



**UNIVERSITE DE STRASBOURG**  
**École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé**



Ecole Doctorale  
des Sciences  
de la Vie  
et de la Santé  
STRASBOURG

Laboratoire Architecture et Réactivité de l'ARN, UPR 9002 du CNRS, Strasbourg

Laboratoire Virologie et Pathologies Humaines, EMR 4610, Lyon

## **THÈSE DE DOCTORAT**

présentée par

**Cyrille GAVAZZI**

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline : Sciences du Vivant

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

### **MECANISME D'INCORPORATION DES SEGMENTS D'ARN<sub>v</sub> D'UN VIRUS INFLUENZA A AVIAIRE**

**Comparaison avec un virus humain et implication pour le réassortiment génétique**

*Thèse dirigée par le Dr Roland MARQUET et le Pr Bruno LINA*

Présentée et soutenue publiquement le 26 septembre 2011

#### **Membres du jury**

Dr Matteo NEGRONI	Président du jury
Dr Christiane BRANLANT	Rapporteur externe
Dr Nadia NAFFAKH	Rapporteur externe
Dr Roland MARQUET	Directeur de thèse
Pr Bruno LINA	Directeur de thèse



# **AVERTISSEMENT**

Les droits de propriété intellectuelle de l'auteur sont réservés.

Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.





# **Mécanisme d'incorporation des segments d'ARNv d'un virus influenza A aviaire : comparaison avec un virus humain et implication pour le réassortiment génétique**

## **Résumé**

Le génome des virus influenza A est composé de 8 ARN viraux de polarité négative (ARNv). Les données de la littérature suggèrent l'existence de mécanismes spécifiques permettant l'incorporation de 8 ARNv différents et il a été montré que les régions codantes et non codantes aux extrémités des ARNv jouent un rôle essentiel dans ce mécanisme. Nous pensons que l'incorporation des ARNv est gouvernée par des interactions intermoléculaires directes entre certaines de ces régions.

Il a été montré au laboratoire, par des expériences de retard sur gel, que les ARNv d'un virus influenza A humain de sous-type H3N2 interagissent ensemble dans un réseau d'interactions complexes. Le plus souvent, ces interactions se font *via* des régions qui sont proches des extrémités des ARNv et correspondent aux régions définies dans la littérature comme nécessaires à l'incorporation des ARNv. Durant ma thèse, nous avons montré que ce réseau d'interactions n'est pas conservé pour un virus aviaire de sous-type H5N2 et que les régions interagissant sont systématiquement localisées à distance des extrémités des ARNv. Nous avons également démontré qu'une interaction directe entre deux ARNv joue un rôle crucial dans leur incorporation dans les virions.

Avec un doctorant du laboratoire du Pr Lina (Lyon), nous nous sommes intéressés au réassortiment génétique entre les souches précitées. Nous avons montré que des facteurs génomiques limitent le réassortiment génétique et nos résultats suggèrent fortement que ce processus est gouverné par des interactions entre les ARNv des deux souches. Nous proposons donc que les processus de réassortiment génétique et d'incorporation du génome sont intimement liés.

## **Mots clés**

Virus influenza A, grippe, ribonucléoparticule virale, incorporation d'un génome à ARN segmenté, réassortiment génétique, interactions ARN/ARN, génétique inverse, mutations compensatoires

# **Mechanism of incorporation of vRNAs segments of an avian influenza A virus: comparison with a human virus and implications for genetic reassortment.**

## **Summary**

The segmented genome of influenza A viruses is carried by 8 negative sense viral RNAs (vRNAs). Previously published data argue in favor of the existence of specific mechanisms allowing the packaging of a complete set of 8 different vRNAs and it has been shown that coding and non coding regions at the extremities of each vRNA play a key role in this process. We believe that incorporation of the vRNAs segments is governed by direct vRNA-vRNA interactions between these “packaging regions”.

It was previously shown in our laboratory, by electromobility shift assay, that vRNAs of a sub-type H3N2 human influenza A virus interact together in a network of complex interactions. In most cases, these interactions occur via regions closed to the vRNAs extremities and correlate with the “packaging regions” defined by others. During my PhD, we showed that this interaction network is not conserved for a sub-type H5N2 avian influenza A virus and that regions involved in the H5N2 network are always located at a distance from the extremities of the vRNAs. We also proved, for the first time, that a direct interaction between two vRNAs plays a crucial role in their packaging into virions.

With a PhD student from Pr Lina’s laboratory (Lyon), we focused on the genetic reassortment between the two strains mentioned above. For the first time, we highlighted the fact that genomic factors limit genetic reassortment and our results strongly suggest that this process is governed by interactions between the vRNAs of the two strains. Accordingly, we propose that genetic reassortment and genome packaging are intimately linked together.

## **Key words**

Influenza A viruses, flu, viral ribonucleoparticle, incorporation of a segmented RNA genome, genetic reassortment, RNA/RNA interactions, reverse genetic, compensatory mutations

# REMERCIEMENTS

Pour commencer, je tiens à remercier les docteurs Christiane Branlant, Nadia Naffakh et Matteo Negroni d'avoir bien voulu juger mon travail de thèse et d'en être les rapporteurs.

Merci également au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche ainsi qu'à l'Université de Strasbourg pour le financement de ma thèse.

Cette thèse a été réalisée dans l'UPR 9002 du CNRS à Strasbourg, au sein de l'équipe du Dr Roland Marquet, et à Lyon dans le laboratoire de virologie et pathologie humaine dirigé par le Pr Bruno Lina. Un grand merci à mes deux directeurs de thèse, Roland Marquet et Bruno Lina, pour leur encadrement au cours de ma formation doctorale. Je témoigne également ici de ma reconnaissance envers tous les membres de ces laboratoires. J'ai une pensée particulière pour Emilie Fournier qui m'a beaucoup aidé lors de mon arrivée au laboratoire à Strasbourg ainsi que pour Catherine Isel qui m'a encadré quotidiennement durant ma thèse. Mon passage à Lyon a été relativement court mais ce fut une expérience très enrichissante et j'ai beaucoup apprécié de travailler au sein du laboratoire du Pr Lina. Merci à Vincent Moules d'avoir organisé ma venue sur Lyon et de m'avoir encadré tout au long de mon séjour et après. Merci également aux personnes avec qui j'ai étroitement collaboré au cours de ce projet, en premier lieu Matthieu Yver, mais aussi Boris Essere et Fabienne Giroux.

Cette thèse représente l'aboutissement de ma formation académique dans le domaine des sciences de la vie qui a commencé il y a quelques années à Nancy. Je m'y suis initié à la recherche au cours de stages réalisés au laboratoire de maturation des ARN et d'enzymologie moléculaire dirigé par le Dr Christiane Branlant et au laboratoire de génétique humaine dirigé par le Pr Philippe Jonveaux. Je remercie ces deux personnes de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire. Je témoigne aussi de ma gratitude envers les membres de ces laboratoires grâce auxquels j'ai bénéficié d'une formation de qualité. Je suis notamment redevable envers Claire Beneteau, Christophe Philippe et Philippe Jonveaux qui m'ont permis de co-signer une publication dans *Journal of Medical Genetics* (14). Entre ma première et ma deuxième année de master, j'ai émigré à Strasbourg pour y poursuivre ma formation. J'ai été chaleureusement

accueilli à l'IGBMC par le Dr James Stevenin et son équipe pour mon stage de deuxième année de master. James Stevenin et Cyril Bourgeois se sont énormément investis dans mon encadrement et ma préparation aux examens ainsi qu'au concours de l'école doctorale. Merci à vous sans qui je n'aurais peut-être pas pu réaliser cette thèse.

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité d'encadrer des TP et des TD de biochimie à la faculté des sciences de la vie de Strasbourg en tant que moniteur. Je remercie Joern Pütz et Fabrice Michel pour leur confiance et leurs conseils. J'ai également une pensée pour mes collègues moniteurs, et notamment les anciens qui m'ont guidé au début de mon monitorat.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>17</b>
<b>1. Généralités sur les <i>Orthomyxoviridae</i> .....</b>	<b>17</b>
<b>2. Les <i>Influenzavirus A</i> .....</b>	<b>19</b>
2.1. Généralités sur les <i>Influenzavirus A</i> .....	19
2.1.1. Aspects historiques .....	19
2.1.2. Vue d'ensemble d'une particule virale .....	19
2.1.3. La classification des <i>Influenzavirus A</i> en sous-types .....	20
2.1.3. Nomenclature .....	21
2.2. Le génome des <i>Influenzavirus A</i> .....	21
2.2.1. Organisation du génome .....	21
2.2.2. Les protéines codées par le génome viral .....	25
2.3. La structure des particules virales .....	26
2.3.1. La morphologie des particules virales .....	26
2.3.2. Les protéines membranaires et la matrice .....	26
2.3.2.1. Les spicules à la surface du virus .....	27
2.3.2.1.1. La protéine HA .....	29
2.3.2.1.1. La protéine NA .....	30
2.3.2.2. Le canal ionique M2 .....	31
2.3.2.3. La protéine de matrice M1 .....	32
2.3.3. Le cœur des particules virales .....	33
2.3.3.1. Organisation structurale du complexe polymérase .....	33
2.3.3.2. La nucléoprotéine NP .....	35
2.3.3.3. Les RNPv : organisation générale et distribution dans les virions .....	37
2.4. L'infection des cellules hôtes .....	41
2.4.1. Les différentes étapes du cycle viral .....	41
2.4.1.1. Attachement du virus à la cellule hôte et entrée du virus .....	41
2.4.1.2. Fusion membranaire et libération du génome .....	43
2.4.1.3. Import des RNPv dans le noyau .....	43
2.4.1.4. Expression du génome et réplication des RNPv .....	45
2.4.1.4.1. Transcription des ARNv en ARNm et traduction en protéines .....	47
2.4.1.4.3. Le passage de la transcription à la réplication .....	52
2.4.1.5. Export des RNPv néo-synthétisées .....	53
2.4.1.6. Assemblage, bourgeonnement et libération des virions .....	54
2.4.2. L'inhibition des défenses anti-virales .....	56
2.5. Evolution des <i>Influenzavirus A</i> .....	57
2.5.1. Les mécanismes moléculaires permettant l'évolution du virus .....	57
2.5.2. Les conséquences de l'évolution des <i>Influenzavirus A</i> .....	58
2.6. Les vaccins contre la grippe .....	58
<b>3. L'incorporation des RNPv au sein des virions .....</b>	<b>60</b>
3.1. La segmentation du génome : avantages et inconvénients .....	60
3.2. Modèle d'incorporation aléatoire et modèle d'incorporation spécifique .....	60
3.3. Les régions des ARNv nécessaires à leur incorporation dans les virions .....	62
3.3.1. Les ARN défectifs-interférents sont incorporés dans les virions .....	62
3.3.1.1. Description des ARN défectifs-interférents .....	62
3.3.1.2. Le mécanisme d'action des ARN DI .....	63
3.3.2. Identification des régions nécessaires à l'incorporation des ARNv .....	66
3.3.2.1. Le rôle des régions non codantes des ARNv dans leur incorporation .....	66
3.3.2.1.1. Le rôle des régions U12 et U13 dans l'incorporation des ARNv .....	66
3.3.2.1.2. Le rôle des régions non codantes spécifiques de chaque ARNv .....	67
3.3.2.2. Le rôle des régions codantes des ARNv dans leur incorporation .....	68

3.3.2.2.1. Les extrémités des régions codantes .....	68
3.3.2.2.1.1. Les extrémités de la région codante de l'ARNv 1 (PB2) .....	70
3.3.2.2.1.2. Les extrémités des régions codantes de l'ARNv 2 (PB1) .....	70
3.3.2.2.1.3. Les extrémités de la région codante de l'ARNv 3 (PA) .....	71
3.3.2.2.1.4. Les extrémités de la région codante de l'ARNv 4 (HA) .....	71
3.3.2.2.1.5. Les extrémités de la région codante de l'ARNv 5 (NP) .....	72
3.3.2.2.1.6. Les extrémités de la région codante de l'ARNv 6 (NA) .....	72
3.3.2.2.1.7. Les extrémités des régions codantes de l'ARNv 7 (M) .....	72
3.3.2.2.1.8. Les extrémités des régions codantes de l'ARNv 8 (NS) .....	73
3.3.2.2.1.9. Bilan : les régions non codantes et les extrémités des régions codantes des ARNv sont indispensables à leur incorporation dans les particules virales .....	73
3.3.2.2.2. La partie centrale des régions codantes .....	74
3.3.3. La maîtrise de l'incorporation de gènes d'intérêt dans les virions .....	75
3.4. La conservation des séquences au niveau des régions des ARNv dédiées à leur incorporation .....	76
3.5. L'absence d'un ARNv affecte la réplication virale .....	79
3.5.1. Un jeu complet de 8 ARNv est requis pour une réplication optimale .....	79
3.5.2. La baisse d'incorporation d'un ARNv donné peut modifier le niveau d'incorporation d'un ou plusieurs autres ARNv .....	80
3.6. Les différents modèles d'incorporation spécifique des ARNv .....	82
3.7. L'existence d'un réseau d'interactions spécifiques entre ARNv .....	82
3.8. Vers une nouvelle approche thérapeutique .....	87
<b>4. L'écologie des <i>Influenzavirus A</i> .....</b>	<b>88</b>
4.1. Les différents réservoirs du virus et la transmission du virus au sein d'un réservoir .....	88
4.1.1. Le réservoir aviaire .....	88
4.1.2. Le réservoir humain .....	89
4.1.3. Le réservoir porcin .....	89
4.2. La transmission du virus entre les différents réservoirs et son adaptation à l'hôte .....	90
<b>5. Le réassortiment génétique entre souches d'<i>Influenzavirus A</i> .....</b>	<b>93</b>
5.1. Le principe du réassortiment génétique .....	93
5.2. Le réassortiment génétique dans la nature .....	93
5.2.1. Le réassortiment entre des virus humains, aviaires et porcins .....	93
5.2.2. Le réassortiment génétique au sein d'un réservoir donné .....	95
5.2.2.1. Le réassortiment génétique dans le réservoir aviaire .....	95
5.2.2.2. Le réassortiment génétique dans le réservoir humain .....	96
5.2.2.3. Le réassortiment génétique dans le réservoir porcin .....	97
5.2.2.4. La distribution des segments de gènes au cours du réassortiment génétique .....	97
5.3. L'étude du réassortiment génétique entre virus de sous-types différents .....	98
5.3.1. Caractéristiques générales du réassortiment génétique .....	98
5.3.2. Analyse d'événements de réassortiment génétique pouvant faire émerger un virus pandémique .....	98
5.3.3. Les facteurs limitant le réassortiment génétique .....	100
5.3.3.1. L'incompatibilité entre les protéines de 2 souches .....	100
5.3.3.1.1. Les protéines du complexe polymérase .....	100
5.3.3.1.2. Les protéines impliquées dans l'export des RNPv .....	101
5.3.3.1.3. Les protéines impliquées dans le bourgeonnement .....	101
5.3.3.2. Le lien entre réassortiment génétique et incorporation des ARNv dans les virions .....	102
<b>PROBLEMATIQUE .....</b>	<b>103</b>
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>105</b>
<b>1. Clonage des séquences des ARNv des virus et mutagenèse .....</b>	<b>105</b>
1.1. Souches virales utilisées .....	105
1.2. Clonage des séquences des ARNv des virus .....	105
1.2.1. Extraction et amplification des ARNv .....	106
1.2.2. Clonage dans les vecteurs pUC2000 .....	106
1.2.3. Clonage dans les vecteurs pHW2000 .....	109
1.3. Mutagenèse dirigée .....	111

1.3.1. Délétions.....	111
1.3.2. Mutations ponctuelles.....	114
1.3.3. Constructions avec la GFP.....	115
1.3.3.1. Clonage de la séquence codante de la GFP dans le vecteur pJET1.2.....	115
1.3.3.2. Remplacement de la majeure partie de la séquence codante de l'ARNv 8 (NS) par la séquence codante de la GFP.....	116
<b>2. Techniques d'étude <i>in vitro</i> des interactions entre ARNv .....</b>	<b>120</b>
2.1. Transcription <i>in vitro</i> .....	120
2.2. Expériences de retard sur gel.....	121
2.2.1. Expériences de retard sur gel après cotranscription des ARNv 2 à 2.....	121
2.2.2. Expériences de retard sur gel après incubation d'ARNv purifiés.....	122
<b>3. Techniques de production et de caractérisation de virus .....</b>	<b>124</b>
3.1. Culture cellulaire.....	124
3.2. Production <i>in vitro</i> d' <i>Influenzavirus A</i> .....	125
3.2.1. Transfection cellulaire.....	125
3.2.2. Amplification des virus produits en génétique inverse.....	128
3.2.3. Production virale.....	129
3.3. Détermination du titre viral en DITC <sub>50</sub> /mL.....	129
3.4. Cinétique de réplication des virus.....	130
3.4.1. Réalisation de la cinétique de réplication des virus.....	130
3.4.2. Analyse de la production virale au cours de la cinétique par RT-PCR quantitative en temps réel.....	130
3.5. Analyse de la composition génétique des virus produits lors des expériences dites de « compétition ».....	134
<b>4. Techniques d'imagerie.....</b>	<b>135</b>
4.1. Observation en microscopie électronique à transmission de coupes de virions.....	135
4.2. Reconstitution de l'intérieur des virions par tomographie électronique.....	136
<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>137</b>
<b>1. Comparaison des réseaux d'interactions entre ARNv définis pour 2 souches et caractérisation de certaines interactions .....</b>	<b>137</b>
1.1. Réseaux d'interactions entre ARNv.....	137
1.1.1. Expériences d'EMSA suite à la co-transcription des ARNv 2 à 2.....	137
1.1.2. Recherche de conditions expérimentales permettant de mettre en évidence des interactions spécifiques entre les ARNv de la souche England.....	143
1.1.3. Réseaux d'interactions entre les ARNv des souches England et Moscou.....	150
1.1.3.1. Réseau d'interactions entre les ARNv de la souche England.....	150
1.1.3.2. Réseau d'interactions entre les ARNv de la souche Moscou.....	150
1.1.4. Conclusion.....	152
1.2. Identification des régions des ARNv de la souche England impliquées dans certaines interactions ARNv/ARNv mises en évidence <i>in vitro</i> .....	152
1.2.1. Interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS).....	152
1.2.2. Interaction entre les ARNv 3 (PA) et 5 (NP).....	159
1.2.3. Interaction entre les ARNv 4 (HA) et 7 (M).....	162
1.2.4. Interaction entre les ARNv 1 (PB2) et 2 (PB1).....	166
1.2.5. Interaction entre les ARNv 5 (NP) et 8 (NS).....	167
1.2.6. Interaction entre les ARNv 3 (PA) et 8 (NS).....	171
1.2.7. Interaction entre les ARNv 4 (HA) et 8 (NS).....	174
1.2.8. Interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 3 (PA).....	176
1.2.9. Conclusion.....	177
1.3. Rôle de l'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) dans l'incorporation des ARNv et sur la réplication virale.....	179
1.3.1. Phénotype de virus possédant l'ARNv 2 (PB1) et/ou l'ARNv 8 (NS) muté(s).....	179
1.3.1.1. Etude de la réplication du virus.....	180
1.3.1.2. Etude de l'incorporation des ARNv dans les particules virales.....	182
1.3.1.2.1. RT-PCR quantitative sur des ARNv extraits des surnageants de culture.....	182
1.3.1.2.2. Etude par microscopie électronique à transmission.....	184

1.3.2. Etude de l'incorporation des ARNv dans les virions par génétique inverse compétitive et par la méthode de « transfection-infection » .....	186
1.3.2.1. Etude par génétique inverse compétitive .....	186
1.3.2.2. Etude par la méthode de « transfection-infection ».....	188
1.3.3. Conclusion .....	189
1.4. Discussion .....	190
<b>2. Réassortiment génétique entre les souches Moscou et England.....</b>	<b>194</b>
2.1. Incorporation de l'ARNv 4 (HA) du virus England dans le virus Moscou .....	194
2.1.1. Réassortiment génétique entre les deux souches (Thèse de B. Essere) .....	194
2.1.1.1. Co-ségrégation de certains ARNv au cours du réassortiment génétique .....	194
2.1.1.2. Les séquences aux extrémités des ARNv dans le réassortiment génétique.....	196
2.1.1.3. Rôle de la composition génomique sur la réplication des virus réassortants .....	197
2.1.1.4. Rôle de l'ARNv 7 (M) England dans l'incorporation de l'ARNv 4 (HA) dans le fond génétique du virus Moscou .....	198
2.1.2. Corrélation entre réassortiment génétique <i>in vitro</i> et interactions entre ARNv (Thèse de C. Gavazzi) .....	199
2.2. Modification de l'ARNv 8 (NS) de la souche Moscou afin d'optimiser son incorporation dans le fond génétique du virus England .....	203
2.3. Discussion .....	208
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>211</b>
<b>1. Incorporation des ARNv dans les particules virales .....</b>	<b>211</b>
1.1. Bilan des principaux résultats obtenus durant ma thèse .....	211
1.2. Perspectives de mon travail de thèse .....	211
<b>2. Réassortiment génétique.....</b>	<b>213</b>
2.1. Bilan des principaux résultats obtenus durant ma thèse .....	213
2.2. Perspectives de mon travail de thèse .....	214
<b>ANNEXE : COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES .....</b>	<b>217</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>219</b>



## ABBREVIATIONS

### **A**

A, C, G, T, U	: adénine, cytidine, guanine, thymine, uracile
ATP, CTP, GTP, UTP	: adenosine-, cytosine-, guanosine-, uridine-triphosphate
Å	: Angström
ADN	: acide désoxyribonucléique
ADNc	: ADN complémentaire
ARN DI	: ARN Défectif Interférent
ARN	: acide ribonucléique
ARNc	: ARN complémentaire
ARNm	: ARN messenger
ARNv	: ARN viral
AS	: acide sialique

### **B**

BET	: bromure d'ethidium
BGH	: <i>bovine growth hormone</i>
BSA	: <i>bovine serum albumin</i>

### **C**

Ci/mCi/μCi	: curie/millicurie/microcurie
CMV	: cytomégalovirus
cpm	: coups par minute
Crm1	: <i>chromosome maintenance region 1</i>

### **D**

Da, kDa	: Dalton, kiloDalton
DHOV	: Dhori virus
DMEM	: <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMS	: Di Méthyl Sulfate
DNase	: desoxyribonucléase
dNTP	: désoxyNucléoside tri-phosphate
DTT	: dithiothréitol

### **E**

E. coli	: <i>Escherichia coli</i>
ECP	: effet cytopathogène
EDTA	: éthylène diamine tétra-acétate
EMEM	: <i>Eagle's minimum essential medium</i>
EMSA	: <i>electroMobility shift assay</i>
ESCRT	: <i>endosomal sorting complex required for transport</i>

### **F**

FPLC	: <i>fast protein liquid chromatography</i>
------	---

## G

Gal : galactose  
GFP : *green fluorescent protein*

## H

HA : hémagglutinine  
HBSS : *Hanks balanced salt solution*  
HEF : *hemagglutinin-esterase fusion*  
HPAI : *highly pathogenic avian influenza*

## I

IFN- $\alpha/\beta$  : interféron  $\alpha/\beta$   
ISAV : *infectious salmon anemia virus*

## L

LAIV : *live attenuated influenza vaccine*  
LPAI : *low pathogenic avian influenza*

## M

M, mM,  $\mu$ M, nM : molaire, millimolaire, micromolaire, nanomolaire  
m, cm, mm,  $\mu$ m, nm : mètre, centimètre, millimètre, micromètre, nanomètre  
MCM : *minichromosome maintenance*  
MDCK : *Madin Darby canin kidney*  
MEM : *modified Eagle medium*  
min. : minute  
MOI : *multiplicity of infection*  
mol, mmol,  $\mu$ mol, nmol, pmol : mole, millimole, micromole, nanomole, picomole

## N

NA : neuraminidase  
NCBI : *national center for biotechnology information*  
NEP/NS2 : *nuclear export protein / non structural 2*  
NLS : *nuclear localisation signal*  
NP : nucléoprotéine  
NTP : nucléoside tri-phosphate  
nts : nucléotides

## O

OAS : oligo-adénylate synthase  
OMS : organisation mondiale de la santé

## P

PA : *protein acid*  
PB1 : *protein basic 1*  
PB2 : *protein basic 2*  
PBS : *phosphate buffered salin*  
PI3K : phosphatidylinositol-3 kinase  
PKR : protéine kinase R

PolI : polymérase I  
PolII : polymérase II  
p/v : poids/volume

## **R**

RdRp : *RNA-polymerase RNA-dependent*  
RNase : ribonucléase  
RNasin : *ribonuclease inhibitor*  
RNP : ribonucléo-protéine  
RNPC : RNP complémentaire  
RNPv : RNP virale  
RT : *reverse transcription*

## **S**

sec. : seconde

## **T**

TBE : tampon Tris-Borate-EDTA  
TBM : tampon Tris-Borate-MgCl<sub>2</sub>  
THOV : Thogoto virus  
Tris : tris(hydroxyméthyl)aminométhane

## **U**

U : unité(s)

## **V**

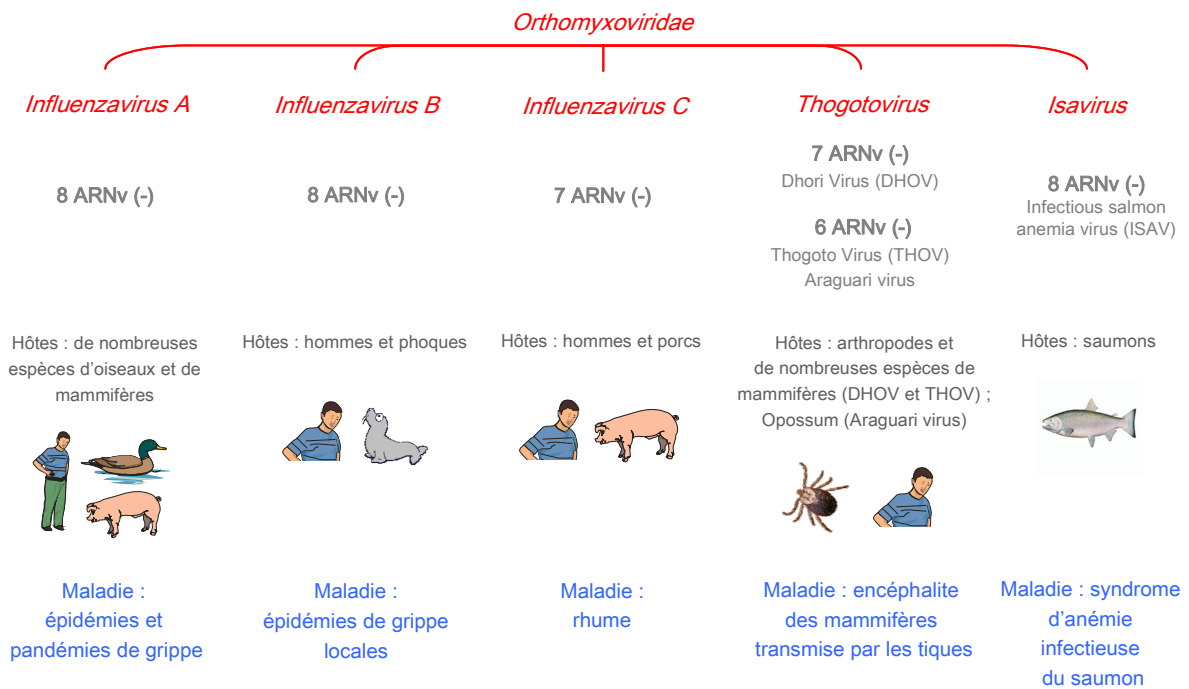
v/v : volume/volume  
Virus DI : virus défectif interférent



# INTRODUCTION

## 1. Généralités sur les *Orthomyxoviridae*

Les virus de la famille des *Orthomyxoviridae* ont un génome constitué de 6 à 8 segments d'ARN simple brin de polarité négative ou ARNv (-). A ce jour, 5 genres d'*Orthomyxoviridae* sont clairement identifiés : les *Influenzavirus A*, les *Influenzavirus B*, les *Influenzavirus C*, les *Thogotovirus* et le genre *Isavirus* (Figure 1) (197).



**Figure 1 :** Principales caractéristiques des virus de la famille des *Orthomyxoviridae*.

Pour chaque type de virus, le nombre d'ARNv composant le génome, la ou les principale(s) espèce(s) hôte(s) ainsi que la pathologie causée par l'infection ont été indiqués. Le genre *Quarjavirus* n'a pas été représenté.

Les *Influenzavirus* sont classés selon les différences antigéniques au niveau des protéines NP et M1 présentes dans les virions. D'un point de vue évolutif, les *Influenzavirus A*, *B* et *C* ont un ancêtre commun. Il est probable que les virus A et B aient divergé l'un de l'autre plus récemment que les virus C. Il a été proposé, sur la base d'alignement de séquences, que les virus C et le dernier ancêtre commun des virus A et B ont divergé il y a 8000 ans, que les virus A et B ont divergé il y a 4000 ans et que les virus A ont commencé à diverger en différents sous-types il y a environ 2000 ans (232).

Les *Influenzavirus A* infectent de nombreuses espèces d'oiseaux et de mammifères parmi lesquels l'Homme et le porc chez lesquels ils peuvent provoquer la grippe (252, 256). Le tropisme des virus dépend de l'hôte. En effet, les virus se répliquent au niveau du tractus intestinal des oiseaux et au niveau de l'appareil respiratoire des êtres humains et des porcs. Le plus souvent, les virus se transmettent efficacement au sein d'une espèce donnée et sont à l'origine d'épidémies de grippe. La transmission du virus d'une espèce à une autre est rare, mais parfois, la « barrière d'espèce » peut tout de même être franchie, avec souvent des conséquences désastreuses pour l'hôte. En effet, le passage d'un virus du porc à l'Homme ou de l'oiseau à l'Homme peut être à l'origine de pandémies grippales. Le meilleur exemple est sans doute la pandémie de grippe espagnole en 1918-1919 qui a été à l'origine d'environ 50 millions de morts.

Les *Influenzavirus B* quant à eux n'infectent pratiquement que l'Homme bien qu'ils puissent aussi infecter le phoque. Tout comme les *Influenzavirus A*, ils sont responsables de cas de gripes lors des épidémies saisonnières. Par contre, ils ne provoquent pas de pandémies grippales.

Les *Influenzavirus C* sont principalement responsables de rhumes chez l'Homme et ont donc une importance moindre que les *Influenzavirus A* et *B* en terme de santé publique.

Le genre *Thogotovirus* comprend actuellement 3 virus : le Thogoto virus (THOV), le Dhori virus (DHOV) et l'Araguari virus (44). Il s'agit d'arbovirus pouvant provoquer des encéphalites chez l'Homme.

Le genre *Isavirus*, ne compte à ce jour qu'un seul virus : le virus de l'anémie infectieuse du saumon (*Infectious salmon anemia virus, ISAV*) (38).

Un nouveau genre d'*Orthomyxoviridae*, nommé *Quarjavirus*, a été proposé sur la base d'alignements de séquences (205). Il comprendrait au moins 3 virus : le Quarafil virus (QRFV), le Johnston Atoll virus (JAV) et le Lake Chad virus (LKCV) (205). Le nombre d'ARNv composant le génome de ces virus n'est pas bien défini et actuellement seuls 5 ARNv ont été identifiés pour le QRFV (205).

Parmi tous les virus de cette famille connus à ce jour, ce sont les *Influenzavirus A* qui sont les plus importants en terme de santé publique dans la mesure où ils provoquent des épidémies saisonnières de gripes et qu'ils peuvent parfois être à l'origine de pandémies souvent associées à une mortalité élevée. C'est pourquoi la suite de cette introduction traitera quasi-exclusivement des *Influenzavirus A*.

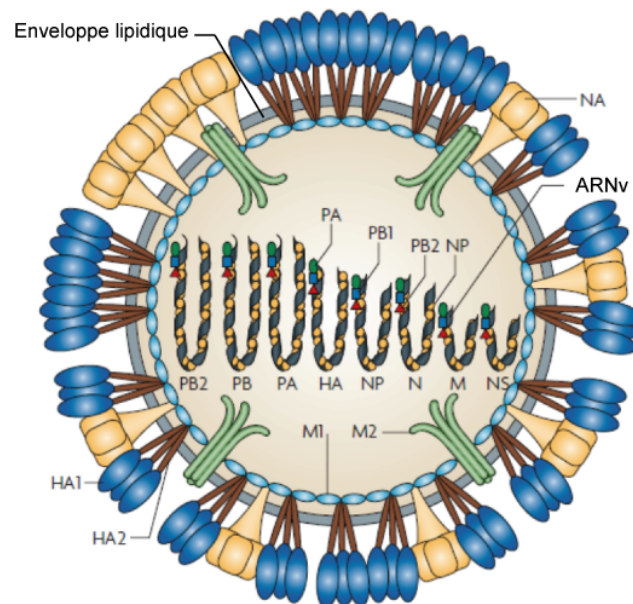
## 2. Les *Influenzavirus A*

### 2.1. Généralités sur les *Influenzavirus A*

#### 2.1.1. Aspects historiques

La grippe semble avoir frappé l'Homme depuis l'Antiquité, Hippocrate ayant décrit en 412 avant Jésus-Christ une maladie aux symptômes similaires à ceux de la grippe. L'origine bactérienne ou virale de l'infection a longtemps été source de débat. A la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, il a été proposé que la bactérie *Haemophilus influenzae* soit l'agent infectieux responsable de la grippe. Il faudra attendre 1931 pour que l'origine virale de la maladie soit démontrée et que le premier *Influenzavirus A* soit isolé chez le porc par Richard Shope. Le premier *Influenzavirus A* humain a quant à lui été isolé en 1933 par Wilson Smith, Sir Christopher Andrewes et Sir Patrick Laidlaw.

#### 2.1.2. Vue d'ensemble d'une particule virale



**Figure 2 :** Représentation schématique d'une particule virale d'*Influenzavirus A*.

Les trimères de protéines HA et les tétramères de protéines NA, insérés dans l'enveloppe lipidique du virus, sont représentés sous forme de spicules bleus et jaunes respectivement. Le tétramère de protéines M2, formant un canal ionique qui traverse l'enveloppe virale, est représenté en vert. La couche de protéines M1 recouvrant l'intérieur de l'enveloppe virale est représentée en bleu clair. Le génome à l'intérieur de la particule virale est sous forme de 8 RNPv. Chaque RNP est formée d'un ARNv représenté sous forme d'un ruban bleu, associé sur toute sa longueur à des protéines NP représentées en jaune et à son extrémité à un complexe polymérase formé des protéines PB2, PB1 et PA représentées respectivement en rouge, bleu clair et vert.

Les *Influenzavirus A* sont habituellement décrits comme étant des virus enveloppés de forme sphérique et d'un diamètre de 80 à 120 nm (Figure 2). Ils présentent à leur surface 2 types de spicules : l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA) qui sont des glycoprotéines. Une couche de protéines de matrice (M1) recouvre l'intérieur de la membrane. Des canaux ioniques, formés de tétramères de protéines M2, traversent l'enveloppe et la matrice. L'intérieur de la particule virale contient le génome présent sous forme de 8 ribonucléoprotéines virales (RN Pv). Chacune d'elles est composée d'un ARNv associé à des nucléoprotéines (NP) et à un complexe polymérase formé des protéines PB2, PB1 et PA.

### 2.1.3. La classification des *Influenzavirus A* en sous-types

Contrairement aux autres *Orthomyxoviridae*, les *Influenzavirus A* sont classés en différents sous-types en fonction des propriétés antigéniques des protéines HA et NA présentes à la surface. Actuellement, 16 sous-types de protéines HA (numérotées de 1 à 16) et 9 sous-types de protéines NA (numérotées de 1 à 9) sont connus. Un virus donné ne possède à sa surface qu'un seul type de chacune de ces 2 protéines. Ainsi, le sous-type d'un virus possédant une protéine HA de type 1 et une protéine NA de type 1 sera de sous-type H1N1.

	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	TOTAL
H1	11622	365	16	2	8	7	3	4	11	12038
H2	33	175	98	1	9	3	6	7	41	373
H3	46	11147	17	7	13	127	7	1112	4	12480
H4	7	39	13	7	11	492	5	105	9	688
H5	3852	553	122	7	2	4	11	15	28	4594
H6	324	394	7	34	54	29	2	104	7	955
H7	161	491	335	16	3	13	203	8	14	1244
H8	1	1	3	92	2	0	1	0	0	100
H9	14	1455	9	5	10	4	4	3	13	1517
H10	10	11	31	15	11	15	190	14	8	305
H11	13	37	16	4	3	14	2	14	137	240
H12	1	3	5	8	72	4	1	2	3	99
H13	0	14	4	0	0	50	0	2	15	85
H14	0	0	1	0	4	1	0	0	0	6
H15	0	1	0	0	0	3	0	1	6	11
H16	0	0	22	0	0	0	0	0	0	22
<b>TOTAL</b>	<b>16084</b>	<b>14686</b>	<b>699</b>	<b>198</b>	<b>202</b>	<b>766</b>	<b>435</b>	<b>1391</b>	<b>296</b>	<b>34757</b>

**Tableau 1 :** Nombre de séquences d'*Influenzavirus A*, classées en fonction de leur sous-type, référencées sur le site du NCBI à la date de 8 novembre 2010.

Les cases en bleu clair correspondent à un sous-type pour lequel aucune séquence n'est disponible, les cases en bleu foncé à un sous-type pour lequel moins de 100 séquences sont disponibles, les cases en jaune à un sous-type pour lequel 100 à 1000 séquences sont disponibles, les cases en orange à un sous-type pour lequel 1000 à 10000 séquences sont disponibles et enfin les cases en rose à un sous-type pour lequel plus de 10000 séquences sont disponibles. D'après (240).



Bien que 144 sous-types puissent théoriquement exister, 26 n'ont encore jamais été détectés et de nombreux sous-types n'ont été observés que très rarement (Tableau 1) (240). Alors que tous les sous-types de HA et NA circulent chez l'oiseau, seuls les sous-types H1, H2, H3, N1 et N2 sont connus pour circuler chez l'Homme et l'infecter. De la même façon, seuls les virus de sous-types H1, H3, N1 et N2 circulent chez le porc. Un nombre très limité d'infections humaines par des virus aviaires H5N1, H9N2 et H7N7 a toutefois été répertorié sans que le virus ne puisse ensuite se transmettre au sein de l'espèce humaine.

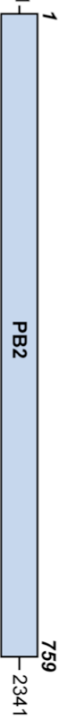
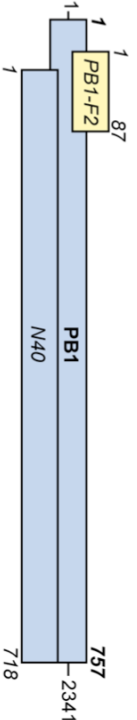




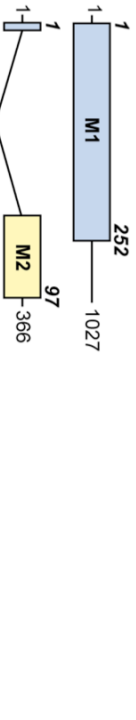

### **2.1.3. Nomenclature**

Le nom complet d'une souche de virus influenza, par exemple A/Finch/England/2051/91 (H5N2), indique dans l'ordre : le genre (ou type) d'*Influenzavirus* (A, B ou C), l'espèce à partir de laquelle le virus a été isolé (uniquement dans le cas où il ne s'agit pas de l'espèce humaine), le nom du lieu où le virus a été isolé, le numéro de l'isolat, l'année durant laquelle la souche a été isolée et, uniquement s'il s'agit d'un *Influenzavirus A*, le sous-type de la souche.

## **2.2. Le génome des *Influenzavirus A***

### **2.2.1. Organisation du génome**

Le génome des *Influenzavirus A* est composé de 8 ARNv (-) différents les uns des autres. La taille des ARNv de la souche A/Puerto Rico/8/34 (H1N) (abrégée PR8), l'une des souches les plus étudiées, est comprise entre 890 et 2341 nucléotides (Figure 3), mais la taille d'un ARNv donné peut varier de quelques nucléotides suivant la souche virale.

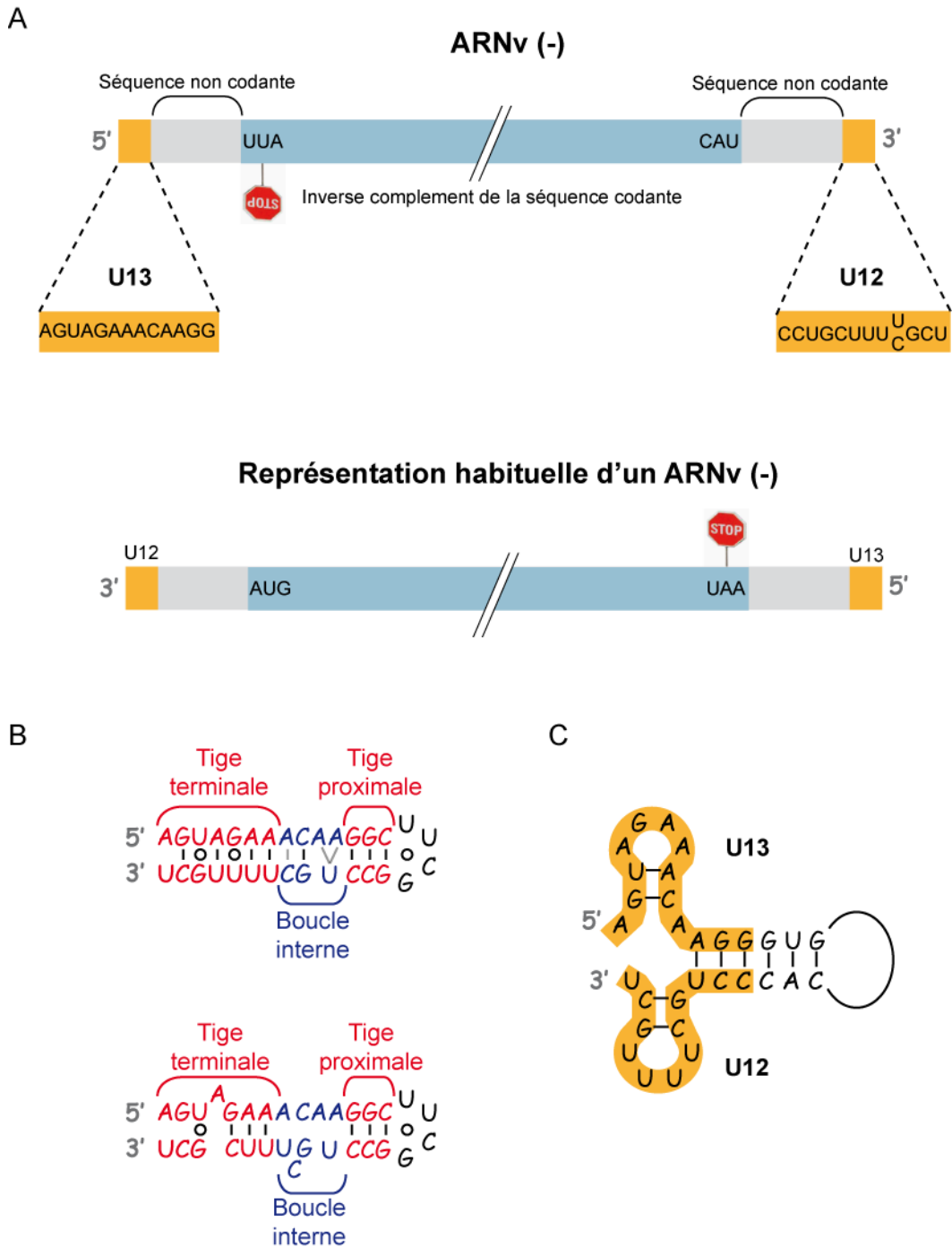
Segment	Représentation schématique de l'ARNv et des protéines	Poids moléculaire estimé de la protéine	Nombre de protéines par virion	Principale(s) fonction(s) de la protéine
ARNv 1 (PB2)		86 kDa	30-60	Fixation de la coiffe d'ARNm cellulaires (première étape du vol de coiffe permettant la transcription des ARNm viraux)
ARNv 2 (PB1)		PB1 : 87 kDa PB1-F2 : 10,5 kDa N40 : 82 kDa	PB1 : 30-60 PB1-F2 : ? N40 : ?	PB1 : ARN-polyomérase ARN-dépendante PB1-F2 : activité pro-apoptotique N40 : ?
ARNv 3 (PA)		84 kDa	30-60	Endonucléase impliquée dans le vol de coiffe lors de la transcription des ARNm viraux Activité protéase
ARNv 4 (HA)		61 kDa	500	Principal déterminant antigénique Rôle dans les premières étapes de l'infection : fixation au récepteur cellulaire et fusion des membranes du virus et de l'endosome
ARNv 5 (NP)		56 kDa	1000	Se lie à l'ARNv sur toute sa longueur Participe à l'export des RNPv hors du noyau
ARNv 6 (NA)		50 kDa	100	Déterminant antigénique Activité neuraminidase jouant un rôle dans la diffusion des virions au sein de l'hôte
ARNv 7 (M)		M1 : 28 kDa M2 : 11 kDa	M1 : 3000 M2 : 20-60	M1 : Protéine de matrice jouant un rôle dans l'export des RNPv hors du noyau et le bourgeonnement M2 : Canal ionique important pour la fusion des membranes du virus et de l'endosome
ARNv 8 (NS)		NS1 : 27 kDa NEP/NS2 : 14 kDa	NS1 : 0 NEP/NS2 : 130-200	NS1 : inhibition de la réponse anti-virale à de nombreux niveaux NEP/NS2 : rôle dans l'export des RNPv hors du noyau

**Figure 3 :** Principales propriétés des protéines codées par le génome de la souche PR8.

Les segments d'ARNv (en orientation positive), dont seules les régions non codantes sont visibles, sont représentés par des traits noirs. Le nombre de nucléotides composant les ARNv est également indiqué. Les protéines codées en phase 0 sont représentées par des rectangles bleus et celles en phase +1 par des rectangles jaunes. Le nombre d'acides aminés composant les protéines est indiqué en italique. Les introns sont représentés par un trait en forme de V. D'après (133, 197).

Tous les ARNv sont cependant organisés de la même façon. Chaque ARNv possède une ou plusieurs séquences codantes bordées par des séquences non codantes (Figure 4A). Aux extrémités 5' et 3' de l'ARNv se trouvent également de courtes séquences conservées de 13 et 12 nucléotides (Figure 4A). Ces séquences, appelées U13 (ou Uni 13) et U12 (ou Uni 12), constituent les éléments promoteurs de la transcription et de la réplication, et sont indispensables pour initier et réguler les synthèses d'ARN. L'uracile en position 4 de l'extrémité 3' de l'ARNv peut, dans certaines souches, être remplacée par une cytidine dans les segments codant les protéines PB2, PB1, PA, HA et NA (Figure 4A), ce qui pourrait avoir comme effet d'inhiber la synthèse des ARNm lors de la phase tardive du cycle infectieux, tout en stimulant les synthèses des ARNc et des ARNv (137), mais cet effet sur la régulation des étapes de transcription/réplication est moins flagrant dans une étude récente (47).

Les séquences U12 et U13 sont partiellement complémentaires et peuvent interagir entre elles. Deux modèles principaux d'interaction coexistent (66) : le modèle de la « poêle à frire » (*panhandle model*) et le modèle du « tire-bouchon » (*corkscrew model*). Dans le modèle du repliement en forme de « poêle à frire », l'appariement se fait sur toute la longueur des séquences U12 et U13 et se décompose en 3 parties : une tige terminale, une boucle interne et une tige proximale (Figure 4B). Dans le modèle du repliement en « tire-bouchon », les séquences U12 et U13 ne sont appariées que sur un faible nombre de nucléotides et les séquences terminales forment des structures en tige-boucle qui restent libres pour interagir avec le complexe polymérase (Figure 4C). Ce dernier modèle, qui refléterait le mieux le repliement fonctionnel de l'ARNv, est favorisé à l'heure actuelle.



**Figure 4 :** Le promoteur de l'ARNv d'un *Influenzavirus A*.

**A.** Représentation linéaire d'un ARNv. **B.** Représentation de la structure du promoteur de l'ARNv d'après le modèle du repliement en « poêle à frire ». Les 2 variants de l'ARNv sont représentés : U ou C en position 4 de l'extrémité 3' de l'ARNv. Les liaisons Watson-Crick entre bases sont représentées par des traits noirs, l'interaction Wobble G-U est représentée par un cercle tandis que les interactions non canoniques sont représentées par des traits gris. **C.** Représentation de la structure du promoteur de l'ARNv d'après le modèle du repliement en « tire-bouchon ». D'après (66).

## 2.2.2. Les protéines codées par le génome viral

Le génome des virus influenza code 12 protéines structurales et non-structurales. Les principales propriétés des protéines virales de la souche PR8 sont résumées dans la Figure 3. Signalons que même si les protéines virales d'autres souches ont des propriétés très similaires, elles peuvent posséder quelques acides aminés en plus ou en moins par rapport aux données présentées ici.

La majorité des protéines virales ont été identifiées depuis longtemps. Cependant, les protéines PB1-F2 et N40 qui sont codées par l'ARNv 2 (PB1) n'ont été découvertes respectivement qu'en 2001 et 2009 (31, 254).

La plupart des génomes d'*Influenzavirus A* codent une protéine PB1-F2 (Figure 3). Cette protéine, généralement composée de 87 à 90 acides-aminés, est codée par un cadre de lecture alternatif localisé près de l'extrémité 5' de l'ARNm transcrit à partir de l'ARNv 2 (31). La traduction est initiée à partir du 4<sup>ème</sup> codon AUG, en phase +1 par rapport au 1<sup>ier</sup> codon AUG qui est utilisé pour la traduction de PB1, par un mécanisme d'initiation de la traduction alternatif qui reste encore à déterminer.

