur la fréquence de co-infections. Brièvement, des cellules ont été co-infectées par des quantités équivalentes de virus au sein de chaque couple, la fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux et les données ont été analysées à l'aide du modèle probabiliste optimisé. L'implémentation du modèle probabiliste permet d'inclure sept combinaisons d'agrégations et cent-soixante et onze combinaisons entre particules virales et agrégats aboutissant à une co-infection. Nous avons montré que la balance HA/NA n'affectait pas la fréquence de co-infections chez les virus IAV dans les conditions testées. Une tendance a cependant été observée avec une légère augmentation de la fréquence de co-infections pour la condition où l'activité NA est plus faible. Une activité trop faible de la neuraminidase pourrait augmenter le nombre d'agrégats entre particules virales en empêchant la dissociation entre les virions, induisant ainsi une augmentation des co-infections. Pour étudier l'effet des infections hétérotypiques entre virus IAV et IBV, nous avons utilisé un virus IAV exprimant la GFP et un virus IBV exprimant la mCherry. Nous avons montré que l'infection préalable de cellules A549 par le virus IAV augmentait la sensibilité des cellules à l'infection par le virus IBV. L'intensité de l'infection par le virus IBV est également augmentée dans les cellules co-infectées.

Ces travaux de thèse ont permis d'optimiser un système robuste de mesure de la fréquence de co-infections chez les virus influenza A par cytométrie en flux. Ce système pourrait être utilisé pour mesurer l'effet de nombreux facteurs cellulaires et viraux sur la fréquence de co-infections chez les virus IAV ou d'autres virus. La caractérisation des mécanismes impliqués dans l'augmentation de la sensibilité cellulaire à l'infection par IBV suite à une infection par IAV pourrait permettre de mieux comprendre les co-infections hétérotypiques chez les virus influenza.

Mots-clés :

Virologie, Influenza A, Influenza B, Co-infections, Balance hémagglutinine/neuraminidase, Fluorescence, Suppression de super-infections

Abstract

Title:

Impact of the hemagglutinin/neuraminidase balance on co-infection frequency of influenza A viruses and consequences of influenza A and B heterotypic co-infections.

Abstract:

Influenza A (IAV) and B (IBV) viruses belong to the Orthomyxoviridae family. The genome is composed of eight negative single-stranded RNA segments. The IAV and IBV viruses are responsible for seasonal influenza epidemics in humans. Upon co-infection of a cell with different subtypes of IAV virus, the segmented nature of the genome leads to the formation of "reassortant viruses" whose genome is composed of a mixture of parental genomic segments and may have pandemic potential. Co-infections therefore play a major role in the evolution of influenza viruses allowing genetic reassortment but also by promoting genetic complementation between viral particles, thus increasing the diversification of the viral population. Mechanisms allowing or limiting co-infections events have been described for many viruses but are not widely understood for influenza viruses. The first objective of my PhD was the optimization of a probabilistic system allowing the quantification of homotypic co-infection events between IAV viruses by flow cytometry. The second objective was to use this system to measure the impact of the balance between the activities of the two surface glycoproteins, hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA), on the frequency of co-infections. Finally, the third objective was to measure the impact of IAV and IBV heterotypic coinfections on the replicative capacities of IAV and IBV.

The co-infection events were quantified by flow cytometry using couples of recombinant influenza viruses in which each partner virus expresses a different fluorescent reporter, mCherry or GFP. Two couples with distinct balanced HA/NA were produced and characterized in order to measure the impact of the HA / NA balance on the level of aggregation of viral particles and therefore on the frequency of co-infections. Briefly, cells were co-infected with equivalent amounts of virus within each couple, fluorescence was then measured by flow cytometry, and data were analyzed using the optimized probabilistic model. The implementation of the probabilistic model makes it possible to include seven combinations of aggregations and one hundred and seventy-one combinations between viral particles and aggregates resulting in co-infection. We have shown that the HA/NA balance does not affect the frequency of co-infections in IAV viruses under the conditions tested. A trend was however observed with a slight increase in the frequency of co-infections for the condition where the NA activity was lower. Too low neuraminidase activity could increase the number of aggregates between viral particles by preventing dissociation between virions, thus inducing an increase in co-infections. To study the effect of heterotypic infections between IAV and IBV, we used an IAV expressing GFP and an IBV expressing mCherry. We have shown that prior infection of A549 cells with the IAV increases the susceptibility of cells to infection with the IBV. The proportion of cells infected with the IBV is also increased in co-infected cells.

The work detailed in this thesis manuscript presents the optimization of a robust system for measuring the frequency of co-infections in influenza A viruses by flow cytometry. This system could be used to measure the effect of many cellular and viral factors on the frequency of co-infections for IAV or other viruses. The characterization of the mechanisms involved in the increase in cellular sensitivity to IBV infection following an IAV infection could provide a better understanding of heterotypic influenza virus co-infections.

Keywords:

Virology, Influenza A, Influenza B, Co-infections, Hemagglutinin/neuraminidase balance, Fluorescence, Superinfections suppression

Remerciements

Je voudrais dans un premier temps remercier mes rapporteurs : le Dr. Stéphane Blanc et le Dr. Maria-Isabel Thoulouze pour avoir accepté de prendre part à mon jury de thèse et pour avoir accepté d'évaluer minutieusement mon manuscrit. Je souhaite également remercier le Dr. Roland Marquet et le Dr. Olivier Terrier pour avoir accepté de rejoindre mon jury en tant qu'examineur. Enfin, je souhaite remercier chaleureusement le Pr. Pierre-Emmanuel Ceccaldi d'avoir accepté de prendre la présidence de mon jury et d'ainsi y représenter le côté Corse.

Merci à l'école doctorale BioSPC et à l'Université de Paris qui ont financé mon Doctorat et monitorat durant ces trois années. Merci au département Virologie de l'Institut Pasteur de Paris pour les deux mois complémentaires m'ayant permis de finaliser ces travaux de thèse.

Je souhaite vivement remercier le Professeur Sylvie van der Werf qui m'a accueilli dans son laboratoire il y a maintenant plus de quatre ans lors d'un stage de Master 1 suite auquel j'ai choisi de poursuivre en Master 2 puis en thèse. Merci également pour les échanges scientifiques toujours très intéressants au cours de ces années. Merci encore de m'avoir toujours soutenu et d'avoir accepté de diriger ma thèse durant une période transitoire.

Je souhaite ensuite remercier le Dr Sandie Munier d'avoir accepté de diriger mes stages de Master puis, par la suite, mes travaux de recherche en Doctorat. Merci pour ses idées et sa rigueur scientifique. Je souhaite également la remercier pour m'avoir soutenu et conseillé lors de mes enseignements à l'Université. Merci donc pour son soutien, sa bonne humeur, son sens de l'organisation et ses conseils ! Merci d'avoir été là au cours de toutes ces années et d'avoir su canaliser le trop plein d'énergie ou d'enthousiasme dont je peux parfois faire preuve ! Merci d'avoir également amélioré mon côté pointilleux, au grand dam des autres membres du laboratoire ! De plus, il est toujours agréable de pouvoir discuter d'autres choses que de travail avec sa directrice de thèse, merci également pour cela !

Des remerciements très chaleureux au Dr. Nadia Naffakh pour m'avoir accueilli dans son équipe de recherche au cours de mon Master 2 puis durant les deux premières années de thèse et pour avoir continué à travailler avec nous par la suite. Merci pour son apport scientifique très précieux, ses conseils, son écoute et sa grande disponibilité, j'ai vraiment pris plaisir lors de nos discussions au cours de ces années.

Au Dr. Catherine Isel pour sa disponibilité, son écoute, ses conseils et son sourire, MERCI ! Sa gentillesse et sa bienveillance au quotidien sont deux qualités qui ont toujours participé à mettre de la bonne humeur même dans les journées compliquées. Merci également pour les nombreuses pâtisseries tout au long de ces années qui vont me manquer par la suite !

Au Dr. Caroline Demeret pour sa disponibilité et sa gentillesse. Merci pour le temps accordé et pour les échanges même lorsque le moment n'était pas opportun. Merci pour ta bonne humeur, ton rire et tes conseils durant ces quelques années au laboratoire.

Au Dr. Bernadette Crescenzo-Chaigne et à ses râlements quotidiens qui méritent d'être mentionnés ! Merci pour sa disponibilité et pour les échanges. A son agréable compagnie et à nos discussions lors de longues heures en P2+.

Au Dr. Yves Jacob et Dr. Patricia Cassonnet pour les longues discussions, leur humour et leur disponibilité. Merci également pour vos idées et les fous rires à vous écouter parler des nombreuses maladroites du robot Tecan « Déglingo »

Au Dr. Marion Declercq et à Mélanie Albert, pour m'avoir toujours soutenu et sans qui cette thèse n'aurait pas eu son pareil. A leur disponibilité, à leurs conseils et à nos fous rires. Merci de m'avoir écouté, supporté et accompagné dans de nombreuses d'aventures aussi bien scientifiques que surprenantes. Je suis heureux de vous avoir rencontré et je suis certain que ce chapitre qui se clôt ne marquera pas pour autant la fin de cette aventure ! Je pense que le son de nos rires résonnera encore de nombreuses années dans les couloirs du laboratoire ou de l'Institut.

Merci à mon collègue doctorant Valentin Ozeel à qui je souhaite tout le meilleur pour la suite de sa thèse.

Je tiens à remercier tous les membres actuels et passés de l'unité GMVR et RBIV avec qui j'ai pu échanger au cours de ces années : Dr. Usama Ashraf, Dr. Elise Biquand, Dr. Magda Cannata Serio, Dr. Patricia Cassonnet, Dr. Kuang-Yu Chen, Dr. David Courtney, Anne-Marie Filodeau, Dr. Guillaume Fournier, Dr. Marwah Karim, Dr. Anastassia Komarova, Dr. Tim Krischuns, Sylvain Paisant, Yannis Rahou et Sarah Razafindrakoto.

Merci à l'équipe actuelle et les membres passés du CNR des virus respiratoires dont la grippe : Marion Barbet, Dr. Sylvie Behillil, Marine Bernard, Angéla Brisbarre, Solenne Brun, Océane Dehan, Flora Donati et Dr. Vincent Enouf pour leur bonne humeur, leur sympathie et leur aide pour certaines manip.

Également, un grand merci aux filles de la plateforme P2M pour leur aide et leur bonne humeur constante.

Many thanks to Dr. Borja Rodriguez-de-Francisco for his help, precious support, friendship and craziness; leading StaPa association with you during my first year was a real pleasure.

Je tiens à remercier le Dr. Barbara Quioc pour les longues heures de discussions, sa folie et sa créativité, un grand merci aux nombreuses couleurs !

Merci à tous les copains sur le campus pour les longues discussions, les apéros et les débats animés : Dr. Florian Bakoa, Dr. Guillaume Beauclair, Dr. Souheyla Benfried, Dr. Lucie Danet, Mélanie Dos Santos, Dr. Vincent Houé.

To the actual and former StaPa bureau members, I had a real nice time co-leading the association or working on some projects with you! Wishing you all the best for the future!

A Laurina Benedetti et Kevin Piacentini, pour ces années d'amitié, à leur soutien dans toutes les circonstances et pour nos (très) longues heures de discussions à refaire le monde ! Malgré la distance, vous avez toujours été très présents et pour cela je vous en remercie chaleureusement.

A Thomas Poli, qui depuis Bastia, Paris ou New-York a toujours été disponible et m'a soutenu depuis le début sur bien des aspects, Merci !

A mes amis Nicolas Eugénie et Oulimata Ndoye, avec qui tout a commencé il y a 5 ans maintenant et qui ont toujours répondu présents peu importe l'événement. Je ne compte pas le nombre d'apéros, de dîners, de journées et de fous rires à vos côtés. Merci !

A Claire Lagrange pour son soutien, les cours de sport et son grain de folie, apportant toujours une bouffée d'oxygène lorsque cela est nécessaire. Comment réinventer le monde avec une bouteille de vin, un bon dîner et du sarcasme pourrait être la description de nombreux de ces moments. Merci !

Un clin d'oeil au noyau dur de Master 1 pour leur soutien depuis le début et pour tous ces bons moments. Également, un remerciement bien particulier à Marine Serralta, à Amandine Picart et à Florent Marty.

A l'équipe insulaire : Catherine Albertini, Guillaume Dominici, Laura Zuccarelli, Laurianne Stuart, Maëva Pasqualini, Mattéo Maestracci, Maxime Sartori et Mélanie Pasqualini, merci de m'avoir intégré lors de mon arrivée à Paris, merci de m'avoir fait découvrir Paris et m'avoir permis de retrouver un peu de Bastia au quotidien. Sans vous, mon arrivée et cette aventure auraient été bien différentes. Je suis fier de vous compter parmi mes amis.

Une pensée pour mes amis Bastiais que je n'oublie pas malgré la distance, c'est toujours un plaisir de vous retrouver chaque été et de profiter à vos côtés d'une bouffée d'oxygène.

Un grand merci à Christophe Dang pour m'avoir accompagné au quotidien particulièrement pendant la période d'écriture, pour ses conseils, sa patience et pour la relecture.

A toute ma famille, que je n'oublie pas même si je ne suis plus sur l'île au quotidien et que je souhaite remercier pour leur soutien durant toutes ces années. Retrouver vos sourires à chacun de mes retours a toujours été un plaisir.

Enfin, je ne peux clôturer cette partie sans remercier mes parents et mon frère pour m'avoir toujours soutenu et encouragé au cours de ces années. Merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir permis et aidé à en arriver là aujourd'hui. Merci de m'avoir écouté pendant des heures parfois pour discuter, parfois pour râler et quelques fois pour douter. Vous avez toujours été là lorsque j'en ai eu besoin, sans votre présence et soutien, je n'aurais pas pu vivre cette aventure de la même façon et, à bien des égards, je vous en remercie !

Table des matières

RESUME	A
ABSTRACT	B
REMERCIEMENTS	C
TABLE DES MATIERES	F
TABLE DES FIGURES	I
TABLE DES TABLEAUX.....	J
LISTE DES ABREVIATIONS	K
INTRODUCTION.....	1
I. VIRUS ET CO-INFECTIONS	1
1. INTERET DES CO-INFECTIONS HOMOTYPIQUES.....	2
1.1. <i>Augmentation de la transmissibilité virale</i>	4
1.2. <i>Adaptabilité du virus et infection en conditions non propices</i>	5
1.3. <i>Co-infections et diversité génétique</i>	6
1.4. <i>Co-infections et coopérations virales</i>	7
1.5. <i>Co-infections et interactions négatives</i>	8
2. MECANISMES FAVORISANTS LES CO-INFECTIONS	10
2.1. <i>Polypléidie virale</i>	11
2.2. <i>Agrégation entre particules virales</i>	12
2.3. <i>Groupements atypiques : corps d'occlusion</i>	14
2.4. <i>Transfert collectif de virus : vésicules de transport extracellulaire</i>	14
2.5. <i>Transfert direct de virus par échange entre cellules</i>	15
3. CONSEQUENCES DES CO-INFECTIONS VIRALES	18
3.1. <i>Conséquences pour les virus</i>	19
3.2. <i>Conséquences pour l'hôte</i>	20
4. METHODES DE DETECTION DES CO-INFECTIONS	22
II. VIRUS INFLUENZA : GENERALITES, EVOLUTION ET CO-INFECTIONS	27
1. CLASSIFICATION ET NOMENCLATURE DES VIRUS INFLUENZA.....	27
2. CARACTERISTIQUES ET CYCLE DE REPLICATION DES VIRUS INFLUENZA A ET B.....	29
2.1. <i>Particule virale</i>	29
2.2. <i>Génome et protéines virales</i>	32
2.3. <i>Récepteur viral</i>	37
2.4. <i>Cycle viral</i>	39
3. ÉPIDEMIOLOGIE VIRALE ET EVOLUTION	43
3.1. <i>Épidémiologie</i>	43
3.1.1 Hôtes et réservoir	43
3.1.2 Infection saisonnière chez l'Homme	45
3.1.3 Traitements et vaccination	46
3.2. <i>Évolution</i>	48
3.2.1 Mécanismes d'évolution.....	48
3.2.1. De la pandémie à l'épidémie : histoire de l'évolution	51
4. CO-INFECTIONS CHEZ LES VIRUS INFLUENZA	54
4.1. <i>Co-infections avec d'autres pathogènes</i>	54
4.2. <i>Co-infections homotypiques</i>	55
4.3. <i>Co-infections hétérotypiques</i>	61
4.4. <i>Facteurs pouvant affecter le transfert collectif de particules virales chez les virus influenza</i>	63

OBJECTIFS	66
MATERIEL & METHODES.....	67
I. CELLULES, VIRUS, BACTERIES ET PLASMIDES.....	67
1. CELLULES	67
2. VIRUS.....	68
3. BACTERIES.....	68
4. PLASMIDES UTILISES POUR LA GENETIQUE INVERSE.....	69
4.1. <i>Structure des plasmides</i>	69
4.2. <i>Préparation des inserts</i>	70
4.3. <i>Ligature, transformation et purification des plasmides</i>	71
5. AUTRES PLASMIDES	72
II. DEVELOPPEMENT DU MODELE PROBABILISTIQUE	73
1. R ET RSTUDIO	73
2. SCRIPTS, FIGURES ET STATISTIQUES	73
III. EFFET DE LA BALANCE HA/NA SUR LA FREQUENCE DE CO-INFECTIONS	74
1. PRODUCTION ET CARACTERISATION DE VIRUS RECOMBINANTS.....	74
1.1. <i>Génétique inverse</i>	74
1.2. <i>Amplification des virus et purification à partir des plages de lyse</i>	74
1.3. <i>Caractérisation génotypique des stocks viraux</i>	75
1.4. <i>Caractérisation phénotypique des stocks viraux</i>	75
2. ANALYSE FONCTIONNELLE DES VIRUS RECOMBINANTS	77
2.1. <i>Test de la sensibilité cellulaire à l'infection</i>	77
2.2. <i>Infection en conditions de cycle multiple : cinétique de croissance</i>	77
3. DETERMINATION DE L'IMPACT DE LA BALANCE HA/NA SUR LA FREQUENCE DE CO-INFECTIONS	78
3.1. <i>Préparation des cellules et des dilutions virales</i>	78
3.2. <i>Production de virus sous les différentes conditions de balance HA/NA</i>	78
3.3. <i>Analyse de la fréquence de co-infections</i>	78
IV. IMPACT DES CO-INFECTIONS HETEROTYPIQUES ENTRE VIRUS INFLUENZA A ET B	80
1. GENETIQUE INVERSE.....	80
2. AMPLIFICATION DES VIRUS ET PURIFICATION A PARTIR DES PLAGES DE LYSE	80
3. INACTIVATION DES VIRUS AUX UV	81
4. CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES STOCKS VIRAUX	81
4.1. <i>Mesure du titre infectieux en plage de lyse</i>	81
4.2. <i>Mesure du titre en particules physiques par RT-PCR quantitative du segment M (IAV) et HA (IBV).</i>	81
5. ANALYSE FONCTIONNELLE DES VIRUS RECOMBINANTS	81
5.1. <i>Infection en conditions de cycle multiple : cinétique de croissance</i>	81
5.2. <i>Expression de la nucléoprotéine virale lors de l'infection</i>	82
6. SYSTEME DE MESURE DES CO-INFECTIONS HETEROTYPIQUES	82
6.1. <i>Mesure de la proportion de cellules positives en fluorescence suite à l'infection par les virus IAV-GFP et IBV-mCherry</i>	82
6.2. <i>Mesure de la proportion de cellules positives en fluorescence suite à l'infection par les virus IAV (A/WSN/33) et IBV (B/Brisbane/60/2008)</i>	83
6.3. <i>Utilisation de drogues lors de la co-infection virale entre IAV et IBV</i>	84
RESULTATS.....	85
I. OUTIL DE MESURE DE LA FREQUENCE DE CO-INFECTIONS	85
1. PRODUCTION ET CARACTERISATION DE VIRUS INFLUENZA RECOMBINANTS EXPRIMANT DES PROTEINES FLUORESCENTES	85
2. SYSTEME DE MESURE DE LA FREQUENCE DE CO-INFECTIONS POUR LES VIRUS INFLUENZA A	87
3. OPTIMISATION D'UN MODELE PREEXISTANT	89

II. IMPACT DE LA MODULATION DE LA BALANCE HEMAGGLUTININE/ NEURAMINIDASE SUR LA FREQUENCE DE CO-INFECTIONS.....	95
1. PRODUCTION ET CARACTERISATION DES STOCKS DE VIRUS RECOMBINANTS FLUORESCENTS POSSEDANT DIFFERENTS EQUILIBRES DE BALANCE HA/NA.....	96
1.1. <i>Sélection de deux souches virales circulantes lors de la saison 2007-2008.....</i>	96
1.2. <i>Production des virus recombinants fluorescents possédant différents équilibres de balance HA/NA</i>	97
1.3. <i>Caractérisation du potentiel infectieux des virus obtenus.....</i>	98
2. MESURE DE L'IMPACT DE LA BALANCE HA/NA SUR LA FREQUENCE DE CO-INFECTIONS	104
2.1. <i>Sélection des données exploitables</i>	104
2.2. <i>Linéarité de $P_{RV_calculée} = f(P_{RV_observée})$</i>	105
2.3. <i>Évolution de la fréquence de co-infections.....</i>	106
III. CO-INFECTIONS HETEROTYPIQUES ENTRE IAV ET IBV.....	109
1. PRODUCTION ET CARACTERISATION DES VIRUS IAV ET IBV RECOMBINANTS FLUORESCENTS	109
1.1. <i>Production</i>	109
1.2. <i>Caractérisation du potentiel infectieux des virus obtenus.....</i>	110
2. SYSTEME DE DETECTION DES CO-INFECTIONS HETEROTYPIQUES ENTRE IAV ET IBV	114
2.1. <i>Effet de l'infection par les virus influenza B sur les virus influenza A lors de co-infections</i>	115
2.2. <i>Effet de l'infection par les virus influenza A sur les virus influenza B lors de co-infections</i>	117
2.3. <i>Effet de l'infection par des virus IAV-GFP inactivés aux ultraviolets sur l'infection par les virus IBV</i>	117
2.4. <i>Effet de l'infection par la souche IAV (A/WSN/33) sur l'infection par la souche IBV (B/Brisbanne/60/2008)</i>	118
2.5. <i>L'entrée virale et les étapes de transcription/réplication du virus IAV sont nécessaires pour la facilitation de l'infection par le virus IBV.....</i>	119
DISCUSSION	122
I. AVANTAGES ET LIMITES DU SYSTEME DE MESURE DE LA FREQUENCE DE CO-INFECTIONS CHEZ LES VIRUS INFLUENZA A PAR CYTOMETRIE EN FLUX	123
II. IDENTIFICATION DE FACTEURS CELLULAIRES ET VIRAUX POUVANT AFFECTER LA FREQUENCE DE CO-INFECTIONS.....	129
III. INFECTIONS HETEROTYPIQUES ENTRE VIRUS INFLUENZA A ET B.....	134
ANNEXES.....	140
RÉFÉRENCES	146

Table des figures

FIGURE 1 – PRINCIPAUX INTERETS DES CO-INFECTIONS HOMOTYPIQUES	3
FIGURE 2 – MECANISMES DE TRANSFERT COLLECTIF DE PARTICULES VIRALES	10
FIGURE 3 – AGREGATION PHYSIQUE DES PARTICULES VIRALES	13
FIGURE 4 – CONSEQUENCES DES CO-INFECTIONS VIRALES	18
FIGURE 5 – METHODE DE MARQUAGE SPECIFIQUE DES SEGMENTS VIRAUX A L'ECHELLE D'UNE SEULE CELLULE	24
FIGURE 6 – MODELE PROBABILISTIQUE PERMETTANT D'ESTIMER LA PROPORTION DES DIFFERENTS TYPES D'AGREGATS DANS UN STOCK VIRAL	26
FIGURE 7 – PARTICULE DES VIRUS INFLUENZA A	30
FIGURE 8 – ARN VIRAUX, ARN MESSAGERS ET PROTEINES DES VIRUS INFLUENZA A	33
FIGURE 9 – DISTRIBUTION DES RECEPTEURS AUX VIRUS INFLUENZA DANS L'ARBRE RESPIRATOIRE	38
FIGURE 10 – CYCLE VIRAL DES VIRUS INFLUENZA A	39
FIGURE 11 – ÉCOLOGIE DES VIRUS INFLUENZA	43
FIGURE 12 – CASSURE ET DERIVE ANTIGENIQUE	48
FIGURE 13 - PANDEMIES DE VIRUS INFLUENZA A DEPUIS 1918	53
FIGURE 14 – CO-INFECTIONS ENTRE PARTICULES INFECTIEUSES ET PARTICULES DEFECTIVES	58
FIGURE 15 - TEMPORALITE DU CYCLE VIRAL POUR LES VIRUS INFLUENZA A	60
FIGURE 16 – BALANCE HEMAGGLUTININE/NEURAMINIDASE FONCTIONNELLE CHEZ L'HOMME	64
FIGURE 17 – EXPRESSION D'UNE PROTEINE FLUORESCENTE A PARTIR DU SEGMENT 1	86
FIGURE 18 – PIPELINE DU SYSTEME DE MESURE DE LA FREQUENCE DE CO-INFECTIONS POUR LES VIRUS INFLUENZA A .	87
FIGURE 19 – MODELE PROBABILISTIQUE PERMETTANT D'INFERER LA PROPORTION D'AGREGATION ENTRE PARTICULES VIRALES	92
FIGURE 20 – EFFET DE LA BALANCE HA/NA SUR L'AGREGATION ENTRE VIRUS INFLUENZA A	95
FIGURE 21 – CARACTERISTIQUES DES VIRUS UTILISES POUR MESURER L'IMPACT DE LA BALANCE HA/NA SUR LA FREQUENCE DE CO-INFECTIONS	97
FIGURE 22 – COMPARAISON DU TITRE INFECTIEUX ET DU TITRE EN PARTICULES PHYSIQUES	100
FIGURE 23 – SENSIBILITE CELLULAIRE A L'INFECTION	101
FIGURE 24 – DETERMINATION DE LA DOSE INFECTIEUSE DE FLUORESCENCE	102
FIGURE 25 – CINETIQUE DE REPLICATION DES VIRUS H275-R, H275-Y, Y275-R, Y275-V SUR CELLULES MDCK-SIAT1	103
FIGURE 26 – REPARTITION ENTRE LES PROPORTIONS DE CELLULES INFECTEES OU CO-INFECTEES EN FONCTION DE LA DILUTION APPLIQUEE	105
FIGURE 27 – ÉVOLUTION DE LA PROPORTION DE CELLULES POSITIVES POUR mCHERRY ET GFP CALCULEE PAR LE MODELE EN FONCTION DE LA PROPORTION OBSERVEE PAR CYTOMETRIE EN FLUX	106
FIGURE 28 – ÉVOLUTION DE LA PROPORTION DE CELLULES CO-INFECTEES (C) EN FONCTION DE LA MOI LORS DE LA MODIFICATION DE LA BALANCE HA/NA	107
FIGURE 29 – TITRE INFECTIEUX ET EN PARTICULES PHYSIQUES DES VIRUS IAV ET IBV RECOMBINANTS FLUORESCENTS	111
FIGURE 30 - CINETIQUE DE REPLICATION DES VIRUS IAV-GFP ET IBV-mCHERRY ET IBV-WT SUR CELLULES MDCK	112
FIGURE 31 – EXPRESSION DE LA NUCLEOPROTEINE VIRALE AU COURS DU TEMPS	113
FIGURE 32 – SYSTEME DE MESURE DES CO-INFECTIONS HETEROTYPIQUES	114
FIGURE 33 – CO-INFECTIONS HETEROTYPIQUES ENTRE LES VIRUS INFLUENZA A ET B	116
FIGURE 34 – EFFET DE L'INACTIVATION AUX UV DU VIRUS IAV-GFP LORS DE LA CO-INFECTION AVEC IBV-mCHERRY	118
FIGURE 35 – INTENSITE MOYENNE ET MEDIANE DE FLUORESCENCE LORS DE LA CO-INFECTION ENTRE IAV ET IBV	119
FIGURE 36 – EFFET DE L'INHIBITION DE L'ENTREE VIRALE ET DE LA TRANSCRIPTION/REPLICATION VIRALE SUR LES INFECTIONS HETEROTYPIQUES IAV/IBV	120

Table des tableaux

TABLEAU 1- PRINCIPALES PROTEINES SYNTHETISEES PAR LES VIRUS INFLUENZA A.....	36
TABLEAU 2 – CARACTERISTIQUES DES VIRUS SELECTIONNES POUR MESURER L’EFFET DE LA BALANCE HA/NA SUR LA FREQUENCE DE CO-INFECTIONS	99
TABLEAU 3– FACTEURS DE DILUTIONS UTILISES POUR LA SELECTION DES DONNEES	104
TABLEAU 4 – PARAMETRES ET RESULTATS DE REGRESSION NON LINEAIRE $C = f(\text{MOI})$	108
TABLEAU 5 – CARACTERISTIQUES DES VIRUS IAV ET IBV RECOMBINANTS FLUORESCENTS	110

Liste des abréviations

aa	Acides aminés
ADN	Acide desoxyribonucléique
ADNc	Acide desoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNc	Acide ribonucléique complémentaire
ARNi	Acide ribonucléique interférent
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNv	Acide ribonucléique viral
AS	Acide sialique
DI	Défective interférente
DIF	Dose infectieuse de fluorescence
DIFx %	Dose infectieuse de fluorescence x %
DNV	Densovirus
FBNSV	"Faba bean necrotic stunt virus" - Virus de la nécrose de la féverole à petits pois
FDA	"Food and Drug Agency" – Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
GFP	"Green Fluorescent Protein" - Protéine de fluorescence verte
HA	Hémagglutinine
hCoV	"Human Coronavirus" - Coronavirus humain
HTLV-1	"Human T-Lymphotropic Virus 1" - Virus T-lymphotropique humain
IAV	"Influenza A virus" - Virus influenza A
IBV	"Influenza B virus" - Virus influenza B
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney cells
MDCK-SIAT1	Madin-Darby Canine Kidney cells - sialyltransferase de type 1
MOI	Multiplicité d'infection
MPV	Metapneumovirus
NA	Neuraminidase
NEP	"Nuclear Export Protein" - Protéine d'export nucléaire

NGS	"New Generation Sequencing" – Sequencage de nouvelle génération
NLS	"Nuclear Localisation Signal" – Signal de localisation nucléaire
NP	Nucléoprotéine
NS1	Protéine non structurale 1
NSP	"Negative Strand Protein" – Protéine du brin négatif
nt	Nucléotides
OMS	Organisation mondiale de la Santé
PA	Protéine acide
PB1	Protéine basique 1
PB2	Protéine basique 2
PCR	'Polymerase chain reaction" - Amplification par polymérisation en chaîne
RBS	"Receptor binding site" - Site de fixation au récepteur
RNP	Ribonucléoprotéine
RNPc	Ribonucléoprotéine complémentaire
RNPv	Ribonucléoprotéine virale
RSV	"Respiratory Syncytial Virus" - Virus respiratoire syncytial
RT-PCR	"Reverse transcription - Polymerase chain reaction" - Transcription inverse - Amplification par polymérisation en chaîne
RT-qPCR	"RT-PCR quantitative
RV	Rhinovirus
SI	Semi-infectieuse
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
UFP	Unité formant plages
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VSV	Virus de la stomatite vésiculaire

Introduction

I. Virus et co-infections

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires dont la survie et l'évolution dépendent en partie de leur capacité à infecter un hôte et à s'y répliquer. Parmi les stratégies développées par les virus, les co-infections, c'est-à-dire l'infection d'une cellule par plusieurs particules virales, permettent l'introduction de plusieurs copies du génome et ainsi de potentialiser l'évolution des virus.

Les phénomènes de co-infections présentés dans ce chapitre peuvent être définis de la manière suivante : « Tout événement d'infection d'une cellule ou d'un organisme par un agent pathogène concomitant ou suivant un événement initial d'infection par un agent pathogène identique ou non. »

Au sein des co-infections nous ferons le *distinguo* entre le type de co-infections, avec d'un côté des co-infections homotypiques, c'est-à-dire entre virus identiques ou de même type, et de l'autre côté les co-infections hétérotypiques, c'est-à-dire entre virus de type différent. La différence entre les modes de co-infections doit être également précisée avec d'un côté des mécanismes d'infections collectives et de l'autre des infections isolées menant à une co-infection. Les co-infections concernant les virus influenza seront présentées en II.4.

Il a longtemps été considéré qu'une particule virale était, seule, une entité nécessaire et suffisante à la réalisation d'une infection productive. Ainsi, le dogme « un génome, une unité infectieuse » a longtemps été soutenu par la communauté scientifique. Cependant, de plus en plus d'études soulignent l'importance des co-infections virales afin de favoriser la survie et l'évolution virale [1-4].

Les événements de co-infections sont observés pour de nombreux virus, indépendamment de la nature du génome (acide désoxyribonucléique ou ribonucléique, ADN et ARN respectivement) ou de son type (linéaire ou segmenté). On trouve par exemple des descriptions de co-infections pour des virus à ARN segmentés, comme les virus influenza [5], ou non segmentés avec le poliovirus [2] et le virus de la stomatite

vésiculaire (VSV) [6]. Les rétrovirus sont également représentés avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [7] et le virus T-lymphotropique humain (HTLV-1) [8]. Des virus à ADN, pouvant ou non infecter l'Homme, sont également décrits avec les baculovirus infectant les insectes [3] ou les virus géants marseillevirus infectant les archées [9].

1. Intérêt des co-infections homotypiques

Il est souvent nécessaire que plusieurs particules virales infectent une même cellule afin de parvenir à une infection complète. Intuitivement, on pourrait penser qu'une infection collective devrait être plus coûteuse pour le virus et donc avoir un impact négatif sur ses capacités répliquatives. Cependant, les observations tendent à démontrer le contraire. On peut expliquer ce phénomène en prenant l'exemple de l'importance des co-infections dans la diversification des quasi-espèces permettant le passage des goulots d'étranglement. Ces derniers peuvent être définis comme des mécanismes locaux ayant pour effet l'empêchement ou la limitation de l'infection virale. Un virus, lors de l'infection, rencontre donc de nombreux goulots d'étranglement. Ces mécanismes peuvent cependant être contournés par une forte diversité virale au sein d'une population, aboutissant *in fine* à une infection productive. La notion de quasi-espèces a été introduite par Esteban Domingo [10] et la dynamique de ces populations lors de l'infection virale a été très étudiée par l'équipe de Marco Vignuzzi [11]. Les principaux intérêts des co-infections pour les populations virales sont présentés en figure 1.

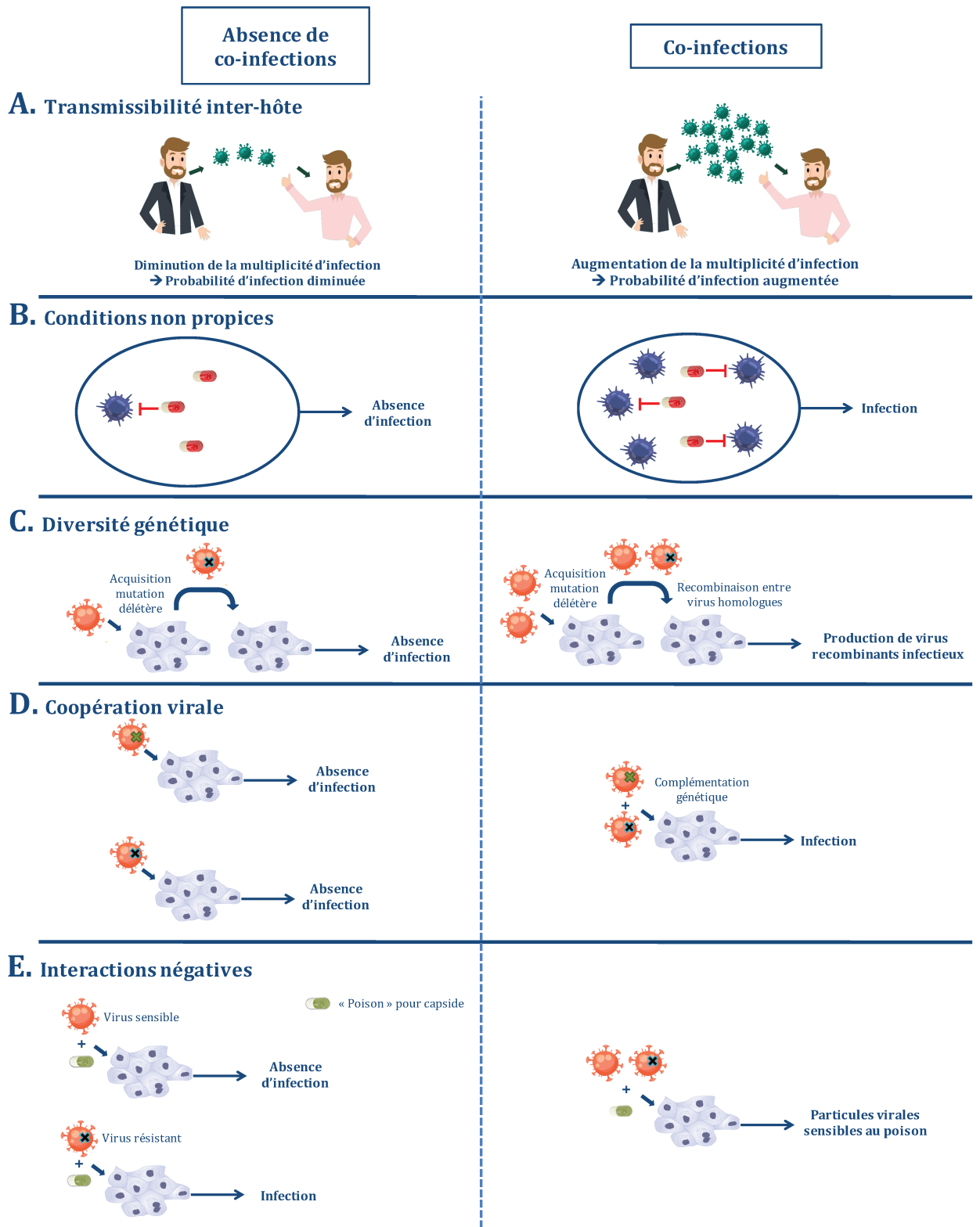


Figure 1 – Principaux intérêts des co-infections homotypiques

A. Augmentation de la transmissibilité inter-hôte : la co-infection de particules virales homotypiques permet d'augmenter la multiplicité d'infection, c'est-à-dire du nombre de particules virales par hôte. Cela permet d'augmenter la probabilité de réalisation d'une transmission inter-hôte efficace. **B.** Infection en conditions non propices : la co-infection de particules homotypiques permet d'augmenter localement le nombre de particules virales et peut permettre, par rapport de force, l'échappement thérapeutique. **C.** Diversité génétique : lors de la réplication du génome viral, des mutations peuvent s'accumuler. La co-infection entre particules virales homotypiques peut permettre l'exclusion des mutations délétères par recombinaison génétique. **D.** Coopération virale : certaines particules virales peuvent échouer dans l'expression de certaines protéines virales menant à l'impossibilité de réaliser une infection productive. La

co-infection entre deux particules homotypiques présentant chacune une ou plusieurs mutations différentes portant atteinte à la production d'une protéine différente peuvent se compléter et ainsi permettre la réalisation d'un cycle infectieux complet. **E. Interactions négatives** : certains entérovirus présentent une sensibilité pour une molécule affectant la capsidie du virus. La co-infection entre un virus sensible et un virus résistant à cette molécule mènera à l'incorporation de protéines de capsidie provenant des deux virus parentaux. Ainsi les virions néoformés seront sensibles à l'action de cette molécule qualifiée de « poison » pour capsidie.

1.1. Augmentation de la transmissibilité virale

La transmissibilité virale peut avoir deux définitions. Dans le cas d'une transmissibilité inter-hôte, elle peut être définie comme une probabilité pour un virus d'être transmis à un hôte et d'y réaliser un cycle infectieux. Dans le cas d'une transmissibilité intra-hôte, il s'agit de la probabilité pour un virus d'être transmis de cellule-à-cellule au sein d'un même hôte. Au sens plus général, une modulation de la transmissibilité revient donc à augmenter ou diminuer la probabilité de transmission efficace d'un virus. Le fondement de ces stratégies repose sur l'augmentation de la multiplicité d'infection ou MOI (« Multiplicity Of Infection »), c'est-à-dire l'augmentation du nombre de particules virales par cellule, ou par hôte lors d'une transmission inter-hôte (figure 1A). Cela permet, dépendamment ou non des goulots d'étranglements, d'augmenter la probabilité de survenue d'une infection productive.

Certains virus présentent un génome dit multipartite, c'est-à-dire qu'il est segmenté et que chaque segment est individuellement empaqueté dans une particule virale. La majorité de ces virus multipartites infecte des plantes avec cependant quatre contre-exemples décrits de virus infectant exclusivement les animaux [12]. L'origine de la nature de ces virus serait la résultante de co-infections à très forte MOI par des virus segmentés ayant abouti à la division de ce génome sous la forme d'un segment par particule [13]. Ces virus multipartites présentent des stratégies d'infections et d'évolutions particulières associées à une organisation génétique parmi les plus déroutantes [14]. Les co-infections sont essentielles pour ces virus afin de permettre l'apport de tous les segments au sein de la même cellule.

Certaines stratégies sont utilisées par les virus afin de favoriser les co-infections. Le virus responsable du ralentissement de la croissance et de la nécrose de la féverole à petits grains (*Vicia faba*), ou FBNSV, est un virus multipartite dont le génome est composé de huit segments, chacun présent dans une particule virale distincte. Ce virus utilise une stratégie d'augmentation locale de la MOI pour potentialiser l'infection [15]. La MOI nécessaire pour obtenir tous les segments dans une même cellule est forte et difficile à obtenir *in vivo*. Afin d'augmenter la MOI sans augmenter la charge virale apportée par

l'inoculum, des mécanismes alternatifs comme un échange d'ARNm viral et de protéines virales entre les cellules par des protéines ou par le bais de plasmodesmes sont mis en place et ont été observés pour le FBNSV [16–18]. Pour ce virus, les évènements de co-infections jouent un rôle majeur en permettant d'augmenter le nombre de particules virales au sein de chaque cellule, augmentant ainsi la probabilité de réaliser une infection productive. La probabilité qu'une cellule reçoive au moins une copie de chacun des segments est ainsi augmentée. D'autres études sont en cours afin d'apporter des éléments de réponses à la compréhension totale de ces mécanismes.

Lors d'une augmentation de la MOI, les transmissibilités virales intra- et inter-hôtes sont plus importantes et l'efficacité d'infection est également augmentée grâce à la survenue d'évènements de co-infections [19].

1.2. Adaptabilité du virus et infection en conditions non propices

En écologie, lorsque les ressources accessibles sont limitées, une augmentation de la densité de population entraine une compétition pour accéder aux ressources et ainsi un déclin de la population. Pour les virus, l'augmentation des co-infections corrèle positivement avec la densité, autrement dit, la compétition entre virions a un effet positif sur la densité de population virale, entraînant son augmentation. Cela pourrait être expliqué par l'effet Allee [4]. On peut définir ce phénomène comme une corrélation positive entre la taille de la population et son taux de croissance. Une diminution de la population virale en dessous d'un certain seuil a des conséquences délétères sur la croissance virale et donc sur la taille de la population menant à sa disparition.

Le VIH est un rétrovirus du genre *lentivirus* responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) chez l'Homme. Le traitement principal contre ce virus repose sur un mélange de plusieurs molécules ciblant différentes étapes du cycle viral afin d'éviter un échappement thérapeutique [20]. Il a été montré que l'infection d'une cellule par plusieurs particules virales permet la réalisation du cycle viral même en présence de molécules antivirales, cela pouvant être expliqué par un effet de masse et par la présence de variants présentant des mutations leur permettant d'échapper à ces molécules (figure 1B) [7, 21]. De même, la transmission groupée du VIH *in vitro*, par un transfert direct de cellule-à-cellule, semble permettre au virus d'échapper à l'effet inhibiteur du facteur de restriction TRIM5 α en comparaison à une transmission non groupée du virus [22].

Les parvovirus sont des virus infectant des cellules engagées dans la phase S du cycle cellulaire. Certains parvovirus ont été décrits comme infectant majoritairement les cellules cancéreuses. Ces dernières présentent une réponse cellulaire diminuée ou un métabolisme différent permettant la réalisation de l'infection virale. Ces parvovirus sont utilisés en oncologie afin de traiter des cancers comme les glioblastomes (pour revue [23, 24]). Les résultats obtenus *in vitro* montrent une régression tumorale lors de leur utilisation à faible MOI [25]. La capacité à infecter des cellules induisant une réponse cellulaire est restaurée lors de l'infection à forte MOI par ces virus. Les co-infections jouent un rôle dans le tropisme de ces virus en leur permettant d'échapper à la réponse cellulaire.

1.3. **Co-infections et diversité génétique**

La diversité génétique virale peut être fortement réduite lors de pressions de sélections exercées par les goulots d'étranglements. Les populations virales présentent une croissance exponentielle et rapide dans le temps, avec des taux de mutations plus élevés que pour d'autres espèces [26]. Le fort taux de croissance associé à l'accumulation de mutations délétères peut, en absence de recombinaison, mener à une extinction de la population virale. Cette extinction est représentée ici par l'impossibilité de réaliser une infection productive. Ce phénomène s'appelle le cliquet de Muller [27, 28]. Les co-infections, en apportant de multiples copies de génomes viraux, permettent des recombinaisons entre génomes comme décrit chez les entérovirus, limitant ainsi l'impact de certaines mutations délétères (figure 1C). Les entérovirus et coxsackievirus sont des virus de la famille des *Picornaviridae*, du genre *Enterovirus* [29] qui sont décrits pour faire des recombinaisons inter- et intra-espèces [30]. Des données épidémiologiques ont montré une co-circulation entre les entérovirus 71 et le coxsackievirus A16, responsables du syndrome pied-main-bouche chez l'Homme [31]. Les patients exprimant les formes les plus graves d'infection ont été testés positifs par transcription inverse suivie d'une amplification par polymérisation en chaîne (RT-PCR) pour les deux souches. Des événements de recombinaison, associés à l'effet pathogène propre à chacun des deux virus, permettent probablement de potentialiser la sévérité de l'infection. Afin de favoriser la diversité génétique, d'autres mécanismes ont également été observés et permettent une meilleure efficacité de l'infection. Certains virus de plantes comme le virus de la mosaïque du navet ont été décrits comme ayant la capacité de moduler la MOI

au cours de l'infection, en modulant la charge virale par exemple, mais également en fonction de la voie d'infection utilisée [32, 33]. Certaines cellules mettent en effet en place un système d'exclusion de super-infection, induit par l'infection virale, afin d'éviter que le même génome puisse être transmis plusieurs fois à la même cellule, favorisant ainsi l'infection par d'autres variants et augmentant la diversité génétique [33]. D'autres virus, comme le VIH, ont également été décrits comme modulant localement la MOI, limitant ainsi la diversité de variants associée à une infection par un nombre important de particules virales différentes. [34, 35]. Ces modulations permettent d'affecter l'infection à plusieurs niveaux : modulation de la réponse cellulaire suite à l'infection avec un échappement ou une saturation des médiateurs et senseurs de l'immunité, modification de l'issue de l'infection, augmentation de la diversité virale et effet de masse pour passer les goulots d'étranglements [1, 4, 36, 37].

Chez les virus à ARN segmentés, les co-infections jouent un rôle majeur dans l'évolution en permettant le brassage génétique. Lorsqu'une cellule est co-infectée par plusieurs particules virales, la formation de nouvelles particules virales contenant un mélange de segments parentaux est observée, on parle de réassortiment. Ce phénomène a été observé chez tous les virus à ARN segmenté mais est majoritairement décrit pour les virus influenza et est présenté, ainsi que l'aspect mécanistique, en II.3.2.1.b [38]. Les réassortiments permettent donc l'évolution virale et peuvent mener à l'émergence de virus pandémiques dans le cas des virus influenza en entraînant un changement majeur dans l'antigénicité des glycoprotéines de surface du virus.

Les co-infections jouent donc un rôle important dans l'évolution des populations virales en permettant la réalisation d'évènements de recombinaison et de réassortiments [39].

1.4. **Co-infections et coopérations virales**

Comme exposé en I.1.3, les virus à ARN présentent un fort taux de mutations. Un grand nombre de mutations peut avoir des conséquences sur les protéines traduites, avec la synthèse de protéines tronquées ou non fonctionnelles, et sur les capacités répliquatives du virus. Une coopération homotypique, c'est-à-dire une coopération entre les différents variants d'un même virus infectant une cellule, est alors nécessaire pour parvenir à une infection complète. La complémentation génétique est classiquement utilisée comme exemple de cette coopération. Ce phénomène est particulièrement observé pour les virus

présentant des génomes défectifs. Les termes « génomes défectifs » ou « particules défectives » sont utilisés pour définir des particules virales possédant un génome présentant de larges délétions internes ou des mutations qui ne permettent pas l'obtention de protéines fonctionnelles. La complémentation entre ces particules mène à la production de toutes les protéines qui sont alors utilisées pour le cycle viral et la production de nouvelles particules virales (figure 1D). Cela a par exemple été décrit pour les virus influenza avec la présence de particules semi-infectieuses et défectives interférentes, présentées plus en détails en II.4.2 et sur la figure 14 [40, 41]. Les premiers cas de complémentations observés furent entre deux génomes tronqués du virus de la fièvre aphteuse, de la famille des *Picornaviridae* et du genre *Aphthovirus* [42]. Les complémentations génétiques entre quasi-espèces virales et leur effet sur la dynamique des populations virales ont été décrits par Esteban Domingo et Celia Perales [43]. La complémentation entre particules défectives (si elles ne sont pas interférentes) permet d'obtenir un phénotype et une cinétique de croissance comparables à ceux obtenus avec les génomes non défectifs.

L'accumulation de mutations dans un génome est délétère et mène souvent à une perte des capacités répliquatives du virus. Une corrélation négative entre le nombre de mutations portées par un génome et l'impact sur le virus a été observée. Ce phénomène d'épistasie négative est qualifié d'épistasie négative [44]. Cependant, si ces mutations ne sont pas portées sur le même génome mais sont réparties entre les différentes copies du génome présent dans la cellule suite à l'infection virale, cette corrélation négative n'est plus observée et une restauration des capacités répliquatives est observée [45].

1.5. **Co-infections et interactions négatives**

Les interactions virales majoritairement décrites concernent des coopérations positives. Cependant, des coopérations négatives, c'est-à-dire ayant un effet délétère pour un ou plusieurs virus co-infectant une cellule, ont été décrites. Une protéine virale sensible à un antiviral pourra interagir avec les protéines provenant d'un virus résistant et ainsi rendre sensible le virus résistant [46]. On parle de dominance négative. Ce phénomène peut être utilisé dans la lutte antivirale. Des travaux menés sur les poliovirus ont montré qu'il est possible de limiter l'apparition de sous-populations résistantes en utilisant une molécule dite dominante sur les autres molécules utilisées [46]. La molécule V-073, qualifiée de « poison pour capsid », altère la fonction des protéines de capsid des

poliovirus en s'y fixant. Certains variants sont résistants à ce composé. La co-infection entre un variant résistant et un variant sensible à V-073 conduit à la diminution drastique du titre viral. Le variant résistant devient donc sensible avec l'incorporation de protéines de capsides sensibles au composé V-073, une coopération négative est donc observée. Cet avantage peut être utilisé dans la recherche de nouvelles molécules à visée antivirale. Les auteurs précisent qu'en ciblant des protéines structurales, il est possible d'avoir un effet sur de nombreux virus comme les rhinovirus, l'entérovirus 71, l'hépatite C et la dengue. De plus, utiliser une drogue dite dominante permettrait d'outrepasser l'apparition rapide de résistants observée lors de l'utilisation de molécules ayant un impact sur la polymérase virale [46].

Un autre exemple de coopération négative est celui de la complémentation entre génomes défectifs interférents et infectieux lors d'une co-infection entre une particule virale infectieuse et une particule défective interférente. Ces génomes dits défectifs peuvent être complétés, lors d'une co-infection, soit par un autre virus défectif pour une autre partie du génome, soit par un virus qualifié d'assistant, c'est-à-dire un virus pouvant mener à une infection productive. Lors d'infection à forte MOI, ces génomes défectifs vont entrer en compétition pour l'accès aux ressources avec les génomes non défectifs. Les génomes présentant des délétions sont plus petits que le génome complet. Il a été observé que les génomes défectifs sont répliqués plus rapidement que leurs homologues non défectifs et peuvent par effet de masse diminuer la réplication et donc la transmissibilité des particules dont le génome est non défectif [47]. Cette particularité des génomes défectifs est à l'étude pour le développement de thérapies antivirales ou vaccinales utilisant des stocks enrichis en particules défectives [48].

2. Mécanismes favorisant les co-infections

L'efficacité d'infection, l'évolution et la transmissibilité virale étant affectées par les co-infections, des stratégies d'infections groupées ont été sélectionnées. Ces stratégies comportent aussi bien des mécanismes à l'échelle individuelle d'un virion que du transfert collectif de particules virales (figure 2).

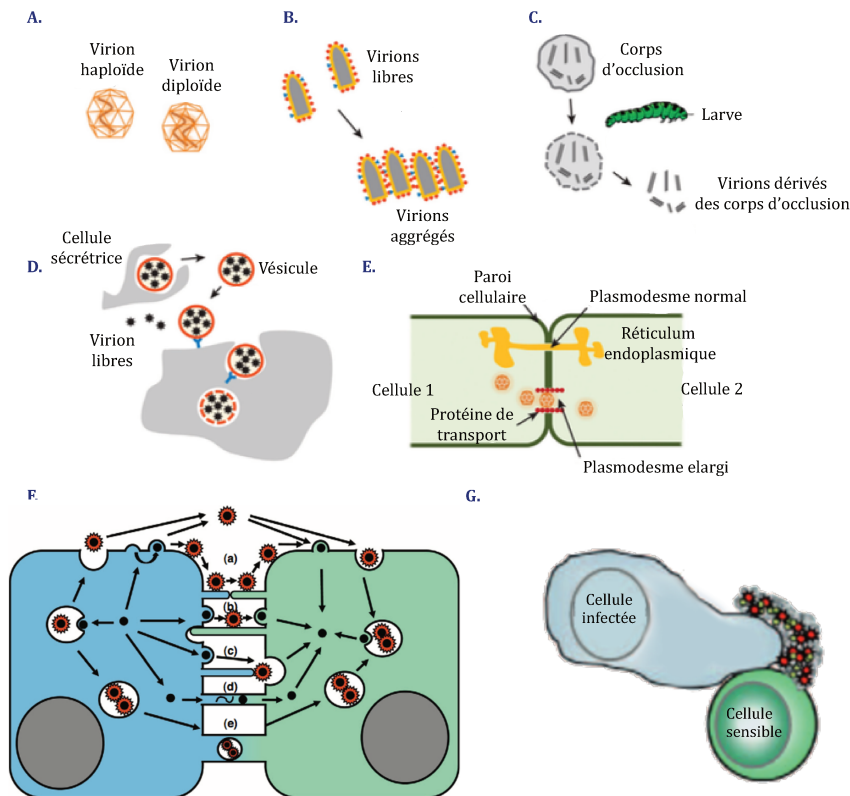


Figure 2 – Mécanismes de transfert collectif de particules virales

A. Représentation schématique de deux virions à capside icosaédrique, l'un haploïde, l'autre diploïde. Les virions peuvent être n-ploïdes. **B.** Représentation schématique de deux virions libres en forme de « balle de fusil » pouvant s'agréger par des interactions entre les protéines à la surface. **C.** Corps d'occlusion composé de virions appartenant au baculovirus entourés d'une matrice protéique jouant un rôle protecteur. Lors de l'ingestion, le pH acide du système digestif de la larve va digérer le corps d'occlusion et libérer les particules virales seules ou sous la forme de groupements et l'infection peut ensuite avoir lieu. **D.** Libération de virus sous forme libre ou par le biais de vésicules riches en lipides et en phosphatidylsérine. La cellule voisine pourra être infectée par les formes libres de virus ou directement par ces vésicules contenant les virus. **E.** Transmission directe de cellule-à-cellule de particules virales entre cellules végétales. Les particules virales sont déplacées par des protéines de transport d'une cellule à l'autre en utilisant des plasmodesmes élargis. **F.** Représentation schématique résumant les mécanismes de transferts directs de cellule-à-cellule. (a,b) : Transfert direct de particules virales par le biais de filopodes entre les deux cellules ou de synapses virologiques. (c) : Projection de filaments d'actine permettant le transfert de particules virales. (d) : Transfert direct par contact cytosolique entre les cellules. (e) : Transfert cytoplasmique sous la forme de vésicules. **G.** Transfert direct ou médié par une cellule non permissive à l'infection de particules virales sous la forme de matrice extracellulaire appelée biofilm. Adapté et traduit de [4, 49, 50].

2.1. Polyploïdie virale

Le premier mécanisme observé fut la polyploïdie virale chez le phage T7, c'est-à-dire l'incorporation de plusieurs copies du génome au sein d'une même particule virale. Cette polyploïdie touche différentes familles virales et peut être sélective ou non sélective (Figure 2A). La polyploïdie semble être favorisée pour les formes virales filamenteuses [4].

Un exemple de sélectivité est celui des rétrovirus avec l'incorporation de deux copies identiques du génome [51]. Ce mécanisme pourrait permettre une plus grande tolérance d'altérations du génome puisqu'une recombinaison entre les deux copies est possible par un saut de matrice lors de la rétrotranscription, permettant d'éliminer les mutations délétères [52].

Une polyploïdie non sélective est décrite comme pouvant être la résultante de l'absence de signaux d'encapsidation spécifiques ou de mécanismes de « contrôle qualité » lors de l'assemblage [4]. Chez certains paramyxovirus, cette polyploïdie permet l'encapsidation de plusieurs copies du génome, fonctionnels ou défectifs, au sein de la même particule. Le virus de la rougeole, de la famille des *Paramyxoviridae*, présente des particules virales possédant deux génomes défectifs qui se complètent lors de l'infection, permettant la réalisation d'un cycle complet d'infection [53].

Un exemple de l'impact de la polyploïdie non sélective sur l'infection virale est celui du virus de la nécrose pancréatique infectieuse. Ce virus à ARN double brin, appartenant à la famille des *Birnaviridae* et au genre *Aquabirnavirus*, infecte les espèces aquatiques comme les saumons. Il pose de nombreux problèmes agroalimentaires dans les élevages de saumons en entraînant de nombreux décès [54]. La polyploïdie permet à ce virus d'emporter plusieurs copies du génome codant pour plusieurs versions de la protéine structurale majoritaire VP2. Cette protéine est décrite comme jouant un rôle majoritaire dans la modulation de la virulence en fonction de la séquence en acides aminés de certains domaines de la protéine. Le nombre de copies du segments présents par particule est décrit comme modulant la virulence [54, 55].

Cette polyploïdie non sélective a également été décrite pour le virus Ebola, un virus filamenteux présentant une forme allongée pouvant aller jusqu'à 20 μm . Pour les formes les plus longues, jusqu'à 22 copies du génome ont été détectées par cryo-microscopie électronique et cryotomographie électronique [56].

La polyploïdie permet d'accroître localement la MOI sans augmenter le nombre de particule par cellule ou la charge virale, favorisant ainsi la probabilité de réaliser un cycle infectieux dans des conditions pouvant être non propices. La polyploïdie permet également de moduler la virulence [55].

2.2. Agrégation entre particules virales

L'agrégation physique entre particules virales a été observée pour un grand nombre de virus en utilisant diverses méthodes comme la microscopie électronique, la diffusion dynamique de la lumière ou la chromatographie d'exclusion de taille. Ces méthodes sont présentées et discutées en [57]. Cette agrégation a souvent été décrite comme provenant d'un biais dans la préparation des stocks purs de virus. Cependant le développement de nouvelles technologies permet d'observer et de comprendre plus précisément ce phénomène.

L'agrégation peut être modulée par des facteurs physico-chimiques comme la concentration ionique, la présence de certains ions ou de certains composés dans le milieu [4, 57]. Certaines conditions de conservation, comme la congélation, ou de préparation avec l'utilisation de sonicateurs ou de vortex peuvent avoir un impact sur l'agrégation [58]. L'émergence de pathologies virales issues de la consommation d'eau souterraine a mené à la réalisation d'études sur la stabilité et l'interaction des virus avec les éléments de l'environnement [57]. Une modification dans la concentration saline, le pH, la nature et la concentration de certains électrolytes, peut avoir une influence sur les forces électrostatiques et hydrophobiques induisant l'agrégation entre des particules virales isolées (figure 3A). De même, ces modifications physico-chimiques peuvent favoriser le regroupement de particules virales à l'interface air-liquide dans l'environnement (figure 3B). La présence de composés, comme des débris cellulaires, dans le milieu environnant peut favoriser le regroupement de particules virales par fixation des virions aux composés cellulaires (figure 3C). Un exemple d'interaction avec les composés présents dans l'environnement est celui des rotavirus, virus appartenant à la famille des *Reoviridae* et responsables de pathologies gastro-intestinales. La transmission du virus se fait par voie oro-fécale. Il a été montré que la matière organique issue du fleuve Suwannee au sud-est des États-Unis favorise l'agrégation des rotavirus et peut ainsi favoriser la transmission groupée de particules virales [59]. Le changement d'état du solvant peut également affecter le regroupement entre particules virales. Par exemple, une

dessiccation de l'air pourra favoriser l'agrégation entre virions (figure 3D). L'environnement joue donc un rôle important dans l'agrégation entre particules virales.

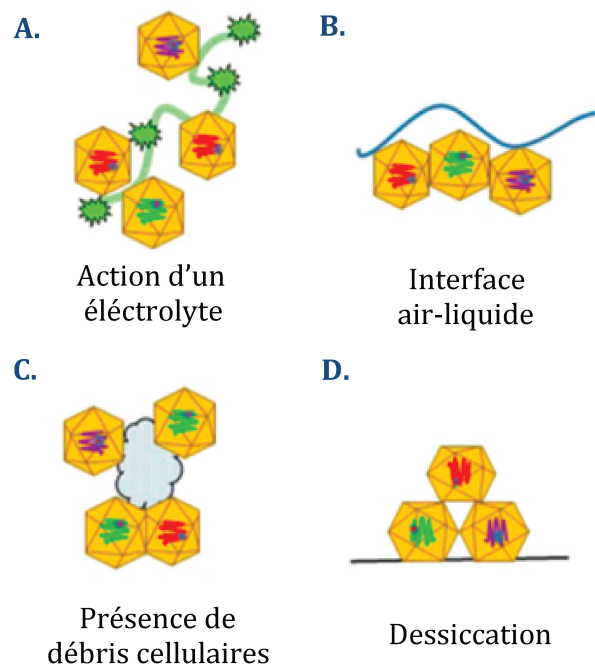


Figure 3 – Agrégation physique des particules virales

A. Attraction des particules virales entre elles par l'action d'un électrolyte. **B.** Agrégation de particules virales dans l'environnement à l'interface air-liquide. **C.** La présence de débris cellulaires dans le milieu ou dans l'environnement peut conduire à l'agrégation entre les particules virales. **D.** La dessiccation dans l'environnement peut entraîner l'agrégation entre particules virales. Adapté et traduit de [57].

Plus récemment, le milieu intérieur et ses composants tout comme les composants cellulaires ont été décrits comme jouant un rôle dans l'agrégation virale [6]. Pour les virus enveloppés bourgeonnant à la membrane cellulaire, les virions néoformés pourraient présenter à leur surface leur propre récepteur ou des composés cellulaires permettant une interaction. De ce fait, une agrégation entre particules virales serait donc possible. Cela a été décrit pour le VSV (Figure 2B) ou les virus influenza. La glycoprotéine de surface G du VSV interagit avec la phosphatidylserine présente à la surface des particules virales et permet ainsi l'agrégation entre particules [6]. Toujours concernant le VSV, la salive, présente dans les voies d'excrétions du virus, a été décrite comme ayant un effet favorisant sur l'agrégation entre particules virales en permettant l'attachement entre les particules virales la chaîne gamma du fibrinogène dans la salive [6, 60]. L'implication d'autres protéines dans l'agrégation virale a été décrite avec par exemple la favorisation d'agrégats entre particules virales du VIH par les fibres amyloïdes retrouvées dans le sperme [61].

Les anticorps neutralisants sont également décrits comme ayant un impact sur l'agrégation virale, décrit en [62] pour le VIH. Une facilitation de l'infection par ces anticorps est également décrite et concerne particulièrement la famille des *Flaviviridae* [63].

2.3. Groupements atypiques : corps d'occlusion

Les baculovirus sont des virus enveloppés à ADN double brin qui infectent exclusivement les arthropodes [64]. Ces virus sont transmis aux larves d'insectes lors de l'ingestion de nourriture contaminée et doivent ainsi être résistants à l'environnement, avec parfois une survie nécessaire durant toute une année sans hôte [4]. Des groupements de virions agrégés s'entourent d'un revêtement protéique jouant un rôle protecteur vis-à-vis des contraintes physico-chimiques de l'environnement et sont appelés corps d'occlusions (figure 2C). Ces derniers sont non infectieux en l'état. Lors de l'ingestion par l'hôte, le pH acide présent dans le système digestif dégradera ce revêtement et permettra l'attachement du virus au récepteur et la réalisation du cycle viral. Cette forme évolutive est décrite comme un mécanisme unique permettant à un virus enveloppé d'être résistants dans son environnement comme le sont naturellement les virus non enveloppés [64].

2.4. Transfert collectif de virus : vésicules de transport extracellulaire

Pour se protéger du milieu extérieur, certains virus sont libérés collectivement sous la forme de vésicules similaires aux endosomes. Les virus entériques, soumis aux contraintes physico-chimiques rencontrées dans le système digestif, utilisent particulièrement cette voie de transmission. Le virus de l'hépatite A est un virus à ARN simple brin de polarité positive et appartient à la famille des *Picornaviridae* et au genre *Hepatovirus*. Ce virus est responsable de manifestations hépato-gastriques chez l'Homme et est transmis par voie oro-fécale. Les formes circulantes et infectieuses du virus retrouvées dans le sang lors de l'infection aiguë sont présentes sous la forme de vésicules assimilées à des endosomes qui contiennent un grand nombre de particules virales regroupées. L'infection se fait donc par un groupement de nombreuses particules virales [3]. Des formes libres et infectieuses, c'est-à-dire non regroupées dans des vésicules et des formes non enveloppées du virus sont retrouvées dans les selles. Ces formes proviendraient de vésicules qui, lors de la sécrétion dans les canaux biliaires, auraient été

dégradées par les sels biliaires. L'enveloppe entourant les particules virales est décrite comme sensible à ces sels [65].

Pour être disséminés en groupe, d'autres virus entériques utilisent des vésicules (Figure 2D). Les cellules en apoptose expriment à leur surface de la phosphatidylsérine permettant leur reconnaissance par les macrophages et leur phagocytose. Les poliovirus utilisent de larges vésicules assimilées aux auto-phagosomes et qui sont riches en lipides et/ou recouvertes de phosphatidylsérine. Ces vésicules sont phagocytées et permettent l'infection [3]. Plus récemment, les rotavirus et les norovirus ont été décrits comme utilisant des vésicules provenant respectivement de la membrane cellulaire et de la voie de sécrétion exosomale. Les rotavirus et norovirus présentent deux formes infectieuses : une première constituée de vésicules contenant plusieurs particules virales et une seconde sous la forme de virus non enveloppés et contenant un seul génome. Ces formes virales peuvent toutefois être retrouvés sous la forme de groupement grâce à l'utilisation des bactéries commensales [3].

Ces stratégies ne sont pas exclusives aux virus animaux ou aux virus de plantes. On retrouve également des stratégies de regroupement de particules virales chez les virus d'archées avec le marseillevirus par exemple. Il s'agit d'un virus à ADN appartenant à la famille des *Marseilleviridae* et au genre *Marseillevirus*. Ce virus peut infecter des archées sous la forme de vésicules en utilisant la phagocytose ou alors sous la forme de virions libres en utilisant la voie canonique d'endocytose depuis la membrane cellulaire.

2.5. Transfert direct de virus par échange entre cellules

L'architecture des cellules, des tissus, des organes et *in fine* des systèmes biologiques permet la communication et le contact entre de nombreux partenaires. Ces voies de communication sont utilisées afin de transférer des composites cellulaires, des ARNm, des protéines ou encore des neurotransmetteurs. Les virus sont connus pour utiliser ces voies à leur avantage. L'utilisation de synapses virologiques, des jonctions serrées, de nanotubes, ou même de plasmodesmes par les virus de plantes, ont été décrits [15, 66]. Ces mécanismes de transmission de particules virales de cellule-à-cellule sont présentés et illustrés par Zhong *et al.* [49]. La transmission locale de particules virales diminue la dispersion et permet ainsi une transmission avec une MOI plus élevée [4]. Le virus des nervures jaunes nécrotiques de la betterave est un virus de la famille des *Benyviridae* dont le génome est composé de quatre ou cinq segments d'ARN simple brin

de polarité positive. Des interactions entre segments d'ARN et protéines virales permettant la formation de complexes ribonucléoprotéiques ont été montrées. Ces complexes, plus stables que les segments isolés, sont transportés de cellule-à-cellule via les plasmodesmes, sur une plus grande distance. Ce mode de transmission permet une dissémination systémique au sein de l'hôte [67]. Un transfert de particules virales infectieuses de cellule-à-cellule par l'utilisation de plasmodesmes élargis a également été décrit [68] (figure 2E).

L'alphaherpesvirus de type 1 est un virus à ADN appartenant à la famille des *Herpesviridae* ayant un tropisme neuronal et possédant un cycle lytique et un cycle latent. La latence se fait dans le ganglion du nerf trijumeau [69]. Lors de sa réactivation, ce virus cause des lésions des muqueuses présentes au niveau de la bouche en réalisant un cycle lytique dans les cellules épithéliales. Le transport depuis les voies nerveuses jusqu'aux muqueuses se fait de cellule-à-cellule par l'utilisation des synapses neuronales et permet le transfert collectif de plusieurs particules virales [70].

Le VIH infecte les lymphocytes T CD4+ et utilise les cellules dendritiques sans les infecter afin d'augmenter la probabilité de transmission aux lymphocytes T CD4+. Le virus est concentré localement et forme une synapse virale pour permettre une transmission groupée de cellules à cellules [71] (Figure 2F). Le VIH utilise le cytosquelette d'actine afin de former de longs tubes appelés filopodes permettant de faciliter la transmission extracellulaire du virus de cellule-à-cellule. Le filopode formé permettra d'apporter plusieurs particules virales aux cellules adjacentes [49] (Figure 2F).

Le virus de la vaccine, appartenant à la famille des *Poxviridae*, utilise l'actine cellulaire afin d'augmenter sa transmission directe de cellule-à-cellule (Figure 2F). Pour cela un réarrangement de l'actine cellulaire au niveau d'un des pôles de la cellule est observé. Ce réarrangement permet la formation d'une comète d'actine responsable de l'augmentation de la mobilité des particules virales et permet une projection de cellules en cellules du virus qui va infecter les cellules permissives environnantes. Si le virus rentre en contact avec une cellule non permissive, un réarrangement de l'actine permettra la formation d'une nouvelle comète et ainsi la projection sur une autre cellule [72, 73].

Le virus HTLV-1, responsable de la leucémie à lymphocytes T chez l'adulte et de la paraparésie spastique tropicale, est un rétrovirus à ARN simple brin appartenant à la famille des *Retroviridae*. Ce virus a été décrit comme utilisant un mode de transmission

atypique, initialement retrouvé chez les bactéries, appelé biofilm [50]. Ce virus est concentré à un pôle de la cellule et est libéré sous la forme de biofilm viral (Figure 2G). Ce biofilm est composé de matrice extracellulaire et de protéoglycanes et possède une forte propriété adhérente. Il est responsable de la concentration locale des particules virales. Ce biofilm permet, lors d'un contact entre une cellule infectée et une cellule non infectée, l'attachement entre les deux cellules et favorise l'infection virale par transmission directe, depuis la cellule infectée, d'un groupement de particules virales qui va adhérer à la surface de la cellule à infecter [8, 74]. Le rôle du biofilm est donc de faciliter l'infection virale, favorisant *de facto* les co-infections. Il est également supposé que le biofilm, de par sa composition, joue un rôle de protection contre l'environnement et permet ainsi aux virus de résister aux contraintes environnementales.

Les virus ont donc développé des stratégies alternatives permettant d'augmenter le nombre de particules virales ou de copies du génome transmis à l'hôte, favorisant les co-infections. Les stratégies utilisent des propriétés intrinsèques aux particules virales en augmentant par exemple le nombre de copies du génome viral par particule ou en favorisant l'agrégation entre particules virales. Des mécanismes plus spécifiques à l'hôte sont également utilisés afin de favoriser la transmission de cellule-à-cellule ou la dissémination au sein de l'hôte.

L'augmentation de la fréquence de co-infections va permettre d'augmenter la probabilité de réalisation d'une infection productive. Cependant, ces modulations de la fréquence de co-infections ont des conséquences sur l'infection de l'hôte en modifiant la virulence ou la charge virale mais influencent également l'issue de l'infection virale. L'évolution virale est également conditionnée en partie par les co-infections.

3. Conséquences des co-infections virales

Dans la littérature, les termes de co-infections et super-infections sont souvent utilisés pour désigner un même phénomène, c'est-à-dire l'infection d'une cellule par plusieurs pathogènes ou l'infection par un second pathogène à la suite d'une infection déjà initiée. Ces deux notions sont pourtant bien différentes, il est donc important lors de l'analyse de préciser les conditions d'infection pour pouvoir faire la différence [75].

Les co-infections peuvent avoir, en plus des différents intérêts pour le virus (présentés en I.1), des effets sur l'infection virale ou des effets sur l'hôte. Ces mécanismes sont présentés brièvement ci-dessous, sur la figure 4. Les mécanismes sous-jacents sont décrits par Naveen Kumar *et al.* [75].

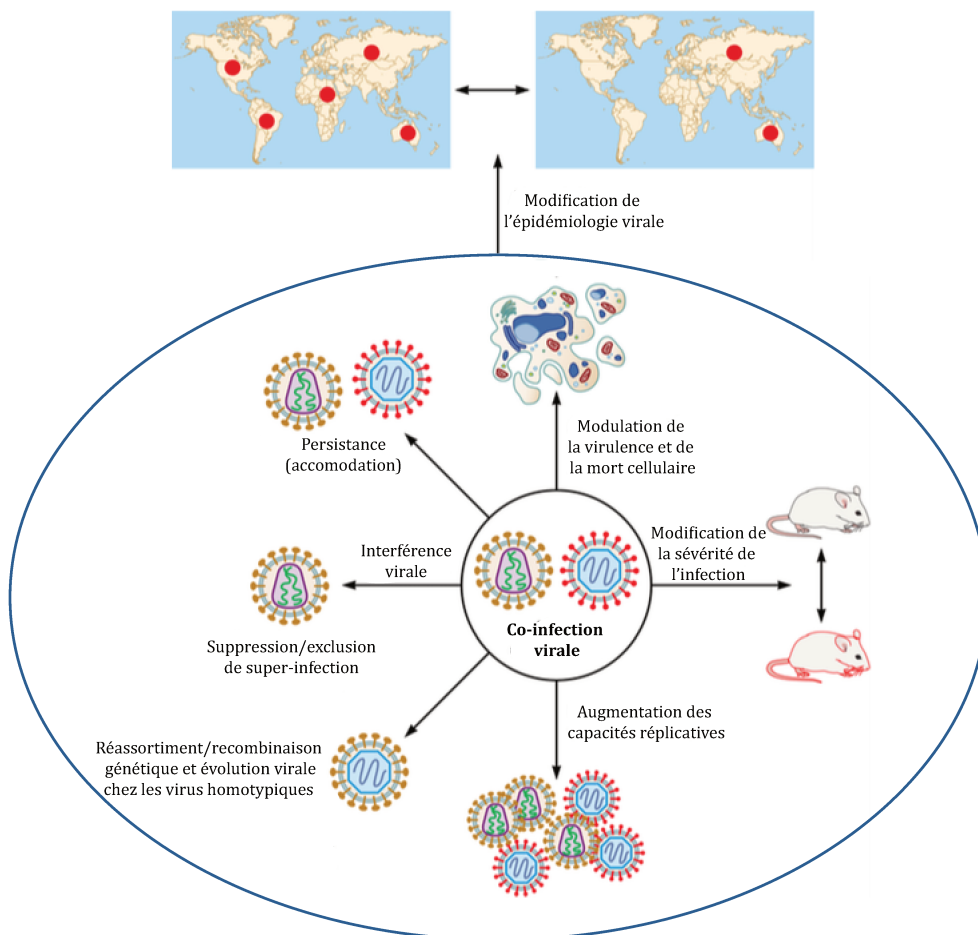


Figure 4 – Conséquences des co-infections virales

Les co-infections virales peuvent avoir des conséquences très étendues. L'atteinte des capacités réplcatives d'un virus par un autre virus présent lors de la co-infection est appelée interférence virale et est le mécanisme le plus observé. Lorsque l'interférence aboutit à l'exclusion totale de l'infection du second virus on parle alors d'exclusion pour des virus homologues ou apparentés, et de suppression de super-infection pour des virus hétérologues. Les co-infections peuvent également avoir un effet sur les capacités réplcatives virales pour l'un, l'autre ou les deux virus concernés. Dans certains cas aucune interaction n'est observée, on parle de persistance ou d'acomodation virale. Les co-infections peuvent aussi moduler la virulence et la mort cellulaire. Toutes ces conséquences peuvent altérer la sévérité de l'infection mais également avoir un impact sur l'épidémiologie virale. Il est à noter que les recombinaisons et réassortiments ne sont possibles que lorsque les virus sont homotypiques. Adapté et traduit de [75].

3.1. Conséquences pour les virus

Lors de la co-infection, un des virus viendra interférer avec la réplication virale de ou des autres virus. Ce processus est appelé interférence virale. Ce mécanisme peut également avoir pour conséquences l'exclusion ou la suppression de super-infections par exemple.

L'interférence est majoritairement causée par la réponse immunitaire innée avec une réponse interférons-médiée activant des voies de signalisation intra-cellulaires. Les médiateurs cellulaires qui seront alors synthétisés viendront interférer avec la réplication virale de nombreux virus et à plusieurs étapes du cycle viral. D'autres mécanismes viro-induits d'interférence avec la réplication virale existent comme par exemple la synthèse de génomes viraux défectifs, de protéines virales trans-activatrices ou d'ARN interférents (ARNi). Un phénomène de compétition pour l'accès aux ressources nécessaires à la réplication a aussi été décrit comme jouant un rôle dans l'interférence.

L'exclusion de super-infections est un phénomène décrit pour des virus proches, tels que les virus influenza A et B par exemple. Ce mécanisme peut se décrire comme une interférence par un premier virus ayant commencé son infection sur le second virus. Cela a été observé pour des virus animaux mais également pour des virus de plantes avec l'exemple du virus de la tristezza des agrumes (*Citrus tristezza virus*). Ce virus est capable d'exclure par un mécanisme inconnu une super-infection au niveau cellulaire ou au niveau de l'organisme par un mécanisme impliquant la protéine virale p33 [76]. Les exclusions de super-infections peuvent, de manière générale, être causées par exemple par une diminution de l'expression du récepteur viral ou par une inhibition de la réplication/transcription du virus. Il n'y a cependant que peu de publications décrivant ce phénomène *in vivo*. Les cas décrits concernent l'altération de la réponse immunitaire lors de la vaccination par des vaccins vivants atténués. Les vaccins vivants atténués vont pouvoir infecter l'hôte mais présenteront, par exemple, des capacités répliquatives plus faibles que le virus non atténué, pouvant ainsi diminuer les manifestations symptomatiques tout en permettant le développement d'une immunité spécifique. Une exclusion de souche vaccinale vivante atténuée a par exemple été observée, *in vivo*, chez le porc infecté de manière persistante par le virus de la peste porcine. Une infection persistante peut se définir par l'absence d'élimination du virus par le système immunitaire de l'hôte et donc sa persistance dans l'organisme. Deux groupes de porcs ont

été comparés, le premier composé de porcs infectés de manière persistante à la naissance par le virus de la peste porcine et le second composé de porcs n'ayant jamais rencontré le virus. Suite à la vaccination, aucune immunité adaptative dirigée contre la souche vaccinale vivante atténuée du virus de la peste porcine n'a été observée chez les porcs infectés de manière persistante contrairement à l'autre groupe. La souche vaccinale ne semble donc pas infecter les cellules si une infection persistante par le virus de la peste porcine est présente [77].

En plus de l'exclusion, concernant des virus proches, la suppression de super-infections virales, concernant des virus différents a été décrite. Des cellules d'insectes infectées de manière persistante par un densovirus (DNV), de la famille des *Densoviridae* ont un effet sur l'infection par le virus de la dengue en comparaison avec des cellules non infectées par un DNV. Le taux d'infection par le virus de la dengue, la production virale et la mort cellulaire associée à l'infection semblent diminués en regard du groupe contrôle [78]. De manière générale, les cellules infectées de manière persistante résistent à l'infection par un autre virus non pas majoritairement dans la permissivité à l'infection mais dans la sévérité de l'infection. L'issue de l'infection est moins sévère pour ces cellules ou organismes et la mortalité est diminuée.

Une interférence positive peut aussi s'observer avec un effet positif sur les capacités répliquatives de l'un ou des deux virus. Cela a par exemple été décrit pour une co-infection entre le betaherpèsvirus 5 et l'alphaherpèsvirus de type 1, deux membres de la famille des *Herpesviridae*, résultant en une augmentation des capacités répliquatives et de la virulence des deux virus [79]. La co-infection de cellules de moustiques C6/36 par le virus de La Crosse et le virus Sindbis résulte en l'augmentation des capacités répliquatives du virus Sindbis [80]. Cette augmentation des capacités répliquatives peut passer par l'utilisation de protéines du second virus au profit du premier par exemple.

3.2. Conséquences pour l'hôte

L'issue de certaines infections virales peut être plus délétère pour un organisme lors de co-infections par d'autres virus. Par exemple une co-infection par les virus de l'hépatite B et C aboutit à une fibrose hépatique plus sévère que lors d'une mono-infection [81]. La permissivité pour d'autres infections peut être augmentée lors d'une primo-infection par un autre virus. L'infection par le VIH, en affectant la barrière muqueuse

intestinale ou en affaiblissant le système immunitaire, pourrait augmenter la probabilité d'être infecté par le virus de l'hépatite C par exemple [82, 83]. L'infection par le VIH augmente également la charge virale du virus de l'hépatite C lors de la co-infection et augmente la vitesse de prolifération de la fibrose hépatique [84]. Les mêmes effets sur la virulence ont été observés lors de la co-circulation de souches brésiliennes du virus de la vaccine. Une modulation de la virulence peut être observée en fonction de la MOI.

Les co-infections virales peuvent également affecter l'épidémiologie virale. Les arbovirus sont des virus transmis d'hôtes-en-hôtes par le biais d'arthropodes. Le vecteur comme l'hôte terminal sont infectés par les virus transmis. Il est à noter que le vecteur, à l'inverse de l'hôte, reste infecté sans élimination du virus. Lors d'une co-infection du vecteur par certaines souches d'arbovirus, une compétition est observée entre les virus et mène à l'inhibition mutuelle de la réplication virale. On peut ainsi observer un arrêt de transmission de souches ou une non circulation dans certaines zones. Ce mécanisme peut s'illustrer avec l'exemple du virus de la dengue. Quatre sérotypes circulent dans la population humaine. L'évolution de la circulation de ces virus au cours de ces 70 dernières années a été décrit par Jane P. Messina *et al.* [85]. Les sérotypes 2 et 4 sont décrits comme responsables d'exclusions compétitives lors de co-infections. Dans des expériences de co-infections, il a été montré que les capacités répliquatives du sérotype 2 étaient fortement inhibée par le sérotype 4. Ce dernier est également affecté par l'infection par le sérotype 2 mais de manière plus limitée [86]. L'installation d'autres sérotypes dans les zones concernées par la circulation des sérotypes 2 et 4 semble donc compromise [86].

4. Méthodes de détection des co-infections

La détection et la quantification des événements de co-infections sont cruciales pour identifier d'éventuels facteurs ayant *in fine* un rôle sur la fréquence de co-infections.

De nombreux virus sont responsables de symptômes communs lors de l'infection d'un hôte et la cause étiologique est souvent associée à un seul pathogène. Les co-infections sont donc sous-estimées, cette sous-estimation provient également de la difficulté à isoler un seul agent viral contrairement aux infections bactériennes où il est relativement plus facile de procéder à l'isolement d'une seule colonie lorsque les conditions de cultures sont maîtrisées.

Afin de détecter les co-infections à des fins de diagnostic médical, les méthodes classiquement utilisées jusqu'à l'avènement de l'amplification par polymérisation en chaîne (PCR) étaient limitées aux tests sérologiques ou à l'amplification virale sur cultures cellulaires à partir de prélèvements de patients. Les méthodes sérologiques peuvent être limitées par leur sensibilité et l'amplification peut être limitée par des interférences virales lors de la culture. Aujourd'hui, les méthodes de détection des co-infections utilisées reposent sur deux approches qui sont basées soit sur la détection des acides nucléiques soit sur la détection de protéines virales en utilisant des anticorps spécifiquement dirigés contre une ou plusieurs protéines virales (pour revue [75]).

L'amplification spécifique de régions des génomes viraux par PCR ou RT-PCR permet de détecter et de quantifier les co-infections avec toutefois une limite due à la nécessité de connaître préalablement les pathogènes recherchés. Le développement des nouvelles technologies de séquençage dites de nouvelles générations et à haut-débit a servi à la découverte de co-infections à plus grande échelle. Le problème de ces méthodes provient de leur caractère semi-quantitatif. Elles permettent de mettre en évidence la présence de plusieurs virus dans un échantillon ou dans une cellule mais ne permettent pas de rendre compte du nombre relatif d'unités virales par cellule.

Parmi les méthodes de détection des protéines virales utilisant des anticorps spécifiques on retrouve des méthodes immuno-enzymatiques ou immuno-chimiques avec la réalisation de test ELISA, de marquages immunofluorescents et des séroneutralisations. A des fins de recherche scientifique, il existe également des méthodes de visualisation plus directes des virus comme l'observation par microscopie électronique des virions mais qui nécessite de pouvoir distinguer les virus co-infectants [57, 87]. Afin de visualiser plus directement les co-infections, des virus permettant

l'expression libre ou associée à une autre protéine de rapporteurs fluorescents ont été produits et utilisés. Ces type de virus a par exemple été utilisé pour visualiser des co-infections virales chez les plantes et ont permis de mettre en évidence des évènements d'exclusions de super-infections [88].

Pour les virus influenza, il n'existe pas de méthode réellement quantitative de mesure des évènements de co-infections. Les techniques classiquement utilisées reposent sur l'utilisation de virus rapporteurs permettant l'expression de protéines fluorescentes fusionnées aux protéines virales. La fluorescence est ensuite mesurée par microscopie à fluorescence ou par cytométrie en flux. Ces virus apportent des informations sur la localisation cellulaire des protéines ou sur les cellules co-infectées, cependant ils ne permettent pas une quantification des co-infections en l'état [89]. Ces virus rapporteurs existent également pour les virus influenza B et ont été répertoriés par Rebekah E. DUMm et Nicholas S. Heaton *et al.* [90]. Ces protéines dites rapportrices peuvent également être traduites indépendamment des protéines virales associées. Pour cela un site de clivage 2A provenant d'un teschovirus porcine peut être utilisé et permet la séparation co-translationnelle des protéines [91].

Afin de visualiser les co-infections, une autre approche plus récente consiste à marquer l'ARN viral à l'aide de sondes. Des méthodes d'hybridation d'ARN *in situ* permettant l'émission de fluorescence ont été mises au point. Cependant ces méthodes demandent une mise au point conséquente et leur réalisation rend l'analyse d'un grand nombre de cellules complexe. En 2017, afin de rendre compte de la dynamique de co-infections et de la réplication virale des virus influenza A, une étude a présenté le développement d'une méthode de visualisation de chacun des segments viraux présents à l'échelle d'une seule cellule [92]. Cette méthode repose sur la reconnaissance spécifique de chaque segment d'ARN viral (ARNv) provenant de deux souches différentes. Brièvement, deux stocks viraux ont été produits à partir de la souche A/WSN/33 et ne diffèrent que par une mutation silencieuse sur chaque segment. Des sondes dites cadenas ont été synthétisées et sont spécifiques de chaque segment et de chaque stock viral. Ces sondes cadenas présentent deux bras en 3' et 5' permettant une hybridation spécifique à chaque segment menant à la formation d'une structure circulaire sur laquelle se trouve un code-barres spécifique de stock et un code-barres spécifique de segment. Ces sondes

vont s'hybrider spécifiquement aux ADN complémentaires (ADNc) obtenus suite à la rétrotranscription des ARNv. Une fois les sondes cadenas hybridées, la liaison des bras 3' et 5' des sondes cadenas est effectuée par une ADN ligase permettant ainsi une circularisation complète de chaque sonde. Une ADN polymérase réalise une amplification circulaire de la séquence des sondes cadenas, permettant la synthèse d'un grand nombre de copies des deux code-barres de chaque segment. Ces copies restent hybridées entre elles par complémentarité de séquence. Enfin, des sondes fluorescentes spécifiques de chaque code-barres sont ajoutées et permettent de marquer spécifiquement chaque segment au sein de chaque cellule (figure 5). Néanmoins, cette méthode est pseudo-quantitative, elle pourrait permettre d'estimer le nombre de cellules co-infectées mais ne prendrait pas en compte les événements d'infections homotypiques puisqu'elle ne permet pas de montrer qu'une cellule est infectée par plusieurs virus provenant du même stock viral. Cette méthode ne permet pas la quantification du nombre de particules virales par cellule, ce qui ne permet pas de déterminer la MOI réelle. L'approche cellule-à-cellule est très chronophage et ne permet pas son automatiser à grande échelle. Ainsi il n'est pas possible de travailler avec de grands échantillons. A ce jour, il n'existe pas de méthodes réellement quantitatives de la fréquence de co-infections et du nombre de particules virales par cellule simultanément.

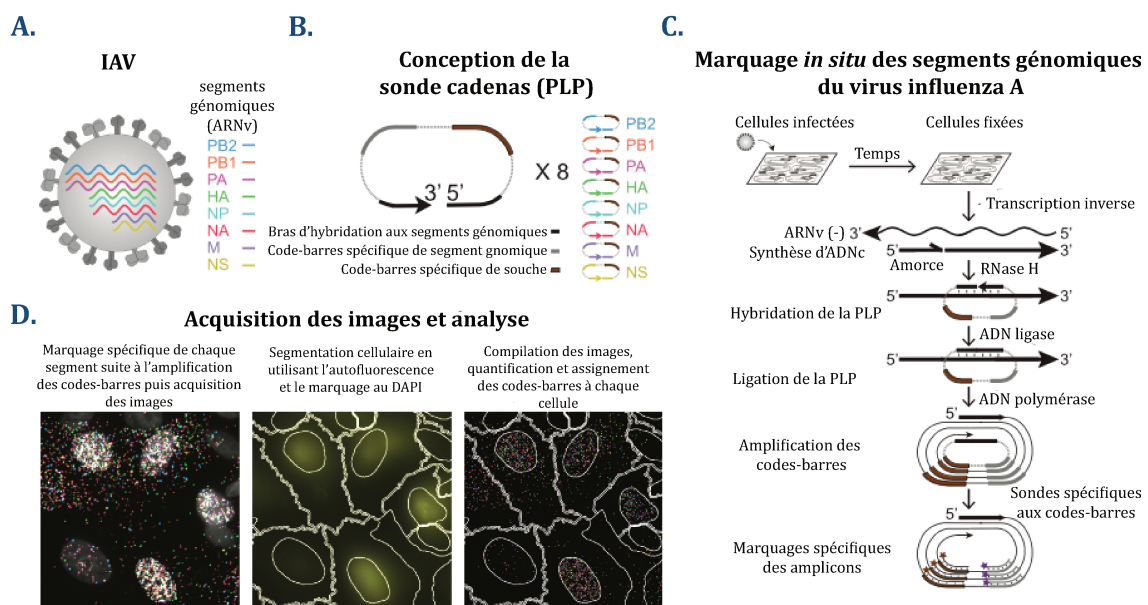


Figure 5 – Méthode de marquage spécifique des segments viraux à l'échelle d'une seule cellule

A. Représentation schématique d'une particule virale influenza A contenant les huit segments génomiques d'ARN monocaténaire de polarité négative. **B.** Chaque sonde cadenas (PLP) est conçue pour s'hybrider spécifiquement avec un segment génomique viral. Chaque sonde est composée de deux bras de vingt nucléotides en 5' et 3' permettant l'appariement sous la forme d'une structure circulaire. La séquence comprise entre les deux bras sur la sonde contient un code-barres spécifique de segment (couleur) et un code-barres spécifique de souche (marron). **C.** Marquage *in situ*

des segments génomiques. L'ADN complémentaire de chaque segment est obtenu par transcription inverse à partir des segments d'ARNv obtenus après fixation des cellules. La matrice ARN est dégradée par la RNase H. Les sondes cadenas viennent s'hybrider sur les ADNc et une ligase permet la jonction entre les deux bras 5' et 3' permettant la circularisation complète des PLP. Une ADN polymérase va amplifier en série la séquence d'ADN, amplifiant les codes-barres. Les amplicons restent liés par complémentarité de séquence. Des sondes fluorescentes spécifiques de chaque code-barres sont ajoutées et les cellules peuvent être analysées par microscopie à fluorescence. **D.** Visualisation et quantification des amplicons pour chaque cellule. Les amplicons sont détectés par hybridation de sondes fluorescentes spécifiques (jusqu'à cinq) sur chaque code-barres, puis analyse par microscopie à fluorescence et reconstitution d'image. La reconstitution se fait par superposition des différentes images permettant de capturer le signal des amplicons fluorescents avec la délimitation cellulaire obtenue par auto-fluorescence et marquage au DAPI. Traduit de [92].

Des approches permettent de quantifier les agrégats viraux. Ces agrégats peuvent donner lieu à des co-infections virales. Il est important de noter que la détection de l'agrégation virale ne rend pas directement compte de la fréquence de co-infections. Une augmentation de l'agrégation peut permettre de supposer une augmentation des co-infections mais n'est pas une preuve formelle de cette augmentation. Ces méthodes permettent de visualiser mais également de quantifier l'agrégation entre particules virales au sein d'un stock viral [57]. Pour mesurer l'agrégation, la diffusion dynamique de la lumière et la microscopie électronique sont par exemple utilisées. Cependant ces méthodes peuvent induire un biais en favorisant ou limitant l'agrégation entre particules virales lors de la préparation des échantillons. De plus ces méthodes ne permettent pas d'identifier formellement la nature des virions agrégés dans le cas d'infections homotypiques par exemple. Plus récemment, la quantification de particules virales du virus de l'immunodéficience humaine, et donc d'agrégations entre particules virales, a pu être réalisée par cytométrie en flux [93]. Cette technique pourra permettre de traiter plus d'échantillons dans une courte période de temps.

En 2017, l'équipe de Rafael Sanjuán a développé une méthode de quantification permettant l'estimation de la fréquence d'agrégation au sein de stocks de virus VSV par cytométrie en flux [6]. Les auteurs ont émis l'hypothèse que les virus enveloppés VSV présentent à leur surface leur propre récepteur et peuvent ainsi interagir entre eux. Afin de quantifier l'agrégation, les auteurs ont produits deux stocks de virus permettant l'expression soit d'une protéine de fluorescence rouge (mCherry) soit d'une protéine de fluorescence verte (GFP). Ils ont ensuite incubé des mélanges équiproportionnels de virus basés sur le titre en particules infectieuses puis ont infecté des cellules et ont mesuré la proportion de cellules simples positives (mCherry-/GFP+, mCherry+/GFP-), double négatives (mCherry-/GFP-) ou doubles positives (mCherry+/GFP+) par cytométrie en flux. En se basant sur le fait qu'une cellule double positive pouvait être infectée par plus que deux particules virales et que des cellules simples positives peuvent être infectées par

plusieurs particules virales permettant l'expression du même rapporteur fluorescent, les auteurs ont dans un premier temps calculé la fréquence réelle de co-infections dans les conditions du modèle. Ainsi, à l'aide d'un modèle numérique utilisant la loi de Poisson et l'inférence Bayésienne, la proportion de virions agrégés et la composition des agrégats ont pu être estimées dans les conditions déterminées par le modèle. Leur modèle permet de prendre en compte des agrégats composés d'une ou deux unités infectieuses au maximum. Ces unités infectieuses pouvant être composées d'un seul ou de deux virions agrégés (figure 6). Le modèle développé par ces auteurs permet donc d'estimer l'agrégation entre particules virales avec certaines limitations dues au modèle (nombre de particules virales ou taille des agrégats par exemple).

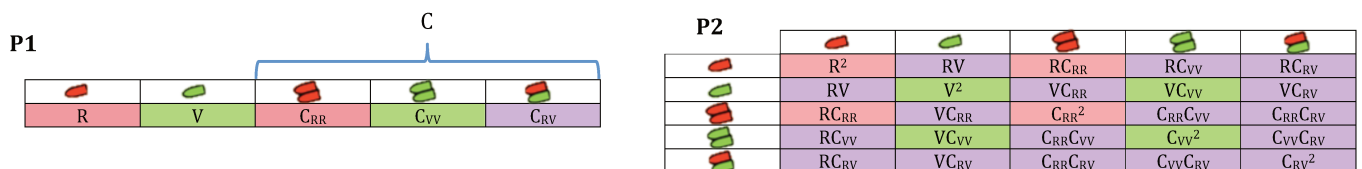


Figure 6 – Modèle probabilistique permettant d'estimer la proportion des différents types d'agrégats dans un stock viral

Le modèle tient compte de 5 modèles d'agrégats possibles : les virions rouges et verts seuls (leur fréquence dans l'échantillon est R et V respectivement) et les 3 possibilités de complexes formés de 2 particules : rouge-rouge, vert-vert et rouge-vert (leur fréquence dans l'échantillon est C_{RR}, C_{VV} et C_{RV} respectivement). La fréquence totale d'agrégation est C. La somme des fréquences de C, R et V représente 100 %. A l'aide d'un modèle numérique il est possible d'estimer la fréquence de chaque agrégat possible dans l'échantillon. Ce modèle ne prend en compte que la probabilité d'être infecté par un seul virion ou agrégat (P1) et la probabilité d'être infecté par un virion seul ou agrégat avec un virion seul ou un agrégat (P2). Adapté de [6].

Ce modèle pourrait être utilisé pour mesurer l'agrégation entre particules virales pour les virus influenza. Cependant une optimisation est nécessaire afin de prendre en compte plus de conditions d'agrégations, donc plus de particules virales.

Les co-infections jouent un rôle majeur dans l'évolution des virus influenza. L'étude de ces phénomènes et l'identification de facteurs les influençant pourraient permettre de mieux comprendre l'évolution des virus influenza.

II. Virus influenza : généralités, évolution et co-infections

1. Classification et nomenclature des virus influenza

Les virus influenza, responsables de pathologies respiratoires, appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae*. Tous les virus influenza sont enveloppés et présentent à leur surface une ou deux glycoprotéines : l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA) pour les virus influenza A (IAV) et B (IBV), et la glycoprotéine de fusion hémagglutinine-estérase (FHE) pour les virus influenza C (ICV) et D (IDV). Le génome de ces virus est segmenté et est composé de 7 ou 8 brins d'ARN monocaténaire de polarité négative. En se basant sur l'antigénicité de la protéine de matrice M1 et de la nucléoprotéine NP, les virus influenza sont classés en 4 genres : *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus* ou *Deltainfluenzavirus* [94, 95]. Le génome des virus influenza A et influenza B est composé de 8 segments d'ARN tandis que celui des virus influenza C et D n'est composé que de 7 segments.

Les virus influenza A et B sont responsables des épidémies saisonnières de grippe chez l'Homme [96, 97]. Les virus influenza C causent des infections bénignes pour l'Homme et les virus influenza D, découverts en 2013, n'infectent à ce jour que les bovins, les caprins et les porcins [94, 95, 98] avec toutefois quelques cas de séroconversions sans mise en évidence directe du virus chez des éleveurs bovins en Floride [98, 99]. Contrairement aux autres virus influenza, les IAV possèdent un large spectre d'hôtes et infectent de nombreuses espèces d'oiseaux volants ou non, avec l'exemple du manchot en Antarctique [100, 101], et de mammifères dont l'Homme [95, 102]. Les oiseaux aquatiques sauvages constituent le réservoir des IAV.

Les virus influenza A sont classifiés en sous-types en fonction de la combinaison HA-NA exprimée à la surface du virus. Ces deux protéines sont les plus polymorphes du virus avec 16 hémagglutinines et 9 neuraminidases décrites à ce jour [103] auxquelles s'ajoutent deux combinaisons supplémentaires, retrouvées exclusivement chez les chauves-souris, H17N10 et H18N11 [104, 105]. Les virus influenza B, présentant moins de diversité, sont classifiés en deux lignages en fonction de leur propriétés antigéniques : Victoria et Yamagata [106–108]. Les propriétés antigéniques des virus IBV étaient initialement déterminées à l'aide de tests d'inhibition d'hémagglutination réalisés à l'aide de sérum obtenus lors de l'immunisation avec des souches de références. Aujourd'hui des

RT-PCR sont utilisées car elles sont plus rapides [109]. Ces virus sont ensuite classés en groupes et sous-groupes en fonction de la similarité génétique de leur séquence [107].

La nomenclature des virus influenza respecte la codification suivante [107, 110] :

- Le type antigénique (A, B, C ou D).
- Pour les virus non humains : l'hôte d'origine.
- L'origine géographique.
- Le numéro de la souche.
- L'année d'isolement.
- Pour les virus influenza A, le sous-type est précisé entre parenthèses.
- Une spécification est faite pour les virus H1N1 circulants après la pandémie de 2009. Ces derniers sont identifiés comme H1N1pdm09.

Par exemple on trouvera A/Perth/16/2019 (H3N2) chez l'Homme et A/duck/Alberta/35/76 chez le canard.

Les épidémies saisonnières sont, depuis 1977, caractérisées par la circulation de virus influenza A de sous-type H1N1 (en 2009 le virus H1N1pdm09 a remplacé le précédent) et H3N2 et de virus influenza B du lignage Yamagata et/ou Victoria [96, 111].

2. Caractéristiques et cycle de réplication des virus influenza A et B

2.1. Particule virale

Les particules virales des virus influenza A peuvent être qualifiées de pléomorphes, avec des morphologies observées sphériques, sphéroïdiques, bacilliformes ou filamenteuses (Figure 7) [112–114]. On trouve également une forme particulière qui est filamenteuse et présentant une forme sphérique à son extrémité, cette forme est appelée corps d'Archetti (Figure 7E) [113, 115]. La taille de ces particules virales varie avec un diamètre compris entre 80 et 120 nm et une longueur pouvant atteindre 20 µm pour les formes filamenteuses (pour revue [114]). Les souches de laboratoire classiquement utilisées ont plutôt une forme sphérique [116], tandis que les souches circulantes, isolées depuis des prélèvements de patients, ont souvent une forme filamenteuse [117]. Cette forme filamenteuse est perdue lors de passages successifs de la souche sur des œufs de poule embryonnés [118]. La morphologie des virus influenza B est moins décrite. Cependant deux études récentes montrent que ces virus semblent être moins pléomorphes que les IAV avec une prédominance de virions sphériques, de même la variabilité au sein d'une même population virale semble être plus faible [119, 120].

L'enveloppe lipidique du virus provient de la cellule infectée. Le virus, lors du bourgeonnement à la membrane cellulaire, en emporte une partie qui est associée à différentes protéines virales ou cellulaires. On retrouve à la surface les deux glycoprotéines virales - l'hémagglutinine et la neuraminidase - formant les spicules caractéristiques des virus influenza initialement observées par Robert W. Horne en 1960 [121]. Ces protéines sont présentes en proportions différentes, avec 4-5 HA pour 1 NA [122]. A l'échelle d'une population virale, chacun des virions ne possède pas non plus le même nombre et/ou ratio de chacune des protéines en surface, favorisant ainsi la diversité virale [123]. On retrouve également enchâssée dans la couche lipidique la protéine M2 jouant le rôle de canal à protons lors du cycle viral pour IAV. Les virus influenza B expriment à la surface les deux glycoprotéines HA et NA comme pour IAV et présentent deux protéines enchâssées : BM2, dont le rôle est équivalent à M2 et la protéine NB.

Une étude décrit la présence de 36 protéines cellulaires retrouvées directement dans les particules virales. Des protéines cellulaires ont également été décrites comme présentes dans l'enveloppe et, pour certaines, comme jouant un rôle dans la structure ou la fonction du virus [124]. Une autre étude présente l'analyse de la composition protéique

obtenue par spectrométrie de masse de virions purifiés . Les auteurs ont ainsi identifié plus de 300 protéines de l'hôte qui pourraient également être présentes dans la particule virale [124, 125].

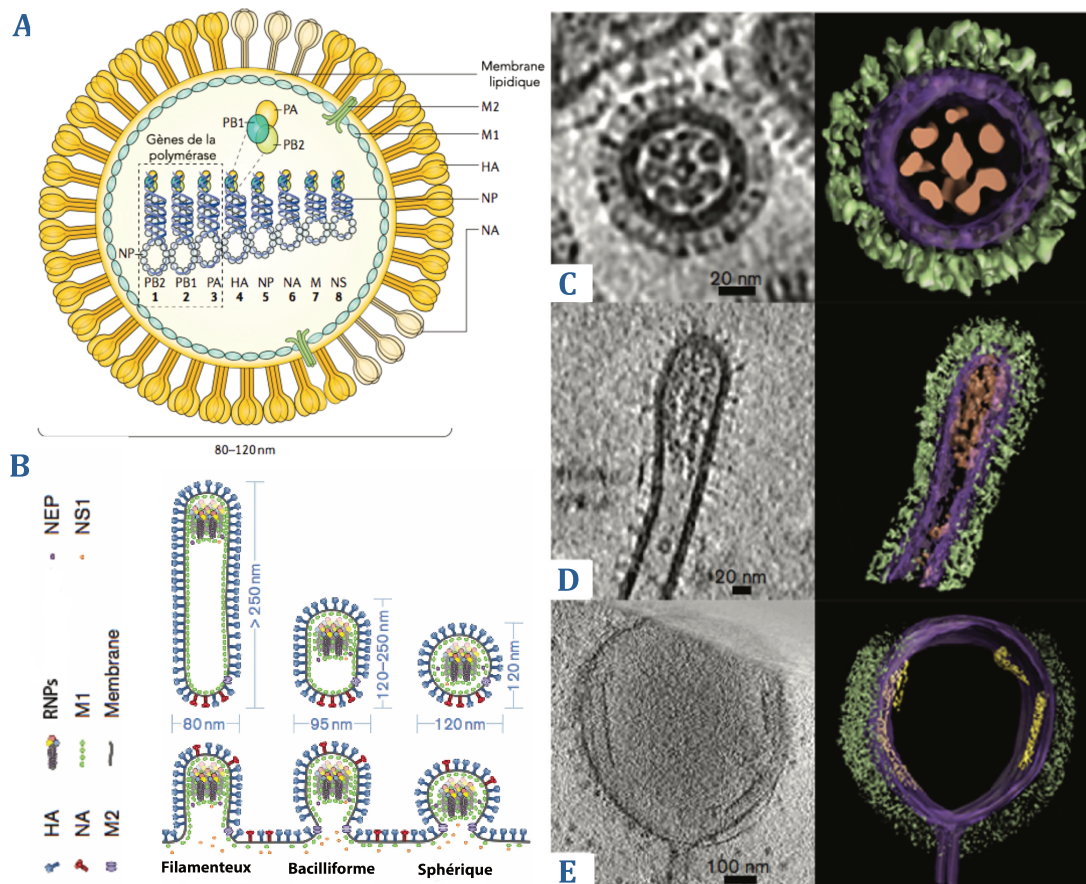


Figure 7 - Particule des virus influenza A

A. Représentation schématique d'une particule virale influenza A. L'enveloppe virale est composée des deux glycoprotéines de surface, l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA), et de la protéine M2 jouant le rôle de canal à protons. Sous l'enveloppe virale se trouve la protéine de matrice M1. Les huit RNPs composées, pour chacune, d'un segment d'ARNv en interaction avec la nucléoprotéine virale (NP) et coiffées des trois protéines de la polymérase virale (PB2, PB1 et PA), se trouvent au centre de la particule virale. Adapté de [95]. **B.** Représentation schématique de la morphologie des virus influenza A lors du bourgeonnement viral et suite à la libération des particules. Adapté de [117]. **C-E.** Observation de coupes de virions influenza A obtenues par cryo-microscopie électronique (à gauche) et leurs segmentations (à droite). C représente une coupe transverse de virion bacilliforme, D représente une coupe longitudinale du sommet d'un virion filamenteux et E représente une coupe longitudinale d'un corps d'Archetti. Les couleurs verte, violet, jaune et marron représentent respectivement les glycoprotéines d'enveloppe, la membrane et la matrice, des agglomérats de la protéine M1 et enfin le génome viral. L'association 7 + 1 des RNP décrite en [126] est bien visible en C. Adapté de [127].

Sous l'enveloppe virale se trouvent des oligomères de la protéine M1 formant la matrice du virus. Cette protéine a été largement décrite comme jouant un rôle dans la morphologie virale [117, 128, 129] mais également dans l'assemblage et le bourgeonnement de la particule virale en permettant, par multimérisation de M1, une déformation locale de la membrane lipidique [130].

A l'intérieur de la particule se trouvent huit segments d'ARN viraux monocaténaire de polarité négative enroulés autour d'oligomères de nucléoprotéines (NP). A l'extrémité de ce complexe se trouve l'hétérotrimère de protéines formant la polymérase virale composé des protéines basiques 1 (PB1) et 2 (PB2) et de la protéine acide (PA). Ce complexe composé de l'ARNv, de la NP et de la polymérase est appelé ribonucléoprotéine (RNP). Ces huit segments sont organisés sous la forme 7+1 soit un segment central autour duquel s'articulent les 7 autres segments [112, 126]. La nécessité de cette organisation a été montrée par Takeshi Noda avec l'incorporation de l'ARN ribosomal 18S et 28S de l'hôte en association avec la NP lorsqu'un segment d'ARN viral est manquant [126]. De même, les virus influenza C et D, possédant 7 segments d'ARNv, incorporent une huitième RNP afin de maintenir cette conformation [131]. L'incorporation sélective de ces ARN ribosomiques n'est à ce jour pas expliquée. Au sein de la particule virale, aussi bien pour les virus influenza A que B, les RNPs interagissent avec M1 [119].

Concernant les virus influenza A, de nombreuses publications, résumées en [132], font état de particules présentant un ou plusieurs segments à partir desquels l'expression des protéines n'est pas possible. Les auteurs d'un article de 2013 soulignent l'importance de ce phénomène en expliquant que plus de 90% des cellules infectées avec une particule virale échouent dans la réalisation d'une infection productive [40]. Ces particules qualifiées de non infectieuses peuvent se trouver sous deux formes différentes. D'un côté, les particules semi-infectieuses (SI) dont une ou des mutations sur le génome vont aboutir à l'expression d'une protéine tronquée ou non fonctionnelle. De l'autre côté, les particules dont le génome est déficient, appelées déficientes interférentes (DI), présentent de larges délétions internes, menant à l'incapacité d'expression de la protéine associée au segment. La figure 14 est une présentation schématique de ces particules. Leur rôle est détaillé en partie II.4.2 Le ratio entre particules non infectieuses et infectieuses est de l'ordre de 10-100 particules non infectieuses pour une particule infectieuse [132].

2.2. Génome et protéines virales

a. Virus influenza A

Le génome des virus influenza A est composé de 8 segments codant chacun pour une ou plusieurs protéines. Au total, ce sont dix protéines essentielles qui sont codées par le génome, auxquelles s'ajoutent jusqu'à huit protéines additionnelles. Les ARNv des virus influenza A, les ARN messagers (ARNm) qui en sont issus et les protéines synthétisées sont présentés schématiquement sur la figure 8 et plus en détails dans le tableau 1.

La taille de chaque segment est limitée avec, par exemple pour la souche A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), une longueur comprise entre 890 et 2341 nucléotides [133]. De ce fait la production de protéines virales passe par des stratégies alternatives de transcription ou traduction, avec par exemple l'épissage alternatif ou l'utilisation des différents cadres de lecture [134, 135]. Ces stratégies sont décrites pour plusieurs segments viraux et aboutissent à la synthèse de différentes protéines comme pour le segment 7, permettant la synthèse des protéines M1 et M2 [136]. Certains ARNm issus des segments 1, 7 et 8, obtenus par ces mécanismes alternatifs auront un rôle régulateur et ne permettent pas la synthèse de protéines associées. Tous les mécanismes alternatifs de production d'ARNm par les virus influenza sont résumés en [137, 138]. Des protéines cellulaires semblent également jouer un rôle dans ces mécanismes alternatifs, comme par exemple la kinase CLK1 [139]. Certaines protéines virales ayant même été décrites comme portant atteinte à l'épissage des ARNm cellulaires [140, 141]. L'épissage de certains ARNm codant pour des protéines virales pourrait être impliqué dans la modulation de la virulence en fonction de l'espèce de l'hôte et jouerait ainsi un rôle dans la restriction d'hôte [142].

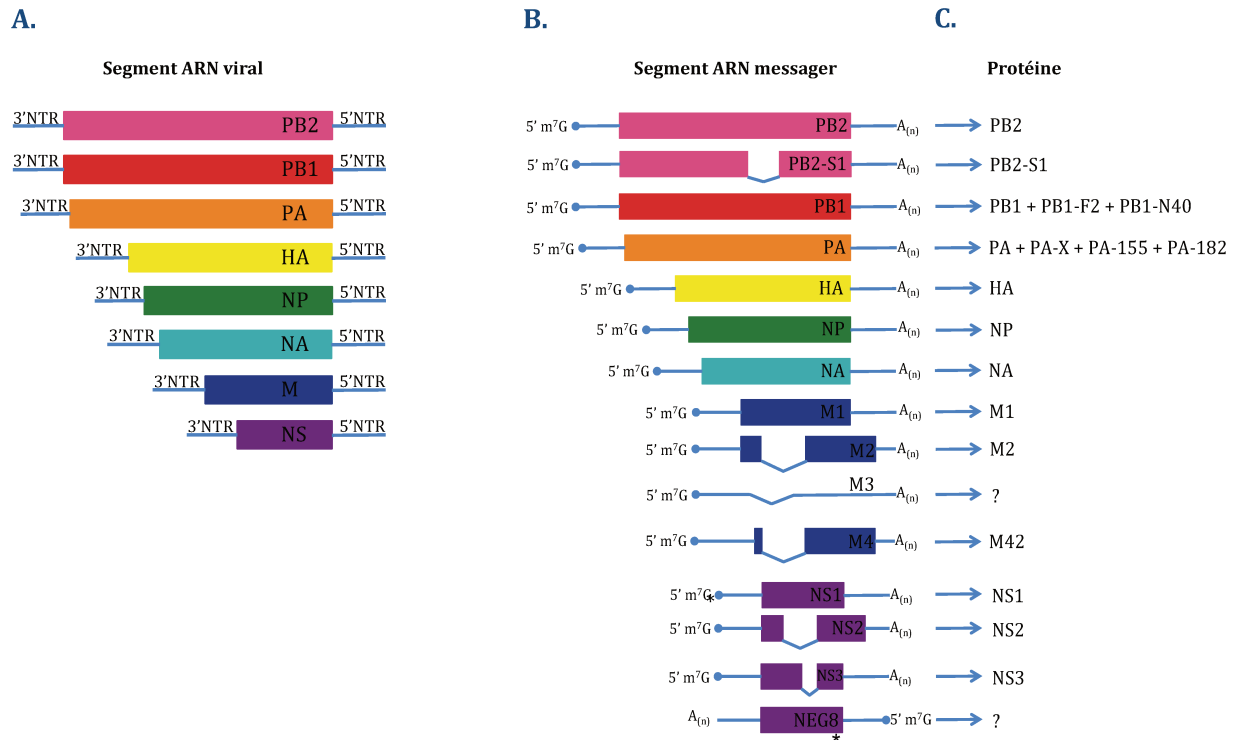


Figure 8 - ARN viraux, ARN messagers et protéines des virus influenza A

A. Représentation schématique des ARN viraux (ARNv) présents dans la particule virale. La partie représentée par un rectangle plein sera transcrite en ARN messager (ARNm). Les parties 5' et 3' représentent les parties non traduites de chaque segment, ces régions possèdent en partie les séquences d'emballage des segments viraux utilisées lors de l'assemblage de la particule virale. Le promoteur viral se trouve également dans ces régions. **B.** Représentation schématique des différents ARNm issus des ARNv présentés en A. La partie 5' m⁷G représente la coiffe des ARNm, provenant des ARNm cellulaires, obtenue par un mécanisme de vol de coiffe réalisé par la polymérase virale. Le rectangle présenté sur chaque ARNm représente la partie codante pour une protéine. La partie A_(n) représente la queue polyadénylée des ARNm. Chaque ARNm possédant une zone reliée par une forme en « V » est représentatif d'une forme d'épissage de l'ARNm principal (de la même couleur, en première position). * : NEG8 est en orientation antisens, le codon initiateur se trouve au niveau de la zone violette indiquée par le symbole astérisque. **C.** Liste des protéines issues des différents ARNm représentés. Les mécanismes alternatifs de traduction de différentes formes de protéines à partir du même ARNm ne sont pas représentés sur le schéma mais sont présentés dans le tableau 1. Adapté de [112, 138, 143].

Les ARNm transcrits et les protéines traduites, si tel est le cas (figure 8 et tableau 1), peuvent être regroupés en fonction du mécanisme sous-jacent :

- Epissage alternatif :

Segment 1 : l'épissage de l'ARNm codant pour la protéine PB2 permet d'obtenir un ARNm codant pour la protéine PB2-S1, dont le rôle n'est, à ce jour, pas connu *in vivo* mais qui inhibe, *in vitro*, la voie de signalisation dépendante de l'activation par RIG-I aboutissant à la synthèse d'interférons [143].

Segment 7 : l'ARNm principal code pour la protéine de matrice M1 et son épissage aboutit à la synthèse de 3 autres ARNm : M2, M3 et M4. Seuls M2 et M4 codent respectivement pour les protéines M2 et M42. La protéine M2 joue le rôle de canal à protons lors de l'entrée virale mais possède également un rôle important pour la

réplication virale. La protéine M42, bien moins représentée à la surface de la particule virale possède des fonctions analogues à M2 [144]. L'ARNm M3 semble agir comme régulateur négatif de l'expression des protéines M1 et M2 [145].

Segment 8 : L'ARNm du segment 8 code pour la protéine non structurale 1 (NS1) qui joue un rôle important dans la régulation immunitaire de l'hôte et dans la régulation de la transcription en interagissant avec la polymérase virale. Une modulation de la traduction par un mécanisme impliquant la région non traduite en 5' (5'NTR) a également été décrit [146]. L'épissage de l'ARNm aboutit à la synthèse de deux autres ARNm, NS2 et NS3, codant pour les protéines éponymes. NS2, également appelée NEP pour protéine d'export nucléaire (« Nuclear Export Protein » en anglais), est impliquée dans l'export nucléaire des ribonucléoprotéines virales néo-synthétisées. La protéine NS3 a été décrite chez la souris comme facteur d'adaptation à l'hôte. Son absence montre une perte de viabilité et de croissance du virus [147].

- Cadre ouvert de lecture alternatif

Segment 2 : l'ARNm principal issu de ce segment code pour la protéine PB1 (PB1). L'utilisation d'un codon AUG en amont de celui utilisé pour PB1 mène, *in fine*, à la synthèse de la protéine PB1-F2 considérée comme facteur de virulence. Elle induit par exemple l'apoptose des cellules infectées et régule l'activité de la polymérase en interagissant avec PB1. Cette protéine n'est cependant pas retrouvée pour toutes les souches virales [148–150].

- Codon d'initiation alternatif

Segment 2 : en complément des protéines PB1 et PB1-F2, la protéine PB1-N40 est traduite à partir du cinquième codon AUG, aboutissant à la synthèse d'une forme tronquée dans la partie N-terminale de la protéine PB1. La fonction exacte de cette protéine n'est pas connue à ce jour, sa présence n'est pas indispensable au cycle viral mais sa perte entraîne un effet délétère sur la réplication du virus. Des interactions entre PB1-N40 et PB1-F2 ont été montrées [151].

Segment 3 : la principale protéine synthétisée est la protéine PA. En complément deux autres protéines PA-N155 et PA-N182 sont traduites en utilisant comme codon initiateur l'AUG en position 11 ou 13 respectivement. La fonction précise de ces protéines n'est à ce jour pas documentée, cependant leur présence est nécessaire pour la réplication du virus et PA-N155 pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse chez l'animal [152].

- Changement du cadre de lecture par le ribosome

Segment 3 : en complément des trois autres protéines décrites pour ce segment, la protéine PA-X est traduite à partir du premier AUG initiateur de l'ARNm issu du segment 3 jusqu'au cent quatre-vingt onzième résidu puis par un changement de cadre de lecture en +1 aboutissant à la synthèse du domaine X pour la région C-terminale [153]. Cette protéine est donc composée du domaine N-terminal de l'endonucléase de PA associé au domaine X. Le rôle décrit de PA-X est de moduler la réponse immunitaire de l'hôte mais également de moduler la virulence [154].