La protéine PB1-F2 n'est pas incorporée dans les virions mais a de nombreuses fonctions au sein des cellules infectées (130). Même si les modes d'action exacts de la protéine PB1-F2 restent à préciser, des études ont montré que cette protéine joue un rôle dans l'induction de l'apoptose dans certains types cellulaires, favorise les processus d'inflammation et stimule l'activité du complexe polymérase viral en se liant à PB1. La protéine PB1-F2 est souvent décrite comme un facteur de virulence, mais ce point est actuellement sujet à controverse (130).

La protéine N40 (Figure 3) est un variant de la protéine PB1 délété de 39 acides-aminés du côté N-terminal (254). Elle résulte de la traduction de l'ARNm à partir du 5<sup>ème</sup> codon AUG (40<sup>ème</sup> codon de la phase ouverte de lecture de PB1), probablement par un mécanisme de « *leaky ribosomal scanning* ». La protéine N40 semble être codée par la majorité des génomes d'*Influenzavirus A* même si elle ne possède pas d'activité polymérase et n'est pas essentielle à la viabilité du virus. Cette protéine peut tout de même interagir avec les autres sous-unités du complexe polymérase et pourrait être impliquée dans la réplication virale dans des contextes génétiques particuliers bien que son rôle exact reste à déterminer (254).

## **2.3. La structure des particules virales**

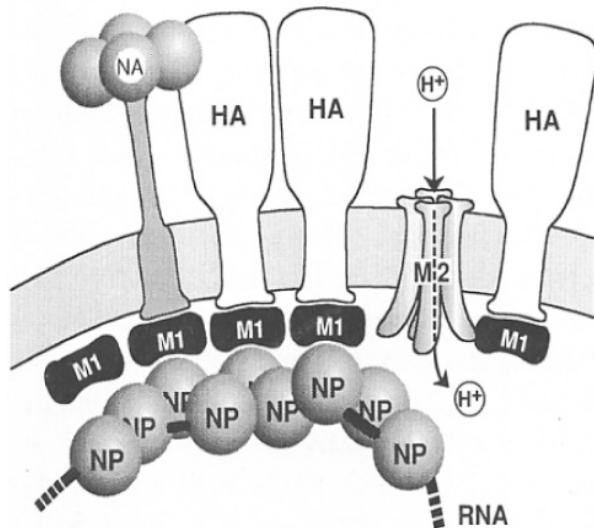
### **2.3.1. La morphologie des particules virales**

Les *Influenzavirus A* sont souvent présentés comme des virus sphériques de 80 à 120 nm de diamètre. Cette morphologie est cependant observée essentiellement pour des souches virales passées plusieurs fois en culture cellulaire ou sur œufs embryonnés de poules, et bien souvent, les isolats cliniques correspondent à des virus plutôt filamenteux. Les virus de la souche A/Udorn/72 présentent la particularité d'être de forme filamenteuse, même après plusieurs passages en culture cellulaire. La longueur des particules de cette souche particulière peut dépasser le micromètre et leur plus petite section mesure environ 55 nm pour les particules filamenteuses et 59 nm pour les particules en forme de gélules (23).

Très récemment, plusieurs particules virales de différentes souches humaines circulantes de sous-types H1N1 et H3N2 ont été analysées par cryo-électron-microscopie (160). Cette étude montre clairement que la proportion de particules sphériques, sphéroïdales et allongées varie drastiquement selon la souche considérée. Bien que le diamètre moyen des particules sphériques est généralement d'une centaine de nanomètre, il a été remarqué qu'il pouvait être significativement différent selon les souches. De plus, pour une souche donnée, la morphologie des particules virales peut varier selon la méthode de production des particules virales (sur œufs de poules embryonnés ou en culture cellulaire).

### **2.3.2. Les protéines membranaires et la matrice**

Les virions possèdent une enveloppe lipidique provenant de la membrane plasmique de la cellule infectée. De nombreux spicules, correspondant aux protéines virales HA et NA, sont insérés dans la membrane et présentés à la surface du virus (Figure 5). Immédiatement sous la membrane se trouve une couche protéique composée de la protéine de matrice M1 d'origine virale qui interagit avec les RNPv (Figure 5). L'enveloppe et la membrane sont traversées de part en part par des protéines virales M2 qui forment des canaux ioniques (Figure 5).



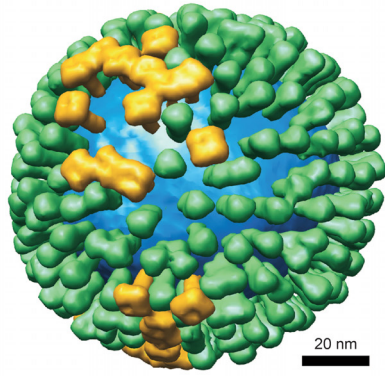
**Figure 5 :** Vue détaillée des protéines présentes au niveau de la membrane virale. D'après (105).

### 2.3.2.1. Les spicules à la surface du virus

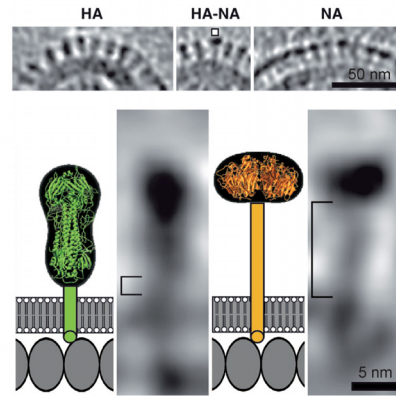
On considère habituellement qu'il y a environ 500 protéines HA et 100 protéines NA à la surface d'une particule virale (133). L'analyse récente de la distribution des protéines HA et NA (Figures 6A et 6B) à la surface des virions par cryo-électron-microscopie (160) et par cryo-électron-tomographie (23, 99) indique que la répartition de ces protéines à la surface des virions diffère de façon importante selon la souche considérée.

La densité des glycoprotéines à la surface de particules virales a été estimée pour de nombreuses particules de souches humaines circulantes de sous-types H1N1 et H3N2 (160). Le nombre de spicules à la surface d'une particule sphérique de 100 nm de diamètre est généralement compris entre 500 et 700. Il a cependant été montré que le nombre de spicules varie selon la souche considérée et selon la méthode de production du virus. Des virus réassortants possédant des ARNv de la souche PR8 et d'une souche humaine H3N2 contemporaine ont également été produits. Leur analyse indique que la composition génomique du virus influence la densité des spicules à la surface des particules virales. Par exemple, dans le fond génétique de la souche PR8, la combinaison de l'ARNv 4 (HA) de la souche H3N2 avec l'ARNv 1 (PB2) ou 2 (PB1) de cette même souche est associée à un grand nombre de spicule en surface de la particule virale. Il se pourrait également que la composition génomique influence le ratio entre les 2 types de glycoprotéines.

A



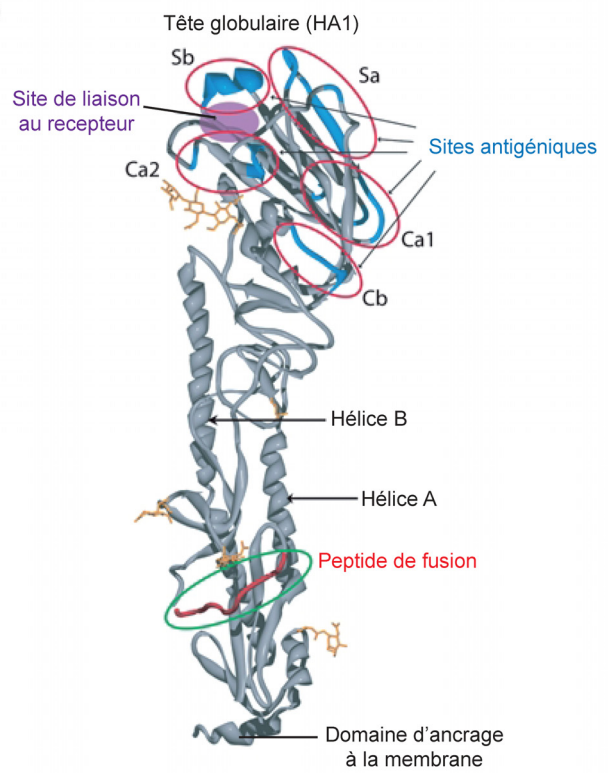
B



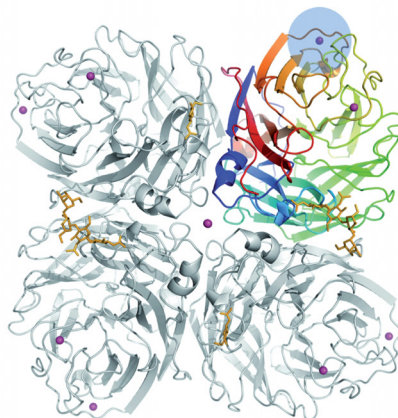
C



D



E





**Figure 6 :** L'hémagglutinine et la neuraminidase des *Influenzavirus A*.

**A.** Modèle de distribution des glycoprotéines HA (en vert) et NA (en jaune) à la surface d'une particule virale de la souche recombinante X31 (H3N2) (l'enveloppe est représentée en bleu). D'après (99). **B.** Structure de l'hémagglutinine et de la neuraminidase déterminée par cryo-électron-tomographie. D'après (99). **C.** Représentation en ruban d'un trimère de protéines HA. Les monomères 2 et 3 sont représentés en couleur argentée et or respectivement. Les différents sous-domaines du monomère 1 sont colorés ainsi : domaine de liaison au récepteur (résidus 115-261) en bleu, estérase vestigiale (résidus 50-114) en jaune, sous-domaines de fusion (résidus 1-49 et 269-309) en magenta et rouge respectivement. (John Skehel, communication personnelle). **D.** Représentation en ruban d'un monomère de la protéine HA0 du virus pandémique de 1918. Ca<sub>2</sub>, Sb, Sa, Ca1 et Cb sont des sites antigéniques potentiels. D'après (228). **E.** Structure cristallographique de la tête de la NA. L'homotrémère a été modélisé. Les ions calcium sont indiqués en magenta et les glycanes liés au récepteur en jaune orangé. D'après (259).

L'analyse de la répartition des spicules à la surface de particules virales X31 (H3N2) produites sur œufs embryonnés montre que, dans ce cas particulier, un virion sphérique de 120 nm possède à sa surface environ 300 HA et 40 NA (Figure 6A) (99). La distribution des 2 types de spicules à la surface du virus ne semble pas être aléatoire. En effet, le plus souvent il y a un regroupement de quelques NA entourées de protéines HA (99).

Dans le cas des particules virales de la souche A/Udorn/72 qui sont filamenteuses ou adoptent une forme de gélule, la disposition des glycoprotéines de surface semble se caractériser par la présence de regroupements de protéines NA au niveau de l'extrémité de la particule virale qui est vraisemblablement opposée au côté où a démarré le bourgeonnement (23).

### 2.3.2.1.1. La protéine HA

La protéine HA (225) est un homo-trimère, d'où son profil triangulaire, en forme de tige (Figures 6B, 6C et 6D). Elle est insérée dans la membrane du virus *via* son extrémité C-terminale tandis que son extrémité N-terminale est extracellulaire (protéine transmembranaire de type I). La tige de la protéine HA est longue de 2 nm, et le reste de la protéine exposé à la surface du virion est de 12 nm (99). Cette protéine est le principal déterminant antigénique du virus qui induit la production d'anticorps neutralisants (voir les sites antigéniques représentés sur la Figure 6D).

Bien que les protéines HA soient les protéines des *Influenzavirus A* qui présentent la plus grande variabilité de séquence, leur structure et leurs fonctions sont hautement conservées. La protéine HA est initialement synthétisée par les ribosomes associés au réticulum endoplasmique, sous forme d'un précurseur non fonctionnel, appelé HA0. Trois molécules de HA0 s'associent de manière non covalente dans le réticulum endoplasmique. La

protéine HA sera par ailleurs glycosylée dans le réticulum endoplasmique et palmitoylée dans le *cis-Golgi network*.

Pour que la protéine HA soit fonctionnelle, chacune des 3 protéines HA0 la composant doit être clivée en 2 sous-unités fonctionnelles, HA1 (47 kDa) et HA2 (29 kDa), qui resteront liées par un pont disulfure. Suite à ce clivage, une partie de la protéine jouant un rôle capital dans le cycle viral et appelée « peptide de fusion » sera localisée à l'extrémité N-terminale de la sous-unité HA2.

Il existe 2 types de sites de clivage. Le site de clivage de la plupart des souches, notamment les souches de sous-type H1, H2 et H3 infectant l'homme, est composé d'un seul acide aminé basique, mais pour de rares souches virales aviaires hautement pathogènes, de sous-type H5 ou H7, le site de clivage est composé de plusieurs acides aminés basiques. Le clivage de protéines HA0 ayant un seul résidu basique au site de clivage est réalisé par des protéases de type trypsine lorsque les protéines sont présentes à la surface de la cellule hôte ou des virions, ce qui contribue à limiter l'infection à certains tissus. Le clivage de protéines HA0 ayant un site de clivage poly-basique est quant à lui réalisé par une protéase ubiquitaire de type subtilisine appelée furine, lorsque les protéines sont dans le *trans-Golgi network*, avec une efficacité qui est supérieure à celle d'un clivage extra-cellulaire. Une fois maturée, la conformation de la protéine HA est sensible au pH. Dans le cas d'une maturation dans le *trans-Golgi network*, la protéine M2 régule le pH de ce compartiment afin d'éviter un changement de conformation inapproprié de la protéine.

#### 2.3.2.1.1. La protéine NA

La protéine NA est un homo-tetramère en forme de champignon (Figures 6B et 6E), et ayant un profil carré, chaque monomère étant formé d'une longue tige de 10 nm et d'une petite tête globulaire de 6 nm (99). L'oligomérisation de la protéine NA a eu lieu dans le réticulum endoplasmique où elle a également été glycosylée. La protéine NA est insérée dans la membrane du virus *via* son extrémité N-terminale tandis que son extrémité C-terminale est extracellulaire (protéine transmembranaire de type II). La protéine NA est le second déterminant antigénique du virus mais les anticorps produits contre les protéines NA ne sont habituellement pas des anticorps neutralisants. En outre, la protéine NA possède, au niveau de sa tête, une activité enzymatique acylneuraminydase (E.C. 3.2.1.18) essentielle au cycle viral.

Les inhibiteurs de la neuraminidase (oseltamivir (Tamiflu<sup>®</sup>) et zanamivir (Relenza<sup>®</sup>)) sont des antiviraux spécifiques des *Influenzavirus A* et *B* qui inhibent de manière réversible l'activité enzymatique de la neuraminidase en se fixant au niveau de son site actif (122).

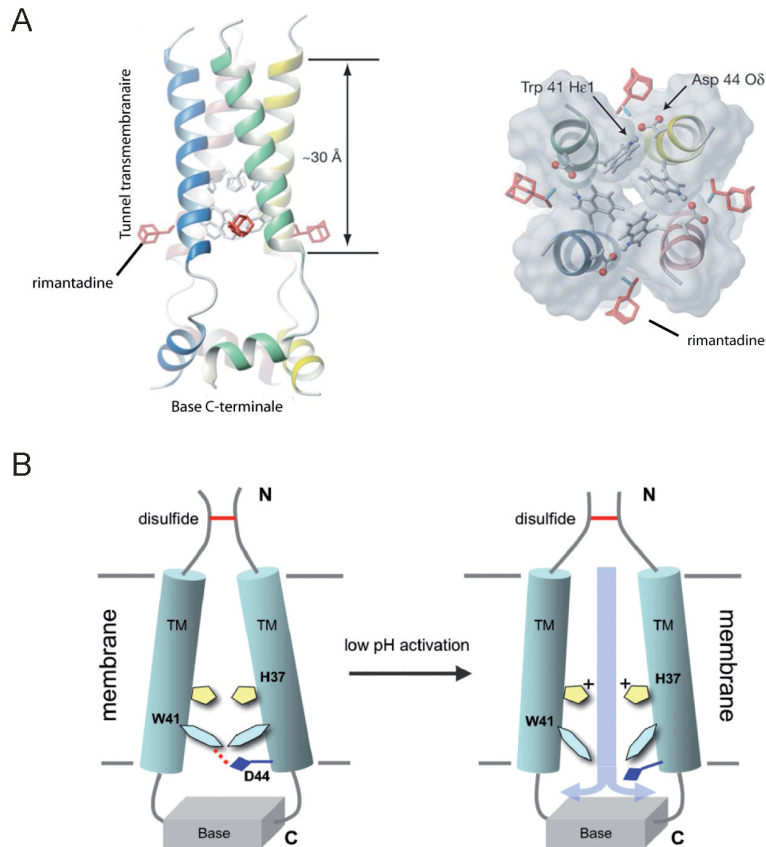
Comme nous le verrons, les protéines HA et NA reconnaissent la même cible cellulaire mais ont des rôles antagonistes au cours du cycle viral. Il doit donc exister une balance fonctionnelle entre les activités des 2 protéines afin d'optimiser la réplication virale (247). Lors de l'adaptation à un nouvel hôte, les protéines HA et NA doivent co-évoluer de manière à ce que l'équilibre fonctionnel entre ces 2 protéines soit préservé.

### 2.3.2.2. Le canal ionique M2

La protéine M2 est présente dans la membrane virale sous forme d'homo-tetramères qui constituent des canaux ioniques montrant une forte sélectivité pour les protons (Figure 7) (22). Ces canaux ioniques, fermés à pH neutre ou basique, s'ouvrent lorsque le pH devient acide (à pH = 5). L'oligomérisation de la protéine est réalisée dans le réticulum endoplasmique. La protéine M2 est une protéine membranaire de type III avec un domaine N-terminal à l'extérieur de la particule virale et un domaine C-terminal à l'intérieur.

Deux adamantanes (amantadine (Mantadix<sup>®</sup>) et rimantadine (Flumadine<sup>®</sup>)) inhibent le canal ionique M2 des *Influenzavirus A*, mais leur utilisation en clinique est limitée. Au niveau moléculaire, une molécule d'amantadine se fixe au niveau d'un canal ionique, ce qui provoque son obstruction (229). La fixation de 4 molécules de rimantadine au niveau de l'homo-tétramère de protéines M2 stabilise quant à elle la conformation fermée du canal ionique (215).

Une partie de la protéine M2 est exposée à la surface du virus et peut donc être reconnue par le système immunitaire de l'hôte. La séquence de la protéine M2 évoluant lentement, il a été imaginé d'utiliser cette protéine dans la préparation de vaccins « universels », efficaces sur de nombreuses souches durant une longue période (71).



**Figure 7 :** Structure et fonctionnement du canal ionique M2.

**A.** Représentation du tétramère formant le canal ionique M2 complexé à la rimantadine (indiquée en rouge). La partie de droite montre une vue du tétramère depuis la partie C-terminale du canal. Les résidus tryptophanes responsables de la fermeture du pore sont stabilisés par des liaisons hydrogènes avec l'aspartate 44. **B.** Représentation schématique du mécanisme d'activation du canal ionique M2. A pH élevé, les hélices transmembranaires sont maintenues à proximité grâce à une interaction entre le tryptophane 41 et l'aspartate 44. Lorsque le pH diminue, la protonation de l'histidine 37 déstabilise cette structure, permettant le passage des protons. La base du tétramère (partie C-terminale) et la présence de ponts disulfures en N-terminal empêche la dissociation du canal ionique. Pour plus de clarté, seuls 2 monomères ont été représentés. D'après (215).

### 2.3.2.3. La protéine de matrice M1

La protéine M1 s'homo-oligomérisse pour former une superstructure hélicoïdale recouvrant l'intérieur de l'enveloppe virale, ce qui confère une certaine rigidité à cette dernière (Figure 5). La protéine M1 peut s'associer aux lipides membranaires et on pense qu'elle interagit avec d'une part la protéine M2 et la partie cytoplasmique des glycoprotéines de surface et d'autre part avec les ribonucléoprotéines virales (RNPv) présentes au sein du virion, formant un pont entre les protéines membranaires et les composants à l'intérieur des virions (Figure 5). La superstructure hélicoïdale de la protéine M1 est différente suivant que les virions sont sphériques ou filamenteux (23), ce qui laisse penser que la structure de M1

pourrait déterminer la forme des virions. Soulignons tout de même qu'une étude, réalisée sur la souche recombinante X31 (H3N2), montre qu'au moins 20 % des virions ayant une matrice présentent des trous dans la couche protéique formant la matrice (99).

Au niveau du virion, quelques protéines M1 sont également associées à la protéine NEP/NS2, même si cette dernière est une protéine non structurale.

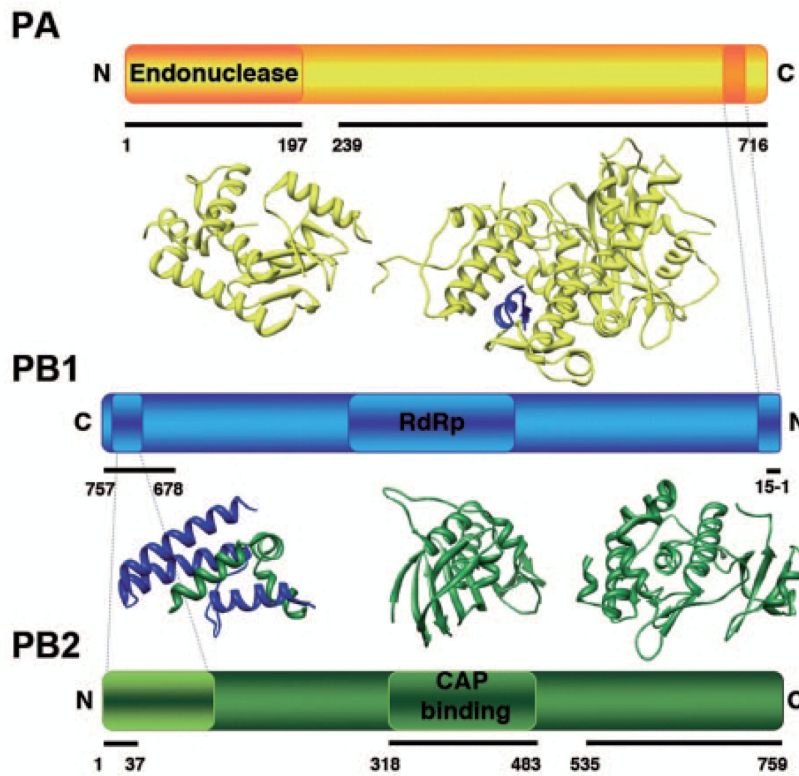
### **2.3.3. Le cœur des particules virales**

Le virion renferme en son sein le matériel génétique du virus présent sous forme de 8 RNPv. Chacune des 8 RNPv est formée d'un ARNv (-) associé sur toute sa longueur à de nombreuses copies de la nucléoprotéine (NP) d'origine virale et, au niveau de son promoteur formé par l'appariement des séquences U12 et U13, à un complexe ARN-polymérase-ARN-dépendante, également d'origine virale (183, 208).

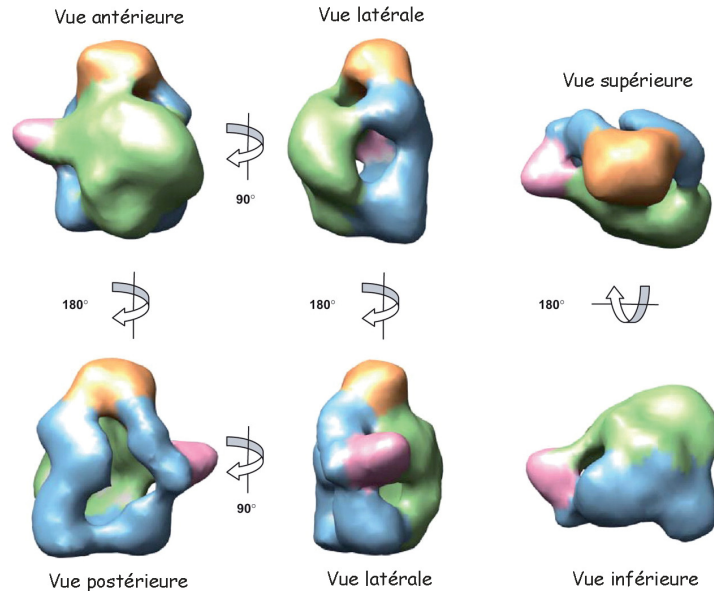
#### **2.3.3.1. Organisation structurale du complexe polymérase**

L'ARN-polymérase-ARN-dépendante des virus influenza est un complexe hétérotrimérique de 250 kDa constitué de 2 enzymes basiques (appelées PB1 et PB2) et d'une enzyme acide (appelée PA) intimement liées (Figure 8). L'enzyme fonctionnelle est l'ensemble du complexe et son activité est probablement modulée par des interactions avec l'ARN cible, les amorces, et/ou des protéines virales ou cellulaires. Le complexe polymérase subit des changements structuraux considérables en se liant à des protéines virales (et probablement cellulaires). Ce complexe enzymatique reconnaît la structure du promoteur de l'ARNv formé des séquences U12 et U13 (Figure 4), en se liant préférentiellement à U13, aidant probablement ainsi au maintien de l'appariement entre ces 2 séquences (66).

A



B



**Figure 8 :** Le complexe polymérase viral.

**A.** Diagramme représentant les principaux domaines des protéines du complexe polymérase ainsi que les interactions entre les différentes protéines. Les domaines de chacune des sous-unités pour lesquelles une structure atomique a été déterminée ont été soulignés et les structures correspondantes ont été présentées (PA en jaune, PB1 en bleu et PB2 en vert). RdRp : domaine portant l'activité ARN-polymérase-ARN-dépendante. D'après (208). **B.** La structure d'un complexe ARN-polymérase-ARN-dépendante de virus influenza A sans ARNv ni protéine NP. Structure obtenue par microscopie électronique à une résolution de 26 Angström. D'après (239).

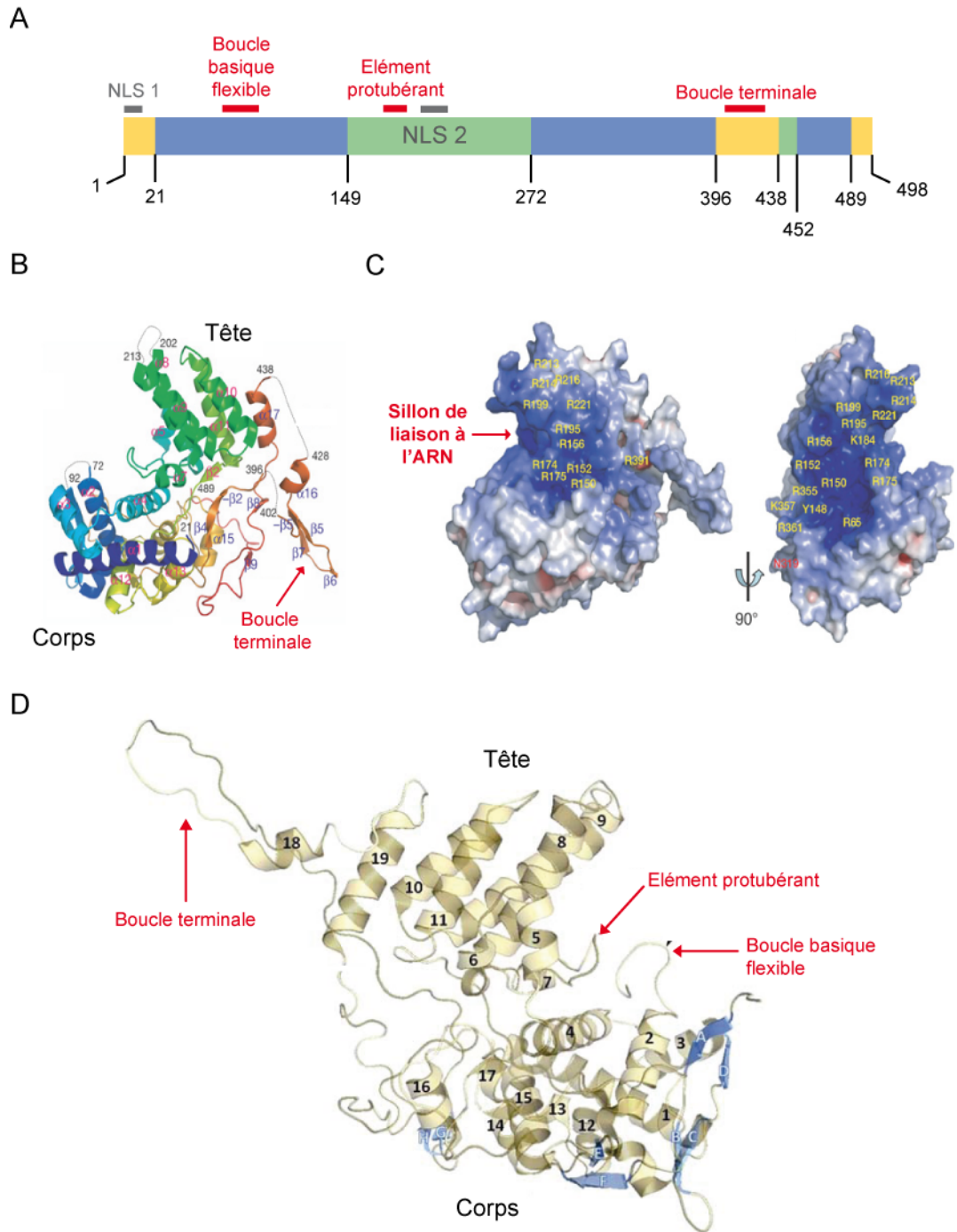
PB1 est le cœur du complexe (53) et il interagit *via* son domaine N-terminal avec le domaine C-terminal de PA (103, 185). Il existe de nombreux contacts entre l'extrémité C-terminale de PB1 et l'extrémité N-terminale de PB2 (230). En revanche, aucune interaction entre les protéines PB2 et PA n'a été mise en évidence au sein des RNPv jusqu'à présent, même si ces protéines peuvent interagir dans les cellules (Figure 8A) (106).

Des structures cristallographiques, que nous ne décrivons pas ici, sont disponibles pour certains domaines protéiques de chacune des 3 enzymes formant le complexe polymérase : PB2 (94, 230, 234, 235, 260), PB1 (103, 185, 230) et PA (52, 103, 185, 268).

L'étude par microscopie électronique d'un complexe polymérase recombinant, sans ARNv ni protéine NP, montre un complexe de forme globulaire possédant une cavité interne (Figure 8B) (239). Des études similaires réalisées sur des RNPv entières montre une structure du complexe polymérase similaire à celle décrite précédemment (6, 35).

### 2.3.3.2. La nucléoprotéine NP

La protéine NP (Figure 9) est une protéine basique qui recouvre l'ARNv sur toute sa longueur (sauf au niveau de la région où le complexe polymérase est fixé). La structure cristallographique de la protéine NP de la souche A/WSN/33 (H1N1) (abrégée WSN) (265) montre qu'il s'agit d'une protéine ayant une structure allongée en forme de banane et comportant 2 domaines (tête et corps) reliés entre eux (Figure 9B). La protéine NP possède également une boucle terminale (résidus 402-428) qui, en se liant au corps d'une protéine NP voisine, permet l'oligomérisation des protéines NP (Figures 9A et 9B) (265). La protéine NP d'une souche aviaire de type H5N1 (Figure 9D) a une structure similaire à celle décrite précédemment (179).



**Figure 9 :** La nucléoprotéine (NP) des *Influenzavirus A*.

**A.** Schéma représentant les différents domaines de la protéine NP. Les domaines du corps (acides-aminés 21-149, 273-396 et 453-489) de la protéine sont représentés en bleu tandis que ceux de la tête (acides-aminés 150-272 et 438-452) sont en vert. Alors que le NLS2 est canonique, le NLS1 est non conventionnel. D'après (265). **B.** Structure cristallographique de la protéine NP de la souche WSN résolue à 3,2 Å. D'après (265). **C.** Distribution des potentiels électrostatiques pour la protéine NP de la souche WSN indiquant en bleu le site de liaison à l'ARN. Les potentiels électrostatiques positifs et négatifs sont indiqués respectivement en bleu et en rouge. D'après (265). **D.** Structure cristallographique de la protéine NP de la souche A/HK/483/97 (H5N1) résolue à 3,3 Å. D'après (178, 179).



La protéine NP se lie à l'ARNv simple brin *via* son squelette ribose-phosphate, laissant les bases exposées au solvant, sans spécificité de séquence et avec une forte affinité ( $K_d = 20$  nM), environ tous les 24 nucléotides (10, 191). Le site de liaison à l'ARN est vraisemblablement un profond sillon situé entre le corps et la tête de la protéine et localisé à l'extérieur de l'oligomère (Figure 9) (265). Ce sillon comporte 16 résidus basiques pouvant interagir avec le squelette phosphodiester et une tyrosine à l'extrémité du sillon qui pourrait s'empiler avec la base (Figure 9C). Néanmoins, l'ARN associé à chaque monomère de protéine NP est trop long pour s'associer au site de liaison à l'ARN proposé, suggérant que l'ARNv interagit aussi avec une autre région de la protéine NP (208). Ng *et al.* suggèrent qu'une boucle basique flexible, formée des résidus 72-91, capturerait l'ARN présent dans l'environnement, puis le positionnerait dans le sillon riche en arginines situé à proximité ; une fois dans le sillon, l'ARN serait maintenu en position par un élément protubérant riche en arginines, formé des résidus 167-186 (Figure 9D) (178, 179).

### 2.3.3.3. Les RNPv : organisation générale et distribution dans les virions

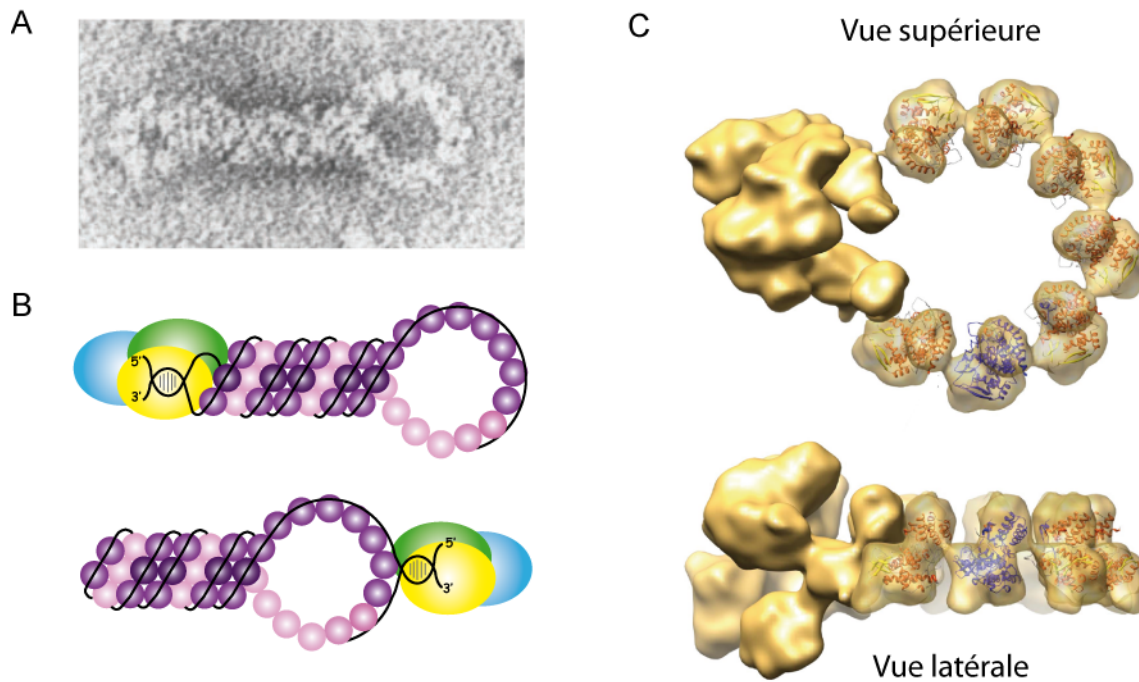
Le complexe polymérase, formé des protéines PB2, PB1 et PA, se fixe à l'ARNv au niveau du promoteur formé par l'appariement des séquences U12 et U13 alors que tout le reste de la molécule d'ARN est recouvert par des protéines NP, tous les 24 nucléotides (191). L'ensemble constitue une RNPv.

Isolées de virions purifiés, les RNPv apparaissent comme des structures superhéliçoidales fermées en forme de ruban d'un diamètre de 13 nm environ pour une longueur comprise approximativement entre 30 et 110 nm (Figures 10A et 10B) (36, 104, 118, 201). Il a été montré dans un premier temps que la seule association de protéines NP à l'ARNv conduit à l'apparition de structures ressemblant à des RNPv (262) et, dans un second temps, qu'en l'absence d'ARNv, les protéines NP seules peuvent former de telles structures (214). Au sein des RNPv, l'ARNv est sensible aux RNases (10, 59) et peut être remplacé par du polyvinylsulfate (201), suggérant que les bases de l'ARNv sont exposées à l'extérieur de la RNPv et qu'il existe des interactions entre les protéines NP et le squelette ribose-phosphate de l'ARNv. Il semble donc que les protéines NP forment le squelette de la RNPv et que l'ARNv s'enroule autour. Les RNPv présentent des sillons majeurs à une périodicité de 15 nm environ et des sillons mineurs à une périodicité de 7,5 nm environ (36, 218), suggérant que la RNPv

est un polymère de protéines NP sous forme simple brin qui se replie et s'enroule sur lui-même. La présence de la structure fermée dépend de la présence du complexe polymérase (128).

Expérimentalement, la conformation générale de la RNPv dépend beaucoup de la taille de l'ARNv. Lorsque celui-ci a une taille inférieure à 350 nucléotides, la RNPv est circulaire ou elliptique (Figure 10C), alors que lorsque sa taille est plus longue, sa structure est superhéliçoidale (Figures 10A et 10B). La structure tridimensionnelle d'une RNPv modèle ne contenant que 248 nucléotides a été déterminée par microscopie électronique à une résolution de 12 Å pour les protéines NP et de 18 Å pour le complexe polymérase (Figure 10C) (35). Cette RNPv est de forme circulaire et 9 protéines NP sont associées à l'ARNv. Deux de ces protéines NP sont en contact avec le complexe polymérase (Figure 10C), peut-être *via* PB1 et PB2 (18, 202), mais ces 2 protéines NP ne semblent pas être en contact avec la protéine PA ni être liées entre elles. L'interaction entre le complexe polymérase et l'anneau de protéine NP dépend de la présence de l'ARNv, puisqu'un traitement à la RNase permet de séparer ces 2 sous-structures.

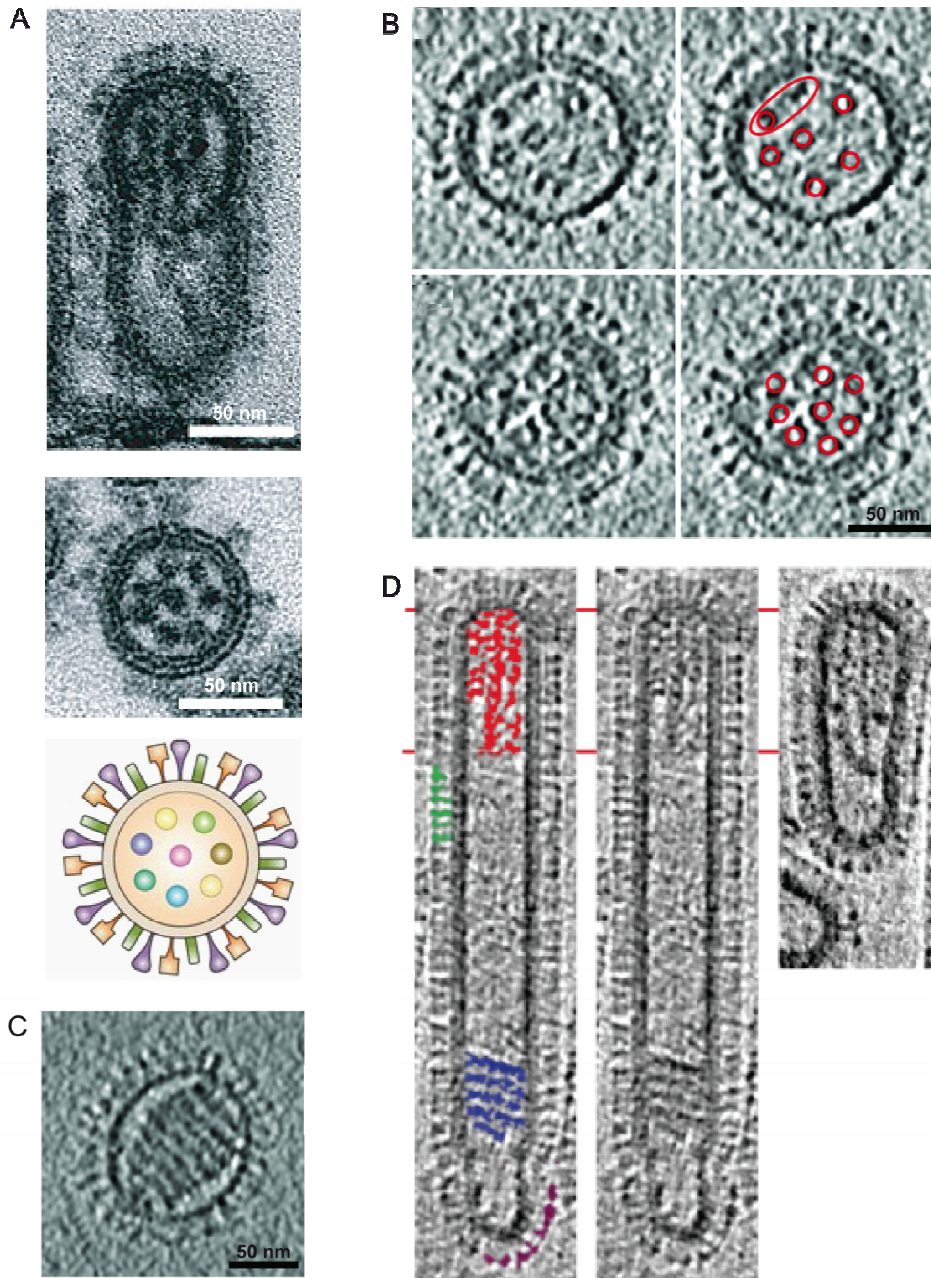
Au sein des virions, les RNPv sont présentes sous forme de filaments torsadés qui sont repliés et enroulés sur eux-mêmes, incurvés ou droits (99). Les premières études de sections longitudinales de particules virales colorées négativement montrent, à l'intérieur des virions, des structures denses aux électrons, avec parfois une organisation qui suggère des paquets de RNPv alignées (4, 7, 17, 37, 158). Ces RNPv sont associées à la matrice au niveau de l'extrémité bourgeonnante du virus (184). Les RNPv peuvent aussi être en contact avec la matrice aux 2 extrémités et, dans les particules sphériques, ces contacts ne sont pas regroupés (99). Les RNPv n'interagissent pas, ou au moins n'établissent pas de contact régulier avec la matrice sur leur longueur (23). Dans les particules allongées, les RNPv forment une liasse de RNPv quasiment parallèles associées à la matrice au niveau d'une extrémité du virion, le reste du virion demeurant vide (23, 99).



**Figure 10 :** Organisation d'une RNPv.

**A.** Observation en microscopie électronique d'une RNPv colorée négativement à l'acétate d'uracile. Grossissement approximatif de 300000 x. D'après (118). **B.** Représentations schématiques d'une RNPv proposées d'après l'observation de RNPv. L'ARNv est représenté par un trait noir, les protéines NP par des sphères violettes, les protéines PB2, PB1 et PA par des sphères respectivement de couleur verte, jaune et bleue. D'après (204). **C.** Reconstitution tridimensionnelle d'une mini-RNPv modèle obtenue à partir de données de cryo-électro-microscopie. La mini-RNPv est constituée d'un complexe polymérase (à gauche) et de 9 protéines NP, liées à un ARNv de 248 nucléotides, formant un anneau. Deux de ces protéines NP sont liées au complexe polymérase. La résolution est de 18 Å pour le complexe polymérase et de 12 Å pour les protéines NP. La structure atomique de la protéine NP est représentée dans le volume de chaque monomère de protéine NP obtenu lors de la reconstitution (sauf pour les 2 protéines NP en contact avec le complexe polymérase). D'après (35).

En section transversale, les structures denses aux électrons s'organisent de façon caractéristique avec une structure dense centrale entourée de 7 autres structures denses, couramment appelée distribution en « 7 + 1 » (Figure 11) (193). Une étude récente montre que les RNPv, d'un diamètre de 12 nm en coupe transversale, ont une distribution similaire avec 1 RNPv centrale entourée de 7 autres RNPv (184). Cette étude a été menée sur 4 souches humaines (WSN, PR8, A/Aichi/2/68 (H3N2), et la souche filamenteuse A/Udorn/307/72 (H3N2)), 2 souches aviaires et une souche porcine. Cette disposition a été également retrouvée dans une autre étude (99). Les RNPv sont souvent présentes sous forme de densités en forme de C qui semblent tourner entre différentes coupes d'une même série, suggérant l'existence d'une structure essentiellement hélicoïdale mais seulement faiblement ordonnée (99).



**Figure 11 :** Disposition des RNPv dans les particules virales.

**A.** Les virions de la souche WSN en cours de bourgeonnement montrent un arrangement spécifique de 8 bâtonnets de différentes longueurs correspondant aux RNPv. L'image en haut est une coupe longitudinale de virions en cours de bourgeonnement qui montre que les RNPv sont associées à l'enveloppe virale à l'extrémité distale du virion. L'image en-dessous correspond à une coupe transversale et montre une distribution caractéristique des RNPv avec une RNPv centrale entourée de 7 autres RNPv (distribution de type (7+1)). L'image du bas est une représentation schématique de cette distribution. D'après (184). **B.** Coupes transversales de virions de la souche A/Aichi/68 (H3N2), en position centrale, montrant une distribution des RNPv de type (7+1). Les images côte à côte sont identiques, sauf que les RNPv ont été entourées en rouge sur l'image de droite. Les RNPv ont une forme de C. Au niveau du panel supérieur, seules 6 RNPv périphériques sont visibles bien qu'une septième puisse être visible à une densité plus faible. D'après (99). **C.** Coupes transversales de virions de la souche A/Aichi/68 (H3N2) sans matrice apparente, en position centrale, montrant une organisation des RNPv de type solénoïde. D'après (99). **D.** Sections de tomogrammes de virions de la souche A/Udorn/72 filamenteux ou en forme de gélules. Les deux premières images sont identiques mis à part que celle de gauche a été annotée ainsi : les RNPv sont en rouge, les protéines NA en violet et les protéines HA en vert. D'après (23).

Certaines études montrent qu'au sein des particules libres, non attachées à la membrane cellulaire, la distribution « 7 + 1 » est retrouvée moins fréquemment, mais les auteurs pensent qu'il s'agit d'un artefact puisque les particules étant libres de tourner, la chance d'observer des coupes en section transversale diminue (20, 99, 184, 193, 261, 264). De plus, une analyse par biréfringence magnétique indique que les composants à l'intérieur des virions ont probablement le même degré d'organisation lorsque les particules virales sont libres et lors de l'étape de bourgeonnement (238).

## **2.4. L'infection des cellules hôtes**

### **2.4.1. Les différentes étapes du cycle viral**

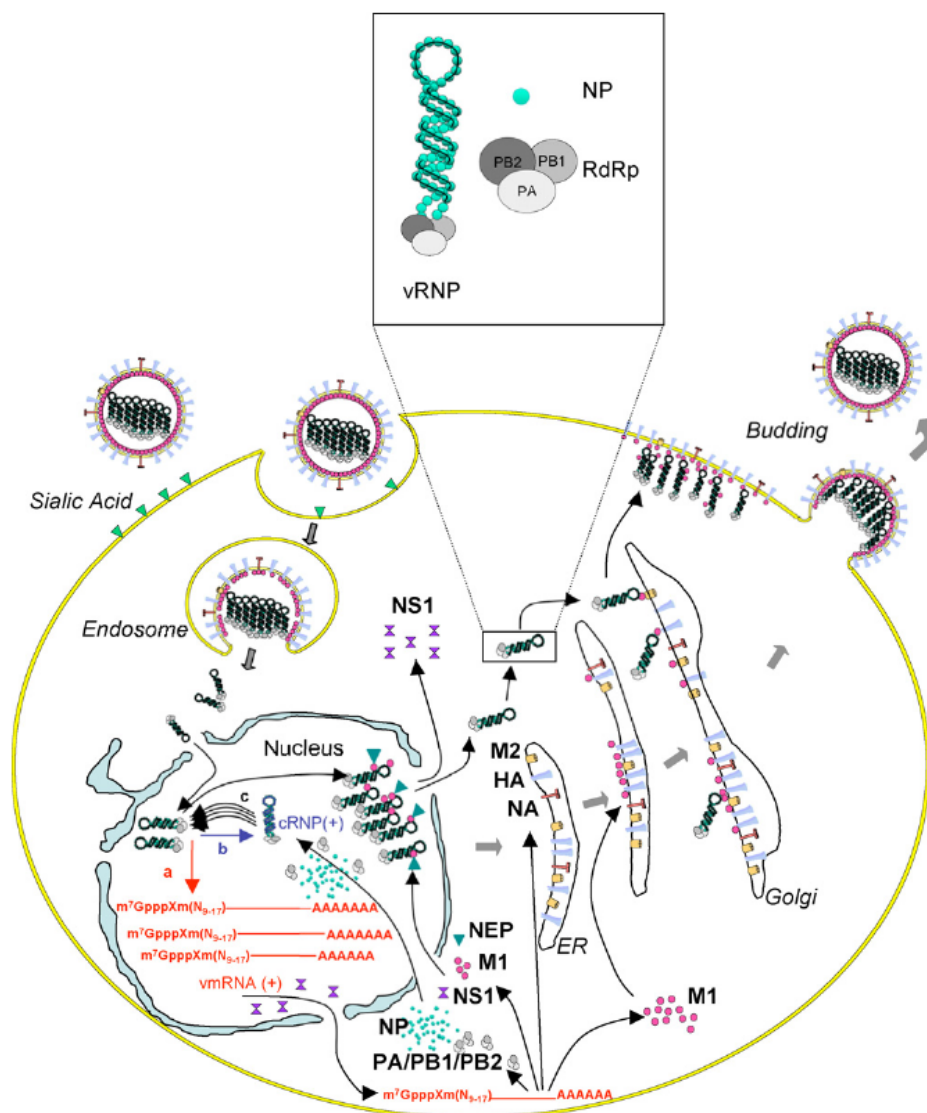
Les principales étapes du cycle répliatif du virus, que nous allons décrire, sont schématisées au niveau de la Figure 12.

#### **2.4.1.1. Attachement du virus à la cellule hôte et entrée du virus**

La face externe des membranes plasmiques au niveau du pôle apical des cellules eucaryotes polarisées est tapissée par un manteau de glucides nommé glycocalix. La plupart des sucres qui le constituent se terminent par des molécules d'acide sialique (ou acide neuraminique) liées à des molécules de galactose. Ce sont ces molécules d'acide sialique qui sont reconnues et liées par les *receptor binding sites* (RBS) des protéines HA présentes à la surface des *Influenzavirus A* (180).

Les virus humains et les virus porcins classiques se lient préférentiellement à des acides N-acetylneuraminiques reliés à un galactose par une liaison de type  $\alpha 2,6$  (SA $\alpha 2,6$ Gal) tandis que les virus aviaires se lient principalement lorsque la liaison est de type  $\alpha 2,3$  (SA $\alpha 2,3$ Gal), mais cette spécificité n'est pas absolue. Elle permet cependant d'expliquer le tropisme du virus. En effet, l'Homme possède majoritairement des récepteurs de type SA $\alpha 2,6$ Gal au niveau des cellules épithéliales de l'appareil respiratoire supérieur (nez, pharynx, trachée, bronches) mais des récepteurs de type SA $\alpha 2,3$ Gal ont récemment été décrits au niveau de l'appareil respiratoire inférieur (bronchioles et alveoles) (150). Ainsi une infection par des virus humains sera essentiellement localisée au niveau de l'appareil

respiratoire supérieur tandis qu'une infection par des virus aviaires (comme le virus aviaire hautement pathogène H5N1) atteindra des tissus situés plus bas dans l'appareil respiratoire. Les volailles ont quant à elles majoritairement des récepteurs de type SA $\alpha$ 2,3Gal au niveau de l'épithélium digestif, d'où une infection de l'appareil digestif. Enfin, les porcs possèdent au niveau de leur trachée les 2 types de récepteurs et peuvent ainsi être infectés par des virus porcins classiques, mais aussi des virus humains et aviaires (113).



**Figure 12 :** Représentation schématique du cycle réplcatif des *Influenzavirus A*. Se reporter au texte pour les explications. D'après (121).



Le virus pénètre ensuite dans la cellule par endocytose et se retrouve au sein d'un endosome. Dans le modèle traditionnel, l'endocytose est médiée par des molécules de clathrine. Il a cependant été montré que le virus pouvait être internalisé par un mécanisme ne faisant intervenir ni clathrine, ni calvéoline (221). De plus, les virus filamenteux pourraient entrer par macropinocytose.

#### 2.4.1.2. Fusion membranaire et libération du génome

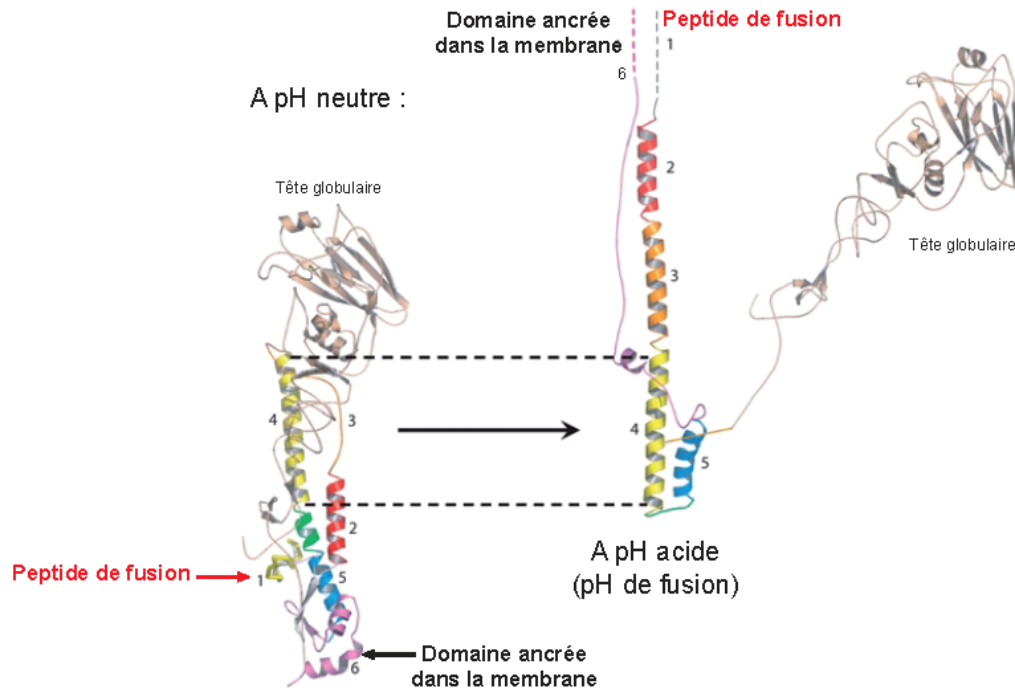
Le canal ionique M2 présent dans la membrane virale permet le passage de protons de l'endosome acide vers l'intérieur du virion (22). Cette acidification de l'intérieur du virus perturbe les interactions protéine/protéine et conduit à la dissociation des complexes formés entre les RNPv et les protéines M1.

Les membranes de l'endosome et du virus vont également fusionner de sorte à former des pores de fusion par lesquels les RNPv, préalablement dissociées des protéines de la matrice, seront libérées dans le cytosol (41, 100). La protéine HA mature (clivée en HA1 et HA2), et notamment l'extrémité N-terminale de HA2 appelée peptide de fusion, joue un rôle clé dans cette fusion des membranes. Le processus est initié par un changement conformationnel irréversible de la protéine HA provoqué par le pH acide de l'endosome. Au cours de cette modification de conformation, le peptide de fusion quitte l'intérieur de la sous-unité HA2 et s'oriente en direction de la membrane de l'endosome avec laquelle il peut alors interagir (Figure 13). Un changement de conformation de la protéine HA permet de rapprocher les membranes qui vont alors fusionner et former un pore de fusion par lequel les RNPv vont pouvoir passer dans le cytoplasme (Figure 13).

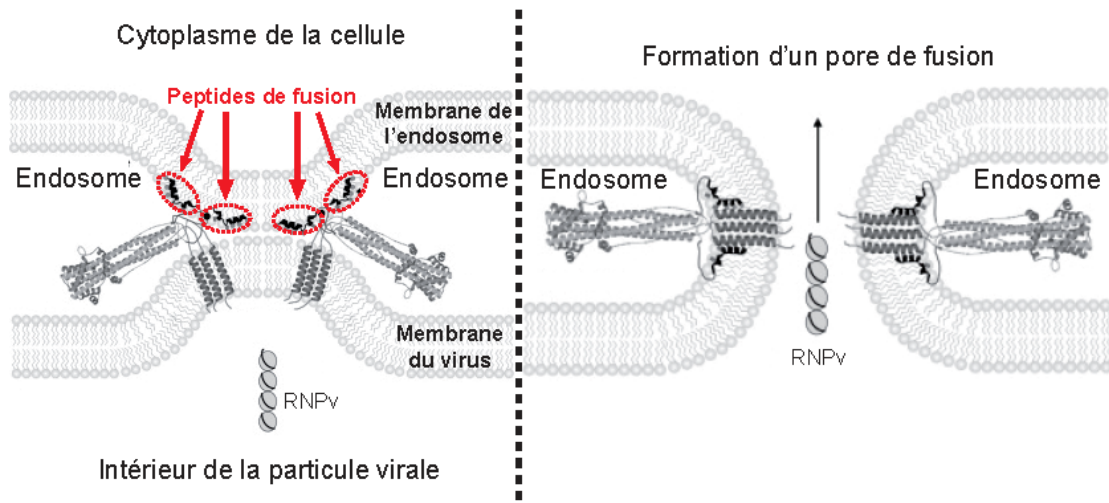
#### 2.4.1.3. Import des RNPv dans le noyau

Les RNPv libérées dans le cytoplasme doivent entrer dans le noyau (40) afin d'être transcrites en ARNm et répliquées. Une molécule d'importine  $\alpha$  (ou karyophérine  $\alpha$ ) va interagir avec le NLS non conventionnel de la protéine NP (39) qui recouvre l'ARNv, puis va recruter une molécule d'importine  $\beta$  (ou karyophérine  $\beta$ ) qui peut interagir avec les protéines du pore nucléaire par lequel les RNPv entrent dans le noyau (Figure 14). L'interaction de la protéine G cellulaire Ran•GTP avec l'importine provoque alors la dissociation du complexe RNPv/importine.

A



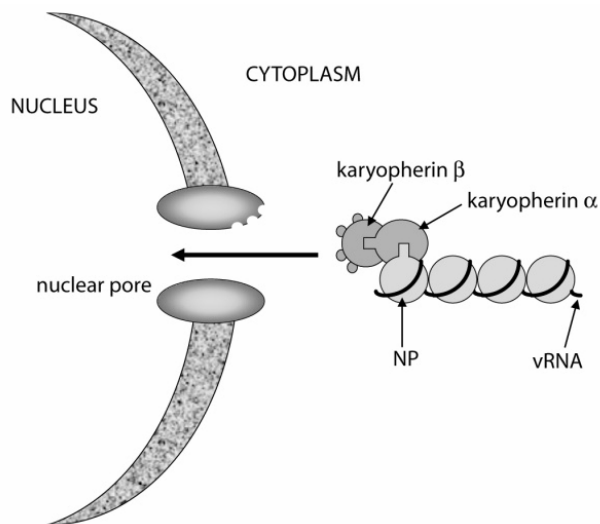
B



**Figure 13 :** La fusion de la membrane virale avec la membrane de l'endosome.

**A.** Modification conformationnelle de la protéine HA induite par la baisse du pH. **B.** Modèle expliquant la fusion de la membrane virale avec la membrane de l'endosome et la formation d'un pore de fusion. D'après (197).





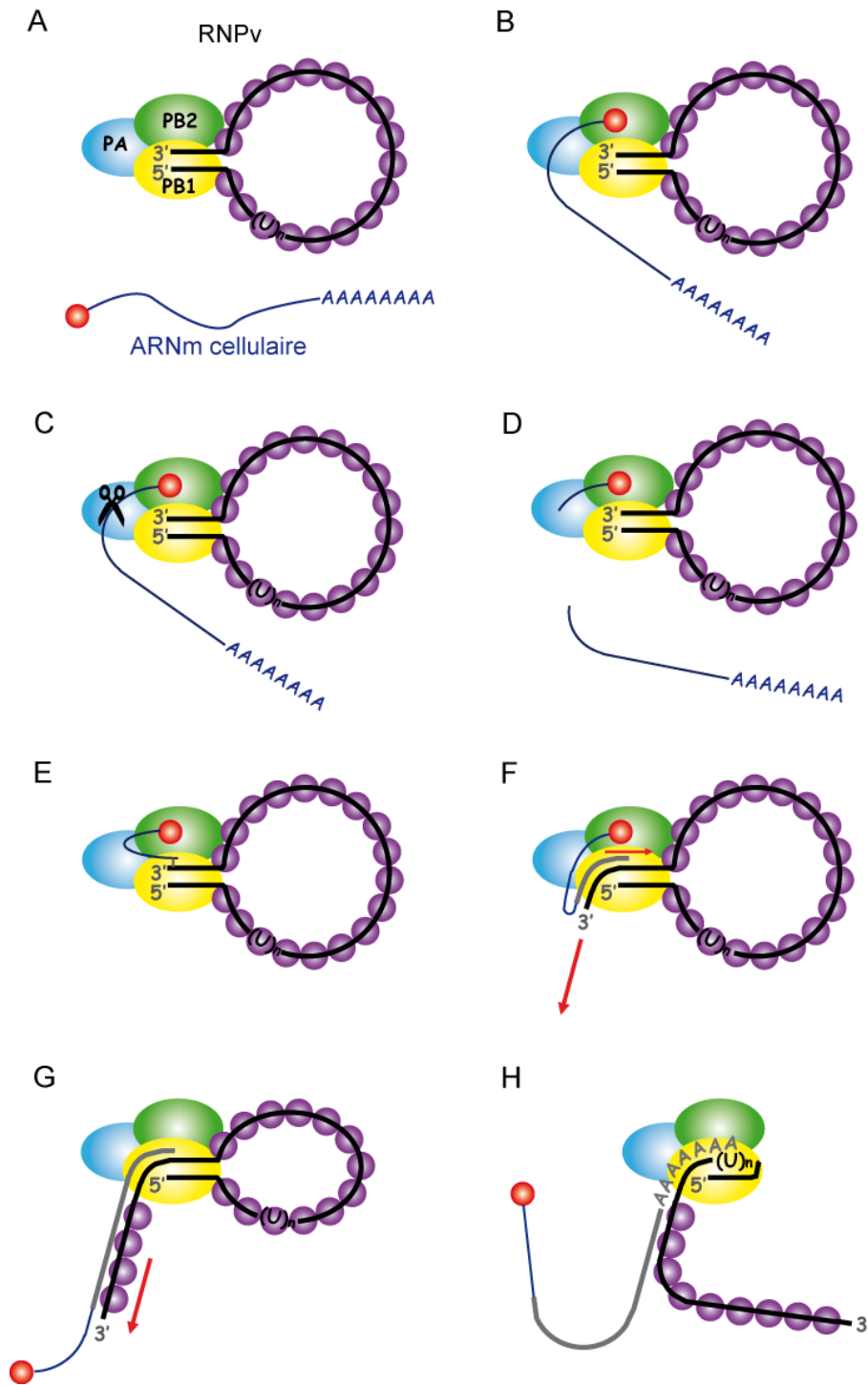
**Figure 14 :** Mécanisme d'import des RNPv dans le noyau. Se rapporter au texte pour la description du processus d'import. D'après (197).

#### 2.4.1.4. Expression du génome et réplication des RNPv

Chacune des 8 RNPv se comporte comme une unité de transcription/réplication indépendante.

Dans un premier temps, les ARNv présents dans le noyau sont transcrits en ARNm possédant une coiffe à leur extrémité 5' et une queue poly-(A) à leur extrémité 3'. Cette étape de transcription primaire permet notamment l'expression des protéines essentielles à la réplication des RNPv.

Dans un second temps, ces mêmes ARNv constituent les matrices pour la synthèse d'ARN de polarité positive, nommés ARN complémentaires (ARNc), servant d'intermédiaires de réplication (208). Cette synthèse est moins efficace que la transcription puisque les ARNc ne constituent que 5 à 10 % de la totalité des ARN de polarité positive d'une cellule infectée. Les ARNc servent de matrices à la polymérase pour la synthèse de nouveaux ARNv qui pourront être utilisés pour la transcription de nouveaux ARNm (transcription secondaire) et surtout être incorporés dans de nouvelles particules virales.



**Figure 15 :** Transcription des ARNm viraux.

**A.** Un ARNm cellulaire (représenté par un trait bleu) possédant une coiffe (représentée par une sphère rouge) se trouve à proximité d'une RNPv. Bien que nous ayons représenté l'ARNm cellulaire transcrit entièrement, il est vraisemblable qu'en réalité, il s'agisse d'un ARNm en cours de synthèse, puisque le complexe polymérase viral interagit avec l'ARN polymérase II cellulaire (non représenté). **B.** La coiffe de l'ARNm cellulaire se fixe à la sous-unité PB2 du complexe polymérase. **C et D.** L'ARNm cellulaire est clivé, 9 à 15 nucléotides en aval de la coiffe, par la sous-unité PA, produisant ainsi l'amorce ARN nécessaire à l'initiation de la transcription. **E.** L'extrémité 3' de l'amorce ARN s'hybride à l'extrémité 3' de l'ARNv. **F.** La synthèse de l'ARNm viral par la sous-unité PB1 débute. **G.** Après la polymérisation de 11 à 15 nucléotides, la coiffe se détache de la sous-unité PB2. **H.** La polymérase bégaye au niveau d'une région de 5 à 8 uraciles consécutives (notée  $(U)_n$ ) localisée 15 à 22 nucléotides en amont de l'extrémité 5' de l'ARNv, permettant ainsi la poly-adénylation de l'ARNm viral.

#### 2.4.1.4.1. Transcription des ARNv en ARNm et traduction en protéines

D'un point de vue mécanistique, l'initiation de la transcription d'un ARNv en ARNm nécessite une amorce ARN. Cette amorce provient du clivage d'un ARNm cellulaire, transcrit par l'ARN polymérase II et possédant une coiffe (m<sup>7</sup>GpppXm) à son extrémité 5'. Ce « vol de coiffe » (*cap snatching*) débute par la fixation de l'ARNm cellulaire au niveau de la sous-unité PB2 du complexe polymérase (Figure 15B) (94). Une fois la coiffe reconnue par PB2, l'ARNm cellulaire est clivé par la sous-unité PA du complexe polymérase (52, 268), 9 à 15 nucléotides en aval de la coiffe (Figure 15C). L'amorce ainsi produite possède dans la majorité des cas un dinucléotide CpA en 3' et peut s'hybrider à l'uridine en 3' de l'ARNv (Figure 15E). Après polymérisation de 4-5 nucléotides par la sous-unité PB1 (Figure 15F), la polymérisation devient processive, probablement suite à l'action de la protéine NP. Après ajout de 11 à 15 nucléotides, la coiffe se détache de PB2 par un mécanisme encore inconnu (Figure 15G). Les ARNm viraux possédant une extrémité 5' identique à celle des ARNm cellulaires, nous pouvons nous demander comment le complexe polymérase discrimine les 2 types de transcrits afin de voler uniquement la coiffe des ARNm cellulaires.

La transcription des ARNm viraux se termine par une poly-adénylation des transcrits à leur extrémité 3' par un mécanisme différent de celui mis en œuvre pour la poly-adénylation des ARNm cellulaires. En effet, la polyadénylation des ARNm viraux fait suite à un bégaiement de l'ARN polymérase sur une région formée de 5 à 8 uraciles consécutives, localisée 15 à 22 nucléotides en amont de l'extrémité 5' de l'ARNv (Figure 15H) (203, 270). Ce bégaiement de la polymérase serait dû au fait que, durant la synthèse de l'ARNm, le complexe polymérase reste lié à l'extrémité 5' de l'ARNv matrice, bloquant ainsi, par encombrement stérique, la synthèse de l'ARN complémentaire à cette extrémité. Néanmoins, ce modèle n'explique pas comment le complexe polymérase peut être recyclé afin d'effectuer d'autres cycles de transcription (66).

Les transcrits viraux subissent également certaines étapes de maturation des ARNm cellulaires telles que la méthylation des adénosines (129, 168) et l'épissage de certains transcrits (134, 135). Environ 10 % des transcrits synthétisés à partir des ARNv 7 (M) et 8 (NS) sont épissés bien qu'ils ne soient pas transcrits par l'ARN polymérase II (132, 135). Sans entrer dans les détails de la régulation de l'épissage, signalons juste que NS1 inhibe l'épissage du transcrit synthétisé à partir de l'ARNv 8 (NS) (82).

Les ARNm viraux doivent être exportés vers le cytoplasme pour y être traduits en protéines. Le mécanisme d'export n'est pas clairement déterminé. Il semblerait qu'il se fasse en partie passivement et selon une voie indépendante de Crm1 mais dépendante de la voie classique TAP/p15, de la protéine virale NS1, et de l'ARN polymérase II (3, 248). Il a également été montré que NS1 inhibe l'export de son propre transcrit (82).

Les gènes des *Influenzavirus A* peuvent se diviser en 2 groupes : gènes précoces (*pb1*, *pb2*, *pa*, *np*, *ns1* et *nep/ns2*) et gènes tardifs (*ha*, *na*, *m1* et *m2*). Ce contrôle s'effectue au niveau de la transcription et de la traduction. La régulation de la transcription des ARNm viraux est réalisée notamment par la protéine virale M1 qui a un rôle inhibiteur (250). Cette régulation est réalisée afin que les défenses anti-virales de l'hôte soient rapidement inhibées par NS1 (voir § 2.4.2.) et que les nouveaux virions ne puissent être produits qu'après plusieurs cycles de transcription/réplication.

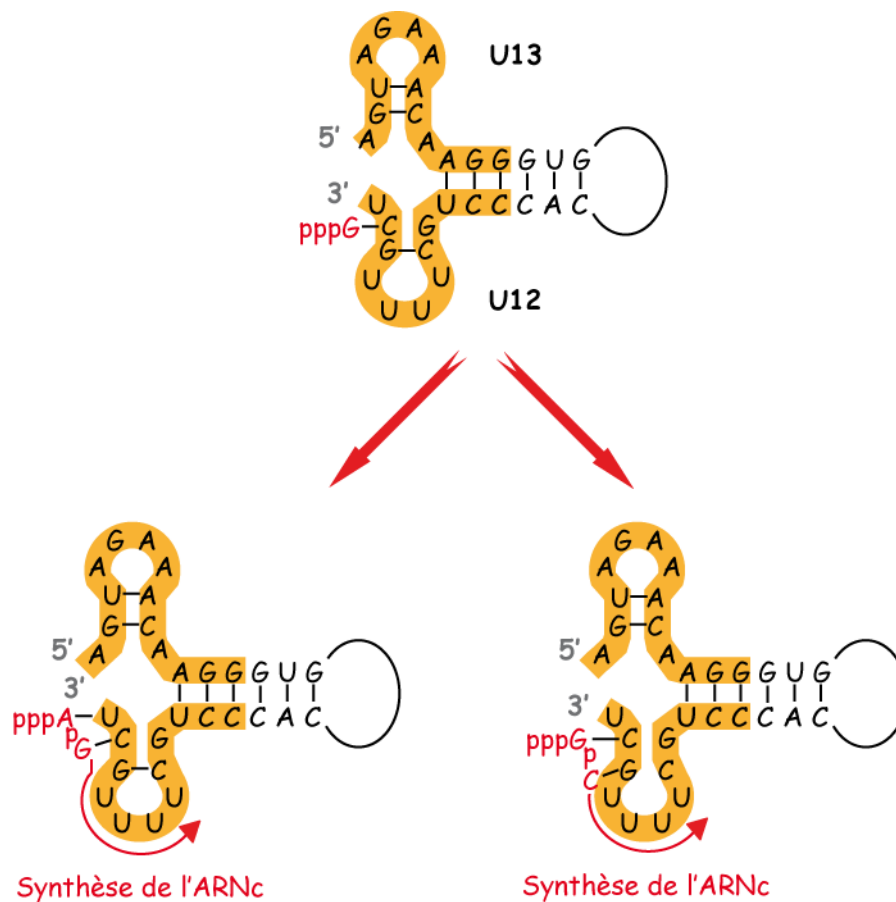
L'expression des gènes viraux est également contrôlée au niveau traductionnel. La protéine NS1 stimule la traduction des ARNm viraux en s'associant avec leur région 5' non traduite et avec des protéines cellulaires impliquées dans l'initiation de la traduction, notamment eIF4GI et PABP (5, 21, 198). Par ailleurs, le complexe polymérase interagit avec le complexe de pré-initiation de la traduction (21), ce qui suggère un rôle du complexe polymérase dans la traduction au niveau du cytoplasme. Signalons que la traduction des protéines cellulaires est quant à elle inhibée du fait notamment de la dégradation des ARNm suite au vol de leur coiffe et de l'inhibition de la maturation des ARNm cellulaires (épissage et poly-adénylation) par la protéine NS1.

Après leur synthèse, 6 protéines virales doivent intégrer le noyau afin de jouer leur rôle. Ce sont les 4 protéines présentes au niveau des RNPv (PB2, PB1, PA et NP), la protéine M1 et la protéine NS2 qui possèdent toutes un ou plusieurs NLS. Il a été proposé que les protéines PB1 et PA entreraient dans le noyau sous forme dimérique et que la protéine PB2, importée indépendamment, n'interagirait avec ce dimère qu'à l'intérieur du noyau (72). Par ailleurs, l'ARNv peut se lier au dimère PB1-PA avant de se lier à PB2 (49) et des dimères PB1-PA, formés dans le cytoplasme, peuvent intégrer le noyau indépendamment de PB2 (109). La formation et l'import nucléaire de dimères PB1-PB2 a cependant été avancée (164).

#### 2.4.1.4.2. Réplication des ARNv (-)

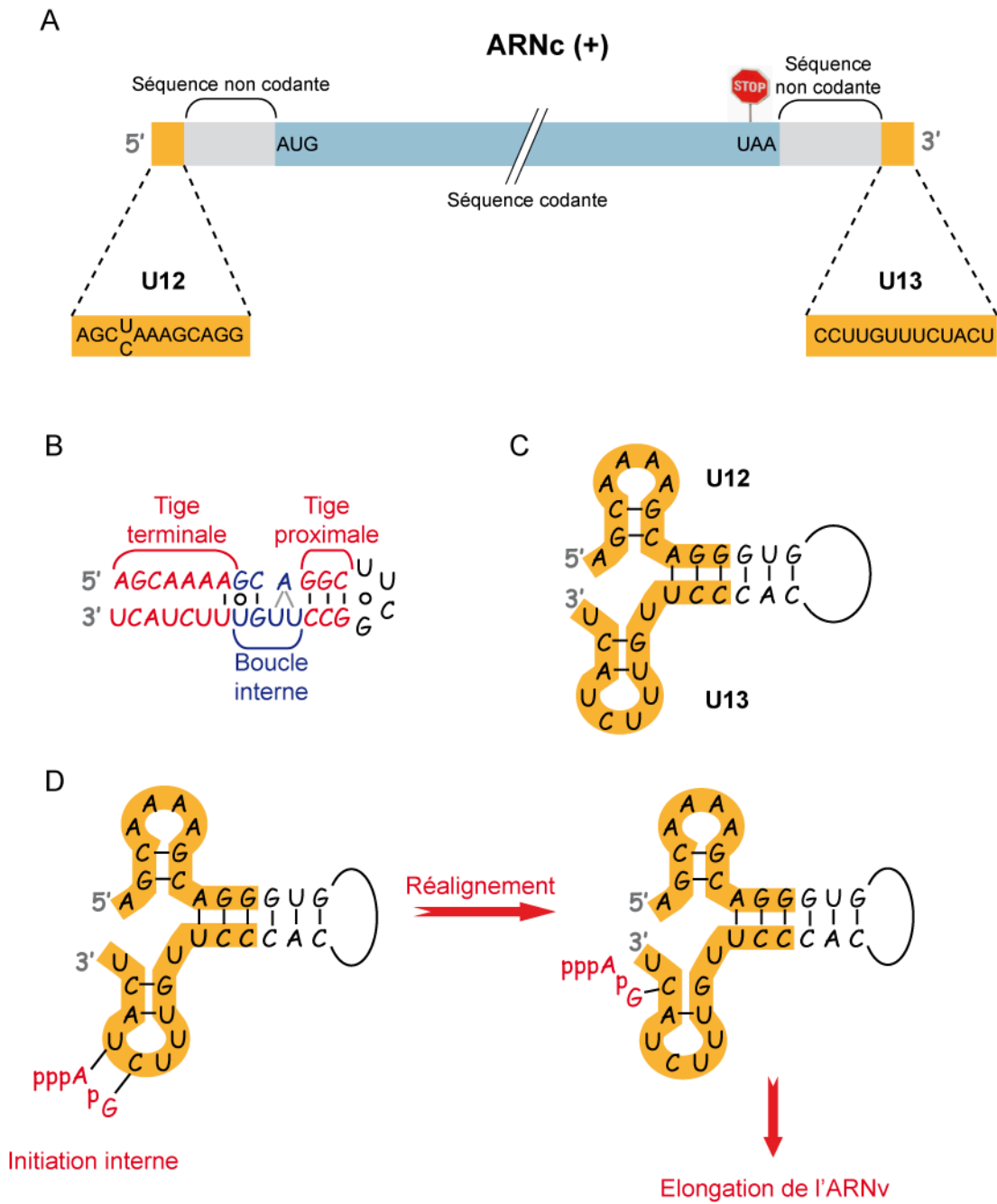
La réplication des ARNv débute par la synthèse d'intermédiaires de réplication appelés ARNc dont les séquences sont complémentaires à celle des ARNv. Ces ARNc sont associés à des complexes polymérases et à des protéines NP, formant ainsi des ribonucléoprotéines, appelées RNPs.

La synthèse de l'ARNc est initiée *de novo*, vraisemblablement grâce à une guanosine qui s'hybriderait à la cytidine en position 2 de l'extrémité 3' de l'ARNv, puis serait reliée par une liaison phosphodiester soit à une adénosine s'hybridant à l'uracile en position 1, soit à une cytosine s'hybridant à la guanine en position 3 (Figure 16) (246).



**Figure 16 :** Les mécanismes moléculaires de l'initiation de la synthèse des ARNc.

La production des ARNc est initiée par la synthèse de dinucléotides pppApG ou pppGpC s'hybridant à l'extrémité 3' de l'ARNv. La production de ces dinucléotides commencerait par l'hybridation d'une guanosine à la cytidine en position 2 de l'extrémité 3' de l'ARNv, puis cette guanosine serait liée par une liaison phosphodiester soit à une adénosine s'hybridant à l'uracile en position 1, soit à une cytosine s'hybridant à la guanine en position 2. L'ARNv est représenté en noir tandis que l'ARNc est représenté en rouge. D'après (246).



**Figure 17 :** La structure du promoteur de l'ARNc et le mécanisme d'initiation de la synthèse des ARNv.

**A.** Représentation linéaire de l'ARNc. **B.** Représentation de la structure du promoteur de l'ARNc d'après le modèle du repliement en « poêle à frire ». Les liaisons Watson-Crick entre bases sont représentées par des traits noirs, l'interaction Wobble G-U est représentée par un cercle tandis que les interactions non canoniques sont représentées par des traits gris. **C.** Représentation de la structure du promoteur de l'ARNc d'après le modèle du repliement en « tire-bouchon ». **D.** Modèle de l'initiation de la synthèse de l'ARNv. L'ARNc est représenté en noir tandis que l'ARNv est représenté en rouge. D'après (50).

Lors de la synthèse de l'ARNc, la polymérase ne bégaie pas au niveau de la région poly-(U) présente sur l'ARNv (mécanisme dit d'antiterminaison). Cette absence de bégaiement nécessite la présence de protéine NP (13) et pourrait donc être due à la fixation de protéines NP sur l'ARNc en cours de synthèse.

Les ARNc ainsi synthétisés servent de matrices au complexe polymérase pour la synthèse de nouveaux ARNv.

Le promoteur de l'ARNc (Figure 17A), comme celui de l'ARNv, semble se replier selon une structure en « poêle à frire » en l'absence de protéines (Figure 17B) (66) et selon une structure en « tire-bouchon » *in vivo* (Figure 17C) (42). Néanmoins, les structures secondaires des promoteurs des ARNv et ARNc diffèrent quel que soit le modèle considéré (comparer les Figures 4B et 17B, ainsi que les Figures 4C et 17C). Le modèle de repliement du promoteur de l'ARNc privilégié actuellement est celui de la structure en « tire-bouchon » (Figure 17C). Il semblerait que des régions distinctes du complexe polymérase interagissent avec les promoteurs de l'ARNv et de l'ARNc, si bien que les complexes de répllication des RNPv et RNPc sont probablement structurellement et fonctionnellement différents.

Le modèle expliquant la synthèse d'ARNv à partir d'ARNc a été établi sur la base d'expériences de synthèse d'ARN réalisées *in vitro* (50). Le complexe polymérase initie la synthèse de l'ARNv sans amorce en hybridant une adénosine à l'uracile en position 4 de l'extrémité 3' du promoteur de l'ARNc (Figure 17D). Une cytosine, s'hybridant à la guanine en position 5 de l'extrémité 3' de l'ARNc, est ensuite liée à l'adénosine par une liaison phosphodiester, générant ainsi un dinucléotide pppApG (Figure 17D) (50). Dans un second temps, ce dinucléotide pppApG va se réaligner face aux 2 premiers nucléotides de l'extrémité 3' du promoteur, la guanine du dinucléotide pppApG va s'hybrider à la cytidine en position 2 du bras 3' du promoteur, puis la polymérase continuera la synthèse de l'ARNv (Figure 17D). Les éléments structuraux du promoteur de l'ARNc qui contrôlent l'initiation de la synthèse d'ARNv à partir du nucléotide en position 4 ont été définis (50). L'initiation nécessite la présence d'une uracile « charnière » en position 10 de l'extrémité 3' du promoteur de l'ARNc (absente dans le cas de l'ARNv) et d'une adénosine en position 3 (Figure 17C). En outre, l'adénosine « charnière » en position 10 de l'extrémité 5' de l'ARNv (absente dans le cas de l'ARNc, comparer les Figures 4C et 17C) semble être un élément empêchant une initiation interne de la synthèse d'ARN. Par ailleurs, il semblerait que les ARNv soient synthétisés par un complexe polymérase différent de celui présent au sein de la RNPc utilisée comme matrice (120). Actuellement, nul ne sait comment se termine la synthèse des ARNv.

La synthèse d'ARNv est régulée. Elle semble notamment être favorisée par la protéine NS1 (69) et par la liaison de la protéine NP au complexe polymérase (177). De petits ARN viraux, correspondant aux extrémités 5' des ARNv, le plus souvent d'une taille de 25 nucléotides (ARNv 2, 3, 6, 7 et 8) ou 27 nucléotides (ARNv 1, 4 et 5), stimulent également la synthèse d'ARNv (mais pas d'ARNc) de manière segment-spécifique probablement en s'associant avec le complexe polymérase entier (199). La synthèse de ces petits ARNv nécessite la présence de complexes polymérase, de protéines NP et NEP/NS2.

#### 2.4.1.4.3. Le passage de la transcription à la réplication

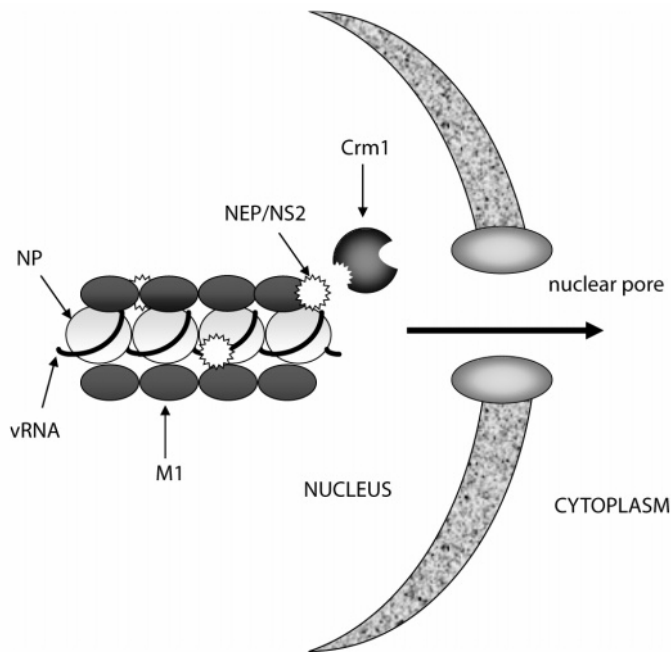
Plusieurs hypothèses, parfois contradictoires, ont été proposées pour expliquer comment le complexe polymérase « choisit » de synthétiser des ARNm ou des ARNc à partir d'ARNv, mais aucune ne fait *consensus* pour le moment (66).

Même si le complexe polymérase seul a la capacité de synthétiser de l'ARNc *in vitro* (245, 246) et *ex vivo* (246), des facteurs viraux et cellulaires semblent tout de même réguler cette synthèse. Parmi ces facteurs, la protéine NP semble jouer un rôle important. En effet, même si une étude montre que l'addition de protéine NP libre ne stimule pas la synthèse d'ARNc (245), 2 autres indiquent le contraire (123, 177). Par ailleurs, la protéine M1 inhibe la transcription des ARNm viraux (250) et la protéine NS2 semble inhiber la transcription tout en favorisant la synthèse des ARNc, voire des ARNv (209). Certains facteurs cellulaires semblent réguler la réplication des RNPv (163). L'un de ces facteurs est l'hélicase MCM qui, en se liant à la sous-unité PA du complexe polymérase, pourrait favoriser l'interaction entre l'ARNc néosynthétisé et le complexe polymérase, limitant ainsi la production d'ARNc abortifs au profit d'ARNc de pleine taille (124).



#### 2.4.1.5. Export des RNPv néo-synthétisées

Une fois formées dans le noyau, une partie des RNPv doit être exportée vers le cytoplasme (40) pour être incorporée dans les virions en cours de formation. Comme nous l'avons déjà évoqué, l'export de RNPv ne doit pas avoir lieu trop tôt au cours du cycle viral afin que le génome viral soit suffisamment transcrit et répliqué.



**Figure 18 :** Mécanisme d'export des RNPv dans le noyau.

Se rapporter au texte pour la description du processus d'export. D'après (197).

Le modèle actuellement privilégié pour expliquer l'export des RNPv est le suivant. Tout d'abord, la protéine M1 interagit avec la RNPv et la protéine NEP/NS2 s'associe avec M1 (Figure 18). La synthèse tardive de la protéine M1 pourrait expliquer l'export tardif des RNPv. Ensuite, la protéine NEP/NS2 recrute la machinerie d'export en interagissant notamment avec la protéine Crm1 (Figure 18). Étrangement, cette interaction ne semble pas se faire *via* le signal d'export nucléaire de la protéine NEP/NS2 (175). Enfin, le complexe traverse le pore nucléaire en direction du cytoplasme (Figure 18). Signalons que la protéine NP se lie également à Crm1 (67) et pourrait donc jouer un rôle dans l'export des RNPv. Les différentes RNPv sont vraisemblablement exportées indépendamment les unes des autres (233). Il semblerait que l'interaction de la protéine NEP/NS2 avec le NLS de M1 (1) empêche les RNPv de retourner dans le noyau, mais l'interaction de la protéine NP avec les filaments d'actine pourraient également jouer un rôle.

#### 2.4.1.6. Assemblage, bourgeonnement et libération des virions

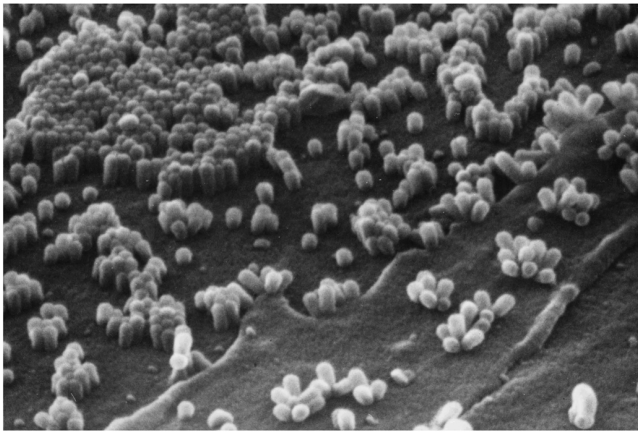
Les particules virales s'assemblent et bourgeonnent à partir de la membrane plasmique au pôle apical des cellules polarisées (169, 212).

Après être passées dans l'appareil de Golgi, les protéines HA, NA et M2 sont dirigées vers la membrane plasmique apicale *via* leurs signaux de sortie apicale. La queue cytoplasmique de M2 est impliquée dans la capture des RNPv au site d'assemblage (151). Actuellement, on ne sait pas exactement comment les RNPv et les protéines M1 et NEP/NS2 atteignent le site d'assemblage et, même si les protéines M1 et NP interagissent avec des composants du cytosquelette, d'autres voies pourraient être utilisées. Les mécanismes permettant l'incorporation d'un jeu de 8 ARNv différents dans les virions seront discutés dans le paragraphe 3. Les virions s'assemblent et bourgeonnent préférentiellement au niveau de radeaux lipidiques présents dans la membrane plasmique. Ces radeaux lipidiques sont définis comme étant des microdomaines lipidiques, résistants aux détergents non anioniques, et sont riches en sphingolipides et en cholestérol. Les protéines HA et NA sont incorporées dans les radeaux lipidiques grâce à la présence de déterminants pour l'association aux radeaux lipidiques au niveau de leur domaine transmembranaire (9). Les protéines M2 sont quant à elles exclues de ces radeaux lipidiques (269) mais se lient au cholestérol (217), ce qui suggère qu'elles pourraient être en périphérie des radeaux lipidiques et relier plusieurs radeaux lipidiques entre eux.

On a longtemps considéré que la protéine M1 jouait un rôle majeur dans le bourgeonnement puisque cette protéine est suffisante et nécessaire à la formation de pseudo-particules virales (90, 136). Néanmoins, les protéines HA, NA ou M2 seules peuvent aussi induire la formation de pseudo-particules virales (27, 131).

L'initiation du bourgeonnement nécessite une courbure de la membrane plasmique vers l'extérieur. Cette courbure pourrait être provoquée par l'accumulation de protéines M1 sous la bicouche lipidique. Néanmoins, Rossman et Lamb suggèrent que la courbure de la membrane est initiée par une forte concentration de HA et NA dans les radeaux lipidiques et que le rôle de M1 ne serait que secondaire dans l'initiation de la courbure (210, 211). Cette protéine pourrait être recrutée par les queues cytoplasmiques des protéines HA et/ou NA, ce qui permettrait l'association de M1 aux radeaux lipidiques, conduisant ensuite à un changement conformationnel de M1 qui permettrait sa polymérisation au site d'assemblage et de bourgeonnement (90). Une fois le bourgeonnement initié, celui-ci continue jusqu'à ce que

les RNPv soient totalement englobées par la membrane, puis les membranes fusionnent à la base du bourgeon, libérant ainsi la particule virale néo-synthétisée. La protéine M1 possède un domaine tardif (*late domain*) qui recrute des facteurs cellulaires nécessaires aux dernières étapes du bourgeonnement (74). La protéine M2 est indispensable au bourgeonnement durant une infection virale, et jouerait probablement un rôle dans la finalisation du bourgeonnement, c'est-à-dire la scission (26, 32, 114, 151, 152, 210). Cette scission est très peu efficace puisque seulement 10 % des virions ayant bourgeonné se séparent de la cellule. Signalons enfin que le bourgeonnement des *Influenzavirus A* ne fait pas intervenir la machinerie cellulaire ESCRT qui est recrutée par de nombreux autres virus au moment du bourgeonnement (266).



**Figure 19 :** Observation en microscopie électronique à balayage de particules virales en cours de bourgeonnement. Grossissement 40 000 fois. D'après (169).

Les particules virales produites ont tendance à se lier à la cellule productrice par l'intermédiaire d'interactions entre les protéines HA virales et les molécules d'acide sialique à la surface de la cellule. Les virions ne seront libérés qu'après retrait de l'acide sialique par la NA. La NA va également cliver les acides sialiques des glycoprotéines virales afin d'éviter l'agrégation des virions et ceux présents dans l'environnement (mucus et autres cellules) afin de favoriser la diffusion des virions dans l'organisme.

## 2.4.2. L'inhibition des défenses anti-virales

Le virus développe tout un ensemble de stratégies pour échapper aux défenses anti-virales mises en place par l'hôte. La protéine virale NS1 joue un rôle capital dans ces processus (96). Nous allons énumérer quelques une des stratégies mises en place pour échapper aux défenses anti-virales.

Tout d'abord, la protéine NS1 inhibe la réponse immunitaire de l'hôte. En effet, elle inhibe, par un mécanisme qui n'est pas encore clairement établi, la synthèse d'interféron de type I (IFN- $\alpha/\beta$ ) qui est une molécule cruciale de la réponse immunitaire innée de l'hôte. De plus, NS1 inhibe également la réponse immunitaire adaptative (70).

NS1 inhibe la 2'-5' oligoadenylate synthetase (OAS) (155). Or l'activation de cette enzyme active normalement la RNase L qui inhibe la réplication virale en dégradant l'ARN (222). Par ailleurs la RNase L augmente la production d'IFN- $\beta$  (222).

NS1 inhibe également l'activation de la protéine kinase R (PKR) qui normalement inhibe la traduction protéique (156). Elle réalise cette inhibition d'une part en séquestrant l'ARN double-brin qui est l'activateur de la PKR et d'autre part, en interagissant avec la PKR. De plus, l'expression de la PKR est normalement induite par l'interféron, qui est également la cible de NS1.

Enfin, le virus induit l'apoptose des cellules ce qui, de façon surprenante, semble favoriser la réplication virale (197). Cette induction de l'apoptose peut se faire *via* l'activation du TGF- $\beta$  par la protéine NA et/ou, suivant la souche, par l'activation de la voie de signalisation PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase). Les protéines virales M1, M2 et PB1-F2 induisent également l'apoptose. Néanmoins, NS1 inhibe la PKR qui est un facteur activateur de l'apoptose et, suivant la souche, active la PI3K qui est notamment impliquée dans l'inhibition de l'apoptose.

## **2.5. Evolution des *Influenzavirus A***

### **2.5.1. Les mécanismes moléculaires permettant l'évolution du virus**

D'un point de vue mécanistique, les *Influenzavirus A* peuvent évoluer par mutation, par réassortiment génétique et par recombinaison, homologue ou non.

L'évolution des *Influenzavirus A* par mutation est facilitée par le fait que la polymérase virale est peu fidèle car elle ne possède pas d'activité correctrice. Le taux de mutations des *Influenzavirus A* est de l'ordre de  $10^{-3}$  mutations par site nucléotidique et par année (30, 125, 143, 145, 182, 252). Ainsi, des mutations ponctuelles sont introduites dans le génome au fur et à mesure des cycles réplicatifs.

Les *Influenzavirus A* peuvent aussi évoluer par réassortiment génétique. Ce phénomène peut se produire lorsqu'une cellule est infectée par plusieurs virus appartenant à des souches différentes. Dans ce cas, le matériel génétique des virus « parentaux » peut se mélanger et des virions possédant un génome hybride seront produits. Bien que les virus appartenant à chacun des 3 genres *Influenzavirus* soient sujets au réassortiment génétique, le réassortiment génétique entre virus de genres différents n'a jamais été observé, probablement à cause de la divergence entre les 3 genres au cours de l'évolution. Le réassortiment génétique entre *Influenzavirus A* sera détaillé dans le paragraphe 5.

La recombinaison homologue n'est pas un mécanisme couramment observé pour les virus à ARN de polarité négative (25). Les *Influenzavirus* ne dérogent pas à cette règle et leur évolution par recombinaison est rare, voire indétectable (19, 97, 98). Un certain nombre d'événements de recombinaison homologue et non homologue entre ARNv d'*Influenzavirus A* ont tout de même été détectés (133). Il a également été proposé que la protéine HA du virus pandémique de 1918-1919 serait issue d'un événement de recombinaison entre les protéines d'un lignage humain donnant la partie HA2 et d'un lignage porcin donnant la partie HA1 (87, 88), mais cette conclusion ne fait pas l'unanimité (255).

### **2.5.2. Les conséquences de l'évolution des *Influenzavirus A***

L'évolution des *Influenzavirus A* se fait par glissement antigénique (*antigenic drift*) et par cassure (ou saut) antigénique (*antigenic shift*).

L'accumulation de mutations, essentiellement au niveau des ARNv 4 (HA) et 6 (NA) codant les glycoprotéines de surface, peut être à l'origine de variations des déterminants antigéniques. De telles modifications sont à l'origine d'une dérive antigénique qui permet d'expliquer que les virus circulants au cours des épidémies de grippe successives n'ont pas les mêmes propriétés antigéniques.

La cassure antigénique correspond quant à elle au changement soudain et profond dans les déterminants antigéniques HA et/ou NA. Dans ce cas, les virus rencontrent des hôtes immunologiquement naïfs, ce qui conduit à des pandémies. Fort heureusement, les cassures antigéniques sont des événements peu fréquents. Elles surviennent lorsqu'un virus passe directement d'une espèce à une autre ou lorsqu'un changement d'au moins un des antigènes de surface s'est produit par réassortiment génétique.

### **2.6. Les vaccins contre la grippe**

Les vaccins anti-grippaux à destination de l'Homme constituent un moyen de protection efficace contre la grippe. Néanmoins, l'évolution rapide du virus nécessite une vaccination annuelle. La majorité des vaccins sont produits à partir de virus inactivés préalablement amplifiés sur œufs de poules embryonnés. Ces vaccins correspondent à un mélange de 3 souches vaccinales, choisies par l'OMS en février pour l'hémisphère nord, correspondant à un *Influenzavirus A* de sous-type H1N1, un *Influenzavirus A* de sous-type H3N2 et un *Influenzavirus B*.

Les souches vaccinales sont issues d'un réassortiment génétique entre les souches d'*Influenzavirus A* circulantes choisies par l'OMS et la souche PR8 qui est une souche permettant d'obtenir de bons rendements sur œufs de poules. Chaque souche vaccinale est produite de manière indépendante vis-à-vis des 2 autres. La souche circulante et la souche PR8 sont injectées dans un œuf de poule embryonné. Les virus réassortants possédant les

ARNv 4 (HA) et 6 (NA) de la souche circulante sont sélectionnés. Une seconde sélection s'opère ensuite selon le pouvoir réplcatif des virus et leur stabilité.

Des vaccins anti-grippaux à base de virus vivants atténués, administrés par voie nasale, sont également utilisés aux USA et en Russie (*live attenuated influenza vaccine* ou *LAIV*). Les virus utilisés pour ces vaccins sont produits par réassortiment génétique entre les souches circulantes et des souches donneuses thermosensibles de types A ou B de sorte à ce qu'ils possèdent les antigènes de surface de la souche circulante et les gènes internes de la souche donneuse qui confèrent le phénotype thermosensible. Ce phénotype thermosensible permet la réplication du virus dans le rhinopharynx qui est à une température relativement basse (33°C), mais pas ou peu dans d'autres régions de l'organisme qui sont à des températures plus élevées.