- Orientation inversée du cadre ouvert de lecture

Segment 8 : l'ARNm de ce segment possède la particularité de présenter un cadre de lecture ouvert appelé NEG8 et dont l'orientation est inversée. La protéine associée a été modélisée par bioinformatique mais n'a jamais été retrouvée *in vivo*. Elle a été nommée NSP pour « Negative Strand Protein », soit protéine du brin négatif. Une hypothèse sur le rôle potentiel de ce cadre ouvert de lecture serait une immunomodulation de la réponse lymphocytaire T CD8+ mais le mécanisme sous-jacent reste à démontrer. Cette même étude suggère que la présence de la protéine pourrait dépendre de l'espèce hôte et jouer un rôle spécifique d'espèce [155].

Tableau 1- Principales protéines synthétisées par les virus influenza A

Pour chaque segment viral sont indiquées la ou les protéines synthétisées ainsi que leur taille (en acide aminés et en kDa) et la ou les fonctions associées. Résumé des informations disponibles en [114, 123, 138, 155-158]

Segment viral	Taille en nucléotides	Protéine	Taille en acides aminés	Taille en kDa	Principales fonctions
1	2341	PB2	759	86	- Sous-unité de la polymérase virale - Composante des RNPv - Joue un rôle dans le mécanisme de vol de coiffe par la reconnaissance des coiffes en 5' des ARNm cellulaires - Joue un rôle dans la virulence et l'adaptation à l'hôte
		PB2-S1	121	55	- Rôle inconnu <i>in vivo</i> . <i>In vitro</i> , inhibe la voie RIG-I dépendante de la synthèse d'interférons
2	2341	PB1	757	87	- Sous-unité catalytique de la polymérase virale - Composante des RNPv - Impliquée dans la transcription et la réplication virale
		PB1-F2	87	10	- Facteur de virulence - Joue un rôle pro-apoptotique - Régule l'activité de la polymérase - Inhibe la voie de signalisation antivirale mitochondriale (MAVS)
		PB1-N40	718	82	- Fonction inconnue à ce jour
3	2233	PA	716	84	- Sous-unité de la polymérase virale - Composante des RNPv - Possède l'activité endonucléasique nécessaire au vol de coiffe lors de la transcription
		PA-X	251	29	- Régule la réponse immunitaire de l'hôte et la virulence
		PA-155	705	62	- Fonction inconnue à ce jour
		PA-182	703	60	- Présence nécessaire à la réplication virale
4	1778	HA	550	61	- Glycoprotéine de surface du virus - Organisée en homotrimères à la surface - Responsable de l'attachement au récepteur - Impliquée dans la fusion des membranes virales et endosomales
5	1565	NP	498	56	- Composante principale des RNPv - Interagit directement avec l'ARNv - Contrôle l'import nucléaire des RNP
6	1413	NA	454	50	- Glycoprotéine de surface du virus - Organisée en homotétramères à la surface - Impliquée dans le clivage de la liaison de la HA au récepteur pour permettre la libération des virions neo-formés - Joue un rôle dans la pénétration du mucus cellulaire pour permettre l'accès au récepteur viral
7	1027	M1	252	28	- Protéine de matrice, retrouvée sous l'enveloppe virale sous la forme d'oligomères - Joue un rôle dans l'export nucléaire des RNPv - Participe au bourgeonnement des virions néo-formés à la surface de la cellule - Impliquée dans la morphologie des particules virales
		M2	97	11	- Protéine retrouvée sous la forme d'homotétramères à la surface du virus - Canal à protons pH-dépendant - Impliquée dans la libération des RNPv depuis l'endosome
		M42	99	11	- Pourrait remplacer M2 dans les particules virales qui en sont dépourvues
8	890	NS1	237	237	- Protéine non structurale aux activités multiples et essentielles : régulation de la réponse immunitaire innée, régulation négative de l'expression de certains gènes de l'hôte, régulation de l'activité de la polymérase
		NS2/NEP	121	121	- Impliquée dans l'export nucléaire des RNPv néo-synthétisées
		NS3	194	194	- Facteur d'adaptation à l'hôte - Non essentielle mais participant à la croissance virale et au potentiel de virulence
		NEG8	156 ou 216	?	- Rôle potentiel dans l'immunomodulation de la réponse lymphocytaire T CD8+

b. Virus influenza B

Les virus influenza B codent pour les mêmes protéines principales que les IAV. Chaque segment code donc pour une protéine à l'exception des segments 5, 7 et 8 qui codent chacun pour une protéine supplémentaire. Ces informations sont résumées en [160]. Le segment 6 codant pour la protéine NA code également, en utilisant un cadre de lecture alternatif, pour une protéine transmembranaire que l'on retrouve dans l'enveloppe du virus, appelée NB. Les fonctions exactes associées ne lui sont pas connues. Cette protéine est qualifiée de viroporine [161]. Le segment 7 codant pour M1 code également, par épissage alternatif, pour la protéine BM2 qui ne présente que peu de similarités de séquence avec la protéine M2 des virus influenza A. Cependant, la partie codant pour le domaine transmembranaire [162] est très similaire. Ces deux protéines ont une fonction similaire. Enfin le segment 8 des IBV code pour la protéine NS1 mais également pour la protéine NS2/NEP par épissage alternatif comme pour les IAV.

2.3. Récepteur viral

Les acides sialiques (AS), sont une famille de sucres composés de neuf carbones auxquels s'ajoute un groupement acide (acides nonulosoniques) ubiquitairement retrouvés à la surface des cellules et sur les glycoprotéines sialylées [163]. La HA du virus se fixe sur ces AS qui jouent un rôle de récepteur. Ces acides sialiques sont, par le biais d'une liaison N-glycosidique, reliés aux oses terminaux des glycoprotéines retrouvées à la surface cellulaire formant ainsi une glycoprotéine sialylée, très bien expliqué en [164]. Les virus influenza se fixent préférentiellement aux acides sialiques branchés au galactose terminal de ces glycoprotéines. Il existe deux types de branchements aux galactoses possibles pour les acides sialiques : les branchements en $\alpha 2,3$ ou en $\alpha 2,6$. La répartition en AS- $\alpha 2,3$ et en AS- $\alpha 2,6$ n'est pas homogène tout au long du tractus respiratoire humain [165]. Une majorité d'AS- $\alpha 2,6$ est retrouvée dans les voies respiratoires supérieures contre une majorité d'AS- $\alpha 2,3$ pour les voies respiratoires profondes. Les virus influenza humains se lient préférentiellement aux AS- $\alpha 2,6$ et les virus aviaires préférentiellement aux AS- $\alpha 2,3$ (figure 9) (pour revue voir [102]). Cette information apporte quelques éléments de réponse concernant la plus grande pathogénicité des virus aviaires chez l'Homme, avec une atteinte des voies respiratoires inférieures et profondes. Les oses impliqués et la nature des branchements aux acides sialiques jouent également un rôle

dans la barrière d'espèce et dans le tropisme chez l'hôte (pour revues voir [102] et [165] respectivement).

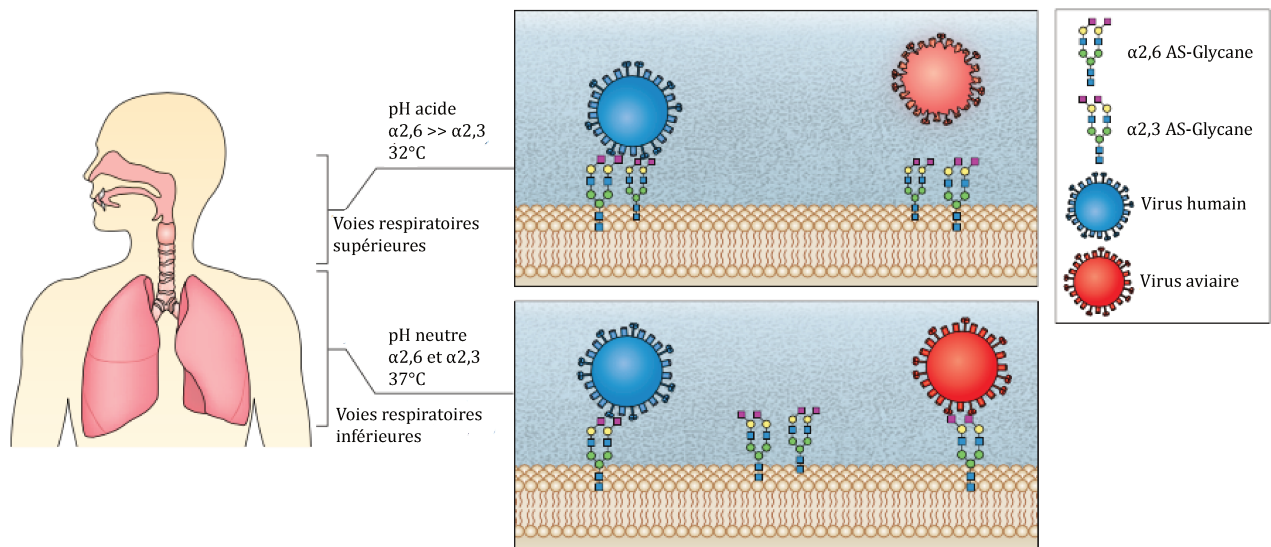


Figure 9 - Distribution des récepteurs aux virus influenza dans l'arbre respiratoire

Représentation schématique des acides sialiques (AS) branchés en $\alpha 2,3$ ou en $\alpha 2,6$ aux glycoprotéines dans les voies respiratoires supérieures et inférieures. Dans les voies respiratoires supérieures, la dominance d'AS branchés en $\alpha 2,6$ favorise la fixation des virus influenza humains. L'association à un pH acide défavorise fortement l'infection par les virus aviaires. On retrouve dans les voies respiratoires inférieures des AS branchés en $\alpha 2,3$ et $\alpha 2,6$ permettant la fixation des virus humains et aviaires. Cependant, la réplication des virus aviaires qui ont une polymérase plus active à 37°C que celle des virus humains, y est favorisée. Issu et traduit de [102].

Il est également à noter que les virus influenza B ont une affinité moins grande que les virus influenza A pour leur récepteur. Cette différence provient d'une mutation dans la HA. Chez les IAV, la tyrosine en position 98 interagit avec l'histidine 183 afin de former une liaison hydrogène qui stabilise le site de fixation du récepteur (RBS pour « Receptor Binding Site » en anglais). Chez la HA des IBV, une phénylalanine en position 98 entraîne un encombrement stérique qui ne permet pas la liaison hydrogène tyrosine-histidine nécessaire à la stabilisation du RBS [166].

2.4. Cycle viral

L'initiation du cycle viral (présenté figure 10) commence lors de l'attachement de l'hémagglutinine du virus à son récepteur présent à la surface des cellules. Cette glycoprotéine est présente sous la forme d'homotrimères à la surface du virus, formant les spicules caractéristiques des virus influenza. Chaque monomère est formé de deux sous-unités reliées entre elles par un pont disulfure. La première sous-unité HA1 possède un domaine de fixation au récepteur et la seconde sous-unité HA2 possède un peptide de fusion (pour revue [167]).

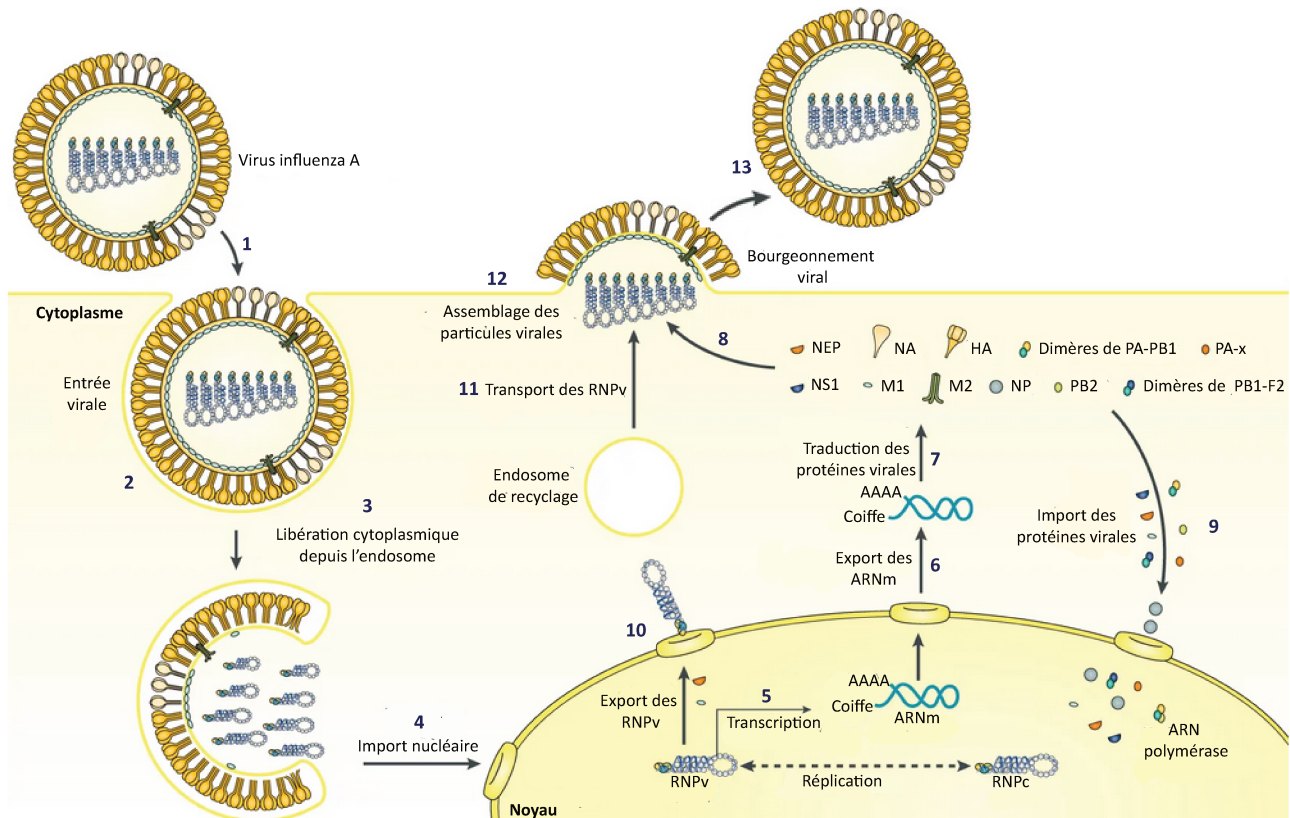


Figure 10 – Cycle viral des virus influenza A

1. Attachement de l'hémagglutinine (HA) à son récepteur. 2. Fusion de la membrane endosomale avec celle du virus. 3. Libération des ribonucléoprotéines virales (RNPv) dans le cytoplasme. 4. Import nucléaire des RNPv. 5. Transcription et réplication du génome viral. 6. Export nucléaire des ARNm viraux. 7. Traduction des ARNm viraux en protéines. 8. Adressage des protéines d'enveloppe du virus (HA, NA, M2) à la membrane plasmique. 9. Import nucléaire des protéines virales impliquées dans la réplication virale. 10. Export des RNPv néo-synthétisés. 11. Transport des RNPv à la membrane cellulaire. Ici, seul le modèle de transport utilisant des endosomes de recyclage et Rab11 est représenté. 12. Assemblage des nouveaux virions. 13. Bourgeonnement viral. Adapté, modifié et traduit depuis [95]. L'entrée dans la cellule, la réplication et l'assemblage viral sont détaillés en [112].

Lorsque le virus entre en contact avec une cellule, l'hémagglutinine scanne la surface de la cellule afin de trouver son récepteur. Si la liaison n'est pas optimale, l'activité neuraminidase de la NA clive la liaison entre la HA et l'AS. Une fois que l'hémagglutinine est en contact avec son récepteur, une liaison entre HA1 et les acides sialiques est créée. L'endocytose clathrine-dépendante de la particule virale est alors initiée. D'autres types d'endocytoses comme la macropinocytose ou endocytose indépendante de la clathrine ont aussi été décrites [168–170]. L'acidification de l'endosome entraîne une modification de conformation de HA2 aboutissant à l'exposition du peptide de fusion. La protéine M2, organisée en tétramères transmembranaires, joue un rôle de canal à protons et est activée par le pH acide. L'acidification du cœur de la particule virale entraîne une déstabilisation de l'interaction entre les RNP virales (RNPv) et la protéine de matrice M1. L'acidification favorise également le changement conformationnel nécessaire à la fusion entre la membrane de l'endosome et celle du virus. Les RNPv sont ainsi libérées et peuvent être relarguées dans le cytoplasme. La protéine TNPO1 est impliquée dans la dissociation des interactions entre les RNPv et la protéine M1 [171]. A l'aide de la protéine TNPO1 [171], les RNPv sont ensuite transloquées dans le noyau afin de réaliser les étapes de transcription et de réplication. L'exposition du signal de localisation nucléaire (NLS pour « Nuclear Localisation Sequence » en anglais) des nucléoprotéines en association avec les ARNv est impliquée dans l'import nucléaire. Cette translocation est réalisée par la voie d'import nucléaire dépendante des importines α et β (pour revues [112, 172]).

Une fois dans le noyau, les RNPv sont prises en charge par la polymérase virale afin d'y être répliquées et transcrites. Ces étapes sont détaillées dans [112, 173, 174]. De manière résumée, la transcription va être réalisée par la polymérase virale en utilisant un mécanisme dit de vol de coiffe des ARNm cellulaires. La protéine PB2, grâce à son domaine d'attachement à la coiffe des ARNm, va reconnaître et se fixer aux ARNm cellulaires. La protéine PA va ensuite interagir avec ce groupement et, grâce à son activité endonucléase, cliver la coiffe en 5' des ARNm cellulaires néo-synthétisés par l'ARN polymérase II. Une interaction entre le domaine C-terminal de l'ARN polymérase cellulaire II et la polymérase virale a été décrite récemment et permet d'expliquer comment se fait le rapprochement entre les ARNm et la polymérase virale [173]. Ce morceau d'ARNm cellulaire est ensuite utilisé par la protéine PB1 comme amorce pour synthétiser l'ARNm viral à partir de l'ARNv. Les ARN viraux sont polyadénylés par bégayement de la polymérase virale sur les uraciles terminaux présents sur la matrice. Ces ARNm viraux néo-formés sont, pour

certaines, épissées puis exportées dans le cytoplasme en utilisant la voie NXF1 [175]. Les protéines qui sont utilisées afin de réaliser de nouveaux cycles de transcription/réplication sont traduites par les ribosomes cytoplasmiques et sont ensuite adressées au noyau. C'est le cas de PB2, PB1, PA, NP, NS1, NEP et M1. Les protéines PB1 et PA sont adressées au noyau sous la forme d'un dimère tandis que PB2 et NP sont importées individuellement. Les protéines qui participent à la formation des nouvelles particules virales, soient HA, NA et M2, sont traduites par les ribosomes associés au réticulum endoplasmique. Ces protéines transitent ensuite par le réticulum endoplasmique avant d'être adressées à la membrane plasmique via le réseau golgien.

Concernant la réplication, de manière très simplifiée, les ARNV sont pris en charge par la polymérase virale afin d'être répliqués en un intermédiaire d'ARN appelé complémentaire (ARNc). Cet ARNc de polarité positive, dès sa synthèse, interagit avec la NP et le trimère de protéines composant la polymérase virale afin de former des ribonucléoprotéines complémentaires (RNPC). Ces RNPC sont à leur tour utilisées comme matrice afin de synthétiser de nouveaux ARNV et RNPv qui seront utilisés pour de nouveaux tours de transcription/réplication ou qui seront exportés dans le cytoplasme afin de former de nouvelles particules virales. La partie mécanistique est détaillée en [176]. Ces RNPv néo-synthétisées vont ensuite être exportées. Pour cela, la partie C-terminale de la NP des RNPv néo-synthétisées interagit avec la protéine M1, elle-même en interaction avec protéine d'export nucléaire NEP [177]. Ce complexe interagit ensuite avec l'exportine CRM1 afin de rejoindre le cytoplasme [178]. Cette structure est qualifiée de chaîne en guirlande («daisy chain » en anglais) [177].

Une fois dans le cytoplasme, les RNPv interagissent avec la GTPase Rab11 afin d'être adressées à la membrane pour assemblage et formation de nouvelles particules virales. L'interaction entre Rab11 et les RNPv est médiée par la sous-unité PB2. Une hypothèse est que cela permettrait de réaliser un contrôle qualité des RNPv incorporées dans les virions en vérifiant la présence de la polymérase [112]. Le mécanisme exact régissant la voie d'adressage des RNPv à la membrane par le biais de Rab11 n'est pas clairement élucidé (pour revue [179]). Une hypothèse repose sur l'utilisation des endosomes de recyclage et du réseau de microtubules par Rab11 afin d'adresser ces vésicules à la membrane cellulaire. Plus récemment, une autre hypothèse a été décrite selon laquelle les infections virales mèneraient à des tubulations du réticulum endoplasmique [180]. Les RNPv néo-formées qui sont exportées du noyau seraient alors

adressées au réticulum endoplasmique et interagiraient avec des vésicules contenant Rab11. Ces vésicules bourgeonneraient depuis la membrane du réticulum afin d'être adressées à la membrane pour former de nouvelles particules virales [180].

Une fois à la membrane, huit RNP_v s'assemblent afin de former le génome viral. Le mécanisme exact d'assemblage n'est pas connu à ce jour. Cependant, une étude récente suggère l'existence d'interactions inter- et intra-segments qui pourrait expliquer la spécificité d'assemblage [127]. Chaque segment présenterait une conformation particulière entre l'ARN_v et les NP, permettant ainsi des interactions ARN-ARN au sein du même segment et entre les différents segments. Ces interactions permettraient l'assemblage préférentiel de certaines combinaisons de segments. Certaines interactions sont plus fréquemment retrouvées. C'est par exemple le cas pour les segments PB1 et NA dont la co-ségrégation est retrouvée pour les différentes souches testées [127]. Ces interactions sont donc proposées comme médiateur de la co-ségrégation des segments durant le réassortiment viral et jouant donc un rôle dans la sélection préférentielle des segments pour l'assemblage dans la particule.

Une fois les segments assemblés en conformation 7 + 1, la particule bourgeonne grâce à la protéine M2 en permettant la scission au niveau de la membrane cellulaire [181]. Le relargage de la particule virale sera dépendant de l'activité sialidase de la neuraminidase. Cette protéine est retrouvée à la surface de la particule virale et est organisée en tétramères. En clivant les résidus d'acides sialiques à la surface cellulaire, la neuraminidase permet à la particule virale de se détacher de la surface cellulaire et de se libérer d'éventuelles interactions pour être ainsi libérée dans le milieu extracellulaire. Les virions néo-formés, en emportant la membrane cellulaire, présentent à leur surface des acides sialiques. L'activité sialidase prévient donc également l'agrégation entre particules virales [182]. Afin d'éviter des phénomènes de compétition dans les étapes d'entrée virale et de libération des particules virales, il est important que les activités de la neuraminidase et de l'hémagglutinine soient relativement équilibrées [183]. L'importance de cet équilibre est présentée en II.4.4. Les particules ainsi libérées ne sont pas infectieuses en l'état. Le clivage de l'hémagglutinine par une protéase est nécessaire afin d'obtenir les deux sous-unités HA1 et HA2 à partir du précurseur HA0. Ce clivage se fait au niveau d'un site de clivage monobasique ou multibasique [184]. La HA des virus humains porte un site de clivage monobasique qui est clivé par une protéase extracellulaire que l'on retrouve au niveau du tractus respiratoire.

3. Épidémiologie virale et évolution

3.1. Épidémiologie

3.1.1 Hôtes et réservoir

Les virus influenza A infectent un très large spectre d'hôtes (figure 11). Les oiseaux aquatiques jouent le rôle de réservoir viral. Les Anseriformes (canards, kamichis, canaroyes, cygnes) et les Charadriiformes (mouettes, sternes et oiseaux de rivage) sont deux ordres particulièrement concernés. La plus grande diversité virale se retrouve dans le réservoir du virus. Tous les sous-types de HA et NA y sont retrouvés sauf les combinaisons H17N10 et H18N11 qui n'ont, à ce jour, été retrouvées que chez certaines espèces de chauves-souris du nouveau monde [104, 105]. Chez ces oiseaux, la réplication du virus se fait majoritairement dans le tractus digestif et y est asymptomatique le plus souvent [102, 185, 186]. Cette réplication à bas bruit permet au virus de se répliquer et d'être maintenu au sein du réservoir. La voie de transmission oro-fécale est privilégiée chez les oiseaux aquatiques. Le virus présent dans les fèces diffuse dans l'eau, infectant ainsi les individus à proximité [186].

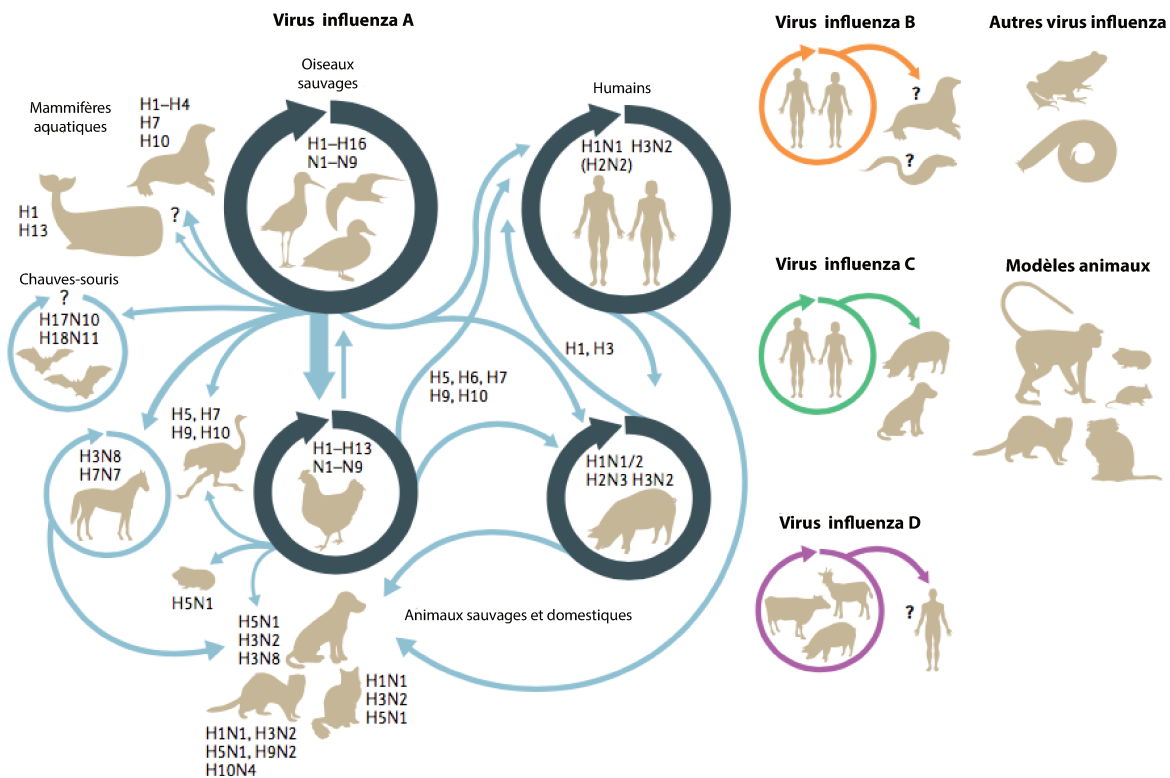


Figure 11 – Écologie des virus influenza

Toutes les combinaisons de HA (1-16) et de NA (1-9) des virus influenza A circulent dans le réservoir représenté par les oiseaux sauvages aquatiques. Les combinaisons H17N10 et H18N11 n'ont été retrouvées que chez les chauves-souris [104, 105]. Depuis le réservoir, certains sous types peuvent être directement transmis à d'autres hôtes par un hôte intermédiaire ou par acquisition de mutations d'adaptation (flèches bleu clair). D'autres sous-types circulent largement au sein de certaines populations et sont à l'origine d'épidémies (flèches bleu nuit). Le sous-type H2N2 a circulé chez l'Homme mais ne circule plus actuellement. Les virus influenza B circulent chez l'Homme et quelques cas de

contaminations de phoques ont été décrits [187]. Les virus influenza C circulent également chez l'Homme et peuvent être transmis aux porcins. Les virus influenza D circulent chez les caprins, bovins et porcins et quelques cas de séroconversions ont été mis en évidence chez l'Homme [98, 99, 188]. Des ARN viraux ressemblant à ceux des virus influenza ont été mis en évidence chez le crapaud asiatique de Wuhan, la myxine de Wengling et l'anguille épineuse. Toutefois, le genre viral reste à définir. L'infection d'un grand nombre d'animaux par les virus influenza a été possible en laboratoire. Issu et traduit depuis [102].

Depuis le réservoir, des transmissions des virus influenza A peuvent s'observer chez d'autres espèces comme chez la volaille domestique ou de nombreuses espèces de mammifères incluant les mammifères marins, les chevaux, les porcs et même, de manière sporadique l'Homme. Les virus influenza aviaires présentent donc un fort potentiel d'infection zoonotique. De plus, le contact rapproché entre l'Homme et la volaille domestique ou les porcins, particulièrement dans les fermes ou les marchés d'animaux vivants, joue un rôle clé dans ces transmissions zoonotiques. Ces animaux jouent le rôle d'hôte intermédiaire dans la transmission à l'Homme. C'est par exemple le cas avec les transmissions régulières à l'Homme de la souche aviaire hautement pathogène H5N1 ou, plus récemment, H7N9. Plusieurs de ces transmissions ont été recensées au cours des dernières années (pour revue [189]).

Il faut cependant préciser que la majorité des cas de transmissions zoonotiques à l'Homme ne mènent pas à l'émergence de ces souches dans la population humaine mais se cantonnent à des infections sporadiques. L'établissement d'une nouvelle lignée virale dans la population humaine nécessiterait (i) une transmission d'un animal à l'Homme, (ii) une réplication efficace du virus chez l'Homme, (iii) une transmission interhumaine relativement efficace. De plus, comme mentionné en II.2.3, les virus aviaires fixent préférentiellement les acides sialiques branchés en $\alpha 2,3$, moins représentés dans les voies respiratoires supérieures de l'homme, diminuant ainsi la probabilité d'infection chez l'Homme [164]. Cependant, les porcs possèdent des acides sialiques branchés en $\alpha 2,3$ et en $\alpha 2$, ils jouent ainsi le rôle d'hôte intermédiaire pour les virus humains et aviaires, permettant le brassage entre les souches virales. Ce brassage, en favorisant l'émergence de ces virus chez l'Homme, représente donc une menace [190].

Les virus influenza B ne circulent que chez l'Homme et sont responsables avec les IAV des épidémies saisonnières de la grippe. Quelques phoques infectés ont également été reportés [187]. Cependant, la voie de transmission initialement décrite comme naturelle a été remise en cause. Durant cette période, beaucoup de jeunes phoques ont en effet présenté une infection par des vers pulmonaires (*Otostrongylus circumlitus* et *Paraflaroides gymnurus*) [187]. Il se pourrait donc que l'infection ait été médiée par ces

vers comme hôte intermédiaire. Il a également été montré lors d'infections expérimentales que les virus influenza B sont capables d'infecter et de se répliquer chez le porc, mais seuls les virus influenza D ont montré un potentiel de transmission par contact entre les porcs [191].

Les virus influenza C circulent chez l'Homme et sont responsables de pathologies bénignes. Ces virus circulent également chez les porcins [94].

Les virus influenza D circulent chez les bovins, caprins et porcins. Des cas de transmission à l'Homme ont été décrits [98, 99, 188].

3.1.2 Infection saisonnière chez l'Homme

Chaque année chez l'Homme, les virus influenza A et B sont responsables d'infections respiratoires aiguës. Une étude récente montre que ces infections sont à l'origine de 300 000 – 600 000 décès autour du globe chaque année. Ces estimations sont supérieures à celles initialement rapportées par l'OMS [192].

La symptomatologie associée à la pathologie est, dans le cas d'une infection restreinte aux voies aériennes supérieures, composée d'une fièvre rapide et intense (>38°C), de toux, de céphalées (maux de tête), d'une congestion nasale, de myalgies (douleurs musculaires), d'une inflammation de la sphère oro-pharyngée et d'une très grande fatigue dans la majorité des cas. Il arrive parfois que l'infection mène au décès de la personne infectée. La mort peut être engendrée par l'infection elle-même, associée ou non, à une réaction forte du système immunitaire. Elle peut également être causée par une pneumonie bactérienne induite. Cette infection bactérienne peut être concomitante à l'infection virale ou survenir *a posteriori*. Ce phénomène et les mécanismes immunitaires associés sont décrits en [193].

La transmission du virus se fait généralement par le biais de gouttelettes respiratoires, d'aérosols ou par une contamination par le biais de surface contaminée [194].

Les données épidémiologiques montrent que toute la population humaine peut être touchée avec une estimation portant sur plusieurs millions de personnes infectées chaque année. Toutes les catégories de populations sont concernées avec toutefois un taux d'hospitalisation et une mortalité plus élevée pour les enfants de moins de 5 ans et les personnes âgées de 65 ans ou plus. Les personnes atteintes de maladies chroniques,

les fumeurs, les femmes enceintes, les personnes en surcharge pondérale (IMC >40 kg/m²) et certaines origines ethniques sont également à risque [195].

Dans la population humaine circulent actuellement deux virus influenza A, de sous-type H1N1 et H3N2, et deux virus influenza B, un du lignage Victoria et un du lignage Yamagata.

3.1.3 Traitements et vaccination

Les traitements actuellement utilisés afin de traiter les infections par les virus influenza ciblent principalement les protéines retrouvées à la surface du virus. Le Zanamivir (Relenza™) et l'Oseltamivir (Tamiflu™), commercialisés en France, sont des inhibiteurs compétitifs de la neuraminidase. Dans d'autres pays on retrouve le Peramivir (Rapivab™) et Laninamivir (Inavir™). Les amantadanes avec l'Amantadine (Mantadix™) et la Rimantadine (Roflual™, en arrêt de commercialisation en France depuis 1983) sont des molécules qui inhibent la fonction de canal à protons de la protéine M2 des virus influenza A et sont donc sans effet sur les IBV. Ces molécules sont de moins en moins utilisées car presque toutes les souches circulantes sont naturellement résistantes aux amantadanes [95, 196, 197]. Des cas de résistances aux autres molécules antivirales sont également rapportées (pour revue [198]).

Afin de pallier ce problème de résistance aux antiviraux, de nouvelles molécules sont testées et ciblent d'autres fonctions cellulaires ou virales. Le Favipivir (inhibiteur nucléosidique de l'ARN polymérase ARN dépendante de nombreux virus à ARN), le Pimodivir (molécule bloquant l'attachement de la coiffe à la protéine PB2 dans le mécanisme de vol de coiffe), le Baloxivir (inhibe l'activité endonucléase de PA), le Nitazoxanide (bloque la maturation de la HA sous la forme du précurseur HA0) et la Fludase (analogue à la neuraminidase qui est inhalé et clive les AS branchés en α 2,3 et α 2,6 à la surface des cellules) sont ainsi testés afin d'être commercialisés [199–204].

La protection la plus efficace est, à ce jour, la vaccination. L'OMS recommande particulièrement la vaccination pour les jeunes enfants, les femmes enceintes, les travailleurs dans le domaine de la santé, les patients porteurs de maladie chronique et les personnes de plus de 65 ans. Le vaccin majoritairement utilisé est composé de trois (trivalent) ou quatre (quadrivalent) souches virales inactivées. L'intérêt de ce vaccin est de couvrir chacun des deux sous-types de virus influenza A circulant et les deux lignages

de virus influenza B circulant pendant la saison épidémique [95]. Pour la saison 2020/2021 le vaccin tétravalent est composé des souches [205] :

- A/Guangdong-Maonan/SWL 1536/2019 (H1N1pdm09),
- A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2),
- B/Washington/02/2019 (B-Victoria),
- B/Phuket/3073/2013 (B-Yamagata).

On trouve également un vaccin vivant atténué dont la souche thermosensible ne peut se répliquer que dans les voies nasales. Ce vaccin disponible sous la forme d'un spray nasal est utilisé dans certains pays comme les Etats-Unis d'Amérique et est recommandé pour les patients entre 2 et 49 ans, en bonne santé et n'est pas recommandé pour les femmes enceintes et les personnes immunodéprimées [206].

La circulation du virus étant facilitée par des températures froides, le pic épidémique est observé en hiver pour l'hémisphère nord. Dans l'hémisphère sud, le pic est observé durant l'été. Grâce à cela, l'OMS, en collaboration avec les centres de références, détermine la composition vaccinale deux fois par an. L'intérêt étant de prédire quelles seront les souches qui circuleront dans l'autre hémisphère. La composition change régulièrement à cause de l'évolution rapide de l'antigénicité du virus. Cette vitesse d'évolution peut apporter un élément de réponse quant à la différence d'efficacité vaccinale observée, par souche et dans sa globalité. Par exemple, une étude publiée en 2019 montre que l'efficacité vaccinale pour les années 2012-2015 dans l'hémisphère nord, était de 53% en moyenne (44%-61%) mais avec de plus grandes variations à l'échelle individuelle de chaque souche vaccinale [207].

Pour le vaccin inactivé, la production actuelle des souches vaccinales repose sur une amplification sur œufs embryonnés suivi d'une inactivation des souches virales. Ce système est limitant en termes de production et cela peut poser problème lors d'un besoin d'une production massive de souches vaccinales dans le cas de pandémie. Afin de pallier cela, l'agence américaine des produits alimentaires et de santé (FDA, « Food and Drug Agency » en anglais), a autorisé, en 2012, la production de virus sur cellules de rein de chiens (MDCK), ayant un rendement plus important. D'autres méthodes de production sont à l'étude et sont résumées en [208].

La production d'un vaccin dit universel permettrait de diminuer ces variations d'efficacité vaccinales et d'induire une meilleure efficacité vaccinale. Une des stratégies repose sur le ciblage de la tige de l'hémagglutinine, décrite comme plus stable. Ce type de

vaccin est donc actuellement à l'étude et les données préliminaires sont encourageantes avec l'entrée dans des études précliniques ou cliniques de certains candidats vaccins [122]. D'autres cibles vaccinales sont à l'étude, comme la protéine M2 qui possède une partie relativement conservée entre les souches [208, 209].

3.2. Évolution

3.2.1. Mécanismes d'évolution

L'évolution rapide des virus influenza est possible grâce à une forte variabilité génétique et à la particularité du génome d'être segmenté. L'évolution se fait par le biais de deux mécanismes : le glissement antigénique et la cassure antigénique, représentés en figure 12 [95].

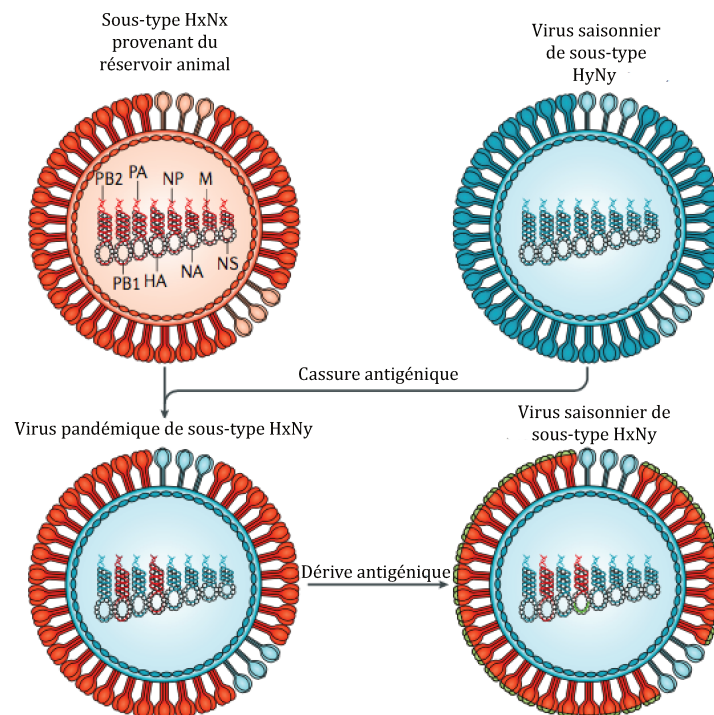


Figure 12 – Cassure et dérive antigénique

La co-infection entre un virus de sous-type HxNx provenant du réservoir animal avec un virus épidémique circulant dans la population humaine de sous-type HyNy peut mener à l'émergence d'un virus de sous-type HxNy. Ce virus introduit dans une population immunologiquement naïve pourrait mener à une pandémie. Une fois l'immunité adaptative installée dans la population, le virus circule comme virus épidémique saisonnier. La pression de sélection s'applique à ce moment-là et conduit à la dérive antigénique. Les mutations dans la HA et NA qui permettent d'échapper à la réponse immunitaire sont donc sélectionnées. Adapté et traduit de [95, 156].

a. Glissement antigénique

Les virus influenza ne possèdent pas d'activité de relecture de la polymérase [210]. Les mutations entraînent *in fine* des substitutions d'acides aminés. Lors d'une infection par le virus, la protéine HA est la cible première de la réponse par le système immunitaire adaptatif de l'hôte [211]. La forte pression de sélection associée au taux de mutation important conduit à la sélection de variants antigéniques non reconnus lors de la réponse adaptative. L'accumulation de mutations dans la HA, mais également la NA, mène au glissement antigénique. Ce phénomène permet d'expliquer l'intérêt majeur de faire évoluer régulièrement la composition du vaccin saisonnier.

Concernant les virus influenza B, la diversité génétique est plus faible et donc la dérive antigénique est limitée. Une étude publiée en 2019 suggère que les virus IBV seraient soumis à plus de goulots d'étranglements, limitant la diversité virale [212].

b. Réassortiments et cassure antigénique

Les événements de réassortiments chez les virus influenza permettent l'évolution virale et l'émergence de nouveaux génotypes depuis les cellules co-infectées. Les virions néo-formés sont composés d'un mélange de segments provenant des virus parentaux. Ces événements de réassortiments peuvent être informatifs sur la survenue d'événements de co-infections. En effet, pour qu'un événement de réassortiment puisse avoir lieu, il faut qu'une cellule soit co-infectée par deux ou plusieurs virus. Le réassortiment viral est cependant limité et contraint par de nombreux facteurs inter-/intra-hôte et ne permet pas de directement quantifier la fréquence de co-infections [213].

Concernant les facteurs inter-hôtes pour les virus influenza, on retrouve la capacité de transmission et la diversité de population lors de la transmission. Le réassortiment viral est possible si plusieurs événements de transmission de particules virales de manière groupées ou isolées surviennent. Premièrement, il a été montré que la seconde infection doit se situer dans un intervalle temporel précis afin de permettre la réalisation de réassortiments [214]. Des cochons d'Inde ont été infectés par un premier virus influenza puis par un second virus à différents temps suite à la primo-infection. Une restriction des événements de réassortiments est observée *in vivo* dix-huit heures suite à la primo-infection [214]. Deuxièmement, afin d'observer des événements de réassortiments, il est nécessaire pour les cellules ou organismes concernées d'être co-infectés par plusieurs variants différents. Plus la taille de la population initiale est faible,

plus la probabilité pour une cellule d'être infectée par deux variants différents ou plus est faible [214]. La voie de transmission ou la présence de goulots d'étranglements peuvent avoir un effet sur la réduction de la taille de population ou de la diversité mais également sur le taux de transmission du virus [214, 215].

Les réassortiments au sein de l'hôte infecté sont dépendants de facteurs intra-hôtes parmi lesquels on retrouve la diversité de population, les goulots d'étranglements et le taux de réassortiment. Les virus influenza présentent un taux de mutations de 10^{-4} à 10^{-6} substitutions par site et par réplication. Ce taux permet l'introduction d'au moins une mutation à chaque cycle de réplication. Ce fort taux de mutations joue en faveur des réassortiments en favorisant la diversité de population. Cependant des mécanismes de sélection de certains variants au sein de l'hôte ont été observés et peuvent limiter la formation de réassortants. Par exemple, un passage successif sur cellules de la souche virale A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) conduit à la sélection de certains variants. Ce stock viral a été utilisé pour infecter des patients et l'analyse du séquençage nouvelle génération (« New Generation Sequencing » ;NGS) des virus produits montre une dominance par certains variants minoritaires dans le stock initial. Une sélection locale chez le sujet infecté a donc eu lieu [216]. Concernant la fréquence de réassortiments, il a été montré *in vivo* et *in vitro* que les virus réassortants pouvaient représenter jusqu'à 70% des virions néo-formés avec une plus grande proportion de réassortiment si l'infection par le second virus est successive et non concomitante au premier virus [214, 217, 218]. Pour obtenir des données quantitatives, les auteurs ont utilisé deux souches virales ayant une réplication virale identique mais différenciable par la présence de plusieurs mutations silencieuses dans un des deux stocks [217].

En théorie, en raison de la nature segmentée du génome, si aucun mécanisme de sélection n'est appliqué, une cellule co-infectée par deux virus influenza A, possédant 8 segments génomiques, peut produire 2^8 soit 256 combinaisons possibles dont 254 sont différentes des compositions parentales [217, 219]. Les nouveaux virions formés suite à la co-infection entre deux souches virales, particulièrement si les segments HA et NA sont concernés, peuvent mener à l'émergence de nouveaux sous-types dans la population humaine. L'introduction de nouveaux sous-types provenant du réservoir viral aviaire conduit à un changement drastique vis-à-vis de l'antigénicité des protéines hémagglutinine et/ou neuraminidase. L'absence d'immunité pour ce nouveau sous-type peut, par le biais de cette cassure antigénique, être à l'origine de pandémies dévastatrices.

De plus, certains virus aviaires dit hautement pathogènes expriment une hémagglutinine H5 ou H7 qui possède un site de clivage multibasique clivé par la furine, une protéase ubiquitaire issue du réseau trans-golgien. Cette particularité confère à ces souches un tropisme plus large, responsable d'infections systémiques dont l'issue peut être fatale.

3.2.1. De la pandémie à l'épidémie : histoire de l'évolution

Au cours des cinq-cents dernières années, environ quatorze pandémies ont pu être observées et décrites grâce aux données cliniques et épidémiologiques [220, 221]. Elles sont presque exclusivement causées par des virus influenza, sauf pour la dernière pandémie de 2019 causée par un coronavirus. Un événement pandémique concernant les virus influenza est décrit tous les 8 à 41 ans [220]. Rien qu'au cours des cent-quarante dernières années, six pandémies ont eu lieu : 1889, 1918, 1957, 1968, 1977 et 2009. Les cinq dernières sont présentées figure 13. La pandémie de 1918 causée par un virus H1N1 est appelée grippe espagnole. Elle est responsable de la mort de plus de 50 millions de personnes autour du globe. Cette pandémie est la plus dévastatrice enregistrée à ce jour. Certaines hypothèses tendent à expliquer la mortalité associée. Une possible surinfection bactérienne causant des pneumonies pourrait avoir augmenté le nombre de décès. Cependant le pathogène associé n'a, à ce jour, pas pu être identifié. Une autre spécificité de cette pandémie concerne les populations touchées avec une courbe trimodale dite « en W ». Les populations les plus touchées furent les jeunes enfants, les jeunes adultes et les personnes âgées. Les jeunes adultes ne sont pas la catégorie habituellement la plus concernée par les infections grippales [195]. Suite à cette pandémie, ce virus a circulé pendant presque quarante ans, jusqu'en 1957, tout en dérivant antigéniquement. En 1957, une cassure antigénique permettant l'introduction dans la population humaine d'un virus H2N2, responsable de la grippe dite asiatique, dans la population a mené à une pandémie dont le nombre de morts fut inférieur à 1918, mais la symptomatologie fut identique avec toutefois une distribution bimodale de l'infection, plus concordant avec ce que l'on peut observer aujourd'hui concernant la circulation des virus de la grippe. L'origine de ce virus proviendrait d'un réassortiment entre un virus aviaire de type H2N2 et le virus H1N1 circulant depuis 1918. Le virus réassortant ainsi obtenu possède les segments HA, NA et PB1 du virus H2N2 et les autres segments du virus H1N1. L'hôte intermédiaire ayant permis le réassortiment n'a toutefois pas pu être identifié. En 1968, le virus circulant a réassorti avec un virus aviaire. Le virus ainsi obtenu possède tous les

segments provenant du virus H2N2 à l'exception du segment codant pour HA et PB1 provenant du virus aviaire H3N2. Ce virus responsable de la pandémie dite de Hong-Kong est un virus H3N2 dont le sous-type circule encore aujourd'hui. Cette pandémie fut moins mortelle que celle de 1918 en raison de l'immunisation d'une partie de la population contre le sous-type 2 de la neuraminidase. Les anticorps dirigés contre la NA n'empêchent pas l'infection mais il semble qu'ils aient joué un rôle dans la réduction de la durée et de l'intensité de la pathologie. En 1977, en parallèle de la circulation du virus H3N2, un virus H1N1 descendant du virus de la grippe espagnole, a été réintroduit en Russie. Les analyses moléculaires ont permis de mettre en évidence que ce virus possédait la même antigénicité que le virus H1N1 circulant en 1950 [222]. Il s'agirait alors de la réintroduction au sein de la population d'un virus congelé. Son absence de circulation pendant une trentaine d'année n'ayant pas été suffisante pour une perte totale d'immunisation de la population, la mortalité observée ne fut pas élevée. Ce virus a circulé jusqu'en 2009 où il a progressivement été remplacé par un nouveau virus H1N1 nommé H1N1pdm09. Le virus ainsi nommé provient d'une succession d'événement de réassortiments. En premier lieu, un triple réassortiment chez le porc a permis l'émergence d'un virus H1N2 ayant les segments PB1 et NA provenant du virus H3N2 humain saisonnier, les segments PB2 et PA d'un virus H1N1 aviaire et enfin les segments HA, NP, M et NS d'un virus H1N1 classique circulant chez les porcins. Ce virus H1N2 réassorti a ensuite fait l'objet d'un nouveau réassortiment chez le porc avec un virus aviaire H1N1, dit eurasiens. Ce nouveau virus H1N1pdm09 présente les segments PB2, PB1, PA, HA, NP et NS du virus triplement réassorti et les segments NA et M du virus H1N1 eurasiens [96].

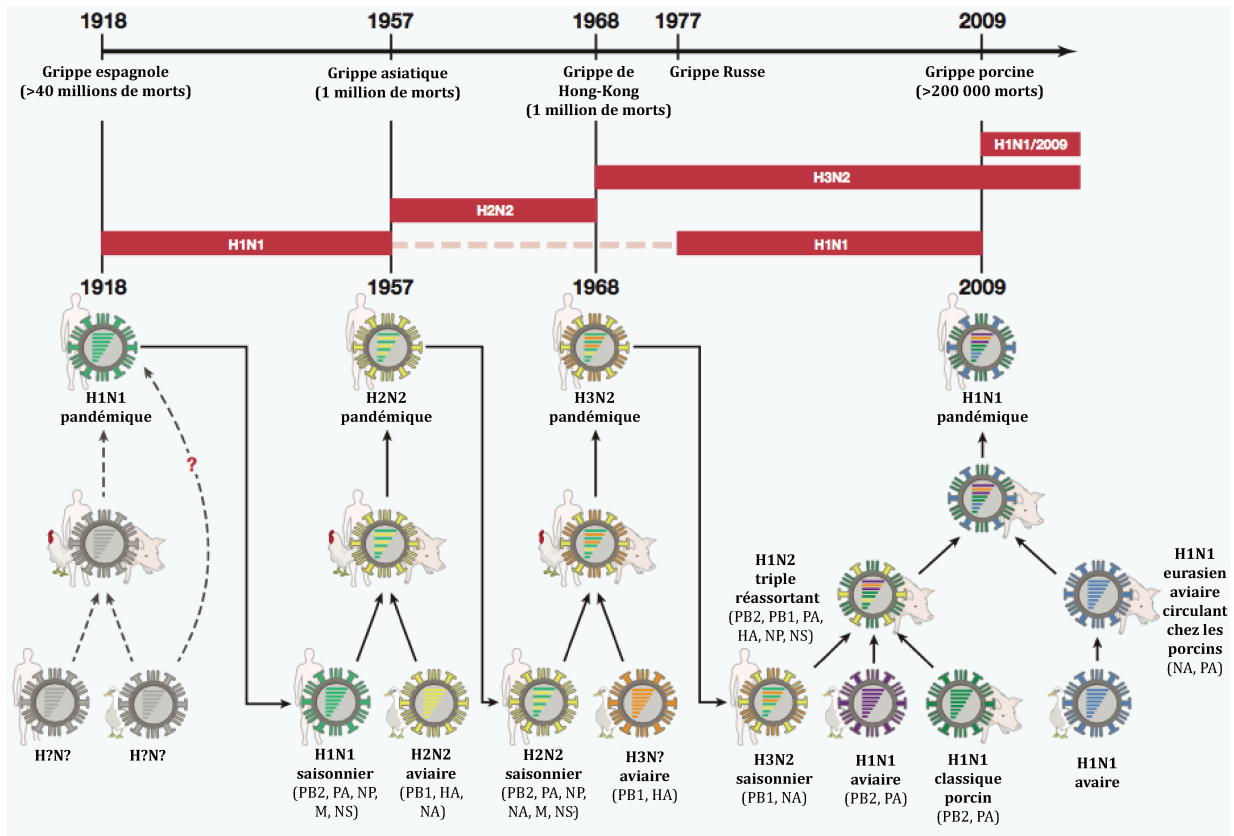


Figure 13 - Pandémies de virus influenza A depuis 1918

Les barres rouges indiquent la période de circulation du virus dans la population humaine et son sous-type. La ligne en pointillés orange indique la période pendant laquelle le virus H1N1 saisonnier a disparu de la population humaine, jusqu'à sa réintroduction en 1977. Les lignes en pointillés noirs présente l'incertitude quant à l'origine du virus pandémique de 1918. Ce virus est soit issu d'un réassortiment entre un virus humain et un virus aviaire ou alors il provient d'une forte dérive antigénique ayant entraîné un changement antigénique complet [96, 223, 224]. Les segments échangés lors du réassortiment sont indiqués en dessous de chaque virus. L'homme, l'oiseau ou le porc indiqué sous chaque virus désigne l'hôte. Adapté de [96].

Aujourd'hui co-circulent les virus saisonniers H3N2 et H1N1pdm09 qui dérivent, respectivement, du virus de 1968 et de celui de la pandémie de 2009 [95].

Les réassortiments entre virus influenza jouent donc un rôle majeur dans l'évolution virale en permettant par exemple la génération de virus présentant un fort potentiel pandémique pour l'Homme.

4. Co-infections chez les virus influenza

La co-infection d'une même cellule par plusieurs particules virales joue donc un rôle majeur dans l'évolution virale en permettant des réassortiments mais également une complémentation entre particules défectives. De nombreuses études existent sur les mécanismes favorisant les co-infections en permettant notamment le transfert collectif de particules virales. A ce jour, ces mécanismes ne sont pas décrits pour les virus influenza.

4.1. Co-infections avec d'autres pathogènes

La littérature fait état de co-infections ou surinfections bactériennes fréquemment associées à une primo-infection par les virus influenza. Une revue publiée en 2016 regroupe un grand nombre d'études réalisées entre 1982 et 2014 et décrit les associations à des infections bactériennes. Les souches *Streptococcus pneumoniae* ou *Staphylococcus aureus* sont majoritairement associées aux infections influenza [225]. Ces deux souches bactériennes peuvent causer des infections pulmonaires graves dont l'issue peut être fatale. La surinfection bactérienne serait favorisée par des mécanismes lésionnels inhérents à l'infection virale plus que par un mécanisme de facilitation.

Les données de co-infections virales proviennent des prélèvements obtenus durant l'épidémie grippale saisonnière par les centres collaborateurs de l'organisation mondiale de la santé, les laboratoires des hôpitaux et les centres nationaux de références. Lors de la détection de virus influenza dans les écouvillons naso-pharyngés, d'autres virus respiratoires ont également été détectés. La présence du virus respiratoire syncytial (RSV), de rhinovirus (RV), de métapneumovirus (MPV) ; de coronavirus humain OC43 (hCoV) ou du coronavirus pandémique SARS-CoV-2 a été décrite [226–228]. Une étude publiée en 2019 s'est intéressée aux possibles interactions entre différents virus respiratoires et à leur effet sur la dynamique des populations pour les virus influenza [229]. Pour cela les auteurs ont analysé les résultats diagnostiques de 44230 patients provenant de laboratoire d'analyses en Ecosse pour la période de janvier 2005 à décembre 2013. Tous les patients ont été testés pour onze infections respiratoires virales et des tests statistiques associés aux données sur les co-infections ont permis d'estimer l'interaction et l'effet sur la dynamique entre les populations des différents virus. Une interaction négative entre les virus influenza A et les RV a été observée. Cela explique le faible taux de co-infections. Les auteurs suggèrent que des réponses viro-induites à court

termes de type interféron permettent d'expliquer la circulation alternée entre IAV et RV. Lorsque les RV circulent on observe moins de circulation IAV et inversement. Une corrélation négative entre IBV et RSV ou RV est également décrite. Une hypothèse porte sur des facteurs comportementaux pouvant jouer un rôle dans la protection contre une surinfection particulièrement chez l'enfant, population particulièrement affectée [230, 231]. La période de maladie et de convalescence, en limitant les déplacements et contacts, éviterait ainsi l'exposition à un autre pathogène et diminuerait le risque d'être surinfecté [229, 231].

Certains patients testés présentent ainsi une co-infection par plusieurs virus respiratoires, allant jusqu'à 5 pour certains patients [226]. Le problème de ces approches provient cependant de la méthode de détection utilisée. L'ARN contenu dans les écouvillons naso-pharyngés est extrait et la présence de virus est mesurée par une méthode d'amplification spécifique et quantitative d'acides nucléiques, une RT-qPCR multiplex. Les virus non détectables par cette méthode sont donc exclus. Ces méthodes limitent généralement la détection à quatre ou cinq virus différents [75]. C'est pourquoi la majorité des co-infections décrites pour les virus influenza provient de virus respiratoires. Cependant l'utilisation des nouvelles méthodes de séquençage comme le NGS permettent d'obtenir de plus en plus d'information sur les co-infections et permet la découverte de nouveaux pathogènes. Ces avancées permettent de mieux comprendre la pathogénèse et d'étudier de possibles interactions entre les pathogènes [230]. Les progrès récents et les méthodes utilisées font l'objet de différentes revues [230, 232].

4.2. Co-infections homotypiques

Les co-infections homotypiques sont décrites et caractérisées pour les virus influenza A [95]. Il s'agit de la co-infection d'une cellule ou organisme par deux ou plusieurs virus influenza A provenant ou non du même sous-type par exemple. Ces co-infections ont également été décrites pour les virus influenza B avec des réassortiments existants entre les virus du même lignage – Yamagata ou Victoria – ou entre les deux lignages [233].

Les co-infections homotypiques jouent un rôle important dans l'évolution des virus influenza A en permettant par exemple la réalisation de réassortiments et pourrait permettre la réalisation de recombinaisons. Cependant ce dernier point n'a pas été observé *in vitro* et est controversé [234]. L'évolution la plus drastique est médiée par les

réassortiments comme présenté en II.3.2. Cependant, les réassortiments ne sont pas systématiques lors de co-infections homotypiques et sont limités par plusieurs facteurs inhérents aux virus :

- Spécificité des signaux d'encapsidation. Les segments sont encapsidés de manière spécifique grâce à une compatibilité entre les signaux d'encapsidation présents sur chaque segment. Une étude montre le rôle critique de ces séquences pour le réassortiment lors de la co-infection entre la souche A/Moscow/10/99 (H3N2) et la souche A/Finch/England/2051/91 (H5N2). L'encapsidation du segment 5 de la souche A/Finch/England/2051/91 n'est pas possible avec les sept autres segments de la souche A/Moscow/10/99. Une modification des signaux d'encapsidation du segment 5 permet son incorporation dans la particule virale [235]. Cette étude montre l'importance de la compatibilité des signaux d'encapsidation dans la réalisation de réassortiments. Une étude publiée en 2017 présente une méthode de cartographie des réassortiments au sein de populations virales circulantes. La comparaison des séquences de virus H3N2 circulants entre janvier 1968 et octobre 2015 sans distinction géographique a permis de montrer que plus l'éloignement génétique est fort entre les segments moins la probabilité de former un ressortant viable est forte [236]. Les auteurs ont également pu attribuer un score permettant d'estimer les combinaisons possibles en fonction de la proximité génétique.
- Compatibilité entre les protéines virales. L'incompatibilité entre protéines virales n'empêche pas la formation de nouveaux virions mais a un effet sur la réalisation d'un cycle infectieux par les virions néoformés [213]. Les trois protéines composant la polymérase virale des virus influenza doivent être compatibles afin de pouvoir réaliser les étapes de transcription et de réplication du génome. Des incompatibilités entre ces protéines provenant de différentes souches virales ont été décrites et une incompatibilité partielle peut mener à la réduction de l'activité de la polymérase virale. Une diminution du titre viral a également été observé aussi bien sur des cellules *in vitro* que sur des modèles animaux *in vivo* [213]. Certaines combinaisons entre les protéines de la polymérase peuvent également permettre d'augmenter la virulence ou le titre viral. Des réassortants entre la souche H1N1pdm09 et la souche aviaire A/chicken/Hebei/LC/2008 (H9N2) ont

été obtenus en laboratoire. L'infection de souris sans étape d'adaptation par passage sur cellules ou sur un hôte intermédiaire a été possible pour soixante-treize des cent vingt-sept réassortants obtenus et huit réassortants ont présenté une pathogénicité plus grande que celle observée pour les deux souches parentales [237]. Le potentiel pandémique peut être favorisé pour ces virus composites composés d'un mélange des virus parentaux suite à un réassortiment. La compatibilité entre les deux glycoprotéines de surface joue également un rôle important dans la réalisation de réassortiments. Ce point sera détaillé en II.4.4.