### **3. L'incorporation des RNPv au sein des virions**

#### **3.1. La segmentation du génome : avantages et inconvénients**

La fragmentation du génome des *Influenzavirus A* en 8 segments distincts confère des avantages évolutifs au virus mais présente aussi des inconvénients (111).

En premier lieu, la segmentation du génome permet de pallier la faible fidélité de la polymérase virale (111). En effet, un génome intact peut être reconstitué à partir d'une sélection d'ARNv mutés et non mutés, évitant ainsi l'accumulation irréversible de mutations délétères. Le second avantage est la possibilité d'acquérir des allèles bénéfiques et de générer différents génotypes par brassage génétique (111). En effet, le réassortiment génétique entre souches d'*Influenzavirus A* joue un rôle important dans leur évolution car il peut provoquer des cassures antigéniques à l'origine de pandémies grippales comme en 1957, 1968 et 2009 (236).

La segmentation du génome complique cependant l'incorporation d'un génome complet dans les particules virales, or pour être infectieux, un virion doit incorporer au moins un exemplaire de chacun des 8 ARNv puisqu'ils codent tous un ou plusieurs gènes indispensables à la réplication du virus (111). Dans la mesure où l'infection par les *Influenzavirus A* est initiée à une faible multiplicité d'infection (MOI, *multiplicity of infection*), c'est-à-dire par un faible nombre de particules virales, leur génome ne peut pas être délivré aux cellules hôtes par plusieurs particules contenant chacune une partie du génome viral. La présence d'un génome complet dans la majorité des virions est donc indispensable à la subsistance du virus.

#### **3.2. Modèle d'incorporation aléatoire et modèle d'incorporation spécifique**

Il existe 2 modèles pour expliquer l'incorporation des ARNv composant le génome des *Influenzavirus A* dans les virions : un modèle d'incorporation aléatoire et un modèle d'incorporation spécifique des ARNv (111).

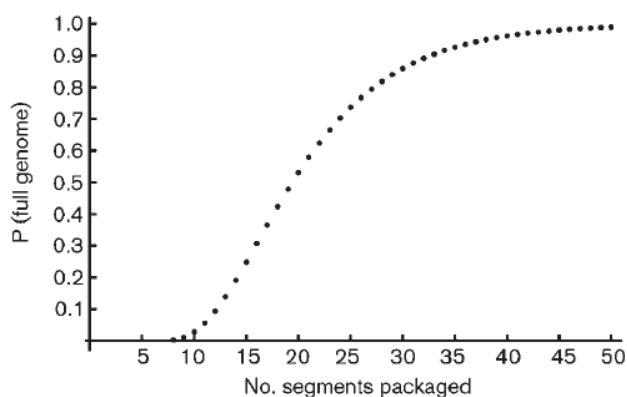
Dans le modèle d'incorporation aléatoire des ARNv, un mécanisme permettrait de distinguer les ARNv des autres ARN présents dans la cellule, mais les 8 types d'ARNv ne seraient pas discriminés les uns des autres au moment de leur incorporation dans les particules virales (111). En revanche, dans le modèle d'incorporation spécifique des ARNv, il existerait



un mécanisme permettant de discriminer les différents types d'ARNv et d'incorporer dans chaque particule virale un exemplaire de chacun des 8 ARNv (111).

Le modèle actuellement privilégié est celui d'une incorporation spécifique des ARNv (111). Cette préférence repose en premier lieu sur le fait que, dans une population donnée, environ 1 à 10 % des particules virales sont infectieuses (54, 110, 127, 165) alors que, statistiquement, seules 0,24 % des particules posséderaient un génome complet en incorporant 8 ARNv de manière aléatoire (68, 165).

La probabilité qu'une particule virale possède un génome complet en fonction du nombre d'ARNv incorporés a été modélisée (Figure 20) (68, 111). Statistiquement, il faudrait que 12 ARNv soient incorporés dans chaque virion pour qu'environ 10 % des particules virales possèdent un génome complet. Néanmoins, des défauts autres que l'absence d'un jeu complet d'ARNv peuvent expliquer qu'une particule virale n'est pas infectieuse. Il est donc vraisemblable que les particules virales doivent incorporer plus de 12 ARNv pour que 10 % d'entre elles soient infectieuses. La présence de plus de 8 ARNv dans des particules virales est possible dans certains cas (8, 68, 80, 141, 216, 257), mais la majorité des particules virales contient exactement 8 RNPv disposées de façon caractéristique avec une RNPv centrale entourée de 7 autres (Figure 11) (23, 99, 184, 193).



**Figure 20 :** Probabilité d'obtenir un génome complet en fonction du nombre d'ARNv incorporés dans les virions de manière aléatoire. Modèle mathématique simple élaboré d'après la théorie de Enami *et al.* D'après (68, 111).

Un autre argument en faveur d'une incorporation spécifique des ARNv est la présence des 8 ARNv de façon équimolaire dans les virions (101, 153, 227), et ce, même si ces ARNv sont présents à différents rapports dans les cellules infectées (227). Il a aussi été montré expérimentalement qu'une baisse du niveau d'un ARNv dans les cellules infectées n'est pas associée à une baisse de cet ARNv dans les particules virales (16). Signalons cependant que certaines études ont mis en évidence une bonne corrélation entre la diminution du niveau d'un ARNv dans les cellules et dans les particules virales, amenant ainsi les auteurs à conclure que

les ARNv sont incorporés de manière aléatoire (15, 146, 271). Ces résultats pourraient peut-être s'expliquer par une diminution trop drastique du niveau des ARNv dans les cellules.

La présence de seulement 8 RNPv dans de longues particules virales filamenteuses (Figure 11) (23) dont la taille permettrait l'incorporation d'un plus grand nombre de RNPv va également dans le sens d'une incorporation spécifique du génome.

Enfin, comme nous le verrons, de nombreux travaux réalisés afin d'identifier les régions responsables de l'incorporation des ARNv apportent un certain nombre d'indices en faveur du modèle d'incorporation spécifique.

### **3.3. Les régions des ARNv nécessaires à leur incorporation dans les virions**

#### **3.3.1. Les ARN défectifs-interférents sont incorporés dans les virions**

##### **3.3.1.1. Description des ARN défectifs-interférents**

Il existe, pour un certain nombre de virus animaux, des virus mutants non infectieux qui ne peuvent se répliquer sans l'aide d'un virus *helper* et qui, lors d'une co-infection, interfèrent fortement avec la réplication des virus sauvages homologues ou apparentés. De tels virus sont appelés virus défectifs-interférents ou virus DI. Dans le cas des *Influenzavirus*, von Magnus a décrit pour la première fois la formation de virus non infectieux suite à des passages successifs de virus, à haute MOI (sans dilution), sur œufs embryonnés (244). D'autres virus DI ont ensuite été mis en évidence *in vitro* et *in vivo*.

Contrairement aux virus sauvages, les virus DI incorporent des ARN, appelés ARN défectifs-interférents (ARN DI), qui ont une taille inférieure aux ARNv (33, 43, 60, 102, 116, 118, 166, 196, 200) et qui sont responsables du mécanisme d'interférence (117). Les ARN DI sont des ARNv tronqués (46, 171) générés par délétion interne (45). Le séquençage complet de nombreux ARN DI indique que la plupart proviennent d'une délétion interne unique (Figure 21) (64, 65, 118, 170, 181, 190, 224, 253, 263). Ces ARN DI ont le plus souvent une longueur comprise entre 200 et 600 nucléotides et ils conservent généralement à chacune de leurs extrémités 100 à 300 nucléotides provenant de l'ARNv dont ils sont issus (Figure 21). La plupart des ARN DI proviennent des ARNv codant les protéines du complexe polymérase mais il existe également des ARN DI dérivés de chacun des 5 autres ARNv.

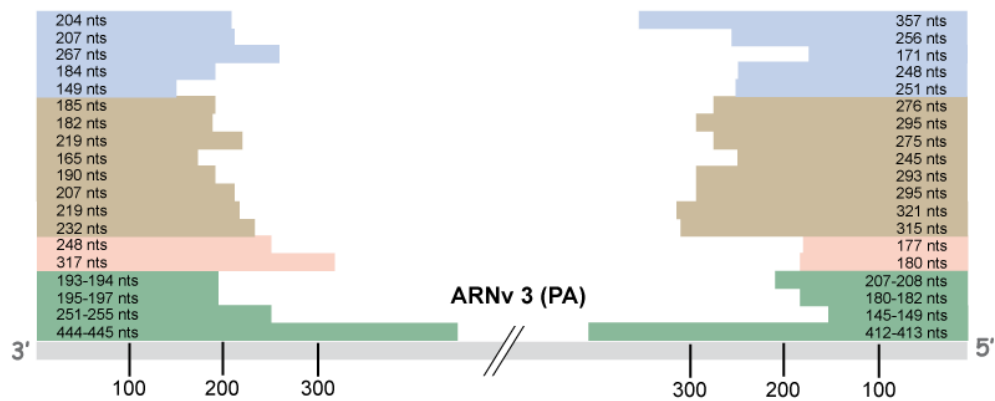
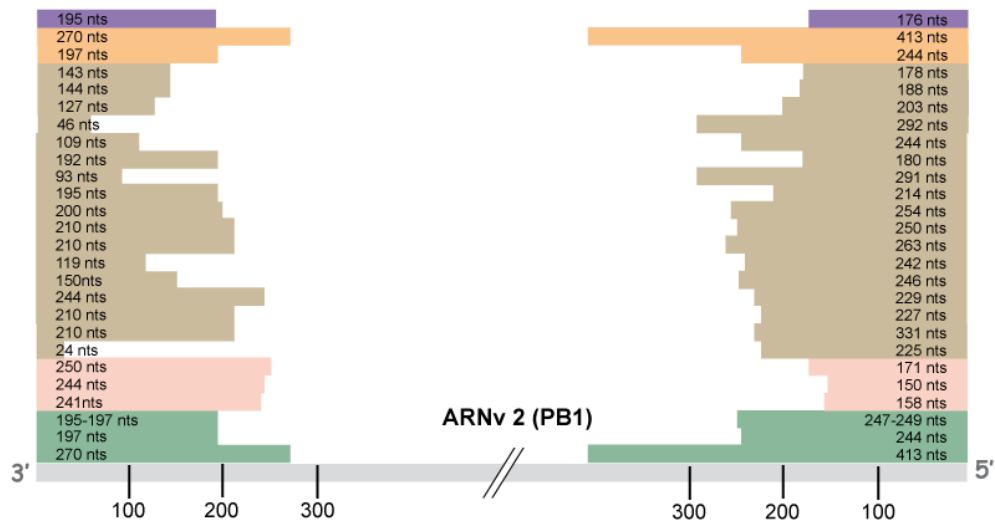
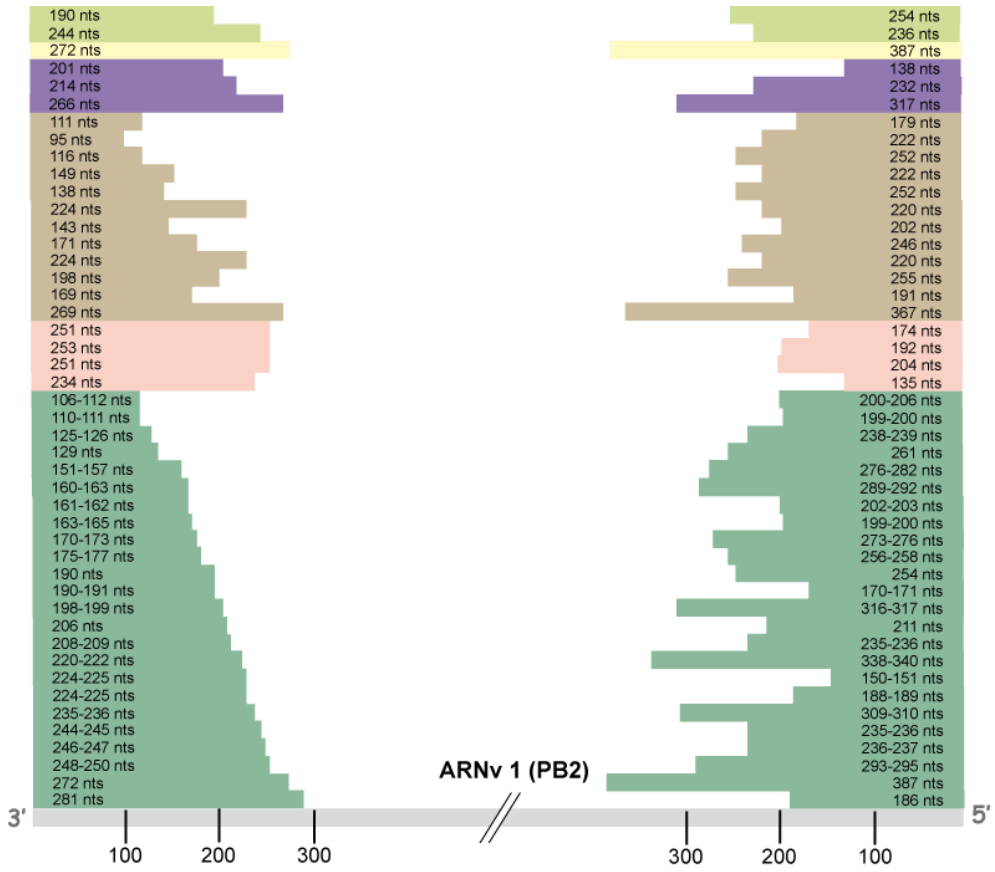
La majorité des ARN DI identifiés ont été obtenus lors du passage de virus en laboratoire, mais des ARN DI ont également été identifiés dans des souches aviaires circulantes (12, 24). Pour l'une de ces souches, il a été montré que les ARN DI rendent la souche non virulente et que, lors d'une co-infection, ils interfèrent avec la pathogénicité de la souche virulente homologue (12, 24).

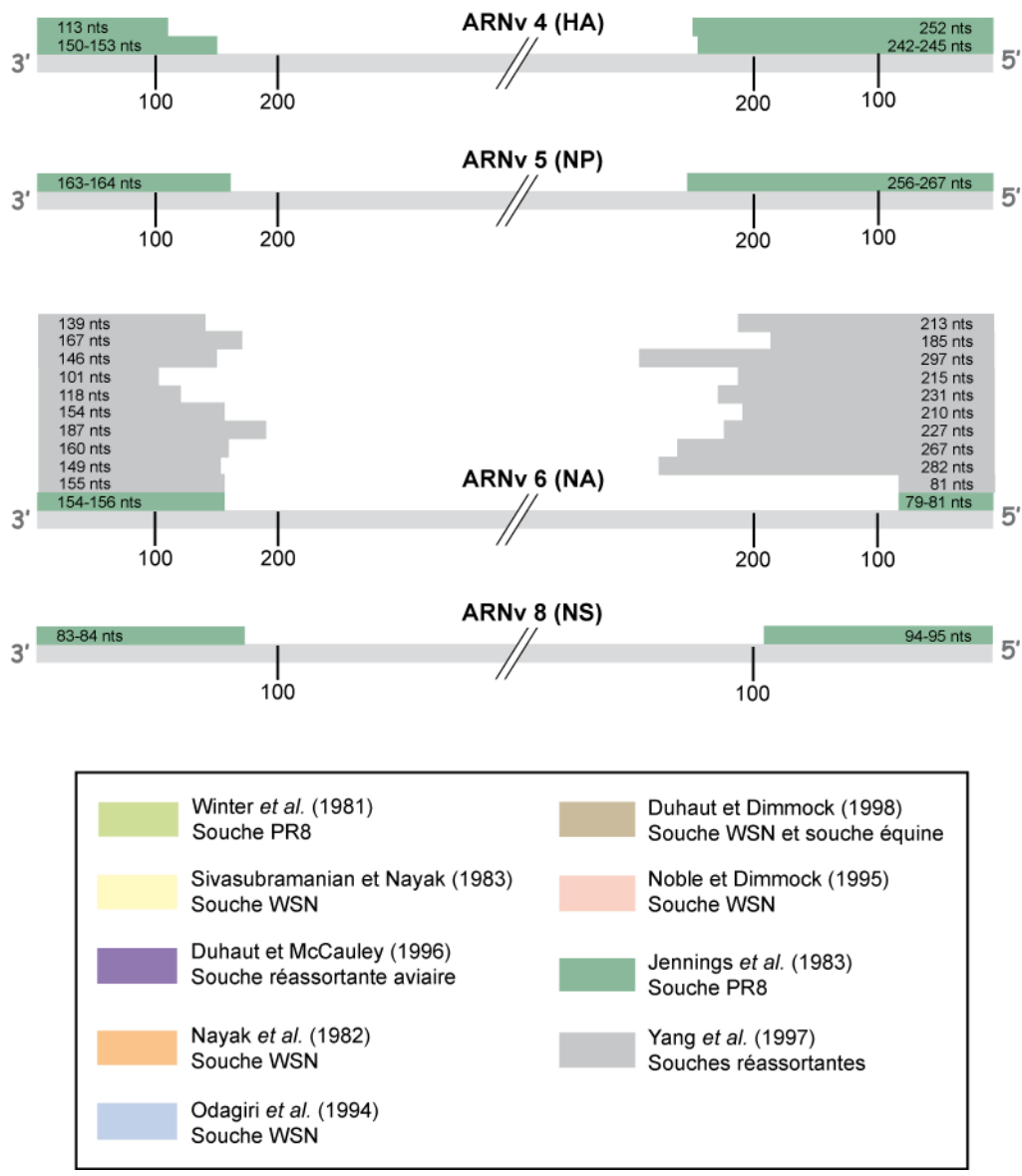
Le mécanisme permettant de générer des ARN DI n'est pas connu, mais il est probable que la taille et la localisation des délétions soit déterminée par plusieurs facteurs parmi lesquels la juxtaposition de régions non contiguës amenées à proximité l'une de l'autre à cause de la structure hélicoïdale des ARNv au sein des RNPv (118).

### 3.3.1.2. Le mécanisme d'action des ARN DI

Le mécanisme par lequel les ARN DI interfèrent avec la réplication de virus sauvages a été bien caractérisé. La présence d'ARN DI dans les particules virales est associée à la diminution d'au moins un ARNv de pleine taille (11, 33, 46, 60, 171, 200). Plus précisément, il a été montré dans de nombreux cas que la présence d'ARN DI est associée à une réduction de l'ARNv parental dans les particules virales (2, 166, 189, 242), mais pas ou peu dans les cellules infectées (65). Cette interférence agit au niveau de l'incorporation des ARNv et affecte aussi l'incorporation des ARNv homologues lors de co-infections avec des virus sauvages et des virus DI (63, 65, 188, 190). Ainsi, l'étude des ARN DI montre que ce sont les régions aux extrémités des ARNv qui sont responsables de leur incorporation dans les virions.

Une étude plus approfondie montre que ce sont les régions non codantes qui sont impliquées dans la compétition spécifique entre un ARN DI issu de l'ARNv 3 (PA) et l'ARNv 3 (PA) « parental » au moment de l'incorporation du génome (188). L'étude détaillée d'un ARN DI issu de l'ARNv 1 (PB2) indique quant à elle qu'au moins 150 nucléotides provenant de l'extrémité 5' de l'ARNv « parental » doivent être conservés au niveau de l'ARN DI afin que celui-ci soit maintenu efficacement au fil des différents passages (62) et qu'il puisse interférer avec l'incorporation de l'ARNv 1 (PB2) sauvage (63). Les régions non codantes et les régions codantes des ARNv semblent donc être impliquées dans l'incorporation des ARNv dans les particules virales.





**Figure 21 :** Régions des ARNv conservées au niveau des ARN DI dont ils sont issus.

Les tailles des régions des ARNv conservées aux extrémités d'ARN DI sont indiquées. Seuls des exemples d'ARN DI générés par une délétion centrale unique au niveau de l'ARNv « parental » ont été représentés ici. Bien qu'il existe des ARN DI issus de l'ARNv 7 (M) (181), aucune information sur les régions conservées au niveau de ces ARN DI n'est disponible à ce jour. D'après (64, 65, 118, 170, 181, 190, 224, 253, 263).

### **3.3.2. Identification des régions nécessaires à l'incorporation des ARNv**

Le système dit de génétique inverse permet la production de particules virales entièrement à partir de plasmides codant les ARNv et les protéines virales (176). Un tel système offre la possibilité de modifier facilement les séquences des ARNv et est donc largement été utilisé en recherche, notamment afin d'identifier les régions nécessaires à l'incorporation des ARNv. Comme l'étude des ARN DI indique que les régions nécessaires à l'incorporation des ARNv sont localisées à leurs extrémités, les séquences codantes présentes au niveau des ARNv peuvent être remplacées, entièrement ou juste en partie, par des gènes rapporteurs (par exemple le gène codant la GFP, *green fluorescent protein*) afin d'évaluer leur incorporation dans les virions.

#### 3.3.2.1. Le rôle des régions non codantes des ARNv dans leur incorporation

Les régions non codantes des ARNv sont composées de régions identiques au niveau de tous les ARNv (régions U12 et U13) et de régions non codantes de longueurs et de séquences différentes pour chacun des 8 ARNv (Figures 3 et 4). Le rôle de chacune de ces régions a été étudié.

##### 3.3.2.1.1. Le rôle des régions U12 et U13 dans l'incorporation des ARNv

Parmi toutes les espèces d'ARN présentes dans le cytoplasme d'une cellule, seuls les ARNv des *Influenzavirus A* sont incorporés dans les particules virales de ce virus. Cette sélection des ARNv repose sur la présence à leurs extrémités des régions U12 et U13 qui s'apparient partiellement pour former le promoteur viral (66) et elle est intimement liée aux processus d'export des RNPv hors du noyau et de bourgeonnement.

En effet, en l'absence du repliement correct du promoteur, un ARNv ne peut pas participer à la formation d'une RNPv et ne sera donc ni exporté ni incorporé dans les virions (147, 174). Une sélection doit également s'opérer afin que les RNPc restent localisées dans le noyau et que les RNPv soient exportées. La distinction entre les 2 types de RNP repose sur la présence d'une adénosine non appariée en position 10 à l'extrémité 5' de l'ARNv (237). Enfin, au moment du bourgeonnement, l'interaction de la protéine M1 avec d'une part les RNPv et d'autre part les protéines virales membranaires joue probablement un rôle

déterminant dans la sélection des ARNv par rapport aux autres espèces d'ARN (212). Cette sélection n'est cependant pas totalement infaillible, puisque d'autres génomes viraux peuvent exceptionnellement être incorporés dans une enveloppe d'*Influenzavirus A* (phénomène de transcapsidation) (55, 213).

### 3.3.2.1.2. Le rôle des régions non codantes spécifiques de chaque ARNv

Le remplacement de la totalité des régions codantes de l'ARNv 8 (NS) de la souche PR8 par la séquence d'un gène rapporteur a permis de montrer que la seule conservation des régions non codantes de l'ARNv est suffisante pour que, en présence d'un virus *helper*, le gène rapporteur soit transcrit, répliqué et incorporé dans des particules virales (147). Des résultats similaires ont ensuite été obtenus avec les ARNv 1 (PB2) (188), 3 (PA) (188), 4 (HA) (174, 237) et 5 (NP) (237).

L'équipe de Tristram Parslow a cherché à déterminer si l'incorporation de gènes rapporteurs flanqués des régions non codantes des ARNv est spécifique ou aléatoire (8). Les séquences codantes des ARNv 5 (NP), 6 (NA) et 8 (NS) de la souche WSN ont alors été remplacées par les séquences de gènes rapporteurs différents et des particules virales ont été produites par génétique inverse. Ces gènes rapporteurs peuvent être incorporés dans les particules virales, mais il a été montré que cette incorporation se fait de manière non spécifique puisqu'une particule peut incorporer 2 gènes rapporteurs différents flanqués des régions non codantes provenant du même ARNv (8). En utilisant 2 gènes rapporteurs différents flanqués des régions non codantes du même ARNv, il a été estimé que 3-5 % des particules virales sont fonctionnellement diploïdes. Néanmoins, l'incorporation des ARN recombinants est faible et pourrait correspondre à l'incorporation marginale d'ARNv ayant échappé aux mécanismes permettant l'incorporation sélective des ARNv.

Ultérieurement, pour chaque ARNv, les régions codantes ont été entièrement remplacées par la séquence du gène codant la GFP et le pourcentage d'incorporation de ce dernier a été calculé (Tableau 2) (75, 77, 161, 194, 195, 251). Dans tous les cas testés sauf un, la seule présence des régions non codantes des ARNv ne permet pas une incorporation efficace des gènes rapporteurs dans les particules virales (75, 77, 161, 194, 195, 251). La seule exception concerne l'ARNv 7 (M) dont les seules séquences non codantes permettent l'incorporation d'un gène rapporteur dans 32 % des particules virales, mais dans ce cas, le

nombre de particules virales produites est très faible (195). Les régions non codantes des ARNv ne sont donc pas suffisantes pour permettre une incorporation optimale de ces derniers.

ARNv	Pourcentage d'incorporation d'un gène rapporteur flanqué des régions non codantes de l'ARNv	Références
1 (PB2)	0 %	(161)
2 (PB1)	1 %	(161)
3 (PA)	5,6 %	(161)
4 (HA)	3,9 %	(251)
5 (NP)	10 %	(194)
6 (NA)	1,1 %	(77)
7 (M)	32,1 %	(195)
8 (NS)	0,2-0,5 %	(75)

**Tableau 2 :** Pourcentage d'incorporation dans les particules virales de gènes rapporteurs flanqués des régions non codantes des ARNv.

D'après (75, 77, 161, 194, 195, 251).

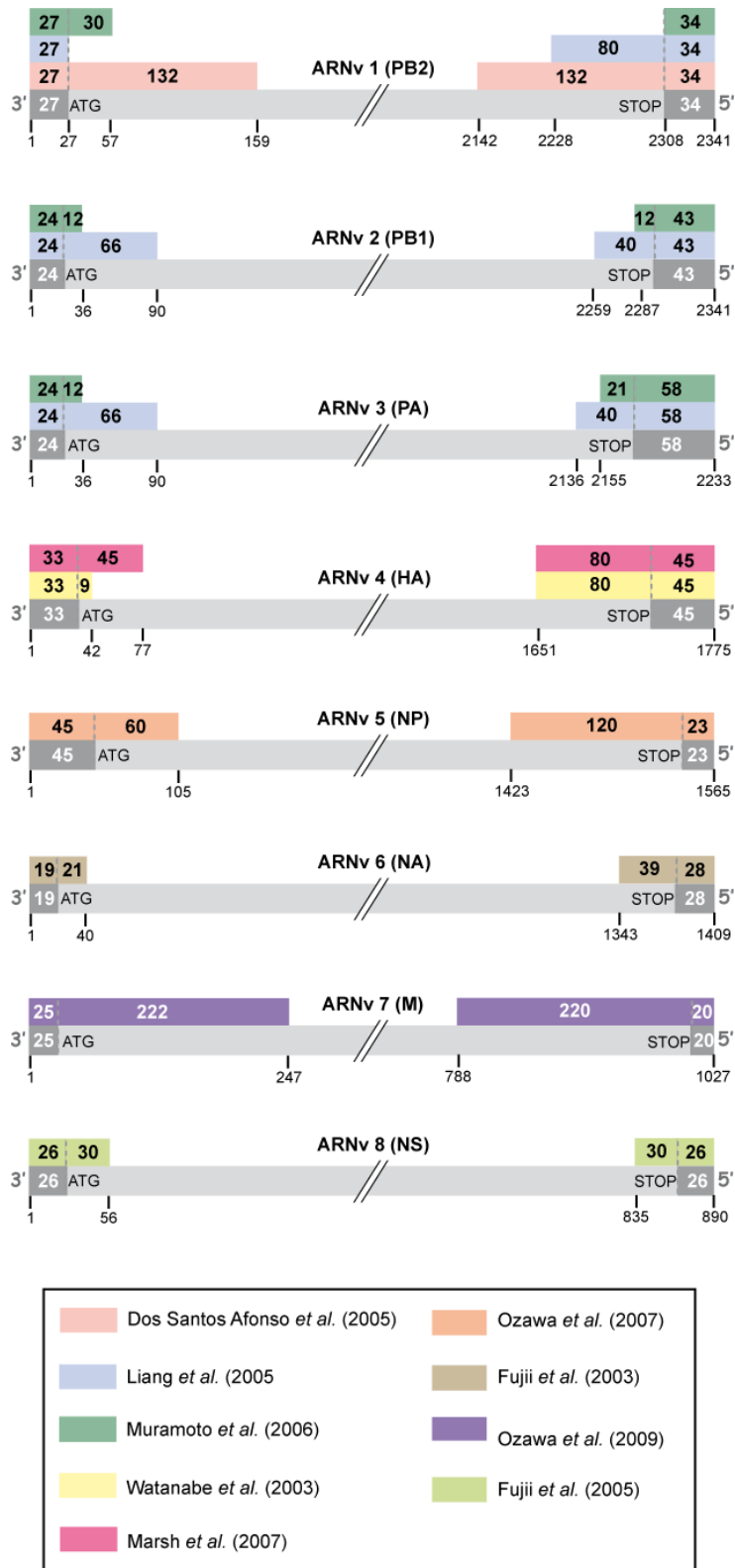
### 3.3.2.2. Le rôle des régions codantes des ARNv dans leur incorporation

#### 3.3.2.2.1. Les extrémités des régions codantes

Les ARN DI des *Influenzavirus A* sont générés par délétion interne des ARNv. Tous les ARN DI conservent systématiquement des régions codantes de l'ARNv dont ils sont issus, ce qui pourrait notamment suggérer que les régions codantes aux extrémités des ARNv jouent un rôle dans leur incorporation. L'étude d'un ARN DI issu de l'ARNv 1 (PB2) a montré que ça peut être le cas dans la mesure où au moins 150 nucléotides provenant de l'extrémité 5' de l'ARNv « parental » doivent être conservés afin que l'ARN DI soit maintenu au fil des différents passages (62) et qu'il puisse interférer avec l'incorporation de l'ARNv « parental » (63).

Plusieurs équipes ont cherché à définir, pour chacun des 8 ARNv de la souche WSN, les régions minimales aux extrémités des ARNv nécessaires à l'incorporation des ARNv. Dans ce but, la majeure partie des séquences codantes des ARNv a été remplacée par un gène rapporteur codant la GFP, puis les régions codantes des ARNv conservées à chacune des extrémités ont été progressivement raccourcies et le pourcentage d'incorporation du gène rapporteur dans les particules virales a été quantifié (75, 77, 141, 148, 161, 194, 195, 251).





**Figure 22 :** Régions codantes et non codantes des différents ARNv de la souche WSN identifiées comme étant nécessaires à l'incorporation d'un gène rapporteur.

Les régions des ARNv les plus courtes permettant une incorporation efficace d'un gène rapporteur sont indiquées. Les positions des extrémités de ces régions sont indiquées sous la représentation schématique de chaque ARNv. Le nombre de nucléotides non codants et codants conservés est également indiqué. Les régions non codantes (U12/U13 et régions non codantes spécifiques de chaque ARNv) et les régions codantes sont représentées respectivement en gris foncé et en gris clair. D'après (56, 75, 77, 141, 148, 161, 194, 195, 251).

#### *3.3.2.2.1.1. Les extrémités de la région codante de l'ARNv 1 (PB2)*

Concernant l'ARNv 1 (PB2), l'équipe de Yoshihiro Kawaoka a montré que les 30 nucléotides en 3' de la région codante, en plus des régions non codantes, jouent un rôle important dans l'incorporation d'un gène rapporteur (Figure 22) (161). En revanche, pour l'équipe de T. Parslow, l'extrémité 3' de la région codante n'est absolument pas nécessaire à l'incorporation d'un gène rapporteur, à la différence des 80 nucléotides en 5' de la région codante qui jouent un rôle déterminant (Figure 22) (141). L'introduction de mutations ponctuelles ou la réalisation de courtes délétions au niveau des régions codantes et non codantes provenant de l'extrémité 5' de l'ARNv inhibent toutes très fortement l'incorporation du gène rapporteur, démontrant le rôle essentiel de ces régions (142). Le rôle de l'extrémité 5' a été confirmé en introduisant, au niveau d'un ARNv authentique, des mutations silencieuses entre les positions 2248-2253 (142).

L'équipe de Nadia Naffakh s'est également intéressée aux régions nécessaires à l'incorporation de l'ARNv 1 (PB2) et a montré que les 132 nucléotides aux extrémités de la région codante, en plus des régions non codantes, permettent l'incorporation d'un gène rapporteur (Figure 22) (56). Il a également été montré que l'insertion de la séquence codant une étiquette Flag à la jonction entre la fin de la séquence codant PB2 et la région non codante perturbe un signal essentiel à la réplication de l'ARNv et/ou à son incorporation (56). Les extrémités des régions codantes ont ensuite été dupliquées et insérées entre la séquence de l'étiquette Flag et la séquence non codante. Il a ainsi été démontré qu'en plus des régions non codantes, les 109 nucléotides en 5' de la région codante de l'ARNv 1 (PB2) jouent un rôle essentiel dans la réplication et/ou l'incorporation de l'ARNv (56). Ces résultats démontrent qu'un signal essentiel à la réplication de l'ARNv et/ou à son incorporation chevauche les régions codantes et non codantes en 5' de l'ARNv 1 (PB2) et que ces régions doivent absolument être contiguës pour jouer leur rôle (56).

#### *3.3.2.2.1.2. Les extrémités des régions codantes de l'ARNv 2 (PB1)*

Concernant l'ARNv 2 (PB1), l'équipe de Y. Kawaoka a montré que seuls les 12 nucléotides à chacune des extrémités de la région codante, en plus des régions non codantes, sont absolument nécessaires à l'incorporation d'un gène rapporteur (Figure 22) (161). Pour l'équipe de T. Parslow, en plus des régions non codantes, les 66 et 40 nucléotides respectivement en 3' et en 5' de la région codante sont nécessaires pour une incorporation

optimale (Figure 22), mais la présence des 33 et 40 nucléotides respectivement en 3' et 5' de la région codante permet tout de même une incorporation assez efficace (141). L'introduction de mutations ponctuelles ou de courtes délétions au niveau de ces régions inhibent toutes, avec des efficacités différentes, l'incorporation du gène rapporteur (142). Néanmoins les mutations de la région provenant de l'extrémité 3' de l'ARNv n'ont qu'un effet très modéré alors que les mutations des régions codantes et non codantes en 5' ont un effet drastique (142). Le rôle de l'extrémité 5' a été confirmé en introduisant, au niveau d'un ARNv authentique, des mutations silencieuses entre les positions 2280-2289 (142).

#### *3.3.2.2.1.3. Les extrémités de la région codante de l'ARNv 3 (PA)*

Concernant l'ARNv 3 (PA), l'équipe de Y. Kawaoka a montré qu'en plus des régions non codantes, 12 et 21 nucléotides respectivement en 3' en 5' de la région codante jouent un rôle important dans l'incorporation d'un gène rapporteur (Figure 22) (161). Néanmoins, dans cette étude, l'absence d'une seule de ces régions codantes n'inhibe que faiblement son incorporation (161). Pour l'équipe de T. Parslow, en plus des régions non codantes, les 66 et 40 nucléotides respectivement en 3' et en 5' de la région codante sont nécessaires pour une incorporation optimale (Figure 22), mais la présence des 15 et 30 nucléotides respectivement en 3' et 5' de la région codante permet tout de même une incorporation assez efficace (141). L'introduction de mutations ponctuelles ou de courtes délétions au niveau de ces régions inhibent, avec des efficacités différentes, l'incorporation du gène rapporteur (142). Néanmoins seules les mutations des régions codantes et non codantes en 5' ont un effet majeur (142). Le rôle de l'extrémité 5' a été confirmé en introduisant, au niveau d'un ARNv authentique, des mutations silencieuses entre les positions 2166-2172 (142).

#### *3.3.2.2.1.4. Les extrémités de la région codante de l'ARNv 4 (HA)*

Concernant l'ARNv 4 (HA), l'équipe de Y. Kawaoka a montré qu'en plus des régions non codantes, les 9 et 80 nucléotides respectivement en 3' en 5' de la région codante jouent un rôle important dans l'incorporation d'un gène rapporteur (Figure 22) (251). Néanmoins, l'équipe de P. Palese a montré qu'en plus des régions non codantes et des 80 nucléotides en 5' de la région codante, les 45 nucléotides en 3' de la région codante sont absolument nécessaires (Figure 22) (148). Plusieurs séries de mutations silencieuses ont ensuite été réalisées au niveau des régions correspondantes présentes dans les ARNv 4 (HA) des souches

WSN et PR8 (148). Étonnamment, les mutations au niveau de l'extrémité 3' de la région codante n'inhibent pas l'incorporation de l'ARNv (148). En revanche, celles réalisées en 5' de la région codante, entre les positions 1659-1673, inhibent l'incorporation de l'ARNv (148). Les auteurs précisent que les séquences au niveau de cette région sont bien conservées entre des virus aviaires, humains et porcins de sous-type H1 (148).

#### *3.3.2.2.1.5. Les extrémités de la région codante de l'ARNv 5 (NP)*

Les régions de l'ARNv 5 (NP) nécessaires à l'incorporation d'un gène rapporteur comprennent les régions non codantes ainsi que les 60 et les 120 nucléotides respectivement en 3' et en 5' de la région codante (Figure 22), bien que des régions plus courtes permettent encore une incorporation relativement efficace (194). Signalons que la séquence codant le NLS non conventionnel de la protéine NP est localisée dans la région codante de 60 nucléotides en 3' de l'ARNv nécessaire à l'incorporation d'un gène rapporteur (194).

#### *3.3.2.2.1.6. Les extrémités de la région codante de l'ARNv 6 (NA)*

Les régions codantes et non codantes de l'ARNv 6 (NA) nécessaires à une incorporation efficace et stable d'un gène rapporteur ont été les premières à avoir été identifiées en 2003 par l'équipe de Y. Kawaoka (77). La présence, en plus des régions non codantes, des 183 et 157 nucléotides respectivement en 3' et 5' de la région codante permet une incorporation très efficace du gène rapporteur (77). Au sein de ces régions, les 21 nucléotides en 3' de la séquence codante jouent un rôle crucial et la conservation de seulement 39 nucléotides en 5' de la région codante permet encore une incorporation efficace (Figure 22) (77).

#### *3.3.2.2.1.7. Les extrémités des régions codantes de l'ARNv 7 (M)*

Concernant l'ARNv 7 (M), il a été montré que la présence des 222 et 220 nucléotides respectivement en 3' et 5' de la région codante, en plus des régions non codantes, permet l'incorporation d'un gène rapporteur (Figure 22) (195). Néanmoins, même s'il est évident que les régions codantes et non codantes aux extrémités sont importantes, il n'a pas été possible de déterminer la taille minimale que ces régions doivent avoir pour permettre une incorporation efficace du gène rapporteur (195).

#### *3.3.2.2.1.8. Les extrémités des régions codantes de l'ARNv 8 (NS)*

Enfin, concernant l'ARNv 8 (NS), il a été montré qu'en plus des régions non codantes, les 30 nucléotides à chacune des extrémités de la région codante jouent un rôle important pour l'incorporation d'un gène rapporteur (Figure 22) (75). Au niveau de ces régions, ce sont les 30 nucléotides en 3' de la région codante qui ont le rôle le plus crucial (75). L'introduction dans un ARNv authentique de mutations silencieuses au niveau des régions codantes identifiées précédemment ainsi que la réalisation de délétions au niveau des régions non codantes montrent que ces régions, et plus particulièrement celles en 3' de l'ARNv, jouent un rôle dans l'incorporation de l'ARNv 8 (NS) dans les particules virales (75).

#### *3.3.2.2.1.9. Bilan : les régions non codantes et les extrémités des régions codantes des ARNv sont indispensables à leur incorporation dans les particules virales*

L'ensemble de ces travaux montre que les signaux nécessaires à l'incorporation des ARNv dans les virions sont multipartites et chevauchent des régions codantes et non codantes localisées aux extrémités des ARNv (Figure 22) (56, 75, 77, 141, 148, 161, 194, 195, 251).

Les régions codantes aux extrémités d'un même ARNv semblent agir de concert puisque des gènes rapporteurs flanqués des extrémités de 2 ARNv différents ne sont pas incorporés efficacement dans les virions (141, 188).

Dans la plupart des cas, la diminution progressive de la longueur des régions codantes provoque une diminution progressive de l'efficacité d'incorporation du gène rapporteur. Ainsi, les régions dédiées à l'incorporation d'un ARNv ne semblent pas avoir de limites précises et, bien que certaines régions soient clairement plus importantes que d'autres, la définition des régions minimales nécessaires à l'incorporation d'un ARNv est parfois quelque peu arbitraire (111).

Enfin, un certain nombre d'études montrent que la diminution progressive de la longueur des régions codantes provenant des ARNv, même si elle n'affecte pas toujours le pourcentage d'incorporation d'un gène rapporteur, est presque systématiquement associée à une baisse progressive du nombre de particules virales produites (75, 161, 195).

### 3.3.2.2.2. La partie centrale des régions codantes

Comme nous venons de le voir, les données de la littérature montrent que les extrémités des régions codantes de chacun des 8 ARNv jouent un rôle essentiel dans leur incorporation au sein des particules virales (56, 75, 77, 141, 148, 161, 194, 195, 251). Nous pouvons cependant remarquer que le pourcentage d'incorporation des gènes rapporteurs n'est pas toujours très élevé, même lorsque de grandes parties des extrémités des régions codantes sont conservées (Tableau 3). Par exemple, un gène rapporteur flanqué des régions non codantes de l'ARNv 4 (HA) n'est incorporé que dans environ 4 % des particules virales (Tableau 2), et l'ajout de part et d'autre du gène rapporteur des 468 nts et des 513 nts respectivement en 3' et en 5' de la séquence codante (soit plus de la moitié de l'ARNv qui est conservée) permet l'incorporation du gène rapporteur dans uniquement 43 % des particules virales (Tableau 3) (251).

Il est donc fort probable que, au moins dans certains cas, les régions remplacées par les gènes rapporteurs, jouent un rôle dans l'incorporation des ARNv dans les virions (161, 251).

ARNv	Constructions	Pourcentage d'incorporation	Références
1 (PB2)	(132)GFP(132)	27,5 %	(89)
1 (PB2)	(120)GFP(120)	69,7 %	(161)
1 (PB2)	(455)GFP(230)	70 %	(141)
2 (PB1)	(120)GFP(120)	62,3 %	(161)
2 (PB1)	(433)GFP(627)	85 %	(141)
3 (PA)	(120)GFP(120)	57,3 %	(161)
3 (PA)	(474)GFP(239)	91 %	(141)
4 (HA)	(468)GFP(513)	42,8 %	(251)
5 (NP)	(120)GFP(120)	76 %	(194)
6 (NA)	(183)GFP(157)	91 %	(77)
7 (M)	(222)GFP(220)	47,7 %	(195)
8 (NS)	(150)GFP(160)	62 à 74 %	(75, 76)

**Tableau 3 :** Pourcentage d'incorporation dans les virions de gènes rapporteurs flanqués d'une grande partie des régions codantes présentes aux extrémités des ARNv.

(X)GFP(Y) signifie que le gène rapporteur codant la GFP est flanqué des régions non codantes aux extrémités de l'ARNv ainsi que de X et Y nucléotides respectivement en 3' et 5' de la région codante de l'ARNv. D'après (75-77, 89, 141, 161, 194, 195, 251).

### 3.3.3. La maîtrise de l'incorporation de gènes d'intérêt dans les virions

Les régions aux extrémités des ARNv nécessaires à leur incorporation dans les virions sont maintenant identifiées plus ou moins précisément. Lorsque ces régions sont flanquées de part et d'autre d'un gène rapporteur, celui-ci peut être incorporé dans les virions (56, 75, 77, 141, 148, 161, 194, 195, 251).

La manipulation des régions dédiées à l'incorporation des ARNv a également permis de produire des particules virales à 8 ARNv parmi lesquels un code la GFP et un autre code la glycoprotéine du VSV (*vesicular stomatitis virus*) ou la glycoprotéine HEF (*hemagglutinin-esterase fusion*) des *Influenzavirus C* qui sont 2 protéines qui peuvent se substituer aux protéines HA et NA des *Influenzavirus A* (79, 251). Des systèmes similaires pourraient être utilisés pour incorporer dans des particules virales des ARNv codant des protéines d'intérêt à la place de la GFP. Les *Influenzavirus A* pourraient alors servir de vecteurs d'antigènes afin de produire des vecteurs vaccinaux contre différentes maladies infectieuses ou des cancers, voire même être utilisés afin de permettre l'expression de protéines étrangères dans des cellules dans le cadre d'une thérapie génique (176, 220). Les *influenzavirus A* ne pouvant pas incorporer leur génome dans le génome de l'hôte, cette stratégie ne risque pas d'initier des mécanismes d'oncogénèse.

La manipulation des signaux dédiés à l'incorporation des ARNv a également permis de produire un virus à 9 ARNv parmi lesquels un ARNv code une protéine HA de sous-type H1 et un autre code une protéine HA de sous-type H3 (80). Les particules virales expriment à leur surface ces 2 sous-types de protéines HA et l'immunisation de souris avec ces particules leur offre une protection contre des virus possédant l'une ou l'autre de ces protéines HA à leur surface (80). Une telle approche pourrait être utilisée pour produire des vaccins contre la grippe qui seraient bivalents.

### **3.4. La conservation des séquences au niveau des régions des ARNv dédiées à leur incorporation**

Il a été observé qu'un ARN DI provenant d'un ARNv d'une souche équine de sous-type H3N8 peut être incorporé dans des particules virales en présence d'un virus *helper* humain de sous-type H1N1 ou H2N2 avec une efficacité équivalente, voire supérieure, à celle observée en utilisant un virus de la même souche comme virus *helper* (62-64). Une étude similaire sur un ARN DI provenant de l'ARNv 1 (PB2) d'une souche aviaire de sous-type H7N7 montre que cet ARN DI peut être incorporé dans des particules virales en présence d'un virus *helper* homologue ou apparenté (65), mais aussi en présence d'un virus *helper* WSN (63). Ces observations pourraient notamment laisser penser que les signaux responsables de l'incorporation spécifique des ARNv sont au moins partiellement conservés entre sous-types et ne varient pas (ou peu) selon l'hôte.

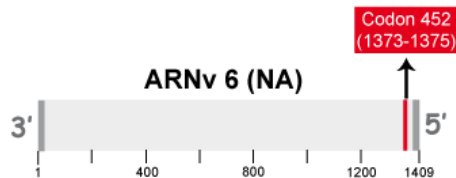
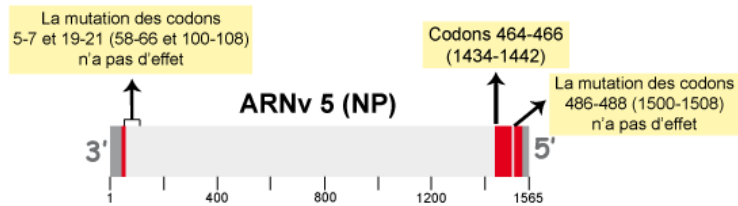
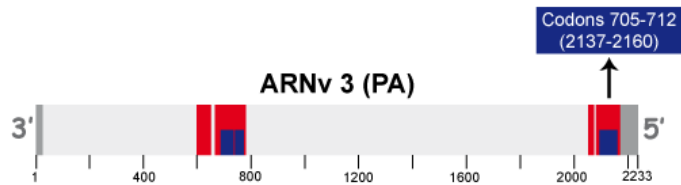
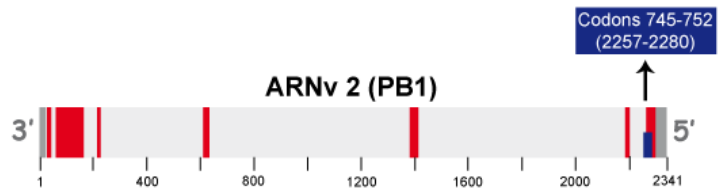
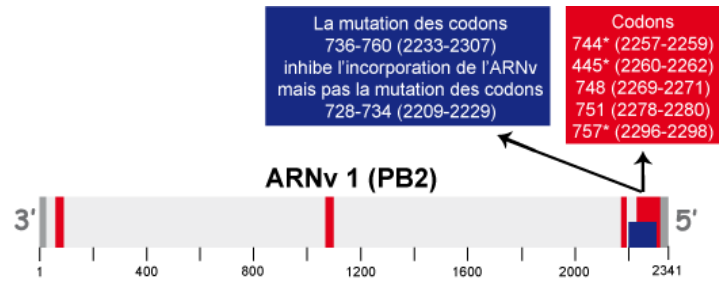
Suite à l'identification des régions codantes des ARNv nécessaires à leur incorporation, les auteurs ont parfois analysé la conservation des séquences entre différentes souches au niveau de ces régions (75, 142, 148). Il a ainsi été montré que les régions codantes et non codantes nécessaires à l'incorporation de l'ARNv 8 (NS) sont relativement bien conservées (75) et que les mutations réalisées au niveau des ARNv 2 (PB1), 3 (PA) et 4 (HA) qui inhibent la réplication virale et l'incorporation des ARNv sont souvent localisées au niveau de positions au moins partiellement conservées (142, 148). Il semble donc que les régions importantes pour l'incorporation des ARNv sont relativement conservées.

Afin de déterminer s'il existe un lien entre la conservation des séquences nucléotidiques et la présence de régions importantes pour l'incorporation des ARNv, il est également possible de mener une démarche inverse, à savoir, identifier des régions conservées aux extrémités des ARNv et observer l'effet de leur mutation sur l'incorporation des ARNv et/ou la réplication virale.

**Figure 23 :** La présence de regroupements de codons hautement conservés et l'effet de leur mutation sur l'incorporation des ARNv.

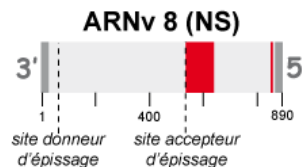
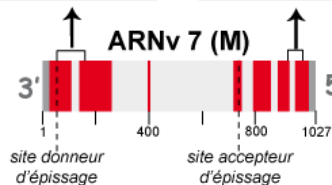
Les régions où sont regroupés les codons hautement conservés identifiées par l'équipe de P. Digard (89) et P. Palese (149) sont indiquées respectivement en rouge et en bleu. Dans la mesure où aucun regroupement de codons hautement conservés n'a été mis en évidence au niveau de l'ARNv 4 (HA), cet ARNv n'a pas été représenté. Les numéros des codons conservés qui ont été mutés sont indiqués, suivis entre parenthèses des positions des nucléotides correspondants. Sauf indication contraire, l'introduction de mutations silencieuses au niveau de ces codons inhibe l'incorporation de l'ARNv. \* indique des codons également identifiés comme critiques pour l'incorporation de l'ARNv 1 (PB2) par Marsh *et al.* (149). Les régions codantes et non codantes sont représentées en gris clair et gris foncé respectivement. Les positions des nucléotides sont indiquées sous la représentation de l'ARNv. D'après (89, 110, 112, 149).









Codons 7-9 et 18-20 (44-62 et 77-85)

Codons 71-73 et 90-92 (924-932 et 981-989)



 Gog <i>et al.</i> (2007) Souche WSN	 Marsh <i>et al.</i> (2008) Souche WSN (et PR8 pour l'ARNv 3)
 Hutchinson <i>et al.</i> (2007) Souche PR8	 Hutchinson <i>et al.</i> (2009) Souche PR8

Etant donnée la redondance du code génétique, la conservation des séquences protéiques n'est pas forcément associée à une conservation des séquences nucléotidiques, sauf s'il existe une pression de sélection sur celles-ci (pression liée par exemple au processus d'incorporation des ARNv dans les virions). L'équipe de Paul Digard a recherché la présence de régions regroupant un grand nombre de codons présentant un taux de mutations synonymes plus faible que prévu étant donnée la redondance du code génétique (89). Il a ainsi été montré que les codons conservés sont essentiellement regroupés aux extrémités des ARNv (Figure 23), au niveau desquelles les signaux dédiés à l'incorporation des ARNv semblent être localisés, et le degré de conservation tend à diminuer plus on s'éloigne des extrémités des ARNv (89). Des résultats globalement similaires ont été obtenus par l'équipe de Peter Palese au cours d'une étude comparable réalisée au niveau des ARNv codant les protéines du complexe polymérase (Figure 23) (149).

Afin de déterminer si la conservation des séquences nucléotidiques joue un rôle dans l'incorporation des ARNv, des mutations silencieuses ont été introduites au niveau de codons conservés, au sein d'ARNv authentiques (110, 112, 149) ou d'ARNv codant un gène rapporteur (89). La plupart de ces mutations provoquent une diminution de l'incorporation des segments d'ARN mutés (Figure 23) (89, 110, 112, 149) alors que la mutation de codons peu conservés localisés à proximité n'affecte pas leur incorporation (89, 110, 112).

De façon très surprenante, il a cependant été observé que la mutation de codons conservés de l'ARNv 3 (PA) n'a pas le même effet selon la souche utilisée (149). En effet, une série de mutations entre les positions 2137-2160 inhibe l'incorporation de l'ARNv dans les souches WSN et PR8 (Figure 23), alors que les autres séries de mutations réalisées au niveau des positions hautement conservées 2094-2156 ont un effet variable selon la souche (149).

Ces études montrent cependant que la mutation de régions conservées n'a pas toujours un effet sur l'incorporation des ARNv (Figure 23) (89, 112, 149). De plus, la mutation de codons peu conservés au niveau de l'ARNv 8 (NS) d'après l'étude de l'équipe de P. Digard (89) réduit tout de même le niveau d'incorporation de cet ARNv (75). Il a alors été proposé que les signaux dédiés à l'incorporation des ARNv puissent, au moins dans certains cas, diverger entre différentes souches (89).

L'équipe de Y. Kawaoka vient de remettre en cause le rôle d'une conservation de séquences dans le processus d'incorporation des ARNv (76, 195). En effet, le remplacement de régions dédiées à l'incorporation des ARNv 7 (M) et 8 (NS) par des séquences aléatoires présentant peu d'homologies avec les séquences authentiques permet une incorporation

encore importante de ces ARNv (76, 195) et, au moins dans le cas de l'ARNv 7 (M), affecte peu la réplication virale (195). Néanmoins, l'équipe de Y. Kawaoka a montré dans une autre étude que des mutations silencieuses au niveau des régions dédiées à l'incorporation de l'ARNv 8 (NS) affectent son incorporation (75). Toutes les séquences ne peuvent donc pas diriger efficacement l'incorporation de l'ARNv 8 (NS). Dans la mesure où des délétions au niveau des régions dédiées à l'incorporation des ARNv 7 (M) et 8 (NS) affectent leur incorporation (75, 195), les auteurs ont proposé que la longueur des régions dédiées à l'incorporation est au moins aussi importante que leur conservation en terme de séquences nucléotidiques (76, 195).

### **3.5. L'absence d'un ARNv affecte la réplication virale**

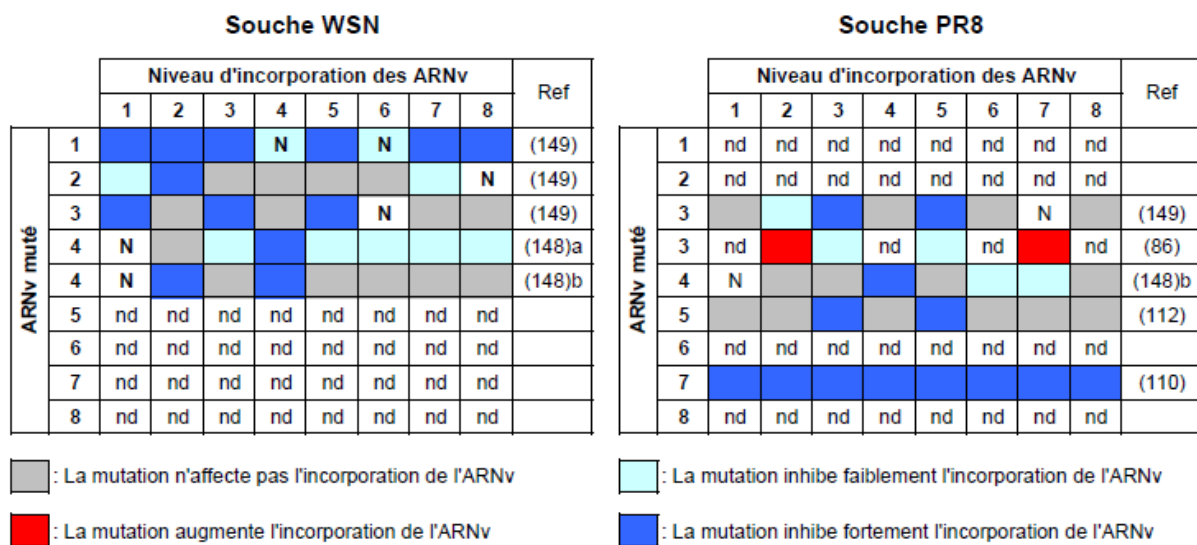
#### **3.5.1. Un jeu complet de 8 ARNv est requis pour une réplication optimale**

Expérimentalement, il a été remarqué que l'absence d'un (ou plusieurs) ARNv a généralement des conséquences néfastes sur la réplication virale. Il est logique de penser qu'une telle inhibition de la réplication virale est due à l'absence d'une protéine virale. Cependant, en utilisant des plasmides codant des ARNv 4 (HA) et 6 (NA) mutés afin de ne pas coder les protéines HA et NA ainsi qu'un jeu de plasmides distinct permettant l'expression des protéines virales, il a été montré que des virus possédant 8 ARNv se répliquent mieux que des virus dépourvus de l'ARNv 4 (HA) ou de l'ARNv 6 (NA), qui eux-mêmes se répliquent mieux que des virus dépourvus de ces 2 ARNv (77). De même, en présence de NA bactérienne, des particules virales incorporant un ARNv 6 (NA) ne codant pas de protéine NA se répliquent mieux que des particules totalement dépourvues d'ARNv 6 (NA) (77). Des observations similaires ont été rapportées ultérieurement. En effet, lorsque l'ARNv 4 (HA) est remplacé par le gène codant la protéine HEF flanqué des extrémités de l'ARNv 4 (HA), les particules virales se répliquent mieux en présence d'un gène codant la GFP flanqué des extrémités de l'ARNv 6 (NA) que lorsque l'ARNv 6 (NA) est absent (79). Enfin, en apportant la protéine PA en *trans*, un virus possédant un ARNv 3 (PA) dont la région centrale est délétée se réplique beaucoup mieux qu'un virus sans ARNv 3 (PA) (48). L'ensemble de ces données démontre que pour être optimale, l'incorporation des ARNv au sein des particules d'*Influenzavirus A* requiert la présence de 8 ARNv indépendamment des protéines qu'ils peuvent coder.

L'équipe de Y. Kawaoka a également comparé pour chacun des 8 ARNv le nombre de particules virales formées en présence d'un gène rapporteur flanqué des extrémités codantes et non codantes d'un ARNv, en présence d'un gène rapporteur flanqué uniquement des régions non codantes de l'ARNv (pratiquement pas incorporé dans les particules virales) et en l'absence totale de cet ARNv (161). L'absence d'un ARNv ou la présence d'un gène rapporteur flanqué uniquement des régions non codantes d'un ARNv conduit à une diminution du nombre de particules formées (161). Il a également été remarqué que l'absence de l'ARNv 1 (PB2) a un effet beaucoup plus marqué que l'absence des autres ARNv (161).

### 3.5.2. La baisse d'incorporation d'un ARNv donné peut modifier le niveau d'incorporation d'un ou plusieurs autres ARNv

Il a été remarqué que lorsque la mutation d'un ARNv donné inhibe son incorporation dans les virions, le niveau d'incorporation d'autres ARNv peut également être modifié (86, 110, 112, 148, 149). Bien que toutes les mutations inhibant l'incorporation d'un ARNv donné dans les particules virales n'aient pas toujours le même effet sur l'incorporation des autres ARNv (surtout dans le cas de mutations affectant l'ARNv 1 (PB2)), il se dégage certaines tendances que nous avons résumées au niveau de la Figure 24.



**Figure 24 :** L'incorporation des différents ARNv dans les particules virales est liée. L'effet de la mutation de régions responsables de l'incorporation d'un ARNv donné sur l'incorporation des 8 ARNv est indiqué. N : ARNv ayant été utilisé pour normaliser le pourcentage d'incorporation des ARNv. Dans le cas d'ARNv 1 (PB2) cette normalisation s'est faite d'une part avec l'ARNv 4 (HA) et d'autre part avec l'ARNv 6 (NA). (a) Absence complète de l'ARNv 4 (HA) (b) Introduction de mutations synonymes au niveau de l'ARNv 4 (HA). D'après (86, 110, 112, 148, 149).

De façon intéressante, dans une même étude, la mutation d'une région inhibant l'incorporation d'un ARNv des souches WSN ou PR8 peut avoir des effets en *trans* sur l'incorporation des autres ARNv qui diffèrent selon la souche considérée (Figure 24, cas des ARNv 3 (PA) et 4 (HA)) (148, 149). L'absence totale d'un ARNv n'a pas non plus le même effet que l'inhibition de son incorporation en introduisant des mutations au niveau des régions dédiées à son incorporation (Figure 24, cas de l'ARNv 4 (HA) de la souche WSN, cas (a) et (b) respectivement) (148). Malgré tout, certaines observations se recoupent parfois. Par exemple, l'incorporation des ARNv 3 (PA) et 5 (NP) semble être intimement liée puisque, dans différentes études utilisant les souches WSN ou PR8, des mutations affectant l'incorporation de l'un de ces ARNv agissent également en *trans* sur l'incorporation de l'autre (Figure 24) (86, 112, 149).

Le cas de mutations au niveau de l'ARNv 7 (M) de la souche PR8 qui inhibent son incorporation semble particulier (110). En effet, ces mutations inhibent l'incorporation de tous les autres ARNv, ce qui suggère que la majorité des particules virales possèdent moins de 8 ARNv (110).

De façon surprenante, la modification d'un ARNv peut ne pas affecter son incorporation mais affecter l'incorporation d'autres ARNv (148, 149). C'est le cas de certaines mutations ponctuelles réalisées dans la région de l'ARNv 3 (PA) de la souche WSN dédiée à son incorporation qui n'affectent pas son niveau d'incorporation dans les particules virales mais inhibent l'incorporation d'autres ARNv (149). De plus, un gène rapporteur flanqué des signaux d'incorporations de l'ARNv 4 (HA) de la souche WSN est incorporé efficacement dans les particules virales, mais l'incorporation d'autres ARNv est affectée, suggérant que, dans ce cas, la région remplacée par la séquence codant la GFP est nécessaire à l'incorporation d'un jeu complet de 8 ARNv (148).

Il existe également des éléments plus indirects qui suggèrent que l'incorporation des 8 ARNv est liée. Par exemple, l'observation en microscopie électronique de cellules infectées par des particules virales dépourvues de NA montre un nombre élevé de particules dépourvues de RNPv, ce qui est un indice suggérant que l'absence de l'ARNv 6 (NA) affecte l'incorporation d'un jeu complet d'ARNv (159). Par ailleurs, le blocage des petits ARN viraux spécifiques de l'ARNv 4 (HA) de la souche PR8, décrits comme étant impliqués dans la transition entre la transcription et la réplication, inhibe peu la synthèse protéique, mais diminue la production virale (absence de HA, NP et NS1) dans les cellules infectées avec les surnageants de cellules traitées, ce qui, pour les auteurs, suggère un défaut d'incorporation des ARNv qui pourrait être dû à la perte de l'ARNv HA (199).

L'ensemble de ces données suggère l'existence d'un réseau d'interactions entre ARNv qui est nécessaire à leur incorporation dans les particules virales.

### **3.6. Les différents modèles d'incorporation spécifique des ARNv**

Il est maintenant couramment admis que l'incorporation des ARNv dans les virions n'est pas aléatoire et qu'il existe des mécanismes régulant l'incorporation d'un jeu complet de 8 ARNv.

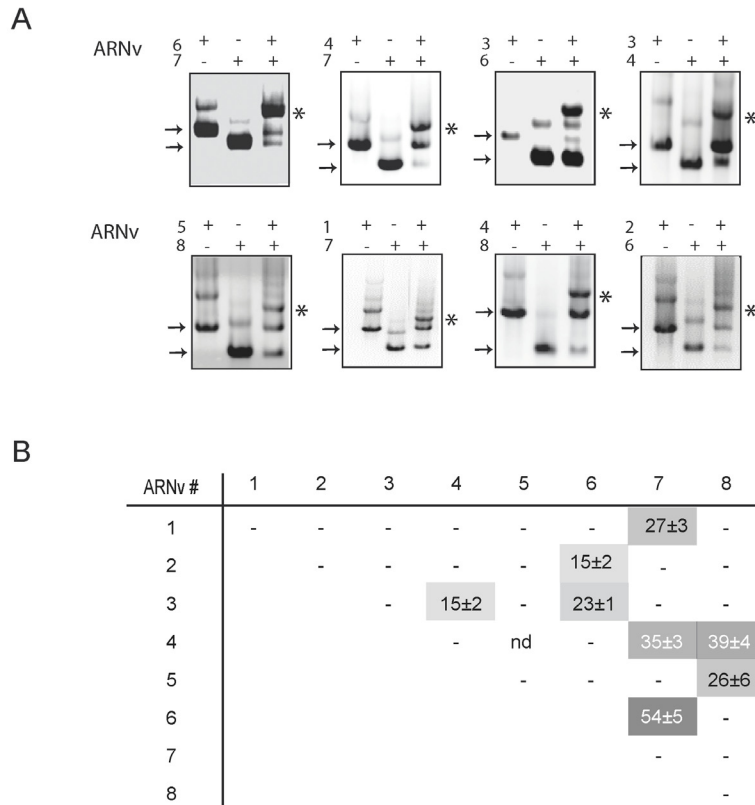
L'hypothèse actuellement privilégiée est qu'il existe un réseau d'interactions spécifiques entre ARNv permettant la formation d'un macro-complexe de 8 ARNv différents qui est incorporé dans les virions. Il est vraisemblable que les régions identifiées comme étant nécessaires à l'incorporation des ARNv participent à ces interactions. Les interactions pourraient se faire directement entre les ARNv ou bien nécessiter des molécules adaptatrices qui pourraient être des acides nucléiques ou des molécules de nature protéique, et dont l'origine pourrait être virale ou cellulaire. Néanmoins, l'existence de telles molécules adaptatrices augmenterait significativement la complexité du système puisqu'il faudrait au moins 7 molécules différentes pour relier entre eux les 8 ARNv de manière spécifique. Ainsi, l'hypothèse la plus plausible est l'existence d'interactions directes entre ARNv gouvernant l'incorporation du génome et, comme nous allons le voir, certains résultats obtenus récemment dans notre laboratoire sont en faveur de ce modèle.

### **3.7. L'existence d'un réseau d'interactions spécifiques entre ARNv**

L'existence d'interactions intermoléculaires directes entre ARNv gouvernant l'incorporation d'un jeu complet d'ARNv dans les virions est une hypothèse qui a été testée au laboratoire.

Les séquences des ARNv de la souche A/Moscou/10/99 (H3N2) (abrégée Moscou) ont été clonées en aval du promoteur de l'ARN polymérase du phage T7, puis les ARNv ont été transcrits 2 à 2 *in vitro* et une éventuelle interaction entre ces ARN a été recherchée en faisant migrer les échantillons sur gel d'agarose en conditions natives (73). Parmi 28 interactions intermoléculaires possibles, 8 interactions entre ARNv ont ainsi pu être mises en évidence (Figure 25). Chaque ARNv est impliqué dans au moins une interaction intermoléculaire et les 8 interactions englobent tous les ARNv dans un réseau unique. Signalons tout de même qu'il

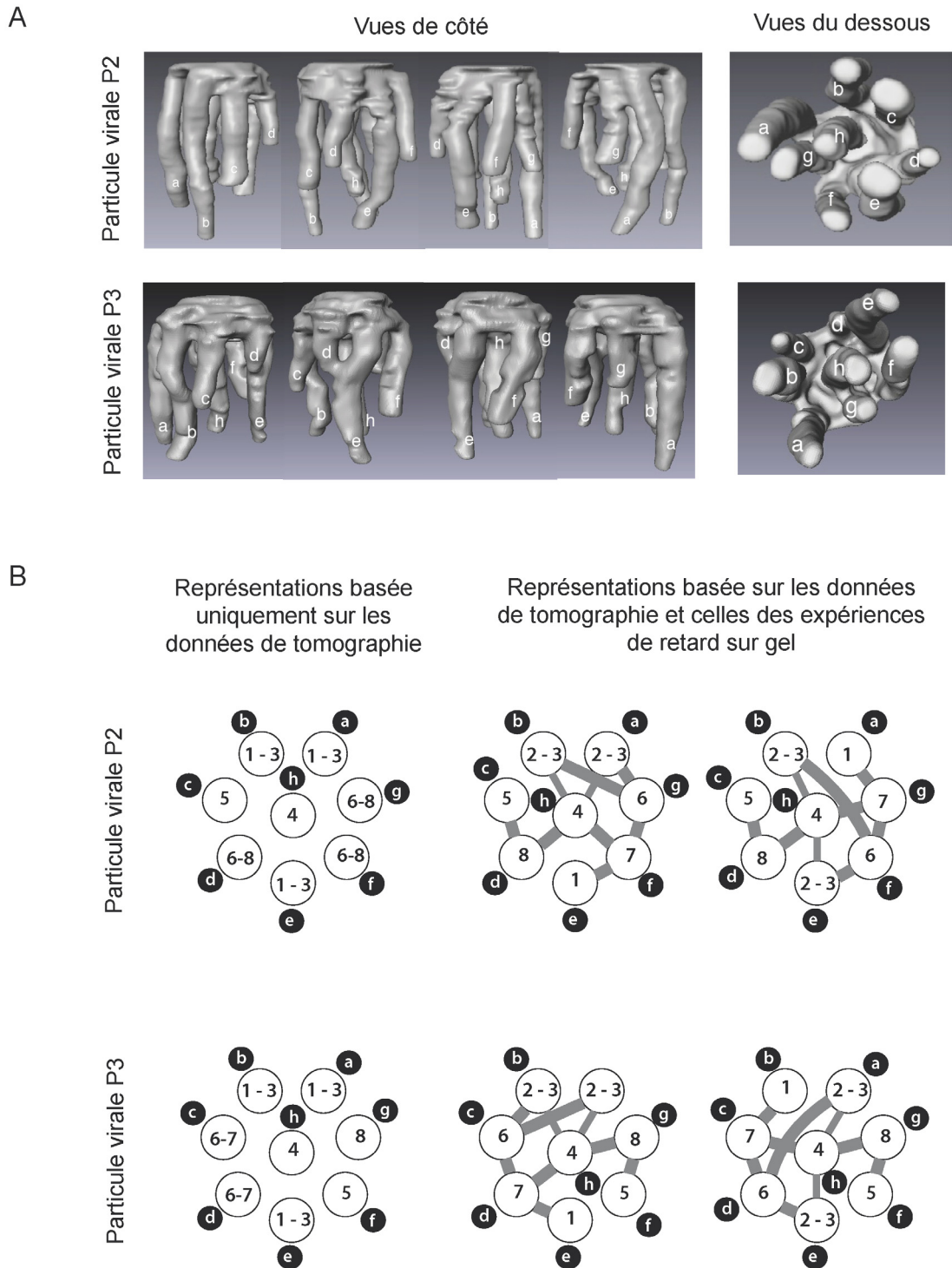
est possible que la méthode utilisée identifie des interactions qui n'existent pas dans les virions ou que, au contraire, certaines interactions entre ARNv existant dans les virions ne sont pas identifiées par cette méthode.



**Figure 25 :** Interactions *in vitro* entre les ARNv de la souche Moscou.

**A.** Analyse de la formation de complexes ARN/ARN par électrophorèse sur gel d'agarose en conditions natives (EMSA). Les ARNv seuls sont indiqués par les flèches et les complexes par les astérisques. **B.** Quantification de la proportion de complexe. La quantité de complexe formée (% du matériel total contenu dans chaque piste) est une moyenne issue de 3 à 5 expériences indépendantes. nd : non déterminé : dans ce cas, l'hétérodimère et l'homodimère sont difficilement distinguables et la quantité d'hétérodimère formé n'a pu être déterminée. D'après (73).

Dans un second temps, l'intérieur de particules virales bourgeonnantes a été reconstitué par tomographie électronique (Figure 26A) et les ARNv associés aux RNPv ont été partiellement identifiés sur la base de la longueur de ces RNPv (73). Les RNPv sont suspendues, plus ou moins parallèlement les unes par rapport aux autres, à partir d'une plateforme qui est présente à l'extrémité apicale des particules et qui pourrait correspondre aux complexes polymérase associés aux ARNv. Ces données, combinées aux résultats des expériences de retard sur gel, ont permis de proposer un modèle d'organisation relative des 8 RNPv dans les particules virales à partir de 5760 combinaisons possibles (Figure 26B). L'organisation des RNPv est cependant légèrement différente pour 2 particules virales (Figure 26B).



**Figure 26 :** Organisation relative des RNPv à l'intérieur d'une particule virale de la souche Moscou.

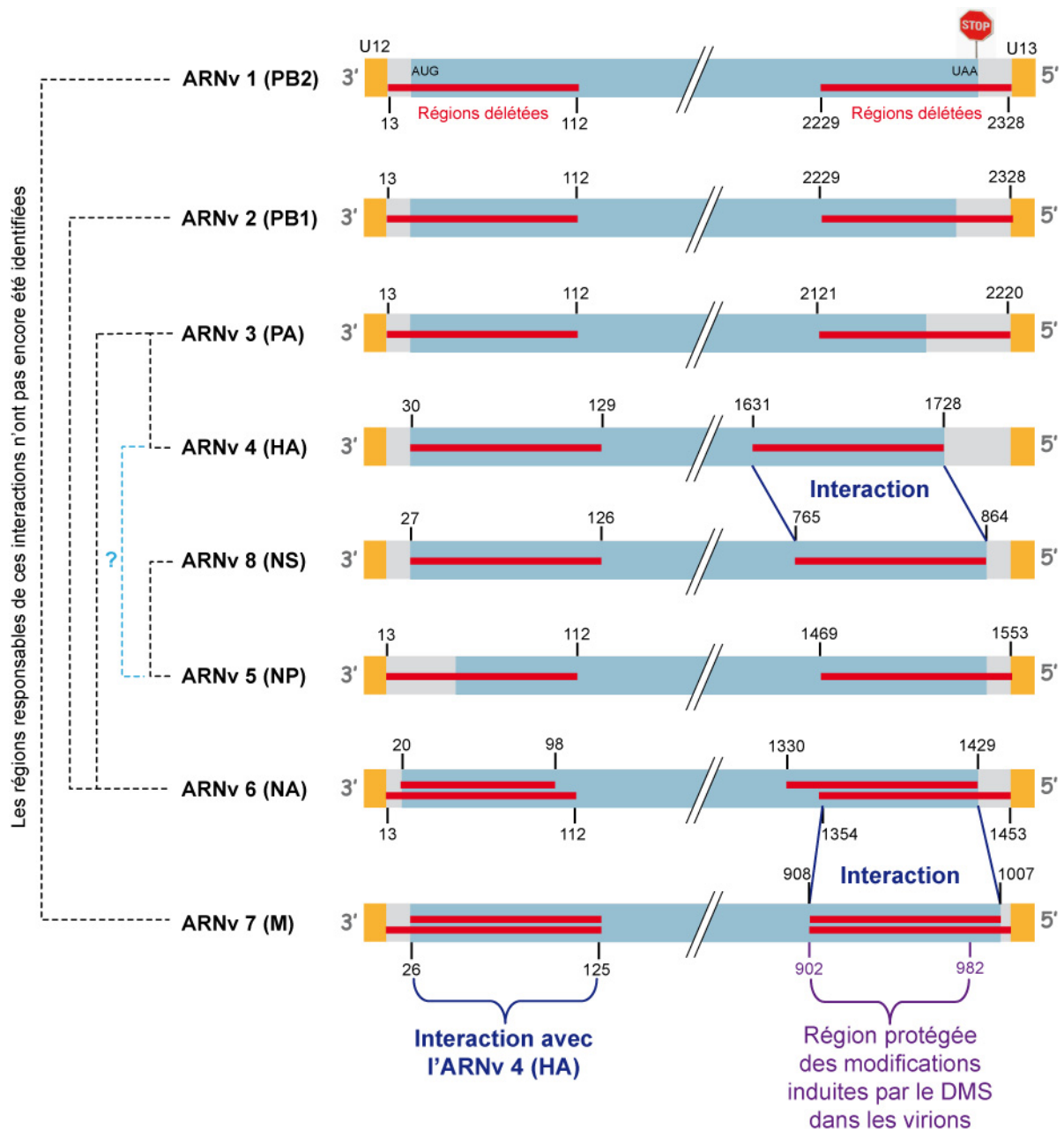
**A.** Reconstitution tridimensionnelle de l'intérieur de 2 particules virales par tomographie électronique de particules virales en cours de bourgeonnement. Les RNPv sont annotées de a à g dans les sens inverse des aiguilles d'une montre, en commençant par les 2 RNPv adjacentes les plus longues. La RNPv centrale est désignée par la lettre h. **B.** Organisations possibles des RNPv dans les particules virales en cours de bourgeonnement (vue supérieure). Les interactions intermoléculaires entre ARNv identifiées *in vitro* sont indiquées par des traits gris. Les 2 traits fins correspondent à l'interaction entre les ARNv 3 (PA) et 4 (HA) et sont mutuellement exclusives, selon la localisation réelle des ARNv 2 (PB1) et 3 (PA). D'après (73).



Dans un troisième temps, les régions des ARNv impliquées dans certaines interactions ont été identifiées. Comme les signaux dédiés à l'incorporation des ARNv semblent être localisés aux extrémités des ARNv et que l'analyse de nombreux ARN DI issus de l'ARNv 1 (PB2) montre qu'ils possèdent au moins 80-90 nucléotides à chaque extrémité (118) une centaine de nucléotides à chacune des extrémités des ARNv ont été délétés (Figure 27). Dans le cas des interactions entre les ARNv 6 (NA) et 7 (M), entre les ARNv 4 (HA) et 8 (NS), ainsi qu'entre les ARNv 4 (HA) et 7 (M), la délétion d'une extrémité d'un ARNv inhibe l'interaction (73). Les régions 5' des ARNv 6 (NA) et 7 (M), tout comme celles des ARNv 4 (HA) et 8 (NS) semblent interagir ensemble (Figure 27) (73). L'extrémité 3' de l'ARNv 7 (M) est impliquée dans l'interaction avec l'ARNv 4 (HA), mais aucune des délétions réalisées à ce jour au niveau de l'ARNv 4 (HA) n'inhibe l'interaction avec l'ARNv 7 (M) (Figure 27). De même, aucune des délétions réalisées n'inhibe *in vitro* les interactions entre les ARNv 1 (PB2) et 7 (M) (Fournier *et al.*, données non publiées), entre les ARNv 5 (NP) et 8 (NS) ou entre les ARNv 2 (PB1) et 6 (NA) (Figure 27) (Sirbat *et al.*, données non publiées). Il est vraisemblable que les régions responsables de ces interactions soient localisées plus à distance des extrémités des ARNv. En outre, il a été montré que la région centrale de l'ARNv 7 (M) est impliquée dans l'interaction avec l'ARNv 1 (PB2) (Thèse d'Emilie Fournier). Enfin, il a été montré que la protéine NP n'inhibe par l'interaction entre les ARNv 6 (NA) et 7 (M) (73).

Dans un dernier temps, il a été montré qu'au niveau de l'extrémité 5' de l'ARNv 7 (M), 15 nucléotides sont protégés des modifications induites par le DMS dans des virions natifs alors qu'ils sont réactifs au niveau de RNPv individuelles (Figure 27). Ce résultat indique que, dans les virions, cette région est impliquée dans au moins un contact entre RNPv (73). Par ailleurs, il existe plusieurs petites zones protégées, pouvant correspondre à l'existence de plusieurs petites zones de contacts avec l'ARNv partenaire, ce qui est compatible avec la nature discontinue des signaux dédiés à l'incorporation des ARNv dans les virions (73).

Les résultats obtenus ne démontrent pas directement que l'incorporation d'un jeu complet de 8 ARNv différents dans les virions est gouvernée par des interactions intermoléculaires entre ARNv. Néanmoins, ils apportent tout un faisceau d'indices en faveur de cette hypothèse.



**Figure 27 :** Régions responsables des interactions entre les ARNv de la souche Moscou.

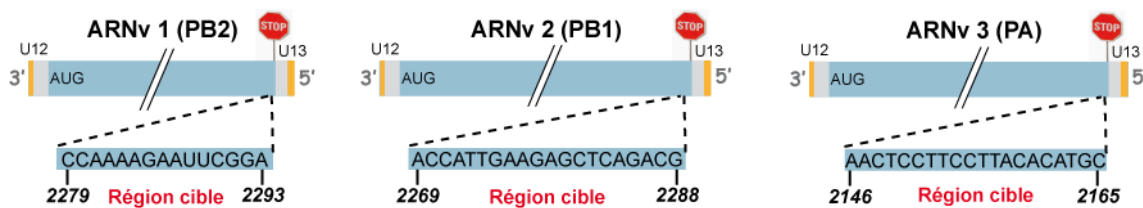
Les régions responsables de certaines interactions observées *in vitro* au cours d'expériences de retard sur gel ont été localisées grâce à des délétions au niveau des ARNv (représentées par des traits rouges ; pour les délétions au niveau des régions codantes, la position du premier et du dernier nucléotide délété est indiquée). A ce jour, les régions responsables des interactions entre les ARNv reliés par un trait en pointillés n'ont pas encore été identifiées. La région de l'ARNv 7 (M) au niveau de laquelle se trouvent 15 nucléotides protégés des modifications induites par le DMS au sein des virions mais pas au niveau de RNPv isolées a également été indiquée. Les régions codantes sont représentées en bleu, les régions non codantes en gris et les régions U12 et U13 en orange. D'après (73) et des résultats non publiés obtenus au laboratoire.

### 3.8. Vers une nouvelle approche thérapeutique

L'incorporation d'un jeu complet de 8 ARNv dans les virions étant indispensable à la production de particules virales capables de générer un cycle répliatif complet, l'inhibition de ce processus pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique.

Dans la mesure où les régions conservées U12 et U13 sont nécessaires à la transcription/réplication des RNPv ainsi qu'à leur incorporation dans les virions, ces régions sont des cibles de choix. Il a été montré que des oligonucléotides anti-sens spécifiques de U13 inhibent partiellement l'apparition d'effets cytopathogènes (ECP) *in vitro* et améliore la survie des souris lors d'une infection avec le virus hautement pathogène H5N1 (57).

Une autre stratégie pourrait consister à cibler les signaux spécifiques d'incorporation présents au niveau de chaque ARNv en y hybridant des oligonucléotides, afin d'empêcher qu'ils ne jouent leur rôle, ou en utilisant des oligonucléotides contenant les signaux d'incorporations afin qu'ils entrent en compétition avec ceux-ci. En culture cellulaire, des oligonucléotides sens et anti-sens dérivés des régions aux extrémités 5' des ARNv 1 (PB2), 2 (PB1) et 3 (PA) dédiées à leur incorporation dans les virions inhibent la répliation virale en agissant vraisemblablement au niveau de l'incorporation des ARNv dans les virions (Figure 28) (85, 86). Les séquences des régions ciblées étant conservées, ces oligonucléotides inhibent efficacement la répliation de virus appartenant à des sous-types différents et infectant différents hôtes (85, 86).



**Figure 28 :** Oligonucléotides inhibant la répliation virale *in vitro*.

Les séquences des régions dédiées à l'incorporation des ARNv correspondant aux oligonucléotides qui inhibent le plus la répliation virale en culture cellulaire sont indiquées pour l'ARNv 1 (PB2) (85) ainsi que pour les ARNv 2 (PB1) et 3 (PA) (86). Les régions codantes sont représentées en bleu, les régions non codantes en gris et les régions U12 et U13 en orange.

## 4. L'écologie des *Influenzavirus A*

### 4.1. Les différents réservoirs du virus et la transmission du virus au sein d'un réservoir

Les *Influenzavirus A* peuvent infecter de nombreuses espèces d'oiseaux et de mammifères, telles que l'Homme et le porc, mais aussi le phoque, la baleine, le cheval, *et cætera* (252, 256). Néanmoins, comme nous l'avons déjà mentionné, seuls certains sous-types peuvent infecter une espèce donnée (256).

#### 4.1.1. Le réservoir aviaire

Les oiseaux des ordres Anseriformes (canards, oies, cygnes) et Charadriiformes (goélands, hirondelles, bécasseaux, bécasseaux du ressac) constituent le réservoir naturel des *Influenzavirus A* et il existe une adaptation optimale entre le virus et ces hôtes, ce qui explique que les infections sont le plus souvent asymptomatiques. Les virus aviaires se répliquent dans le tractus intestinal et sont relargués dans les fèces d'où une transmission majoritairement selon le mode oro-fécal.

Chez les volailles domestiques, les infections par les *Influenzavirus A* sont caractérisées par une virulence extrêmement faible ou extrêmement élevée. La forme dite faiblement pathogène ne provoque que des symptômes bénins (plumage ébouriffé, ponte moins fréquente...). La forme hautement pathogène se propage très rapidement dans les élevages et provoque une pathologie polyviscérale dont le taux de létalité peut avoisiner les 100 %. Les virus aviaires hautement pathogènes (HPAI, *highly pathogenic avian influenza*) n'appartiennent qu'aux sous-types H5 et H7. Ils se distinguent des virus faiblement pathogènes (LPAI, *low pathogenic avian influenza*) par la présence de plusieurs résidus basiques au niveau du site de clivage de la protéine HA0.

### 4.1.2. Le réservoir humain

Les *Influenzavirus A* infectent également les êtres humains, essentiellement au cours de l'hiver dans les régions tempérées de l'hémisphère nord et de juin à juillet-août dans les régions tempérées de l'hémisphère sud. Ils sont alors à l'origine d'infections respiratoires aiguës très contagieuses qui évoluent sur un mode épidémique (34). La contagiosité débute 1 jour avant les symptômes et dure 6 jours. La contamination se fait principalement par voie aérienne par l'intermédiaire de microgouttelettes excrétées par des sujets infectés lors de toux ou d'éternuements, ou bien par l'intermédiaire d'objets contaminés. Chaque année, en général, 5 à 20 % de la population humaine a la grippe. Cette infection est le plus souvent bénigne chez les personnes jeunes sans comorbidité et elle disparaît le plus souvent en quelques jours sans nécessiter de traitement anti-viral. Par contre, la grippe est à l'origine d'une mortalité et d'une morbidité importante chez les personnes âgées ou souffrant de certaines maladies chroniques (34). Ainsi, environ 0,1 % des personnes développant une grippe meurent.

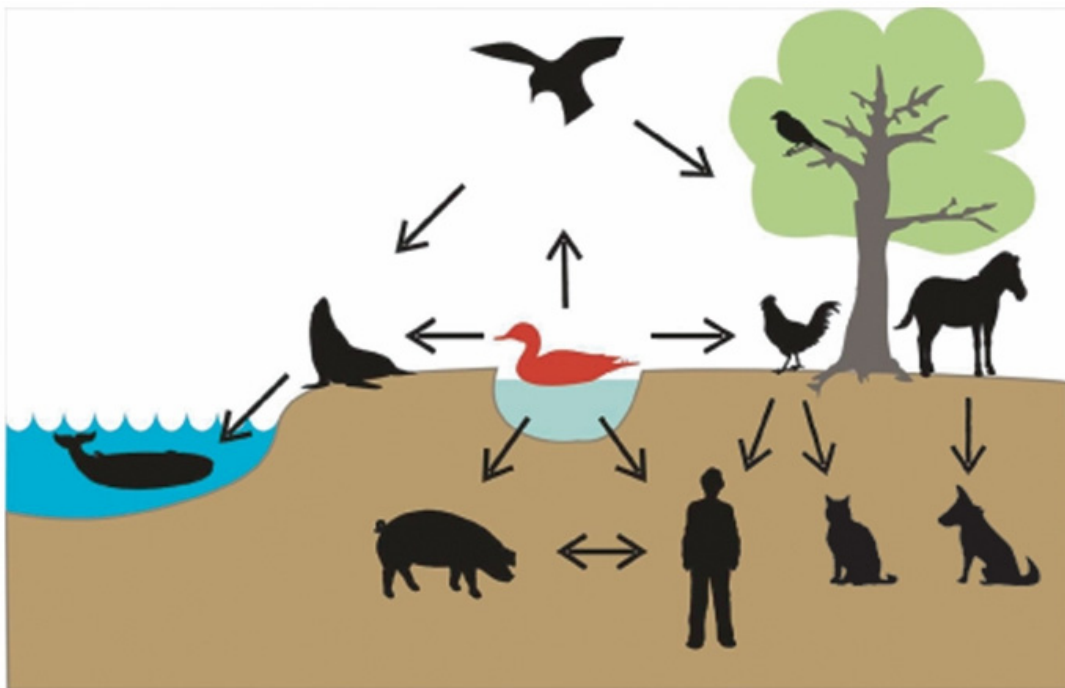
D'un point de vue clinique, le diagnostic de la grippe est facile en période épidémique, devant un tableau brutal associant un syndrome infectieux marqué (fièvre à 40°C, tachycardie, frissons, asthénie, anorexie, abattement), un syndrome respiratoire (catarrhe des voies aériennes supérieures, brûlures rétro-sternales, toux sèche douloureuse), un syndrome algique (douleurs diffuses, céphalées vives frontales et rétro-orbitaires, photophobie, lombalgie), et des signes physiques pauvres (infection conjonctivale, rougeur diffuse du pharynx, langue suburrale, râles sous-crépitaux) (34).

### 4.1.3. Le réservoir porcin

Il existe des *Influenzavirus A* infectant les porcs et se transmettant au sein de ce réservoir. L'infection des porcs se caractérise par un écoulement nasal, une toux, une respiration difficile et une conjonctivite (252). Comme nous le verrons, les porcs jouent un rôle crucial dans l'écologie et l'évolution des *Influenzavirus A* car les cellules épithéliales de leur trachée expriment d'une part des récepteurs permettant leur infection par des virus aviaires et d'autre part des récepteurs permettant leur infection par des virus humains.

## 4.2. La transmission du virus entre les différents réservoirs et son adaptation à l'hôte

Les *Influenzavirus A* se transmettent efficacement entre individus d'une même espèce. Par contre, il existe une « barrière d'espèce » qui restreint la transmission des *Influenzavirus A* d'une espèce à une autre. La transmission entre espèces est donc beaucoup plus rare mais elle est possible (Figure 29).



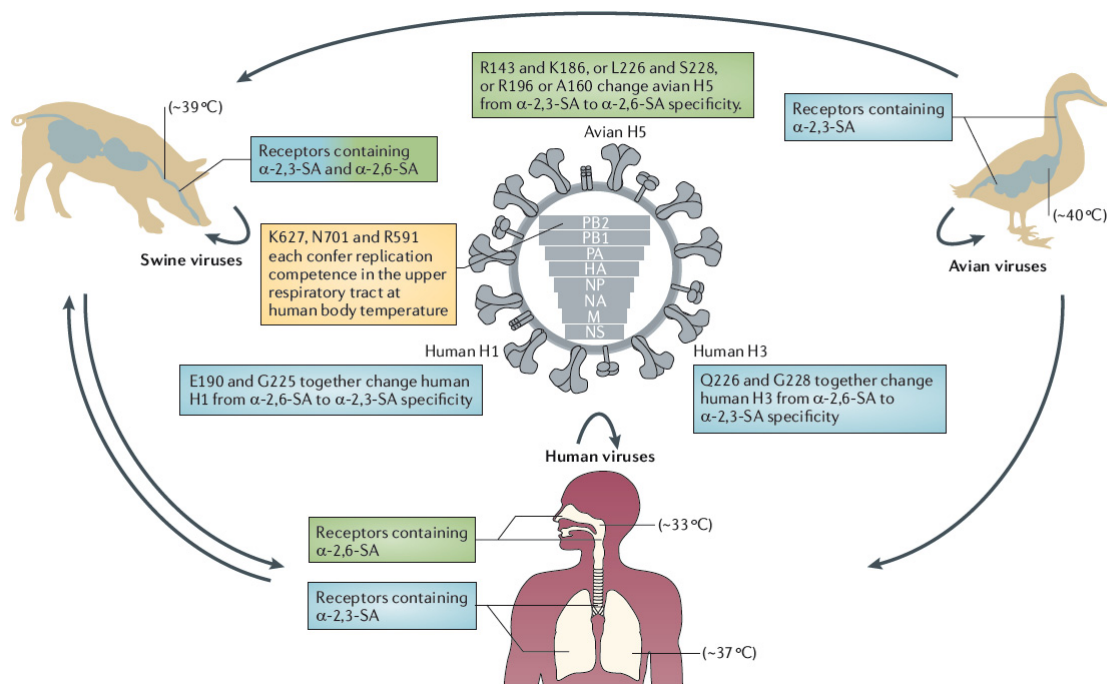
**Figure 29 :** La transmission des *Influenzavirus A* entre différents réservoirs.

Les oiseaux aquatiques sauvages, représentés en rouge, constituent le principal réservoir du virus. Certains virus infectant ces espèces peuvent être transmis aux volailles, aux êtres humains, aux porcs et aux mammifères marins. Les virus peuvent également se transmettre entre des porcs et des êtres humains ainsi que des volailles aux êtres humains. La transmission de virus équinus aux chiens a aussi été rapportée. D'après (256).

La restriction d'hôte intervient à différents niveaux, notamment lors de la reconnaissance des récepteurs cellulaires par la protéine HA (154). En effet, les virus humains et les virus porcins classiques se lient préférentiellement à des récepteurs de type SA $\alpha$ 2,6Gal tandis que les virus aviaires se lient principalement à des récepteurs de type SA $\alpha$ 2,3Gal (Figure 30). La distribution de ces différents types de récepteurs au niveau des cellules de l'hôte explique que le type d'infection soit différent selon espèce. En effet, l'Homme possède majoritairement des récepteurs de type SA $\alpha$ 2,6Gal au niveau de l'appareil respiratoire

supérieur, les volailles ont majoritairement des récepteurs de type SA $\alpha$ 2,3Gal au niveau de leur tractus digestif, et les porcs les 2 types de récepteurs au niveau de leur trachée. La modification de certains résidus de la HA peut cependant changer la spécificité de cette protéine d'un type de récepteur à l'autre et pourrait suffire à l'adaptation à un nouvel hôte (Figure 30).

Il a été montré que 52 résidus présents au niveau des protéines virales caractérisent les virus aviaires et les virus humains (28). La plupart de ces résidus sont localisés au niveau des protéines constituant les RNPv (28, 162). L'un de ces déterminants d'hôte est l'acide aminé de la protéine PB2 en position 627 qui est le plus souvent un acide glutamique dans le cas des souches aviaires et une lysine dans le cas des souches humaines. Il semblerait que la présence d'une lysine à la place d'un acide glutamique à cette position pourrait être associée à une réplication plus efficace du virus à 33°C qui est la température dans l'appareil respiratoire supérieur de l'Homme (Figure 30) (138, 154).



**Figure 30 :** Exemple de résidus affectant spécifiquement le tropisme des *Influenzavirus A*.

Les protéines HA des virus aviaires se lient préférentiellement à des récepteurs de type SA $\alpha$ 2,3Gal présents majoritairement au niveau de l'appareil respiratoire et de l'appareil digestif des oiseaux ainsi qu'au niveau de la trachée des porcs. Les protéines HA des virus adaptés à l'Homme se lient quant à elles préférentiellement à des récepteurs de type SA $\alpha$ 2,6Gal présents majoritairement au niveau de l'appareil respiratoire supérieur de l'Homme et de la trachée des porcs. Certains résidus des protéines HA et PB2 jouent un rôle clé dans la détermination du tropisme du virus. D'après (154).

Dans la mesure où les cellules épithéliales présentes au niveau de la trachée du porc possèdent à leur surface des récepteurs pour des virus humains et des virus aviaires, le porc pourrait constituer un « creuset de mélange » (*mixing vessel*) au sein duquel le réassortiment génétique entre virus humains et aviaires pourrait avoir lieu (113). Les virus réassortants pourraient ensuite évoluer pour s'adapter à l'Homme, ce qui faciliterait le passage de la « barrière d'espèce ».

Lorsqu'un virus a franchit la « barrière d'espèce » et qu'il s'est établi chez un nouvel hôte, il évolue rapidement pour s'adapter à ce nouvel hôte. Par exemple, les virus aviaires ont un génome enrichi en dinucléotides CpG dans un contexte riche en A/U (91, 207), mais ces motifs sont absents des virus humains. Il a été proposé que ces motifs sont éliminés du génome des virus humains parce qu'ils induisent la réponse immunitaire de l'Homme (91, 92, 119).



## **5. Le réassortiment génétique entre souches d'*Influenzavirus A***

### **5.1. Le principe du réassortiment génétique**

Les *Influenzavirus A* peuvent, en raison de la nature segmentée de leur génome, évoluer par réassortiment génétique lors de la co-infection d'un hôte par des virus différents. Comme nous le verrons, le réassortiment génétique est fréquent entre des virus d'un même sous-type infectant le même hôte, mais il est beaucoup plus rare entre des virus de sous-types différents et entre des virus circulant chez des hôtes différents. Le réassortiment génétique est bien décrit mais les mécanismes contrôlant ce processus sont méconnus.

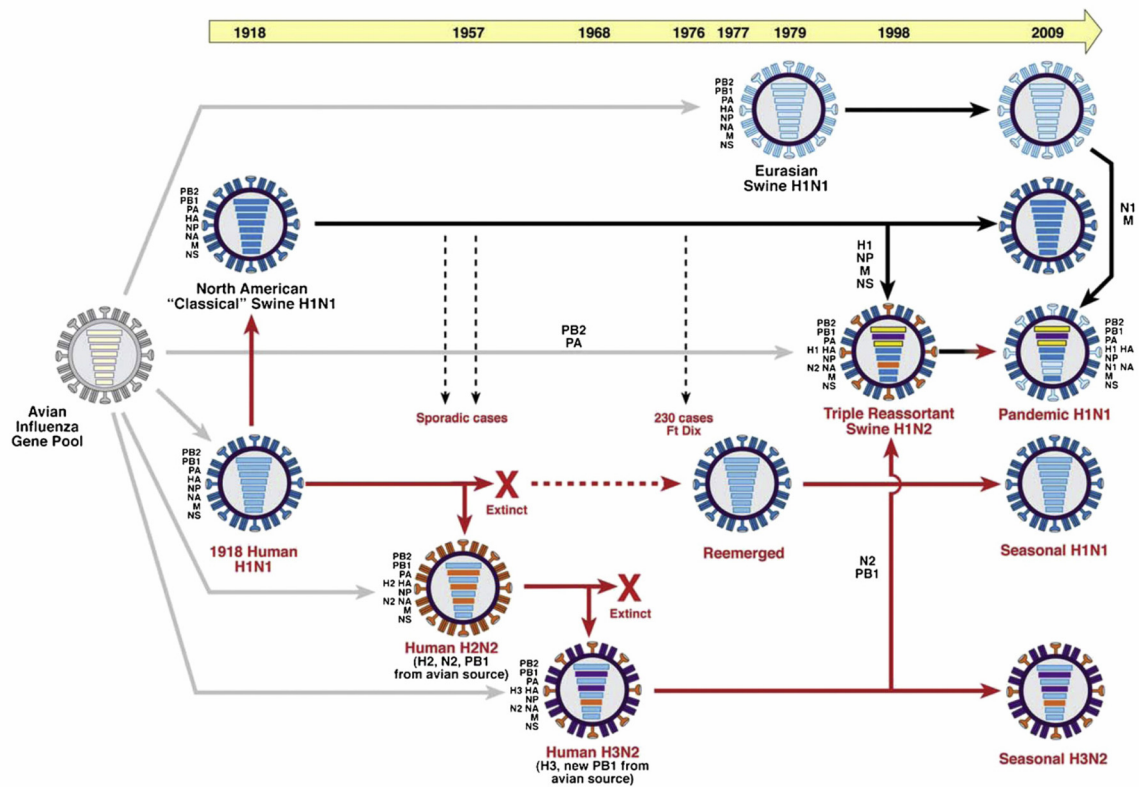
### **5.2. Le réassortiment génétique dans la nature**

#### **5.2.1. Le réassortiment entre des virus humains, aviaires et porcins**

Le réassortiment génétique entre des virus circulants chez des hôtes différents n'est pas très courant. Néanmoins, de tels réassortiments sont possibles, principalement chez le porc qui peut être infecté à la fois par des virus humains ainsi que par des virus aviaires et est considéré comme un « creuset de mélange » entre ces virus.