Les co-infections homotypiques chez les virus influenza A sont donc largement décrites et observées. Les conséquences pour le virus et/ou pour l'hôte sont également décrites :

- Coopération virale : Une étude publiée en 2013 montre que presque toutes les particules virales des virus influenza A échouent dans l'expression d'au moins une protéine [40]. Les virus influenza A sont caractérisés par une large proportion de particules dont le génome est dit défectif. Les virus influenza présentent donc trois types de particules (figure 14) : infectieuses, semi-infectieuses ou défectives interférentes (pour revue [132, 238]). Comme expliqué précédemment, le terme particules défectives est utilisé pour décrire les particules SI et DI. Les particules SI possèdent un ou plusieurs segments présentant des mutations ne permettant pas l'expression des protéines concernées. Les particules DI possèdent un ou plusieurs segments présentant de larges délétions internes ne permettant pas l'expression des protéines concernées. L'infection par une particule SI ou DI seule ne permet pas la réalisation d'un cycle infectieux complet. Les co-infections jouent un rôle majeur dans la complémentarité entre ces particules défectives en permettant la réalisation d'un cycle infectieux et en favorisant la diversité génétique [1, 5, 239, 240] (Figure 14).

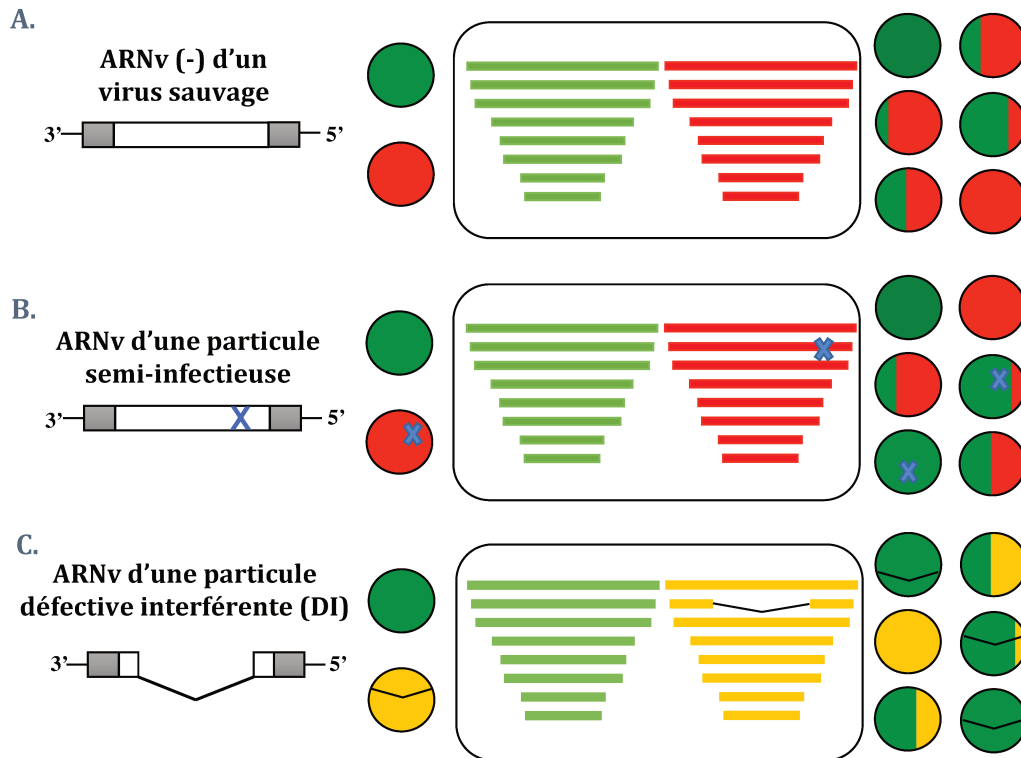


Figure 14 – Co-infections entre particules infectieuses et particules déficientes

Représentation schématique de co-infections par deux particules virales provenant de virus influenza. Gauche : Représentation d'un segment d'ARN viral provenant d'une particule infectieuse **(A)**, semi-infectieuse **(B)** ou déficiente interférente **(C)**. Milieu : Représentation de deux particules virales et de leurs segments lors de la co-infection d'une cellule. Droite : exemple de virions obtenus suite aux réassortiments. La partie grisée sur les segments d'ARNv représente les régions non traduites de chaque segment. Les particules représentées par un mélange de deux couleurs correspondent à la progénie composée d'un mélange de segments provenant des deux virions parentaux.

- **Interférence virale** : la super-infection, c'est-à-dire la capacité pour un second virus homologue d'infecter une cellule préalablement infectée par un virus influenza a été décrite et n'est réalisable que pendant une période de temps très précise au-delà de laquelle une exclusion de super-infection s'observe [92]. La super-infection entre virus influenza serait dépendante de plusieurs facteurs cellulaires et viraux. La probabilité de super-infection est inversement proportionnelle au nombre de segments par particule virale pouvant donner lieu à l'expression de protéines [241]. Plus le premier virus exprime de protéines fonctionnelles, plus la probabilité de réaliser une infection par un second virus est faible. Une étude portant sur les populations virales enrichies en particules semi-infectieuses a en effet montré que la présence de ces particules favorisait les super-infections [241].

Une étude publiée en 2017 s'intéresse à la dynamique de réplication virale lors de co-infections ou super-infections entre deux virus influenza A quasiment

identiques issus de la souche A/WSN/33 (H1N1) [92]. La méthode utilisée est présentée en section I.4 et sur la figure 5. La réplication du premier virus ne semble pas être affectée lors de la super-infection, à l'inverse de celle du second virus. En utilisant un marquage pseudo-quantitatif spécifique de chaque segment d'ARN, les auteurs ont également pu réaliser une fragmentation temporelle du cycle viral, permettant de placer précisément chaque étape du cycle viral sur une échelle de temps (figure 15). Une fourchette de temps permettant la réalisation de super-infections a également été déterminée. Une super-infection est possible dans une période de deux heures après la première infection, ce qui est en accord avec des données préalablement publiées [92, 214]. La co-infection par un second virus identique est ainsi inhibée chez les virus influenza A une fois que la réplication du premier virus a commencée. L'hypothèse formulée par les auteurs porte sur l'inhibition de l'import nucléaire de nouvelles RNPv afin de permettre l'adressage des RNPv néo-synthétisées pour former de nouvelles particules virales [92]. Le blocage de l'import nucléaire empêcherait ainsi la transcription/réplication du génome du second virus. Une étude publiée en 2008 propose une autre hypothèse pour expliquer le mécanisme associé à l'exclusion de super-infections homotypiques impliquant la neuraminidase virale dans l'altération des acides sialiques en surface et donc sur une inhibition de l'entrée du second virus [242]. Cependant les résultats obtenus par [92] montrent l'entrée du second virus et permettent donc de rejeter l'hypothèse formulée par [242].

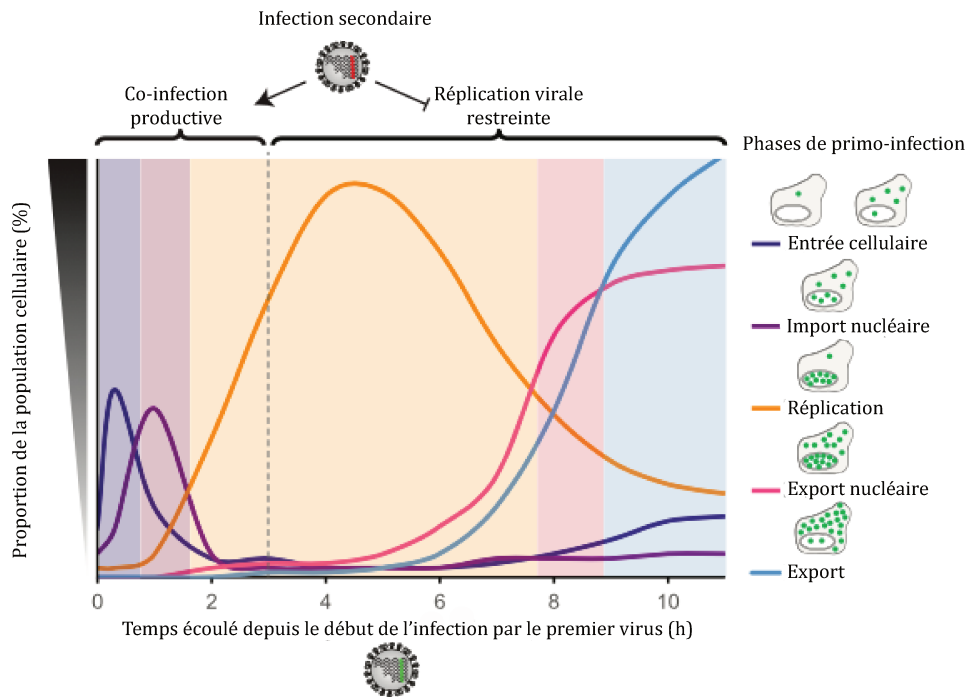


Figure 15 - Temporalité du cycle viral pour les virus influenza A

Représentation de la temporalité associée aux cinq phases de la réplication des virus influenza A. Chaque phase est représentée par un diagramme et chaque courbe informe sur la proportion de la population cellulaire dans chaque phase en fonction du temps écoulé depuis l'infection initiale. La fenêtre de temps permettant de réaliser une co-infection productive est indiquée au-dessus de la figure. Traduit de [92].

- **Modification des capacités réplcatives :** Une étude publiée en 2016 montre que deux populations de virus H3N2 présentent des capacités réplcatives améliorées lors de la co-culture en comparaison à une croissance isolée. Par séquençage de souches virales circulantes, une mutation D151G a été identifiée et est retrouvée avec une forte proportion dans les stocks viraux [41]. Cette mutation altère la capacité de clivage de la neuraminidase, qui présente alors une activité de fixation aux acides sialiques. Les auteurs ont alors utilisé deux stocks viraux qui ne diffèrent que par la mutation du résidu 151 de la neuraminidase et ont montré qu'une population mixte composée d'un mélange des virus D151 et G151 se répliquait mieux que les populations pures qui elles-mêmes finissaient par devenir un mélange des deux génotypes. Cette coopération entre deux variants de la NA peut être expliquée par le fait que la HA des virus H3N2 humains récents a une affinité réduite pour les AS. Il serait alors avantageux pour la population virale d'acquérir l'activité de fixation aux AS médiée par la NA du variant G151, mais de maintenir l'activité du variant D151 pour la libérer efficacement les virions néo-synthétisés.

4.3. Co-infections hétérotypiques

Les co-infections hétérotypiques chez les virus influenza sont caractérisées par la co-infection entre différents types de virus influenza (i.e. : un virus influenza A et un virus influenza B). *In vivo*, ces co-infections sont détectées dans des échantillons cliniques humains. Par exemple, le rapport d'activité du centre national français de référence des virus respiratoires (dont la grippe) pour la saison 2017-2018 fait état de 23 patients testés positifs pour un virus influenza A et un virus influenza B. La proportion est donc d'environ 0,5% d'échantillons doublement positifs [243]. Pour la saison 2015-2016 en Pologne, 51 cas de co-infections A + B ont été reportés soit environ 0,6% des échantillons doublement positifs [227]. En Espagne, pour la saison 2014-2015, la proportion est de 1,1% [244]. Une étude rétrospective au Brésil portant sur les saisons 2009 à 2018 présente un taux de co-infection observé très faible avec 18 patients sur 8011 doublements positifs, soit 0,22%. Cependant ce taux varie entre les saisons [245]. Dans cette étude, les auteurs suggèrent une circulation plus localisée et minoritaire du virus influenza B pendant cette période de temps, pouvant expliquer le faible taux observé. Les co-infections entre les virus influenza A et B chez l'Homme sont donc minoritaires. L'issue de l'infection ou la survenue éventuelle de complications ne semble pas plus importante que lors d'une mono-infection [244]. Des études complémentaires sont nécessaires afin de valider formellement ces observations, peu de données sont publiées et s'opposent. Il est également suggéré que les co-infections sont majoritairement d'origine nosocomiale et que la circulation non égalitaire entre les souches peut expliquer la faible proportion de co-infections [244, 245].

Lors de co-infections *in vitro* entre les virus influenza A et B, la formation de virus chimériques composés d'un mélange de segments provenant des deux virus n'a pas été observée [246]. La modification des signaux spécifiques d'empaquetage permet toutefois de former des virions composés d'un mélange de segments provenant des deux parents IAV et IBV [247]. Cependant ces mélanges n'ont pas été observés *in vivo*.

Les co-infections hétérotypiques chez les virus influenza ne sont donc pas fréquemment observées. Certains mécanismes pourraient permettre d'expliquer en partie cette faible proportion de co-infection hétérotopiques.

Une étude publiée en 2012 s'est intéressée aux mécanismes de suppression de super-infections entre les virus influenza A et B [246]. Un virus dérivé de la souche A/PR/8/34 exprimant une protéine de fluorescence DsRed à partir du segment 5 provenant d'un virus H5N1 et codant pour la neuraminidase a été produit. Des cellules ont été co-infectées par le virus influenza A rapporteur et un virus influenza B provenant de la souche B/Lee/40 ou B/Maryland/2/59. Une réduction du signal de fluorescence a été observée lorsque les deux virus sont ajoutés simultanément sur les cellules. Cet effet n'est plus observé si le virus influenza B est ajouté deux heures après l'infection par IAV. Les auteurs ont également montré que la protéine NP inhibait la réplication de IAV. Une étude ultérieure a permis de montrer que l'expression de quantité croissante de NP de IBV augmentait l'interaction avec la NP de IAV de manière dose dépendante [248]. Cette interaction empêche la liaison de la NP avec la protéine PB2 et ne permet pas la formation du complexe polymérase fonctionnel pour IAV.

D'autres hypothèses pourraient également expliquer l'inhibition observée. Suite à l'infection virale, des médiateurs de l'immunité innée ou des facteurs antiviraux comme IFITM, de la famille des IFIT et MxA pourraient inhiber la fusion et la réplication virale en interagissant directement avec les protéines virales, ces mécanismes pourraient en partie expliquer la suppression de super-infections durant une certaine période de temps suite à une primo-infection [249]. Une suppression de super-infections été observée *in vivo* chez des furets. Cette exclusion a été observée entre les virus influenza A et B, peu importe l'ordre d'infection, avec une protection contre l'infection par un virus non homologue suite à une primo-infection. Certains composants viraux pourraient jouer un rôle en bloquant les mécanismes d'entrée du virus ou le fonctionnement de certaines protéines virales. Concernant les co-infections homotypiques par des virus influenza A, une protection croisée a également été observée peut être expliquée par l'expression d'épitopes communs entre les deux souches. Une immunité préexistante de la population contre le virus H1N1pdm09 a été observée lors de son émergence [249, 250].

4.4. Facteurs pouvant affecter le transfert collectif de particules virales chez les virus influenza

L'échec de production d'une progénie infectieuse par 90% des cellules infectées [251] associé avec l'échec de l'expression du produit d'au moins un segment viral par 90% des virions [40] permettent de suggérer que les co-infections – en plus de l'impact sur l'évolution virale – sont vitales pour la réalisation de l'infection virale. La complémentarité entre particules défectives permet par exemple d'outrepasser ces échecs [132, 240]. Afin d'augmenter localement la MOI sans augmenter la concentration dans l'inoculum les stratégies de transfert collectif de particules virales décrites en I.2 sont utilisées par de nombreux virus. Cependant peu de données sont disponibles pour les virus influenza. Un transfert de protéines virales et de segments génomiques entre cellules infectées et cellules naïves par le biais de nanotubes a cependant été observé pour les virus influenza [252]. L'augmentation de l'agrégation virale pourrait également permettre l'augmentation de la fréquence de co-infections. Comme décrit précédemment, l'agrégation entre particules virales peut être directe, c'est-à-dire avec une liaison virion-virion ou médiée par un intermédiaire présent dans l'environnement. Les protéines exprimées à la surface du virus jouent probablement un rôle fort dans ces mécanismes, particulièrement chez les virus enveloppés [6].

Les virus influenza expriment à leur surface la neuraminidase ayant une activité sialidase et l'hémagglutinine jouant un rôle dans la liaison au récepteur. L'équilibre entre les fonctions des deux glycoprotéines de surface est défini comme la balance HA/NA. L'apparition de mutations ou un changement de sous-type peuvent avoir des conséquences sur l'activité de ces glycoprotéines et donc sur la balance HA/NA [253–255]. Les modifications de ces états d'équilibre entre l'hémagglutinine et la neuraminidase ont permis l'émergence de nouveau virus influenza A comme en 2007-2008 avec l'apparition de virus H1N1 naturellement résistant à l'oseltamivir [253] (figure 16) Durant cette saison, une mutation est apparue dans la NA (H275Y) ayant pour effet de diminuer d'un facteur trois l'affinité de l'enzyme pour le substrat sans impact sur la fonction catalytique de l'enzyme. Cette mutation H275Y est responsable de l'acquisition de la résistance à l'oseltamivir et a permis de rétablir un état d'équilibre avec une HA possédant une faible affinité pour son substrat [256]. Ces virus résistants présentaient une balance HA/NA plus équilibrée que les virus sensibles et un potentiel de diffusion plus fort dans la population. En 2008 ces virus naturellement résistants à l'oseltamivir ont

largement circulé dans la population. Cependant en 2009 le virus pandémique H1N1pdm09 a émergé dans la population humaine et a évolué en deux groupes : le groupe I représenté par la souche A/California/04/2009 et le groupe II par la souche A/New York/06/2009. Les virus du groupe II ont acquis des mutations dans la HA (P83S, T200A, S203T et I321V) et la NA (V106I et N248D). Ces mutations ont eu pour effet d'augmenter l'affinité de la HA pour les acides sialiques $\alpha 2,6$ d'un côté et d'augmenter l'activité de la neuraminidase de l'autre, et donc restaurer un état d'équilibre plus fort dans la balance HA/NA. Les souches pandémiques issues du groupe II ont remplacé les souches H1N1 circulantes résistantes à l'oseltamivir [253].

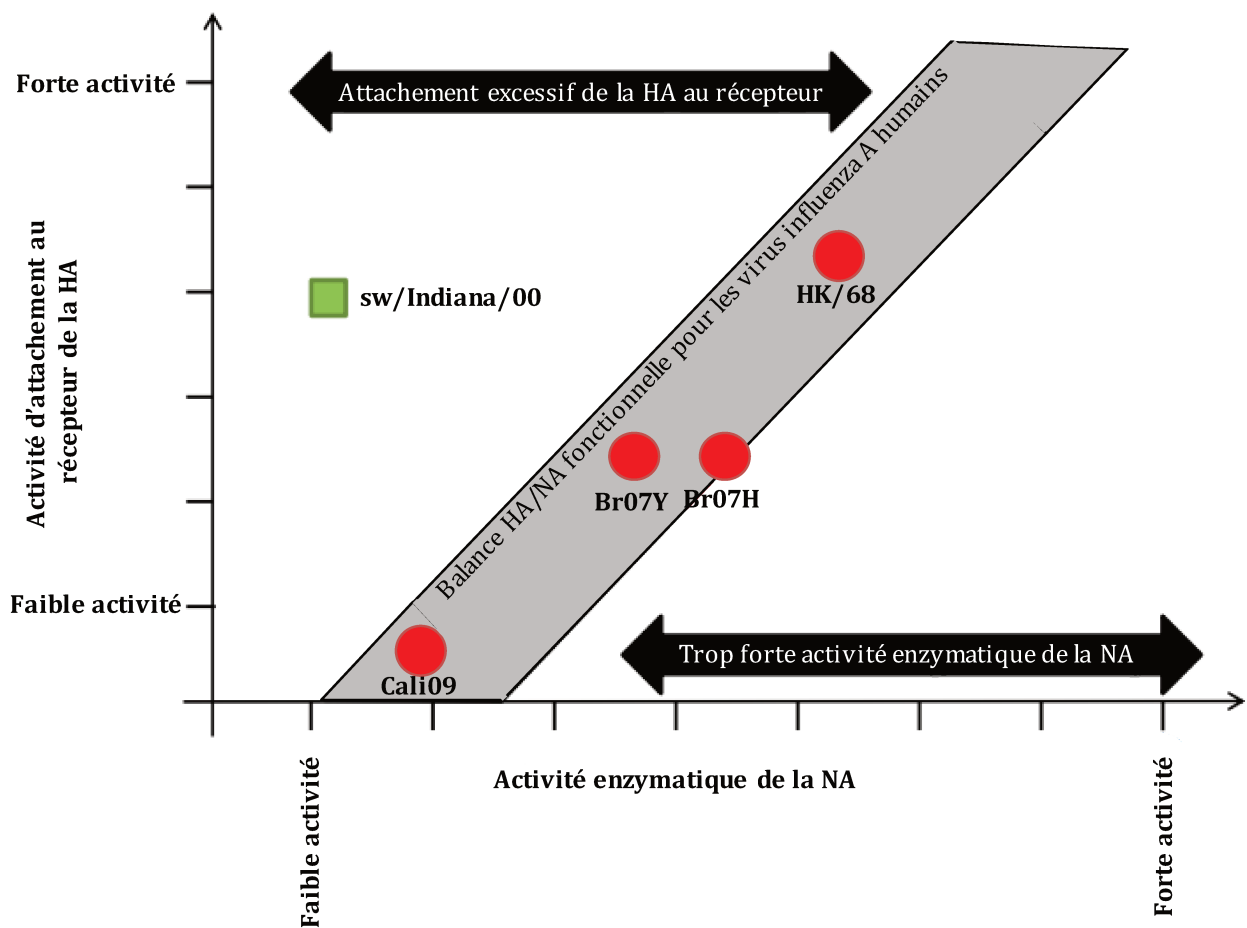


Figure 16 - Balance hémagglutinine/neuraminidase fonctionnelle chez l'Homme

La figure représente l'activité enzymatique de la neuraminidase en abscisse et l'activité de fixation au récepteur de l'hémagglutinine en ordonnée. La fixation de la HA à son récepteur peut être exprimée par la constante de dissociation (K_d) et l'activité de la NA peut être exprimée par la constante catalytique (K_{cat}) ou par le ratio entre la constante K_{cat} et la constante de Michaelis-Menten (K_{cat}/K_m). La zone grisée sur la figure représente la balance hémagglutinine/neuraminidase optimale pour les virus influenza chez l'Homme. Dans cette zone, l'intensité d'attachement au récepteur par la HA corrèle avec l'activité enzymatique de la NA. Pour illustrer la balance fonctionnelle entre la HA et la NA, cinq souches influenza A sont représentées. Le carré vert représente une souche porcine A/swine/Indiana/P12439/00 (H1N2; noté sw/Indiana/00). Les 4 cercles rouges représentent quatre souches humaines : A/Brisbane/59/2007 (H275), sensible à l'oseltamivir (H1N1, noté Br07H) ; A/Brisbane/59/2007 (Y275), résistant à l'oseltamivir (H1N1, noté Br07Y) ; A/California/04/2009 (H1N1, noté Cali09) et A/Hong Kong/68 (H3N2,

noté HK68). La substitution H275Y sur la NA de la souche Br07Y décroît l'activité de la NA et permet d'obtenir une balance HA/NA fonctionnelle pour la diffusion chez l'Homme. La souche Br07Y a circulée activement dans la population humaine à partir de la saison 2007-2008. Adapté de [253].

Une modification de la balance HA/NA pourrait avoir un impact sur l'agrégation entre particules virales en permettant par exemple une augmentation des liaisons entre la HA et les acides sialiques présents à la surface des particules virales. Cette augmentation de l'agrégation pourrait *in fine* augmenter la fréquence de co-infections.

Le tractus respiratoire humain est recouvert de mucus dont le rôle est de maintenir une hydratation suffisante de l'appareil respiratoire mais également d'agir comme une première barrière physique pour l'accès aux cellules. Ce mucus va piéger de nombreux composés comme les agents pathogènes afin de permettre leur élimination. Du mucus est également retrouvé dans la salive. Chez l'Homme, le mucus est majoritairement composé de quinze mucines, des polymères majoritairement glycoprotéiques. La grande majorité de ces mucines sont composées d'acides sialiques. La répartition en mucines est différente en fonction de la localisation dans l'appareil respiratoire [257]. Il a été montré que ces mucines possèdent un rôle antiviral contre les virus influenza A. Chez la souris, l'expression des mucines Muc5ac a un effet délétère sur la réplication virale des IAV [258]. Il a également été montré *in vitro* que l'infection par les virus influenza pouvait être inhibée par des exosomes. Ces vésicules sont chargées en acides sialiques $\alpha 2,6$, le virus se lierait alors à ces AS dans les exosomes et l'infection serait alors inhibée [259]. La salive humaine est aussi composée de mucines avec une majorité de mucines MUC5B et MUC7 [260]. Les acides sialiques $\alpha 2,3$ et $\alpha 2,6$ sont également retrouvés dans la salive humaine [261]. La formation d'agrégats viraux médiée par la salive a par exemple été observée pour le VSV [6]. Les mucines et les acides sialiques joueraient donc un rôle crucial dans l'infection virale et leur prévention.

Une modification de la balance HA/NA pourrait donc jouer un rôle dans la fréquence de co-infections en modulant l'agrégation entre particules virales. La présence de mucines dans le milieu extracellulaire, comme dans la salive, pourrait également jouer un rôle sur la fréquence de co-infections.

Objectifs

La nature segmentée du génome des virus influenza A permet la réalisation d'évènements de réassortiments pouvant être à l'origine de l'introduction de virus à potentiel pandémique au sein de la population humaine. C'est pourquoi l'identification de facteurs cellulaires et viraux pouvant augmenter la fréquence de co-infections est essentielle. De plus, des mécanismes permettant de favoriser ou de limiter les évènements de co-infections ont été décrits pour de nombreux virus mais pas pour les virus influenza.

Le premier objectif de ces travaux de thèse sera d'optimiser un modèle probabilistique d'étude des évènements de co-infections par cytométrie en flux. Ce modèle permettra de quantifier les évènements de co-infections chez les virus influenza A à partir des données obtenues par cytométrie en flux en utilisant un couple de virus recombinant permettant l'expression une protéine fluorescente différente – GFP ou mCherry – par chacun des partenaires du couple.

Le second objectif sera d'utiliser le système préalablement développé afin de tester l'impact d'un facteur viral sur la fréquence de co-infections : la balance entre les activités des deux glycoprotéines de surface des virus influenza A, l'hémagglutinine et la neuraminidase. Pour cela nous produirons deux couples de virus recombinants présentant chacun une balance HA/NA différente. Au sein de chaque couple, un membre permettra l'expression de GFP et l'autre de mCherry, la fluorescence des cellules infectées sera mesurée par cytométrie en flux et les données obtenues seront traitées à l'aide du modèle probabilistique et comparées en fonction de la balance HA/NA.

Concernant le troisième et dernier objectif de ces travaux, nous nous intéresserons à l'effet des co-infections hétérotypiques sur les capacités répliquatives des virus influenza A et B. Pour cela des virus recombinants IAV et IBV permettant l'expression de rapporteurs fluorescents seront produits et caractérisés afin d'être utilisés pour co-infecter des cellules alvéolaires humaines. Les données de fluorescence obtenues par cytométrie en flux permettront d'apporter des éléments de réponse quant à l'effet de chaque virus sur les capacités répliquatives de l'autre virus.

Matériel & Méthodes

I. Cellules, virus, bactéries et plasmides

1. Cellules

Les cellules Madin-Darby Canine Kidney (MDCK), dérivées d'un épithélium rénal canin, sont cultivées dans du milieu de Eagle (MEM, Gibco Life Technologies), supplémenté par 5 % de sérum de veau foetal (SVF). Les cellules MDCK-SIAT1 [262], issues de cellules MDCK transfectées de manière stable avec un ADNc humain codant pour la 2,6-sialyltransferase (ST6GAL1) afin de surexprimer des acides sialiques dont le branchement se fait en α 2-6, sont également cultivées en MEM, supplémenté par 5 % de SVF. Les cellules 293T, dérivées de cellules embryonnaires humaines transformées par le biais de l'antigène T du SV40 et de la protéine E1A de l'adénovirus de type 5, et les cellules A549, dérivées d'un adénocarcinome pulmonaire humain, sont cultivées dans du milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM, Gibco Life Technologies) supplémenté par 10 % de SVF. Les cellules A549-SIAT1, transfectées stablement avec le plasmide pCI-Neo-ST6GAL1 afin d'exprimer le produit du gène ST6GAL, sont également cultivées en milieu DMEM sous pression de sélection par la généticine (G418 ; 600 μ g/mL). Les cellules NCI-H292, issues d'un carcinome pulmonaire muco-épidermoïde humain, sont cultivées dans du milieu de Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Gibco Life Technologies) supplémenté par 10 % de SVF. Les cellules BCI NS1.1 [263], obtenues à partir de prélèvement de cellules pluripotentes provenant l'épithélium basal respiratoire humain et immortalisées grâce à la transduction par un rétrovirus permettant l'expression de la télomérase humaine, ont été fournies par le laboratoire du Pr Ronald G. Crystal (Weill Cornell Medical College, New York, USA). Ces cellules sont cultivées dans du milieu de culture reconstitué pour cellules épithéliales (BEBM, Lonza, #CC-3171) supplémenté de pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 U/mL), de gentamicine (50 μ g/mL) et d'amphotéricine B (1,25 μ g/mL). Les cellules épithéliales CALU-3 provenant d'un adénocarcinome pulmonaire humain, sont cultivées en milieu de Eagle modifié par Dulbecco additionné de nutriment F12 (DMEM/F-12 Ham, Gibco Life Technologies) et supplémenté en pyruvate de sodium (1 mM, Gibco Life Technologies), en acides aminés non essentiels (dilué au 1/100^{ème}, Gibco Life Technologies) et en bicarbonate de sodium

(1,5 g/L, Gibco Life Technologies). Les cellules fibroblastiques IMR-90 sont issues du tissu pulmonaire sain d'un fœtus humain féminin de 16 semaines et sont cultivées dans du DMEM supplémenté par 10 % de SVF. Tous les milieux de culture sont également additionnés de pénicilline (100 U/mL) et de streptomycine (100 µg/mL).

Les cellules sont incubées dans une étuve humide à 37°C et sous 5 % de CO₂.

2. Virus

La souche A/WSN/33 (H1N1) pour les virus influenza A et la souche B/Brisbane/60/2008 ainsi que les virus recombinants correspondants ont été produits par génétique inverse sur cellules MDCK/293T et amplifiés sur cellules MDCK. Les virus chimériques contenant les segments 2, 3, 5, 7 et 8 provenant de la souche A/WSN/33, le segment 1 provenant de la souche A/WSN/33 et modifié pour permettre l'expression d'une protéine fluorescente ainsi que le segment 4 provenant de la souche A/Paris/644/2008 et le segment 6 provenant de la souche A/Paris/497/2007 ou A/Paris/1170/2008 ont été produits par génétique inverse sur cellules MDCK-SIAT1/293T et amplifiés sur cellules MDCK-SIAT1. La souche A/Paris/76/08 (H1N1pdm09) adaptée pour infecter les cellules A549 [264], disponibles au laboratoire, est issue d'amplification sur cellules A549 du produit de génétique inverse, comme décrit en [264]. La souche A/Puerto-Rico/8/34 (H1N1), disponible au laboratoire, a été amplifiée sur cellules MDCK à faible MOI (10⁻⁴ UFP/cellule).

3. Bactéries

La souche d'*Escherichia coli* DH5α, utilisée pour les transformations bactériennes lors du clonage des différents plasmides, est cultivée dans du milieu de Luria-Bertani (LB).

4. Plasmides utilisés pour la génétique inverse

4.1. Structure des plasmides

- Influenza A :

Les plasmides de génétique inverse utilisés pour la production de virus issus de la souche A/WSN/33, pPoli-WSN-PB2, -PB1, -PA, -NP, -M, -NS, -HA, -NA contiennent l'ADNc de chacun des 8 segments du virus WSN, cloné de telle sorte que les séquences correspondant au cadre ouvert de lecture, flanquées des extrémités 5' et 3' non codantes, soient en orientation antisens. Les séquences virales sont placées sous la dépendance du promoteur humain de l'ARN polymérase I, qui permet une initiation exacte de la transcription. L'exactitude de l'extrémité 3' du transcrit est assurée par la présence du ribozyme du virus de l'hépatite delta.

Les plasmides pcDNA3-WSN-PB2, -PB1, -PA et -NP contiennent les ADNc codant les protéines PB2, PB1, PA et NP du virus WSN, clonés dans le vecteur d'expression pcDNA3.1 (Invitrogen) sous le contrôle du promoteur du cytomegalovirus et du signal de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine.

Les plasmides pPoli-PB2-GFP et -mCherry sont dérivés du plasmide pPoli-WSN-PB2 selon le principe décrit par Tran *et al.* [265]. Ils contiennent un cadre ouvert de lecture comprenant la séquence codant la protéine PB2 du virus WSN, suivie d'une séquence espaceur codant 3 alanines, de la séquence codant le peptide 2A du Teschovirus porcin 1 (TVP-1), puis de la séquence codant la protéine fluorescente d'intérêt optimisée afin de mieux correspondre au code génétique utilisé par les virus influenza (figure 17). Ces séquences sont suivies d'une séquence de 109 nucléotides (correspondant à la fin du cadre ouvert de lecture de PB2), qui permet d'assurer la conservation des signaux d'emballage des segments, comme décrit dans Munier *et al.* [266]. Afin d'éviter la duplication exacte de cette séquence au sein du génome viral, les 109 nucléotides codant effectivement pour les derniers acides aminés de PB2 ont été modifiés en tirant parti de la dégénérescence du code génétique.

- **Influenza B :**

Les plasmides bidirectionnels de génétique inverse utilisés pour la production de virus issus de la souche B/Brisbane/60/2008, pDP2002-PB2, -PB1, -PA, -NP, -M, -NS, -HA, -NA contiennent l'ADNc de chacun des 8 segments du virus IBV, cloné de telle sorte que les séquences correspondant au cadre ouvert de lecture, flanquées des extrémités 5' et 3' non codantes, soient en orientation antisens. D'une part les séquences virales sont placées sous la dépendance du promoteur humain de l'ARN polymérase I, qui permet une initiation exacte de la transcription et du terminateur murin de l'ARN polymérase I permettant un arrêt précis de la transcription. D'autre part les ADNc sont flanqués du promoteur du CMV dépendant de l'ARN polymérase II et d'une séquence de polyadénylation permettant la synthèse directe de protéines virales.

Le plasmide pCI-PB2 contient l'ADNc codant la protéine PB2 du virus IBV, clonés dans le vecteur d'expression pCI (Promega) sous le contrôle du promoteur du CMV et en aval du signal de polyadénylation tardif du virus SV40.

Le plasmide pDP2002-PB2-2A-mCherry a été obtenu en utilisant la même stratégie que pour les plasmides de génétique inverse IAV permettant l'expression d'un rapporteur fluorescent.

4.2. Préparation des inserts

L'insert 2A-mCherry a été obtenu par amplification par polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction ou PCR) en utilisant comme matrice le plasmide pPoli-CFP-mCherry et des amorces spécifiques permettant d'introduire la séquence 2A et les sites de restrictions NotI (en amont) et NheI (en aval). L'insert 2A-GFP a été obtenu par PCR séquentielle du plasmide pUC57-2A-mCitrine afin de modifier 7 nucléotides, permettant ainsi d'obtenir la séquence codant la protéine GFP et les sites de restrictions NotI (en amont) et NheI (en aval).

Les PCR sont réalisées à partir de 10 ng de matrice dans 25 µL du tampon recommandé par le fabricant, en présence de 0,5 µM de chacune des deux amorces, 0,2 µM de chacun des dNTP, et 0,02 U/µL d'ADN polymérase (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, ThermoScientific). Les mélanges réactionnels sont placés dans un thermocycleur (GeneAmp 9 PCR System 9700, Perkin-Elmer) programmé ainsi : 3 min à 98°C, 35 cycles de : 10 s à 98°C et 30 s à 72°C, puis 5 min à 72°C.

Les amplicons obtenus par PCR sont hydrolysés par les enzymes de restriction NotI et NheI (20 U d'enzyme, New England Biolabs) 1 h à 37°C puis purifiés après électrophorèse en gel d'agarose à l'aide du kit NucleoSpin Gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel).

Le vecteur, déjà disponible, est le plasmide pPoll-PB2-DG-SL-Gluc, préalablement hydrolysé par les enzymes NotI et NheI (pPoll-PB2), déphosphorylé et purifié.

4.3. Ligature, transformation et purification des plasmides

Les réactions de ligature sont réalisées en utilisant l'ADN ligase du phage T4 (Rapid DNA ligation kit, ThermoScientific) selon les recommandations du fabricant, en présence de 40 ng de vecteur et d'un rapport molaire insert/vecteur de 3:1. Après une incubation de 15 min à température ambiante, 2 µL de produit de ligature sont incubés avec 50 µL de bactéries chimio-compétentes DH5α durant 30 min à 4°C. La transformation est réalisée par un choc thermique de 45 s à 42°C. Après 1 h d'incubation dans du milieu Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC) à 37°C sous agitation, les bactéries sont étalées sur des boîtes de milieu de LB-Agar supplémenté en ampicilline à 100 µg/mL, puis incubées pendant la nuit à 37°C. Pour chaque clonage, une colonie est ensemencée dans du milieu LB liquide supplémenté en ampicilline à 100 µg/mL et mise en culture pendant la nuit à 37°C sous agitation.

Les plasmides sont ensuite purifiés en utilisant un kit de purification selon le protocole fourni (NucleoSpin Plasmid, Macherey-Nagel). La concentration en ADN des échantillons est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop (ThermoScientific) et ajustée à 1 µg/µL.

Les plasmides sont séquencés par la plateforme de séquençage Eurofins Cochin (www.eurofinscochin.com).

5. Autres plasmides

- pCi-Neo-ST6GAL1

Le plasmide permettant l'expression du produit du gène ST6GAL1 a été obtenu par un clonage de type Gateway. La technique est présentée en détails en [267].

Un codon stop a été ajouté en 3' de la séquence codante du gène ST6GAL1 obtenue à partir du plasmide pDON223-ST6GAL1 (disponible au laboratoire) par PCR. Le produit de PCR est alors composé de la séquence codante du gène ST6GAL1 suivie d'un codon stop et encadrée par les séquences permettant la recombinaison avec le plasmide de destination. Le mélange réactionnel est composé de 4,5 ng de matrice dans 5 µL du tampon recommandé par le fabricant, en présence de 0,5 µM de chacune des deux amorces (5'-GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATG'3' et 5'-GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGGTATTAGCAGTGAATG-3'), 0,2 µM de chacun des dNTP, et 0,02 U/µL d'ADN polymérase (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, ThermoScientific). Les mélanges réactionnels sont placés dans un thermocycleur (GeneAmp 9 PCR System 9700, Perkin-Elmer) programmé ainsi : 30 sec à 98°C, 35 cycles de : 10 s à 98°C, 30 s à 68,3°C et 1 min et 15 s à 72°C, puis 5 min à 72°C.

Afin d'insérer le produit de PCR dans un vecteur donneur pDON207-GW par réaction BP, un mélange réactionnel composé de 2 µL du tampon recommandé par le fabricant, de 1 µg du plasmide pDON207-GW, de 5 µL du produit de PCR et de 1 µL de mélange réactionnel BP clonase (Invitrogen) est incubé toute une nuit à 25°C. Le produit de la réaction est utilisé pour transformer des bactéries sous pression de sélection avec de la gentamicine puis l'ADN plasmidique est purifié. Cet ADN est utilisé pour une réaction LR afin d'obtenir le plasmide pCi-neo-ST6GAL1. Le mélange réactionnel est composé de 2 µL de LR clonase et de tampon recommandé par le fabricant, de 0,150 µg du plasmide pDON207-ST6GAL1 et de 0,150 µg du plasmide de destination pCI-Neo-GW. Ce mélange est incubé 1 h 30 min à 25°C puis est utilisé pour transformer des bactéries sous pression de sélection avec de l'ampicilline. L'ADN plasmidique est ensuite purifié.

II. Développement du modèle probabilistique

1. R et RStudio

Les scripts ont été écrits à l'aide de RStudio (version 1.2.5019), exécutés sur R (Version 3.6.1) et initialisés à partir du terminal (version 2.9.5) sur MacOS Mojave (version 10.14.6).

2. Scripts, figures et statistiques

Les données ont été analysés à l'aide de deux scripts (présentés en annexes 1 et 2). Le fichier de résultat a été généré sous le format .csv, traité à l'aide de Microsoft Excel (version 16.40) et les graphiques et les analyses statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Graphpad Prism 8 (version 8.4.3).

III. Effet de la balance HA/NA sur la fréquence de co-infections

1. Production et caractérisation de virus recombinants

1.1. Génétique inverse

Des cellules 293T et MDCK-SIAT1 sontensemencées en co-culture à 4.10^5 et 3.10^5 cellules par puits de plaque 6 puits, respectivement, dans un mélange volume à volume dans leur milieu de culture respectif. Le lendemain, les cellules sont co-transfectées avec un mélange de 0,5 µg de chacun des plasmides de génétique inverse pPoli-PB2, -PB1, -PA, -NP, -M, -NS, -HA, -NA et 0,5 µg de chacun des plasmides pcDNA3-WSN-PB2, -PB1, -PA et -NP, avec 18 µL de FuGENE HD (Promega) dans 82 µL de milieu OptiMEM + GlutaMax. Pour les virus recombinants, le plasmide pPoli-PB2 est remplacé par le plasmide correspondant permettant l'expression d'une protéine fluorescente (GFP ou mCherry) et les plasmides pPoli-HA et pPoli-NA proviennent des souches indiquées afin produire les combinaisons HA/NA attendues. Pour le contrôle négatif, le plasmide pPoli-PB2 est volontairement omis. Après 24 h d'incubation à 37°C, les cellules sont rincées deux fois avec du DMEM, avant d'ajouter 2 mL de DMEM contenant 0,5 µg/mL de trypsine TPCK (trypsine traitée avec le L-1-tosylamido-2-phényléthyl chlorométhyl cétone, Coger) qui est nécessaire au clivage de la HA à la surface des virions néoformés. Après 48 h d'incubation à 35°C, le milieu de culture est collecté et centrifugé 5 min à 2500 g, puis le surnageant est aliquoté et conservé à -80°C.

La concentration en particules virales infectieuses est déterminée par la méthode de titrage en plages de lyse (cf. §III.1.4.1).

1.2. Amplification des virus et purification à partir des plages de lyse

Pour les amplifications à MOI contrôlée, un flacon de culture cellulaire de 100 cm² estensemencé avec 10^7 cellules MDCK-SIAT1. Le lendemain, les cellules sont rincées deux fois avec du milieu DMEM puis infectées à une MOI de 10^{-4} Unités Formant Plage (UFP)/cellule dans 4 mL de DMEM. Après 1 h d'adsorption à 35°C, 16 mL de DMEM contenant 1 µg/mL de trypsine TPCK sont ajoutés.

Après 72 h d'incubation à 35°C, le milieu de culture est collecté et centrifugé 5 min à 2500 g, puis le surnageant est aliquoté et conservé à -80°C.

Pour les purifications à partir de plages de lyse, les surnageants de génétique inverse sont titrés selon la méthode des plages de lyse comme décrit dans le §III.1.4.1, excepté que l'Avicel est remplacé par de l'agarose 2 % (Seakem GTG Agarose, Lonza) et

que le volume déposé sur les cellules est de 4 mL. Après 72 h d'incubation à 35°C, les plages de lyse sont visualisées par transparence et l'agarose précautionneusement prélevé à ce niveau à l'aide d'un cône est déposé dans 1 mL de DMEM puis congelé à -80°C. Les virus ainsi prélevés sont amplifiés une première fois (C1) en diluant l'inoculum au 1/100^{ème} sur cellules MDCK-SIAT1, ensemencées la veille à 1.10⁶ cellules par puits de plaques 6 puits, titrés par la méthode des plages de lyse, puis amplifiés une seconde fois (C2) à une MOI contrôlée comme décrit ci-dessus.

1.3. Caractérisation géotypique des stocks viraux

Les ARN viraux sont extraits (QIAamp Viral RNA, Qiagen) puis amplifiés par transcription inverse (*Reverse Transcription* ou RT) et PCR selon le protocole du kit SuperScript One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Le mélange réactionnel est le suivant : 12,5 µL de mix de réaction 2X, 0,5 µM de chacune des deux amorces spécifiques du segment PB2, 0,5 µL de mix d'enzyme RT/Platinum Taq, 2 µL d'échantillon d'ARN et de l'eau p.p.i. en quantité nécessaire pour arriver à un volume final de 25 µL. Les mélanges réactionnels sont placés dans un thermocycleur (GeneAmp PCR System 9700, Perkin-Elmer) programmé ainsi : 30 min à 50°C, 2 min à 94°C, 35 cycles de : 15 s à 94°C, 30 s à 52°C et 2 min à 72°C, puis 10 min à 72°C. Enfin, 5 µL des produits de RT-PCR sont analysés par électrophorèse en gel 1 % d'agarose contenant du bromure d'éthidium (0,7 µg/mL) pour vérifier la taille des amplicons, et le reste est purifié, à l'aide du kit NucleoSpin Gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel), pour séquençage par la plateforme Eurofins Cochin.

Le génome des virus amplifiés (C2) a été analysé à l'aide du logiciel CLC Workbench suite au séquençage NGS réalisé par la plateforme P2M de l'Institut Pasteur de Paris.

1.4. Caractérisation phénotypique des stocks viraux

1.4.1. Mesure du titre infectieux en plage de lyse

Des cellules MDCK-SIAT1 ensemencées la veille à 1.10⁶ cellules par puits de plaque 6 puits sont rincées deux fois avec du milieu DMEM, puis incubées 1 h à 35°C avec 400 µL de chacune des suspensions virales diluées en série de 10 en 10 dans du milieu DMEM. Après ajout de 2 mL d'un mélange volume à volume de MEM 2X, pH = 7, additionné de 2 µg/mL de trypsine TPCK et d'Avicel 2X (24 mg/mL, FMC BioPolymer), les cellules sont

incubées durant 72 h à 35°C. Les plages de lyse sont révélées par coloration du tapis cellulaire avec une solution de cristal violet 10 %, formaldéhyde 10 %, éthanol 20 %.

1.4.2. Mesure du titre en particules physiques par RT-PCR quantitative du segment M

Pour le segment M, les ARN viraux sont amplifiés par RT-PCR quantitative (RT-qPCR) selon le protocole du kit SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen). Le mélange réactionnel est le suivant : 5 µL de mix de réaction 2X, 0,6 µM de MgSO₄, 0,4 µM de chacune des deux amorces (5'-CTTCTAACCGAGGTCGAAACGTA-3' et 5'-GGTGACAGGATTGGTCTTGTCTTTA-3'), 0,4 µM d'une sonde d'hydrolyse (5'-HEX-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGAG-BHQ-3' ; comportant le fluorochrome HEX en 5' et l'extincteur (quencher) BHQ en 3'), 0,2 µL de mix d'enzyme RT/Platinum Taq, 2,5 µL d'échantillon d'ARN et de l'eau p.p.i. en quantité nécessaire pour arriver à un volume final de 10 µL. Les mélanges réactionnels sont placés dans un thermocycleur couplé à un système optique de détection de la fluorescence (LightCycler 480, Roche) programmé ainsi : 15 min à 45°C, 3 min à 95°C, 50 cycles de : 10 s à 95°C, 10 s à 55°C et 20 s à 72°C (acquisition de fluorescence), puis 30 s à 40°C. Une gamme de transcrits M produits in vitro (10² à 10⁸ copies) est utilisée pour la détermination du nombre de copies présentes dans nos échantillons.

1.4.3. Détermination de la Dose Infectieuse de Fluorescence x %

Des cellules MDCK-SIAT1,ensemencées la veille à 4.10⁴ cellules par puits de plaque 96 puits, sont rincées deux fois avec du milieu DMEM, puis incubées avec 50 µL de dilutions en série de raison 2 des suspensions virales (de 1/1 à 1/128). Après 1 h d'incubation à 35°C, l'inoculum est retiré et remplacé par 100 µL de milieu DMEM supplémenté par 2% de SVF. A 6 heures post-infection (hpi), les cellules sont rincées avec du PBS, incubées avec 20 µL de trypsine-0,05% EDTA (Gibco Life Technologies) durant 10 min, puis mises en suspension dans du milieu de culture. Les cellules sont transférées dans une plaque 96 puits à fond rond, centrifugées 5 min à 400 g, rincées une fois avec du PBS puis fixées 20 min à température ambiante avec du PBS contenant 4% de paraformaldéhyde (PFA). La fluorescence est mesurée à l'aide du cytomètre en flux Attune NxT (Thermofisher). Le pourcentage de cellules positives par cytométrie en flux

en fonction de la dilution est représenté à l'aide du logiciel Graphpad Prism et la dilution à appliquer afin d'obtenir x% de cellules positives est déterminée graphiquement.

2. Analyse fonctionnelle des virus recombinants

2.1. Test de la sensibilité cellulaire à l'infection

Des cellules A549, A549-SIAT1, BCI-NS1.1, CALU-3, IMR90, MDCK, MDCK-SIAT1 et NCI-H292, ensemencées la veille à 4.10^4 cellules par puits de plaque 96 puits, sont rincées deux fois avec du milieu DMEM, puis incubées avec 50 μ L de suspension virale diluée permettant d'être à une MOI de 3 UFP/cellule. Après 1 h d'incubation à 35°C, l'inoculum est retiré, les cellules sont rincées trois fois avec du milieu DMEM et 100 μ L de milieu, spécifique à chaque lignée cellulaire (cf. §I.1) additionné de 0,5 μ g/mL de trypsine TPCK sont ajoutés, puis les cellules sont incubées 24 h ou 36 h à 35°C. Les cellules sont ensuite rincées deux fois avec du milieu DMEM avant d'être incubées 10 min avec 30 μ L de trypsine-0,05% EDTA. Suite à l'incubation, 120 μ L de milieu DMEM supplémenté de 10% de SVF sont ajoutés. Les 150 μ L de suspension cellulaire sont transférés dans 150 μ L de PFA 8% et fixés 15 min. Les cellules sont ensuite centrifugées 5 min à 1500 g puis reprises dans 200 μ L de PBS. La fluorescence est ensuite mesurée par cytométrie en flux à l'aide du cytomètre NxT Attune (Thermofisher).

2.2. Infection en conditions de cycle multiple : cinétique de croissance

Des cellules MDCK-SIAT1, ensemencées la veille à 4.10^4 cellules par puits de plaque 96 puits, sont rincées deux fois avec du milieu DMEM, puis incubées avec 50 μ L de suspension virale diluée permettant d'être à une MOI de 10^{-3} UFP/cellule. Après 1 h d'incubation à 35°C, l'inoculum est retiré, les cellules sont rincées trois fois avec du milieu DMEM et 100 μ L de milieu additionné de 0,5 μ g/mL de trypsine TPCK sont ajoutés, puis les cellules sont incubées à 35°C. Les surnageants sont prélevés aux temps 24, 48 et 72 hpi puis congelés à -80°C et la concentration en particules virales infectieuses est déterminée par la méthode de titrage en plages de lyse (cf. §III.1.4.1).

3. Détermination de l'impact de la balance HA/NA sur la fréquence de co-infections

3.1. Préparation des cellules et des dilutions virales

Des cellules MDCK-SIAT1 sontensemencées la veille à $2,5 \cdot 10^5$ cellules par puits de plaque 24 puits. Au sein de chaque couple de virus recombinants permettant l'expression de GFP ou de mCherry, une dilution est appliquée au virus ayant la plus forte dose infectieuse de fluorescence afin d'infecter les cellules à une MOI de 3 UFP/cellule. Une dilution est également appliquée au second membre, dont la DIF est plus faible, afin d'être à une MOI de 3 UFP/cellule mais cette dilution est corrigée afin d'utiliser une quantité de virus permettant d'obtenir la même proportion de cellules positives par cytométrie en flux que l'autre membre du couple. Pour cela, le facteur de dilution à appliquer au second virus est multiplié par le résultat du ratio entre la DIF la plus élevée et la DIF la plus faible du couple. Les deux virus dilués sont ensuite mélangés et du milieu DMEM est ajouté pour obtenir un volume final de 100 μ L pour chaque puits contenant les cellules infectées.

3.2. Production de virus sous les différentes conditions de balance HA/NA

Les cellules MDCK-SIAT1,ensemencées la veille, sont rincées deux fois avec du milieu DMEM, puis incubées avec 100 μ L des suspensions virales préalablement préparées. Après 1 h d'incubation à 35°C, l'inoculum est retiré, les cellules sont rincées trois fois avec du milieu DMEM et 500 μ L de milieu additionné de 0,5 μ g/mL de trypsine TPCK sont ajoutés, puis les cellules sont incubées à 35°C. Les surnageants sont prélevés à 48 hpi, centrifugés 5 min à 2500 g puis les surnageants sont congelés à -80°C.

3.3. Analyse de la fréquence de co-infections

Des cellules MDCK-SIAT1,ensemencées la veille à $4 \cdot 10^4$ cellules par puits de plaque 96 puits, sont rincées deux fois avec du milieu DMEM, puis incubées avec 50 μ L de dilutions en série de raison 2 (de 1/1 à 1/128) des suspensions virales récoltées à l'étape présentée en III.3.2. Après 1 h d'incubation à 35°C, l'inoculum est retiré et remplacé par 100 μ L de milieu DMEM supplémenté par 2% de SVF. A 24 hpi, les cellules sont rincées avec du PBS, incubées avec 20 μ L de trypsine-0,05% EDTA durant 10 min, puis mises en suspension dans du milieu de culture. Les cellules sont transférées dans une plaque 96 puits à fond rond, centrifugées 5 min à 400 g, rincées une fois avec du PBS puis fixées 20

min à température ambiante avec du PBS contenant 4% de PFA. La fluorescence est mesurée à l'aide du cytomètre en flux Attune NxT (Thermofisher). Le pourcentage de cellules simples ou doubles positives pour GFP et mCherry est mesurée par cytométrie en flux. Les données obtenues sont ensuite utilisées pour calculer la proportion de cellules co-infectées à l'aide du modèle probabilistique.

IV. Impact des co-infections hétérotypiques entre virus influenza A et B

1. Génétique inverse

Pour le virus IBV, des cellules 293T et MDCK sont ensemencées en co-culture à 4.10^5 et 3.10^5 cellules par puits de plaque 6 puits, respectivement, dans un mélange volume à volume dans leur milieu de culture respectif. Le lendemain, les cellules sont co-transfectées avec un mélange de 0,5 µg de chacun des plasmides de génétique inverse, pDP2002-PB2, -PB1, -PA, -NP, -M, -NS, -HA, -NA et 0,5 µg de du plasmide pCI-PB2, avec 24 µL de FuGENE HD dans 76 µL de milieu OptiMEM + GlutaMax. Pour les virus recombinants, le plasmide pDP2002-PB2 est remplacé par le plasmide correspondant permettant l'expression d'une protéine fluorescente mCherry. Pour le contrôle négatif, le plasmide pDP2002-PB2 est volontairement omis. Après 24 h d'incubation à 37°C, les cellules sont rincées deux fois avec du DMEM, avant d'ajouter 2 mL de DMEM contenant 0,5 µg/mL de trypsine TPCK. Après 48 h d'incubation à 35°C, le milieu de culture est collecté et centrifugé 5 min à 2500 g, puis le surnageant est aliquoté et conservé à -80°C.

Pour les virus IAV-GFP et IAV-N31S-GFP issus de la souche A/WSN/33, le protocole opératoire est identique à celui présenté en section III.1.1. Pour le virus IAV-GFP, le plasmide pPolI-PB2 est remplacé par le plasmide pPolI-PB2-2A-GFP et pour le virus IAV-N31S-GFP les plasmides pPolI-PB2 et pPolI-M sont remplacés, respectivement, par les plasmides pPolI-PB2-2A-GFP et pPolI-M-N31S.

La concentration en particules virales infectieuses est déterminée par la méthode de titrage en plages de lyse (cf. §III.1.4.1).

2. Amplification des virus et purification à partir des plages de lyse

Les génétiques inverses ont été amplifiées sur cellules MDCK à une MOI de 10^{-3} UFP/cellule. Les virus ainsi prélevés sont amplifiés une première fois (C1) en diluant l'inoculum au 1/100^{ème} sur cellules MDCK, ensemencées la veille à 1.10^6 cellules par puits de plaques 6 puits, titrés par la méthode des plages de lyse, puis amplifiés en seconde fois (C2) à une MOI contrôlée de 10^{-4} UFP/cellule.

3. Inactivation des virus aux UV

Les stocks de virus sont inactivés aux rayonnements ultraviolets par exposition de plaques 6 puits, dont 400 µL de virus sont disposés dans chaque puits, à 8 cycles de rayonnement UV soit l'équivalent de 8 mJ/cm². L'exposition se fait à l'aide d'un four à UV (UVC 500, UVCrosslinker, Amersham Life Science). Une agitation est réalisée entre chacun des cycles.

4. Caractérisation phénotypique des stocks viraux

4.1. Mesure du titre infectieux en plage de lyse

Les virus ont été titrés par la méthode des plages de lyse sur des cellules MDCK comme présenté en cf. §III.1.4.1.

4.2. Mesure du titre en particules physiques par RT-PCR quantitative du segment M (IAV) et HA (IBV)

Pour le segment M des virus IAV, voir III.4.1.2.

Pour le segment HA, la même méthode que pour le segment M a été utilisée (cf §III.4.1.2). Les deux amorces et les deux sondes utilisées ont pour séquence : 5'-ACCCTACARAMTTGGAACYTCAGG-3', 5'-ACAGCCCAAGCCATTGTTG-3', 5'-FAM-AAATCCAATTTTRCTGGTAG-BHQ-3', 5'-FAM-AAATCCGATTTTRCTGGTAG-BHQ-3'. Une gamme de transcrits HA produits *in vitro* (10² à 10⁸ copies) a été utilisée pour la détermination du nombre de copies présentes dans nos échantillons.

5. Analyse fonctionnelle des virus recombinants

5.1. Infection en conditions de cycle multiple : cinétique de croissance

Des cellules MDCK ou A549,ensemencées la veille à 4.10⁴ cellules par puits de plaque 96 puits, sont rincées deux fois avec du milieu DMEM, puis incubées avec 50 µL de suspension virale diluée permettant d'être à une MOI de 10⁻³ UFP/cellule. Après 1 h d'incubation à 35°C, l'inoculum est retiré, les cellules sont rincées trois fois avec du milieu DMEM et 100 µL de milieu additionné de 0,5 µg/mL de trypsine TPCK sont ajoutés, puis les cellules sont incubées à 35°C. Les surnageants sont prélevés aux temps 24, 48 et 72 hpi puis congelés à -80°C et la concentration en particules virales infectieuses est déterminée par la méthode de titrage en plages de lyse (cf. §III.1.4.1).