Bien que le réassortiment génétique entre des virus circulants chez des hôtes différents soit rare, de tels événements jouent un rôle prépondérant dans l'évolution des *Influenzavirus A* humains (Figure 31) (236). Le début du XX<sup>ème</sup> siècle a été marqué par une pandémie grippale qui a causée environ 50 millions de morts : la grippe espagnole. Selon toute vraisemblance, le virus à l'origine de cette pandémie n'a pas émergé par réassortiment génétique mais il s'agit d'un virus aviaire de sous-type H1N1 qui serait passé directement à l'Homme. Le virus a ensuite évolué par dérive antigénique avant d'être remplacé par le virus pandémique de 1957 de sous-type H2N2. Ce virus, issu d'un événement de réassortiment génétique entre le virus humain et un virus aviaire, a causé en 1957-1958 la pandémie de grippe asiatique qui a provoquée 1 à 1,5 millions de morts. Un nouvel événement de réassortiment génétique entre le virus humain et un virus aviaire a permis l'émergence d'un virus de sous-type H3N2 responsable de la mort de plus d'un million de personnes en 1968 lors de la grippe de Hong-Kong. Un descendant du virus pandémique de 1918 est réapparu en 1977, probablement suite

à la libération accidentelle de la souche par un laboratoire, et a tué environ 500000 personnes lors de l'épisode de grippe russe. A partir de cette date, les virus de type H1N1 et H3N2 co-circulent et infectent l'Homme. Enfin, en 2009 est apparu, suite à un grand nombre d'événements de réassortiment génétique entre des virus porcins, aviaires et humains (83, 226), un nouveau virus de sous-type H1N1 d'origine porcine capable d'infecter l'Homme et de se transmettre efficacement entre membres de l'espèce humaine. Ce virus est à l'origine de la première pandémie du XXI<sup>ème</sup> siècle qui a tué plus de 18000 personnes de part le monde et est responsable de l'infection de 43 à 89 millions de personnes rien qu'aux USA (154).



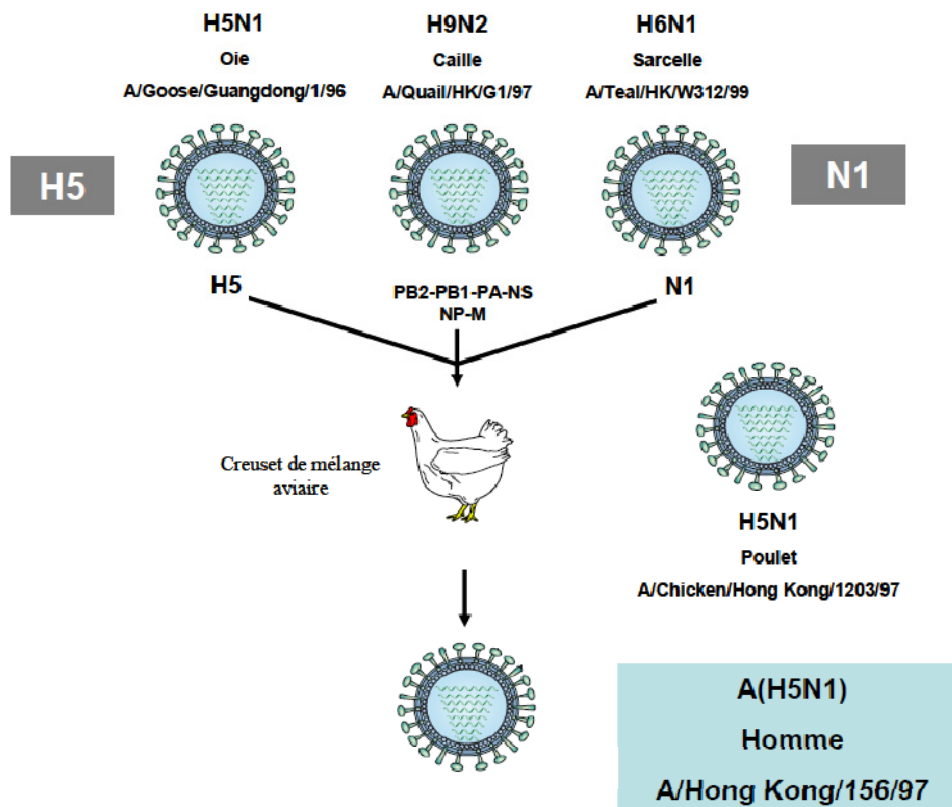
**Figure 31 :** Evolution des *Influenzavirus A* depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle. D'après (236).

## 5.2.2. Le réassortiment génétique au sein d'un réservoir donné

### 5.2.2.1. Le réassortiment génétique dans le réservoir aviaire

Les *Influenzavirus A* aviaires sont classés en 2 clades : un clade américain et un clade eurasien. L'analyse de virus aviaires isolés à partir d'oiseaux sauvages montre qu'au sein d'une clade donné, les événements de réassortiment génétique sont très courants (61). Les événements de réassortiment entre des virus appartenant à 2 clades différents sont quant à eux plus rares (61).

Le virus aviaire hautement pathogène H5N1, à l'origine d'infections humaines rares mais d'une extrême gravité, provient de multiples réassortiments génétiques entre plusieurs *Influenzavirus A* aviaires (Figure 32) (140).



**Figure 32 :** Représentation simplifiée des événements de réassortiment génétique à l'origine du virus aviaire A (H5N1).

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

### 5.2.2.2. Le réassortiment génétique dans le réservoir humain

Les virus humains d'un sous-type donné évoluent par réassortiment génétique (108, 172, 173, 219, 231). Il semblerait qu'au cours des épidémies saisonnières de grippe chez l'Homme, il est fréquent qu'un individu donné soit infecté par différents virus, ce qui est indispensable pour que le réassortiment génétique ait lieu (84). L'analyse des séquences des virus humains de types H3N2 et H1N1 ayant circulé ces dernières années a révélé que le réassortiment génétique est un mécanisme d'évolution majeur au sein de ces sous-types (108, 172, 173, 219, 231). Par exemple, de nombreux événements de réassortiment génétique entre souches de sous-type H3N2 se sont produits à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle, si bien que 70 % des virus circulant en Allemagne durant la saison 1998-1999 et analysés par Schweiger *et al.* ont des compositions génomiques distinctes (219). Des virus réassortants ont été isolés au cours des saisons suivantes mais la proportion de virus avec des compositions génomiques différentes varie selon les saisons (219). Il a également été montré que le réassortiment génétique a joué un rôle important dans l'évolution des virus de sous-type H1N1 humains circulants depuis 1918 (173). Un virus isolé en 1947 a par exemple acquis de nouveaux ARNv 1 (PB2) et 4 (HA) par réassortiment génétique intra-sous-type, ce qui peut expliquer le changement antigénique important observé en 1947 (173). Enfin, le réassortiment génétique *in vivo* entre deux virus humains appartenant au même sous-type peut engendrer des changements considérables aboutissant par exemple au transfert de la résistance aux antiviraux à des souches circulantes initialement sensibles (51), ou son inverse (78).

Depuis 1977, des virus de sous-types H1N1 et H3N2 co-circulent au sein des populations humaines. Néanmoins, le réassortiment génétique entre 2 virus humains de sous-types différents est rare, bien que des virus puissent parfois émerger par réassortiment génétique entre des souches de sous-types H1N1 et H3N2. Ainsi, des virus H1N1 réassortants possédant des ARNv provenant d'un virus H3N2 ont circulés dans plusieurs pays de 1978 à 1980 (167, 267). Des virus H1N2 réassortants ont été isolés de manière sporadique en Chine de décembre 1988 à mars 1989 (95) et dans différentes parties du monde en 2001 (93, 258), mais ils ne se sont pas établis dans la population humaine.

En conclusion, le réassortiment génétique entre des virus humains de même sous-type joue un rôle considérable et peut expliquer que la virulence des souches saisonnières soit différente d'une année à l'autre. Par contre, le réassortiment génétique entre virus humains de sous-types différents ne semble pas jouer un rôle important dans l'évolution des virus.

### 5.2.2.3. Le réassortiment génétique dans le réservoir porcin

Les virus porcins évoluent également par réassortiment génétique au sein d'un même sous-type et entre sous-types (126). Il a par exemple été montré que le réassortiment génétique entre des virus porcins de sous-types H1N1 et H3N2 a récemment conduit à l'émergence d'un virus porcin de sous-type H3N1 (157).

### 5.2.2.4. La distribution des segments de gènes au cours du réassortiment génétique

Nous pouvons nous demander si la distribution des segments d'ARNv durant le processus de réassortiment génétique entre des virus circulant dans un même réservoir se fait au hasard. L'analyse de virus aviaires isolés à partir d'oiseaux sauvages n'a pas révélé de combinaison privilégiée entre ARNv suite au réassortiment génétique entre virus aviaires du même clade (61). Il semble donc que le réassortiment génétique se produise de manière aléatoire entre virus aviaires du même clade. Par contre, lors d'événements de réassortiment entre virus porcins ou entre virus humains, les ARNv 4 (HA) et 6 (NA) sont beaucoup plus impliqués que les autres ARNv (126, 206). Dans une moindre mesure, l'ARNv 2 (PB1) est également plus impliqué dans les événements de réassortiment génétique entre virus porcins (126). Le réassortiment génétique entre virus porcins et entre virus humains semble donc ne pas être aléatoire.

### **5.3. L'étude du réassortiment génétique entre virus de sous-types différents**

#### **5.3.1. Caractéristiques générales du réassortiment génétique**

Lorsqu'une cellule est infectée par 2 virus différents, le réassortiment peut théoriquement faire émerger  $2^8$  soit 256 génotypes différents (les 2 génotypes parentaux et 254 nouvelles combinaisons). Néanmoins, les virus possédant certaines combinaisons génomiques ne sont pas viables (29, 138). De plus, même si le nombre de virus analysés est inférieur à 254, certains génotypes sont clairement plus représentés que d'autres (139).

L'une des caractéristiques majeures du réassortiment génétique est la co-ségrégation de certains ARNv (139, 144, 243). Ce phénomène a été montré pour la première fois par Lubeck *et al.* (144). Il a alors été observé que les ARNv 1 (PB2) et 3 (PA) ainsi que les ARNv 2 (PB1) et 3 (PA) sont très souvent « associés » au cours du réassortiment génétique entre 2 virus humains de sous-types différents (144). Plus récemment, il a été montré *in vitro* que les ARNv 4 (HA) et 7 (M) ont souvent la même origine (243).

Signalons enfin que la probabilité d'être incorporé dans les particules virales réassortantes pour chacun des ARNv est différente selon sa provenance (243). Par exemple, la majorité des virus réassortants analysés par Varich *et al.* (243) possèdent un ARNv 4 (HA) humain et un ARNv 5 (NP) aviaire.

#### **5.3.2. Analyse d'événements de réassortiment génétique pouvant faire émerger un virus pandémique**

Une grande partie des études consacrées au réassortiment génétique se sont focalisées sur le réassortiment génétique entre une souche humaine et une souche d'un autre réservoir, principalement aviaire ou porcin. En effet, le porc peut être infecté par des virus porcins, humains ainsi que par des aviaires et des virus potentiellement pandémiques peuvent émerger par réassortiment génétique entre ces virus si un ARNv codant une glycoprotéine de surface est incorporé dans un fond génétique humain. Le principal antigène de surface étant la protéine HA, beaucoup d'études se sont limitées à l'analyse de virus réassortants possédant un ARNv 4 (HA) non humain. Les virus aviaires de sous-type H5 ou H7 présentent un intérêt supplémentaire car la présence d'un site de clivage poly-basique au niveau de ces protéines peut rendre le virus hautement pathogène.

Nous allons présenter 3 études récentes qui cherchent à déterminer si des virus pandémiques peuvent facilement émerger par réassortiment génétique entre des souches virales circulantes de différents sous-types.

Afin d'évaluer la probabilité de réassortiment entre un virus humain saisonnier de sous-type H3N2 et un HPAI de sous-type H5N1, des furets ont été co-infectés avec ces 2 virus (115). L'analyse de virus issus de sécrétions nasales indique que 9 % des virus sont des virus réassortants et que 34 % d'entre eux possèdent la protéine HA de sous-type H5. Ce résultat confirme une étude *in vitro* précédente qui indiquait une bonne compatibilité entre les composants des souches « parentales » lorsque des particules virales réassortantes étaient produites par génétique inverse forcée (29). L'analyse du génotype des virus réassortants produits chez le furet montre que seules 5 compositions génomiques différentes contiennent l'ARNv 4 (HA) d'origine aviaire et que cet ARNv n'est jamais incorporé seul (115).

Le réassortiment génétique entre le virus pandémique de 2009 et le HPAI de sous-type H5N1 a été étudié en co-infectant des cellules en culture avec ces virus (187). Parmi les particules virales analysées suite à cette co-infection, 85 % sont des particules réassortantes. Sur les 50 virus réassortants isolés, 32 compositions génomiques différentes ont été rapportées. L'analyse des génotypes des particules virales réassortantes indique que l'ARNv 4 (HA) aviaire n'est jamais incorporé sans autre ARNv aviaire dans un fond génétique humain.

Le réassortiment génétique entre un virus humain saisonnier de sous-type H3N2 et un virus équin de sous-type H7N7 a quant à lui été étudié en co-transfectant des cellules en culture avec les plasmides de génétique inverse codant les 8 ARNv de chacune des 2 souches (139). Sur 120 particules virales réassortantes analysées, seuls 29 génotypes différents ont été trouvés. Deux de ces particules possèdent l'ARNv 4 (HA) d'origine équine sur un fond génétique humain, mais sa présence est toujours associée à la présence d'autres ARNv d'origine équine.

L'ensemble de ces études suggèrent que des virus réassortants pourraient être produits suite à la co-infection d'une cellule par des souches aviaires et humaines circulant actuellement, et qu'un fond génétique humain pourrait incorporer un ARNv 4 (HA) étranger. Néanmoins, la proportion de virus réassortants produits dépend beaucoup des souches utilisées. Il semble donc qu'il existe un certain degré de compatibilité et d'incompatibilité entre certaines souches. Il a également été remarqué qu'un ARNv 4 (HA) d'origine non humaine n'est jamais incorporé seul dans un fond génétique humain (115, 139, 187).

### **5.3.3. Les facteurs limitant le réassortiment génétique**

Dans la mesure où le nombre de géotypes observés à l'issue d'un événement de réassortiment génétique est limité, il doit exister des incompatibilités entre des protéines issues de différentes souches et/ou des incompatibilités entre les ARNv de souches différentes au moment de leur incorporation dans les particules virales qui limitent le réassortiment génétique.

#### 5.3.3.1. L'incompatibilité entre les protéines de 2 souches

##### 5.3.3.1.1. Les protéines du complexe polymérase

Il ressort des études portant sur le réassortiment génétique qu'une incompatibilité entre les protéines du complexe polymérase constitue un obstacle majeur au réassortiment génétique entre 2 virus (29, 138, 139).

Certaines associations entre des protéines PB2, PB1 et PA provenant de virus infectant des hôtes différents peuvent former une polymérase ayant une activité réduite voire totalement inactive (29, 139). Globalement, il existe une bonne corrélation entre l'activité des complexes polymérase réassortants et les géotypes des virus réassortants (29, 139). Dans au moins un cas, l'incompatibilité entre des protéines PB2, PB1 et PA de différentes origines s'explique par leur incapacité à s'associer en hétéro-trimère (139). Ce résultat n'est pas surprenant comme les gènes codant les protéines des RNPv ont évolué en différents lignages en fonction de l'hôte et que beaucoup de déterminants d'hôte sont localisés dans les domaines d'interaction entre les différentes protéines des RNPv (162). Une interaction fonctionnelle entre les protéines PB2 et PA a cependant été mise en évidence bien qu'aucune interaction physique directe entre ces 2 protéines n'ait été montrée à ce jour (29, 139).

Il vient également d'être montré que les caractéristiques de la protéine NP du virus pandémique de 2009 (présence d'un codon d'initiation de la traduction précoce et d'une valine en position 413) jouent un rôle crucial dans sa compatibilité avec le complexe polymérase de cette souche et pourrait contribuer à limiter le réassortiment entre la souche pandémique de 2009 et d'autres souches virales circulantes (249).

Selon les souches, les protéines virales du complexe polymérase provenant d'une souche aviaire et d'une souche humaine peuvent cependant être tout à fait compatibles et ne



pas être un facteur limitant le réassortiment génétique *in vitro* (187). De plus, la présence d'un ARNv 1 (PB2) d'origine humaine dans un fond génétique aviaire peut augmenter l'activité de la polymérase ainsi que la virulence du virus chez la souris (138).

#### 5.3.3.1.2. Les protéines impliquées dans l'export des RNPv

Une fois formées dans le noyau, les RNPv doivent être exportées vers le cytoplasme afin d'être incorporées dans les particules virales. Cet export nécessite d'une part l'interaction de la protéine M1 avec la protéine NP présente au sein de la RNPv et d'autre part l'interaction de la protéine M1 avec la protéine NEP/NS2 qui recrute la machinerie cellulaire d'export. Plusieurs indices laissent penser que des incompatibilités entre les protéines NP, M1 et NEP/NS2 pourraient être des facteurs limitant le réassortiment génétique (29, 138, 139). Ainsi, la réplication de la plupart des virus réassortants possédant un ARNv 5 (NP) humain et des ARNv 7 (M) ou 8 (NS) aviaires est généralement significativement réduite (29). De plus, les virus réassortants possédant uniquement l'ARNv 5 (NP) humain sur un fond génétique aviaire se répliquent très mal, mais si les ARNv 7 (M) et 8 (NS) aviaires sont remplacés par leurs homologues humains, les capacités répliquatives des virus atteignent un niveau proche d'un virus parental (29).

#### 5.3.3.1.3. Les protéines impliquées dans le bourgeonnement

Même si cette hypothèse n'est que très peu étayée, il est possible qu'une incompatibilité entre les protéines HA, NA, M1 et M2 jouant un rôle clé dans le bourgeonnement soit un facteur limitant le réassortiment génétique. Ceci a été suggéré suite à une étude qui a montré qu'un virus réassortant possédant un ARNv 4 (HA) provenant d'un virus saisonnier de sous-type H1N1 et des ARNv 6 (NA) et 7 (M) provenant du virus pandémique de 2009 (origine porcine) se répliquent mieux que les virus parentaux (186). Par ailleurs, dans une étude *in vitro*, les ARNv 4 (HA) et 7 (M) au sein de virus réassortants humain/aviaire ont très souvent la même origine (243).

### 5.3.3.2. Le lien entre réassortiment génétique et incorporation des ARNv dans les virions

Comme nous venons de le voir, le réassortiment génétique est clairement limité par une incompatibilité protéique. Il a cependant été remarqué que certaines combinaisons génomiques ne sont jamais générées par réassortiment génétique bien qu'il soit possible de les obtenir par réassortiment génétique forcé en utilisant un système de génétique inverse. Il a alors été proposé que le réassortiment génétique puisse être limité par une incompatibilité entre les ARNv des souches « parentales » au moment de leur sélection pour être incorporés dans les particules virales. Cette hypothèse est tout à fait vraisemblable puisque l'incorporation du génome des Influenzavirus A est un processus hautement régulé qui est contrôlé par la formation d'un réseau d'interactions spécifiques entre les différents ARNv (voir le paragraphe 3).

Il a été montré que le réassortiment génétique est limité entre une souche PR8 sauvage et une souche PR8 possédant des ARNv 4 (HA) et 8 (NS) dont les extrémités nécessaires à leur incorporation ont été échangées et que ces ARNv chimériques ne sont pas incorporés efficacement dans les particules virales (81). Néanmoins, d'autres travaux sont nécessaires pour démontrer l'existence d'une incompatibilité au niveau des ARNv sauvages qui limiterait le réassortiment génétique.

## PROBLEMATIQUE

Le génome des *Influenzavirus A* est composé de 8 segments d'ARNv de polarité négative différents les uns des autres. Pour être infectieux, un virion doit contenir au moins un exemplaire de chacun des 8 ARNv composant le génome viral. Par ailleurs, la plupart des particules virales contiennent en général exactement 8 ARNv. Comme nous l'avons décrit en détail dans l'introduction, l'incorporation du génome des virus influenza A est un mécanisme sélectif qui est contrôlé, pour les souches WSN et PR8, par des régions localisées aux extrémités des ARNv. Il a également été montré au laboratoire, par Emilie Fournier, que certains ARNv composant le génome de la souche A/Moscou/10/99 (H3N2) (abrégée Moscou) interagissent entre eux *in vitro*, essentiellement *via* des régions localisées à leurs extrémités, formant un réseau d'interactions spécifiques. Ces résultats, combinés à des données de tomographie électronique, ont permis de proposer un modèle quant à l'organisation relative des RNPv dans les virions. Dans ce modèle, les complexes polymérase, liés aux promoteurs des ARNv, interagiraient ensemble au niveau de l'extrémité bourgeonnante des virions, formant un plateau, et les RNPv seraient suspendues parallèlement les unes par rapport aux autres à partir de ce plateau. Les extrémités des ARNv seraient ainsi à proximité les unes des autres et pourraient interagir de manière spécifique, permettant l'incorporation d'un jeu complet de 8 ARNv différents dans les virions.

Mon projet de thèse a tout d'abord consisté à déterminer si l'organisation relative des RNPv proposée pour la souche Moscou est conservée dans une autre souche virale. Dans ce but, nous avons décidé de mener une étude similaire pour la souche aviaire faiblement pathogène A/Finch/England/2051/91 (H5N2) (abrégée England). Nous avons établi par des expériences de retard sur gel (*electromobility shift assay*, EMSA) le réseau d'interactions entre les ARNv composant le génome de ce virus, puis nous avons identifié les régions impliquées dans la plupart de ces interactions. Enfin, nous avons déterminé, par des expériences de production de virus *in vitro*, le rôle de l'une de ces interactions dans l'incorporation des ARNv et la réplication virale.

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, l'infection d'une cellule donnée par plusieurs virus de souches différentes peut conduire, par un mécanisme appelé réassortiment

génétique, à la production de virus réassortants dont les 8 ARNv composant le génome proviennent des génomes des virus parentaux. Le réassortiment génétique est loin d'être un mécanisme aléatoire puisque seules certaines combinaisons génétiques sont possibles. Cette restriction au réassortiment génétique s'opère à différents niveaux. Des protéines codées par le génome d'une souche donnée, et notamment les protéines participant à la formation des RNPv, peuvent ne pas être pleinement fonctionnelles en présence de protéines codées par le génome d'une autre souche. En outre, en cas de changement d'hôte, les protéines virales doivent être compatibles avec les co-facteurs cellulaires. Néanmoins, certaines combinaisons génomiques ne sont jamais générées par réassortiment génétique bien qu'il soit possible de les obtenir par réassortiment génétique forcé en utilisant un système de génétique inverse. Ceci laisse penser qu'il pourrait exister une incompatibilité entre les signaux dédiés à l'incorporation des ARNv des souches « parentales » qui limiterait également le réassortiment génétique. En effet, au niveau des virus réassortants, ces signaux doivent être compatibles afin que leur génome soit incorporé efficacement dans les virions.

Le deuxième volet de ma thèse, a concerné l'étude du lien entre les résultats obtenus au laboratoire quant au mécanisme permettant l'incorporation d'un jeu d'ARNv complet au sein des particules virales et le réassortiment génétique entre la souche humaine Moscou et la souche aviaire England. Dans un premier temps, nous avons tenté d'expliquer les résultats de réassortiment génétique *in vitro* obtenus par Boris Essere (Lyon) en étudiant *in vitro* les interactions entre les ARNv des 2 souches. Dans un deuxième temps, les 4 régions d'un ARNv de la souche England responsables de son interaction *in vitro* avec 4 ARNv de la même souche ont été insérées au niveau des régions homologues présentes dans l'ARNv Moscou homologue afin de déterminer si elles peuvent diriger son incorporation dans un virus England.

# MATERIELS ET METHODES

## 1. Clonage des séquences des ARNv des virus et mutagenèse

### 1.1. Souches virales utilisées

Deux souches de virus influenza A ont été utilisées dans ce travail : d'une part la souche A/Moscou/10/99 (H3N2) (abrégée Moscou) isolée à partir d'un représentant de l'espèce humaine et d'autre part la souche A/Finch/England/2051/91 (H5N2) (abrégée England) isolée à partir d'une espèce de pinsons. Signalons que la souche Moscou est entrée dans la composition des souches vaccinales de 2000-2001 à 2003-2004.

Le pourcentage d'identité entre les séquences nucléotidiques de chacun des 8 ARNv des 2 souches a été calculé en utilisant le programme Needle (European Molecular Biology Open Software Suite) basé sur l'algorithme de Needleman-Wunsch (Tableau 4). Les séquences nucléotidiques entre les ARNv homologues ne diffèrent que d'environ 20 %, sauf dans le cas des ARNv 4 (HA) qui sont différents à près de 50 %. Néanmoins, sur l'ensemble du génome, nous trouvons que les séquences nucléotidiques des 2 souches sont identiques à près de 80 %.

ARNv	1 (PB2)	2 (PB1)	3 (PA)	4 (HA)	5 (NP)	6 (NA)	7 (M)	8 (NS)
% d'identité	82,4 %	87,3 %	83,8 %	52,7 %	82,9 %	82,5 %	89 %	74,9 %

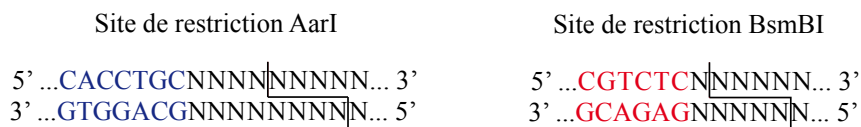
**Tableau 4 :** Pourcentage d'identité entre les séquences nucléotidiques des ARNv des virus influenza A des souches Moscou et England.

### 1.2. Clonage des séquences des ARNv des virus

Les ARNv ont été clonés dans les vecteurs pUC2000 (pour les expériences d'études *in vitro* d'interactions ARN/ARN) et pHW2000 (pour les expériences de production de virus) que nous décrirons ultérieurement. La plupart de ces clonages ayant été réalisés avant mon arrivée au laboratoire, les méthodes employées ne seront décrites que succinctement.

### 1.2.1. Extraction et amplification des ARNv

Les ARNv sont extraits à partir des particules virales présentes dans le surnageant de culture de cellules MDCK infectées en utilisant le kit QIAmp viral RNA minikit (Qiagen) suivant les instructions du fabricant. Une transcription inverse utilisant une amorce s'hybridant à la région U12 des ARNv (séquence de l'amorce : 5' AGCAAAAGCAGG 3') permet la synthèse des ADNc (ADN complémentaires). Chaque ARNv est ensuite amplifié par PCR en utilisant des couples d'amorces spécifiques de chaque ARNv (Tableau 5) possédant à leurs extrémités les séquences reconnues par les enzymes de restriction BsmBI ou AarI :



Les produits de PCR ainsi obtenus ont ensuite été clonés dans les vecteurs pUC2000 et pHW2000.

ARNv amplifié	Amorce sens (de 5' vers 3')	Amorce anti-sens (de 5' vers 3')
1 (PB2)	TATT <b>CACCTGC</b> CTCAGGGAGCGAAAAGCAGGTC	ATAT <b>CACCTGC</b> CCTCGTATTAGTAGAAACAAGG
2 (PB1)	TATT <b>CACCTGC</b> CTCAGGGAGCGAAAAGCAGGCA	ATAT <b>CACCTGC</b> CCTCGTATTAGTAGAAACAAGGCATT
3 (PA)	TATT <b>CACCTGC</b> CTCAGGGAGCGAAAAGCAGGTAC	ATAT <b>CACCTGC</b> CCTCGTATTAGTAGAAACAAGG
4 (HA)	TATT <b>CACCTGC</b> CTCAGGGAGCGAAAAGCAGGGG	ATAT <b>CACCTGC</b> CCTCGTATTAGTAGAAACAAGG
5 (NP)	T <b>CGTCTC</b> AGGGAGCAAAAAGCAGGTAGAT	AT <b>CGTCTC</b> GTATTAGTAGAAACAAGGGTATTTTTG
6 (NA)	TATT <b>CGTCTC</b> AGGGAGCAAAAAGCAGGAGT	ATAT <b>CGTCTC</b> GTATTAGTAGAAACAAGGAG
7 (M)	TATT <b>CGTCTC</b> AGGGAGCAAAAAGCAGGTAG	ATAT <b>CGTCTC</b> GTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT
8 (NS)	TATT <b>CGTCTC</b> AGGGAGCAAAAAGCAGGGTG	ATAT <b>CGTCTC</b> GTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT

**Tableau 5 :** Amorces utilisées pour amplifier les segments de gènes des souches influenza A utilisées dans ce travail.

Les séquences de reconnaissance spécifiques des sites de restriction AarI et BsmBI permettant le clonage du produit de PCR dans les vecteurs pUC2000 ou pHW2000 sont indiquées respectivement en bleu et rouge. Pour l'ARNv 8 (NS) de la souche England, le site de restriction BsmBI a été remplacé par un site AarI.

### 1.2.2. Clonage dans les vecteurs pUC2000

Le vecteur pUC2000 dans lequel les segments d'ADNc ont été clonés a été construit à partir du vecteur commercial pUC19 (GenBank Accession # : L09137) (Figure 33). Des cassettes de clonages destinées à recevoir les ADNc synthétisés à partir des ARNv ont été introduites dans le vecteur pUC19 après avoir retiré par digestion enzymatique la région dans

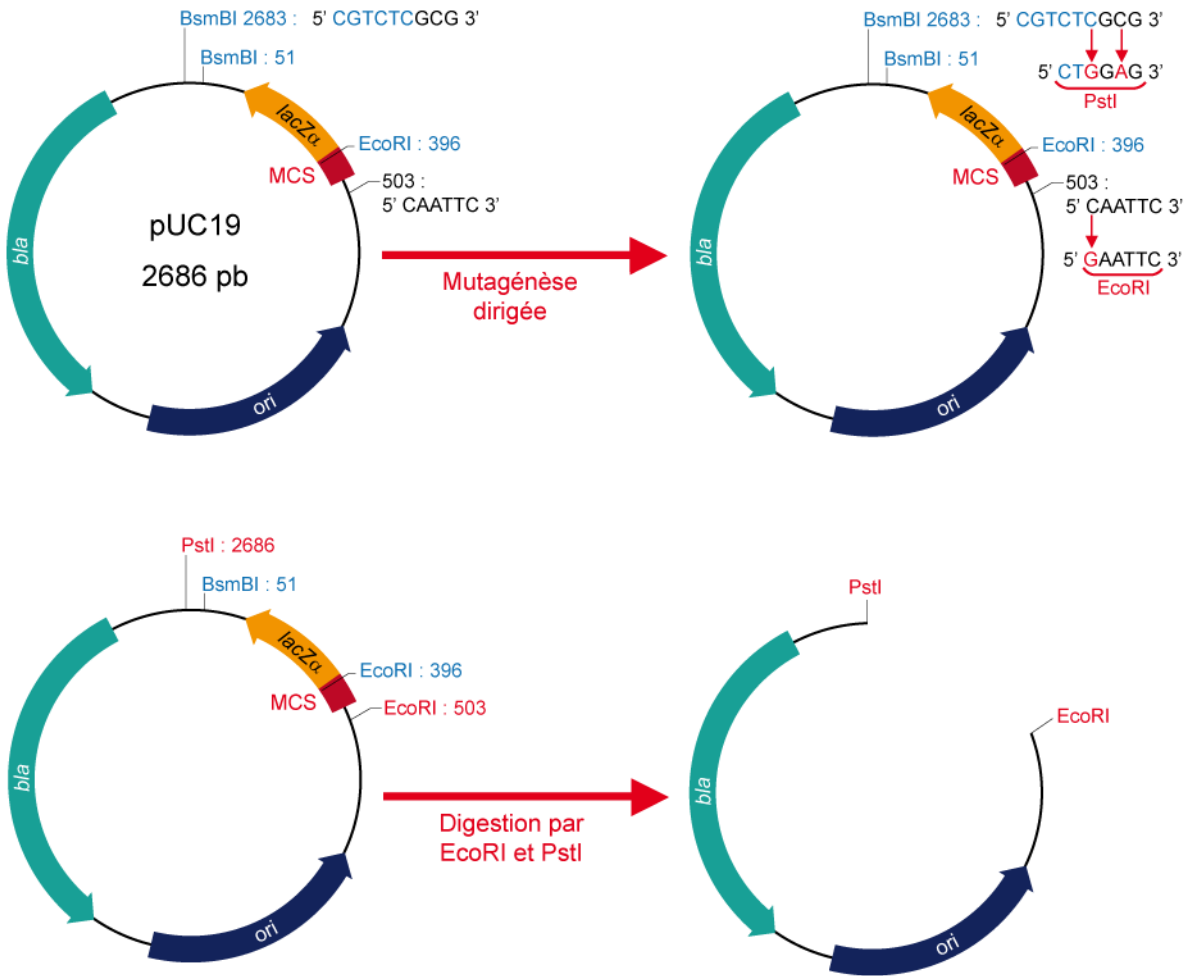
laquelle la cassette de clonage et le gène *lacZ* sont localisés. Dans ce but, des substitutions en position 2, 4 et 503 ont été réalisées par mutagenèse dirigée afin de créer des sites de reconnaissance pour les enzymes de restriction PstI et EcoRI.

Deux brins d'ADN complémentaires (Figure 33) ont été entièrement synthétisés *in vitro* afin de produire la nouvelle cassette de clonage du vecteur. Elles possèdent toutes un promoteur T7 en orientation antisens, deux sites de reconnaissance pour l'enzyme de restriction BsmBI et un site de restriction unique (Eco47III, Bsh1236I ou Ecl136II selon la cassette de clonage considérée) permettant de linéariser le plasmide afin d'arrêter la transcription *in vitro* des ARNv. Lorsque les 2 brins d'ADN sont hybridés l'un à l'autre, l'ADN double brin constitué possède des extrémités cohésives compatibles avec les extrémités du vecteur préalablement digéré par les enzymes de restriction PstI et EcoRI.

Les fragments d'ADN obtenus après transcription inverse des ARNv et PCR (voir § 1.2.1.), digérés par les enzymes de restriction BsmBI ou AarI selon les cas, ont été clonés dans le vecteur pUC2000 approprié (Tableau 6) préalablement digéré par l'enzyme de restriction BsmBI. L'orientation de l'insert est telle que le promoteur T7 permet la transcription d'un ARNv de polarité négative. Cet ARNv possède quelques nucléotides supplémentaires en 5' (5' AUAA 3') et en 3' (5' AGGGGC 3' pour le vecteur pUC2000-Bsh1236I, 5' AGGGCUC 3' pour le vecteur pUC2000-Ecl136II ou 5' AGGGUCG 3' pour le vecteur pUC2000-Eco47III) qui correspondent aux parties restantes des sites de clonage et à la moitié du site de restriction utilisé pour arrêter la transcription.

ARNv	Souche Moscou	Souche England
1 (PB2)	Ecl136II	Ecl136II
2 (PB1)	Bsh1236I	Bsh1236I
3 (PA)	Bsh1236I	Ecl136II
4 (HA)	Ecl136II	Bsh1236I
5 (NP)	Eco47III	Bsh1236I
6 (NA)	Bsh1236I	Eco47III
7 (M)	Ecl136II	Ecl136II
8 (NS)	Ecl136II	Ecl136II

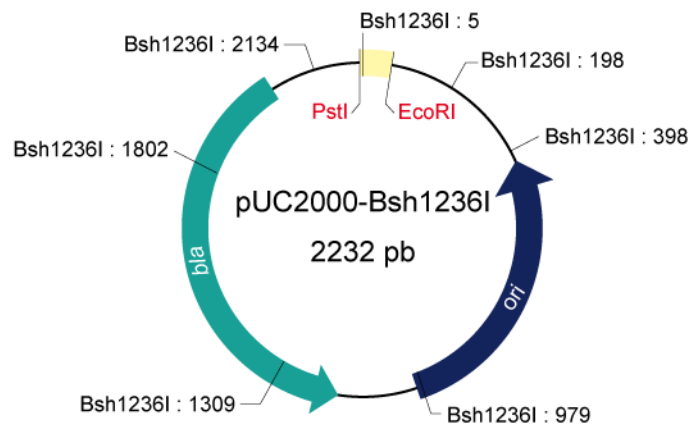
**Tableau 6 :** Site de restriction présent dans la cassette de clonage du vecteur pUC2000 dans lequel chaque ARNv a été inséré.



Hybridation des 2 brins d'ADN synthétisés *in vitro*



Sites de restrictions alternatifs :





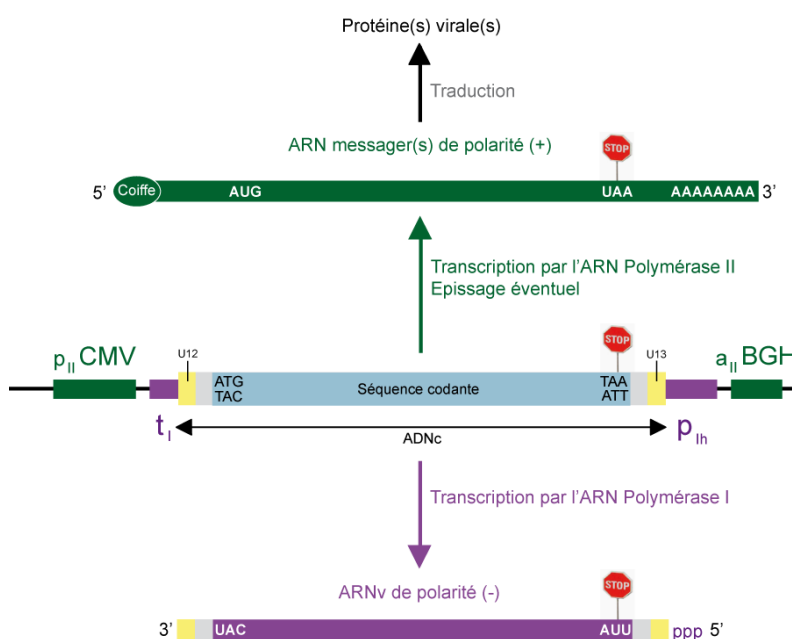
### Figure 33 : Construction du vecteur pUC2000.

Les principales étapes permettant d'obtenir le vecteur pUC2000 à partir du vecteur commercial pUC19 (GenBank Accession # : L09137) ont été représentées. Se référer texte pour les explications. Le schéma n'a pas été réalisé à l'échelle.

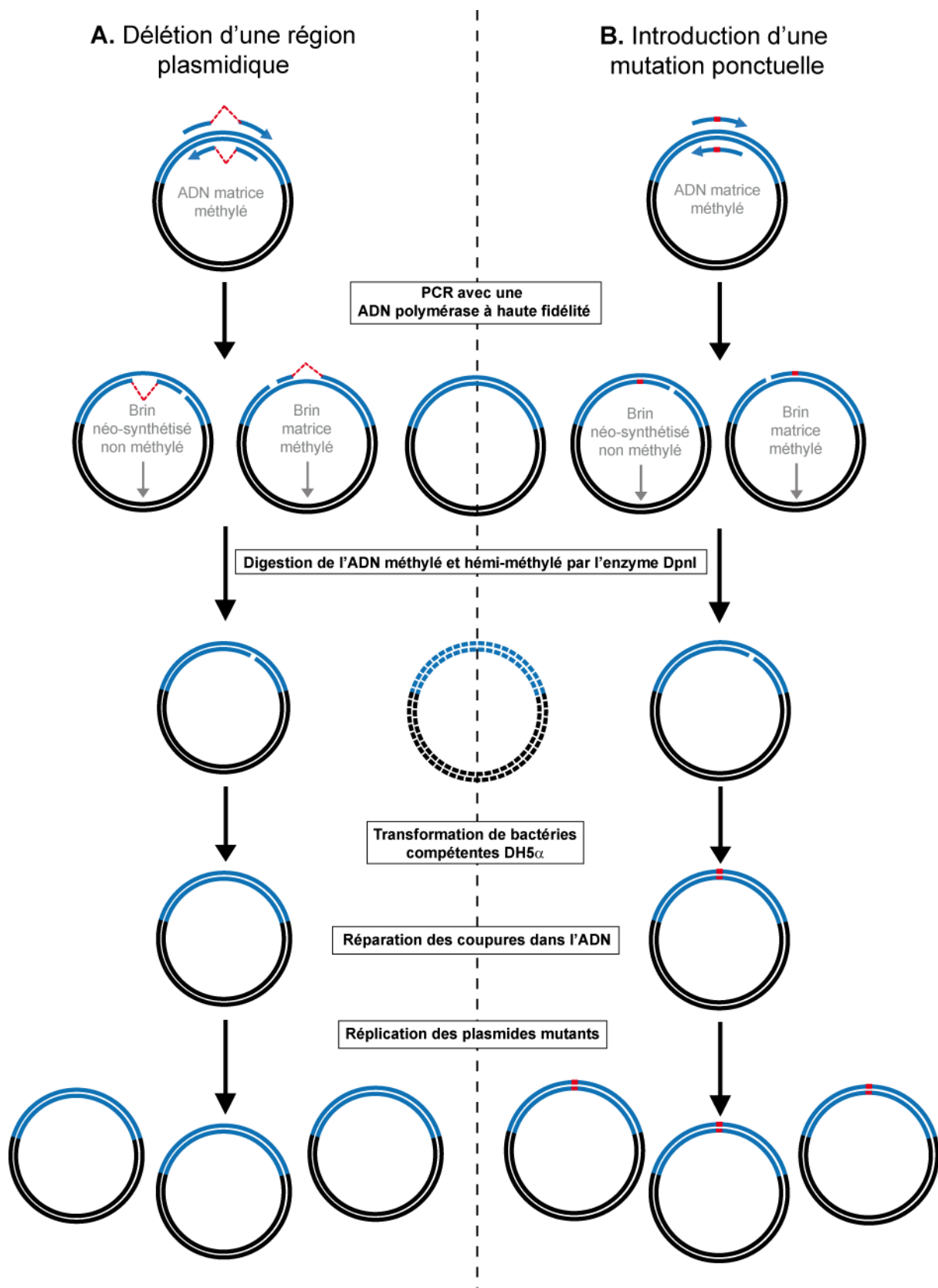
Le vecteur pUC2000-Bsh1236I est représenté à titre d'exemple. Le gène *bla*, codant une  $\beta$ -lactamase qui confère une résistance à l'ampicilline, est localisé aux coordonnées 2032-1172. L'origine de réplication *ori* est aux coordonnées 1001-413. En plus du site de restriction Bsh1236I localisé au niveau de la cassette de clonage, le vecteur pUC2000 possède 6 autres sites Bsh1236I. Le vecteur ne contient pas de site de restriction Ecl136II, ni de site Eco47III. Les vecteurs pUC2000-Ecl136I et pUC2000-Eco47III ne diffèrent que par l'ajout de 2 nucléotides au niveau de la cassette de clonage.

### 1.2.3. Clonage dans les vecteurs pHW2000

Les fragments d'ADN obtenus après transcription inverse des ARNv et PCR (voir § 1.2.1.), digérés par les enzymes de restriction BsmBI ou AarI selon les cas, ont été clonés dans le vecteur pHW2000 (107) préalablement digéré par BsmBI. L'ADNc se trouve alors inséré entre un promoteur PolII (abrégé  $p_{II}$ ) et un terminateur PolII ( $t_I$ ) (Figure 34). Cet ensemble est encadré par le promoteur PolIII du cytomégalovirus humain ( $p_{III}CMV$ ) et le signal de polyadénylation isolé du gène codant l'hormone de croissance bovine ( $a_{II}BGH$ ). Ces 2 unités de transcriptions sont en orientation inverse, ce qui permet, après transfection de cellules eucaryotes par le plasmide pHW2000, d'une part la transcription par l'ADN polymérase I cellulaire d'un ARNv de polarité négative et, d'autre part, la transcription par l'ARN polymérase II cellulaire d'ARN pré-messagers de polarité positive qui seront maturés par les machineries cellulaires en ARNm pouvant être traduits en protéines (Figure 34).



**Figure 34 :** Les différentes transcriptions réalisées à partir du vecteur pHW2000. Se référer au texte pour les explications. Le schéma n'a pas été réalisé à l'échelle. D'après (107).



**Figure 35 :** Description de la stratégie de mutagénèse utilisée.

**A.** Stratégie utilisée pour réaliser des délétions au sein des ARNv. **B.** Stratégie utilisée pour introduire des mutations ponctuelles. Se référer au texte pour les explications. La délétion et la mutation sont indiquées en rouge.

## **1.3. Mutagenèse dirigée**

### **1.3.1. Délétions**

Des délétions de séquences d'ARNv clonées dans le vecteur pUC2000 ont été réalisées pour la plupart des ARNv de la souche England. Ces délétions ont été réalisées par mutagenèse dirigée par PCR en utilisant des amorces qui permettent d'amplifier tout le plasmide à l'exception de la région à déléter : la partie 5' de l'amorce sens s'hybride immédiatement en amont de la région à déléter tandis que la partie 3' s'hybride immédiatement en aval ; l'amorce anti-sens est strictement complémentaire à l'amorce sens (Figure 35). Les différentes régions des ARNv qui ont été délétées ainsi que les séquences des amorces de PCR utilisées sont répertoriées dans le tableau 7.

Classiquement, pour chaque délétion, 5 conditions (Tableau 8) ont été testées afin d'augmenter la probabilité d'obtenir un produit de PCR. Quelle que soit la condition utilisée, 40 ng de plasmide pUC2000 produits dans une souche d'*E. coli* de génotype *dam*<sup>+</sup> servent de matrice. Un tel plasmide est méthylé puisque le gène *dam* code la méthyltransférase Dam qui méthyle la position N-6 des adénines présentes dans un contexte 5' GATC 3'.