5.2. Expression de la nucléoprotéine virale lors de l'infection

Des cellules A549 et MDCK,ensemencées la veille à $2,5 \cdot 10^4$ cellules par puits de plaque 96 puits, sont rincées deux fois avec du milieu DMEM, puis incubées avec 50 μ L de suspension virale diluée permettant d'être à une MOI de 3 UFP/cellule. Après 1 h d'incubation à 35°C, l'inoculum est retiré, les cellules sont rincées trois fois avec du milieu DMEM et 100 μ L de milieu DMEM additionné de 10% de SVF sont ajoutés, puis les cellules sont incubées 3 h, 6 h ou 9 h à 35°C. Les lysats cellulaires totaux ont été préparés par addition de tampon de Laemmli 1X (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 ; β -mercaptoéthanol 5 % ; SDS 2 % ; bleu de bromophénol 0,001 %) directement sur le tapis cellulaire. Le lysat obtenu a été dissocié par passage sur une colonne QIAshredder (Qiagen). Les protéines cellulaires ont ensuite été séparées par électrophorèse en gel NuPAGE 4-12% Bis-Tris (Invitrogen), puis transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (Amersham) à l'aide d'un appareil de transfert (Biorad). Les sites de fixation non spécifiques ont été saturés par incubation en PBS-Tween20 0,25%-Régilait 5% pendant 1 h. La membrane a ensuite été incubée la nuit à 4°C en présence d'un anticorps monoclonal anti-NP pour IAV (AAH5 ; Abcam ; dilution au 1/5000^{ème}) ou un anticorps monoclonal anti-NP pour IBV (B017 ; Abcam ; dilution au 1/1000^{ème}) dilués dans du PBS-Tween20 0,25 %-BSA 1%. Enfin, la membrane a été incubée 1 h en présence d'un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (anti-IgG de souris, GE Healthcare). La peroxydase est révélée par addition d'un substrat chimioluminescent (kit ECL Plus, Amersham) et exposition de la membrane à l'imageur Chemidoc (Biorad).

6. Système de mesure des co-infections hétérotypiques

6.1. Mesure de la proportion de cellules positives en fluorescence suite à l'infection par les virus IAV-GFP et IBV-mCherry

Des cellules A549,ensemencées la veille à $2 \cdot 10^4$ cellules par puits de plaques 96 puits, sont rincées deux fois avec du milieu DMEM, puis incubées avec 50 μ L de suspension virale diluée provenant soit (i) du virus IAV-GFP permettant d'être à une MOI de 3 UFP/cellule, soit (ii) du virus IBV-mCherry à une MOI de 3 UFP/cellule (ajustée en fonction du ratio de particules physiques par particule infectieuse du stock afin d'être à un nombre équivalent de particules physiques avec le stock IAV-GFP), soit (iii) d'un mélange des deux virus avec une MOI de 3 UFP/cellule pour le virus IAV-GFP et IBV-mCherry (ajustée comme précédemment). Après 1 h d'incubation à 4°C, l'inoculum est

retiré, les cellules sont rincées trois fois avec du milieu DMEM puis 100 µL de milieu OptiMEM + GlutaMAX sont ajoutés et les cellules sont incubées 1 h à 35°C. Suite à cette incubation, le milieu est retiré et les cellules sont incubées 1 h à 35°C avec 50 µL de suspension virale diluée du virus IBV-mCherry ou IAV-GFP à la même MOI que précédemment pour (i) et (ii), respectivement, ou de 50 µL de milieu DMEM pour (iii). Une condition contrôle où le premier virus est remplacé par 50 µL de milieu DMEM est également réalisé afin de mesurer l'intensité de fluorescence des virus IAV et IBV en absence de co-infections. Enfin, le milieu est retiré, les cellules sont rincées deux fois avec du milieu DMEM, puis incubées avec 100 µL de milieu OptiMEM + GlutaMax à 35°C pendant 6 h. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS, incubées avec 20 µL de trypsine-0,05% durant 10 min, puis mises en suspension dans du milieu de culture. Les cellules sont transférées dans une plaque 96 puits à fond rond, centrifugées 5 min à 400 g, rincées une fois avec du PBS puis fixées 20 min à température ambiante avec du PBS contenant 4% de paraformaldéhyde (PFA). Les cellules sont centrifugées 5 min à 1500 g puis reprises dans 200 µL de PBS. Les proportions de cellules GFP+, mCherry+, GFP+/mCherry+, GFP-/mCherry+, GFP+/mCherry- et GFP-/mCherry+ sont mesurées à l'aide du cytomètre en flux Attune NxT (Thermofisher).

6.2 Mesure de la proportion de cellules positives en fluorescence suite à l'infection par les virus IAV (A/WSN/33) et IBV (B/Brisbane/60/2008)

Le même protocole qu'appliqué en IV.5.1. est utilisé. Cependant, pour les virus n'exprimant pas de rapporteurs fluorescents, l'infection virale est mise en évidence par cytométrie en flux suite à un marquage de la NP virale. Les cellules fixées sont centrifugées à 1500g pendant 5 minutes puis du PBS-1% SVF est ajouté. Les cellules sont ensuite perméabilisées par ajout d'une solution de PBS-1% Triton x100 durant 6 min avant centrifugation et blocage 10 min au PBS-1% SVF. Chaque suspension cellulaire est séparée en deux et, pour la première moitié, un marquage à l'aide d'un anticorps dirigé contre la NP virale IAV (AAH5 ; Abcam ; dilution au 1/5000^{ème} ; 30 min à 4°C) ou, pour la seconde moitié, un anticorps monoclonal anti-NP pour IBV (B017 ; Abcam ; dilution au 1/1000^{ème} ; 30 min à 4°C) est réalisé. Suite à une série de 3 lavages successifs séparés chacun par un cycle de centrifugation de 5 min à 1500 g, un marquage est effectué à l'aide d'un anticorps secondaire fluorescent (GAM AF488 ; Invitrogen ; dilution au 1/250^{ème} ; 30

min à 4°C). L'intensité moyenne et médiane de fluorescence est mesurée à l'aide du cytomètre.

6.3 Utilisation de drogues lors de la co-infection virale entre IAV et IBV

Les mêmes conditions d'infections que présentées en IV.5.1. sont utilisées. Le virus IAV-GFP est remplacé par le virus IAV-N31S-GFP. Les drogues Pimodivir (50 nM, Clinisciences) et Nucleozin (1 µM, Sigma) sont ajoutées au moment de l'infection et sont conservées tout au long de l'infection. La drogue Amantadine (20 µM final, Sigma) est ajoutée aux cellules 1 h avant l'infection et est maintenue durant toute la durée de l'infection.

Résultats

I. Outil de mesure de la fréquence de co-infections

Afin de mesurer la fréquence de co-infections, nous avons choisi de modifier et d'optimiser le système préalablement développé par [6] et présenté dans l'introduction en I.4. Brièvement, ce système repose sur la co-infection de cellules par un couple de virus VSV exprimant deux protéines fluorescentes différentes. La mesure de la proportion des différentes catégories de cellules fluorescentes par cytométrie en flux permet, après résolution numérique, d'estimer l'agrégation virale. L'impact de certaines conditions sur la fréquence de co-infections peut ensuite être mesurée. L'importance de la modulation fréquence d'agrégation sur la fréquence de co-infections peut ainsi être estimé. Nous avons donc produit des couples de virus influenza recombinants permettant chacun l'expression d'un rapporteur fluorescent différent afin de mesurer la fréquence de co-infections sous certaines conditions.

1. Production et caractérisation de virus influenza recombinants exprimant des protéines fluorescentes

Un couple de virus recombinants a été produit et permet l'expression d'une protéine fluorescente mCherry ou GFP à partir du segment 1 codant pour la protéine PB2. La protéine fluorescente est traduite indépendamment de la protéine PB2 grâce à l'insertion entre les deux ORF d'un site de clivage 2A provenant d'un teschovirus porcin permettant une séparation co-traductionnelle des deux protéines [91]. Les deux protéines ne sont donc pas fusionnées et le rapporteur fluorescent n'interfère pas avec la fonction de la protéine PB2.

La séquence codant pour la protéine fluorescente est localisée sur le même segment pour chacun des virus produits (figure 17). L'utilisation du même segment permet d'empêcher la formation par réassortiment de virions possédant deux segments modifiés. Afin de conserver les signaux d'encapsidation du segment, la région codant l'extrémité C-terminale de PB2 est dupliquée et est ajoutée en aval de la séquence codant pour le rapporteur fluorescent (figure 17 – région hachurée sur fond noir) et en amont de

l'extrémité 5' non codante. L'identité entre les deux régions dupliquées pourrait aboutir à l'exclusion de la séquence codant pour le rapporteur fluorescent par recombinaison. Pour limiter ce phénomène, la séquence nucléotidique de la première région (figure 17 – région hachurée sur fond bleu) a été modifiée en tirant parti de la dégénérescence du code génétique.



Figure 17 – Expression d'une protéine fluorescente à partir du segment 1

Représentation schématique du segment PB2-2A-Fluo. PB2 : séquence codant PB2 (762 acides aminés ou aa) de la souche A/WSN/33. Zone rouge : courte séquence codant pour trois alanines. 2A : séquence codant le peptide 2A du teschovirus porcine 1 (22 aa). Fluo : séquence codant pour la protéine de fluorescence GFP (240 aa) ou mCherry (236 aa). Ces séquences ont été optimisées pour contenir les codons majoritairement utilisés par les virus influenza [268]. Région hachurée sur fond gris : duplication de la séquence codant pour l'extrémité C-terminale de PB2. Les 109 nucléotides codant effectivement pour les derniers aa de PB2 (région hachurée sur fond bleu) ont été modifiés en tirant parti de la dégénérescence du code génétique. 3'NC (27 nt) et 5'NC (34 nt) : extrémités non codantes du segment PB2.

Les virus ont été produits par génétique inverse puis amplifiés à une MOI contrôlée. Pour limiter la diversité virale, les virus ont été purifiés par isolement sur plaque de lyse à chacune des deux étapes d'amplification puis la dernière purification a été amplifiée à une MOI contrôlée pour produire des stocks viraux.

Pour chaque stock viral, quatre paramètres sont mesurés :

- Le titre infectieux, déterminé par la méthode de titrage en plaques de lyse et exprimé en unités formant plaques (UFP)/mL.
- Le titre en particules physiques, c'est-à-dire le nombre de virions présents dans un volume donné, déterminé par RT-qPCR et exprimé en nombre de copies d'un segment génomique viral/mL. Le segment choisi pour les virus IAV et IBV présente des particules défectives mais n'est pas le segment pour lequel on observe le plus de particules défectives.
- Le ratio de particules physiques/infectieuses permettant de déterminer le nombre de particules physiques par particule infectieuse.
- La dose infectieuse de fluorescence 50% ou DIF50, correspondant au facteur de dilution à appliquer aux stocks viraux afin d'obtenir 50% de fluorescence des cellules infectées. Pour cela les stocks de virus sont dilués en série de raison 2 puis les dilutions sont utilisées pour infecter des cellules en cycle unique. La proportion de cellules fluorescentes en fonction du facteur de dilution est représentée et le

facteur de dilution à appliquer pour obtenir 50% de fluorescence (= DIF50) est déterminé graphiquement.

2. Système de mesure de la fréquence de co-infections pour les virus influenza A

Pour mesurer les événements de co-infections par les virus influenza A pour une condition donnée, le couple de virus fluorescents au sein duquel un membre exprime mCherry et l'autre GFP est utilisé, comme présenté en I.1. Des cellules sont co-infectées dans des conditions de cycles multiples par un mélange équiproportionnel de chaque membre du couple de virus fluorescent basé sur leur DIF50. La progénie virale est collectée 48 heures post-infection puis est diluée en série de raison 2 et est utilisée pour infecter des cellules en cycle unique. Les cellules sont ensuite fixées et la fluorescence est mesurée par cytométrie en flux (figure 18).

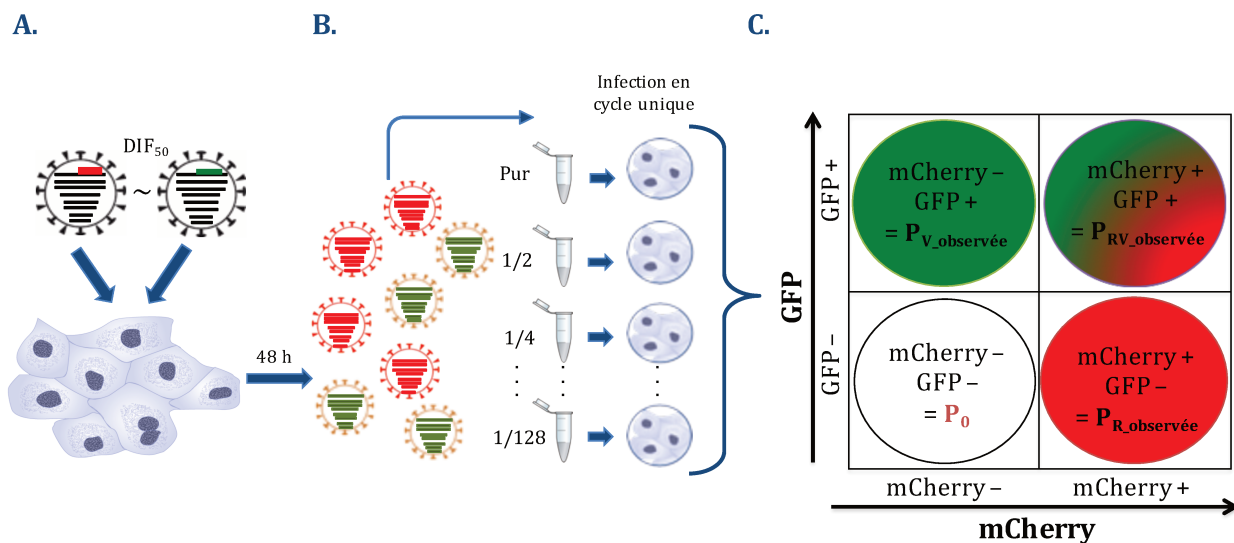


Figure 18 - Pipeline du système de mesure de la fréquence de co-infections pour les virus influenza A

A. Des cellules sont co-infectées avec un mélange équiproportionnel, basé sur la DIF₅₀, de deux virus permettant chacun l'expression de mCherry ou GFP. **B.** La progénie virale est collectée 48 heures après l'infection. La progénie est diluée en série de raison 2 et chaque dilution est utilisée pour infecter des cellules en cycle unique. Les cellules sont ensuite fixées. **C.** La fluorescence des cellules est mesurée par cytométrie en flux. La proportion de cellules exprimant seulement la protéine mCherry est notée $P_{R_observée}$, celle exprimant seulement la protéine GFP est notée $P_{V_observée}$ et celle exprimant mCherry et GFP est notée $P_{RV_observée}$, la proportion de cellules non infectée est notée P_0 . Ces proportions sont utilisées afin de valider le modèle puis de calculer la fréquence de co-infections.

Il est possible de déterminer par cytométrie en flux les proportions de cellules suivantes :

- Exprimant au moins la protéine de fluorescence rouge (mCherry+/GFP±)
- Exprimant au moins la protéine de fluorescence verte (mCherry±/GFP+)
- Exprimant la protéine de fluorescence rouge et la protéine de fluorescence verte (mCherry+/GFP+)
- Exprimant seulement la protéine de fluorescence rouge (mCherry+/GFP-)
- Exprimant seulement la protéine de fluorescence verte (mCherry-/GFP+)
- N'exprimant aucune des protéines fluorescentes (mCherry-/GFP-)

La proportion observée de cellules exprimant seulement la protéine de fluorescence rouge mCherry sera notée $P_{R_observée}$, la proportion observée de cellules exprimant seulement la protéine de fluorescence verte GFP sera notée $P_{V_observée}$ et la proportion observée de cellules exprimant les protéines GFP et mCherry sera notée $P_{RV_observée}$.

Les données obtenues par cytométrie en flux sont utilisées dans un modèle de résolution numérique, présenté dans la section suivante, permettant le calcul de la proportion de cellules co-infectées. La nature et la proportion des différents types d'agrégats sont également évaluées. Il est alors possible de représenter, pour une condition donnée, la proportion d'agrégation en fonction de la MOI dans un échantillon.

3. Optimisation d'un modèle préexistant

Lors de co-infections, certaines cellules peuvent être infectées plusieurs fois par des particules virales provenant du même stock viral. Ainsi, la proportion de cellules doubles positives mesurée par cytométrie en flux ne peut être directement utilisée comme marqueur de la fréquence de co-infections, comme expliqué dans l'introduction. Nous avons alors optimisé le modèle initialement développé par l'équipe de Rafael Sanjuán [6] afin de mesurer la fréquence réelle de co-infections et d'estimer l'agrégation dans les stocks de VSV pour l'appliquer aux virus influenza A. Le modèle initial, présenté dans l'introduction en I.4, ne prend en compte que des unités infectieuses composées d'une ou deux particules virales et d'agrégats composés au maximum de deux unités infectieuses.

L'optimisation de ce modèle permet de prendre en compte des unités infectieuses composées d'une, de deux ou de trois particules virales initialement agrégées, présentées sur la figure 19A. Il a également été choisi de prendre en compte une possible agrégation entre deux ou trois unités infectieuses afin de considérer un maximum d'évènements d'infections (figure 19B-C).

A partir des données obtenues par cytométrie en flux, il est possible de déterminer la proportion de cellules non infectées (P_0) ou infectées par une (P_1), deux (P_2) ou trois (P_3) unités infectieuses.

La distribution des cellules infectées suit la loi de Poisson de formule :

- $P_n = \frac{m^n \times e^{-m}}{n!}$
- P_n représente la proportion de cellules infectées par n unités infectieuses
- m représente la MOI, soit le nombre d'unités infectieuses par cellule
- n représente le nombre d'unités infectieuses

En assimilant la proportion de cellules doublement négatives observée par cytométrie en flux (mCherry-/GFP-) à la proportion de cellules non infectées (P_0), il est possible de calculer, à partir de la formule de P_n , la MOI de chaque échantillon comme étant égale à :

- $m = -\ln(P_0)$

A partir de la MOI déterminée, on peut écrire :

- $P_1 = \frac{m^1 \times e^{-m}}{1!}$
- $P_2 = \frac{m^2 \times e^{-m}}{2!}$
- $P_3 = \frac{m^3 \times e^{-m}}{3!}$

Les valeurs obtenues de P_0 , P_1 , P_2 et P_3 seront ensuite utilisées pour définir une valeur seuil d'exclusion dans l'analyse de la fréquence de co-infections pour les dilutions d'échantillons ne permettant pas d'inclure au moins 99,7% des événements d'infections répondant aux conditions du modèle.

Pour pouvoir calculer la fréquence de co-infections, plusieurs étapes sont nécessaires.

La première étape consiste à déterminer des équations permettant de quantifier la proportion de chacune des unités infectieuses incluses dans le modèle (présentées en figure 19A) au sein de l'échantillon en fonction de la proportion initiale de cellules infectées par une seule particule virale non agrégée permettant l'expression de mCherry (R) ou de GFP (V). En utilisant les lois des probabilités, une équation peut ainsi être posée pour chaque unité infectieuse. La proportion de co-infections (C) parmi toutes les cellules infectées peut également s'écrire en fonction de R et V, ainsi :

- $C = 1 - R - V$

Pour des unités infectieuses composées de deux particules virales on peut écrire :

- $C_{RR} = C \times \frac{R^2}{(R+V)^2 + (R+V)^3}$
- $C_{VV} = C \times \frac{V^2}{(R+V)^2 + (R+V)^3}$
- $C_{RV} = C \times \frac{2 \times R \times V}{(R+V)^2 + (R+V)^3}$

- C_{RR} représente la proportion de cellules infectées par une unité infectieuse composée de deux particules virales permettant chacune l'expression de mCherry.
- C_{VV} représentent la proportion de cellules infectées par une unité infectieuse composée de deux particules virales permettant chacune l'expression de GFP.










- C_{RV} représente la proportion de cellules infectées par une unité infectieuse composée d'une particule virale permettant l'expression de mCherry et d'une particule virale permettant l'expression de GFP.

Pour des unités infectieuses composées de trois particules virales on peut écrire :



















- $C_{RRR} = C \times \frac{R^3}{(R+V)^2+(R+V)^3}$
- $C_{VVV} = C \times \frac{V^3}{(R+V)^2+(R+V)^3}$
- $C_{RRV} = C \times \frac{3 \times R^2 \times V}{(R+V)^2+(R+V)^3}$
- $C_{RVV} = C \times \frac{3 \times R \times V^2}{(R+V)^2+(R+V)^3}$

- C_{RRR} représente la proportion de cellules infectées par une unité infectieuse composée de trois particules virales permettant chacune l'expression de mCherry.
- C_{VVV} représente la proportion de cellules infectées par une unité infectieuse composée de trois particules virales permettant chacune l'expression de GFP.
- C_{RRV} représente la proportion de cellules infectées par une unité infectieuse composée de deux particules virales permettant chacune l'expression de mCherry et d'une particule virale permettant l'expression de GFP.
- C_{RVV} représente la proportion de cellules infectées par une unité infectieuse composée d'une particule virale permettant l'expression de mCherry et de deux particules virales permettant chacune l'expression de GFP.

A.

								
R	V	C_{RR}	C_{VV}	C_{RV}	C_{RRR}	C_{VVV}	C_{RRV}	C_{RVV}

B.

									
	R^2	RV	RC_{RR}	RC_{VV}	RC_{RV}	RC_{RRR}	RC_{VVV}	RC_{RRV}	RC_{RVV}
	RV	V^2	VC_{RR}	VC_{VV}	VC_{RV}	VC_{RRR}	VC_{VVV}	VC_{RRV}	VC_{RVV}
	RC_{RR}	VC_{RR}	C_{RR}^2	$C_{VV}C_{RR}$	$C_{RV}C_{RR}$	$C_{RRR}C_{RR}$	$C_{VVV}C_{RR}$	$C_{RRV}C_{RR}$	$C_{RVV}C_{RR}$
	RC_{VV}	VC_{VV}	$C_{RR}C_{VV}$	C_{VV}^2	$C_{RV}C_{VV}$	$C_{RRR}C_{VV}$	$C_{VVV}C_{VV}$	$C_{RRV}C_{VV}$	$C_{RVV}C_{VV}$
	RC_{RV}	VC_{RV}	$C_{RR}C_{RV}$	$C_{VV}C_{RV}$	C_{RV}^2	$C_{RRR}C_{RV}$	$C_{VVV}C_{RV}$	$C_{RRV}C_{RV}$	$C_{RVV}C_{RV}$
	RC_{RRR}	VC_{RRR}	$C_{RR}C_{RRR}$	$C_{VV}C_{RRR}$	$C_{RV}C_{RRR}$	C_{RRR}^2	$C_{VVV}C_{RRR}$	$C_{RRV}C_{RRR}$	$C_{RVV}C_{RRR}$
	RC_{VVV}	VC_{VVV}	$C_{RR}C_{VVV}$	$C_{VV}C_{VVV}$	$C_{RV}C_{VVV}$	$C_{RRR}C_{VVV}$	C_{VVV}^2	$C_{RRV}C_{VVV}$	$C_{RVV}C_{VVV}$
	RC_{RRV}	VC_{RRV}	$C_{RR}C_{RRV}$	$C_{VV}C_{RRV}$	$C_{RV}C_{RRV}$	$C_{RRR}C_{RRV}$	$C_{VVV}C_{RRV}$	C_{RRV}^2	$C_{RVV}C_{RRV}$
	RC_{RVV}	VC_{RVV}	$C_{RR}C_{RVV}$	$C_{VV}C_{RVV}$	$C_{RV}C_{RVV}$	$C_{RRR}C_{RVV}$	$C_{VVV}C_{RVV}$	$C_{RRV}C_{RVV}$	C_{RVV}^2

C.




























										
	R^3	RV^2	R^2C_{RR}	R^2C_{VV}	R^2C_{RV}	R^2C_{RRR}	R^2C_{VVV}	R^2C_{RRV}	R^2C_{RVV}	
	RV^2	V^3	V^2C_{RR}	V^2C_{VV}	V^2C_{RV}	V^2C_{RRR}	V^2C_{VVV}	V^2C_{RRV}	V^2C_{RVV}	
	RC_{RR}^2	VC_{RR}^2	C_{RR}^3	$C_{VV}C_{RR}^2$	$C_{RV}C_{RR}^2$	$C_{RRR}C_{RR}^2$	$C_{VVV}C_{RR}^2$	$C_{RRV}C_{RR}^2$	$CR_{VV}C_{RR}^2$	
	RC_{VV}^2	VC_{VV}^2	$C_{RR}C_{VV}^2$	C_{VV}^3	$C_{RV}C_{VV}^2$	$C_{RRR}C_{VV}^2$	$C_{VVV}C_{VV}^2$	$C_{RRV}C_{VV}^2$	$C_{RVV}C_{VV}^2$	
	RC_{RV}^2	VC_{RV}^2	$C_{RR}C_{RV}^2$	$C_{VV}C_{RV}^2$	C_{RV}^3	$C_{RRR}C_{RV}^2$	$C_{VVV}C_{RV}^2$	$C_{RRV}C_{RV}^2$	$C_{RVV}C_{RV}^2$	
	RC_{RRR}^2	VC_{RRR}^2	$C_{RR}C_{RRR}^2$	$C_{VV}C_{RRR}^2$	$C_{RV}C_{RRR}^2$	C_{RRR}^3	$C_{VVV}C_{RRR}^2$	$C_{RRV}C_{RRR}^2$	$C_{RVV}C_{RRR}^2$	
	RC_{VVV}^2	VC_{VVV}^2	$C_{RR}C_{VVV}^2$	$C_{VV}C_{VVV}^2$	$C_{RV}C_{VVV}^2$	$C_{RRR}C_{VVV}^2$	C_{VVV}^3	$C_{RRV}C_{VVV}^2$	$C_{RVV}C_{VVV}^2$	
	RC_{RRV}^2	VC_{RRV}^2	$C_{RR}C_{RRV}^2$	$C_{VV}C_{RRV}^2$	$C_{RV}C_{RRV}^2$	$C_{RRR}C_{RRV}^2$	$C_{VVV}C_{RRV}^2$	C_{RRV}^3	$C_{RVV}C_{RRV}^2$	
	RC_{RVV}^2	VC_{RVV}^2	$C_{RR}C_{RVV}^2$	$C_{VV}C_{RVV}^2$	$C_{RV}C_{RVV}^2$	$C_{RRR}C_{RVV}^2$	$C_{VVV}C_{RVV}^2$	$C_{RVV}C_{RVV}^2$	$V C_{RV}^3$	

Figure 19 – Modèle probabilistique permettant d'inférer la proportion d'agrégation entre particules virales

Par assimilation, un virion permettant l'expression de la GFP sera qualifié de virion vert et un virion permettant l'expression de mCherry de virion rouge. Le modèle prend en considération neuf possibilités d'unités infectieuses : les virions rouges et verts seuls (la proportion est notée R et V respectivement), des agrégats de deux ou trois virions rouges, notés C_{RR} et C_{RRR} respectivement, des agrégats de deux ou trois virions verts notés C_{VV} et C_{VVV} respectivement, et des agrégats de deux ou trois virions verts et rouges notés C_{RV} , C_{RRV} ou C_{RVV} selon la composition. Le modèle prend en compte la probabilité pour une cellule d'être infectée par plusieurs unités infectieuses. **A.** Matrice d'infection par une unité infectieuse. **B.** Matrice d'infection par deux unités infectieuses. **C.** Matrice d'infection par trois unités infectieuses. Les équations correspondantes aux différentes unités infectieuses sont présentées dans le texte. La fluorescence détectée pour chaque cellule est représentée par les couleurs rouge, verte et violette représentant des cellules exprimant mCherry, GFP ou les deux protéines, respectivement. Adapté de [6].

La deuxième étape consiste à prendre en compte toutes les configurations d'agrégations possibles, et donc de co-infections, entre deux (figure 19B) et trois (figure 19C) unités infectieuses afin de pouvoir écrire les équations permettant de déterminer la proportion calculée de cellules exprimant seulement la protéine mCherry notée $P_{R_calculée}$, la proportion calculée de cellules exprimant seulement la protéine GFP notée $P_{V_calculée}$ et la proportion calculée de cellules exprimant les protéines GFP et mCherry notée $P_{RV_calculée}$.

Ainsi :

- $$P_{R_calculée} = P_1(R + C_{RR} + C_{RRR}) + P_2[(R + C_{RR})^2 + C_{RRR}(2R + C_{RR} + C_{RRR})] + P_3 \left[(R + C_{RR})^3 + C_{RRR}^2(3R + 3C_{RR} + \frac{3R^2}{C_{RRR}} + \frac{3C_{RR}^2}{C_{RRR}} + C_{RRR}) \right]$$
- $$P_{V_calculée} = P_1(V + C_{VV} + C_{VVV}) + P_2[(V + C_{VV})^2 + C_{VVV}(2V + C_{VV} + C_{VVV})] + P_3 \left[(V + C_{VV})^3 + C_{VVV}^2(3V + 3C_{VV} + \frac{3V^2}{C_{VVV}} + \frac{3C_{VV}^2}{C_{VVV}} + C_{VVV}) \right]$$
- $$P_{RV_calculée} = P_1(C_{RV} + C_{RRV} + C_{VVR}) + P_2(1 - R^2 - 2RC_{RR} - 2RC_{RRR} - C_{RR}^2 - C_{RRR}^2 - 2C_{RR}C_{RRR} - V^2 - 2VC_{VV} - 2VC_{VVV} - C_{VV}^2 - C_{VVV}^2 - 2C_{VV}C_{VVV}) + P_3(1 - R^3 - 3RC_{RR}^2 - 3RC_{RRR}^2 - 3R^2C_{RR} - C_{RR}^3 - 3C_{RR}C_{RRR}^2 - 3C_{RRR}C_{RR}^2 - C_{RRR}^3 - V^3 - 3VC_{VV}^2 - 3VC_{VVV}^2 - 3V^2C_{VV} - C_{VV}^3 - 3C_{VV}C_{VVV}^2 - 3V^2C_{VVV} - 3C_{VVV}C_{VV}^2 - C_{VVV}^3)$$

La troisième partie permet de déterminer les valeurs de R et V permettant de résoudre les équations précédentes, puis de comparer la valeur de $P_{RV_observée}$ obtenue par cytométrie en flux (mCherry+/GFP+) avec la valeur de $P_{RV_calculée}$ afin de vérifier l'adéquation du modèle avec les observations.

En utilisant la méthode des moindres carrés, le couple de valeurs (R, V) permettant de résoudre les trois équations qui définissent $P_{R_calculée}$, $P_{V_calculée}$ et $P_{RV_calculée}$ en rendant minimale la somme des écarts entre valeurs observées et calculées est déterminé parmi 550 valeurs de R et V comprises entre 0 et 1. Le couple de valeurs (R, V) obtenu est ensuite utilisé afin de résoudre toutes les équations précédentes permettant de déterminer les proportions de chaque unité infectieuse et forme d'agrégat et, *in fine*, de déterminer la proportion de co-infections C pour chaque échantillon. L'ensemble des données ont été traitées et analysées à l'aide de scripts R dont le modèle est disponible en Annexe 1.

Une fois la proportion de co-infections calculée pour chacune des dilutions de chaque échantillon, un filtre est appliqué afin que le modèle soit représentatif d'au moins 99,7% des évènements totaux d'infections. Ainsi, seules les dilutions de chaque échantillon pour lesquelles $P_0 + P_1 + P_2 + P_3 \geq 0,997$ sont conservées pour l'analyse. Le modèle reflète ainsi *a minima*, pour chaque dilution choisie, 99,7% des évènements infectieux.

Pour chaque dilution conservée, la proportion de cellules doublement positives en cytométrie en flux (mCherry+/GFP+) observée et calculée est représentée sous la forme $P_{RV_calculée} = f(P_{RV_observée})$. Plus la modélisation est précise plus la valeur de $P_{RV_calculée}$ doit être assimilable à celle de $P_{RV_observée}$. Cette identité est représentée par une linéarité des données. L'absence de linéarité doit donner lieu à l'exclusion de la dilution responsable de la non linéarité. La proportion de co-infections C est ensuite représentée, pour chaque condition testée, sous la forme $C = f(MOI)$. Une équation de droite est alors déterminée pour chaque condition testée. Le coefficient directeur de chaque droite correspondant à une condition est comparé afin de conclure sur l'impact de chaque condition sur la fréquence de co-infections pour les virus influenza A.

II. Impact de la modulation de la balance hémagglutinine/neuraminidase sur la fréquence de co-infections

En plus des deux glycoprotéines de surface – hémagglutinine et neuraminidase – les virus influenza présentent à leur surface leur propre récepteur emporté lors du bourgeonnement des particules virales à la membrane cellulaire (figure 20A). Une liaison entre l'hémagglutinine d'une particule virale et le récepteur présent à la surface d'une autre particule virale permet l'agrégation entre particules virales (figure 20B-C). Une balance entre l'activité de l'hémagglutinine et de la neuraminidase est nécessaire pour permettre une infection optimale. Cependant des variations dans la balance HA/NA pourraient avoir un effet sur l'agrégation entre particules virales. Une plus forte activité de la neuraminidase pourrait permettre un détachement plus systématique des particules entre elles et *in fine* avoir un impact négatif sur la fréquence de co-infections (figure 20B). A l'inverse une plus faible activité de la neuraminidase n'entraînerait pas un détachement systématique et aurait un effet positif sur l'agrégation entre particules virales et *in fine* sur la fréquence de co-infections (figure 20C).

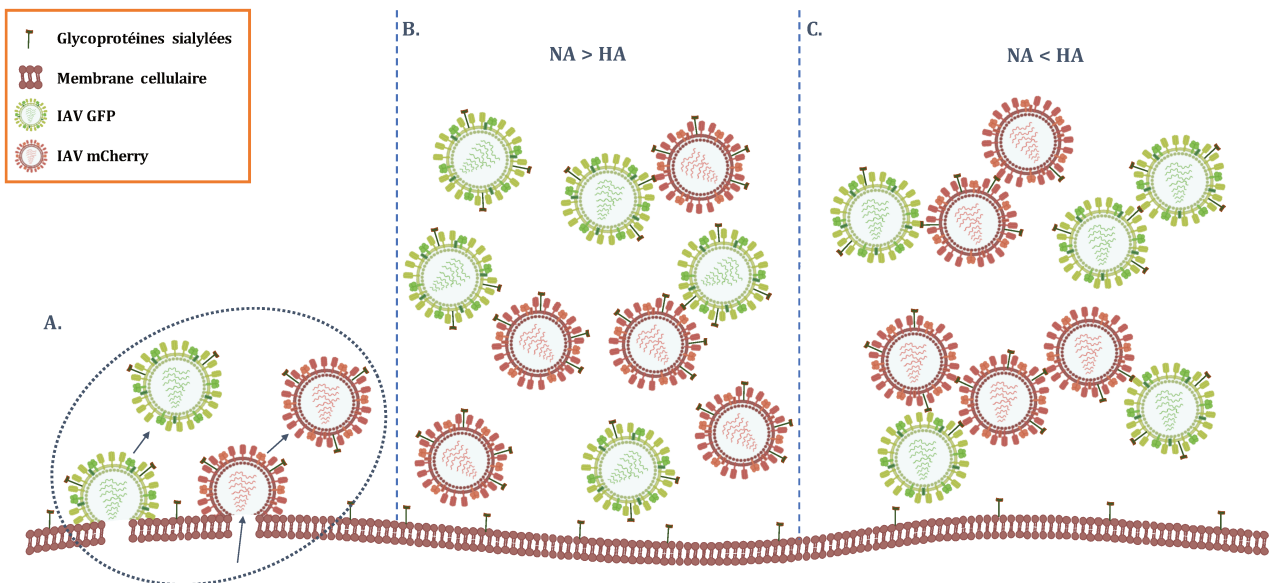


Figure 20 – Effet de la balance HA/NA sur l'agrégation entre virus influenza A

(A. Les acides sialiques (AS) interagissent avec l'hémagglutinine des virus influenza A. Ces AS sont retrouvés sur les glycoprotéines sialylées à la surface cellulaire, et donc à la surface des particules virales qui acquièrent leur enveloppe par bourgeonnement à la membrane cellulaire. B. et C. Une forte activité de la neuraminidase en comparaison de l'hémagglutinine ($NA > HA$) réduit la formation d'agrégats viraux. A l'inverse, une plus faible activité NA comparé à la HA ($NA < HA$) permet la formation d'un plus grand nombre d'agrégats. Ces agrégats sont observés lors de l'interaction entre l'hémagglutinine d'une première particule virale et les AS portés par les glycoprotéines sialylées d'une seconde particule.

Afin de mesurer l'impact de la modulation de la balance HA/NA, deux couples de virus recombinants permettant l'expression d'un rapporteur fluorescent ont été produits et caractérisés. La fréquence de co-infections a été mesurée dans les deux conditions de balance HA/NA et les résultats sont présentés dans cette section.

1. Production et caractérisation des stocks de virus recombinants fluorescents possédant différents équilibres de balance HA/NA

1.1. Sélection de deux souches virales circulantes lors de la saison 2007-2008

Les saisons 2007-2008 et 2008-2009 ont été marquées par la circulation, suite à leur apparition fin 2007, de virus H1N1 présentant la mutation H275Y sur la neuraminidase conférant une résistance à l'oseltamivir. Les capacités répliquatives de virus porteurs de cette mutation étaient habituellement limitées avec une balance HA/NA très déséquilibrée [269]. Une succession de mutations dans la HA et la NA a permis de réduire l'instabilité de la balance et ainsi de favoriser la réplication et la transmission de ces virus, permettant leur circulation. Deux souches virales de la saison 2007-2008 ont été sélectionnées pour mesurer l'impact de la balance HA/NA sur la fréquence de co-infections. Les deux souches possèdent une hémagglutinine identique correspondant à la souche A/Paris/0644/2007. La première souche sélectionnée A/Paris/0497/2007, sensible à l'oseltamivir, possède une neuraminidase dont l'affinité représentée par le K_m est de 7,5 μM . La seconde souche sélectionnée A/Paris/1170/2008, résistante à l'oseltamivir, possède une NA porteuse de la mutation H275Y qui a un K_m presque 2,5 fois plus élevé soit 18,2 μM [255]. Ces deux souches présentent donc une même HA mais une NA possédant une activité forte ou faible. La première souche présente donc une balance HA/NA plus déséquilibrée avec une forte activité neuraminidase contrairement à la seconde souche qui présente une balance plus équilibrée avec une activité neuraminidase plus faible (figure 21).

L'hémagglutinine et la neuraminidase de ces souches ont donc été choisies pour l'étude de l'impact de la balance HA/NA sur la fréquence de co-infections.

1.2. Production des virus recombinants fluorescents possédant différents équilibres de balance HA/NA

Pour chaque souche sélectionnée, un couple de virus recombinants a été produit. Pour chaque membre du couple, les segments 2, 3, 5, 7 et 8 sont identiques et proviennent de la souche A/WSN/1933, le segment 4 codant pour l'hémagglutinine provient de la souche A/Paris/0644/2007 et le segment 6 codant pour la NA provient de la souche A/Paris/0497/2007 ou A/Paris/1170/2008. Au sein de chaque couple, un membre permet l'expression d'une protéine fluorescente à partir du segment 1 différente du second membre. Ainsi un membre exprime de la GFP et l'autre la mCherry. Pour le couple 1 (noté H275), le segment 6 provient de la souche A/Paris/0497/2007 et pour le couple 2 (noté Y275) de la souche A/Paris/1170/2008. Les couples de virus produits ne diffèrent donc que par la neuraminidase codée par le segment 6 (figure 21). Au sein d'un couple, le virus permettant l'expression de mCherry reçoit le suffixe -R et celui permettant l'expression de GFP le suffixe -V.

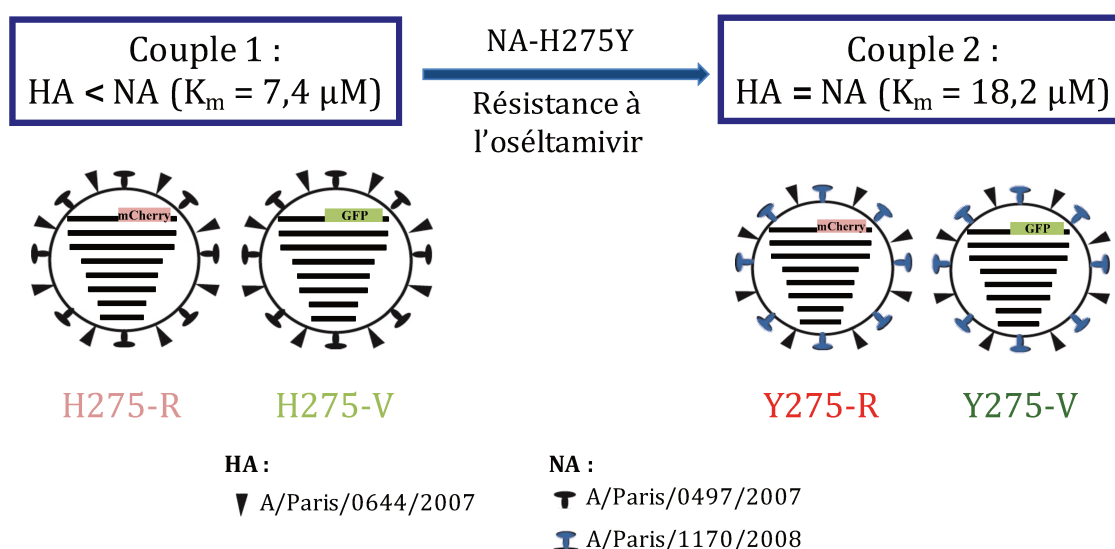


Figure 21 – Caractéristiques des virus utilisés pour mesurer l'impact de la balance HA/NA sur la fréquence de co-infections

Représentation schématique de deux couples de virus présentant une balance HA/NA différente. Chaque couple est composé d'un virus permettant l'expression de la protéine fluorescente mCherry et d'un virus permettant l'expression de la protéine fluorescente GFP, toutes deux à partir du segment 1 codant pour la protéine PB2. Les deux couples possèdent une hémagglutinine provenant de la souche A/Paris/0644/2007. Le couple 1 (H275) possède une neuraminidase provenant de la souche A/Paris/0497/2007 et le couple 2 (Y275) de la souche A/Paris/1170/2008. La neuraminidase des deux virus diffère par une mutation H275Y conférant une résistance à l'oseltamivir.

Les virus ont été produits par génétique inverse puis ont été amplifiés sur MDCK-SIAT1 dont la caractéristique est d'exprimer une majorité d'acides sialiques branchés en α 2,6 à leur surface [262]. En effet, il n'a pas été possible de produire ou d'amplifier ces virus sur des cellules MDCK, classiquement utilisées pour la multiplication des virus grippaux.

Pour éviter une trop grande hétérogénéité au sein des stocks viraux, un isolement de six plages de lyse sur gélose suivi d'une amplification sur cellules MDCK-SIAT1 à une MOI de 10^{-3} UFP/cellule à 35°C durant 72 h ont été effectués pour chaque stock viral. Seules les populations amplifiées présentant un titre infectieux, un titre en particules physiques et un potentiel fluorescent jugés suffisants, ainsi qu'une séquence, déterminée par NGS, relativement similaire à la séquence de référence, ont été retenues et leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau 2.

1.3. **Caractérisation du potentiel infectieux des virus obtenus**

1.3.1. Titre infectieux, titre en particules physiques et ratio

Les caractéristiques obtenues pour les différents virus sont présentées dans le tableau 2. Les populations purifiées non retenues ne sont pas présentées ici. Les motifs d'exclusion choisis sont :

- Titre infectieux trop faible ne permettant pas l'infection avec une MOI égale à 3 pour un grand nombre de cellules.
- Ratio de particules physiques par particule infectieuse de l'ordre de 10^4 .
- Mutations non silencieuses observées dans la séquence codante d'un ou plusieurs segments lors du NGS.
- Fluorescence observée trop éloignée de la fluorescence attendue estimée avec la loi de Poisson.

Tableau 2 – Caractéristiques des virus sélectionnés pour mesurer l’effet de la balance HA/NA sur la fréquence de co-infections

Virus	Titre infectieux (UFP/mL)^a	Titre en particules physiques (Copies M/mL)^b	Ratio particules physiques/infectieuses
H275-R	$3,66 \times 10^7$	$1,57 \times 10^{10}$	$4,28 \times 10^2$
H275-V	$1,04 \times 10^7$	$1,29 \times 10^{10}$	$1,24 \times 10^3$
Y275-R	$7,75 \times 10^6$	$1,73 \times 10^{10}$	$2,23 \times 10^3$
Y275-V	$9,63 \times 10^6$	$2,39 \times 10^{10}$	$2,48 \times 10^3$

^a : Titre déterminé par la méthode des plaques de lyse sur MDCK-SIAT1

^b : Titre déterminé par RT-qPCR du segment M. Moyenne de 2 séries de mesure indépendantes.

Les titres infectieux obtenus sur cellules MDCK-SIAT1 pour les virus sélectionnés sont relativement similaires au sein de chaque couple et sont de l’ordre de 10^7 UFP/mL.

Le titre en particules physiques est estimé en nombre de copies du segment M/mL déterminé par RT-qPCR. Comme pour le titre infectieux, le titre en particules physiques est relativement similaire entre les virus et est de l’ordre de 10^{10} copies M/mL.

Le ratio calculé à partir du titre infectieux et du titre en particules physiques permet de déterminer le nombre de particules physiques dans un stock en fonction du nombre de particules infectieuses (figure 22). Ce ratio est relativement similaire pour les quatre virus et est de l’ordre de 10^3 particules physiques/particule infectieuse.

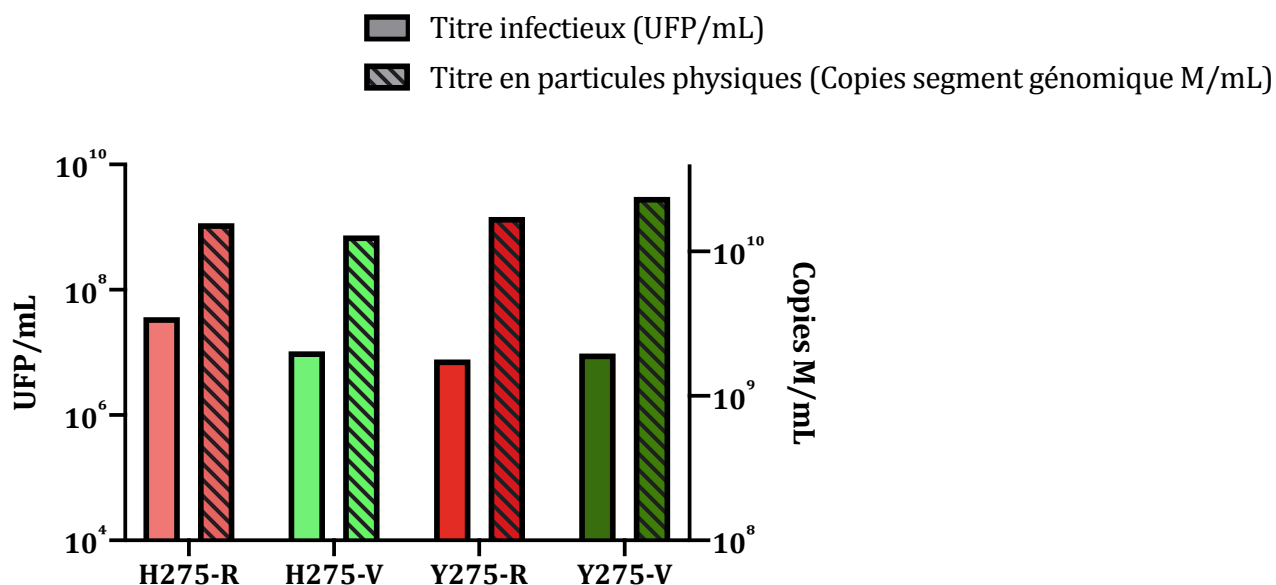


Figure 22 – Comparaison du titre infectieux et du titre en particules physiques

Le titre infectieux a été déterminé par la méthode de titrage en plaques de lyse et est exprimé en unité formant plaque (UFP)/mL. Le titre en particules physiques est exprimé en nombre de copies du segment M par mL déterminé par RT-qPCR.

1.3.2. Potentiel de multiplication

La sensibilité de différentes lignées cellulaires à l'infection par les virus recombinants fluorescents a été mesurée afin de pouvoir utiliser une lignée cellulaire plus physiologique et moins adhérente – contrainte technique en cytométrie en flux – que les cellules MDCK lors des expériences. Des lignées cellulaires épithéliales ou fibroblastiques provenant de l'appareil respiratoire profond humain ont été utilisées (A549, BCI-NS1, CALU-3, IMR-90 et NCI-H292) en parallèle des cellules de rein de chien exprimant à leur surface un ratio en AS branchés en $\alpha 2,3/\alpha 2,6$ positif (MDCK) ou négatif (MDCK-SIAT1). Les cellules ont été infectées avec une MOI de 3 UFP/cellule pendant 24 h et 36 h puis la fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux. Parmi les lignées cellulaires testées, les MDCK-SIAT1 sont les cellules présentant la plus forte sensibilité d'infection à 24 h et 36 h post-infection (figure 23). A 24 h post-infection, le pourcentage de fluorescence observé pour les lignées A549, BCI-NS1.1, CALU-3, IMR-90 et NCI-H292 infectées par les quatre virus avec une MOI de 3 a été estimé comme trop faible pour que ces cellules puissent être utilisées lors d'expériences de co-infections (données non montrées). Les lignées BCI-NS1.1 et CALU-3 ont également été infectées durant 36 h à la même MOI et le pourcentage de positivité observé est également trop faible (données non présentées).

Toujours avec l'objectif d'utiliser une lignée cellulaire plus physiologique, nous avons produit et caractérisé une lignée cellulaire stable issue de cellules alvéolaires

humaines A549 et exprimant à la surface un ratio entre acides sialiques branchés en $\alpha 2,3$ et en $\alpha 2,6$ similaires aux cellules MDCK-SIAT1, en faveur des branchements en $\alpha 2,6$. Cette majorité de branchements en $\alpha 2,6$ est plus représentatif des voies aériennes supérieures chez l'Homme. Brièvement, des cellules A549 ont été transfectées avec un plasmide possédant la séquence du gène ST6GAL1 permettant l'expression de la Beta-Galactoside Alpha-2,6-Sialyltransferase 1. Les cellules ont ensuite été cultivées sous pression de sélection antibiotique. Plusieurs clones cellulaires ont été sélectionnés par dilutions limites et ont été amplifiés. La proportion d'acides sialiques branchés en $\alpha 2,3$ et en $\alpha 2,6$ a été mesurée par cytométrie en flux suite à un marquage spécifique avec des lectines *Maackia amurensis* (MAA) et *Sambucus nigra* (SNA) se fixant respectivement aux AS branchés en $\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$ (données non présentées). Le marquage a été effectué conformément au protocole présenté en [262]. Ces cellules nommées A549-SIAT1 n'ont pas permis d'obtenir des pourcentages de fluorescence suffisant à 24 h et 36 h post-infection pour pouvoir être utilisées (figure 23). Les cellules MDCK-SIAT1 ont donc été utilisées pour les expériences de co-infections avec les virus dont la balance HA/NA est modifiée.

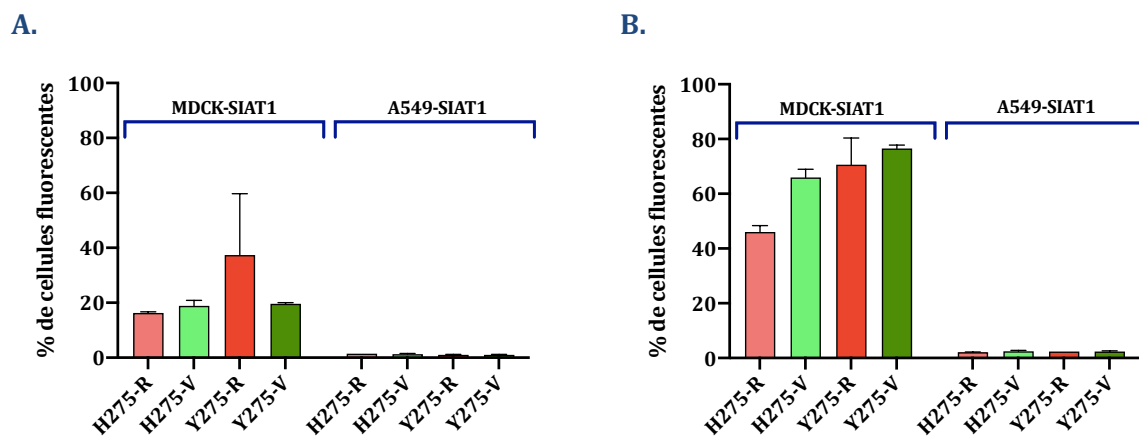


Figure 23 – Sensibilité cellulaire à l'infection

Des cellules MDCK-SIAT1 et A549-SIAT1 ont été infectées pendant 24 h (A.) ou 36 h (B.) à une MOI de 3 UFP/cellule par les virus H275-R, H275-V, Y275-R et Y275-V puis la fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux. Les valeurs sont issues de la moyenne de deux duplicats biologiques obtenus pour chaque virus et à chaque temps (\pm écart-type).

Pour utiliser les virus recombinants dans des conditions équivalentes de fluorescence, la dose infectieuse de fluorescence x% (DIFx) a été déterminée. Pour cela une même quantité de cellules MDCK-SIAT1 a été infectée par des dilutions croissantes de raison 2 de chaque virus et la fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux 24 h post-infection. Le facteur de dilution à appliquer afin d'obtenir x% de cellules positives par cytométrie en flux a été déterminé. Pour les expériences avec les virus permettant de

mesurer l'effet de la balance HA/NA sur la fréquence de co-infections, la DIF20 et la DIF40 ont été déterminées. Les moyennes des DIF20 et DIF40 obtenue en duplicats pour chaque point lors de deux expériences indépendantes sont présentées sur la figure 24. Les valeurs brutes de DIF20 et DIF40 varient entre les expériences mais le ratio observé au sein des couples est constant entre les expériences.

Pour le couple de virus H275, la DIF20 ou la DIF40 obtenue pour le virus H275-V est 1,35 fois supérieure à celle du virus H275-R. Afin d'utiliser les deux virus dans les mêmes conditions de fluorescence, il faut appliquer au virus H275-V un facteur de dilution 1,35 fois supérieur à celui appliqué au virus H275-R. Pour le couple Y275, il faut appliquer au virus Y275-R un facteur de dilution 1,35 fois supérieur au virus Y275-V.

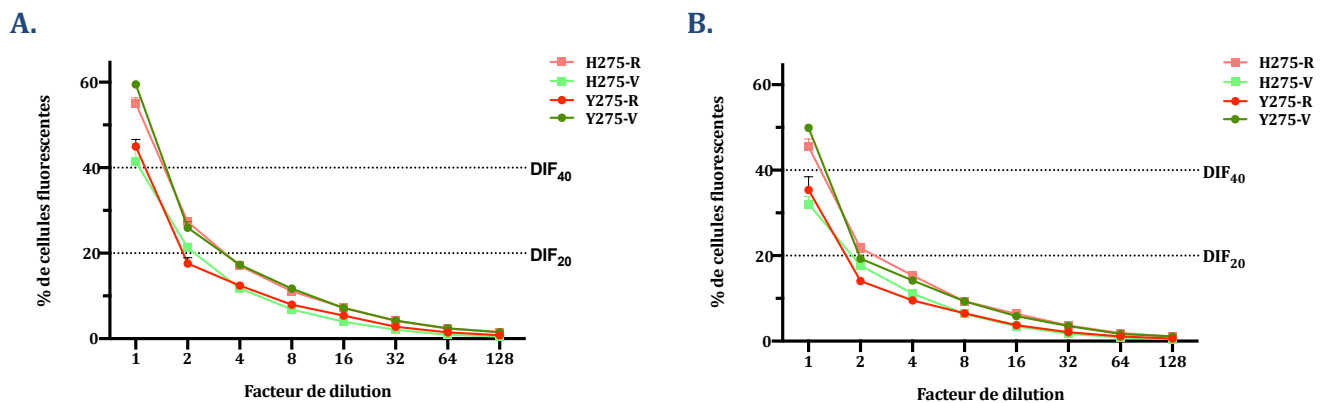


Figure 24 – Détermination de la dose infectieuse de fluorescence

Chacun des quatre virus H275-R, H275-Y, Y275-R, Y275-V a été dilué en série de raison 2. Des cellules MDCK-SIAT1 ont été infectées par chacune de ces dilutions et la fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux 24 h post-infection. Chaque point représente la moyenne obtenue (\pm écart-type) de la proportion de cellule positive en fluorescence en fonction du facteur de dilution appliqué pour l'expérience 1 (A.) et 2 (B.). Les lignes horizontales pointillées représentent 20% et 40% de cellules fluorescentes.

1.3.3. Cinétique de répliation

La cinétique de croissance des 4 virus a été déterminée sur cellules MDCK-SIAT1 afin de comparer leurs capacités répliatives (figure 25). Les cellules ont été infectées à une MOI de 10^{-3} UFP/cellule, et les surnageants prélevés à 24 h, 48 h, 72 h et 96 h ont été titrés par la méthode des plages de lyse. Une augmentation du titre est observée jusqu'à 48 h avant de décroître jusqu'à 96 h. Le titre maximal observé pour tous les virus est à 48 h et de l'ordre de 10^7 UFP/mL. Les quatre virus ont une cinétique de répliation comparable.

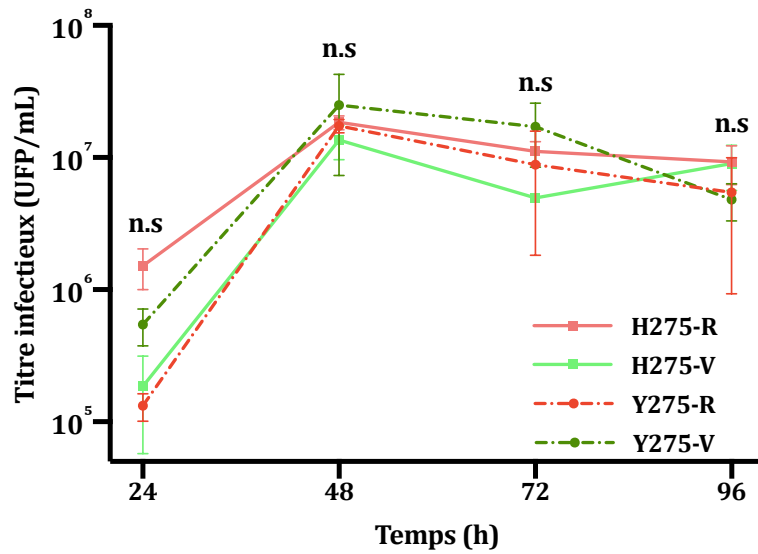


Figure 25 – Cinétique de réplication des virus H275-R, H275-Y, Y275-R, Y275-V sur cellules MDCK-SIAT1

Une cinétique de réplication à faible MOI (10^{-3}) a été réalisée sur cellules MDCK-SIAT1 pour les virus H275-R, H275-V, Y275-R et Y275-V. Les cellules ont été infectées à une MOI de 10^{-3} UFP/cellule, et les surnageants prélevés à 24 h, 48 h, 72 h et 96 h ont été titrés par la méthode des plages de lyse. Les points représentent la moyenne de duplicats biologiques (\pm écart-type). Test ANOVA two-way : comparaison multiple, normalisation avec test de Tukay, $\alpha = 0,05$, n.s = non significative. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism.

2. Mesure de l'impact de la balance HA/NA sur la fréquence de co-infections

2.1. Sélection des données exploitables

Afin de mesurer la fréquence de co-infections entre les deux couples de virus, des cellules MDCK-SIAT1 ont été co-infectées durant 48 h par un mélange équiproportionnel composé des deux virus du couple H275 ou des deux virus du couple Y275. La progénie a ensuite été récoltée. Cette progénie a été diluée en série de raison 2 (d'un facteur 1 à 128) et ces dilutions ont été utilisées pour infecter en cycle unique de réplication des cellules MDCK-SIAT1. La fluorescence a ensuite été mesurée par cytométrie en flux. L'expérience a été réalisée trois fois de manière indépendante. Les deux premières expériences ont été réalisées en duplicats et la troisième expérience en triplicats. Des dilutions en série ont été réalisées dans le but d'obtenir $P_0 + P_1 + P_2 + P_3 \geq 0,997$, c'est-à-dire que la somme des proportions de cellules non infectées ou infectées par 1, 2 ou 3 unités infectieuses représentent *a minima* 99,7% des événements d'infections. Les dilutions les plus faibles ont donc été exclues lors de l'analyse et seules les dilutions permettant d'obtenir 99,7% des événements d'infections ont été conservées pour chacun des échantillons (figure 26). Les dilutions utilisées sont variables d'une expérience à l'autre ; les données sont présentées dans le tableau 3 et une illustration des données calculées obtenues des proportions R, V et RV pour un réplicat du couple H275 est présenté en figure 26. De manière générale, les dilutions les plus fortes ont été utilisées.

Tableau 3- Facteurs de dilutions utilisés pour la sélection des données

Couple\réplicat	Expérience 1		Expérience 2		Expérience 3		
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7
H275	4-128*	4-128	16-128	16-128	16-128	16-128	16-128
Y275	4-128	8-128	16-128	16-128	32-128	32-128	32-128

* Les facteurs de dilutions utilisés afin de respecter $P_0 + P_1 + P_2 + P_3 \geq 0,997$ sont présentés sous la forme « facteur le plus faible - facteur le plus fort ».