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
Tampon HF (NEB)	1 x	1 x	0 x	0 x	0 x
Tampon GC (NEB)	0 x	0 x	1 x	1 x	0 x
Tampon ThermoPol (NEB)	0 x	0 x	0 x	0 x	1 x
MgCl <sub>2</sub> (NEB)	0 nmol	50 nmol	0 nmol	50 nmol	0 nmol
dNTP (Promega)	10 nmol	10 nmol	10 nmol	10 nmol	10 nmol
Amorce sens	25 pmol	25 pmol	25 pmol	25 pmol	25 pmol
Amorce anti-sens	25 pmol	25 pmol	25 pmol	25 pmol	25 pmol
Phusion High-Fidelity DNA Pol (NEB)	1 U	1 U	1 U	1 U	0 U
Vent <sub>R</sub> <sup>®</sup> DNA Pol (NEB)	0 U	0 U	0 U	0 U	2 U

**Tableau 8** : Conditions de PCR utilisées.

ARNv	Région délétée	Amorce sens (de 5' vers 3')	Amorce anti-sens (de 5' vers 3')
1 (PB2)	13-398	GAGCGAAAGCAGGGTTGAACATGG	CCATGTTCAACCCTGCTTCGCTC
1 (PB2)	399-784	GAAAAGGTGAAAGATGATGTTGATCAGAG	CTCTGATCAACATCATCTTCAACCTTTTC
1 (PB2)	785-1170	GGGAGGTGAGAAATGATCAACTGATAGTG	CACTATCAGTTGAATCATTCTCACCTCCC
1 (PB2)	1171-1556	GCAACCAGAAGGCTTTGTGCTTATCTCC	GGAGATAAGAGCACAAGCCTTCTGGTTGC
1 (PB2)	1557-1942	GGACCAACGAGGTAATGTGAGAGGCTCAG	CTGAGCCTCTCACATTTACCTCGTTGGTCC
1 (PB2)	1943-2328	CTTCTTAACTGTAACCTTGTCTACTAA	TTAGTAGAAAACAGGTTACAGTTAAAGAAG
2 (PB1)	13-124	GGGAGCGAAAGCAGGCAGGAACAGGATACA	TGTATCCTGTCTGCTGCTTTCGCTCCC
2 (PB1)	125-384	CATACAGCCATGGAAAACGACCCAAGGC	GCCTTGGGTGAGTTTCCATGGCTGTATG
2 (PB1)	385-644	CAAAACAAGAGTGGACGAAGAAGCAGAGGC	GCCTCTGCTTCTCGTCCACTCTTGTTTG
2 (PB1)	645-904	GAACAATAGGAAAAGATACAGAGCTCTC	GAGAGCTCTGTATCTTTCCTCATTGTTTC
2 (PB1)	905-1164	GATGATTAACCTCACTTCAACGAATCAACG	CGTTGATTCGTTGAAGTGAGTTAATCATC
2 (PB1)	1165-1418	CATTGACCTGAAATACGTTCTATAGGACCTG	CAGGTCCTATAGAAGCTATTCAGGTCATG
2 (PB1)	1419-1678	GCAGGGTGGACAGTCAAGGACTACAGGTAC	GTACCTGTAGTCTTGACTGTCCACCCTGC
2 (PB1)	1679-1938	CTCTTCAGCTGTCATCCGTAACAATGCTG	CAGCATTGTTACGGATGAACAGCTGAAGAG
2 (PB1)	1939-2198	CATAAGGAAATTGAGCGCACGAATTGACTTC	GAAGTCAATTCGTGCGCTCAATTTCTTATG
2 (PB1)	2199-2328	CAGGGCCGAATTGACCTTGTCTACTAA	TTAGTAGAAAACAGGTCATTCGGGCCCTG
3 (PA)	13-124	GGGAGCGAAAGCAGGAATTTGCTGCAATATG	CATATGCAGCAAATTCCTGCTTTCGCTCCC
3 (PA)	125-514	GAAAATCGAAACGAACAATGAAGAGAGCAGG	CCTGCTCTTTCATTGTTGCTTTCGATTTC
3 (PA)	515-904	CAGACTACACCTTGACCCGAGTCATGAGG	CCTCATGACTCGGGTCAAGGGTGTAGTCTG
3 (PA)	905-1292	CTAAGCATCGAGGTGAAGTGTGAAATAG	CTATTCATCAAGTTCACCTCGATGCTTAG
3 (PA)	1293-1682	CGATTCAAGCTGGATAATAGGCCAAGTGTG	GACACTTGGCCTATTATCCAGCTTGAATCG
3 (PA)	1683-2072	GCTCCTGAGGACTGCTGGAGGCTATATG	CATATAGCCCTCCAGCAGTCTCAGGAGC
3 (PA)	2073-2221	CTGGGACTTTCGATCTCCTTGTCTACTAATA	TATTAGTAGAAAACAGGAGATCGAAAAGTCCCAG
4 (HA)	13-102	GGGAGCAAAGCAGGAAACAACGACAGAG	CTCTGTCGAGTTGTTCTGCTTTTGCTCCC
4 (HA)	13-42	GGGAGCAAAGCAGGGCTTCTTCTTGAAT	ATTGCAAGAAGAAGCCCTGCTTTTGCTCCC
4 (HA)	43-72	AATGGAGAAAATAGTAAGTGACCAGATTTG	CAAATCTGGTCACTTACTATTTCTCCATT
4 (HA)	73-102	AGTCAGTCTTGTAAAAACAACGACAGAGA	TCTGTCGAGTTGTTTTAAACAAGACTGACT
4 (HA)	103-357	CATTGGTTACCATGCTTCAACGACTATG	CATAGTCGTTGAAAGCATGGTAACCAATG
4 (HA)	358-612	CTGCTACCTGGGAACCATCTAATGATGC	GCATCATTAGGATGGTCCCAGGGTAGCAG
4 (HA)	613-867	CTGTGGGGATTACATGAAAAGTGGATTG	CAATCCACTTTTCATGTGAATCCCCACAG
4 (HA)	868-1124	GGGGATTCAGCAATACCACATAGCAACG	CGTTGCTATGGTGGTATTGCTGAATCCCC
4 (HA)	1125-1379	GACGGTGGTATGGGTATTTCATGACTC	GAGTCATGGAAATACCATAACCAACCGTC
4 (HA)	1380-1634	GAGAGAACTTAGCGAGTTCCTAGCACTG	CAGTGTAGGGAACCTCGTAGAGTTCTCTC
4 (HA)	1635-1664	TTTATTCAACAGTGGCTGTCTATCTTCT	AGAAAGATAGACCAGCCACTGTTGAATAAA
4 (HA)	1665-1694	TGGCAATCATGATAGGATCATTGCAGTGCA	TGCACTGCAATGATCCTATCATGATTGCCA
4 (HA)	1695-1724	GGATGTGCTCAATGCTTGTGAGTTCAGAT	ATCTGAACTACAAGCATTGGAGCACATCC
4 (HA)	1725-1754	GAATTTGCATTTAAACCTTGTCTACTAA	TTAGTAGAAAACAGGTTAAATGCAAAATTC
4 (HA)	1635-1754	TTTATTCAACAGTGGCCTTGTCTACTAATAC	GTATTAGTAGAAAACAGGCCACTGTTGAATAAA
5 (NP)	13-145	GGGAGCAAAGCAGGGTGGAAATGGGAGGT	ACCTCCAATTCCACCTGCTTTTGCTCCC
5 (NP)	146-400	GTTGGAAGAATGGTTGTTGGCGTCAAGCG	CGCTTGACGCAAACAACCACTTCTTCAAC
5 (NP)	401-655	GAGGAGATCAGGAGGAGAAATTTCTGGAGAG	CTCTCCAGAAATTTCTCTCTGATCTCTCTC
5 (NP)	656-909	GGGGATCAATGATATATGACTTTGAGAGAG	CTCTCTCAAAGTCATATATCATGTATCCCC
5 (NP)	910-1164	GCTGTGGCCAGTGGAAATGGACTCCAGTACTC	GAGTACTGGAGTCCATTCCACTGGCCACAGC
5 (NP)	1165-1419	GAGAACATGGAAACACAGGGGCGGGAGTC	GACTCCCCGCCCCGTGTTTCCATGTTCTC
5 (NP)	1420-1552	GAAGATGTGCTTTCCTTGTCTACTAA	TTAGTAGAAAACAGGGAAGACACATCTTC
7 (M)	13-102	GGGAGCAAAGCAGGGAGACTTGAAGATGTC	GACATCTCAAGTCTCCCTGCTTTTGCTCCC

7 (M)	13-42	GGGAGCAAAGCAGGGTTCGAAACGTACGT	ACGTACGTTTCGACCCTGCTTTTGCTCCC
7 (M)	43-72	GAGTCTTCTAACCGAGTCAGGCCCTCAA	TTGAGGGGCTGACTCGGTTAGAAGACTC
7 (M)	73-102	TCTCTATCGTCCGAGACTTGAAGATGT	ACATCTCAAGTCTCGGGACGATAGAGAGA
7 (M)	103-302	CAAAGCCGAGATCGCGCATGGATAGGGCAGTC	GACTGCCCTATCCATGCGCGATCTCGGCTTTG
7 (M)	303-513	GAGACCCGAACAACAACAATGGTGACTAC	GTAGTCACCATTTGTTGTTGTTGCGGGTCTC
7 (M)	514-724	GCATCGGTCTCACAGCTTGAATAATTGCAG	CTGCAAATTTCAAGCTGTGAGACCGATGC
7 (M)	725-924	CTGAAAGATGATCTTCTATGAGGGAAGAATATC	GATATTCTCCCTCATAGAAGATCATCTTTCAG
7 (M)	925-954	AAGGAGTGCTGAGTAGAGTGCTGTGGATG	CATCCACAGCACTCTACTCAGGCACTCCTT
7 (M)	955-984	ATCGGCAGGAACAGCTTGCAACATAGAGC	GCTCTATGTTGACAAGCTGTTCTCGCCGAT
7 (M)	985-1014	TTGACGATGGTCACTTCTGTTTCTACTAA	TTAGTAGAAAACAAGGAATGACCATCGTCAA
7 (M)	925-1014	AAGGAGTGCTGAGTCCTTGTCTACTAATAC	GTATTAGTAGAAAACAAGGACTCAGGCACTCCTT
8 (NS)	13-126	GGGAGCAAAGCAGGATAGGCTCCGAAGAG	CTCTCGGAGCCTATCTGCTTTTGCTCCC
8 (NS)	16-26	AGCAAAGCAGGGTGTGGATTCCAACACG	CGTGTGGAATCCATCACCTGCTTTTGCT
8 (NS)	27-56	GGTGACAAAGACATAGTAGATTGTTATCTA	TAGATAACAATCTACTATGTTCTTGTACC
8 (NS)	16-56	AGCAAAGCAGGGTGGTAGATTGTTATCTA	TAGATAACAATCTACCACCTGCTTTTGCT
8 (NS)	57-256	ATAACCTCGTTTCAGCAAATAGCCATTGC	GCAATGGCTATTTGCTGAAACGAGGTTAT
8 (NS)	235-456	TTGAGGACATCCTGATAGTCTCTCTGAGGG	CCCTCAGAGACTATCAGGATGTCCTCAA
8 (NS)	435-656	GCGAATTTCTCAGTCGGACCTCCACTCCCT	AGGGAGTGGAGTCCGACTGAGAAATTCGC
8 (NS)	635-834	ACAGAGATTCGTTGATAAGGACTTCTCT	AGAGAAAGTCTTATCAAGCGAATCTCTGT
8 (NS)	835-877	GAAGTTGAGAGTGAGCCTTGTCTACTAA	TTAGTAGAAAACAAGGCTCACTCTCAACTTC
8 (NS)	765-877	GAAATATACTGACAAACCTTGTCTACTAATAC	GTATTAGTAGAAAACAAGTTGTGTCAGTATATTTC

**Tableau 7 :** Amorces de mutagenèse dirigée utilisées pour réaliser des délétions au niveau des ARNv de la souche England.

Quarante cycles d'amplification (comportant chacun une étape de dénaturation de 1 min. à 94°C, une étape d'hybridation des amorces de 1 min. à 50°C et une étape d'élongation de 1 min./kb à 72°C) ont été réalisés. Dans de rares cas, les conditions décrites précédemment n'ont pas permis d'obtenir un produit de PCR. Nous avons réussi à pallier ce problème en modifiant le programme de PCR de sorte qu'il comporte 5 cycles d'amplification réalisés dans des conditions peu stringentes (comportant chacun une étape de dénaturation de 1 min. à 94°C, une étape d'hybridation des amorces de 1 min. à 32°C et une étape d'élongation de 1 min./kb à 72°C) suivis de 35 cycles d'amplification réalisés dans des conditions plus stringentes (étape d'hybridation des amorces de 30 sec. à 52°C). Les ADN polymérase utilisées ne possédant pas d'activité de déplacement de brin, l'extrémité 3' de chaque brin néo-synthétisé n'est pas lié à l'extrémité 5' (Figure 35).

A l'issue de la PCR, l'ADN plasmidique matrice a été digéré (Figure 35) en incubant le mélange réactionnel durant 2-3 heures à 37°C après y avoir ajouté directement 10 U d'enzyme de restriction DpnI (Fermentas). Cette endonucléase reconnaît les sites 5' GATC 3'

et clive l'ADN après l'adénine uniquement si l'ADN est méthylé ou hémi-méthylé bien que, dans ce dernier cas, la vitesse de la réaction soit 60 fois plus lente.

Enfin, des bactéries chimio-compétentes One Shot<sup>®</sup> MAX Efficiency<sup>®</sup> DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>-T1<sup>R</sup> (Invitrogen) ont été transformées par choc thermique avec une faible quantité des produits de PCR suivant les recommandations du fabricant (Figure 35). Les enzymes bactériennes de réparation de l'ADN permettent de lier les extrémités 5' et 3' des brins d'ADN néo-synthétisés par PCR (Figure 35). Les plasmides mutés peuvent alors se répliquer (Figure 35) et les bactéries transformées sont sélectionnées sur un milieu LB Agar contenant 0,1 mg/mL d'ampicilline.

### 1.3.2. Mutations ponctuelles

Des mutations ponctuelles au niveau de la séquence de certains ARNv de la souche England clonés dans les vecteurs pUC2000 et/ou pHW2000 ont également été réalisées. La technique utilisée est la même que celle décrite précédemment pour réaliser des délétions dans les ARNv. La seule différence réside au niveau des amorces de PCR (voir Tableau 9) qui correspondent aux séquences mutées et s'hybrident à l'ADN matrice malgré l'existence de mésappariements au niveau des positions à muter (Figure 35).

ARNv muté	Interaction étudiée	Amorce sens (de 5' vers 3')	Amorce anti-sens (de 5' vers 3')
1 (PB2)	PB1/PB2	MUT 1 : TAGGTTTAAGAATTAGTTCGTCTTTCAGCTTTGGAG	CTCCAAAGCTGAAAGACGAACCTAATCTTAAACCTA
1 (PB2)	PB1/PB2	MUT 2 : TATATGCAAGGCAGCATTAGGTTTAAGAAT	ATTCTTAAACCTAATGCTGCCTTGCATATA
2 (PB1)	PB1/PB2	MUT 1 : GAATCCTTGAAGACGAACAAATGTACCAGAAG	CTTCTGGTACATTTGTTCTGCTTCAAGGATTC
2 (PB1)	PB1/PB1	MUT 2 : ATGTACCAGAAATGCTGCAATCTATTC	GAATAGATTGCAGCATTCTGGTACAT
2 (PB1)	PB1/NS	GATTGTGTGTTAGAGGCTATGGCGTCTTGAAG	CTTCAAGGAACGCCATAGCCTCTAACACACAATC
3 (PA)	PA/NP	GGCACCGGAAAAGGTTGACTTTGAGGACTG	CAGTCCTCAAAGTCAACCTTTCCGGTGCC
3 (PA)	PA/NS	GAAATTGGAGTCACTCGCCGCGAGGTTACATATAC	GTATATGTGAACCTCGCGCGAGTGACTCCAATTTTC
3 (PA)	PA/NS	CATTGAAATTGGAGTCACTCGCCGCGAGGTTACATATACTATC	GATAGTATATGTGAACCTCGCGCGAGTGACTCCAATTTCAATG
5 (NP)	PA/NP	CAGTGTACAACCAACCTTTTCGGTGCAGAG	CTCTGCACCGAAAAGGTTGGTTGTACTG
5 (NP)	NP/NS	CTATAAGGACCCGCTCAGGTGGAAACACCAG	CTGGTGTTCACCTGAGCGGGTCTTATAG
5 (NP)	PA/NP	GCAAATCAGTGTACAACCAACCTTTTCGGTGCAGAGGAATC	GATTCCTCTGCACCGAAAAGGTTGGTTGTACTGATTTGC
5 (NP)	NP/NS	GGGCTATAAGGACCCGCTCAGGTGGAAACACCAGCCAAC	GTTGGCTGGTGTTCACCTGAGCGGGTCTTATAGCCC
8 (NS)	PA/NS	GAAATATCTCCACTCGCGCAAGCGAGGACATCTTAC	GTAGAATGCTCCTCGCTTCCCGGAGTGGGAGATATTTTC
8 (NS)	NP/NS	GAATGGGGACCACTGAGCGTCCAAAACAGAAAC	GTTTCTGTTTTGGACGCTCAGGTGGTCCCCCATTC
8 (NS)	PB1/NS	GAAAACCTCAAATCGCCATAGCCTTAGTCTGCTCCTC	GAGGAGCAGGACTAGAGGCTATGGCGATTTTGAGGTTTTTC

**Tableau 9 :** Amorces de mutagenèse dirigée utilisées pour réaliser des mutations ponctuelles au niveau des ARNv de la souche England.

### 1.3.3. Constructions avec la GFP

#### 1.3.3.1. Clonage de la séquence codante de la GFP dans le vecteur pJET1.2

La séquence codante de la GFP a été amplifiée par PCR à partir d'un vecteur fourni par Matteo Negroni (Strasbourg). La réaction de polymérisation a été réalisée dans un volume de 50 µL par 1 U de Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) en présence de 75 ng d'ADN plasmidique, de 10 nmol de chacun des 4 dNTP (Promega), de 25 pmol d'amorce sens (5' AAAAGAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG 3'), de 25 pmol d'amorce anti-sens (5' TTTTGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC 3') et de tampon HF (NEB) concentré 1x. Nous avons tout d'abord réalisé 5 cycles d'amplification dans des conditions peu stringentes (comportant chacun une étape de dénaturation de 1 min. à 94°C, une étape d'hybridation des amorces de 1 min. à 32°C et une étape d'élongation de 1 min. à 72°C) suivis de 35 cycles d'amplifications dans des conditions plus stringentes (étape d'hybridation des amorces de 30 sec. à 52°C). Les produits de PCR ont été extraits à partir d'un gel d'agarose 0,8 % (p/v) réalisé en TBE 0,5x (Euromedex) avec le kit NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II (Macherey-Nagel) suivant les recommandations du fabricant.

Le produit de PCR précédemment purifié a ensuite été cloné dans le vecteur pJET1.2/blunt en utilisant le kit CloneJET<sup>™</sup> PCR Cloning Kit (Fermentas) suivant les recommandations du fabricant (Figure 36). Afin d'augmenter le nombre de clones, la ligation a été réalisée à température ambiante durant 20 min. Des bactéries chimio-compétentes DH5 (dont le génotype est : F'phi80*dlacZ* delta(*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17* (rk-, m k+) *phoA supE44 lambda-thi-1 gyrA96 relA1/F' proAB+ lacIqZdeltaM15 Tn10(tetr)*) ont ensuite été transformées par choc thermique (10 min. à 4°C, 45 sec. à 42°C, 10 min. à 4°C). Les bactéries transformées ont été sélectionnées sur un milieu LB Agar contenant 0,1 mg/mL d'ampicilline.

Les plasmides pJET1.2 contenant un insert ont été séquencés afin de déterminer l'orientation de l'insert. En effet, le vecteur utilisé contenant un promoteur T7, nous souhaitons que la séquence codante de la GFP soit insérée de sorte à pouvoir transcrire par l'ARN polymérase T7 un ARNm codant la GFP (Figure 36). L'amorce de PCR anti-sens possédant un site de restriction GGATCC reconnu par l'enzyme de restriction BamHI, le vecteur peut être linéarisé par cette enzyme afin d'arrêter la transcription immédiatement après la séquence codante de la GFP. Il existe cependant 51 nucléotides entre la fin de la

séquence du promoteur T7 et le début de la séquence codante de la GFP. En conséquence, ce vecteur a été appelé pJET1.2(51)GFP. Soulignons que l'amorce de PCR sens utilisée possédait un site de restriction GAATTC reconnu par l'enzyme de restriction EcoRI, ce qui permet d'isoler la séquence codante de la GFP en digérant le vecteur pJET1.2(51)GFP par les enzymes de restriction BamHI et EcoRI (Figure 36).

Afin de transcrire un ARNm ne contenant que la séquence codante de la GFP, nous avons délété les 51 nucléotides localisés entre la fin de la séquence du promoteur T7 et le début de la séquence codante de la GFP. Le plasmide ainsi généré a été appelé pJET1.2.GFP. Le site de restriction EcoRI est éliminé lors de cette mutagenèse. La délétion a été réalisée par mutagenèse dirigée par PCR comme décrit précédemment (voir § 1.3.1., Tableau 8, condition E) en réalisant 5 cycles d'amplification dans des conditions peu stringentes puis 35 cycles dans des conditions plus stringentes (voir § 1.3.1.) et utilisant les amorces suivantes :

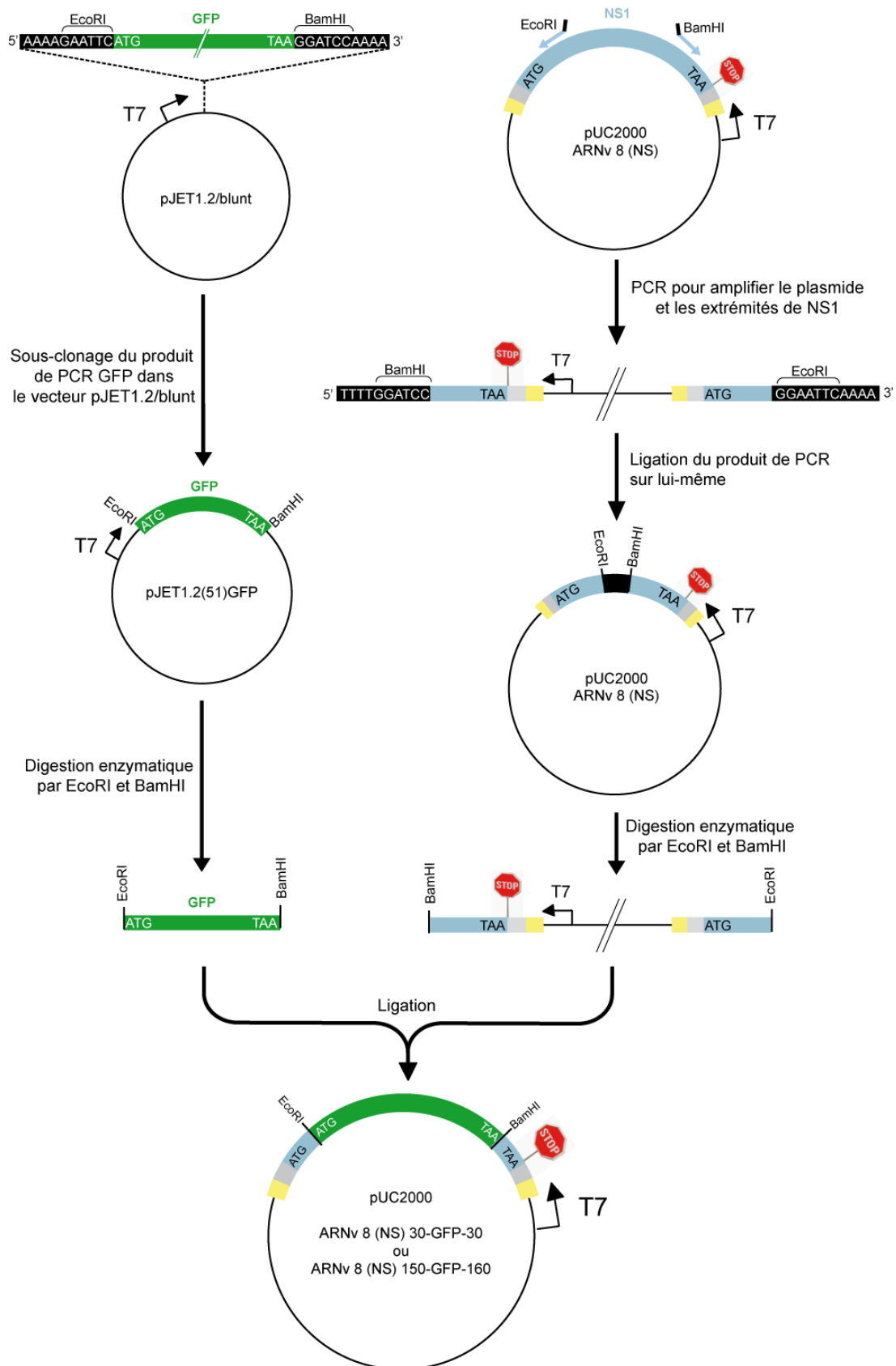
Amorce sens : 5' CGACTCACTATAGGGATGGTGAGCAAGGGC 3'

Amorce anti-sens : 5' GCCCTTGCTCACCATCCCTATAGTGAGTCG 3'

### 1.3.3.2. Remplacement de la majeure partie de la séquence codante de l'ARNv 8 (NS) par la séquence codante de la GFP

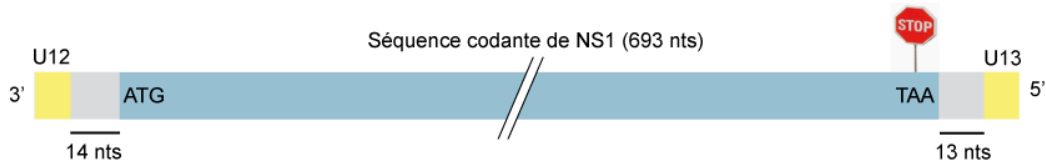
Nous avons remplacé la majeure partie de la séquence codante de l'ARNv 8 (NS) clonée dans le vecteur pUC2000 par la séquence codante de la GFP. Deux constructions distinctes ont été réalisées (Figure 37). La séquence codante de la GFP (y compris le codon stop) a tout d'abord été insérée après les 30 premiers nucléotides de la séquence codante de la protéine NS1 et avant les 30 derniers nucléotides de cette séquence codante, afin de permettre la production d'un ARNv mutant qui sera appelé ARNv 8 (NS) 30-GFP-30 (Figure 37B). Dans une seconde construction contenant la séquence de la GFP, les 150 nucléotides en 5' de la région codante de NS1 et les 160 nucléotides en 3' ont été conservés, afin de permettre la production d'un ARNv 8 (NS) 150-GFP-160 (Figure 37C). Cette dernière construction est similaire à celle utilisée par Fujii *et al.* (75) pour identifier les signaux contrôlant spécifiquement l'incorporation de l'ARNv 8 (NS) de la souche A/WSN/33 (H1N1).





**Figure 36 :** Description de la stratégie utilisée pour sous-cloner la séquence codante de la GFP et pour remplacer la majeure partie de la séquence codante de l'ARNv 8 (NS) par la séquence codante de la GFP.  
 Se référer au texte pour les explications. Le schéma n'a pas été réalisé à l'échelle.

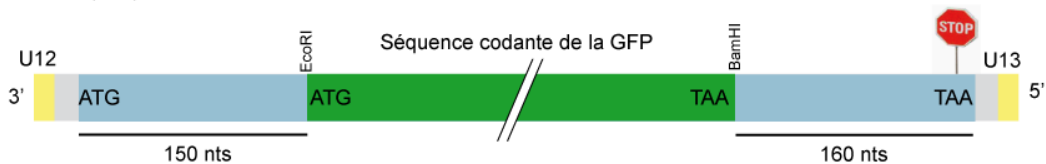
**A. ARNv 8 (NS) :**



**B. ARNv 8 (NS) 30-GFP-30 :**



**C. ARNv 8 (NS) 150-GFP-160 :**



**Figure 37 :** Représentation schématique de différents ARNv 8 (NS) mutants.

Se référer au texte pour les explications. Le schéma n'a pas été réalisé à l'échelle.

La séquence codante de la GFP a été obtenue par digestion enzymatique du vecteur pJET1.2.(51)GFP avec les enzymes de restriction EcoRI et BamHI (Figure 36). Cette digestion a été réalisée en incubant le plasmide à 37°C durant 2 heures, en présence de 2 U d'EcoRI/ $\mu\text{g}$  d'ADN, de 4 U de BamHI/ $\mu\text{g}$  d'ADN et de tampon Tango (Fermentas) à une concentration finale 2x. La séquence codante de la GFP a ensuite été purifiée sur gel d'agarose 0,8 % (p/v) en TBE 0,5x (Euromedex) en utilisant le kit NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel).

L'ensemble du plasmide pUC2000 contenant l'ARNv 8 (NS), exceptée la région codante de NS1 devant être remplacée par la séquence codante de la GFP, a été amplifié par PCR (Figure 36) en utilisant les amorces suivantes :

- Construction de l'ARNv 8 (NS) 30-GFP-30 :

Amorce sens : 5' TTTT**GGATCC**CATAAAGACTTTCTCTTTTCAGCTT 3'

Amorce anti-sens : 5' TTTT**GAATTC**CCTGAAACGAGGTTATCGTGTTGGA 3'

- Construction de l'ARNv 8 (NS) 150-GFP-160 :

Amorce sens : 5' GCCC**GAATTC**AAGTGTGCTGCCTCTTCCCTTAATG 3'

Amorce anti-sens : 5' AAA**AGGATCC**GAGTCAGAAAGTTTGAAGAGATCAG 3'

La réaction de polymérisation a été réalisée dans un volume de 50  $\mu$ L par 1 U de Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) en présence de 60 ng d'ADN plasmidique, de 10 nmol de chacun des 4 dNTP (Promega), de 25 pmol de chacune des 2 amorces et de tampon GC (NEB) concentré 1x. Quarante cycles d'amplification (comportant chacun une étape de dénaturation de 45 sec. à 94°C, une étape d'hybridation des amorces de 30 sec. à 50°C et une étape d'élongation de 3 min. à 72°C) ont été réalisés. Les produits de PCR ont été purifiés sur gel d'agarose comme décrit ci-dessus. A l'issue de la PCR, l'ADN matrice a été digéré par l'enzyme DpnI comme décrit précédemment. Afin de générer un plasmide à partir des produits de PCR, les extrémités de chaque produit de PCR ont ensuite été liguées ensemble en utilisant la T4 DNA ligase du kit CloneJET<sup>™</sup> PCR Cloning Kit (Fermentas) après avoir incubé les produits de PCR en présence de la DNA Blunting enzyme du kit, suivant les recommandations du fabricant. Afin d'augmenter le nombre de clones, la ligation a été réalisée à température ambiante durant 30 min. Des bactéries One Shot<sup>®</sup> MAX Efficiency<sup>®</sup> DH5 $\alpha$ <sup>™</sup>-T1<sup>R</sup> (Invitrogen) ont été transformées par choc thermique avec une faible quantité de ces produits de PCR, puis les bactéries transformées ont été sélectionnées sur un milieu LB Agar contenant 0,1 mg/mL d'ampicilline.

Les plasmides pUC2000 délétés ont ensuite été digérés par les enzymes de restriction EcoRI et BamHI (Figure 36) puis purifiés sur gel suivant les mêmes conditions que celles utilisées pour retirer la séquence codante de la GFP du vecteur pJET1.2.(51)GFP. Afin d'insérer la séquence codante de la GFP dans les plasmides linéarisés, nous avons incubé différents ratios de plasmide et d'insert en présence de différentes quantités de T4 DNA ligase (Fermentas ou Biolabs) durant 20 heures à 16°C (Figure 36). A l'issue de la ligation, des bactéries DH5 ont été transformées par choc thermique avec les mélanges de ligation, puis les bactéries transformées ont été sélectionnées sur un milieu LB Agar contenant 0,1 mg/mL d'ampicilline.

## 2. Techniques d'étude *in vitro* des interactions entre ARNv

### 2.1. Transcription *in vitro*

Avant de transcrire les ARN, les plasmides pUC2000 sont linéarisés avec les enzymes de restriction Ecl136II, Bsh1236I ou Eco47III (Fermentas) suivant les cas. L'ADN linéarisé est ensuite extrait par ajout de phénol-chloroforme (v/v), mis à précipiter 30 min. dans un bain carbo-éthanol après avoir ajouté 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,6 et 2,5 volumes d'éthanol absolu, lavé à l'éthanol 70 %, séché 5 min. au speedvac, et enfin remis en suspension dans de l'eau Milli-Q (Millipore). La linéarisation du plasmide est vérifiée en faisant migrer en parallèle, sur un gel d'agarose 0,8 % (p/v), 250 ng d'ADN plasmidique circulaire et 250 ng du même plasmide après linéarisation.

La transcription *in vitro* est réalisée par l'ARN polymérase du bactériophage T7 purifiée à partir de la souche surproductrice BL21/pAR1219 fournie au laboratoire, avec le protocole de purification, par F.W. Studier.

Pour chaque transcription, environ 30 µg de l'ADN plasmidique linéarisé sont incubés 3 heures à 37°C en présence de 40 mM de tampon Tris-HCl pH 8 à 37°C, 15 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de NaCl, 32 mM d'un mélange équimolaire de chacun des 4 NTP à pH 7 (Sigma-Aldrich), 0,1 % (v/v) de Triton X-100, SigmaUltra (Sigma-Aldrich), 300 U de rRnasin<sup>®</sup> Rnase inhibitor (Promega), 2 mM de Spermidine for molecular biology, minimum 98% GC (Sigma-Aldrich), 10 mM de DL-Dithiothreitol for molecular biology, minimum 99% titration (Sigma-Aldrich), 15 µg de BSA, Fraction V, minimum 96% (Sigma-Aldrich), 0,5 µg de pyrophosphatase inorganique de levure (Roche), et 5 µL de l'ARN polymérase du phage T7 diluée au 1/10<sup>e</sup>. Environ 1 heure 30 après le début de la transcription, 3 µL d'ARN polymérase sont ajoutés.

La transcription est suivie d'un traitement à la DNase I réalisé ainsi : cent unités de Dnase I recombinante, Rnase-free (Roche) sont ajoutés au mélange de transcription en présence du tampon de l'enzyme concentré 1x, puis l'échantillon est incubé 1 heure à 37°C. L'ARN est ensuite extrait au phénol-chloroforme (v/v). Les ARN sont purifiés par FPLC (Pharmacia Fine Chemicals) sur une colonne TSK G2000SW (Tosoh Bioscience) dans un tampon contenant 200 mM d'acétate de sodium (pH 6,5) et 1 % de méthanol (v/v). Les transcrits sont précipités à l'éthanol selon le même protocole que celui décrit précédemment pour précipiter les ADN plasmidiques linéarisés, lavés deux fois à l'éthanol 70 % (v/v),

séchés au speedvac sans chauffage et remis en suspension dans de l'eau Milli-Q (Millipore). La pureté et l'intégrité des ARN sont contrôlés sur gel d'acrylamide 6 % en conditions dénaturantes.

## **2.2. Expériences de retard sur gel**

### **2.2.1. Expériences de retard sur gel après cotranscription des ARNv 2 à 2**

Des expériences de retard sur gel après cotranscription des ARNv 2 à 2 ont été réalisées afin d'étudier, d'une part les interactions entre les ARNv de la souche Moscou, sauvages ou mutés, et d'autre part, les interactions entre les ARNv de la souche Moscou et ceux de la souche England.

Les plasmides pUC2000 sont tout d'abord linéarisés par les enzymes de restriction Ecl136II, Bsh1236I ou Eco47III (Fermentas) comme décrit précédemment, puis 200 ng de chacun des 2 plasmides linéarisés sont mélangés. La transcription est réalisée dans un volume de 10  $\mu$ L, par 0,167  $\mu$ L de l'ARN polymérase du phage T7 diluée au 1/10<sup>e</sup>, en présence de 40 mM de tampon Tris-HCl pH 8 à 37°C, 15 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de NaCl, 16 mM d'un mélange équimolaire de chacun des 4 NTP à pH 7 (Sigma-Aldrich), 0,05 % (v/v) de Triton X-100, SigmaUltra (Sigma-Aldrich), 1 U de rNasin<sup>®</sup> Rnase inhibitor (Promega), 1 mM de Spermidine for molecular biology, minimum 98% GC (Sigma-Aldrich), 5 mM de DL-Dithiothreitol for molecular biology, minimum 99% titration (Sigma-Aldrich), 0,5  $\mu$ g de BSA, Fraction V, minimum 96% (Sigma-Aldrich).

Après 3 heures d'incubation à 37°C, 5  $\mu$ L de solution de dépôt (glycérol 40 % (v/v), xylène-cyanol 0,05 % (p/v), bleu de bromophénol 0,05 % (p/v)) sont ajoutés à l'échantillon avant que celui-ci ne soit déposé sur un gel d'agarose 0,8 % (p/v) contenant 0,01 % (p/v) de bromure d'éthidium. Après environ 4 heures de migration à 4°C dans un tampon TBM (Tris 50 mM, acide borique 44,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,1 mM), le gel est trans-illuminé aux UV et analysé avec un Chemidoc (Bio-Rad) et le logiciel QuantityOne. Le pourcentage d'ARNv présents sous forme d'hétérodimère est quantifié avec le logiciel ImageGauge (Fuji Film).

### 2.2.2. Expériences de retard sur gel après incubation d'ARNv purifiés

Nous avons cherché à déterminer par des expériences de retard sur gel si les ARNv de la souche England peuvent interagir 2 à 2. Les ARN utilisés ont été transcrits et purifiés comme indiqué précédemment (voir § 2.1).

Dans une expérience classique, 2 pmol de chacun des 2 ARN purifiés sont mélangées dans 8 µL d'eau Milli-Q (Millipore). Les échantillons sont ensuite dénaturés 2 min. à 90°C et refroidis rapidement 2 min. sur la glace. La dimérisation des ARNv est initiée en incubant les échantillons 30 min. à 55°C après addition d'un tampon de faible salinité concentré 5 fois (concentration finale : cacodylate de sodium 50 mM, KCl 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,1 mM, pH 7,5). Après addition de 5 µL de solution de dépôt (glycérol 40 % (v/v), xylène-cyanol 0,05 % (p/v), bleu de bromophénol 0,05 % (p/v)), les échantillons sont déposés sur un gel d'agarose 0,8 % (p/v) contenant 0,01 % (p/v) de bromure d'éthidium. Après environ 4-5 heures de migration à 4°C dans un tampon TBM (Tris 50 mM, acide borique 44,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,1 mM), le gel est trans-illuminé aux UV et analysé avec un Chemidoc (Bio-Rad) et le logiciel QuantityOne. Le pourcentage d'ARNv présents sous forme d'hétérodimère est quantifié avec le logiciel ImageGauge (Fuji Film).

Afin de caractériser l'impact de courtes régions des ARNv sur les interactions observées lors des expériences de retard sur gel, nous avons utilisé des oligodésoxynucléotides de synthèse (Thermo Fischer Scientific) complémentaires à ces régions (voir Tableau 10). Les expériences de retard sur gel sont réalisées comme décrit précédemment en ajoutant 10 pmol d'oligodésoxynucléotides au mélange des ARNv, avant la dénaturation.

Parallèlement, les oligodésoxynucléotides ont été marqués radioactivement en 5' au <sup>32</sup>P. Ce marquage est réalisé en incubant, à 37°C pendant 1 heure, 10 pmol d'oligodésoxynucléotides avec 2,5 pmol de [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]ATP à une activité spécifique de 6000 Ci/mmol et 10 U de T4 Polynucleotide Kinase (Fermentas) en présence de tampon A concentré 1x. Les oligodésoxynucléotides sont ensuite purifiés en utilisant des colonnes chromatographiques Micro Bio-Spin<sup>®</sup> 6 (Bio-Rad) suivant les recommandations du fabricant. De faibles quantités de ces oligodésoxynucléotides (10000 à 20000 cpm dosés en mode Cerenkov) ont été incubées avec les ARNv afin de contrôler l'hybridation spécifique des oligodésoxynucléotides. Après migration, le gel d'agarose est fixé pendant 10 min. dans une solution d'acide trichloroacétique 10 % (Roth), puis séché sous-vide pendant environ 1 heure

à température ambiante. Les bandes radioactives sont visualisées et quantifiées en utilisant un FLA 5000 (Fuji).

Nom	Séquence (de 5' vers 3')	Nom	Séquence (de 5' vers 3')
Oligo anti-PB2 781-810	AATGATGATGTTGATCAGAGTTTAATCATT	Oligo anti-HA 442-466	GTCCAATCATGATGCCTCATCAGGG
Oligo anti-PB2 811-840	GCTGCAAGAAACATTGTTAGGAGGGCAACG	Oligo anti-HA 613-644	CCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAAACAAAGC
Oligo anti-PB2 841-870	GTGTGAGCAGATCCACTGGCCTCACTATTG	Oligo anti-HA 645-676	TCTATCAAAAACCAACCACTACGTTCCGTT
Oligo anti-PB2 871-900	GAAATGTGCCATAGCACACAGATTGGTGG	Oligo anti-HA 646-675	CTATCAAAAACCAACCACTACGTTCCGFT
Oligo anti-PB2 901-930	ATAAGAATGGTGGACATTCTTAGACAGAAC	Oligo anti-HA 677-708	GGAACATCAACACTGAACAGAGATCAGTCCC
Oligo anti-PB2 931-960	CCAACAGAAAGAGCAAGCTGTGGATATATGC	Oligo anti-HA 709-740	AGAAATAGCCACTAGGCCAAAGTAAATGGGC
Oligo anti-PB2 961-990	AAGGCAGCACTAGGTTTAAAGATCAGCTCA	Oligo anti-HA 741-772	AAAGTGGAGAATGGAGTTCTTCTGGACAATT
Oligo anti-PB2 991-1020	TCCTCAGCTTTGGAGGTTCACTTTCAA	Oligo anti-HA 773-804	TTGAAGCCGAATGATGCCATCAATTTGAGAG
Oligo anti-PB2 1021-1050	AGGACGAGTGGGTCATCTGTCAAAGAAAGAA	Oligo anti-HA 805-836	TGATGAAATTTTATGTCTCCAGAATATGCAT
Oligo anti-PB2 1051-1080	GAGGAAATGCTTACAGGCAACCTCCAAACA	Oligo anti-HA 837-867	ACAAAATTGTCAAGAAAGGGGATTTCAGCAAT
Oligo anti-PB2 1081-1110	TTGAAGATAAGAGTACATGAAGGATACGAG	Oligo anti-NP 1163-1192	CAATGGACTCCAGTACTCTTGAAGTGAAGAA
Oligo anti-PB2 1111-1140	GAATTACAATGGTTGGACGAAGAGCAACA	Oligo anti-NP 1193-1222	GCAGATATGGGCTATAAGGACCAGGAGTG
Oligo anti-PB2 1141-1170	GCCATATTAAGGAAAGCAACAGAAAGGCTT	Oligo anti-NP 1223-1252	GAGGAAACACCAGCCAACAGAGAGCATCTG
Oligo anti-PB1 284-309	GTGTGTTGGAAGCAATGGCTTTCCTT	Oligo anti-NP 1253-1282	CAGGGCAAAATCAGTGTACAACCTACTTTCT
Oligo anti-PB1 1618-1639	AACAATATGATAAACAATGACC	Oligo anti-NP 1283-1312	CGGTGAGAGGAATCTTCTTTGAAAGAG
Oligo anti-PB1 1637-1661	ACCTTGACCCAGCAACAGCTCAGAT	Oligo anti-NP 1313-1342	CGACCATCATGGCTGCATTACAGGGAACA
Oligo anti-PB1 1679-1706	TCAAAGACTACAGGTACACATACCGATG	Oligo anti-NP 1343-1372	CTGAAGGCAGAACATCTGATATGAGGACTG
Oligo anti-PB1 1707-1735	CCACAGGGGTGATACACAAATCAACGA	Oligo anti-NP 1373-1402	AAATCATAAGAATGATGGAGAATGCCAAC
Oligo anti-PB1 1736-1764	GGAGATCATTGAGCTGAAGAGCTGTGG	Oligo anti-NP 1403-1432	CAGAAGATGTGCTTTCCAGGGGCGGGGAG
Oligo anti-PB1 1765-1793	GAGCAGACCCGTTGGAAGGCAGGACTGTT	Oligo anti-NP 1433-1462	TCTTCGAGCTCTCGACGAAAGGCCAACGA
Oligo anti-PB1 1775-1799	GTTCGAAGGCAGGACTGTTGGTTTC	Oligo anti-NP 1463-1492	ACCCGATCGTGCTTCTTTGACATGAGTA
Oligo anti-PB1 1794-1822	GGTTTCAGATGGAGGACCAACCTATACA	Oligo anti-NP 1493-1522	ATGAAGGATCTTATTTCTTCGGAGACAATG
Oligo anti-PB1 1823-1851	ATATCCGGAATCTCCACATCCAGAGGTA	Oligo anti-NP 1523-1552	CAGAGGAGTATGACAAATTAAGAAAAATAC
Oligo anti-PB1 1852-1880	TGCTTGAAGTGGAACTAATGGATGAAGA	Oligo anti-M 514-544	ACAAATGGTGACTCCACCAACCCACTAATC
Oligo anti-PB1 1881-1909	CTACCAGGGCAGGCTGTGTAATCCTCTGA	Oligo anti-M 545-574	AGACATGAAAACAGAATGGTGTGCCAGC
Oligo anti-PB1 1910-1938	ACCCGTTTGTAGTCATAAGGAAATTGAG	Oligo anti-M 575-604	ACTACGGCTAAGGCTATGGAGCAGATGGCT
Oligo anti-PB1 1939-1968	TCCGTAACAATGCTGTGGTAATGCCAGCT	Oligo anti-M 605-634	GGTCCGAGTGAGCAGGCAGCGGAGGCCATG
Oligo anti-PB1 1969-1998	CATGGCCCGCCAAGAGCATGGAATATGAT	Oligo anti-M 635-664	GAGGTGTAGTCAAGGCTAGGCAGATGGTG
Oligo anti-PB1 1999-2028	GCTGTTGCGACTACACACTCATGGATCCCT	Oligo anti-M 665-694	CAGGCAATGAGGACAATTGGGACTCATCCT
Oligo anti-PB1 2029-2058	AAGAGGAATCGTTCCATTCTCAACACCAGC	Oligo anti-M 695-724	AGTTCAGTGCCTGCTGAAAGATGATCTT
Oligo anti-PB1 2059-2088	CAAAGGGGAATCCTTGAGGATGAGCAGATG	Oligo anti-NS 257-285	CAAAATAGCCATTGCTTCCAGTCTGCTC
Oligo anti-PB1 2089-2118	TACCAGAAAGTGTGCAATCTATTGAGAAA	Oligo anti-NS 286-315	CTCGGTATATCACTGATATGAGCATAGAGG
Oligo anti-PB1 2119-2148	TTCTTCTAGTAGTTTATACAGGAGGCCA	Oligo anti-NS 316-345	AGATAAGCCGAGAATGGTACATGCTGATGC
Oligo anti-PB1 2149-2178	GTTGGAATTTCCAGCATGGTGGAGCCATG	Oligo anti-NS 346-375	CTAGGCAGAAAATAACTGGAGGCCTCATGG
Oligo anti-PB1 2179-2208	GTGTCCAGGCCCGAATTGACGCACGAATT	Oligo anti-NS 357-381	ATAACTGGAGGCCTCATGGTGAATA
Oligo anti-PB1 2209-2238	GACTTCGAGTGTGGAAGGATTAAGAAAGAA	Oligo anti-NS 376-405	TGAAAATGACCAAGCCATAATGGATAAGA
Oligo anti-PA 385-405	GAGTGACACGGAGGGAAGTT	Oligo anti-NS 406-434	GAATTATCCTTAAAGCGAATTTCTCAGTC
Oligo anti-PA 467-487	CTCATTCACTGGGAGGAAA	Oligo anti-NS 435-466	CTATTGATCAACTAGAGACATTAGTCTCT
Oligo anti-PA 542-563	CCAGGCTGTTCAACATAAGGCA	Oligo anti-NS 465-494	CTGAGGGCATTACAGAAGATGGTGTCTATT
Oligo anti-PA 1143-1172	TATGGCACCCGAGAAAGTAGACTTTGAGGA	Oligo anti-NS 495-524	GTGGTGAAATATCTCCATTCCCTCCATG
Oligo anti-PA 1339-1359	CAAGTATGAGAAGGAACTAC	Oligo anti-NS 525-554	CCAGGACATTCTACAGAGGATGTCAAAAAT
Oligo anti-HA 325-354	CAACCTGTCAATGGCTCTGCTACCCTGG	Oligo anti-NS 654-676	GGGGACCTCCACTCCCTCCAAA

**Tableau 10 :** Séquences des oligonucléotides antisens utilisés pour caractériser les interactions entre les ARNv de la souche England.

### **3. Techniques de production et de caractérisation de virus**

#### **3.1. Culture cellulaire**

Deux lignées cellulaires ont été utilisées dans ce travail : d'une part les cellules 293T/17 (*Human Embryonic Kidney 293T* ; ATCC® CRL-11268™) et d'autre part les cellules MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney* ; ATCC® CRL-2936™).

Les cellules 293T/17 sont cultivées en flasque T75 dans du milieu DMEM contenant 1 g/L de glucose (Lonza) supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal, 2 mM de L-Glutamine dans 0,85 % de NaCl (Lonza), 100 U/mL de pénicilline (Lonza) et 100 U/mL de streptomycine (Lonza). Elles sont incubées à 37°C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>. Le passage des cellules 293T/17 est réalisé tous les quatre jours. Après avoir lavé le tapis cellulaire avec du PBS, les cellules sont remises en suspension dans du milieu de culture et comptées à l'aide d'une cellule de Malassez. Une nouvelle flasque T75 est ensuiteensemencée avec 2,5 millions de cellules dans 30 mL de milieu. Afin de disposer de cellules 293T/17 qui puissent être transfectées, des boîtes de Pétri BD BioCoat™ Collagène I de 60 mm de diamètre (BD Biosciences, surface de 21,3 cm<sup>2</sup>) sontensemencées avec 0,8 million de cellules dans 3 mL de milieu, 24 heures avant transfection.

Les cellules MDCK sont quant à elles cultivées en flasque T175 dans du milieu UltraMDCK sans sérum (Lonza) supplémenté avec 2 mM de L-Glutamine dans 0,85 % de NaCl (Lonza), 100 U/mL de pénicilline (Lonza) et 100 U/mL de streptomycine (Lonza). Elles sont incubées à 37°C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>. Le passage des cellules MDCK est réalisé tous les quatre jours. Les cellules sont lavées deux fois avec du HBSS (*Hanks Balanced Salt Solution*) sans rouge de phénol, ni calcium, ni magnésium (Lonza), puis incubées 2 heures à 37°C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub> après avoir ajouté 50 mL de HBSS dans la flasque. La solution de HBSS est ensuite remplacée par 3 à 5 mL d'une solution contenant 0,025 % (v/v) de trypsine dans du HBSS (Lonza) et 0,0198 % (v/v) de versene (Lonza), avant d'incuber les cellules durant 10 min. à 37°C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>. La dissociation des cellules du support est achevée mécaniquement à la pipette. Après numération des cellules, une nouvelle flasque T175 estensemencée avec 5 millions de cellules dans 100 mL de milieu. Les cellules MDCK peuvent également servir àensemencer des plaques 6, 12, 24, 48 ou 96 puits qui seront utilisées afin d'amplifier ou de caractériser des virus. Dans ce cas, chaque plaque estensemencée avec 1,2 million de cellules dans 24 mL de milieu.



## **3.2. Production *in vitro* d'Influenzavirus A**

La technique de production de virus à partir de plasmides permettant l'expression des ARNv et des protéines virales est appelée « génétique inverse ». Il existe de nombreuses variantes (176) de cette technique que nous ne détaillerons pas ici.