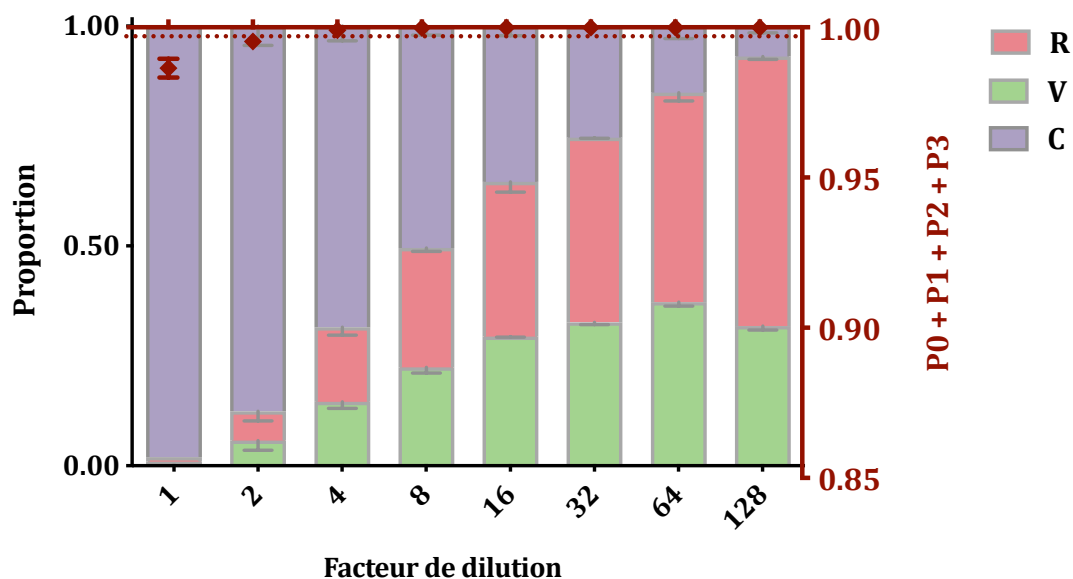


Figure 26 – Répartition entre les proportions de cellules infectées ou co-infectées en fonction de la dilution appliquée

Axe gauche : chaque barre représente, parmi les cellules infectées, la proportion de cellules infectées seulement par une particule virale permettant l'expression de mCherry (R), GFP (V) ou co-infectées par au moins deux particules virales différentes (C) pour chacun des facteurs de dilution appliqué.

Axe droite : Chaque losange représente la proportion de cellules résultant de la somme des proportions de cellules non infectées (P0) ou infectées par une (P1) ; deux (P2) ou trois (P3) unités infectieuses.

Les données présentées proviennent du réplicat 2 de l'expérience 1 (#2 dans le tableau 3). Les données présentes sur les barres représentent les moyennes des résultats (\pm écart-type).

Afin d'avoir un nombre constant de réplicat pour chaque facteur de dilution, il a été décidé de ne représenter que les facteurs de dilutions 32, 64 et 128 pour le couple Y275 et les dilutions 16, 32, 64 et 128 pour le couple H275.

2.2. Linéarité de $P_{RV_calculée} = f(P_{RV_observée})$

Le modèle probabilistique optimisé permet de calculer la proportion initiale R et V et ainsi de calculer la proportion de chaque unité infectieuse et d'agrégats. Une représentation linéaire de la proportion observée et calculée de cellules exprimant les protéines mCherry et GFP permet de montrer une adéquation entre le modèle et les observations. La proportion observée est représentée par la proportion de cellules mCherry+/GFP+ obtenue par cytométrie en flux et la proportion calculée est déterminée en tenant compte de toutes les unités infectieuses et de toutes les agrégations possibles considérées dans le modèle et permettant l'expression des deux protéines fluorescentes. Les valeurs de $P_{RV_observée}$ et $P_{RV_calculée}$ pour les 4 (H275) ou 3 (Y275) facteurs de dilutions sélectionnés pour chacun des 7 échantillons ont été représentées (figure 27). La relative linéarité observée permet l'utilisation des données calculées de R et V afin de déterminer

la proportion de co-infections dans chaque échantillon dilué sélectionné. Les données de R et V sont également utilisées pour déterminer chaque type d'unités infectieuses et chaque type d'agrégats intégré dans le modèle optimisé.

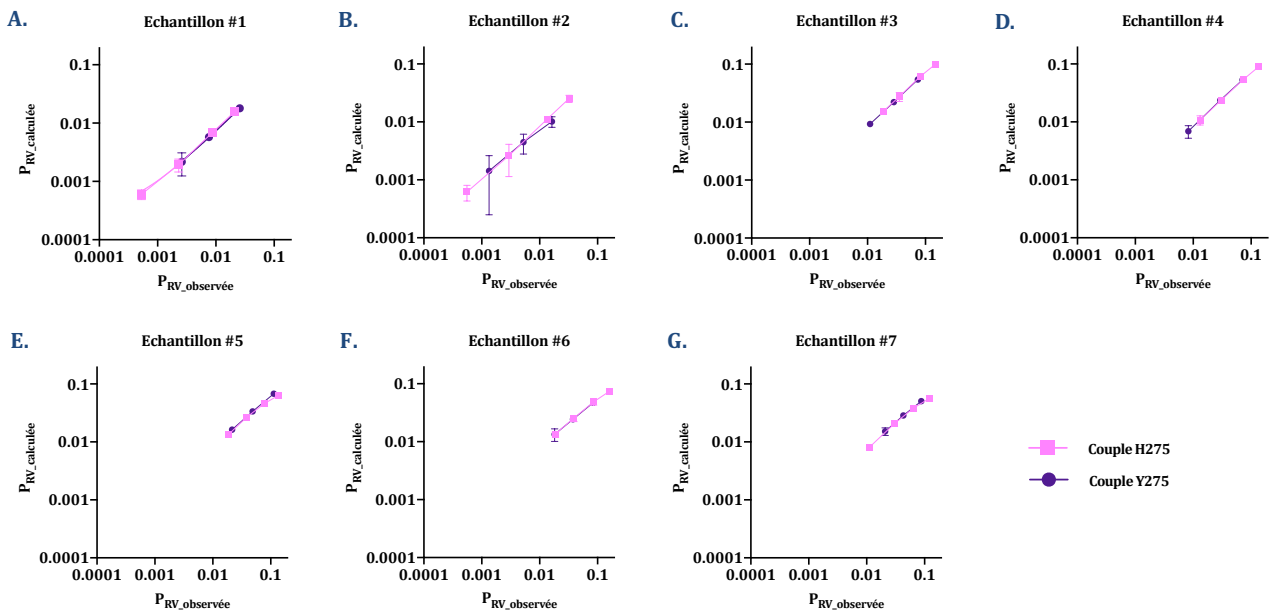


Figure 27 – Évolution de la proportion de cellules positives pour mCherry et GFP calculée par le modèle en fonction de la proportion observée par cytométrie en flux

Pour chaque échantillon, 4 facteurs de dilutions pour le couple H275 et 3 pour le couple Y275 ont été sélectionnés car répondant au critère $P_0 + P_1 + P_2 + P_3 \geq 0,997$. Pour chacun de ces échantillons et pour chacune des dilutions, la proportion, calculée à l'aide du modèle numérique optimisé, de cellules exprimant les protéines mCherry et GFP a été déterminée. Cette proportion notée $P_{RV_calculée}$ a été comparée à la proportion de cellules mCherry+/GFP+ obtenue par cytométrie en flux et notée $P_{RV_observée}$. Chaque point représente la moyenne de deux réplicats technique pour chaque réplicat biologique (\pm écart-type).

2.3. Évolution de la fréquence de co-infections

La proportion de co-infections pour chaque condition a été déterminée comme étant le résultat de $C = 1 - R - V$. Pour chaque condition, la MOI définie comme le nombre d'unités infectieuses disponibles par cellule a été déterminée à partir de la proportion de cellules non infectées de la manière suivante : $MOI = -\ln P_0$. La fréquence calculée de co-infections a donc ensuite été comparée en fonction de la MOI déterminée. Les données sont présentées en figure 28. La fréquence de co-infections C observée pour les deux couples H275 et Y275 ne semble pas significativement différente. Pour confirmer ce résultat, une régression linéaire de chacune des droites en utilisant la méthode des moindres carrés a été réalisée. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4. Les coefficients directeurs de chaque droite ont été moyennés au sein de chaque expérience

pour chacun des membres du couple. La différence observée entre les coefficients directeurs pour les couples H275 et Y275 au sein des trois expériences est faible. Cependant le couple Y275 semble graphiquement présenter légèrement plus de co-infections que le couple H275. Les données ne sont pas statistiquement différentes mais s'assimilent plutôt à une tendance. Cette tendance semble montrer que l'augmentation de la MOI permet d'augmenter la différence entre les deux couples en faveur du couple Y275. Cette tendance à l'augmentation de la fréquence de co-infections pourrait s'expliquer par une plus grande formation d'agrégats grâce à la différence dans la balance HA/NA.

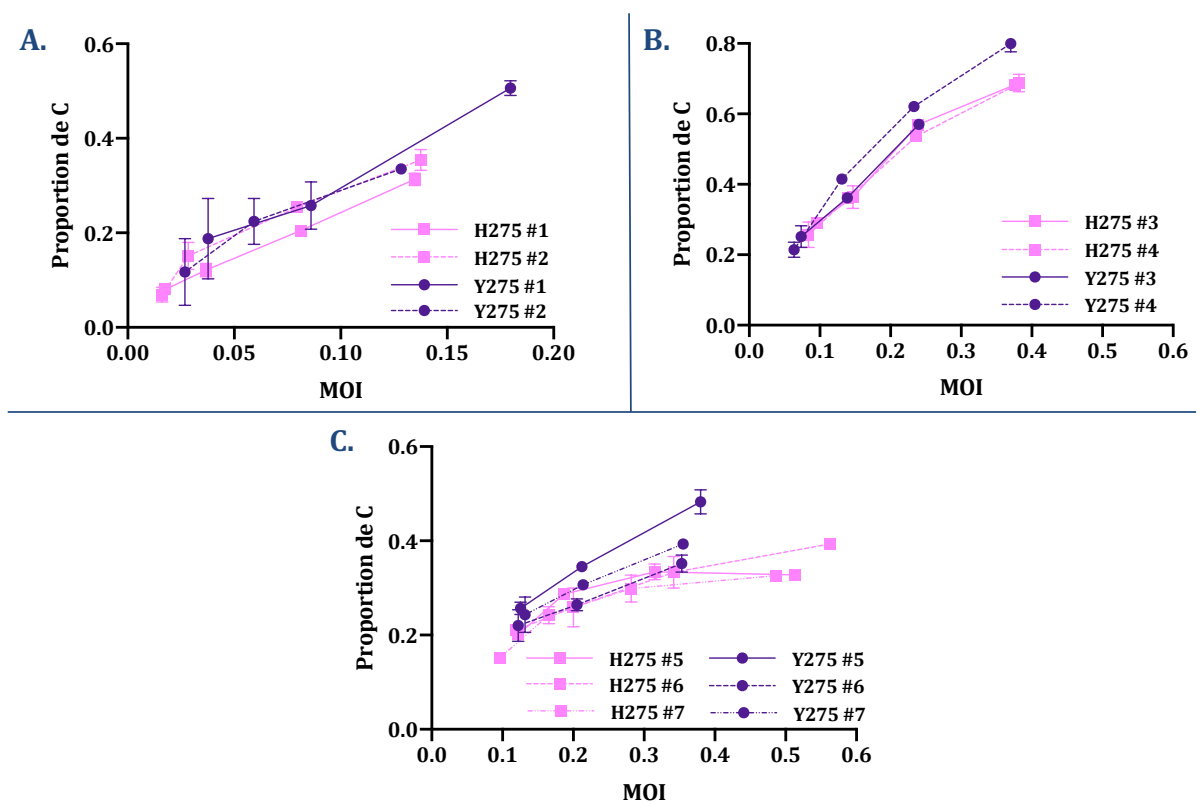


Figure 28 – Évolution de la proportion de cellules co-infectées (C) en fonction de la MOI lors de la modification de la balance HA/NA

Pour chaque couple H275 en rose et Y275 en violet, l'évolution de la proportion de co-infections en fonction de la MOI a été représentée. Les données ont été séparées par expériences : **A.** expérience 1, **B.** expérience 2 et **C.** expérience 3. Chaque point représente la moyenne des duplicats (\pm écart-type) pour chaque réplicat biologique. Sur l'ensemble de la figure, 7 réplicats biologiques sont présentés.

Tableau 4 – Paramètres et résultats de régression non linéaire $C = f(\text{MOI})$

Les paramètres obtenus suite à la régression non linéaire et à la validation par la méthode des moindres carrés sont présentés ici.

Paramètre/N°	Expérience 1		Expérience 2		Expérience 3	
	H275	Y275	H275	Y275	H275	Y275
Coefficient directeur	2,083	2,1785	1,4365	1,8985	0,3799	0,7051
Ordonnée à l'origine	0,05512	0,08147	0,163	0,12155	0,1747	0,1532
R ²	0,96815	0,8667	0,9568	0,9768	0,7575	0,9432
Somme des carrés des écarts à la moyenne	0,002881	0,010594	0,008928	0,007287	0,007050	0,001448
Erreur-type Estimation (SE)	0,019113	0,051365	0,03818	0,032445	0,03509	0,018962

Les données obtenues avec ce système virus/cellule ne semblent pas montrer de différences significatives entre les deux couples H275 et Y275. La différence dans la balance HA/NA de ce système ne permet donc pas de mettre en évidence une différence dans la fréquence de co-infections pour les virus influenza A.

III. Co-infections hétérotypiques entre IAV et IBV

Les co-infections entre les virus influenza A et B ne sont que peu décrites comme présenté dans l'introduction en II.4.3. Un des facteurs pouvant permettre d'expliquer cette situation est l'exclusion de super-infections. Afin de tester cette hypothèse et de compléter les données disponibles dans la littérature, nous nous sommes intéressés aux effets des co-infections hétérotypiques entre les virus influenza A et B.

1. Production et caractérisation des virus IAV et IBV recombinants fluorescents

Pour mesurer les co-infections hétérotypiques entre IAV et IBV, nous avons produit et caractérisé un couple de virus recombinants fluorescents IAV et un couple de virus recombinants fluorescents IBV. Chaque partenaire du couple exprime soit la protéine mCherry soit la protéine GFP. Comme pour les virus utilisés en II, la protéine fluorescente est exprimée à partir du segment 1 indépendamment de la protéine PB2 grâce à une séparation co-translationnelle possible par la présence du site de clivage 2A.

1.1. Production

Pour les virus influenza A la souche A/WSN/33 a été utilisée et pour les virus influenza B, la souche B/Brisbane/60/2008 (lignage Victoria) a été utilisée. Seul le segment 1 de chaque souche a été modifié afin d'insérer une séquence codant pour une protéine fluorescente. Les constructions pour IBV n'étant pas disponibles au laboratoire, le *modus operandi* adapté à partir de la PCR nichée et permettant l'obtention de ces séquences est brièvement résumé. Un gène synthétique codant pour une partie de la séquence du segment 1 des virus IBV dont la partie codant pour l'extrémité C-terminale de PB2 est dégénérée est utilisé. Ce gène est amplifié par PCR afin d'ajouter les séquences correspondant aux sites de restrictions NotI et SpeI en 3'. En parallèle, une PCR est réalisée en utilisant le plasmide de génétique inverse comportant la séquence du segment 1 du virus IBV et une amorce s'hybridant en amont de la région à dupliquer contenant les sites de restriction NotI et SpeI. Les deux produits de PCR précédents ont été mélangés afin d'obtenir, par PCR, un produit contenant une portion de la séquence codant pour la protéine PB2 suivi des 150 nucléotides de la région dégénérée puis de la région non dégénérée. Ces deux dernières régions sont alors séparées par les sites NotI et SpeI. Ce produit de PCR a été cloné dans le plasmide de génétique inverse du segment 1 du virus

IBV. L'insertion du site de clivage 2A et de la séquence codant pour un rapporteur fluorescent (mCherry ou GFP) a été ensuite été réalisée par sous-clonage entre les sites NotI et SpeI du plasmide de génétique inverse obtenu.

Les virus ont été produits par génétique inverse puis ont été amplifiés sur cellules MDCK. Pour éviter une trop grande hétérogénéité au sein des stocks viraux, un isolement de plages de lyse sur gélose suivi d'une amplification sur MDCK ont été effectués pour chaque stock viral. Seules les populations amplifiées présentant un titre infectieux, un titre en particules physiques et un potentiel fluorescent jugés suffisants, ainsi qu'une séquence génomique validée par séquençage ont été retenues.

1.2. **Caractérisation du potentiel infectieux des virus obtenus**

a. Titre infectieux, titre en particules physiques et ratio

Les virus IAV et IBV recombinants fluorescents ont été caractérisés et les données sont résumées dans le tableau 5.

Tableau 5 – Caractéristiques des virus IAV et IBV recombinants fluorescents

Virus	Titre infectieux (UFP/mL)	Titre en particules physiques (Copies/mL)	Ratio particules physiques/infectieuses
IAV-mCherry	$8,75 \times 10^7$	$1,48 \times 10^{10}$	$1,69 \times 10^2$
IAV-GFP	$1,18 \times 10^8$	$1,91 \times 10^{10}$	$1,62 \times 10^2$
IBV-mCherry	$3,75 \times 10^6$	$6,07 \times 10^9$	$1,62 \times 10^3$

Les virus IAV et IBV ont été titrés par la méthode de titrage en plages de lyse (Tableau 5, figure 29). Il n'a cependant pas été possible d'obtenir le virus fluorescent IBV exprimant la protéine GFP. Aucune des trois tentatives de génétique inverse n'a aboutie. Le titre viral obtenu pour les virus IAV-mCherry et IAV-GFP est relativement similaire, de l'ordre de 10^8 UFP/mL. Le titre du stock IBV présente un titre viral environ 30 fois inférieur au virus IAV.

Les titres en particules physiques des virus ont été obtenus par RT-qPCR du segment génomique codant pour la protéine M (segment 7) pour les virus IAV et du segment génomique codant pour la protéine HA (segment 5) pour les virus IBV. Les titres

en particules physiques obtenus pour les virus IAV sont similaires. Le virus IBV-mCherry présente un titre en particules physiques 3,15 fois inférieur au titre en particules physiques du virus IAV-GFP.

Le nombre de particules physiques par particule infectieuse présenté dans le tableau 5 est similaire entre les virus IAV et est inférieur par 10 fois à celui observé pour le virus IBV-mCherry. Le nombre de particules physiques par particule infectieuse est donc plus important pour le virus IBV-mCherry.

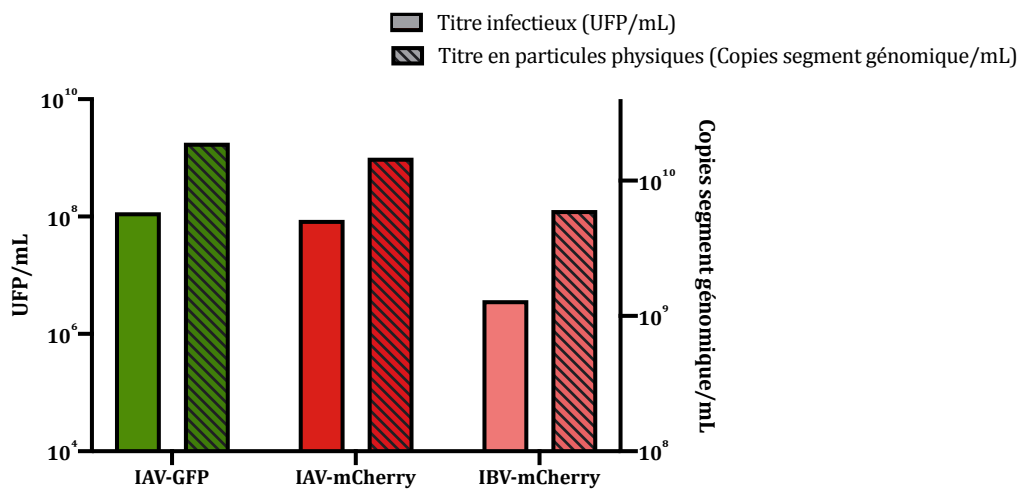


Figure 29 – Titre infectieux et en particules physiques des virus IAV et IBV recombinants fluorescents

Le titre infectieux a été déterminé par la méthode de titrage en plages de lyse et est exprimé en unité formant plaque (UFP)/mL. Le titre physique est exprimé en nombre de copies du segment génomique viral M pour le virus IAV et HA pour le virus IBV par mL déterminé par RT-qPCR.

b. Potentiel de multiplication

Afin d'utiliser les virus IAV-GFP et IBV-mCherry dans les expériences de co-infections, les capacités répliquatives des deux virus ont été mesurées sur cellules MDCK et A549. En parallèle, une cinétique de répliquaion a été réalisée sur le virus IBV-WT afin de vérifier que l'insertion de la séquence codant pour mCherry n'affecte pas les capacités répliquatives du virus IBV-mCherry. Les cinétiques de répliquaion obtenues sur cellules MDCK sont présentées figure 30. Sur cellules MDCK, la cinétique de croissance à MOI contrôlée (10^{-3} UFP/cellule) ne montre pas de différences statistiquement significatives entre le virus IBV-WT et IBV-mCherry ni entre le virus IBV-mCherry et IAV-GFP. La cinétique de croissance observée pour le virus IBV-mCherry sur cellules A549 est presque nulle, avec un titre viral de 250 UFP/mL après 72 h d'incubation contre $1,88 \times 10^6$ UFP/mL pour le virus IAV-GFP.

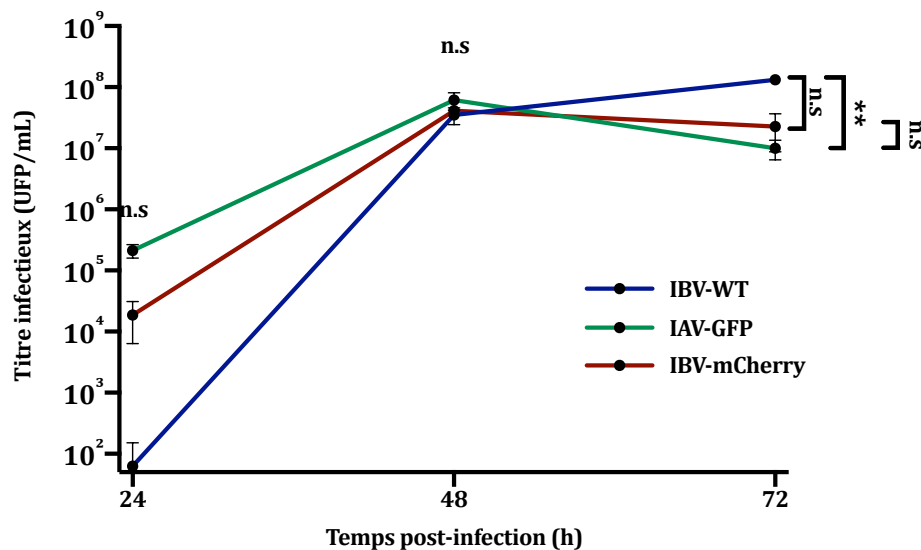


Figure 30 - Cinétique de répllication des virus IAV-GFP et IBV-mCherry et IBV-WT sur cellules MDCK

Une cinétique de répllication a été réalisée sur cellules MDCK pour les virus IAV-GFP, IBV-mCherry et IBV-WT. Les cellules ont été infectées à une MOI de 10^{-3} UFP/cellule, et les surnageants prélevés à 24 h, 48 h et 72 h ont été titrés par la méthode des plages de lyse. Les points représentent la moyenne de duplicats biologiques (\pm écarts-type). Test ANOVA two-way : comparaison multiple, test de Tukay, $\alpha = 0,05$, **: p-value = 0,0014, n.s = non significative. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism.

La sensibilité à l'infection par le virus IBV-mCherry des cellules A549 a été mesurée et comparée à celle du virus IAV-GFP. Pour cela des cellules A549 ont été infectées avec une MOI de 3 UFP/cellule et les cellules ont été lysées à 3h, 6 h puis 9h post-infection. L'expression de la NP a été mise en évidence par la réalisation d'un Western-blot avec un anticorps dirigé contre la NP du virus IAV ou IBV (figure 31). L'expression de la NP est visible dès 6h post-infection pour les deux virus dans les cellules MDCK et A549. L'expression de la NP pour chacun des virus est très forte 9h post-infection en comparaison aux autre temps testés. Cette observation est identique pour les deux lignées cellulaires testées. Il est à noter que les cellules A549 sont également infectées par les virus IBV-mCherry mais la production virale à 24 h, 48 h et 72 h sur cellules A549 est très faible en comparaison des cellules MDCK. Cependant notre système de mesure des évènements de co-infections fonctionne en conditions de cycle unique d'infection et ne nécessite pas la réalisation d'un cycle complet pour permettre la détection de l'infection des cellules. Les cellules A549, plus physiologiques que les cellules MDCK, ont donc été utilisées dans le système de mesure des évènements de co-infections hétérotypiques.

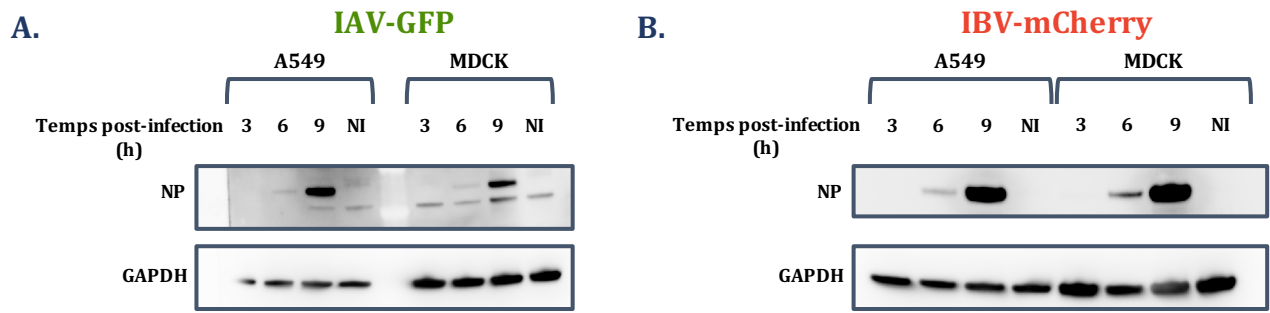


Figure 31 – Expression de la nucléoprotéine virale au cours du temps

Des cellules A549 ou MDCK ont été infectées avec le virus IAV-GFP (A.) ou IBV-mCherry (B.) à une MOI de 3 UFP/cellule et les cellules ont été lysées à 3 h, 6 h ou 9 h post-infection. Un Western-blot a été réalisé en utilisant un anticorps dirigé contre la nucléoprotéine de IAV (A.) ou IBV (B.) en parallèle d'un anticorps dirigé contre la GAPDH. NI : non infecté ; NP : nucléoprotéine.

2. Système de détection des co-infections hétérotypiques entre IAV et IBV

Des cellules A549 ont été infectées soit avec un mélange composé du virus IAV-GFP et IBV-mCherry (figure 32A) avec une MOI de 3 UFP/cellule pour chaque virus soit infectées par un premier virus de manière synchrone à une MOI de 3 UFP/cellule puis par l'autre virus 1 h post-infection (figure 32B et 32C). Les cellules ont ensuite été fixées 6h après le début de l'infection par le dernier virus ajouté et la fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux. En parallèle de ces infections, des contrôles ont été effectués en infectant les cellules dans les mêmes conditions sans ajout du premier ou du second virus.

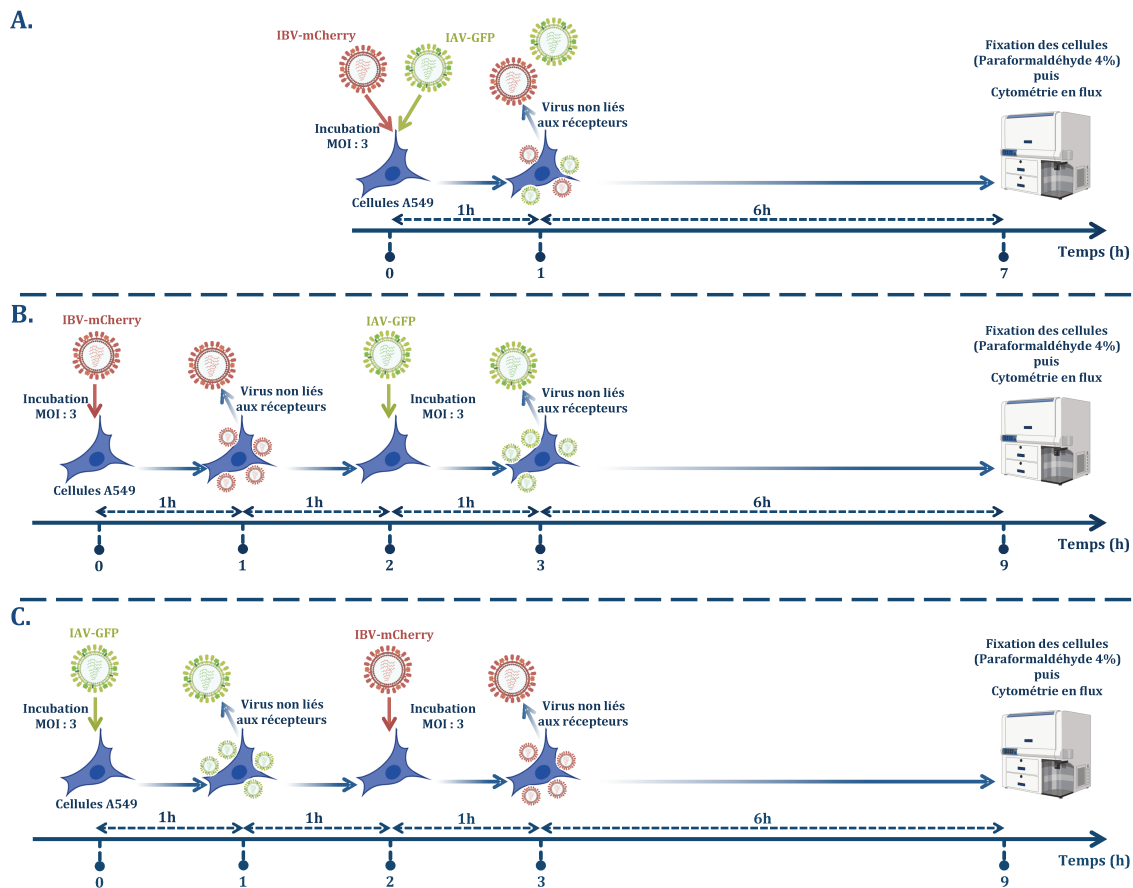


Figure 32 – Système de mesure des co-infections hétérotypiques

A. Des cellules A549 sont incubées avec un mélange de IAV-GFP et IBV-mCherry à une MOI de 3 UFP/cellule pour chaque virus. Les virus non liés sont retirés par lavage après 1 h de synchronisation de l'infection à 4°C. Du milieu de culture est ajouté et les cellules sont placées durant 6 h à 35°C. Une fixation au paraformaldéhyde 4% est réalisée et la fluorescence pour mCherry et/ou GFP est mesurée par cytométrie en flux. **B.** et **C.** Des cellules A549 sont mises en présence d'une suspension de virus IBV-mCherry (**B.**) ou IAV-GFP (**C.**) à une MOI de 3 UFP/cellule puis les virions excédentaires non liés sont retirés par lavage après 1 h de synchronisation de l'infection à 4°C. Les cellules sont incubées 1 h à 35°C puis sont exposées durant 1 h à 35°C à une suspension virale à MOI 3 UFP/cellule du virus IAV-GFP (**B.**) ou IBV-mCherry (**C.**). Les virions excédentaires non liés sont retirés par lavage puis les cellules sont incubées 6h à 35°C avant d'être fixées au paraformaldéhyde 4%. La fluorescence pour mCherry et/ou GFP est mesurée par cytométrie en flux. Certains éléments de la figure proviennent de BioRender.com et sont publiés après accord.

2.1. Effet de l'infection par les virus influenza B sur les virus influenza A lors de co-infections

La proportion de cellules GFP+ observée par cytométrie en flux lors de l'infection par le virus IAV-GFP est très fortement réduite lors de la co-infection par le virus IBV-mCherry (figure 33, histogrammes verts, comparaison barres hachurées et non hachurées). Lorsque le virus IBV-mCherry est ajouté après le virus IAV-GFP, le pourcentage de cellules GFP+ est réduit d'un facteur 4,8 (figure 33C, moyenne des trois expériences, p-value < 0,0001). Lorsque le virus IBV-mCherry est ajouté avant le virus IAV-GFP le facteur de réduction est de 69,9 (figure 33B, moyenne des trois expériences, p-value < 0,0001) et lorsque les deux virus sont ajoutés simultanément le facteur de réduction est de 42,4 (figure 33A, moyenne des trois expériences, p-value < 0,0001).

L'infection par le virus IBV-mCherry, qu'elle soit simultanée, antérieure ou postérieure à celle du virus IAV-GFP entraîne une diminution du nombre de cellules GFP+ mais la réduction est plus forte d'un facteur 8,8 à 14,6 si l'infection par IBV-GFP est simultanée ou antérieure à IAV-GFP, respectivement. L'infection par le virus IBV semble donc impacter négativement l'infection par le virus IAV. Ces résultats sont en accord avec une publication de 2012 montrant que l'infection par les virus IBV inhibe l'infection par les virus IAV [246].

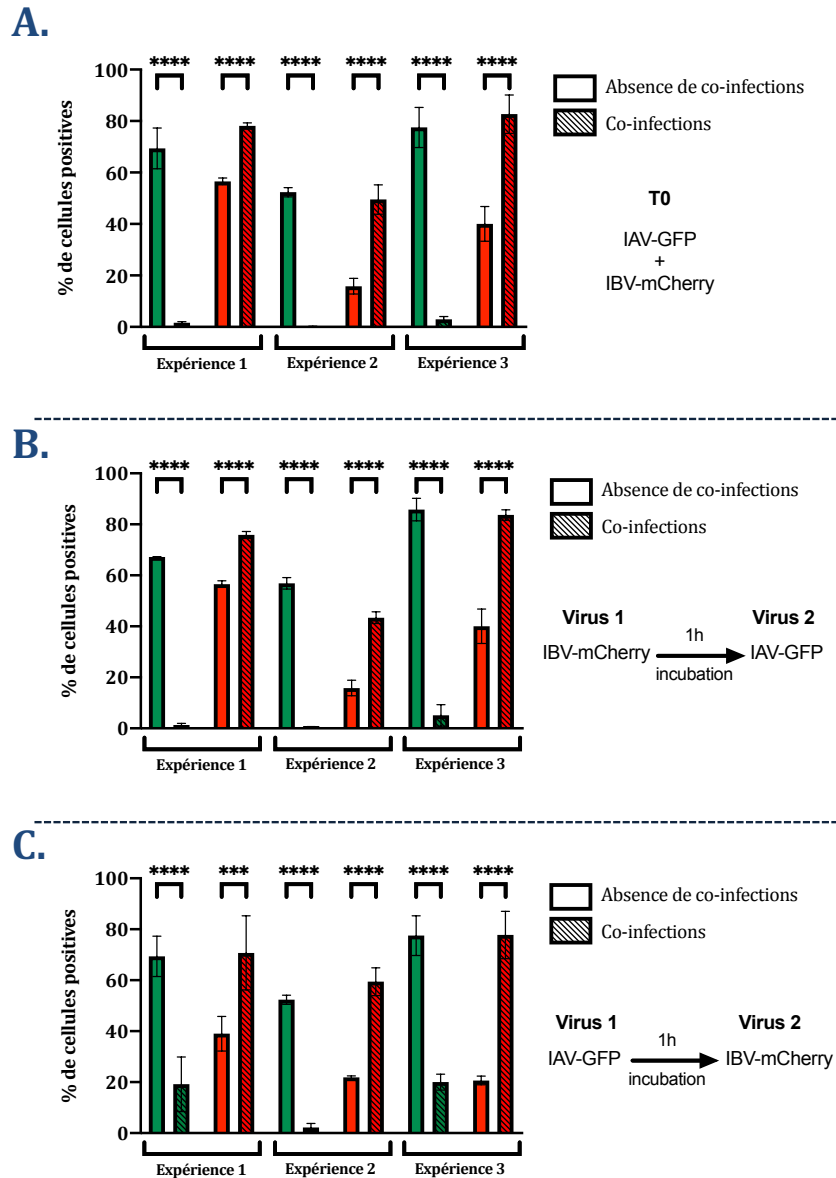


Figure 33 – Co-infections hétérotypiques entre les virus influenza A et B

Des cellules A549 ont été co-infectées par les virus IAV-GFP et IBV-mCherry puis 6 h post-infection par le dernier virus ajouté, les cellules ont été fixées et la fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux. Les barres hachurées représentent la proportion de cellules fluorescentes exprimant les protéines GFP en vert et mCherry en rouge lors de co-infections pour chacune des trois expériences réalisées. Les barres pleines représentent la proportion de cellules fluorescentes exprimant les protéines GFP en vert et mCherry en rouge lors de l'infection seule par le virus IAV-GFP ou IBV-mCherry en contrôle pour chacune des trois expériences réalisées. **A.** Co-infection simultanée par les virus IAV-GFP et IBV-mCherry. **B.** Primo-infection par le virus IBV-mCherry puis infection par le virus IAV-GFP 1 h post-infection. **C.** Primo-infection par le virus IAV-GFP puis infection par le virus IBV-mCherry 1 h post-infection. Les barres représentent la moyenne de triplicats biologiques (\pm écart-type). Test ANOVA two-way : comparaison multiple, test de Dunn-Sidak, $\alpha = 0,05$; *** : p-value ajustée = 0,0001 ; **** : p-value ajustée = <0,0001. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism.

2.2. Effet de l'infection par les virus influenza A sur les virus influenza B lors de co-infections

La proportion de cellules positives en cytométrie en flux lors de l'infection par le virus IBV-mCherry est augmentée lors de la co-infection par le virus IAV-GFP (figure 33, histogrammes rouges, comparaison barres hachurées et non hachurées). L'augmentation du nombre de cellules mCherry+ est plus importante lors de l'infection antérieure par le virus IAV-GFP avec un facteur d'augmentation de 2,55 (figure 33C, moyenne des trois expériences, p-value $\leq 0,0001$). Une augmentation par un facteur 1,80 est également observée lors de l'infection à posteriori par le virus IAV-GFP (figure 33B, moyenne des trois expériences, p-value $< 0,0001$) et lors de l'infection concomitante des deux virus avec un facteur d'augmentation de 2,05 (figure 33A, moyenne des trois expériences, p-value $< 0,0001$).

L'infection par le virus IAV-GFP, qu'elle soit simultanée, antérieure ou postérieure à celle du virus IBV-mCherry a pour conséquence l'augmentation du nombre de cellules mCherry+. L'infection par le virus influenza A favorise l'infection par le virus influenza B. Pour la suite des expériences, seule la condition infection initiale par IAV-GFP suivie 1 h après de l'infection par IBV-mCherry a été conservée car c'est la condition donnant lieu à la plus forte augmentation de l'infection par IBV.

2.3. Effet de l'infection par des virus IAV-GFP inactivés aux ultraviolets sur l'infection par les virus IBV

Afin de vérifier si l'augmentation de l'infection par les virus influenza B nécessite des virus influenza A totalement infectieux, le stock viral IAV-GFP a été inactivé aux rayonnements UV. Des cellules A549 ont été co-infectées dans les mêmes conditions que présentées en figure 33C. En parallèle de ces conditions le virus IAV-GFP non exposé aux UV a été utilisé en contrôle. La proportion de cellules mCherry+ en cytométrie en flux a été mesurée et est présentée figure 34.

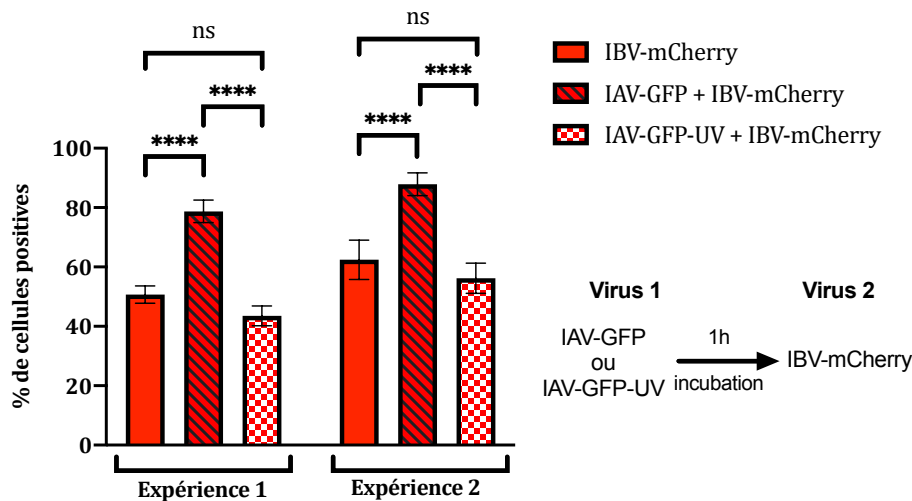


Figure 34 – Effet de l'inactivation aux UV du virus IAV-GFP lors de la co-infection avec IBV-mCherry

Le virus IAV-GFP a été inactivé aux rayonnements ultra-violet (IAV-GFP-UV). Des cellules A549 ont été infectées pendant 1 h par le virus IAV-GFP ou IAV-GFP-UV puis par le virus IBV-mCherry. Les cellules ont été fixées 6 h après l'ajout du dernier virus et la fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux. Les barres pleines représentent la proportion de cellules fluorescentes positives pour mCherry en absence de co-infections. Les barres rouges hachurées représentent la proportion de cellules positives pour mCherry lors de la co-infection entre IAV-GFP et IBV-mCherry. La proportion de cellules positives pour mCherry lors de la co-infection entre IAV-GFP-UV et IBV-mCherry est représentée par des barres à carreaux rouges et blancs. Les barres représentent la moyenne de triplicats biologiques (\pm écart-type). Test ANOVA two-way : comparaison multiple, test de Dunn-Sidak, $\alpha = 0,05$; ns : non significative ; **** : p-value ajustée $\leq 0,0001$. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism.

La facilitation de l'infection du virus IBV-mCherry lors de l'infection préalable par le virus IAV-GFP (figure 34, comparaison barres hachurées et non hachurées) n'est plus observée lorsque le virus IAV-GFP a été inactivé aux UV (figure 34, comparaison barres à carreaux et non hachurées). La différence de cellules mCherry+ observée en absence ou en présence d'infection préalable par le virus IAV-GFP inactivé aux UV n'est pas significativement différente. Cependant, une différence significative est observée entre l'ajout de virus IAV-GFP inactivé aux UV et l'ajout de virus IAV-GFP non inactivé (figure 34, p-value $< 0,0001$). Un virus infectieux est donc nécessaire pour observer un effet facilitateur de IAV-GFP sur l'infection par IBV-mCherry.

2.4. Effet de l'infection par la souche IAV (A/WSN/33) sur l'infection par la souche IBV (B/Brisbane/60/2008)

En complément des données obtenues avec les virus recombinants exprimant un rapporteur fluorescent, des cellules ont été co-infectées dans les mêmes conditions avec les virus correspondants non modifiés, A/WSN/33 et B/Brisbane/60/2008. Les virus ont été produits par génétique inverse puis amplifiés sur cellules MDCK et le titre infectieux a été déterminé par la méthode de plaque de lyse. Les conditions de co-infections

sont les mêmes que celles présentées en III.2 avec une étape supplémentaire de marquage de la nucléoprotéine virale de IAV et IBV à l'aide d'anticorps spécifiques. L'intensité moyenne et médiane de fluorescence pour le virus IBV a été mesurée pour les conditions d'infection ou de co-infections et les données sont présentées sur la figure 35.

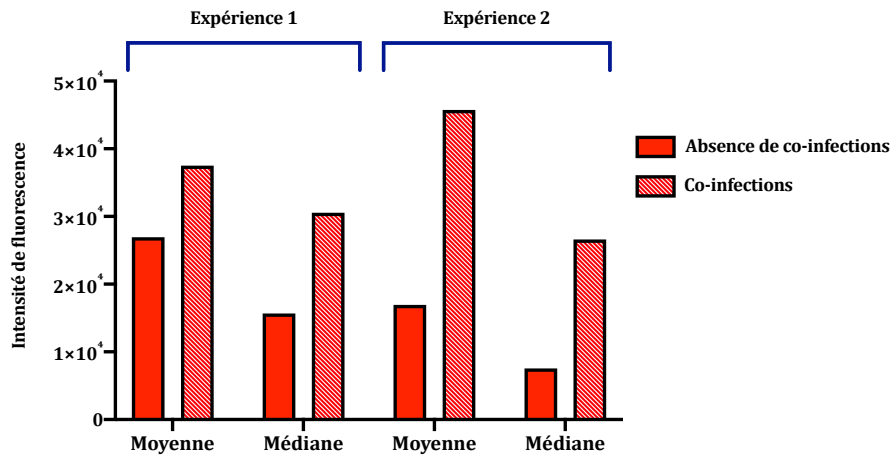


Figure 35 – Intensité moyenne et médiane de fluorescence lors de la co-infection entre IAV et IBV

Des cellules A549 ont été infectées durant 1 h par le virus A/WSN/33 puis co-infectées par le virus B/Brisbane/60/2008 durant 6 h. Les cellules ont ensuite été fixées et un marquage de la nucléoprotéine virale à l'aide d'anticorps spécifiques a été réalisé. La fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux suite à l'ajout d'anticorps secondaires couplés à un fluorochrome. Les barres pleines représentent l'intensité moyenne ou médiane de fluorescence lors de l'infection seule par le virus IBV en contrôle. Les barres hachurées représentent l'intensité moyenne ou médiane de fluorescence lors de la co-infection par le virus IAV et IBV.

Lors de la co-infection entre les virus IAV et IBV, une augmentation de la valeur moyenne et de la valeur médiane de fluorescence correspondant au virus IBV est observée en comparaison à l'absence de co-infections. L'augmentation est plus marquée pour l'expérience 2. Ces observations vont dans le sens des observations précédentes concernant l'augmentation de la proportion de cellules positives en cytométrie en flux lors de la co-infection hétérotypique entre IAV et IBV. L'infection préalable des cellules A549 par un virus IAV semble donc augmenter l'intensité de fluorescence mesurée pour le virus IBV.

2.5. L'entrée virale et les étapes de transcription/réplication du virus IAV sont nécessaires pour la facilitation de l'infection par le virus IBV

Par la suite, nous avons cherché quelles étaient les étapes du cycle viral du virus IAV nécessaires afin d'observer un effet facilitateur de l'infection par IBV. Pour cela nous avons utilisé de l'amantadine, ciblant l'étape d'entrée virale, du pimodivir et de la nucleozin, ciblant les étapes de transcription/réplication. Ces drogues ont une action

spécifique contre les virus IAV et sont donc sans effet sur les virus IBV. Le fond génétique du virus IAV étant la souche A/WSN/33 naturellement résistante à l'amantadine, nous avons produit et caractérisé un virus recombinant permettant l'expression de la protéine GFP et présentant la mutation N31S sur la protéine M2, conférant une sensibilité à l'amantadine. Pour ces expériences, en association avec le virus IAV-N31S-GFP, nous avons utilisé deux stocks de virus IBV-mCherry différents de celui précédemment utilisé (figure 36).

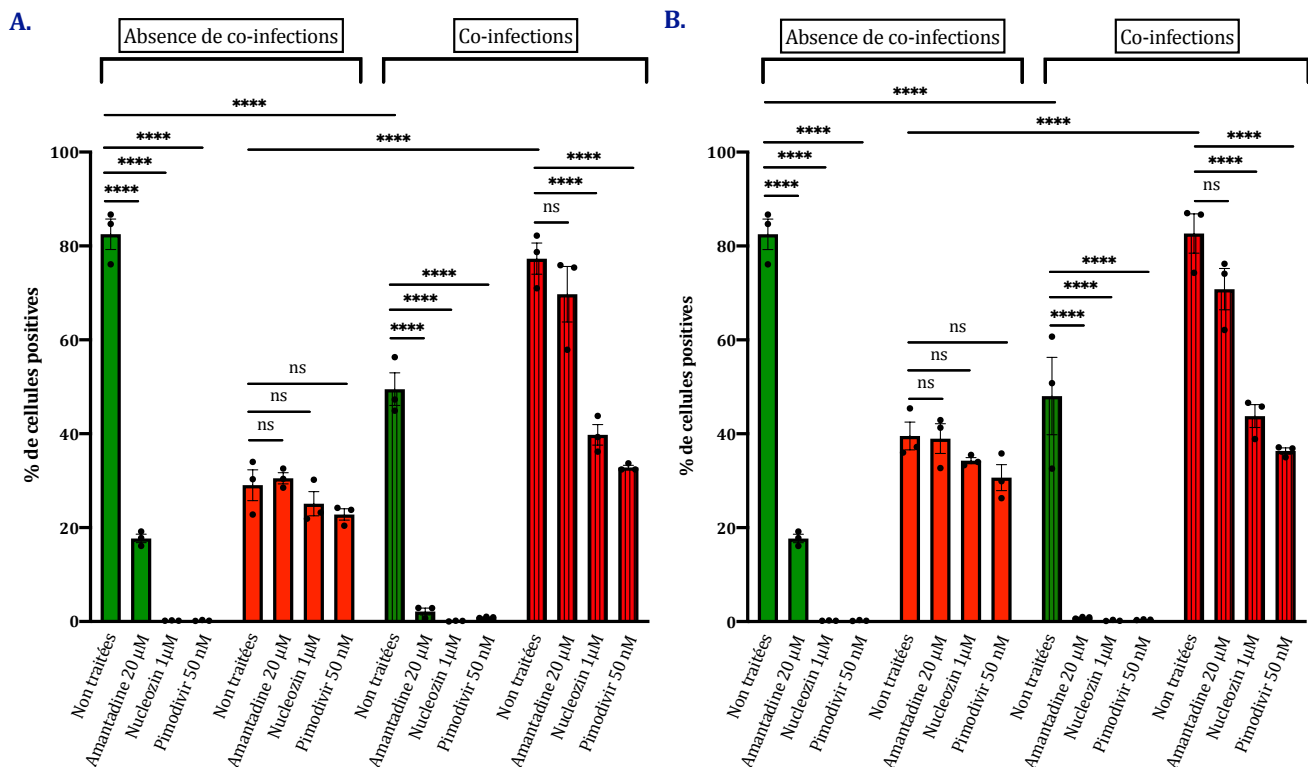


Figure 36 – Effet de l'inhibition de l'entrée virale et de la transcription/réplication virale sur les infections hétérotypiques IAV/IBV

Des cellules A549 ont été infectées par le virus IAV-N31S-GFP puis 1 h après par un virus IBV-mCherry provenant de deux stocks différents (A. et B.) en présence ou en absence de drogues aux concentrations indiquées. Les cellules ont été fixées 6 h après l'ajout du dernier virus et la fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux. Les barres pleines représentent la proportion de cellules fluorescentes en absence de co-infections. Les barres hachurées représentent la proportion de cellules fluorescentes lors de la co-infection entre IAV-N31S-GFP et IBV-mCherry. Les barres représentent la moyenne de triplicats biologiques (\pm écart-type). La figure est représentative de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicats. Test ANOVA Three-way : comparaison multiple, test de Tukay, $\alpha = 0,05$; ns : non significative ; **** : p-value ajustée $\leq 0,0001$. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism.

L'effet précédemment observé de facilitation de l'infection de IBV-mCherry lors de la co-infection par IAV-N31S-GFP est retrouvé ici et de manière similaire pour les deux stocks viraux IBV utilisés. L'effet inhibiteur de l'infection par IAV-GFP lors de la co-infection par IBV-mCherry est également retrouvé mais est moins marqué que précédemment.

Lors de l'utilisation d'amantadine, de pimodivir ou de nucleozin, la fluorescence observée pour le virus IAV-N31S-GFP est fortement réduite (p-value < 0,0001) en comparaison à l'absence de drogue, ce qui confirme la sensibilité du virus aux concentrations utilisées pour les différentes drogues. Un effet moins marqué peut cependant être observé lors de l'utilisation d'amantadine, résultant en un pourcentage de cellules fluorescentes avoisinant les 20%. Comme attendu, les différentes drogues utilisées n'ont pas d'effet sur l'infection par le virus IBV-mCherry.

En présence de pimodivir ou de nucleozin, inhibant, *in fine*, les étapes de transcription/réplication, l'effet facilitateur du virus IAV-N31S-GFP sur l'infection par le virus IBV-mCherry n'est plus observée (p-value < 0,0001). Les étapes de transcription/réplication du virus IAV semblent donc nécessaires afin d'observer un effet sur le virus IBV-mCherry.

Toutefois, lors de l'utilisation d'amantadine, un effet facilitateur est tout de même observé. Nous pouvons cependant observer que l'inhibition de l'entrée des virus IAV-N31S-GFP n'est pas totale, une partie des virions pourrait donc entrer dans les cellules et permettre la facilitation de l'infection par IBV-mCherry.

Nous avons montré que les étapes de transcription/réplication des virus IAV sont nécessaires afin de favoriser l'infection par les virus IBV lors de co-infections. Il serait intéressant d'identifier les mécanismes régissant ce phénomène.

Discussion

Les évènements de co-infections jouent un rôle majeur dans l'évolution des virus influenza en permettant la réalisation d'évènements de complémentations entre génomes défectifs et de réassortiments. Les mécanismes régissant la permission ou l'exclusion de super-infections entre les virus influenza ne sont pas bien caractérisés. Durant ces travaux nous avons optimisé un modèle probabilistique permettant d'estimer la fréquence d'agrégation chez le VSV à partir de la proportion de cellules co-infectées mesurées par cytométrie en flux. Le modèle optimisé a été utilisé afin de mesurer l'impact de la balance hémagglutinine/neuraminidase sur la fréquence de co-infections entre virus influenza et d'estimer le rôle de la fréquence d'agrégation sur la modulation des co-infections. Ce modèle utilise plusieurs couples de virus recombinants qui permettent l'expression d'un rapporteur fluorescent et ainsi la quantification de la fréquence de co-infections par analyse numérique des données obtenues par cytométrie en flux. Dans cette section, nous présenterons les avantages et les limites du modèle optimisé ainsi que les contraintes liées à son utilisation. Nous discuterons également de l'importance de l'identification de facteurs jouant un rôle dans la modulation de la fréquence de co-infections entre les virus influenza. L'utilisation de ce système de mesure n'a pas permis de montrer, dans les conditions fixées, une différence significative de l'impact de la balance hémagglutinine/neuraminidase sur la fréquence de co-infections entre virus influenza A. Cependant le système développé pourra être utilisé pour tester l'effet d'autres facteurs cellulaires et viraux sur la fréquence de co-infections.

Nous avons également montré que l'infection préalable de cellules alvéolaires humaines A549 par un virus influenza A augmentait la sensibilité à l'infection successive par un virus influenza B mais également l'intensité de l'infection. Les données obtenues seront également discutées dans cette section. De possibles éléments mécanistiques régissant les effets observés seront également présentés.

I. Avantages et limites du système de mesure de la fréquence de co-infections chez les virus influenza A par cytométrie en flux

L'utilisation de virus exprimant des rapporteurs fluorescents ou luminescents pour l'étude de l'infection ou de la réplication des virus influenza est fréquemment décrite [270, 271]. Une première approche pouvant être utilisée repose sur l'expression d'un rapporteur fusionné à une protéine virale. Cependant, cette méthode d'expression de rapporteurs peut conduire à une diminution du titre infectieux ou des capacités répliquatives en comparaison au virus de référence, voire à la perte du signal du rapporteur. Une seconde approche repose sur l'insertion de la séquence codant pour un peptide 2A entre la séquence codant une protéine virale, par exemple PB2, et celle du rapporteur fluorescent [91, 271]. L'utilisation du site de séparation co-translationnelle 2A présente l'avantage de ne pas fusionner directement les deux protéines et ainsi de ne pas porter atteinte à la structure ou à la fonction de la protéine PB2 [91]. Le titre viral obtenu pour les virus fluorescents n'est alors pas ou peu différent du virus de référence. Les signaux d'encapsidation des segments génomiques viraux se trouvant sur les régions non codantes et chevauchants sur une partie de la séquence codante, il est nécessaire de dupliquer la fin de la séquence codante en aval de la séquence du rapporteur. De ce fait, la fin de la séquence codant effectivement pour la protéine PB2 (en amont du gène rapporteur) a été modifiée afin de limiter la recombinaison entre les deux séquences dupliquées, et la perte de la séquence codant pour le rapporteur fluorescent. Des constructions similaires impliquant les segments 1, 2 et 3 ont été évaluées et nous avons observé une meilleure stabilité lors de l'insertion de la séquence codant pour un rapporteur dans le segment 1 (données non publiées et [266]). L'absence de diminution du titre infectieux de ces virus pourrait également s'expliquer par l'optimisation de la séquence nucléotidique codant pour le rapporteur fluorescent mCherry ou GFP. En effet, les codons minoritairement utilisés ont été remplacés par un codon synonyme plus utilisé par les virus influenza [268]. Une étude publiée plus récemment suggère que certains codons pourraient stabiliser la fixation de la polymérase et ainsi limiter la perte du rapporteur [272]. Nous avons donc produit et caractérisé des virus recombinants fluorescents dont l'expression du rapporteur n'affecte pas les capacités répliquatives du virus. L'utilisation de ces virus modifiés est cependant limitée par la disponibilité d'un système de génétique inverse. De même, l'insertion de la séquence codant pour un

rappporteur fluorescent peut ne pas être tolérée de manière identique par les différents segments et les différentes souches.

A partir de la proportion de cellules simples et doubles positives pour GFP et mCherry en cytométrie en flux, la proportion réelle de cellules co-infectées a été déterminée numériquement pour chacune des conditions testées. Le modèle initial utilisé par l'équipe de Rafael Sanjuan [6] permet d'estimer la fréquence d'agrégation entre particules virales de VSV à partir de la proportion de cellules infectées. Dans le modèle initial, seules des unités infectieuses composées d'un ou de deux virions ont été considérées et seule l'agrégation par une ou deux unités infectieuses a été considérée. Au total seules trente conditions d'agrégations ont été estimées avec leur modèle. Le VSV présente une morphologie homogène dite en « balle de fusil » contrairement aux virus influenza présentant des particules sphériques, sphéroïdiques et filamenteuses [118, 273]. La forme des filaments pour les virus influenza pouvant atteindre le micromètre contre une centaine de nanomètres pour le VSV, la probabilité de contact entre plusieurs particules virales pourrait alors être plus élevée. La probabilité de former des agrégats pourrait ainsi être augmentée. Ce paramètre a été pris en considération lors de l'optimisation du modèle avec l'inclusion d'unités infectieuses composées d'une, deux ou trois particules virales et d'agrégats composés d'une, deux ou trois unités infectieuses. Le modèle optimisé prend donc en compte cent soixante et onze possibilités d'agrégations entre particules virales. Ce modèle optimisé permet donc de travailler avec des échantillons infectés par un plus grand nombre de particules virales et permet de diminuer la proportion d'agrégats négligés. L'optimisation du modèle afin de tenir compte d'unités infectieuses composées de plus de trois particules virales et d'agrégats composés de plus de trois unités infectieuses serait possible. Lors du calcul de la proportion de cellules non infectées ou infectées par une, deux ou trois unités infectieuses, la somme des proportions $P_0 + P_1 + P_2 + P_3$ était supérieure ou égale à 90% des évènements totaux d'infections pour les échantillons non dilués. Dès les premières dilutions, cette somme atteignait très rapidement plus de 95%, permettant d'atteindre le seuil fixé de 99,7% aux dilutions suivantes. Ainsi, il n'a pas été jugé nécessaire d'implémenter le modèle suite à l'analyse des résultats obtenus puisque nous possédions trois dilutions conservables *a minima* pour chacun des échantillons. Implémenter le modèle pour prendre en compte plus d'évènements aurait pu permettre d'utiliser des échantillons moins dilués.

La fréquence de co-infections est donc estimée à partir d'un modèle numérique utilisant les proportions observées de cellules simples ou doubles positives par cytométrie en flux pour calculer la proportion réelle de cellules co-infectées et estimer la fréquence d'agrégation. L'analyse numérique des données est nécessaire, l'utilisation immédiate de la proportion de cellules doubles positives comme indicateur de la proportion de cellules co-infectées et donc de la fréquence de co-infections n'est pas possible. Cette impossibilité est caractérisée par (i) la présence de cellules pouvant être infectées par plusieurs particules virales permettant l'expression d'un même rapporteur fluorescent et (ii) par une probabilité différente pour une cellule d'être infectée par une particule virale permettant l'expression de mCherry ou une particule virale permettant l'expression de GFP. Pour (i), une cellule infectée par plus d'une particule virale permettant l'expression du même rapporteur fluorescent est comptabilisée comme simple positive tout en étant co-infectée, la fréquence de co-infections est alors sous-estimée. Il est donc nécessaire de déterminer la proportion de chacune des unités infectieuses et de chacun des agrégats par cellule afin de déterminer la proportion réelle de cellules co-infectées. Pour (ii), lors de l'utilisation de deux stocks viraux, si le mélange de virus n'est pas parfaitement équiproportionnel, la probabilité pour une cellule d'être infectée par l'un ou l'autre virus est différente. La probabilité pour une cellule d'être infectée par le virus minoritaire sera moins importante que celle d'être infectée par le virus majoritairement présent. De ce fait, lors de co-infections, l'assimilation de la proportion de cellules doubles positives en cytométrie à la proportion de cellules co-infectées serait erronée. De plus, les virus influenza présentent un grand nombre de particules dites défectives [132]. Ces particules ne permettent pas, seules, la réalisation d'une infection productive. Lors de la co-infection entre deux particules défectives – semi-infectieuses par exemple – une complémentation entre les particules virales peut permettre la restauration des capacités infectieuses et ainsi l'émission de fluorescence. Une proportion différente en particules défectives entre les différents stocks viraux pourrait induire un biais lors de l'analyse en augmentant ou diminuant la probabilité de complémentation entre génomes défectifs. La proportion de cellules fluorescentes serait alors influencée par la proportion en particules défectives des stocks et la proportion de cellules co-infectées serait ainsi erronée. Afin de réduire cet effet, le ratio entre le titre en particules physiques – estimé par RT-qPCR – et le titre en particules infectieuses – estimé par la méthode de titrage en plages de lyse – a été comparé entre les différents stocks

viraux et l'utilisation de stocks présentant un ratio similaire a été privilégiée. Cependant cette méthode ne permet pas de quantifier précisément ou d'identifier le type de particules défectives présentes mais permet d'approximer la proportion de particules non-infectieuses dans les stocks. Les méthodes de détection classiquement utilisées reposent sur le séquençage par NGS des stocks viraux suivi d'une analyse bioinformatique afin d'identifier et de quantifier certaines mutations et délétions [274, 275]. Deux études récentes ont comparé la proportion de génomes défectifs entre différentes souches de virus influenza et décrit la nature de ces délétions [276, 277]. Le modèle optimisé et l'utilisation de stocks présentant un ratio similaire de particules physiques par particule infectieuse ne permet pas d'estimer cette proportion mais permet toutefois de s'affranchir du biais associé. En effet, lors de la détermination des valeurs de R et V permettant la résolution des équations de P_R , P_V et P_{RV} , les données observées et calculées sont comparées. La linéarité de l'équation valeur_observée = f(valeur_calculée) permet de valider la pertinence du modèle et ainsi de calculer la proportion réelle de cellules co-infectées. Cette méthode de calcul permet ainsi de s'affranchir des biais (i) et (ii) en estimant le nombre de particules non agrégées afin de recalculer toutes les combinaisons possibles d'unités infectieuses et d'agrégats.

Le modèle a été utilisé afin de mesurer l'effet d'une condition donnée sur la fréquence de co-infections. Cependant, ce modèle permet également d'estimer l'effet d'une condition sur l'agrégation virale même en absence de modification de la fréquence de co-infections totale. Un nombre n de cellules pourrait présenter une proportion C de cellules co-infectées avec une majorité de cellules infectées par au moins deux particules virales isolées et une minorité par des agrégats d'au moins deux particules. Une condition favorisant l'agrégation pourrait permettre l'agrégation entre deux particules virales et diminuer le nombre de particules isolées. La proportion globale de cellules co-infectées n'en serait pas modifiée contrairement à la répartition entre les formes d'agrégats. Cette condition pourrait être particulièrement vraie à forte MOI avec une forte proportion de cellules co-infectées. Le modèle permet donc de mesurer l'impact d'un facteur ou d'une condition sur la fréquence de co-infections et permet d'estimer la répartition entre les différentes formes d'agrégats entre particules virales.

Les méthodes de détection des co-infections classiquement utilisées présentent un certain nombre de limites pouvant être évitées par le système développé et présenté au cours de ces travaux. En microscopie photonique, la détection repose sur l'utilisation

d'anticorps dirigés contre une protéine virale couplés à un rapporteur. Il est à noter que la détection de virus influenza exprimant un rapporteur fluorescent dans des cellules MDCK infectées a été possible par microscopie confocale [278]. L'utilisation de la microscopie photonique et son développement dans la détection des infections virales est présenté en [279]. Le premier facteur limitant attendant à ces méthodes est le nombre de cellules analysables. Malgré l'automatisation de l'acquisition des images, la microscopie photonique ne peut pas permettre d'analyser dans un court délai un très grand nombre de cellules contrairement à la cytométrie en flux. A titre indicatif le cytomètre utilisé lors des acquisitions (Attune NxT, Thermofisher) permet un traitement de 1 mL de suspension cellulaire par minute indépendamment du nombre de cellules présentes dans l'échantillon, portant le nombre de cellules analysées par minute à plusieurs dizaines de milliers. En plus du temps d'acquisition des images, le traitement du signal en microscopie est complexe et chronophage. La cytométrie en flux permet de traiter de manière automatisée un grand nombre d'échantillons et le traitement du signal de fluorescence ne nécessite que quelques heures avant l'analyse numérique par le modèle probabilistique. L'utilisation de la cytométrie en flux afin d'estimer la fréquence de co-infections permet donc un gain de temps rendant possible l'analyse d'échantillons plus conséquents sur une plus courte période de temps, augmentant le nombre de cellules analysées et donc la force statistique lors de l'analyse des résultats.

Au cours de ces travaux, nous avons donc optimisé un système permettant initialement de mesurer la fréquence de co-infections entre particules virales par cytométrie en flux pour le VSV afin de permettre l'estimation de la fréquence d'agrégation chez les virus influenza A. Ce système optimisé a permis de mesurer l'effet d'un facteur viral sur la fréquence de co-infections. Il aurait toutefois été intéressant de valider la capacité du modèle à détecter des variations dans la fréquence de co-infections et ainsi d'estimer des variations dans l'agrégation entre particules virales. L'utilisation d'un stock de virus influenza A exposé à différentes concentrations en Ca^{2+} ou Mg^{2+} pourrait favoriser l'agrégation entre particules virales et ainsi être utilisé pour valider biologiquement le modèle[57]. Enfin, le système optimisé pourrait permettre d'apporter des éléments de réponse sur les conditions favorisant les réassortiments nécessaires à l'évolution des virus influenza A.

Les co-infections, en modulant la diversité virale, en permettant l'échappement à la réponse cellulaire à l'infection ou en augmentant la transmissibilité inter-/intra-hôte, par

exemple, pourraient également jouer un rôle important chez d'autres virus (segmentés ou non). Le développement des technologies de NGS associées aux méthodes de détection des co-infections à l'échelle cellulaire ou globale, pourraient permettre d'apporter de nouvelles connaissances sur l'évolution ou la dynamique virale. Ainsi le système présenté ici pourrait être utilisé pour mesurer la fréquence de co-infection et estimer l'agrégation entre particules virales pour d'autres virus.

II. Identification de facteurs cellulaires et viraux pouvant affecter la fréquence de co-infections

Au cours de ces travaux nous avons cherché à mesurer l'effet d'une modification dans la balance entre l'activité des glycoprotéines de surface des virus influenza A, HA et NA, sur la fréquence de co-infections. Nos expériences n'ont pas permis de mettre en évidence de différence significative pour les conditions choisies. L'hémagglutinine utilisée pour les deux couples de virus produits provient de la souche A/Paris/644/2007, ayant circulée lors de la saison 2007/2008. La neuraminidase provient, pour le premier couple H275, de la souche A/Paris/497/2007 et, pour le second couple Y275, de la souche A/Paris/1170/2008. La séquence protéique de la HA utilisée est identique à celle des deux souches A/Paris/497/2007 et A/Paris/1170/2008. Concernant la neuraminidase, nous avons choisi d'utiliser les protéines provenant de souches ayant circulées lors de la saison 2007/2008 afin d'utiliser des combinaisons de balance HA/NA n'altérant pas les capacités répliquatives des virus. Ce choix repose sur des données publiées montrant l'importance d'un certain état d'équilibre entre l'activité des deux glycoprotéines de surface afin de permettre l'infection virale. Un équilibre serait par exemple nécessaire dans les étapes d'attachement du virus à son récepteur, d'endocytose lors de l'entrée virale et de détachement des particules virales néo-formées [280]. La balance HA/NA jouerait également un rôle lors de la progression du virus au travers du mucus afin de permettre l'accès des particules virales à la surface cellulaire [281]. Nous avons donc choisi une combinaison viable de balance HA/NA lors de notre étude. Les résultats obtenus peuvent être en partie expliqués par (i) les propriétés enzymatiques des deux NA et (ii) par les combinaisons de balance HA/NA choisies. Concernant (i), le choix des deux NA a été fait sur une différence dans la valeur de la constante de Michaelis-Menten (K_m), représentative de l'affinité d'une enzyme pour son substrat. Notre hypothèse de travail repose sur la proportion d'agrégation entre particules virales ayant une même HA en fonction du K_m de la neuraminidase. La NA du couple H275 ($K_m = 7,5\mu\text{M}$) étant 2,42 fois plus affine que la NA du couple Y275 ($K_m = 18,2\mu\text{M}$), la proportion d'agrégats est supposée plus faible pour le couple H275. Toutefois il aurait été intéressant d'inclure d'autres paramètres enzymatiques comme la vitesse maximale de la réaction V_m lors du choix du couple à utiliser. Une variation dans la V_m entre les deux neuraminidases pourrait, par exemple, limiter les effets observés. Nous ne pouvons pas exclure qu'une NA présentant une forte affinité pour son substrat et une faible V_m donne des résultats

identiques à une NA possédant une faible affinité pour son substrat et une V_m forte. Le nombre de molécules de HA et de NA à la surface pourrait avoir, en plus de propriétés enzymatiques différentes, un impact sur l'agrégation entre particules virales. Cette différence est une hypothèse émise afin d'expliquer partiellement l'absence de différence significative entre les deux couples de virus. Concernant (ii), la balance HA/NA de la souche A/Paris/497/2007 est déséquilibrée en faveur de la NA, avec une forte activité neuraminidase. En 2007, l'introduction de la mutation H275Y dans la NA a réduit l'activité neuraminidase, et ainsi rétabli un état d'équilibre dans la balance HA/NA [253]. Cet état initial de déséquilibre pourrait limiter l'agrégation entre particules virales en clivant les interactions entre virions. L'introduction de la mutation H275Y, en limitant la dissociation des agrégats viraux, pourrait permettre, *in fine*, de favoriser les co-infections. Cependant cette favorisation minime de l'agrégation pourrait ne pas être suffisante pour avoir un impact sur la fréquence de co-infections dans les conditions testées. C'est pourquoi il serait intéressant de tester d'autres combinaisons de HA/NA afin de maximiser l'écart entre les balances HA/NA, ce qui pourrait avoir pour effet d'augmenter la fréquence d'agrégations et de co-infections. Toutefois, cette augmentation pourrait altérer les capacités répliquatives des virus et rendrait difficile la comparaison entre les différentes conditions. Le système de mesure optimisé pourrait permettre de comparer toutes les combinaisons d'agrégats entre unités infectieuses dans les différentes conditions, ce qui permettrait de statuer sur l'impact de la balance HA/NA sur la proportion d'agrégation en plus de la fréquence de co-infections. Nous avons comparé ces différentes proportions pour nos différents échantillons et aucune différence significative n'a été mise en évidence. Toutefois, l'étude de l'impact de la balance HA/NA sur la fréquence de co-infections reste complexe. En effet, la régulation de la balance HA/NA est multifactorielle et la seule différence de propriétés enzymatiques de la NA ne peut suffire à expliquer de possibles variations. Une compensation fonctionnelle de la HA a par exemple été décrite pour des virus H3N2 possédant une version déficiente de la NA. Ces virus possèdent une HA dont l'affinité pour le récepteur est très faible afin de compenser la perte d'activité de la NA lors du bourgeonnement à la surface cellulaire [282]. D'autres virus H3N2 ont été décrits comme possédant une neuraminidase capable de se lier au récepteur grâce à l'acquisition de la mutation D151G [283]. La distribution en surface des protéines HA et NA a également été décrite comme asymétrique, permettant la formation de zones plus concentrées en protéines à la surface de la particule virale [281]. L'influence du contexte

génétiq ue sur la proportion de HA et de NA à la surface a également été décrite [284]. Ces variations dans la distribution pourraient également jouer un rôle dans la régulation de la balance HA/NA. Cependant, même s'il présente des limites, le système utilisé pour mesurer l'impact de la balance HA/NA sur la fréquence de co-infections chez les virus influenza A est robuste et permet de s'affranchir de plusieurs biais liés par exemple à l'utilisation de virus présentant des capacités répl icatives différentes.

D'autres facteurs pourraient jouer un rôle dans la modulation de la fréquence de co-infections chez les virus influenza A. La morphologie des virus influenza A pourrait jouer un rôle dans l'agrégation entre particules virales et donc *in fine* sur la fréquence de co-infections. Les formes filamenteuses des virus IAV possèdent une surface et une longueur plus importantes que les particules sphériques. Les glycoprotéines sialylées à la surface du virus pourraient jouer un rôle en permettant l'agrégation entre particules virales par liaison de la HA à ces glycoprotéines. Les formes filamenteuses augmentent la probabilité de rencontre entre les particules virales et augmentent donc la probabilité de former des agrégats viraux. Au cours de ces travaux nous avons conduit des expériences préliminaires afin d'obtenir des virus recombinants permettant l'expression de protéines fluorescentes et présentant différents types de morphologie. Brièvement, plusieurs méthodes ont été utilisées en parallèle et reposent toutes sur la modification du segment 7 codant pour la protéine M1, en partie responsable de la morphologie filamenteuse [128], associé ou non à un passage sur œufs embryonnés des virus produits afin d'augmenter la concentration en particules virales. Des couples de virus dont chacun des membres exprime un rapporteur fluorescent mCherry ou GFP ont été produits et caractérisés. L'analyse de la morphologie par microscopie électronique à transmission a montré que nos stocks de virus n'étaient que peu enrichis en particules virales filamenteuses. Les analyses préliminaires de la fréquence de co-infections pour le couple de virus filamenteux vs un couple de virus sphériques n'ont pas montré de différences significatives. Cependant les stocks de virus filamenteux produits contiennent une grande majorité de particules sphériques, pouvant partiellement expliquer les résultats préliminaires obtenus. La relative fragilité des particules virales filamenteuses lors des étapes de congélation rend la conservation de ces virus particulièrement délicate [58]. Cette fragilité, associée aux difficultés à produire des virus filamenteux recombinants permettant l'expression de protéines fluorescentes, ne nous a pas permis de compléter ces résultats.

La présence de glycoprotéines sialylées dans certains liquides corporels comme la salive pourrait permettre de favoriser l'agrégation entre particules virales pour les virus influenza A. Cela a par exemple été décrit pour le virus VSV [6] et la salive. L'agrégation entre particules virales est augmentée lors de l'incubation des virions avec de la salive humaine. Les auteurs suggèrent que les particules virales sont en contact permanent avec la salive lors de la transmission, et qu'une agrégation médiée par la salive permettrait d'augmenter la concentration en particules virales et jouer un rôle dans la transmission. Concernant les virus influenza A, l'aérosolisation et la transmission par le biais de gouttelettes muco-protéiques sont les voies majoritaires de transmission [194]. L'agrégation des particules virales dans la salive pourrait permettre de potentialiser la transmission à un nouvel hôte en augmentant le nombre de particules virales lors de la transmission. Nous avons produit et caractérisés un couple de virus recombinants et fluorescents issus de la souche A/WSN/33 qui pourra être utilisé afin de mesurer l'effet de la salive sur la fréquence de co-infections. Ces virus produits sont relativement similaires en termes de titre infectieux, titre en particules physiques, DIF50 et capacités répliquatives. Il serait intéressant d'utiliser ces virus afin de comparer l'effet de la salive de différents hôtes comme l'Homme, le porc ou les oiseaux sur la fréquence de co-infections. Les porcs possédant des acides sialiques branchés en $\alpha 2,3$ et en $\alpha 2,6$, ils peuvent être infectés par des virus humains et aviaires [285]. La co-infection entre virus humains et aviaires chez le porc pourrait mener à l'émergence par réassortiment d'un virus à fort potentiel pandémique. L'augmentation de l'agrégation entre particules virales par la salive pourrait augmenter la fréquence de co-infection et *in fine* favoriser cette émergence.

Enfin, le système de mesure de la fréquence de co-infections optimisé pourra être utilisé afin de mesurer l'incidence de la complémentation entre particules défectives sur la fréquence de co-infections. Les virus influenza présentant un ratio élevé de particules physiques par particule infectieuse, la complémentation entre particules dites défectives joue un rôle important dans l'infection par les virus influenza. Ces particules également qualifiées de non infectieuses peuvent représenter plus de 90% des particules et leur rôle n'est pas bien compris à ce jour [132]. Au sein de ces particules on retrouve les particules défectives interférentes et les particules semi-infectieuses. En ce qui concerne les particules défectives interférentes, un rôle protecteur a été décrit avec une diminution du titre viral observé chez la souris suite à une exposition préalable à des particules dont le

génomique est défectif avant une exposition à un virus infectieux [286]. Chez l'Homme, une augmentation de la sévérité de l'infection a été observée lors de l'infection par des virus influenza A présentant peu de particules défectives interférentes [287]. Les auteurs ont identifié une mutation dans la séquence codant pour la protéine PA provenant de souches virales H1N1pdm09 isolées de patients présentant des formes sévères d'infection. Cette mutation D529N réduit la proportion de génomes défectifs produits par un mécanisme encore non totalement élucidé [287, 288]. Cette diminution de la proportion de génomes défectifs causée par la mutation D529N pourrait en partie être responsable de la sévérité de l'infection chez l'Homme.

Afin de mesurer l'impact des particules à génomes défectifs sur la fréquence de co-infections chez les virus influenza A, nous avons amplifié séquentiellement chacun des membres du couple de virus recombinants permettant l'expression d'une protéine fluorescente issus de la souche A/WSN/33 à forte MOI (= 1) afin d'induire la production de génomes défectifs. Le titre en particules infectieuses et en particules physiques a été estimé et la dose infectieuse de fluorescence a été déterminée. Une augmentation du nombre de particules physiques par particules infectieuses a été observée. Cependant, la dose infectieuse de fluorescence pour obtenir x% de cellules positives lors de l'analyse par cytométrie en flux a très fortement diminué. Cette diminution se traduit par une plus faible dilution des stocks viraux afin d'obtenir le même pourcentage de cellules positives. Avant d'utiliser ces virus dans le système de mesure de la fréquence de co-infections par cytométrie en flux, il serait intéressant de quantifier la proportion de particules virales ayant conservée la séquence codant pour le rapporteur fluorescent pour chaque stock viral et pour chacune des amplifications. Une différence majeure de cette proportion entre les deux stocks de virus au sein d'un couple, pourrait induire un biais lors de l'analyse numérique de la fréquence de co-infections. En effet, pour une quantité donnée de cellules infectées par une même proportion de particules virales provenant de l'un ou de l'autre virus au sein d'un couple, la proportion pour une cellule d'être infectée et d'exprimer le rapporteur fluorescent est différente. Cette différence de probabilité induit également une différence dans le calcul de la probabilité pour une cellule d'être co-infectée par les deux particules virales. La détermination de ces proportions pourrait permettre d'ajuster le modèle probabilistique afin de rectifier la probabilité qu'une cellule soit infectée par l'un ou l'autre virus, permettant ainsi de déterminer une fréquence de co-infection en limitant les biais.

III. Infections hétérotypiques entre virus influenza A et B

Au cours de ces travaux, nous nous sommes intéressés aux effets des infections hétérotypiques entre virus influenza A et B. Afin d'apporter un élément de réponse, nous avons utilisé des virus permettant l'expression d'un rapporteur fluorescent – GFP pour le virus IAV et mCherry pour le virus IBV – et nous avons mesuré la proportion de cellules positives pour l'un, l'autre ou les deux virus en cytométrie en flux.

Concernant les virus IBV, il est à noter que peu de systèmes de génétique inverse sont disponibles. Nous ne disposons au laboratoire que du système permettant la production de virus appartenant à la souche B/Brisbane/60/2008. De plus, peu de virus IBV permettant l'expression de rapporteurs fluorescents ont été décrits à ce jour [289, 290]. Seules les trois souches virales B/Yamagata/16/1988, B/Brisbane/60/2008 et B/Malaysia/2506/2004, dont les systèmes de génétique inverse sont maîtrisés, ont été utilisées pour produire des virus rapporteurs dont les capacités répliquatives ont été jugées comme comparables aux virus non modifiés [90]. Contrairement aux virus influenza A pour lesquels nous avons pu obtenir des virus exprimant différents rapporteurs fluorescents (BFP, GFP, mCherry ou mCitrine), il n'a pas été possible d'obtenir un stock de virus influenza B exprimant un rapporteur fluorescent GFP, malgré plusieurs essais. Seuls des stocks de virus IBV exprimant un rapporteur fluorescent mCherry ont pu être obtenus. De plus, le nombre de particules physiques par particule infectieuse est variable entre les stocks viraux que nous avons produits. La production de virus influenza B fluorescents semble plus complexe que pour les virus influenza A. La relative difficulté de production de virus IBV exprimant un rapporteur pourrait s'expliquer en partie par la méthode utilisée afin d'exprimer le rapporteur fluorescent. Contrairement aux virus influenza A, les 21 acides aminés restant sur la protéine virale suite au clivage du site 2A pourraient altérer l'interaction entre les différentes protéines virales et cellulaires et ainsi avoir un impact sur les capacités répliquatives des virus influenza B [90, 91].

Dans un premier temps, nous avons montré que l'infection des cellules A549 par un virus influenza B inhibe l'infection par les virus influenza A. Cet effet s'observe aussi bien lors de l'ajout préalable, simultané ou postérieur du virus influenza B au virus influenza A. Cette donnée suggère que l'étape d'entrée du virus IAV est possible et que l'exclusion de l'infection ne se fait pas à cette étape du cycle. La diminution de la fluorescence observée pour le virus IAV lors de l'ajout de IBV une heure post-infection par

le virus IAV nous permet de dire que les que les étapes de transcription/réplication des virus IAV pourraient être ciblées. En effet, l'initiation de ces étapes est possible dans ce délai et leur inhibition pourrait conduire à l'absence de production du rapporteur fluorescent. Une étude publiée en 2012 confirme nos résultats [246]. Les auteurs ont co-infecté des cellules Vero E6 avec un virus B/Lee/40 sauvage et un virus IAV recombinant dont 7 segments proviennent de la souche A/PR/8/34 (H1N1) et le segment 6 a été modifié par le remplacement de la séquence codant la NA par celle d'un rapporteur fluorescent. La fluorescence des cellules infectées par le virus IAV est diminuée lors de la co-infection avec le virus IBV. L'effet n'est plus observé si le virus IBV est ajouté deux heures après le virus IAV. Les auteurs n'ont cependant pas mesuré le pourcentage de cellules infectées par le virus IBV. Dans une étude plus récente, les auteurs se sont intéressés à l'aspect mécanistique de la régulation de IBV sur IAV [291]. La nucléoprotéine des virus IBV interagit avec la nucléoprotéine des virus IAV et affecte donc la réplication virale. L'inhibition des virus IAV par la NP de IBV est dépendante des concentrations relatives en NP [246, 291]. Cette interaction empêche l'interaction entre la NP de IAV et la protéine PB2. Le système que nous avons développé permet de visualiser la réplication/transcription virale des virus IAV et IBV simultanément, contrairement au système utilisé par Wanitchang *et al.* qui ne s'intéressait qu'à l'infection par IAV [246]. Notre système permet donc de mesurer l'impact de l'infection par un virus sur la transcription/réplication de l'autre virus.

Dans un second temps, en utilisant les virus rapporteurs fluorescents IAV-GFP et IBV-mCherry, nous avons montré que l'ajout préalable, simultané ou postérieur du virus IAV au virus IBV augmentait la sensibilité des cellules A549 à l'infection par le virus IBV. Nous avons également observé une augmentation de l'intensité de l'infection des cellules par IBV lors de l'ajout de virus IBV sauvage et d'autres souches d'IAV (présenté ci-après). Cet effet n'ayant pas été décrit précédemment, nous avons décidé de nous y intéresser plus spécifiquement. L'étude publiée par Dou *et al.* en 2017 définit une période temporelle de deux heures durant laquelle des co-infections entre virus influenza A sont possibles. Au-delà de cette période, une exclusion a été observée [92]. Au cours de nos expériences nous avons comparé la condition de co-infections simultanées ou la condition d'ajout séquentiel des deux virus séparés d'une heure. Nous avons également comparé nos résultats avec ceux obtenus lors de l'ajout du second virus après deux heures d'infection par le premier virus. Ces expériences préliminaires ont montré que la

condition une heure post-infection permettait d'obtenir une plus grande facilitation de l'infection par les virus IBV lors de la co-infection entre les virus IAV et IBV que la condition deux heures post-infection. En utilisant les résultats obtenus pour les virus influenza A par Dou *et al.* [92], il aurait été intéressant de tester des temps plus espacés entre les deux virus afin de mettre en évidence une fenêtre permettant la réalisation de co-infections.

Le virus IAV utilisé lors de ces expériences, dont le segment codant pour la protéine PB2 permet l'expression d'un rapporteur fluorescent, provient de la souche A/WSN/33. Cette souche est classiquement utilisée en laboratoire pour l'étude des virus influenza A. Nous avons alors choisi de valider ces résultats en utilisant d'autres souches de virus influenza A. Ainsi, les souches A/WSN/33 (H1N1), A/Puerto-Rico/8/34 (H1N1) et A/Paris/76/08 (H1N1pdm09) sauvages ont été utilisées. Nous avons également souhaité utiliser la souche A/Centre/1003/2012 (H3N2) disponible au laboratoire mais la proportion de cellules infectées était trop faible pour être utilisée. Nos expériences préliminaires ont montré que l'infection préalable par ces virus IAV augmente la sensibilité à l'infection par le virus IBV-mCherry, comme observé avec le virus IAV-GFP. Nous avons donc montré, pour les conditions testées, que l'effet observé n'était pas dépendant de la souche de virus IAV. Dans ces expériences, la proportion de cellules A549 infectées par les virus IAV non modifiés a été mesurée par cytométrie en flux suite à un marquage de la nucléoprotéine virale à l'aide d'un anticorps. Une variation dans les proportions de cellules positives à l'infection par les différents virus influenza A a été observée. Cependant, une différence d'efficacité d'infection ou du marquage anticorps ou encore une variation dans la proportion de particules défectives entre les stocks pourraient être en partie responsables de ces variations. Il aurait été intéressant d'utiliser d'autres sous-types IAV ou souches virales IBV afin de vérifier que l'effet observé n'est pas dépendant de la souche B/Brisbane/60/2008. Compte tenu du faible nombre de souches virales exprimant un rapporteur et de la difficulté de production, il serait intéressant de produire et d'utiliser un virus du second lignage IBV, le lignage Yamagata, exprimant un rapporteur fluorescent, en complément du virus utilisé durant nos expériences, appartenant au lignage Victoria. Nous avons toutefois confirmé nos résultats en utilisant un virus sauvage de cette même souche permettant de montrer que l'effet n'est pas dépendant de l'expression du rapporteur fluorescent.

Le mécanisme de favorisation de l'infection des virus IBV lors de la co-infection avec un virus IAV n'est pas décrit à ce jour. Afin d'apporter un élément de réponse à cette problématique, nous avons dans un premier temps utilisé un stock de virus IAV-GFP inactivé par exposition aux rayonnements ultraviolets. Nous avons observé que des virus pleinement infectieux sont nécessaires afin d'observer l'effet facilitant sur l'infection IBV. Par la suite, afin de déterminer quelles étapes du cycle viral sont nécessaires, nous avons utilisé plusieurs drogues agissant à différentes étapes du cycle viral du virus IAV. Le virus IAV-N31S-GFP, possédant une mutation sur la protéine M2 restaurant la sensibilité à l'amantadine, a été utilisé dans les expériences de co-infections avec deux stocks différents de virus IBV-mCherry, en présence d'amantadine, de pimodivir ou de nucleozin. L'utilisation d'amantadine à 20 μM n'a pas permis l'inhibition complète de l'entrée des virus influenza A, aboutissant à l'observation de l'effet favorisant sur l'infection par les virus influenza B. Nous avons essayé d'augmenter la concentration d'amantadine à 50 μM afin d'augmenter l'inhibition, sans succès. Nous avons vérifié par NGS que nos stocks viraux ne présentent pas de sous-populations virales n'exprimant pas la mutation N31S. Cette mutation est présente à plus de 99,5 %, permettant d'écarter cette hypothèse. Il est à noter qu'à 50 μM , la mortalité cellulaire observée est plus forte. Les résultats obtenus avec l'amantadine, seuls, ne permettent pas de montrer la nécessité de la libération des RNPs virales dans le cytoplasme. En revanche, les résultats obtenus avec le pimodivir et la nucleozin montrent les étapes de transcription/réplication sont nécessaires afin d'observer l'effet favorisant sur l'infection par IBV. En effet, en présence de ces drogues, l'effet facilitateur de l'infection par IBV n'est plus observé.

Grâce à nos résultats, nous supposons que les étapes de transcription/réplication virales du virus influenza A sont nécessaires afin de faciliter l'infection par les virus influenza B. Une étude publiée en 1999 par notre laboratoire montre que les protéines de la polymérase du virus influenza A provenant de la souche A/PR8/34 peuvent, *in vitro*, en présence de la NP du virus influenza B provenant du virus B/Harbin/7/94, prendre correctement en charge un ARNv de IBV modifié pour permettre l'expression d'un rapporteur luminescent [292]. L'interaction de la nucléoprotéine de IBV avec la nucléoprotéine de IAV menant à la rupture de l'interaction entre la protéine PB2 et la protéine NP des virus IAV a également été montré [248, 291]. En se basant sur les données obtenues et les données disponibles dans la littérature, nous proposons le mécanisme suivant permettant d'expliquer l'augmentation de fluorescence observée. Lors de la co-

infection virale, la nucléoprotéine virale des virus IBV interagit avec la NP des virus IAV, menant à une diminution de la transcription/réplication des virus IAV et, *in fine*, à une diminution de la quantité de protéines virales et de rapporteur fluorescent, pouvant expliquer la diminution de la proportion de cellules fluorescentes observée. La quantité de NP IAV disponible étant réduite, la formation des RNPv est également réduite. Les protéines virales IAV disponibles pourraient alors prendre en charge l'ARNv des virus IBV, permettant ainsi l'augmentation de la production d'ARNm codant pour les protéines IBV et pour le rapporteur fluorescent mCherry. Cela pourrait permettre d'expliquer l'augmentation de l'intensité de fluorescence observée mais également la proportion de cellules positives en cytométrie en flux. Les cellules infectées par un faible nombre de particules virale IBV pourrait ne produire que peu de protéines virales et de rapporteur fluorescent. De ce fait, l'intensité de fluorescence mesurée serait en dessous du seuil de détection fixé. L'augmentation de l'intensité de fluorescence aurait alors pour effet de placer ces cellules au-dessus du seuil et donc de les comptabiliser comme positives.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous suggérons de transfecter des cellules afin de permettre l'expression de toutes les protéines de la polymérase virale IAV, ou de certaines combinaisons, en présence ou absence de la NP IAV, puis d'infecter les cellules avec un virus IBV exprimant un rapporteur fluorescent. Une augmentation de l'intensité de fluorescence ou de la proportion de cellules positives pour mCherry suite à la transfection et infection des cellules en comparaison à la proportion de cellules fluorescentes lors de l'infection par IBV seul pourrait permettre de montrer une implication de la polymérase virale IAV. Afin de tester une potentielle compétition entre les protéines des virus IAV et IBV, il serait intéressant de transfecter des quantités croissantes des différentes protéines IAV avant infection par le virus IBV. Cependant, il a été observé que les cellules A549 transfectées devenaient résistantes à l'infection virale. La production de lignées cellulaires A549 exprimant stablement ces protéines virales et leurs combinaisons, ou l'utilisation de cellules 293T, pourrait permettre d'outrepasser cette limite. Une autre alternative pourrait être de quantifier les étapes de transcription/réplication spécifiques de chacun des deux virus à l'aide de RT-qPCR spécifiques de brins. Une immunoprécipitation des protéines des virus IAV suivi d'une RT-qPCR pour détecter l'ARNv des virus IBV pourrait également permettre de mettre en évidence l'interaction entre une ou plusieurs des protéines PB2, PB1, PA et NP des virus influenza A et l'ARN viral des virus IBV. Les données obtenues pourraient nous permettre

de confirmer l'hypothèse d'augmentation de la transcription/réplication du virus IBV en présence des protéines IAV.

Le système utilisé et présenté au cours de ces travaux n'a cependant été testé que dans le modèle cellulaire A549. Nous ne pouvons pas exclure que les résultats obtenus ne soient pas dépendant de la lignée cellulaire ou de certaines souches virales IBV. Cependant, afin d'obtenir des données préliminaires, le système utilisé permet d'obtenir des données robustes et reproductibles pouvant être traitées de manière automatisée et sur un grand nombre de cellules.

En perspectives, il serait intéressant de comparer l'état clinique et l'évolution de la pathologie lors de co-infections hétérotypiques en comparaison aux conditions d'infections seules chez les patients. Ces informations pourraient permettre de montrer l'importance des co-infections hétérotypiques pour les virus influenza dans la modulation de la virulence. Une étude *in vivo* dans un modèle animal pourrait permettre de contrôler un certain nombre de paramètres comme par exemple, la charge virale à l'infection et le délai entre les infections, et ainsi d'apporter des éléments de réponse concernant une possible suppression de super-infections et sur la modulation de la virulence lors de co-infections hétérotypiques.

Annexes

Annexe 1 : Script R permettant la détermination de R et V et la résolution des équations

```
#!/usr/bin/env Rscript

#####
# Script to estimate the R and G values most compatible with the observed fluorescence
# value
#
#### NM_Balance_HA_NA_Analyse_Last_version
#load module of estimation function
source('Scripts/Computation_function_3_agregats_3_particles.R')
# Input data frame
# The input data should contain the following columns (with these exact names):
# "Uninfected", "GFP.only", "Cherry.only", "GFP.Cherry", "P1", "P2", "P3"

data_inf <- read.table("Initial_file.csv", sep = ";", header = TRUE)
#data_inf <- data_inf[2:5]
data_inf$Uninfected1 = data_inf$Uninfected1/100
data_inf$GFP.only1 = data_inf$GFP.only1/100
data_inf$mCherry.only1 = data_inf$mCherry.only1/100
data_inf$GFP.mCherry1 = data_inf$GFP.mCherry1/100

data_inf$MOI = -log(data_inf$Uninfected1)
data_inf$P1 = ((exp(-data_inf$MOI))*((data_inf$MOI)^1)/factorial(1))
data_inf$P2 = ((exp(-data_inf$MOI))*((data_inf$MOI)^2)/factorial(2))
data_inf$P3 = ((exp(-data_inf$MOI))*((data_inf$MOI)^3)/factorial(3))
data_inf <- data_inf[, c("Uninfected1", "GFP.only1", "mCherry.only1", "GFP.mCherry1",
"P1", "P2", "P3")]

# number of value of R and G to test (between 0 and 1)
#Test 100/200/250 okay
N_value = 550
nlines = dim(data_inf)[1]

# Create empty columns to insert estimated data
data_inf = cbind(data_inf, matrix(NA*10*nlines, ncol=10, nrow = nlines))
names(data_inf)[8:17] = c("G", "R", "C", "Cgg", "Crr", "Crg", "Crrr", "Cggg", "Crrg", "Cggr")

for(l in 1:nlines)
{
  print(l)
  res = (find_optimal_R_n_G(N_value, data_inf[l, 'P1'], data_inf[l, 'P2'], data_inf[l, 'P3'],
```

```

data_inf[, 'mCherry.only1'], data_inf[, 'GFP.only1'], data_inf[,
'GFP.mCherry1'], data_inf[, 'Uninfected1'])

```

```

# insert results in the data frame:
data_inf[, names(res)] = res
}
data_inf$Moi = -log(data_inf$Uninfected1)

```

```

## New variables to simplify expression writing

```

```

F_Cgg <- ((1-data_inf$R-
data_inf$G)*data_inf$G^2)/((data_inf$R+data_inf$G)^2+(data_inf$R+data_inf$G)^3)
F_Crr <- ((1-data_inf$R-
data_inf$G)*data_inf$R^2)/((data_inf$R+data_inf$G)^2+(data_inf$R+data_inf$G)^3)
F_Crg <- ((1-data_inf$R-
data_inf$G)*2*data_inf$R*data_inf$G)/((data_inf$R+data_inf$G)^2+(data_inf$R+data_inf$G)^3)
F_Crrr <- ((1-data_inf$R-
data_inf$G)*data_inf$R^3)/((data_inf$R+data_inf$G)^2+(data_inf$R+data_inf$G)^3)
F_Cggg <- ((1-data_inf$R-
data_inf$G)*data_inf$G^3)/((data_inf$R+data_inf$G)^2+(data_inf$R+data_inf$G)^3)
F_Crrg <- ((1-data_inf$R-
data_inf$G)*3*(data_inf$R^2)*data_inf$G)/((data_inf$R+data_inf$G)^2+(data_inf$R+data_inf$G)^3)
F_Cggr <- ((1-data_inf$R-
data_inf$G)*3*(data_inf$G^2)*data_inf$R)/((data_inf$R+data_inf$G)^2+(data_inf$R+data_inf$G)^3)

```

```

data_inf$Prg_Expected = data_inf$P1 * (F_Crg + F_Cggr + F_Crrg)
+ data_inf$P2 * (1 - data_inf$R^2 - 2*(data_inf$R*F_Crr) - 2*(data_inf$R*F_Crrr) -
F_Crr^2 - F_Crrr^3 - 2*(F_Crr*F_Crrr) - data_inf$G^2 - 2*(data_inf$G*F_Cgg) -
2*(data_inf$G*F_Cggg) - F_Cgg^2 - F_Cggg^3 - 2*(F_Cgg*F_Cggg))
+ data_inf$P3 * (1 - data_inf$R^3 - 3*(data_inf$R*(F_Crr^2)) - 3*(data_inf$R^2 * F_Crr)
- F_Crr^3 - 3*(F_Crr*F_Crrr^2) - 3*(data_inf$R^2 * F_Crrr) - 3*(F_Crrr * F_Crr^2) -
F_Crrr^3 - data_inf$G^3 - 3*(data_inf$G*(F_Cgg^2)) - 3*(data_inf$G^2 * F_Cgg) -
F_Cgg^3 - 3*(F_Cgg*F_Cggg^2) - 3*(data_inf$G^2 * F_Cggg) - 3*(F_Cggg * F_Cgg^2) -
F_Cggg^3)

```

```

#data_inf$Prg_Expected = (data_inf$P1 * (((1-data_inf$R-data_inf$G)*
2*data_inf$R*data_inf$G)/ (data_inf$R+data_inf$G)^2)) + (data_inf$P2 * (((1-
data_inf$R^2-(2*data_inf$R*(1-data_inf$R-data_inf$G)* data_inf$R^2)/
(data_inf$R+data_inf$G)^2) - (((1-data_inf$R-data_inf$G)* data_inf$R^2)/
(data_inf$R+data_inf$G)^2)^2 - data_inf$G^2 - 2*data_inf$G*(((1-data_inf$R-
data_inf$G)* data_inf$G^2)/ (data_inf$R+data_inf$G)^2)
#-(((1-data_inf$R-data_inf$G)* data_inf$G^2)/ (data_inf$R+data_inf$G)^2)^2))

```

```

data_inf$proba = data_inf$Uninfected1 + data_inf$P1 + data_inf$P2 + data_inf$P3

```

```

data_inf$dual = (2*data_inf$C)/((2*data_inf$C+data_inf$G+data_inf$R) +
(3*data_inf$C+data_inf$G+data_inf$R))
data_inf$trial = (3*data_inf$C)/((2*data_inf$C+data_inf$G+data_inf$R) +
(3*data_inf$C+data_inf$G+data_inf$R))

```

```

write.csv(data_inf,"Path/Output_File_Name.csv")

```

Annexe 2 : configuration des fonctions permettant la détermination de R et V
#Optimized for 3 aggregates of 3 particles, NM on 20190729

```

#
# Go through a grid of value between 0 and 1
#
find_optimal_R_n_G <- function(N_value, P1, P2, P3, mCherry.only1, GFP.only1,
GFP.mCherry1, Uninfected1)
{
  R <- seq(0, 1, len=N_value)
  G <- seq(0, 1, len=N_value)

  pR_estimates = rep(NA, N_value)
  pG_estimates = rep(NA, N_value)
  pRG_estimates = rep(NA, N_value)
  r_seq = rep(NA,N_value)
  g_seq = rep(NA,N_value)

  i=1
  sample = 7

  for(r in R)
  {
    for(g in G)
    {
      if ((r+g) <1)
      {
        r_seq[i] = r
        g_seq[i] = g
        pR_estimates[i] = pR(P1, P2, P3, r, g)
        pG_estimates[i] = pG(P1, P2, P3, r, g)
        pRG_estimates[i] = PRG(P1, P2, P3, r, g)

        i = i+1
      }
    }
  }

  #total_cells <- sum(Cherry.only + GFP.only + GFP.Cherry + Uninfected)
  Pr = mCherry.only1
  Pg = GFP.only1

```

```

Prg = GFP.mCherry1

id_optimal = which.min((Pr - pR_estimates)^2 + (Pg - pG_estimates)^2 + (Prg -
pRG_estimates)^2)

R_opt = r_seq[id_optimal]
G_opt = g_seq[id_optimal]
# Deduce C from R and G:
C = 1-R_opt-G_opt

# Compute Cgg, Crr, Crg, Crrr, Cggg, Crrg, Cggr from R and G opt
Crr = Crr(R_opt, G_opt)
Cgg = Cgg(R_opt, G_opt)
Crg = Crg(R_opt, G_opt)
Crrr = Crrr(R_opt, G_opt)
Cggg = Cggg(R_opt, G_opt)
Crrg = Crrg(R_opt, G_opt)
Cggr = Cggr(R_opt, G_opt)

return(c( G=G_opt, R=R_opt, C= C, Cgg=Cgg, Crr= Crr, Crg=Crg, Crrr = Crrr, Cggg = Cggg,
Crrg = Crrg, Cggr = Cggr))
}

#
### Computation function for 3 agregates of 3 particles
#

pR <- function(P1, P2, P3, R, G)
{
## Tester C * le reste
R_Cgg <- ((1-R-G)*G^2)/((R+G)^2+(R+G)^3)
R_Crr <- ((1-R-G)*R^2)/((R+G)^2+(R+G)^3)
R_Crg <- ((1-R-G)*2*R*G)/((R+G)^2+(R+G)^3)
R_Crrr <- ((1-R-G)*R^3)/((R+G)^2+(R+G)^3)
R_Cggg <-((1-R-G)*G^3)/((R+G)^2+(R+G)^3)
R_Crrg <-((1-R-G)*3*(R^2)*G)/((R+G)^2+(R+G)^3)
R_Cggr <-((1-R-G)*3*(G^2)*R)/((R+G)^2+(R+G)^3)

res =
P1 * (R + R_Crr + R_Crrr)
+ P2 * (R^2 + 2*(R*R_Crr) +2*(R*R_Crrr) + R_Crr^2 + R_Crrr^2 + 2*(R_Crr*R_Crrr))
+ P3 * (R^3 + 3* (R*(R_Crr^2)) + 3 * (R*R_Crrr^2) +3 * (R^2 * R_Crr) + R_Crr^3 +
3*(R_Crr*R_Crrr^2) +3* (R^2 * R_Crrr) + 3*(R_Crrr * R_Crr^2) + R_Crrr^3)
return(res)
}

```

```

}

pG <- function(P1, P2, P3, R, G)
{
  R_Cgg <- ((1-R-G)*G^2)/((R+G)^2+(R+G)^3)
  R_Crr <- ((1-R-G)*R^2)/((R+G)^2+(R+G)^3)
  R_Crg <- ((1-R-G)*2*R*G)/((R+G)^2+(R+G)^3)
  R_Crrr <- ((1-R-G)*R^3)/((R+G)^2+(R+G)^3)
  R_Cggg <- ((1-R-G)*G^3)/((R+G)^2+(R+G)^3)
  R_Crrg <- ((1-R-G)*3*(R^2)*G)/((R+G)^2+(R+G)^3)
  R_Cggr <- ((1-R-G)*3*(G^2)*R)/((R+G)^2+(R+G)^3)

  res =
  P1 * (G + R_Cgg + R_Cggg)
+ P2 * (G^2 + 2*(G*R_Cgg) + 2*(G*R_Cggg) + R_Cgg^2 + R_Cggg^2 + 2*(R_Cgg*R_Cggg))
+ P3 * (G^3 + 3*(G*(R_Cgg^2)) + 3*(G*R_Cggg^2) + 3*(G^2 * R_Cgg) + R_Cgg^3 +
3*(R_Cgg*R_Cggg^2) + 3*(G^2 * R_Cggg) + 3*(R_Cggg * R_Cgg^2) + R_Cggg^3)
  return(res)
}

PRG <- function(P1, P2, P3, R, G)
{
  R_Cgg <- ((1-R-G)*G^2)/((R+G)^2+(R+G)^3)
  R_Crr <- ((1-R-G)*R^2)/((R+G)^2+(R+G)^3)
  R_Crg <- ((1-R-G)*2*R*G)/((R+G)^2+(R+G)^3)
  R_Crrr <- ((1-R-G)*R^3)/((R+G)^2+(R+G)^3)
  R_Cggg <- ((1-R-G)*G^3)/((R+G)^2+(R+G)^3)
  R_Crrg <- ((1-R-G)*3*(R^2)*G)/((R+G)^2+(R+G)^3)
  R_Cggr <- ((1-R-G)*3*(G^2)*R)/((R+G)^2+(R+G)^3)

  t1 <- P1 * (R_Crg + R_Crrg + R_Cggr)
  t2 <- P2 * (1 - R^2 - 2*(R*R_Crr) - 2*(R*R_Crrr) - R_Crr^2 - R_Crrr^2 - 2*(R_Crr*R_Crrr)
- G^2 - 2*(G*R_Cgg) - 2*(G*R_Cggg) - R_Cgg^2 - R_Cggg^2 - 2*(R_Cgg*R_Cggg) )
  t3 <- P3 * (1 - R^3 - 3*(R*(R_Crr^2)) - 3*(G*R_Cggg^2) - 3*(R^2 * R_Crr) - R_Crr^3 -
3*(R_Crr*R_Crrr^2) - 3*(R^2 * R_Crrr) - 3*(R_Crrr * R_Crr^2) - R_Crrr^3 - G^3 - 3*
(G*(R_Cgg^2)) - 3*(G*R_Cggg^2) - 3*(G^2 * R_Cgg) - R_Cgg^3 - 3*(R_Cgg*R_Cggg^2) -
3*(G^2 * R_Cggg) - 3*(R_Cggg * R_Cgg^2) - R_Cggg^3)
  return(t1 + t2 + t3)
}

Crr <- function(R, G)
{
  return(((1-R-G)* R^2)/ ((R+G)^2+(R+G)^3))
}

```

```
Crrr <- function(R, G)
{
  return(((1-R-G)* R^3)/ ((R+G)^2+(R+G)^3))
}
```

```
Cgg <- function(R, G)
{
  return(((1-R-G)* G^2)/ ((R+G)^2+(R+G)^3))
}
```

```
Cggg <- function(R, G)
{
  return(((1-R-G)* G^3)/ ((R+G)^2+(R+G)^3))
}
```

```
Crg <- function(R, G)
{
  return(((1-R-G)* 2*R*G)/ ((R+G)^2+(R+G)^3))
}
```

```
Crrg <- function(R, G)
{
  return(((1-R-G)* 3*R^2*G)/ ((R+G)^2+(R+G)^3))
}
```

```
Cggr <- function(R, G)
{
  return(((1-R-G)* 3*R*G^2)/ ((R+G)^2+(R+G)^3))
}
```

Références

1. Leeks, A., Segredo-Otero, E. A., Sanjuán, R., & West, S. A. (2018). Beneficial coinfection can promote within-host viral diversity. *Virus Evolution*, 4(2). <https://doi.org/10.1093/ve/vey028>
2. Andreu-Moreno, I., & Sanjuán, R. (2018). Collective Infection of Cells by Viral Aggregates Promotes Early Viral Proliferation and Reveals a Cellular-Level Allee Effect. *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.08.028>
3. Sanjuán, R., & Thoulouze, M.-I. (2019). Why viruses sometimes disperse in groups?†. *Virus Evolution*, 5(1). <https://doi.org/10.1093/ve/vez014>
4. Sanjuán, R. (2017). Collective Infectious Units in Viruses. *Trends in Microbiology*, 25(5), 402–412. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.02.003>
5. Farrell, A., Brooke, C., Koelle, K., & Ke, R. (2019). *Coinfection of semi-infectious particles can contribute substantially to influenza infection dynamics* (preprint). *Microbiology*. <https://doi.org/10.1101/547349>
6. Cuevas, J. M., Durán-Moreno, M., & Sanjuán, R. (2017). Multi-virion infectious units arise from free viral particles in an enveloped virus. *Nature Microbiology*, 2(7). <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.78>
7. Del Portillo, A., Tripodi, J., Najfeld, V., Wodarz, D., Levy, D. N., & Chen, B. K. (2011). Multiploid Inheritance of HIV-1 during Cell-to-Cell Infection. *Journal of Virology*, 85(14), 7169–7176. <https://doi.org/10.1128/JVI.00231-11>
8. Gross, C., & Thoma-Kress, A. (2016). Molecular Mechanisms of HTLV-1 Cell-to-Cell Transmission. *Viruses*, 8(3), 74. <https://doi.org/10.3390/v8030074>
9. Arantes, T. S., Rodrigues, R. A. L., dos Santos Silva, L. K., Oliveira, G. P., de Souza, H. L., Khalil, J. Y. B., ... Abrahão, J. S. (2016). The Large Marseillevirus Explores Different Entry Pathways by Forming Giant Infectious Vesicles. *Journal of Virology*, 90(11), 5246–5255. <https://doi.org/10.1128/JVI.00177-16>
10. Ojosnegros, S., Perales, C., Mas, A., & Domingo, E. (2011). Quasispecies as a matter of fact: Viruses and beyond. *Virus Research*, 162(1–2), 203–215. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.09.018>

11. Poirier, E. Z., & Vignuzzi, M. (2017). Virus population dynamics during infection. *Current Opinion in Virology*, 23, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.03.013>
12. Lucía-Sanz, A., & Manrubia, S. (2017). Multipartite viruses: adaptive trick or evolutionary treat? *NPJ systems biology and applications*, 3, 34. <https://doi.org/10.1038/s41540-017-0035-y>
13. Valdano, E., Manrubia, S., Gómez, S., & Arenas, A. (2019). Endemicity and prevalence of multipartite viruses under heterogeneous between-host transmission. *PLOS Computational Biology*, 15(3), e1006876. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006876>
14. Sicard, A., Michalakakis, Y., Gutiérrez, S., & Blanc, S. (2016). The Strange Lifestyle of Multipartite Viruses. *PLOS Pathogens*, 12(11), e1005819. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005819>
15. Sicard, A., Piroilles, E., Gallet, R., Vernerey, M.-S., Yvon, M., Urbino, C., ... Blanc, S. (2019). A multicellular way of life for a multipartite virus. *eLife*, 8, e43599. <https://doi.org/10.7554/eLife.43599>
16. Kehr, J., & Kragler, F. (2018). Long distance RNA movement. *The New Phytologist*, 218(1), 29–40. <https://doi.org/10.1111/nph.15025>
17. Lopez-Cobollo, R. M., Filippis, I., Bennett, M. H., & Turnbull, C. G. N. (2016). Comparative proteomics of cucurbit phloem indicates both unique and shared sets of proteins. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 88(4), 633–647. <https://doi.org/10.1111/tpj.13288>
18. Paultre, D. S. G., Gustin, M.-P., Molnar, A., & Oparka, K. J. (2016). Lost in Transit: Long-Distance Trafficking and Phloem Unloading of Protein Signals in Arabidopsis Homografts. *The Plant Cell*, 28(9), 2016–2025. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00249>
19. Sanjuán, R. (2018). Collective properties of viral infectivity. *Current Opinion in Virology*, 33, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.06.001>
20. Ghosn, J., Taiwo, B., Seedat, S., Autran, B., & Katlama, C. (2018). HIV. *The Lancet*, 392(10148), 685–697. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31311-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31311-4)
21. Sigal, A., Kim, J. T., Balazs, A. B., Dekel, E., Mayo, A., Milo, R., & Baltimore, D. (2011). Cell-to-cell spread of HIV permits ongoing replication despite antiretroviral therapy. *Nature*, 477(7362), 95–98. <https://doi.org/10.1038/nature10347>

22. Richardson, M. W., Carroll, R. G., Stremlau, M., Korokhov, N., Humeau, L. M., Silvestri, G., ... Riley, J. L. (2008). Mode of Transmission Affects the Sensitivity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 to Restriction by Rhesus TRIM5. *Journal of Virology*, 82(22), 11117–11128. <https://doi.org/10.1128/JVI.01046-08>
23. Geletneky, K., Herrero y Calle, M., Rommelaere, J., & Schlehofer, J. R. (2005). Oncolytic Potential of Rodent Parvoviruses for Cancer Therapy in Humans: A Brief Review. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 52(7–8), 327–330. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2005.00877.x>
24. Russell, S. J., Peng, K.-W., & Bell, J. C. (2012). Oncolytic virotherapy. *Nature Biotechnology*, 30(7), 658–670. <https://doi.org/10.1038/nbt.2287>
25. Herrero y Calle, M., Cornelis, J. J., Herold-Mende, C., Rommelaere, J., Schlehofer, J. R., & Geletneky, K. (2004). Parvovirus H-1 infection of human glioma cells leads to complete viral replication and efficient cell killing. *International Journal of Cancer*, 109(1), 76–84. <https://doi.org/10.1002/ijc.11626>
26. Peck, K. M., & Luring, A. S. (2018). Complexities of Viral Mutation Rates. *Journal of Virology*, 92(14), e01031-17, [/jvi/92/14/e01031-17.atom](https://doi.org/10.1128/JVI.01031-17). <https://doi.org/10.1128/JVI.01031-17>
27. Chao, L. (1990). Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. *Nature*, 348(6300), 454–455. <https://doi.org/10.1038/348454a0>
28. Butcher, D. (1995). Muller's ratchet, epistasis and mutation effects. *Genetics*, 141(1), 431–437.
29. Lugo, D., & Krogstad, P. (2016). Enteroviruses in the early 21st century: new manifestations and challenges. *Current Opinion in Pediatrics*, 28(1), 107–113. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000303>
30. Muslin, C., Joffret, M.-L., Pelletier, I., Blondel, B., & Delpeyroux, F. (2015). Evolution and Emergence of Enteroviruses through Intra- and Inter-species Recombination: Plasticity and Phenotypic Impact of Modular Genetic Exchanges in the 5' Untranslated Region. *PLOS Pathogens*, 11(11), e1005266. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005266>
31. Han, J.-F., Zhang, Y., Hou, P. Q., Zhu, S.-Y., Wu, X.-Y., Zhao, H., ... Qin, C.-F. (2014). Human enterovirus co-infection in severe HFMD patients in China. *Journal of Clinical Virology*, 61(4), 621–622. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.09.005>
32. Gutiérrez, S., Pirolles, E., Yvon, M., Baecker, V., Michalakakis, Y., & Blanc, S. (2015). The Multiplicity of Cellular Infection Changes Depending on the Route of Cell Infection in a Plant Virus. *Journal of Virology*, 89(18), 9665–9675. <https://doi.org/10.1128/JVI.00537-15>

33. Gutiérrez, S., Yvon, M., Thébaud, G., Monsion, B., Michalakis, Y., & Blanc, S. (2010). Dynamics of the Multiplicity of Cellular Infection in a Plant Virus. *PLOS Pathogens*, *6*(9), e1001113. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001113>
34. Josefsson, L., King, M. S., Makitalo, B., Brannstrom, J., Shao, W., Maldarelli, F., ... Palmer, S. E. (2011). Majority of CD4+ T cells from peripheral blood of HIV-1-infected individuals contain only one HIV DNA molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(27), 11199–11204. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107729108>
35. Duncan, C. J. A., Williams, J. P., Schiffner, T., Gartner, K., Ochsenbauer, C., Kappes, J., ... Sattentau, Q. J. (2014). High-Multiplicity HIV-1 Infection and Neutralizing Antibody Evasion Mediated by the Macrophage-T Cell Virological Synapse. *Journal of Virology*, *88*(4), 2025–2034. <https://doi.org/10.1128/JVI.03245-13>
36. Cervera, H., & Elena, S. F. (2016). Genetic variation in fitness within a clonal population of a plant RNA virus. *Virus Evolution*, *2*(1), vew006. <https://doi.org/10.1093/ve/vew006>
37. Boullé, M., Müller, T. G., Dähling, S., Ganga, Y., Jackson, L., Mahamed, D., ... Sigal, A. (2016). HIV Cell-to-Cell Spread Results in Earlier Onset of Viral Gene Expression by Multiple Infections per Cell. *PLOS Pathogens*, *12*(11), e1005964. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005964>
38. Vijaykrishna, D., Mukerji, R., & Smith, G. J. D. (2015). RNA Virus Reassortment: An Evolutionary Mechanism for Host Jumps and Immune Evasion. *PLOS Pathogens*, *11*(7), e1004902. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004902>
39. Lowen, A. C. (2018). It's in the mix: Reassortment of segmented viral genomes. *PLOS Pathogens*, *14*(9), e1007200. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007200>
40. Brooke, C. B., Ince, W. L., Wrammert, J., Ahmed, R., Wilson, P. C., Bennink, J. R., & Yewdell, J. W. (2013). Most Influenza A Virions Fail To Express at Least One Essential Viral Protein. *Journal of Virology*, *87*(6), 3155–3162. <https://doi.org/10.1128/JVI.02284-12>
41. Xue, K. S., Hooper, K. A., Ollodart, A. R., Dingens, A. S., & Bloom, J. D. (2016). Cooperation between distinct viral variants promotes growth of H3N2 influenza in cell culture. *eLife*, *5*, e13974. <https://doi.org/10.7554/eLife.13974>
42. Domingo, E., & Perales, C. (2019). Viral quasispecies. *PLOS Genetics*, *15*(10), e1008271. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008271>
43. Domingo, E., & Perales, C. (2018). Quasispecies and virus. *European Biophysics Journal*, *47*(4), 443–457. <https://doi.org/10.1007/s00249-018-1282-6>

44. Sanjuán, R., Cuevas, J. M., Moya, A., & Elena, S. F. (2005). Epistasis and the Adaptability of an RNA Virus. *Genetics*, *170*(3), 1001–1008. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.040741>
45. Bordería, A. V., Isakov, O., Moratorio, G., Henningsson, R., Agüera-González, S., Organtini, L., ... Vignuzzi, M. (2015). Group Selection and Contribution of Minority Variants during Virus Adaptation Determines Virus Fitness and Phenotype. *PLOS Pathogens*, *11*(5), e1004838. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004838>
46. Tanner, E. J., Liu, H., Oberste, M. S., Pallansch, M., Collett, M. S., & Kirkegaard, K. (2014). Dominant drug targets suppress the emergence of antiviral resistance. *eLife*, *3*, e03830. <https://doi.org/10.7554/eLife.03830>
47. Rezelj, V. V., Levi, L. I., & Vignuzzi, M. (2018). The defective component of viral populations. *Current Opinion in Virology*, *33*, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.07.014>
48. Yang, Y., Lyu, T., Zhou, R., He, X., Ye, K., Xie, Q., ... Zhao, W. (2019). The Antiviral and Antitumor Effects of Defective Interfering Particles/Genomes and Their Mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1852. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01852>
49. Zhong, P., Agosto, L. M., Munro, J. B., & Mothes, W. (2013). Cell-to-cell transmission of viruses. *Current Opinion in Virology*, *3*(1), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.11.004>
50. Thoulouze, M.-I., & Alcover, A. (2011). Can viruses form biofilms? *Trends in Microbiology*, *19*(6), 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.03.002>
51. Krakauer, D. C., & Sasaki, A. (2006). The greater than twofold cost of integration for retroviruses. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *273*(1590), 1159–1163. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3322>
52. Negroni, M., & Buc, H. (2001). Mechanisms of Retroviral Recombination. *Annual Review of Genetics*, *35*(1), 275–302. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.090551>
53. Rager, M. (2002). Polyploid measles virus with hexameric genome length. *The EMBO Journal*, *21*(10), 2364–2372. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.10.2364>
54. Mutoloki, S., Jøssund, T. B., Ritchie, G., Munang'andu, H. M., & Evensen, Ø. (2016). Infectious Pancreatic Necrosis Virus Causing Clinical and Subclinical Infections in Atlantic Salmon Have Different Genetic Fingerprints. *Frontiers in Microbiology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01393>

55. Lago, M., Rodríguez, J. F., Bandín, I., & Dopazo, C. P. (2016). Aquabirnavirus polyploidy: a new strategy to modulate virulence? *Journal of General Virology*, *97*(5), 1168–1177. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000434>
56. Beniac, D. R., Melito, P. L., deVarenes, S. L., Hiebert, S. L., Rabb, M. J., Lamboo, L. L., ... Booth, T. F. (2012). The Organisation of Ebola Virus Reveals a Capacity for Extensive, Modular Polyploidy. *PLoS ONE*, *7*(1), e29608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029608>
57. Gerba, C. P., & Betancourt, W. Q. (2017). Viral Aggregation: Impact on Virus Behavior in the Environment. *Environmental Science & Technology*, *51*(13), 7318–7325. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05835>
58. Hirst, J. C., & Hutchinson, E. C. (2019). Single-particle measurements of filamentous influenza virions reveal damage induced by freezing. *Journal of General Virology*. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001330>
59. Gutierrez, L., & Nguyen, T. H. (2012). Interactions between Rotavirus and Suwannee River Organic Matter: Aggregation, Deposition, and Adhesion Force Measurement. *Environmental Science & Technology*, *46*(16), 8705–8713. <https://doi.org/10.1021/es301336u>
60. Anschau, V., & Sanjuán, R. (2020). Fibrinogen Gamma Chain Promotes Aggregation of Vesicular Stomatitis Virus in Saliva. *Viruses*, *12*(3), 282. <https://doi.org/10.3390/v12030282>
61. Usmani, S. M., Zirafi, O., Müller, J. A., Sandi-Monroy, N. L., Yadav, J. K., Meier, C., ... Münch, J. (2014). Direct visualization of HIV-enhancing endogenous amyloid fibrils in human semen. *Nature Communications*, *5*(1), 3508. <https://doi.org/10.1038/ncomms4508>
62. Alexander, M. R., Sanders, R. W., Moore, J. P., & Klasse, P. J. (2015). Short Communication: Virion Aggregation by Neutralizing and Nonneutralizing Antibodies to the HIV-1 Envelope Glycoprotein. *AIDS Research and Human Retroviruses*, *31*(11), 1160–1165. <https://doi.org/10.1089/aid.2015.0050>
63. Tirado, S. M. C., & Yoon, K.-J. (2003). Antibody-Dependent Enhancement of Virus Infection and Disease. *Viral Immunology*, *16*(1), 69–86. <https://doi.org/10.1089/088282403763635465>
64. Slack, J., & Arif, B. M. (2006). The Baculoviruses Occlusion-Derived Virus: Virion Structure and Function. In *Advances in Virus Research* (Vol. 69, pp. 99–165). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)69003-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)69003-9)
65. Hirai-Yuki, A., Hensley, L., Whitmire, J. K., & Lemon, S. M. (2016). Biliary Secretion of Quasi-Enveloped Human Hepatitis A Virus. *mBio*, *7*(6), e01998-16, /mbio/7/6/e01998-16.atom. <https://doi.org/10.1128/mBio.01998-16>

66. Graw, F., & Perelson, A. S. (2016). Modeling Viral Spread. *Annual Review of Virology*, 3(1), 555–572. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042249>
67. Dall’Ara, M., Ratti, C., Bouzoubaa, S., & Gilmer, D. (2016). Ins and Outs of Multipartite Positive-Strand RNA Plant Viruses: Packaging versus Systemic Spread. *Viruses*, 8(8), 228. <https://doi.org/10.3390/v8080228>
68. Kumar, D., Kumar, R., Hyun, T. K., & Kim, J.-Y. (2015). Cell-to-cell movement of viruses via plasmodesmata. *Journal of Plant Research*, 128(1), 37–47. <https://doi.org/10.1007/s10265-014-0683-6>
69. Theil, D., Derfuss, T., Paripovic, I., Herberger, S., Meinel, E., Schueler, O., ... Brandt, T. (2003). Latent Herpesvirus Infection in Human Trigeminal Ganglia Causes Chronic Immune Response. *The American Journal of Pathology*, 163(6), 2179–2184. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63575-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63575-4)
70. Zaichick, S., Bohannon, K., & Smith, G. (2011). Alphaherpesviruses and the Cytoskeleton in Neuronal Infections. *Viruses*, 3(7), 941–981. <https://doi.org/10.3390/v3070941>
71. McDonald, D. (2003). Recruitment of HIV and Its Receptors to Dendritic Cell-T Cell Junctions. *Science*, 300(5623), 1295–1297. <https://doi.org/10.1126/science.1084238>
72. Frischknecht, F. (2001). Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization. *Trends in Cell Biology*, 11(1), 30–38. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)01871-7](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01871-7)
73. Condit, R. C. (2010). Surf and Turf: Mechanism of Enhanced Virus Spread During Poxvirus Infection. *Viruses*, 2(5), 1050–1054. <https://doi.org/10.3390/v2051050>
74. Pais-Correia, A.-M., Sachse, M., Guadagnini, S., Robbiati, V., Lasserre, R., Gessain, A., ... Thoulouze, M.-I. (2010). Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nature Medicine*, 16(1), 83–89. <https://doi.org/10.1038/nm.2065>
75. Kumar, N., Sharma, S., Barua, S., Tripathi, B. N., & Rouse, B. T. (2018). Virological and Immunological Outcomes of Coinfections. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), e00111-17, [/cmr/31/4/e00111-17.atom.](https://doi.org/10.1128/CMR.00111-17) <https://doi.org/10.1128/CMR.00111-17>
76. Bergua, M., Zwart, M. P., El-Mohtar, C., Shilts, T., Elena, S. F., & Folimonova, S. Y. (2014). A Viral Protein Mediates Superinfection Exclusion at the Whole-Organism Level but Is Not Required for Exclusion at the Cellular Level. *Journal of Virology*, 88(19), 11327–11338. <https://doi.org/10.1128/JVI.01612-14>

77. Muñoz-González, S., Perez-Simó, M., Muñoz, M., Bohorquez, J. A., Rosell, R., Summerfield, A., ... Ganges, L. (2015). Efficacy of a live attenuated vaccine in classical swine fever virus postnatally persistently infected pigs. *Veterinary Research*, 46(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0209-9>
78. Burivong, P., Pattanakitsakul, S.-N., Thongrunkiat, S., Malasit, P., & Flegel, T. W. (2004). Markedly reduced severity of Dengue virus infection in mosquito cell cultures persistently infected with *Aedes albopictus* densovirus (AalDENV). *Virology*, 329(2), 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.08.032>
79. Rinaldo, C. R., Richter, B. S., Black, P. H., Callery, R., Chess, L., & Hirsch, M. S. (n.d.). Replication of Herpes Simplex Virus and Cytomegalovirus in Human Leukocytes, 8.
80. Bara, J. J., & Muturi, E. J. (2014). Effect of mixed infections of Sindbis and La Crosse viruses on replication of each virus in vitro. *Acta Tropica*, 130, 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.10.016>
81. Alberti, A., Pontisso, P., Chemello, L., Fattovich, G., Benvegnù, L., Belussi, F., & De Mitri, M. S. (1995). The interaction between hepatitis B virus and hepatitis C virus in acute and chronic liver disease. *Journal of Hepatology*, 22(1 Suppl), 38–41.
82. Taylor, L. E., Swan, T., & Mayer, K. H. (2012). HIV Coinfection With Hepatitis C Virus: Evolving Epidemiology and Treatment Paradigms. *Clinical Infectious Diseases*, 55(suppl 1), S33–S42. <https://doi.org/10.1093/cid/cis367>
83. Laskus, T., Radkowski, M., Jablonska, J., Kibler, K., Wilkinson, J., Adair, D., & Rakela, J. (2004). Human immunodeficiency virus facilitates infection/replication of hepatitis C virus in native human macrophages. *Blood*, 103(10), 3854–3859. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-08-2923>
84. Sulkowski, M. S., & Benhamou, Y. (2007). Therapeutic issues in HIV/HCV-coinfected patients. *Journal of Viral Hepatitis*, 14(6), 371–386. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2006.00816.x>
85. Messina, J. P., Brady, O. J., Scott, T. W., Zou, C., Pigott, D. M., Duda, K. A., ... Hay, S. I. (2014). Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends in Microbiology*, 22(3), 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.12.011>
86. Pepin, K. M., Lambeth, K., & Hanley, K. A. (2008). Asymmetric competitive suppression between strains of dengue virus. *BMC Microbiology*, 8(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-28>

87. Kumar, N., Barua, S., Riyesh, T., Chaubey, K. K., Rawat, K. D., Khandelwal, N., ... Sharma, S. (2016). Complexities in isolation and purification of multiple viruses from mixed viral infections: Viral interference, persistence and exclusion. *PloS one*, *11*(5), e0156110.
88. Laufer, M., Mohammad, H., Christ, D. S., Riedel, D., Maiss, E., Varrelmann, M., & Liebe, S. (2018). Fluorescent labelling of Beet necrotic yellow vein virus and Beet soil-borne mosaic virus for co- and superinfection experiments in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of General Virology*, *99*(9), 1321–1330. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001122>
89. Nogales, A., Ávila-Pérez, G., Rangel-Moreno, J., Chiem, K., DeDiego, M. L., & Martínez-Sobrido, L. (2019). A Novel Fluorescent and Bioluminescent Bireporter Influenza A Virus To Evaluate Viral Infections. *Journal of Virology*, *93*(10), e00032-19, <https://doi.org/10.1128/JVI.00032-19>.
90. Dumm, R. E., & Heaton, N. S. (2019). The Development and Use of Reporter Influenza B Viruses. *Viruses*, *11*(8), 736. <https://doi.org/10.3390/v11080736>
91. Kim, J. H., Lee, S.-R., Li, L.-H., Park, H.-J., Park, J.-H., Lee, K. Y., ... Choi, S.-Y. (2011). High Cleavage Efficiency of a 2A Peptide Derived from Porcine Teschovirus-1 in Human Cell Lines, Zebrafish and Mice. *PLoS ONE*, *6*(4), e18556. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018556>
92. Dou, D., Hernández-Neuta, I., Wang, H., Östbye, H., Qian, X., Thiele, S., ... Daniels, R. (2017). Analysis of IAV Replication and Co-infection Dynamics by a Versatile RNA Viral Genome Labeling Method. *Cell Reports*, *20*(1), 251–263. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.021>
93. Bonar, M. M., & Tilton, J. C. (2017). High sensitivity detection and sorting of infectious human immunodeficiency virus (HIV-1) particles by flow virometry. *Virology*, *505*, 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.02.016>
94. Hause, B. M., Collin, E. A., Liu, R., Huang, B., Sheng, Z., Lu, W., ... Li, F. (2014). Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine: Proposal for a New Genus in the Orthomyxoviridae Family. *mBio*, *5*(2), e00031-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.00031-14>
95. Krammer, F., Smith, G. J. D., Fouchier, R. A. M., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, P. C., ... García-Sastre, A. (2018). Influenza. *Nature Reviews Disease Primers*, *4*(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>
96. Wendel, I., Matrosovich, M., & Klenk, H. D. (2015). SnapShot: Evolution of Human Influenza A Viruses. *Cell Host & Microbe*, *17*(3), 416-416.e1. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.02.001>

97. Sharma, L., Rebaza, A., & Dela Cruz, C. S. (2019). When “B” becomes “A”: the emerging threat of influenza B virus. *European Respiratory Journal*, *54*(2), 1901325. <https://doi.org/10.1183/13993003.01325-2019>
98. Su, S., Fu, X., Li, G., Kerlin, F., & Veit, M. (2017). Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence*, *8*(8), 1580–1591. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1365216>
99. White, S. K., Ma, W., McDaniel, C. J., Gray, G. C., & Lednicky, J. A. (2016). Serologic evidence of exposure to influenza D virus among persons with occupational contact with cattle. *Journal of Clinical Virology*, *81*, 31–33. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.05.017>
100. Hurt, A. C., Su, Y. C. F., Aban, M., Peck, H., Lau, H., Baas, C., ... Gonzalez-Acuna, D. (2016). Evidence for the Introduction, Reassortment, and Persistence of Diverse Influenza A Viruses in Antarctica. *Journal of Virology*, *90*(21), 9674–9682. <https://doi.org/10.1128/JVI.01404-16>
101. Hurt, A. C., Vijaykrishna, D., Butler, J., Baas, C., Maurer-Stroh, S., Silva-de-la-Fuente, M. C., ... Gonzalez-Acuna, D. (2014). Detection of Evolutionarily Distinct Avian Influenza A Viruses in Antarctica. *mBio*, *5*(3), e01098-14, mBio.01098-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01098-14>
102. Long, J. S., Mistry, B., Haslam, S. M., & Barclay, W. S. (2019). Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(2), 67–81. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0115-z>
103. Kosik, I., & Yewdell, J. W. (2019). Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase: Yin–Yang Proteins Coevolving to Thwart Immunity. *Viruses*, *11*(4), 346. <https://doi.org/10.3390/v11040346>
104. Tong, S., Li, Y., Rivaller, P., Conrardy, C., Castillo, D. A. A., Chen, L.-M., ... Donis, R. O. (2012). A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(11), 4269–4274. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116200109>
105. Tong, S., Zhu, X., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Bourgeois, M., ... Donis, R. O. (2013). New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLoS Pathogens*, *9*(10), e1003657. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003657>
106. Rota, P. A., Wallis, T. R., Harmon, M. W., Rota, J. S., Kendal, A. P., & Nerome, K. (1990). Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology*, *175*(1), 59–68. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90186-U](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90186-U)

107. CDC. (2019, November 18). Types of Influenza Viruses. *Centers for Disease Control and Prevention*. Retrieved March 17, 2020, from <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>
108. Vijaykrishna, D., Holmes, E. C., Joseph, U., Fourment, M., Su, Y. C., Halpin, R., ... Barr, I. G. (2015). The contrasting phylodynamics of human influenza B viruses. *eLife*, *4*, e05055. <https://doi.org/10.7554/eLife.05055>
109. Biere, B., Bauer, B., & Schweiger, B. (2010). Differentiation of Influenza B Virus Lineages Yamagata and Victoria by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*(4), 1425–1427. <https://doi.org/10.1128/JCM.02116-09>
110. A revision of the system of nomenclature for influenza virus: a WHO Memorandum. (1980). *Bulletin of the World Health Organization*, *58*(4), 585–591.
111. Klimov, A. I., Garten, R., Russell, C., Barr, I. G., Besselaar, T. G., Daniels, R., ... Cox, N. (2012). WHO recommendations for the viruses to be used in the 2012 Southern Hemisphere Influenza Vaccine: Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from February to September 2011. *Vaccine*, *30*(45), 6461–6471. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.07.089>
112. Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H., & Daniels, R. (2018). Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1581. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01581>
113. Vijayakrishnan, S., Loney, C., Jackson, D., Suphamungmee, W., Rixon, F. J., & Bhella, D. (2013). Cryotomography of Budding Influenza A Virus Reveals Filaments with Diverse Morphologies that Mostly Do Not Bear a Genome at Their Distal End. *PLoS Pathogens*, *9*(6), e1003413. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003413>
114. Badham, M. D., & Rossman, J. S. (2016). Filamentous Influenza Viruses. *Current Clinical Microbiology Reports*, *3*(3), 155–161. <https://doi.org/10.1007/s40588-016-0041-7>
115. Archetti, I. (1955). Appearances associated with filamentous forms of influenza viruses. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, *6*(1), 29–35. <https://doi.org/10.1007/BF01242050>
116. Kordyukova, L. V., Mintaev, R. R., Rtishchev, A. A., Kunda, M. S., Ryzhova, N. N., Abramchuk, S. S., ... Voronina, O. L. (2020). Filamentous versus Spherical Morphology: A Case Study of the Recombinant A/WSN/33 (H1N1) Virus. *Microscopy and Microanalysis*, 1–13. <https://doi.org/10.1017/S1431927620000069>
117. Dadonaite, B., Vijayakrishnan, S., Fodor, E., Bhella, D., & Hutchinson, E. C. (2016). Filamentous influenza viruses. *Journal of General Virology*, *97*(8), 1755–1764. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000535>

118. Noda, T. (2012). Native Morphology of Influenza Virions. *Frontiers in Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00269>
119. Katz, G., Benkarroum, Y., Wei, H., Rice, W. J., Bucher, D., Alimova, A., ... Gottlieb, P. (2014). Morphology of Influenza B/Lee/40 Determined by Cryo-Electron Microscopy. *PLoS ONE*, 9(2), e88288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088288>
120. Gulati, N. M., Gallagher, J. R., McCraw, D. M., & Harris, A. K. (2019). Probing the Structural Organization of Virions and Genomic Ribonucleoprotein Complexes from Type B Influenza Virus by Cryo-electron Microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, 25(S2), 1302–1303. <https://doi.org/10.1017/S1431927619007244>
121. R. W. Horne, Waterson, A. P., Wildy, P., & Farnham, A. E. (1960). The structure and composition of the Myxoviruses. *Virology*, 11(1), 78–98. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(60\)90056-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(60)90056-8)
122. Sautto, G. A., Kirchenbaum, G. A., & Ross, T. M. (2018). Towards a universal influenza vaccine: different approaches for one goal. *Virology Journal*, 15(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0918-y>
123. Vahey, M. D., & Fletcher, D. A. (2019). Low-Fidelity Assembly of Influenza A Virus Promotes Escape from Host Cells. *Cell*, 176(1–2), 281-294.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.056>
124. Shaw, M. L., Stone, K. L., Colangelo, C. M., Gulcicek, E. E., & Palese, P. (2008). Cellular Proteins in Influenza Virus Particles. *PLoS Pathogens*, 4(6), e1000085. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000085>
125. Hutchinson, E. C., Charles, P. D., Hester, S. S., Thomas, B., Trudgian, D., Martínez-Alonso, M., & Fodor, E. (2014). Conserved and host-specific features of influenza virion architecture. *Nature Communications*, 5(1), 4816. <https://doi.org/10.1038/ncomms5816>
126. Noda, T., Murakami, S., Nakatsu, S., Imai, H., Muramoto, Y., Shindo, K., ... Kawaoka, Y. (2018). Importance of the 1+7 configuration of ribonucleoprotein complexes for influenza A virus genome packaging. *Nature Communications*, 9(1), 54. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02517-w>
127. Dadonaite, B., Gilbertson, B., Knight, M. L., Trifkovic, S., Rockman, S., Laederach, A., ... Bauer, D. L. V. (2019). The structure of the influenza A virus genome. *Nature Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0513-7>

128. Elleman, C. J., & Barclay, W. S. (2004). The M1 matrix protein controls the filamentous phenotype of influenza A virus. *Virology*, *321*(1), 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.12.009>
129. Bourmakina, S. V. (2003). Reverse genetics studies on the filamentous morphology of influenza A virus. *Journal of General Virology*, *84*(3), 517–527. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18803-0>
130. Dahmani, I., Ludwig, K., & Chiantia, S. (2019). Influenza A matrix protein M1 induces lipid membrane deformation via protein multimerization. *Bioscience Reports*, *39*(8), BSR20191024. <https://doi.org/10.1042/BSR20191024>
131. Nakatsu, S., Murakami, S., Shindo, K., Horimoto, T., Sagara, H., Noda, T., & Kawaoka, Y. (2018). Influenza C and D viruses package eight organized ribonucleoprotein complexes. *Journal of virology*, *92*(6), e02084–17.
132. Brooke, C. B. (2014). Biological activities of “noninfectious” influenza A virus particles. *Future Virology*, *9*(1), 41–51. <https://doi.org/10.2217/fvl.13.118>
133. Bouvier, N. M., & Palese, P. (2008). The biology of influenza viruses. *Vaccine*, *26 Suppl 4*, D49–53. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.039>
134. Kamal, R., Alymova, I., & York, I. (2017). Evolution and Virulence of Influenza A Virus Protein PB1-F2. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(1), 96. <https://doi.org/10.3390/ijms19010096>
135. Huang, X., Zheng, M., Wang, P., Mok, B. W.-Y., Liu, S., Lau, S.-Y., ... Chen, H. (2017). An NS-segment exonic splicing enhancer regulates influenza A virus replication in mammalian cells. *Nature Communications*, *8*(1), 14751. <https://doi.org/10.1038/ncomms14751>
136. Inglis, S. C., & Brown, C. M. (1981). Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus. *Nucleic Acids Research*, *9*(12), 2727–2740. <https://doi.org/10.1093/nar/9.12.2727>
137. Dubois, J., Terrier, O., & Rosa-Calatrava, M. (2014). Influenza Viruses and mRNA Splicing: Doing More with Less. *mBio*, *5*(3), e00070-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.00070-14>
138. Vasin, A. V., Temkina, O. A., Egorov, V. V., Klotchenko, S. A., Plotnikova, M. A., & Kiselev, O. I. (2014). Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: An overview of recently discovered proteins. *Virus Research*, *185*, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.015>

139. Artarini, A., Meyer, M., Shin, Y. J., Huber, K., Hilz, N., Bracher, F., ... Karlas, A. (2019). Regulation of influenza A virus mRNA splicing by CLK1. *Antiviral Research*, *168*, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.06.003>
140. Ashraf, U., Benoit-Pilven, C., Lacroix, V., Navratil, V., & Naffakh, N. (2019). Advances in Analyzing Virus-Induced Alterations of Host Cell Splicing. *Trends in Microbiology*, *27*(3), 268–281. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.11.004>
141. Dubois, J., Traversier, A., Julien, T., Padey, B., Lina, B., Bourdon, J.-C., ... Terrier, O. (2019). The Nonstructural NS1 Protein of Influenza Viruses Modulates TP53 Splicing through Host Factor CPSF4. *Journal of Virology*, *93*(7), e02168-18, /jvi/93/7/JVI.02168-18.atom. <https://doi.org/10.1128/JVI.02168-18>
142. Bogdanow, B., Wang, X., Eichelbaum, K., Sadewasser, A., Husic, I., Paki, K., ... Selbach, M. (2019). The dynamic proteome of influenza A virus infection identifies M segment splicing as a host range determinant. *Nature Communications*, *10*(1), 5518. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13520-8>
143. Yamayoshi, S., Watanabe, M., Goto, H., & Kawaoka, Y. (2016). Identification of a Novel Viral Protein Expressed from the PB2 Segment of Influenza A Virus. *Journal of Virology*, *90*(1), 444–456. <https://doi.org/10.1128/JVI.02175-15>
144. Wise, H. M., Hutchinson, E. C., Jagger, B. W., Stuart, A. D., Kang, Z. H., Robb, N., ... Digard, P. (2012). Identification of a Novel Splice Variant Form of the Influenza A Virus M2 Ion Channel with an Antigenically Distinct Ectodomain. *PLoS Pathogens*, *8*(11), e1002998. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002998>
145. Shih, S. R., Nemeroff, M. E., & Krug, R. M. (1995). The choice of alternative 5' splice sites in influenza virus M1 mRNA is regulated by the viral polymerase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(14), 6324–6328. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.14.6324>
146. Hale, B. G., Randall, R. E., Ortín, J., & Jackson, D. (2008). The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *Journal of General Virology*, *89*(10), 2359–2376. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/004606-0>
147. Selman, M., Dankar, S. K., Forbes, N. E., Jia, J.-J., & Brown, E. G. (2012). Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing. *Emerging Microbes & Infections*, *1*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/emi.2012.38>

148. Conenello, G. M., Tisoncik, J. R., Rosenzweig, E., Varga, Z. T., Palese, P., & Katze, M. G. (2011). A Single N66S Mutation in the PB1-F2 Protein of Influenza A Virus Increases Virulence by Inhibiting the Early Interferon Response In Vivo. *Journal of Virology*, *85*(2), 652–662. <https://doi.org/10.1128/JVI.01987-10>
149. Chen, W., Calvo, P. A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., ... Yewdell, J. W. (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature Medicine*, *7*(12), 1306–1312. <https://doi.org/10.1038/nm1201-1306>
150. Conenello, G. M., & Palese, P. (2007). Influenza A Virus PB1-F2: A Small Protein with a Big Punch. *Cell Host & Microbe*, *2*(4), 207–209. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.09.010>
151. Krumbholz, A., Philipps, A., Oehring, H., Schwarzer, K., Eitner, A., Wutzler, P., & Zell, R. (2011). Current knowledge on PB1-F2 of influenza A viruses. *Medical Microbiology and Immunology*, *200*(2), 69–75. <https://doi.org/10.1007/s00430-010-0176-8>
152. Wang, Q., Li, Q., Liu, T., Chang, G., Sun, Z., Gao, Z., ... Zhao, G. (2018). Host Interaction Analysis of PA-N155 and PA-N182 in Chicken Cells Reveals an Essential Role of UBA52 for Replication of H5N1 Avian Influenza Virus. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 936. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00936>
153. Yewdell, J. W., & Ince, W. L. (2012). Frameshifting to PA-X Influenza. *Science*, *337*(6091), 164–165. <https://doi.org/10.1126/science.1225539>
154. Jagger, B. W., Wise, H. M., Kash, J. C., Walters, K.-A., Wills, N. M., Xiao, Y.-L., ... Digard, P. (2012). An Overlapping Protein-Coding Region in Influenza A Virus Segment 3 Modulates the Host Response. *Science*, *337*(6091), 199–204. <https://doi.org/10.1126/science.1222213>
155. Hickman, H. D., Mays, J. W., Gibbs, J., Kosik, I., Magadán, J. G., Takeda, K., ... Yewdell, J. W. (2018). Influenza A Virus Negative Strand RNA Is Translated for CD8⁺ T Cell Immunosurveillance. *The Journal of Immunology*, *201*(4), 1222–1228. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800586>
156. Marion Declercq. (2019, September 16). *Host RNA degradation pathways and influenza A virus interplay: Identification of a major role of the cellular exonuclease ERI1 in the influenza A virus life cycle*. Université de Paris - ED BioSPC 562, Paris.
157. Muramoto, Y., Noda, T., Kawakami, E., Akkina, R., & Kawaoka, Y. (2013). Identification of Novel Influenza A Virus Proteins Translated from PA mRNA. *Journal of Virology*, *87*(5), 2455–2462. <https://doi.org/10.1128/JVI.02656-12>

158. Klemm, C., Boergeling, Y., Ludwig, S., & Ehrhardt, C. (2018). Immunomodulatory Nonstructural Proteins of Influenza A Viruses. *Trends in Microbiology*, 26(7), 624–636. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.12.006>
159. Vahey, M. D., & Fletcher, D. A. (2019). Low-Fidelity Assembly of Influenza A Virus Promotes Escape from Host Cells. *Cell*, 176(1–2), 281–294.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.056>
160. van de Sandt, C. E., Bodewes, R., Rimmelzwaan, G. F., & de Vries, R. D. (2015). Influenza B viruses: not to be discounted. *Future Microbiology*, 10(9), 1447–1465. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.65>
161. To, J., & Torres, J. (2019). Viroporins in the Influenza Virus. *Cells*, 8(7), 654. <https://doi.org/10.3390/cells8070654>
162. Mandala, V. S., Liao, S.-Y., Gelenter, M. D., & Hong, M. (2019). The Transmembrane Conformation of the Influenza B Virus M2 Protein in Lipid Bilayers. *Scientific Reports*, 9(1), 3725. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40217-1>
163. Haines-Menges, B. L., Whitaker, W. B., Lubin, J. B., & Boyd, E. F. (2015). Host Sialic Acids: A Delicacy for the Pathogen with Discerning Taste. *Microbiology Spectrum*, 3(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MBP-0005-2014>
164. de Graaf, M., & Fouchier, R. A. M. (2014). Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *The EMBO Journal*, 33(8), 823–841. <https://doi.org/10.1002/embj.201387442>
165. Kumlin, U., Olofsson, S., Dimock, K., & Arnberg, N. (2008). Sialic acid tissue distribution and influenza virus tropism. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2(5), 147–154. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2008.00051.x>
166. Wang, Q., Tian, X., Chen, X., & Ma, J. (2007). Structural basis for receptor specificity of influenza B virus hemagglutinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(43), 16874–16879. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708363104>
167. Russell, C. J., Hu, M., & Okda, F. A. (2018). Influenza Hemagglutinin Protein Stability, Activation, and Pandemic Risk. *Trends in Microbiology*, 26(10), 841–853. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.03.005>
168. Matlin, K. S., Reggio, H., Helenius, A., & Simons, K. (1981). Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *The Journal of Cell Biology*, 91(3), 601–613. <https://doi.org/10.1083/jcb.91.3.601>

169. de Vries, E., Tscherne, D. M., Wienholts, M. J., Cobos-Jiménez, V., Scholte, F., García-Sastre, A., ... de Haan, C. A. M. (2011). Dissection of the Influenza A Virus Endocytic Routes Reveals Macropinocytosis as an Alternative Entry Pathway. *PLoS Pathogens*, 7(3), e1001329. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001329>
170. Sieczkarski, S. B., & Whittaker, G. R. (2002). Influenza Virus Can Enter and Infect Cells in the Absence of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Journal of Virology*, 76(20), 10455–10464. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.20.10455-10464.2002>
171. Miyake, Y., Keusch, J. J., Decamps, L., Ho-Xuan, H., Iketani, S., Gut, H., ... Yamauchi, Y. (2019). Influenza virus uses transportin 1 for vRNP debundling during cell entry. *Nature Microbiology*, 4(4), 578–586. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0332-2>
172. Eisfeld, A. J., Neumann, G., & Kawaoka, Y. (2015). At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 28–41. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3367>
173. Walker, A. P., & Fodor, E. (2019). Interplay between Influenza Virus and the Host RNA Polymerase II Transcriptional Machinery. *Trends in Microbiology*, 27(5), 398–407. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.013>
174. Pflug, A., Lukarska, M., Resa-Infante, P., Reich, S., & Cusack, S. (2017). Structural insights into RNA synthesis by the influenza virus transcription-replication machine. *Virus Research*, 234, 103–117. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.01.013>
175. York, A., & Fodor, E. (2013). Biogenesis, assembly, and export of viral messenger ribonucleoproteins in the influenza A virus infected cell. *RNA Biology*, 10(8), 1274–1282. <https://doi.org/10.4161/rna.25356>
176. Fodor, E., & te Velhuis, A. J. W. (2019). Structure and Function of the Influenza Virus Transcription and Replication Machinery. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, a038398. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038398>
177. Paterson, D., & Fodor, E. (2012). Emerging Roles for the Influenza A Virus Nuclear Export Protein (NEP). *PLoS Pathogens*, 8(12), e1003019. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003019>
178. Chaimayo, C., Hayashi, T., Underwood, A., Hodges, E., & Takimoto, T. (2017). Selective incorporation of vRNP into influenza A virions determined by its specific interaction with M1 protein. *Virology*, 505, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.02.008>
179. Amorim, M. J. (2019). A Comprehensive Review on the Interaction Between the Host GTPase Rab11 and Influenza A Virus. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 176. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00176>

180. de Castro Martin, I. F., Fournier, G., Sachse, M., Pizarro-Cerda, J., Risco, C., & Naffakh, N. (2017). Influenza virus genome reaches the plasma membrane via a modified endoplasmic reticulum and Rab11-dependent vesicles. *Nature Communications*, *8*(1), 1396. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01557-6>
181. Rossman, J. S., Jing, X., Leser, G. P., & Lamb, R. A. (2010). Influenza Virus M2 Protein Mediates ESCRT-Independent Membrane Scission. *Cell*, *142*(6), 902–913. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.029>
182. Air, G. M. (2012). Influenza neuraminidase: Influenza neuraminidase. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, *6*(4), 245–256. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2011.00304.x>
183. Du, R., Cui, Q., & Rong, L. (2019). Competitive Cooperation of Hemagglutinin and Neuraminidase during Influenza A Virus Entry. *Viruses*, *11*(5), 458. <https://doi.org/10.3390/v11050458>
184. Böttcher-Friebertshäuser, E., Garten, W., Matrosovich, M., & Klenk, H. D. (2014). The Hemagglutinin: A Determinant of Pathogenicity. In R. W. Compans & M. B. A. Oldstone (Eds.), *Influenza Pathogenesis and Control - Volume I* (Vol. 385, pp. 3–34). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/82_2014_384
185. Webster, R. G., Yakhno, M., Hinshaw, V. S., Bean, W. J., & Copal Murti, K. (1978). Intestinal influenza: Replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology*, *84*(2), 268–278. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(78\)90247-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(78)90247-7)
186. Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M., & Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*, *56*(1), 152–179.
187. Osterhaus, A. D. (2000). Influenza B Virus in Seals. *Science*, *288*(5468), 1051–1053. <https://doi.org/10.1126/science.288.5468.1051>
188. Zhai, S.-L., Zhang, H., Chen, S.-N., Zhou, X., Lin, T., Liu, R., ... Li, F. (2017). Influenza D Virus in Animal Species in Guangdong Province, Southern China. *Emerging Infectious Diseases*, *23*(8), 1392–1396. <https://doi.org/10.3201/eid2308.170059>
189. Bui, C., Bethmont, A., Chughtai, A. A., Gardner, L., Sarkar, S., Hassan, S., ... MacIntyre, C. R. (2016). A Systematic Review of the Comparative Epidemiology of Avian and Human Influenza A H5N1 and H7N9 - Lessons and Unanswered Questions. *Transboundary and Emerging Diseases*, *63*(6), 602–620. <https://doi.org/10.1111/tbed.12327>
190. Shi, Y., Wu, Y., Zhang, W., Qi, J., & Gao, G. F. (2014). Enabling the “host jump”: structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(12), 822–831. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3362>

191. Lee, J., Wang, L., Palinski, R., Walsh, T., He, D., Li, Y., ... Ma, W. (2019). Comparison of Pathogenicity and Transmissibility of Influenza B and D Viruses in Pigs. *Viruses*, *11*(10), 905. <https://doi.org/10.3390/v11100905>
192. Iuliano, A. D., Roguski, K. M., Chang, H. H., Muscatello, D. J., Palekar, R., Tempia, S., ... Mustaquim, D. (2018). Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *The Lancet*, *391*(10127), 1285–1300. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33293-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33293-2)
193. Rynda-Apple, A., Robinson, K. M., & Alcorn, J. F. (2015). Influenza and Bacterial Superinfection: Illuminating the Immunologic Mechanisms of Disease. *Infection and Immunity*, *83*(10), 3764–3770. <https://doi.org/10.1128/IAI.00298-15>
194. Killingley, B., & Nguyen-Van-Tam, J. (2013). Routes of influenza transmission. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, *7*, 42–51. <https://doi.org/10.1111/irv.12080>
195. Chow, E. J., Doyle, J. D., & Uyeki, T. M. (2019). Influenza virus-related critical illness: prevention, diagnosis, treatment. *Critical Care*, *23*(1), 214. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2491-9>
196. Shie, J.-J., & Fang, J.-M. (2019). Development of effective anti-influenza drugs: congeners and conjugates – a review. *Journal of Biomedical Science*, *26*(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0567-0>
197. Yen, H.-L. (2016). Current and novel antiviral strategies for influenza infection. *Current Opinion in Virology*, *18*, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.05.004>
198. Hussain, M., Galvin, H., Haw, T. Y., Nutsford, A., & Husain, M. (2017). Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management. *Infection and Drug Resistance*, *Volume 10*, 121–134. <https://doi.org/10.2147/IDR.S105473>
199. Furuta, Y., Gowen, B. B., Takahashi, K., Shiraki, K., Smee, D. F., & Barnard, D. L. (2013). Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Research*, *100*(2), 446–454. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.015>
200. Clark, M. P., Ledeboer, M. W., Davies, I., Byrn, R. A., Jones, S. M., Perola, E., ... Charifson, P. S. (2014). Discovery of a Novel, First-in-Class, Orally Bioavailable Azaindole Inhibitor (VX-787) of Influenza PB2. *Journal of Medicinal Chemistry*, *57*(15), 6668–6678. <https://doi.org/10.1021/jm5007275>

201. Portsmouth, S., Kawaguchi, K., Arai, M., Tsuchiya, K., & Uehara, T. (2017). Cap-dependent Endonuclease Inhibitor S-033188 for the Treatment of Influenza: Results from a Phase 3, Randomized, Double-Blind, Placebo- and Active-Controlled Study in Otherwise Healthy Adolescents and Adults with Seasonal Influenza. *Open Forum Infectious Diseases*, 4(suppl_1), S734–S734. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx180.001>
202. Fukao, K., Ando, Y., Noshi, T., Kitano, M., Noda, T., Kawai, M., ... Naito, A. (2019). Baloxavir marboxil, a novel cap-dependent endonuclease inhibitor potently suppresses influenza virus replication and represents therapeutic effects in both immunocompetent and immunocompromised mouse models. *PLOS ONE*, 14(5), e0217307. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217307>
203. Haffizulla, J., Hartman, A., Hoppers, M., Resnick, H., Samudrala, S., Ginocchio, C., ... Rossignol, J.-F. (2014). Effect of nitazoxanide in adults and adolescents with acute uncomplicated influenza: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b/3 trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(7), 609–618. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70717-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70717-0)
204. Davidson, S. (2018). Treating Influenza Infection, From Now and Into the Future. *Frontiers in Immunology*, 9, 1946. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01946>
205. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2020-2021 northern hemisphere influenza season. (2020). Retrieved from https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/202002_recommendation.pdf?ua=1
206. Rudenko, L., Yeolekar, L., Kiseleva, I., & Isakova-Sivak, I. (2016). Development and approval of live attenuated influenza vaccines based on Russian master donor viruses: Process challenges and success stories. *Vaccine*, 34(45), 5436–5441. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.08.018>
207. Regan, A. K., Gibbs, R., Bloomfield, L., & Effler, P. V. (2019). Estimating influenza vaccine effectiveness using data routinely available in electronic primary care records. *Vaccine*, 37(5), 755–762. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.12.006>
208. Alfred Harding, & Nicholas Heaton. (2018). Efforts to Improve the Seasonal Influenza Vaccine. *Vaccines*, 6(2), 19. <https://doi.org/10.3390/vaccines6020019>
209. Mezhenkaya, D., Isakova-Sivak, I., & Rudenko, L. (2019). M2e-based universal influenza vaccines: a historical overview and new approaches to development. *Journal of Biomedical Science*, 26(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0572-3>
210. Steinhauer, D. A., & Holland, J. J. (1987). Rapid Evolution of RNA Viruses. *Annual Review of Microbiology*, 41(1), 409–431. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002205>

211. Petrova, V. N., & Russell, C. A. (2018). The evolution of seasonal influenza viruses. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(1), 47–60. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.118>
212. Valesano, A. L., Fitzsimmons, W. J., McCrone, J. T., Petrie, J. G., Monto, A. S., Martin, E. T., & Luring, A. S. (2019). Influenza B Viruses Exhibit Lower Within-Host Diversity than Influenza A Viruses in Human Hosts. *Journal of Virology*, *94*(5). <https://doi.org/10.1128/JVI.01710-19>
213. Lowen, A. C. (2017). Constraints, Drivers, and Implications of Influenza A Virus Reassortment. *Annual Review of Virology*, *4*(1), 105–121. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041726>
214. Marshall, N., Priyamvada, L., Ende, Z., Steel, J., & Lowen, A. C. (2013). Influenza Virus Reassortment Occurs with High Frequency in the Absence of Segment Mismatch. *PLoS Pathogens*, *9*(6), e1003421. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003421>
215. Varble, A., Albrecht, R. A., Backes, S., Crumiller, M., Bouvier, N. M., Sachs, D., ... tenOever, B. R. (2014). Influenza A virus transmission bottlenecks are defined by infection route and recipient host. *Cell host & microbe*, *16*(5), 691–700. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.09.020>
216. Sobel Leonard, A., McClain, M. T., Smith, G. J. D., Wentworth, D. E., Halpin, R. A., Lin, X., ... Koelle, K. (2016). Deep Sequencing of Influenza A Virus from a Human Challenge Study Reveals a Selective Bottleneck and Only Limited Intra-host Genetic Diversification. *Journal of Virology*, *90*(24), 11247–11258. <https://doi.org/10.1128/JVI.01657-16>
217. Tao, H., Li, L., White, M. C., Steel, J., & Lowen, A. C. (2015). Influenza A Virus Coinfection through Transmission Can Support High Levels of Reassortment. *Journal of Virology*, *89*(16), 8453–8461. <https://doi.org/10.1128/JVI.01162-15>
218. Tao, H., Steel, J., & Lowen, A. C. (2014). Intra-host Dynamics of Influenza Virus Reassortment. *Journal of Virology*, *88*(13), 7485–7492. <https://doi.org/10.1128/JVI.00715-14>
219. Svinti, V., Cotton, J. A., & McInerney, J. O. (2013). New approaches for unravelling reassortment pathways. *BMC Evolutionary Biology*, *13*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-1>
220. Taubenberger, J. K., & Kash, J. C. (2010). Influenza Virus Evolution, Host Adaptation, and Pandemic Formation. *Cell Host & Microbe*, *7*(6), 440–451. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.009>

221. Taubenberger, J. K., & Morens, D. M. (2009). Pandemic influenza - including a risk assessment of H5N1: -EN- Pandemic influenza - including a risk assessment of H5N1 -FR- Les pandémies de grippe et l'évaluation du risque associé au sous-type H5N1 du virus de l'influenza -ES- Pandemias de influenza y evaluación de riesgos del subtipo H5N1 del virus. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 28(1), 187–202. <https://doi.org/10.20506/rst.28.1.1879>
222. Nakajima, K., Desselberger, U., & Palese, P. (1978). Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950. *Nature*, 274(5669), 334–339. <https://doi.org/10.1038/274334a0>
223. Smith, G. J. D., Bahl, J., Vijaykrishna, D., Zhang, J., Poon, L. L. M., Chen, H., ... Guan, Y. (2009). Dating the emergence of pandemic influenza viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(28), 11709–11712. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904991106>
224. Taubenberger, J. K., Reid, A. H., Lourens, R. M., Wang, R., Jin, G., & Fanning, T. G. (2005). Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature*, 437(7060), 889–893. <https://doi.org/10.1038/nature04230>
225. Klein, E. Y., Monteforte, B., Gupta, A., Jiang, W., May, L., Hsieh, Y.-H., & Dugas, A. (2016). The frequency of influenza and bacterial coinfection: a systematic review and meta-analysis. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 10(5), 394–403. <https://doi.org/10.1111/irv.12398>
226. Pokorski, M. (Ed.). (2013). *Respiratory Regulation - The Molecular Approach* (Vol. 756). Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4549-0>
227. Pokorski, M. (Ed.). (2017). *Influenza and Respiratory Care* (Vol. 968). Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-51712-4>
228. Wu, X., Cai, Y., Huang, X., Yu, X., Zhao, L., Wang, F., ... Zhan, Q. (2020). Co-infection with SARS-CoV-2 and Influenza A Virus in Patient with Pneumonia, China. *Emerging Infectious Diseases*, 26(6), 1324–1326. <https://doi.org/10.3201/eid2606.200299>
229. Nickbakhsh, S., Mair, C., Matthews, L., Reeve, R., Johnson, P. C. D., Thorburn, F., ... Murcia, P. R. (2019). Virus–virus interactions impact the population dynamics of influenza and the common cold. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(52), 27142–27150. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911083116>
230. Murdoch, D. R., Werno, A. M., & Jennings, L. C. (n.d.). Microbiological Diagnosis of Respiratory Illness: Recent Advances, 15.
231. Rohani, P., Earn, D. J., Finkenstädt, B., & Grenfell, B. T. (1998). Population dynamic interference among childhood diseases. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265(1410), 2033–2041. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0537>

232. Ramamurthy, M., Sankar, S., Kannangai, R., Nandagopal, B., & Sridharan, G. (2017). Application of viromics: a new approach to the understanding of viral infections in humans. *VirusDisease*, 28(4), 349–359. <https://doi.org/10.1007/s13337-017-0415-3>
233. Dudas, G., Bedford, T., Lycett, S., & Rambaut, A. (2015). Reassortment between Influenza B Lineages and the Emergence of a Coadapted PB1–PB2–HA Gene Complex. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 162–172. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu287>
234. Boni, M. F., de Jong, M. D., van Doorn, H. R., & Holmes, E. C. (2010). Guidelines for Identifying Homologous Recombination Events in Influenza A Virus. *PLoS ONE*, 5(5), e10434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010434>
235. Essere, B., Yver, M., Gavazzi, C., Terrier, O., Isel, C., Fournier, E., ... Moules, V. (2013). Critical role of segment-specific packaging signals in genetic reassortment of influenza A viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(40), E3840–E3848. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308649110>
236. Villa, M., & Lässig, M. (2017). Fitness cost of reassortment in human influenza. *PLOS Pathogens*, 13(11), e1006685. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006685>
237. Sun, Y., Qin, K., Wang, J., Pu, J., Tang, Q., Hu, Y., ... Liu, J. (2011). High genetic compatibility and increased pathogenicity of reassortants derived from avian H9N2 and pandemic H1N1/2009 influenza viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(10), 4164–4169. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019109108>
238. Diefenbacher, M., Sun, J., & Brooke, C. B. (2018). The parts are greater than the whole: the role of semi-infectious particles in influenza A virus biology. *Current Opinion in Virology*, 33, 42–46. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.07.002>
239. Combe, M., Garijo, R., Geller, R., Cuevas, J. M., & Sanjuán, R. (2015). Single-Cell Analysis of RNA Virus Infection Identifies Multiple Genetically Diverse Viral Genomes within Single Infectious Units. *Cell Host & Microbe*, 18(4), 424–432. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.09.009>
240. Jacobs, N. T., Onuoha, N. O., Antia, A., Steel, J., Antia, R., & Lowen, A. C. (2019). Incomplete influenza A virus genomes occur frequently but are readily complemented during localized viral spread. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11428-x>
241. Sun, J., & Brooke, C. B. (2018). Influenza A Virus Superinfection Potential Is Regulated by Viral Genomic Heterogeneity. *mBio*, 9(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01761-18>

242. Huang, I.-C., Li, W., Sui, J., Marasco, W., Choe, H., & Farzan, M. (2008). Influenza A Virus Neuraminidase Limits Viral Superinfection. *Journal of Virology*, *82*(10), 4834–4843. <https://doi.org/10.1128/JVI.00079-08>
243. Rapport annuel d'activité du Centre National de Référence des infections respiratoires (dont la grippe) - Saison 2017-2018. (n.d.). Retrieved from <https://www.pasteur.fr/fr/file/29356/download>
244. Pérez-García, F., Vásquez, V., de Egea, V., Catalán, P., Rodríguez-Sánchez, B., & Bouza, E. (2016). Influenza A and B co-infection: a case-control study and review of the literature. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *35*(6), 941–946. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2620-1>
245. Gregianini, T. S., Varella, I. R. S., Fisch, P., Martins, L. G., & Veiga, A. B. G. (2019). Dual and Triple Infections With Influenza A and B Viruses: A Case-Control Study in Southern Brazil. *The Journal of Infectious Diseases*, *220*(6), 961–968. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz221>
246. Wanitchang, A., Narkpuk, J., Jaru-ampornpan, P., Jengarn, J., & Jongkaewwattana, A. (2012). Inhibition of influenza A virus replication by influenza B virus nucleoprotein: An insight into interference between influenza A and B viruses. *Virology*, *432*(1), 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.06.016>
247. Baker, S. F., Nogales, A., Finch, C., Tuffy, K. M., Domm, W., Perez, D. R., ... Martinez-Sobrido, L. (2014). Influenza A and B Virus Intertypic Reassortment through Compatible Viral Packaging Signals. *Journal of Virology*, *88*(18), 10778–10791. <https://doi.org/10.1128/JVI.01440-14>
248. Jaru-ampornpan, P., Narkpuk, J., Wanitchang, A., & Jongkaewwattana, A. (2014). Nucleoprotein of influenza B virus binds to its type A counterpart and disrupts influenza A viral polymerase complex formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *443*(1), 296–300. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.100>
249. Laurie, K. L., Guarnaccia, T. A., Carolan, L. A., Yan, A. W. C., Aban, M., Petrie, S., ... Barr, I. G. (2015). Interval Between Infections and Viral Hierarchy Are Determinants of Viral Interference Following Influenza Virus Infection in a Ferret Model. *Journal of Infectious Diseases*, *212*(11), 1701–1710. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv260>
250. Greenbaum, J. A., Kotturi, M. F., Kim, Y., Oseroff, C., Vaughan, K., Salimi, N., ... Peters, B. (2009). Pre-existing immunity against swine-origin H1N1 influenza viruses in the general human population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(48), 20365–20370. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911580106>

251. Heldt, F. S., Kupke, S. Y., Dorl, S., Reichl, U., & Frensing, T. (2015). Single-cell analysis and stochastic modelling unveil large cell-to-cell variability in influenza A virus infection. *Nature Communications*, 6, 8938. <https://doi.org/10.1038/ncomms9938>
252. Kumar, A., Kim, J. H., Ranjan, P., Metcalfe, M. G., Cao, W., Mishina, M., ... Sambhara, S. (2017). Influenza virus exploits tunneling nanotubes for cell-to-cell spread. *Scientific Reports*, 7(1), 40360. <https://doi.org/10.1038/srep40360>
253. Gaymard, A., Le Briand, N., Frobert, E., Lina, B., & Escuret, V. (2016). Functional balance between neuraminidase and haemagglutinin in influenza viruses. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(12), 975–983. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.07.007>
254. Wagner, R., Matrosovich, M., & Klenk, H.-D. (2002). Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Reviews in Medical Virology*, 12(3), 159–166. <https://doi.org/10.1002/rmv.352>
255. Rameix-Welti, M.-A., Enouf, V., Cuvelier, F., Jeannin, P., & van der Werf, S. (2008). Enzymatic Properties of the Neuraminidase of Seasonal H1N1 Influenza Viruses Provide Insights for the Emergence of Natural Resistance to Oseltamivir. *PLoS Pathogens*, 4(7), e1000103. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000103>
256. Collins, P. J., Haire, L. F., Lin, Y. P., Liu, J., Russell, R. J., Walker, P. A., ... Hay, A. J. (2009). Structural basis for oseltamivir resistance of influenza viruses. *Vaccine*, 27(45), 6317–6323. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.017>
257. Zanin, M., Baviskar, P., Webster, R., & Webby, R. (2016). The Interaction between Respiratory Pathogens and Mucus. *Cell Host & Microbe*, 19(2), 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.01.001>
258. Ehre, C., Worthington, E. N., Liesman, R. M., Grubb, B. R., Barbier, D., O’Neal, W. K., ... Boucher, R. C. (2012). Overexpressing mouse model demonstrates the protective role of Muc5ac in the lungs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(41), 16528–16533. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206552109>
259. Kesimer, M., Scull, M., Brighton, B., DeMaria, G., Burns, K., O’Neal, W., ... Sheehan, J. K. (2009). Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: a possible role in innate defense. *The FASEB Journal*, 23(6), 1858–1868. <https://doi.org/10.1096/fj.08-119131>
260. Takehara, S., Yanagishita, M., Podyma-Inoue, K. A., & Kawaguchi, Y. (2013). Degradation of MUC7 and MUC5B in Human Saliva. *PLoS ONE*, 8, e69059. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069059>

261. Limsuwat, N., Suptawiwat, O., Boonarkart, C., Puthavathana, P., Wiriyarat, W., & Auewarakul, P. (2016). Sialic acid content in human saliva and anti-influenza activity against human and avian influenza viruses. *Archives of Virology*, *161*(3), 649–656. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2700-z>
262. Matrosovich, M., Matrosovich, T., Carr, J., Roberts, N. A., & Klenk, H.-D. (2003). Overexpression of the α -2,6-Sialyltransferase in MDCK Cells Increases Influenza Virus Sensitivity to Neuraminidase Inhibitors. *J. VIROL.*, *77*, 8.
263. Walters, M. S., Gomi, K., Ashbridge, B., Moore, M. A. S., Arbelaez, V., Heldrich, J., ... Crystal, R. G. (2013). Generation of a human airway epithelium derived basal cell line with multipotent differentiation capacity. *Respiratory Research*, *14*(1), 135. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-14-135>
264. Biquand, E., Poirson, J., Karim, M., Declercq, M., Malausse, N., Cassonnet, P., ... Demeret, C. (2017). Comparative Profiling of Ubiquitin Proteasome System Interplay with Influenza A Virus PB2 Polymerase Protein Recapitulating Virus Evolution in Humans. *mSphere*, *2*(6). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00330-17>
265. Tran, V., Moser, L. A., Poole, D. S., & Mehle, A. (2013). Highly Sensitive Real-Time In Vivo Imaging of an Influenza Reporter Virus Reveals Dynamics of Replication and Spread. *Journal of Virology*, *87*(24), 13321–13329. <https://doi.org/10.1128/JVI.02381-13>
266. Munier, S., Rolland, T., Diot, C., Jacob, Y., & Naffakh, N. (2013). Exploration of Binary Virus–Host Interactions Using an Infectious Protein Complementation Assay. *Molecular & Cellular Proteomics*, *12*(10), 2845–2855. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.028688>
267. Reece-Hoyes, J. S., & Walhout, A. J. M. (2018). Gateway Recombinational Cloning. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2018*(1), pdb.top094912. <https://doi.org/10.1101/pdb.top094912>
268. Wong, E. H., Smith, D. K., Rabadan, R., Peiris, M., & Poon, L. L. (2010). Codon usage bias and the evolution of influenza A viruses. Codon Usage Biases of Influenza Virus. *BMC Evolutionary Biology*, *10*(1), 253. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-253>
269. Mitnaul, L. J., Matrosovich, M. N., Castrucci, M. R., Tuzikov, A. B., Bovin, N. V., Kobasa, D., & Kawaoka, Y. (2000). Balanced Hemagglutinin and Neuraminidase Activities Are Critical for Efficient Replication of Influenza A Virus. *Journal of Virology*, *74*(13), 6015–6020. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.13.6015-6020.2000>
270. Fukuyama, S., Katsura, H., Zhao, D., Ozawa, M., Ando, T., Shoemaker, J. E., ... Kawaoka, Y. (2015). Multi-spectral fluorescent reporter influenza viruses (Color-flu) as powerful tools for in vivo studies. *Nature Communications*, *6*(1), 6600. <https://doi.org/10.1038/ncomms7600>

271. Breen, M., Nogales, A., Baker, S., & Martínez-Sobrido, L. (2016). Replication-Competent Influenza A Viruses Expressing Reporter Genes. *Viruses*, *8*(7), 179. <https://doi.org/10.3390/v8070179>
272. Furusawa, Y., Yamada, S., da Silva Lopes, T. J., Dutta, J., Khan, Z., Kriti, D., ... Kawaoka, Y. (2019). Influenza Virus Polymerase Mutation Stabilizes a Foreign Gene Inserted into the Virus Genome by Enhancing the Transcription/Replication Efficiency of the Modified Segment. *mBio*, *10*(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01794-19>
273. Whelan, S. P. J. (2008). Vesicular Stomatitis Virus. In *Encyclopedia of Virology (Third Edition)* (Academic Press., pp. 291–299).
274. Bosma, T. J., Karagiannis, K., Santana-Quintero, L., Ilyushina, N., Zagorodnyaya, T., Petrovskaya, S., ... Sauder, C. J. (2019). Identification and quantification of defective virus genomes in high throughput sequencing data using DVG-profiler, a novel post-sequence alignment processing algorithm. *PLOS ONE*, *14*(5), e0216944. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216944>
275. Timm, C., Akpınar, F., Yin, J., & Lyles, D. S. (2014). Quantitative Characterization of Defective Virus Emergence by Deep Sequencing. *Journal of Virology*, *88*(5), 2623–2632. <https://doi.org/10.1128/JVI.02675-13>
276. Alnaji, F. G., Holmes, J. R., Rendon, G., Vera, J. C., Fields, C. J., Martin, B. E., & Brooke, C. B. (2019). Sequencing Framework for the Sensitive Detection and Precise Mapping of Defective Interfering Particle-Associated Deletions across Influenza A and B Viruses. *Journal of Virology*, *93*(11). <https://doi.org/10.1128/JVI.00354-19>
277. Boussier, J., Munier, S., Achouri, E., Crescenzo-Chaigne, B., Behillil, S., Enouf, V., ... Naffakh, N. (2020). RNA-seq accuracy and reproducibility for the mapping and quantification of influenza defective viral genomes. *RNA*, rna.077529.120. <https://doi.org/10.1261/rna.077529.120>
278. Bodewes, R., Nieuwkoop, N. J., Verburgh, R. J., Fouchier, R. A. M., Osterhaus, A. D. M. E., & Rimmelzwaan, G. F. (2012). Use of influenza A viruses expressing reporter genes to assess the frequency of double infections in vitro. *Journal of General Virology*, *93*(Pt_8), 1645–1648. <https://doi.org/10.1099/vir.0.042671-0>
279. Witte, R., Andriasyan, V., Georgi, F., Yakimovich, A., & Greber, U. (2018). Concepts in Light Microscopy of Viruses. *Viruses*, *10*(4), 202. <https://doi.org/10.3390/v10040202>
280. de Vries, E., Du, W., Guo, H., & de Haan, C. A. M. (2020). Influenza A Virus Hemagglutinin–Neuraminidase–Receptor Balance: Preserving Virus Motility. *Trends in Microbiology*, *28*(1), 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.08.010>

281. Vahey, M. D., & Fletcher, D. A. (2019). Influenza A virus surface proteins are organized to help penetrate host mucus. *eLife*, 8, e43764. <https://doi.org/10.7554/eLife.43764>
282. Richard, M., Erny, A., Caré, B., Traversier, A., Barthélémy, M., Hay, A., ... Lina, B. (2012). Rescue of a H3N2 Influenza Virus Containing a Deficient Neuraminidase Protein by a Hemagglutinin with a Low Receptor-Binding Affinity. *PLoS ONE*, 7(5), e33880. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033880>
283. Hooper, K. A., & Bloom, J. D. (2013). A Mutant Influenza Virus That Uses an N1 Neuraminidase as the Receptor-Binding Protein. *Journal of Virology*, 87(23), 12531–12540. <https://doi.org/10.1128/JVI.01889-13>
284. Moulès, V., Terrier, O., Yver, M., Riteau, B., Moriscot, C., Ferraris, O., ... Lina, B. (2011). Importance of viral genomic composition in modulating glycoprotein content on the surface of influenza virus particles. *Virology*, 414(1), 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.03.011>
285. Trebbien, R., Larsen, L. E., & Viuff, B. M. (2011). Distribution of sialic acid receptors and influenza A virus of avian and swine origin in experimentally infected pigs. *Virology Journal*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-434>
286. Dimmock, N. J., & Easton, A. J. (2014). Defective Interfering Influenza Virus RNAs: Time To Reevaluate Their Clinical Potential as Broad-Spectrum Antivirals? *Journal of Virology*, 88(10), 5217–5227. <https://doi.org/10.1128/JVI.03193-13>
287. Vasiljevic, J., Zamarreño, N., Oliveros, J. C., Rodriguez-Frandsen, A., Gómez, G., Rodriguez, G., ... Falcón, A. (2017). Reduced accumulation of defective viral genomes contributes to severe outcome in influenza virus infected patients. *PLOS Pathogens*, 13(10), e1006650. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006650>
288. Fodor, E., Mingay, L. J., Crow, M., Deng, T., & Brownlee, G. G. (2003). A Single Amino Acid Mutation in the PA Subunit of the Influenza Virus RNA Polymerase Promotes the Generation of Defective Interfering RNAs. *Journal of Virology*, 77(8), 5017–5020. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.8.5017-5020.2003>
289. Hatta, M., Goto, H., & Kawaoka, Y. (2004). Influenza B Virus Requires BM2 Protein for Replication. *Journal of Virology*, 78(11), 5576–5583. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.11.5576-5583.2004>
290. Fulton, B. O., Palese, P., & Heaton, N. S. (2015). Replication-Competent Influenza B Reporter Viruses as Tools for Screening Antivirals and Antibodies. *Journal of Virology*, 89(23), 12226–12231. <https://doi.org/10.1128/JVI.02164-15>

291. Narkpuk, J., Jaru-Ampornpan, P., Subali, T., Bertulfo, F. C. T., Wongthida, P., & Jongkaewwattana, A. (2015). Mechanistic study of intertypic nucleoprotein complex formation and its inhibitory effect toward influenza A virus. *Virology*, 485, 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.06.032>
292. Crescenzo-Chaigne, B., Naffakh, N., & van der Werf, S. (1999). Comparative Analysis of the Ability of the Polymerase Complexes of Influenza Viruses Type A, B and C to Assemble into Functional RNPs that Allow Expression and Replication of Heterotypic Model RNA Templates In Vivo. *Virology*, 265(2), 342–353. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0059>