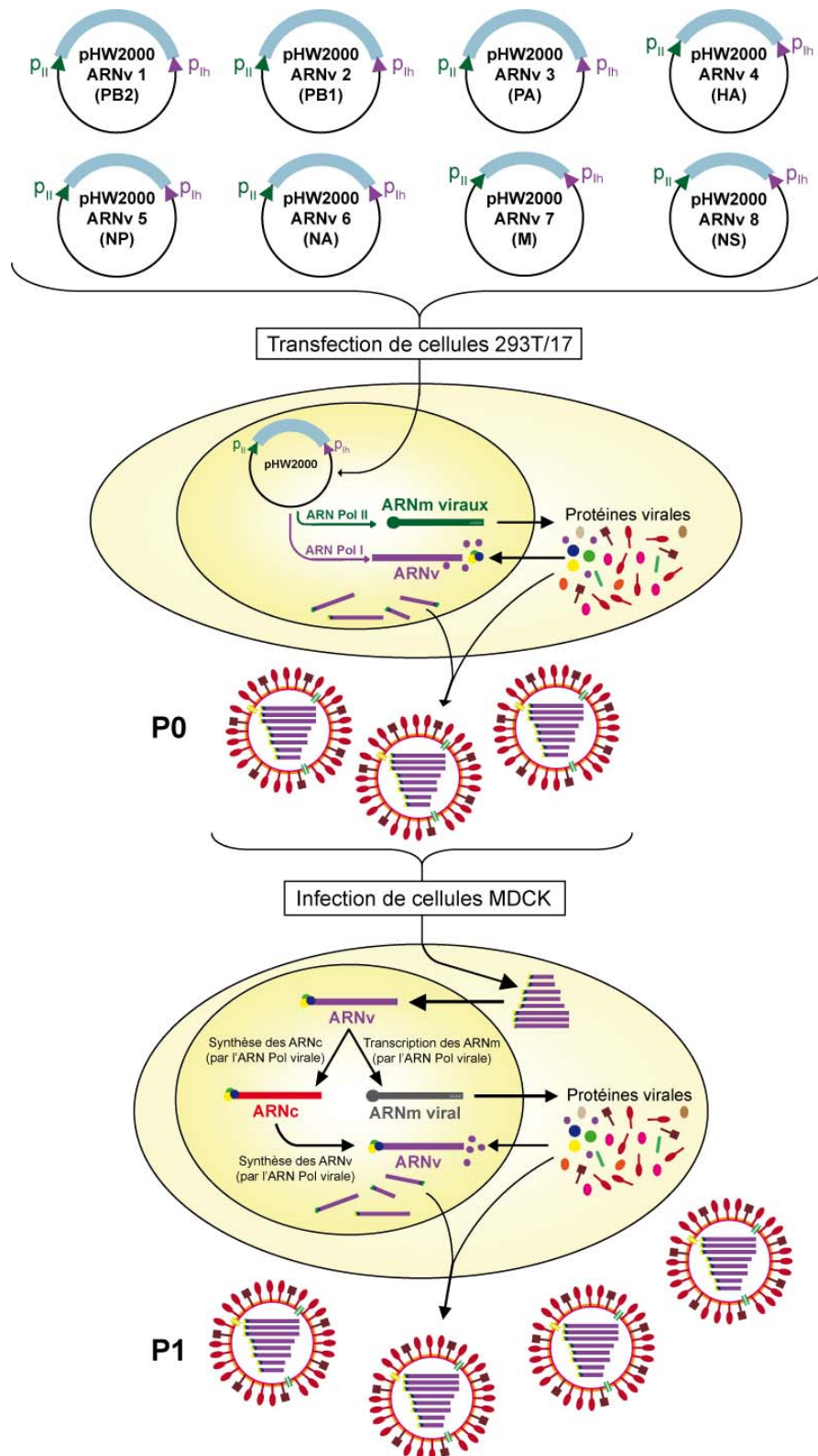
Dans ce travail, afin de générer des virus influenza A sauvages ou mutés, nous avons transfecté les cellules avec 8 plasmides pHW2000 différents (Figure 38), chaque plasmide possédant la séquence d'un des 8 ARNv du virus, sauvage ou mutée, flanquée des promoteurs PolII et PolIII (Figure 34).

Dans les expériences dites de « compétition », les cellules ont été transfectées avec les 8 plasmides pHW2000 dans lesquels les séquences sauvages de chacun des 8 ARNv sont clonées, ainsi qu'avec un 9<sup>ème</sup> plasmide dans lequel la séquence mutée d'un des ARNv est clonée. Cette expérience vise à déterminer si l'un des deux ARNv, sauvage ou muté, est majoritairement incorporé dans les virions. Une alternative à cette technique dite de génétique inverse compétitive est la méthode dite de « transfection-infection ».

### **3.2.1. Transfection cellulaire**

Le plus souvent, des cellules 293T/17, cultivées en boîtes de Pétri BD BioCoat<sup>TM</sup> Collagène I de 60 mm de diamètre (BD Biosciences), sont transfectées lorsqu'elles sont confluentes à 40-60 %. Un microgramme de chacun des plasmides pHW2000 est mélangé stérilement avec l'agent de transfection TransIT<sup>®</sup>-LT1 transfection reagent (Mirus Bio) à raison de 2 µL d'agent de transfection par µg d'ADN, puis incubé 45 min. à température ambiante dans 250 µL de milieu OptiMEM. Après ajout de 1 mL de milieu OptiMEM au mélange de transfection, celui-ci est déposé goutte à goutte sur le tapis cellulaire préalablement lavé avec du milieu OptiMEM. Les cellules sont alors incubées durant 6 heures à 37°C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub> (conditions habituelles de culture). A l'issue de cette incubation, les cellules sont lavées avec 1 mL de milieu OptiMEM contenant 0,3 % de BSA (p/v) (Sigma-Aldrich) avant d'ajouter 1 mL de ce même milieu. Après 24 heures d'incubation à 37°C, 1 mL de milieu OptiMEM contenant 0,3 % de BSA (p/v) ainsi que 1 µg de trypsine acétylée issue de pancréas bovin dans du PBS 1 X (Sigma-Aldrich) sont ajoutés dans la boîte de Pétri. La trypsine permet la maturation de la protéine virale HA. Les virions produits, présents dans le surnageant de culture, sont récupérés 48 à 72 heures après transfection. Les

virions présents dans les surnageants de culture sont séparés des cellules par 5 min. de centrifugation à 4700 g à 4°C. Cette fraction de virus est appelée P0.



**Figure 38 :** Description du système de génétique inverse utilisé. Se référer au texte pour les explications. Le schéma n'a pas été réalisé à l'échelle.

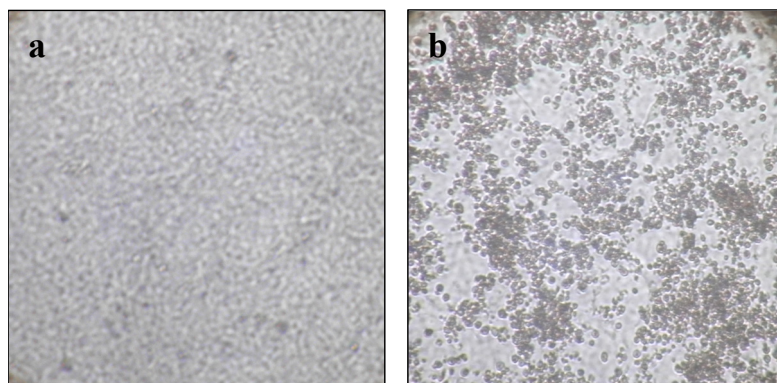
Dans certains cas, les cellules sont transfectées en utilisant du SuperFect<sup>®</sup> transfection reagent (Qiagen). Dans ce cas, 50 µL d'agent de transfection et 280 µL de milieu OptiMEM ont été ajoutés au mélange de plasmides. L'ensemble a ensuite été homogénéisé par vortex, incubé 10 min. à température ambiante, puis dilué dans 2,5 mL de milieu. Ce mélange de transfection a ensuite été déposé au contact des cellules 293T/17 préalablement lavées. Après une incubation de 3 heures à 37°C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>, le milieu de transfection a été enlevé et remplacé par 3 mL de milieu OptiMEM contenant 0,3 % de BSA (p/v) après avoir réalisé un lavage des cellules avec ce même milieu. Après 24 heures d'incubation à 37°C, 3 µg de trypsine acétylée issue de pancréas bovin dans du PBS 1 X (Sigma-Aldrich) sont ajoutés dans la boîte de Pétri. Les virions produits sont récupérés 48 à 72 heures après transfection comme décrit précédemment.

Nous avons aussi été amenés à produire des particules virales par la méthode dite de « transfection-infection » en utilisant le Amaxa<sup>™</sup> Cell Line Nucleofector<sup>®</sup> Kit V (Lonza). Un million de cellules 293T/17 sont tout d'abord remises en suspension dans 100 µL du milieu de transfection fourni dans le kit, puis 500 ng du plasmide de génétique inverse à transfecter sont ajoutés. Les cellules sont transfectées par un choc électrique réalisé, dans une cuve fournie dans le kit, avec l'appareil Nucleofector<sup>®</sup> (Lonza) (programme Q-001). Les cellules sont ensuite infectées par un virus donné à une MOI de 2. Concrètement, un certain volume de virus est ajouté au milieu de transfection de sorte à être à une MOI de 2, puis du milieu DMEM contenant 1 g/L de glucose (Lonza) supplémenté avec 20 % (v/v) de sérum de veau fœtal, 2 mM de L-Glutamine dans 0,85 % de NaCl (Lonza), 100 U/mL de pénicilline (Lonza) et 100 U/mL de streptomycine (Lonza) est ajouté de façon à ce que les cellules soient en suspension dans un volume final de 1,5 mL. Cette suspension cellulaire est ensuite incubée dans le puits d'une plaque 24 puits durant 1 heure 30 à 37°C sous agitation. A l'issue de cette incubation, les cellules sont séparées du milieu de culture par 4 min. de centrifugation à environ 800 g et remises en suspension dans du milieu DMEM supplémenté avec 0,5 µg/mL de trypsine acétylée issue de pancréas bovin dans du PBS 1 X (Sigma-Aldrich) avant d'être mises en culture sur boîtes de Pétri BD BioCoat<sup>™</sup> Collagène I de 60 mm de diamètre (BD Biosciences). Le surnageant contenant les particules virales est récupéré 24 heures après l'infection. Après avoir éliminé les débris cellulaires par 4 min. de centrifugation à environ 1500 g, les particules virales sont isolées par plages de lyses pour pouvoir ensuite étudier l'incorporation dans les particules de l'ARNv codé par le plasmide transfecté (voir § 3.5.).

### 3.2.2. Amplification des virus produits en génétique inverse

Afin d'amplifier les virus produits en génétique inverse, les fractions P0 sont utilisées pour infecter des cellules MDCK confluentes après culture en plaques 48 puits (BD Biosciences, surface de 0,75 cm<sup>2</sup> par puits) dans du milieu UltraMDCK (Lonza). Cette amplification permet en outre de montrer la présence de virions infectieux dans la fraction P0.

Les cellules sont d'abord lavées avec du milieu EMEM (*Minimum Essential Medium with Earle's BSS*, Lonza) contenant 2 mM de L-Glutamine dans 0,85 % de NaCl (Lonza), 100 U/mL de pénicilline (Lonza), 100 U/mL de streptomycine (Lonza) et 1 µg/mL de trypsine acétylée issue de pancréas bovin dans du PBS 1 X (Sigma-Aldrich). C'est ce milieu qui sera désormais utilisé pour cultiver les cellules MDCK. Après ajout de 150 µL de fraction P0 généralement diluée au demi dans du milieu de culture, les cellules sont incubées 1 à 2 heures à 37°C sous agitation douce. Après ajout de 350 µL de milieu de culture, les cellules sont incubées à 37°C. La multiplication virale entraîne, le plus souvent aux alentours de 72 heures post-infection, l'apparition d'effets cytopathogènes (ECP) : les cellules s'arrondissent et se détachent du tapis cellulaire sous-jacent (Figure 39). Après apparition des ECP, le surnageant de culture contenant les virions, appelé P1, peut être prélevé. Selon les cas, cette fraction P1 peut être congelée à -80°C ou être diluée (par exemple au 1/100 ou au 1/1000) dans 150 µL de milieu de culture pour un 2<sup>nd</sup> cycle d'infection de cellules MDCK en plaque 48 puits.



**Figure 39 :** Les effets cytopathogènes (ECP).

Clichés de microscopie optique de cellules MDCK non infectées (a) et de cellules présentant des ECP 72 heures après infection (b). Grossissement 100 x.

### 3.2.3. Production virale

Afin de constituer un stock de virus, des cellules MDCK cultivées en flasques sont infectées avec une fraction virale diluée (généralement d'un facteur  $10^4$ ) comme décrit précédemment (voir § 3.2.2.) en adaptant les volumes de milieu au volume de la flasque. Après l'apparition d'ECP, généralement 48 heures après l'infection, les virions présents dans le surnageant de culture sont séparés des cellules par 5 min. de centrifugation à 4700 g à 4°C. La fraction contenant les virions est ensuite aliquotée et stockée à -80°C.

### 3.3. Détermination du titre viral en DICT<sub>50</sub>/mL

Le titre infectieux en DICT<sub>50</sub> (ou *TCID<sub>50</sub>*, *Tissue Culture Infective Dose 50*) d'un virus est calculé par une méthode statistique et correspond à la quantité de ce virus nécessaire pour induire un ECP dans 50 % des cellules inoculées.

La détermination du titre en DICT<sub>50</sub>/mL se fait en plaque 96 puits sur des cellules MCDK à confluence. Les cellules sont tout d'abord lavées avec 100 µL de milieu d'infection. Elles sont ensuite infectées avec 200 µL de milieu d'infection contenant 50 µL d'une dilution de virus (dilutions de  $10^{-1}$  à  $10^{-9}$ ). Au moins 4 puits doivent être infectés pour une dilution donnée. Les cellules sont incubées 3 jours à 37°C (5 % de CO<sub>2</sub>) avant de rechercher la présence ou non d'ECP.

Pour chaque dilution, le pourcentage de puits avec ECP est calculé. Le titre infectieux (en DICT<sub>50</sub>/mL) est calculé selon la méthode statistique suivante :

$$\text{Titre} = 10^{(\text{exposant de la dilution immédiatement inférieure à la dernière dilution donnant 50 \% d'ECP}) + DP + 1,3} \text{ DICT}_{50}/\text{mL}$$

$$\text{Avec DP} = \frac{(\text{valeur du pourcentage d'ECP inférieur à 50 \%} - 50)}{(\text{valeur du pourcentage d'ECP inférieur à 50 \%} - \text{valeur du pourcentage d'ECP supérieur à 50 \%})}$$

### **3.4. Cinétique de réplication des virus**

#### **3.4.1. Réalisation de la cinétique de réplication des virus**

Des cellules MDCK à confluence dans des T25 (5 à  $5,5 \cdot 10^6$  cellules) sont infectées à une MOI (*multiplicity of infection*) faible de  $10^{-3}$ , ce qui signifie qu'il y a un ratio d'un virus pour  $10^3$  cellules, soit 5000-5500 particules virales, ou bien à une MOI forte de 1, ce qui signifie qu'il y a un ratio d'un virus pour 1 cellule, soit 5 à 5,5 millions de particules virales. Les cellules, cultivées en milieu UltraMDCK, sont d'abord lavées avec du milieu EMEM contenant 2 mM de L-Glutamine dans 0,85 % de NaCl (Lonza), 100 U/mL de pénicilline (Lonza), 100 U/mL de streptomycine (Lonza) et 1  $\mu$ g/mL de trypsine acétylée issue de pancréas bovin dans du PBS 1 X (Sigma-Aldrich). L'infection est réalisée dans un volume de 1 mL de ce même milieu contenant les particules virales. Après 1 heure d'incubation à 37°C sous agitation douce, le milieu d'infection est retiré, les cellules sont lavées abondamment avec du milieu de culture, puis 11 mL de milieu sont ajoutés et les cellules sont incubées à 37°C. Des fractions aliquotes du milieu de culture, qui seront conservées à -80°C, sont prélevées à temps zéro puis à différentes heures post-infection. A chaque fois qu'une fraction aliquote est prélevée, un volume identique de milieu de culture est ajouté dans la flasque afin de conserver un volume de 11 mL.

#### **3.4.2. Analyse de la production virale au cours de la cinétique par RT-PCR quantitative en temps réel**

La quantité des ARNv 2 (PB1), 5 (NA), 7 (M), 8 (NS) a été déterminée en quantification absolue par RT-PCR quantitative en temps réel.

Les ARNv sont extraits des fractions aliquotes du surnageant de culture, prélevées au cours de la cinétique, en utilisant le kit QIAmp viral RNA minikit (Qiagen) suivant les instructions du fabricant, en insérant un traitement de 15 min. à la DNase I durant l'extraction. Ce traitement consiste à ajouter, après avoir chargé l'échantillon sur la colonne, 30 U de DNase I (Qiagen) diluées au  $1/8^{\text{ème}}$  dans du tampon RDD (Qiagen). Cette méthode d'extraction permet d'obtenir 60  $\mu$ L d'ARNv à partir de 150  $\mu$ L de surnageant de culture.

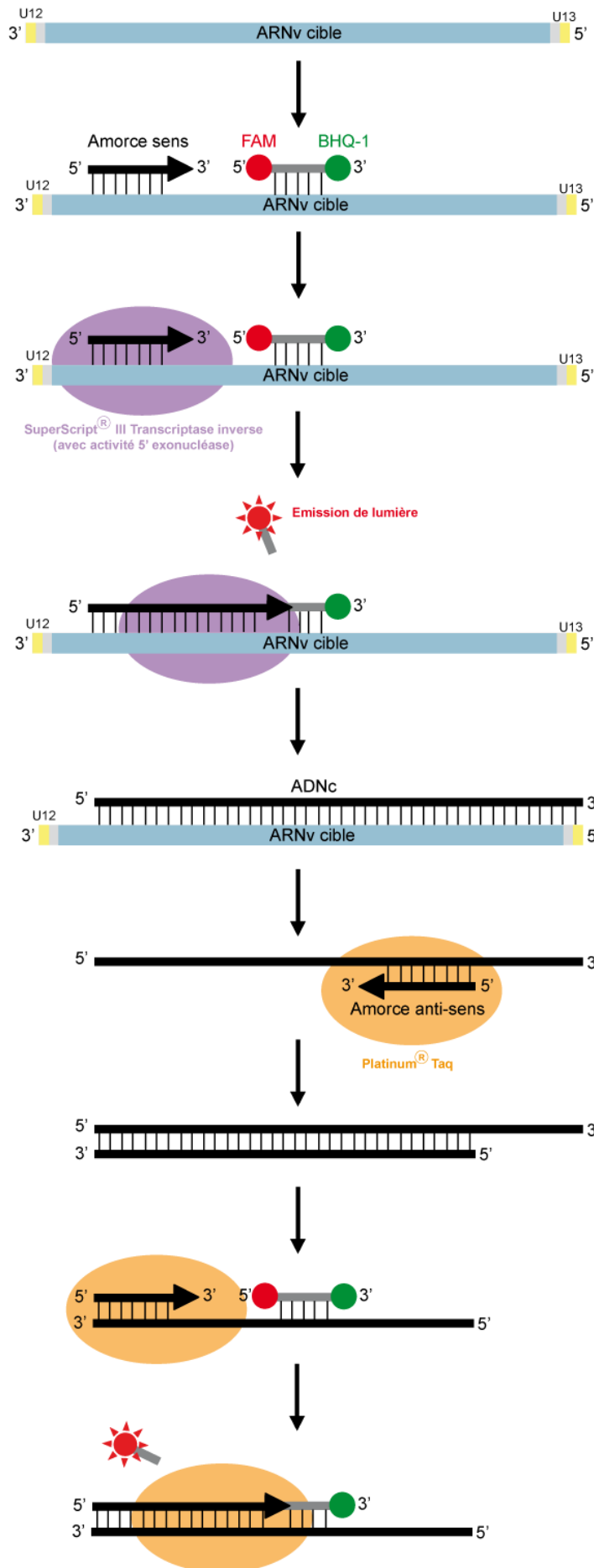
La quantification de l'ARNv M est réalisée en utilisant les amorces et la sonde décrites par Bouscambert-Duchamp *et al.* (58). Les amorces et les sondes destinées à la quantification

des 3 autres ARNv ont été conçues à l'aide du logiciel Primer Express<sup>®</sup> 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). L'ensemble des séquences des amorces et des sondes sont indiquées dans le Tableau 11.

ARNv amplifié	Séquences des amorces et de la sonde	Taille de l'amplicon
2 (PB1)	Amorce sens : GGGAAGTGGACAACAAACACAGA Amorce anti-sens : GTTATTCTCAGGTAATGGTCCATCAA Sonde : ACTGGAGCACCCCAACTCAACCCG [5']Fam [3']BHQ-1	75 nts
6 (NA)	Amorce sens : GCAGACTACAGGAATTGGTCAAAA Amorce anti-sens : GCGGAGAGCCTAATTGAATTGT Sonde : TGTCAAATCACAGGTTTCGCTCCTTCT [5']Fam [3']BHQ-1	86 nts
7 (M)	Amorce sens : CTTCTAACCGAGGTCGAAACGTA Amorce anti-sens : GGTGACAGGATTGGTCTTGTCTTTA Sonde : TCAGGCCCCCTCAAAGCCGAG [5']Fam [3']BHQ-1	155 nts
8 (NS)	Amorce sens : GATGGTGCTATTGTGGCTGAAA Amorce anti-sens : TGCATTTTGGACATCCTCTGTAGAA Sonde : ATCTCCCATTCCCTCCATGCCAGG [5']Fam [3']BHQ-1	75 nts

**Tableau 11 :** Séquences des amorces et sondes utilisées pour la RT-PCR quantitative.

Les RT-PCR quantitatives sont réalisées sur LightCycler (Roche) dans des capillaires de 20  $\mu$ L (Roche) en utilisant les réactifs du kit SuperScript<sup>®</sup> III Platinum<sup>®</sup> One-Step qRT-PCR System (Invitrogen) (Figure 40). Pour chaque réaction, 5  $\mu$ L d'échantillon d'ARNv à quantifier, pur ou dilué au demi, ou 5  $\mu$ L de l'ARNv servant à établir la gamme, transcrit et purifié *in vitro*, sont mélangés à 15  $\mu$ L de mélange réactionnel préparé de telle façon à ce que la transcription inverse et la PCR soient réalisées par 0,5  $\mu$ L du mélange commercial de SuperScript<sup>®</sup> III RT / Platinum<sup>®</sup> Taq dans un milieu contenant 0,5  $\mu$ M d'amorce sens (utilisée à la fois dans la réaction de transcription inverse et dans la réaction de PCR), 0,5  $\mu$ M d'amorce anti-sens (utilisée uniquement dans la réaction de PCR), 0,2  $\mu$ M de sonde, 0,6 mM de MgSO<sub>4</sub> et du tampon commercial concentré 1 x contenant 0,2 mM de dNTP et 3 mM de MgSO<sub>4</sub>. Le programme de RT-PCR est décrit dans le Tableau 12. La fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle d'amplification (Figure 40).



**Figure 40 :** Description des synthèses d'acides nucléiques durant la RT-PCR quantitative.

Se référer au texte pour les explications. Le schéma n'a pas été réalisé à l'échelle.



	Température	Temps	Nombre de cycles
Transcription inverse	45°C	15 min.	1
Dénaturation	95°C	3 min.	1
Amplification	95°C	10 sec	50
	55°C	10 sec	
	72°C	20 sec (SINGLE)	

**Tableau 12 :** Programme de RT-PCR quantitative en temps réel.

Pour chaque ARNv à quantifier, une gamme est réalisée avec  $10^6$ ,  $10^5$  et  $10^4$  copies d'ARNv synthétisés *in vitro* comme décrit précédemment (voir § 2.1). Pour chaque RT-PCR quantitative, chacun des points de la gamme est quantifié au minimum 2 fois. L'analyse des résultats s'est faite selon la méthode « fit points » et la ligne de base a été ajustée selon un mode proportionnel. Les principales caractéristiques des droites étalons des RT-PCR quantitatives sont résumées dans le Tableau 13.

ARNv	Seuil	Pente de la droite étalon	Ordonnée à l'origine	Erreur	Valeurs des Ct
2 (PB1)	0,03	-3,72±0,12	43,40±0,61	0,07±0,03	Ct <sub>1</sub> : 21,03±0,23 Ct <sub>2</sub> : 24,90±0,24 Ct <sub>3</sub> : 28,46±0,36
6 (NA)	0,03	-3,80±0,13	43,66±0,63	0,09±0,04	Ct <sub>1</sub> : 20,83±0,36 Ct <sub>2</sub> : 24,57±0,58 Ct <sub>3</sub> : 28,20±1,03
7 (M)	0,04	-3,73±0,17	43,96±0,92	0,07±0,02	Ct <sub>1</sub> : 21,55±0,26 Ct <sub>2</sub> : 25,28±0,37 Ct <sub>3</sub> : 28,79±0,74
8 (NS)	0,03	-3,94±0,10	44,64±0,58	0,07±0,02	Ct <sub>1</sub> : 21,00±0,33 Ct <sub>2</sub> : 24,70±0,64 Ct <sub>3</sub> : 29,07±0,50

**Tableau 13 :** Principales caractéristiques des droites étalons des RT-PCR quantitatives.

Pour chaque droite, les valeurs de la pente et de l'ordonnée à l'origine sont indiquées (moyenne de 8 expériences indépendantes ± écart-type). L'erreur calculée par le logiciel, donnant une indication sur la variabilité entre tubes due aux erreurs de pipetage, est également indiquée (moyenne de 8 expériences indépendantes ± écart-type). Pour chaque expérience, le coefficient de regression  $r$ , qui donne une indication sur les erreurs accumulées dans les dilutions en cascade, est égal à -1 ou -0,99. Ct<sub>1</sub>, Ct<sub>2</sub> et Ct<sub>3</sub> correspondent aux valeurs de Ct obtenues au seuil fixé pour les 3 points de la gamme (respectivement  $10^6$ ,  $10^5$  et  $10^4$  copies d'ARNv), le Ct étant le cycle auquel le signal de fluorescence dépasse le seuil fixé pour le bruit de fond (moyenne de 24 valeurs ± écart-type).

### **3.5. Analyse de la composition génétique des virus produits lors des expériences dites de « compétition »**

Les virus produits en génétique inverse peuvent être isolés (directement ou, comme dans ce travail, après un passage sur cellules MDCK) en plages de lyse afin d'être analysés individuellement. Dans ce travail, cette technique a été utilisée afin d'identifier l'ARNv qui a été incorporé lors des expériences de « compétition » entre deux ARNv.

Des cellules MDCK à confluence, cultivées en plaques 6 puits (BD Biosciences, surface de 9,6 cm<sup>2</sup> par puits) dans du milieu UltraMDCK (Lonza), sont d'abord lavées avec du milieu EMEM (*Minimum Essential Medium with Earle's BSS*, Lonza) contenant 2 mM de L-Glutamine dans 0,85 % de NaCl (Lonza), 100 U/mL de pénicilline (Lonza), 100 U/mL de streptomycine (Lonza) et 1 µg/mL de trypsine. C'est ce milieu qui sera désormais utilisé pour cultiver les cellules MDCK. Après ajout de 700 µL de fraction P0 diluée au ½ dans du milieu de culture, les cellules sont incubées 2 heures à 37°C sous agitation douce. La totalité du milieu d'infection est ensuite retiré et remplacé par 2 mL de milieu MEM (*Modified Eagle Medium*, Gibco) tiède contenant 0,55 % (p/v) d'agar Noble (Difco™) et 1 µg/mL de trypsine. Une fois le milieu solidifié, les cellules sont incubées à 37°C. Après 24 à 48 heures d'incubation, les plages de lyse obtenues sont dénombrées et piquées pour infecter à nouveau des cellules MDCK en plaque 48 puits, selon le protocole décrit précédemment.

Les ARNv sont extraits du surnageant de culture récupéré à 72 heures post-infection avec le kit Nucleospin RNA virus (Masherey-Nagel) selon les recommandations du fabricant.

Les 8 ARNv sont rétro-transcrits en ADNc grâce à une amorce s'hybridant à U12 (5' AGCAAAAGCGG 3'). Dans un premier temps, 10 µL d'ARNv et 300 ng d'oligonucléotides sont incubés 5 min. à 70°C. L'élongation est ensuite réalisée à 42°C durant 1 heure par 10 U de RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas) en présence du tampon de l'enzyme (1x) et de 20 nmol d'un mélange équimolaire de dNTP (Eurogentec) dans un volume final de 20 µL. L'ensemble est ensuite incubé à 65°C durant 5 min.

Afin de déterminer quel ARNv a été incorporé parmi les 2 ARNv mis en compétition, une PCR est réalisée sur 3 µL d'ADNc. L'ADNc est amplifié dans un volume de 50 µL par 1,25 U de GoTaq® (Promega) en présence de colorless GoTaq® Flexi Buffer (1x), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,6 mM d'un mélange équimolaire de dNTP (Eurogentec) et de 200 ng de chacune des amorces de PCR (voir Tableau 14). Après 5 min. de dénaturation à 94°C, 30 cycles d'amplification sont réalisés (1 min. de dénaturation à 94°C, 1 min. d'hybridation (pour la

température, voir le Tableau 14) et enfin 1 min. d'élongation à 72°C) et sont suivis de 5 min. d'élongation finale à 72°C.

ARNv amplifié	Amorce sens	Amorce anti-sens	Taille de l'amplicon	Température d'hybridation
2 (PB1) wt	TGTGTTGGAAGCAATGGCT	ATTGTGTTTCAGCGTCAGTGC	420 nts	60°C
2 (PB1) muté	TGTGTTAGAGGCTATGGCG	ATTGTGTTTCAGCGTCAGTGC	420 nts	60°C
8 (NS) wt	CTCAAAATAGCCATTGCTTCC	TTTCTGTTTTGGAGGGAGTG	429 nts	62°C
8 (NS) muté	CTCAAAATCGCCATAGCCTCT	TTTCTGTTTTGGAGGGAGTG	429 nts	62°C

**Tableau 14 :** Oligonucléotides utilisés pour identifier l'ARNv incorporé lors des expériences de compétitions.

Les segments 2 (PB1) et 8 (NS) dits « mutés » sont ceux qui possèdent les 4 mutations compensatoires réalisées dans le cadre de l'étude de l'interaction entre ces 2 ARNv de la souche A/Finch/England/2051/91 (H5N2).

## 4. Techniques d'imagerie

Cette étude a été complétée par l'observation de l'intérieur des particules virales en microscopie électronique à transmission et par l'analyse de la disposition relative des RNPv en tomographie. Dans la mesure où ces techniques ont été réalisées respectivement par le Centre Technologique des Microstructures (EZUS LYON 1, UCBL, Villeurbanne) et par l'équipe du Dr. Daniel Thomas (Université de Rennes I), elles ne seront décrites que très sommairement.

### 4.1. Observation en microscopie électronique à transmission de coupes de virions

Afin d'observer la distribution des RNPv à l'intérieur des particules virales, des tapis de cellules MDCK infectées sont traités avec une solution de fixation (cacodylate de sodium 0,1 M, glutaraldéhyde 2 %) à température ambiante puis lavés trois fois (cacodylate de sodium 0,2 M). Les cellules sont ensuite post-fixées dans une solution de tétra-oxyde d'osmium et colorées avec une solution aqueuse d'acétate d'uranyle. L'échantillon est ensuite progressivement déshydraté par des lavages successifs dans des solutions éthanoliques puis inclus dans de la résine epon. Après polymérisation, le bloc obtenu est détaillé en coupes ultrafines (65 nm d'épaisseur) et les coupes obtenues sont placées sur une grille de cuivre. La coloration des coupes est effectuée avec une solution de citrate de plomb à l'aide d'un

Ultrastainer (Leica). Une fois sèches, les coupes sont observées avec un microscope électronique à transmission Philips CM 120 à une puissance de 80 kV.

#### **4.2. Reconstitution de l'intérieur des virions par tomographie électronique**

Des blocs contenant des particules virales purifiées sont préparés comme précédemment. Des sections de 150 à 200 nm d'épaisseur sont colorées à l'acétate d'uranyle suivant le même protocole. Une série tiltée de projections est acquise sur un microscope électronique Technai G2 Sphera (FEI Company, Eindhoven, *The Netherlands*) à une puissance de 200 kV. Les images sont enregistrées automatiquement par un appareil photographique CCD (Megascan) à un grossissement nominal de 25000x (taille des pixels 0,46 nm) suivant un tilt de  $-60^\circ$  à  $+60^\circ$  incrémenté de  $1^\circ$ . La reconstitution en 3D est calculée en utilisant l'interface graphique eTomo (*Package IMOD tomography*). Les images issues de la série tiltée sont pré-analysées et alignées avec ou sans particules d'or. Les tomogrammes finaux sont reconstitués par rétroprojection pondérée. Chaque virion est ensuite extrait du tomogramme initial et le bruit de fond est retiré en utilisant un filtre médian. Les volumes en 3D sont visualisés, segmentés et lissés à l'aide du logiciel AMIRA (Mercury Computer Systems, Mérignac).

# **RESULTATS ET DISCUSSION**

## **1. Comparaison des réseaux d'interactions entre ARNv définis pour 2 souches et caractérisation de certaines interactions**

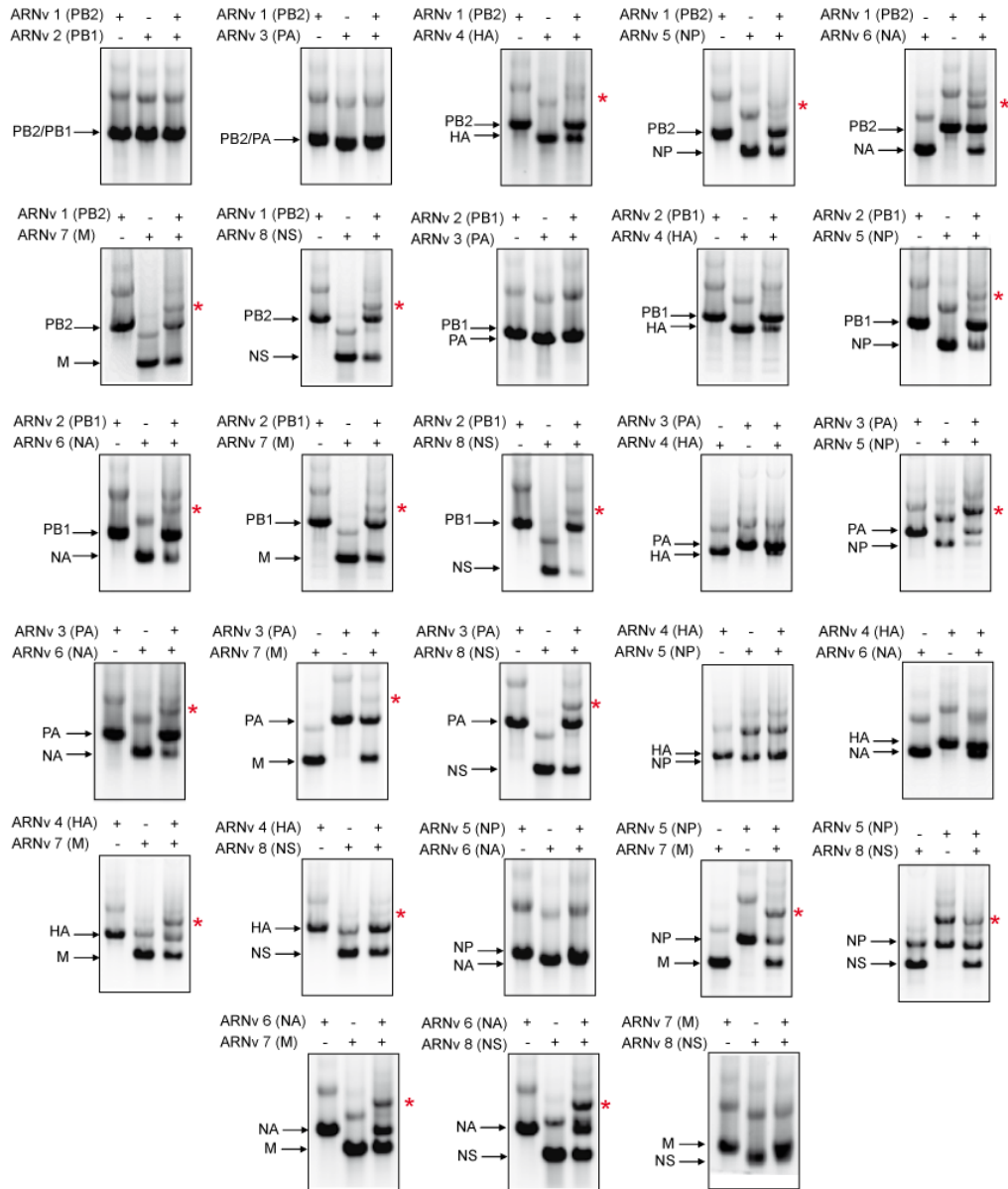
### **1.1. Réseaux d'interactions entre ARNv**

#### **1.1.1. Expériences d'EMSA suite à la co-transcription des ARNv 2 à 2**

Les ARNv de la souche A/Finch/England/2051/91 (H5N2) (abrégée England) ont été clonés, après transcription inverse et amplification par PCR, dans le vecteur pUC2000 en aval d'un promoteur T7 permettant la transcription *in vitro* des ARNv (voir la partie « Matériels et Méthodes »). Comme dans le cas de la souche A/Moscou/10/99 (H3N2) (abrégée Moscou) (73), les ARNv ont été co-transcrits deux à deux, puis une éventuelle interaction entre ces ARNv a été recherchée en les faisant migrer sur gel d'agarose en conditions natives. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 41.

Sur les 28 interactions possibles, nous avons clairement visualisé 19 interactions (voir la Figure 41), bien que la majorité d'entre elles soient de faible intensité. Les ARNv n'interagissent clairement pas pour 4 couples testés mais, pour 6 autres couples (notés « nd » sur la Figure 41B), nous n'avons pas pu déterminer sans ambiguïté si les ARNv en présence interagissent ou non. En effet, la plupart des ARNv ayant tendance à homodimériser dans les conditions expérimentales utilisées, il n'est généralement pas possible de distinguer les homodimères des hétérodimères lorsque les 2 ARNv en présence ont des tailles relativement similaires.

A



B

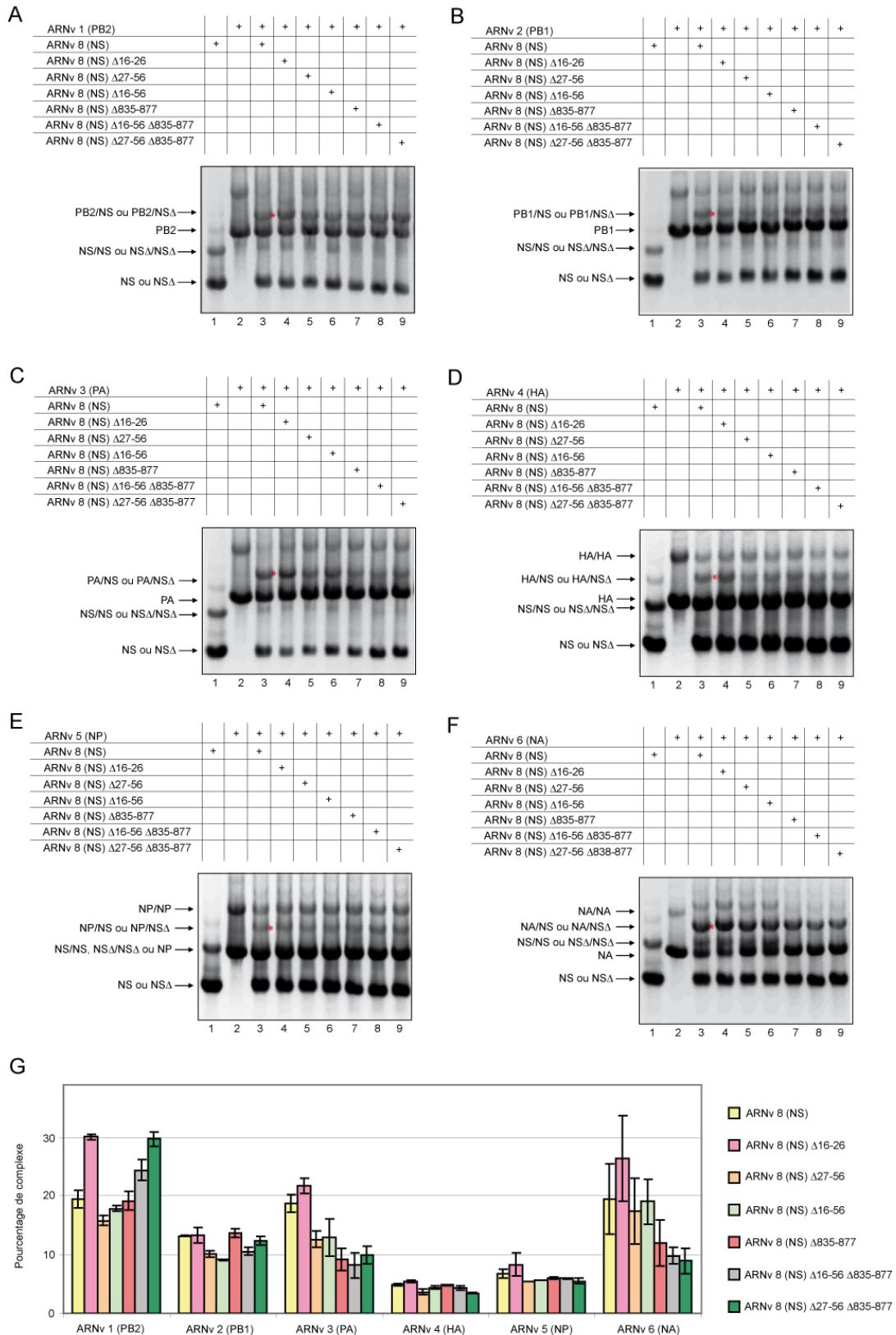
ARNv	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS
PB2		0	nd	7±1	14±1	14±1	15±1	19±1
PB1			nd	0	16±4	10±3	12±3	15±3
PA				nd	39±3	16±1	9±0	18±1
HA					nd	nd	13±2	3±2
NP						nd	46±3	9±1
NA							13±2	23±4
M								0
NS								

**Figure 41 :** Interactions *in vitro* entre les ARNv co-transcrits deux à deux

**A.** Analyse de la formation de complexes entre ARNv par EMSA. La position des ARNv présents sous forme de monomères est indiquée par des flèches à gauche des gels. Les hétérodimères sont indiqués par des astérisques rouges à droite des gels. Par soucis de clarté, les homodimères ne sont pas signalés. **B.** Quantification de la proportion de complexe (en pourcentage) par rapport à la quantité totale d'ARN par piste (moyenne de 3 expériences ± SEM). nd : non déterminé, dans le cas où il n'a pas été possible de conclure quant à l'existence d'une interaction entre les 2 ARNv en présence.

Ces résultats sont surprenants pour quatre raisons : (i) la majorité des ARNv tendent à homodimériser, au moins lorsqu'ils sont transcrits sans ARNv partenaire ; (ii) dans la majorité des cas, la proportion d'ARNv engagée dans des hétérodimères est assez faible. Le pourcentage d'ARNv sous forme hétérodimérique est même souvent plus faible que le pourcentage d'ARNv impliqués dans des interactions homodimériques mises en évidence lorsque les ARNv sont transcrits sans ARNv partenaire ; (iii) les ARNv 5 (NP) et 7 (M), tout comme les ARNv 3 (PA) et 8 (NS), n'interagissent pratiquement pas lorsqu'ils sont incubés ensemble à 37°C immédiatement après avoir été transcrits séparément dans les mêmes conditions que précédemment (résultats non montrés) ; (iv) enfin, la plupart des ARNv interagissent entre eux. En conséquence, nous pensons que les conditions expérimentales utilisées précédemment au laboratoire pour mettre en évidence des interactions entre les ARNv de la souche Moscou (73), ne sont pas adaptées dans notre cas.

Afin de tester la spécificité des interactions entre ARNv, nous avons construit différents ARNv mutants. Fujii *et al.* a montré que les régions 16-56 et 834-880 de l'ARNv 8 (NS) de la souche WSN sont importantes pour l'incorporation d'un génome complet (75). Parmi ces régions, la région 16-26 correspondant à la région non codante en 3' de l'ARNv joue un rôle crucial (75). Nous avons donc réalisé des délétions au niveau des régions homologues de l'ARNv 8 (NS) de la souche England et testé les ARNv recombinants dans des expériences de retard sur gel (Figure 42). La délétion des régions homologues aux régions dédiées à l'incorporation de l'ARNv 8 (NS) de la souche WSN n'inhibe pas les interactions avec les ARNv 1 (PB2), 2 (PB1), 4 (HA) et 5 (NP) (Figures 42A, 42B, 42D, 42E et 42G). Toutes les délétions, sauf la délétion entre les positions 16-26, inhibent l'interaction avec l'ARNv 3 (PA) d'un facteur 2 environ (Figures 42C et 42G). La délétion de la région entre les positions 835-877 semble inhiber l'interaction avec l'ARNv 6 (NA), mais les résultats obtenus sont assez variables (Figures 42F et 42G).



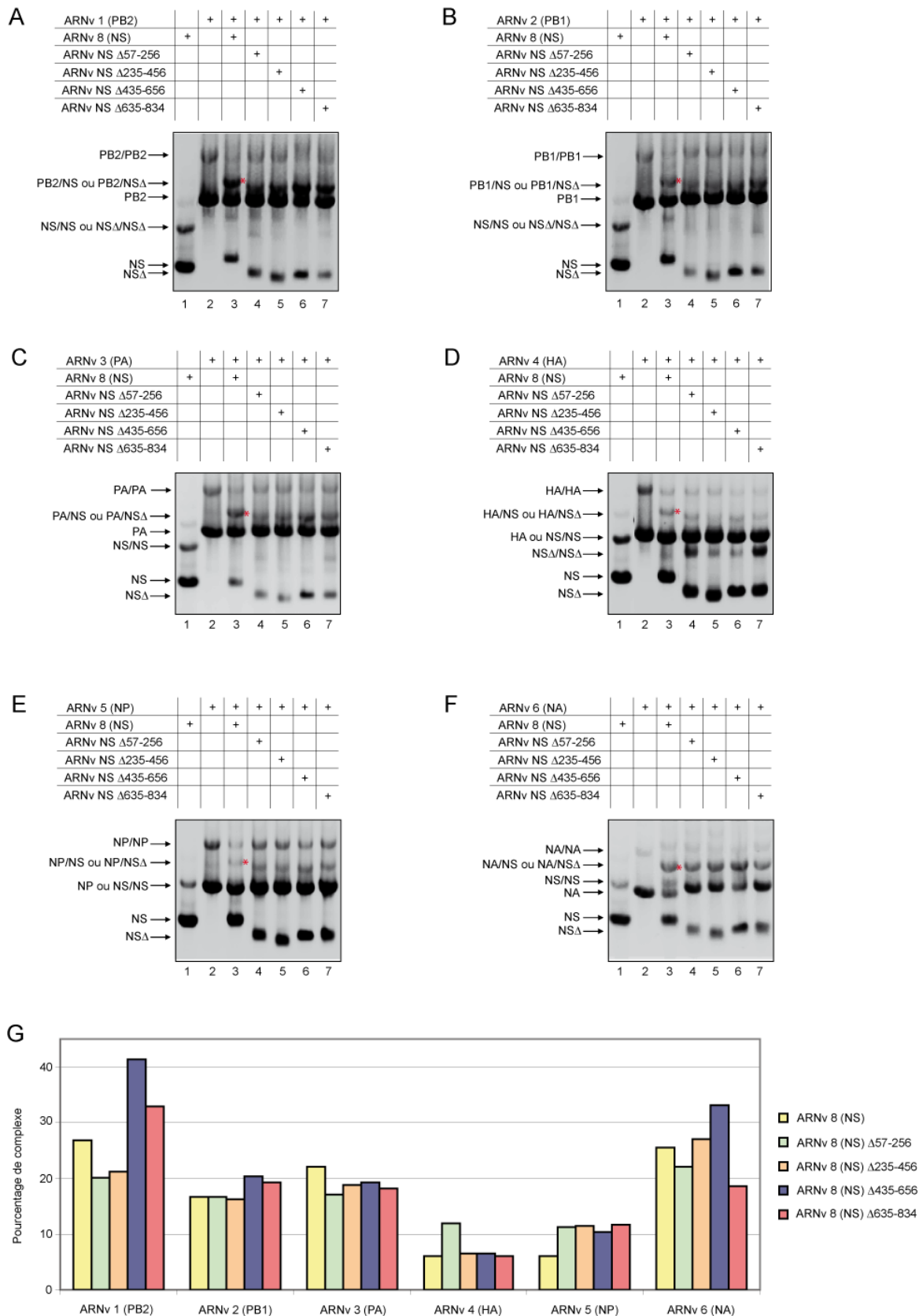
**Figure 42 :** Interactions *in vitro* entre des ARNv 8 (NS) délétés au niveau des régions homologues aux régions impliquées dans l'incorporation de l'ARNv 8 (NS) de la souche WSN et les ARNv partenaires de l'ARNv 8 (NS) après co-transcription des ARNv 2 à 6. **A-F.** Analyse de la formation de complexes entre ARNv par EMSA. **G.** Quantification de la proportion de complexe (en pourcentage) par rapport à la quantité totale d'ARN par piste (moyenne de 2 expériences  $\pm$  valeurs extrêmes).



Dans un second temps, des délétions d'environ 200 nucléotides ont été réalisées tout au long de la région centrale de l'ARNv 8 (NS) et ces ARNv mutants ont été utilisés dans des expériences de retard sur gel (Figure 43). Aucune des délétions testées n'inhibent l'interaction de l'ARNv 8 (NS) avec les ARNv partenaires.

Dans un troisième temps, la majeure partie des séquences codantes de l'ARNv 8 (NS) a été remplacée par la séquence codant la GFP et ces ARNv mutants ont été utilisés dans des expériences de retard sur gel (résultats non montrés). La présence de la séquence codant la GFP augmente l'interaction de l'ARNv recombinant avec les ARNv partenaires de l'ARNv 8 (NS) et nous avons montré que l'ARN codant la GFP interagit avec les ARNv de la souche England (résultats non montrés). La GFP a cependant été couramment utilisée comme gène rapporteur pour identifier les régions des ARNv impliquées dans leur incorporation et dans ces études, les ARN recombinants codant la GFP sont souvent peu incorporés dans les particules virales (75, 77, 161, 194, 195, 251).

Ces derniers résultats permettent de conclure que les conditions expérimentales utilisées ne sont pas adaptées à la mise en évidence d'interactions spécifiques entre les ARNv de la souche England.



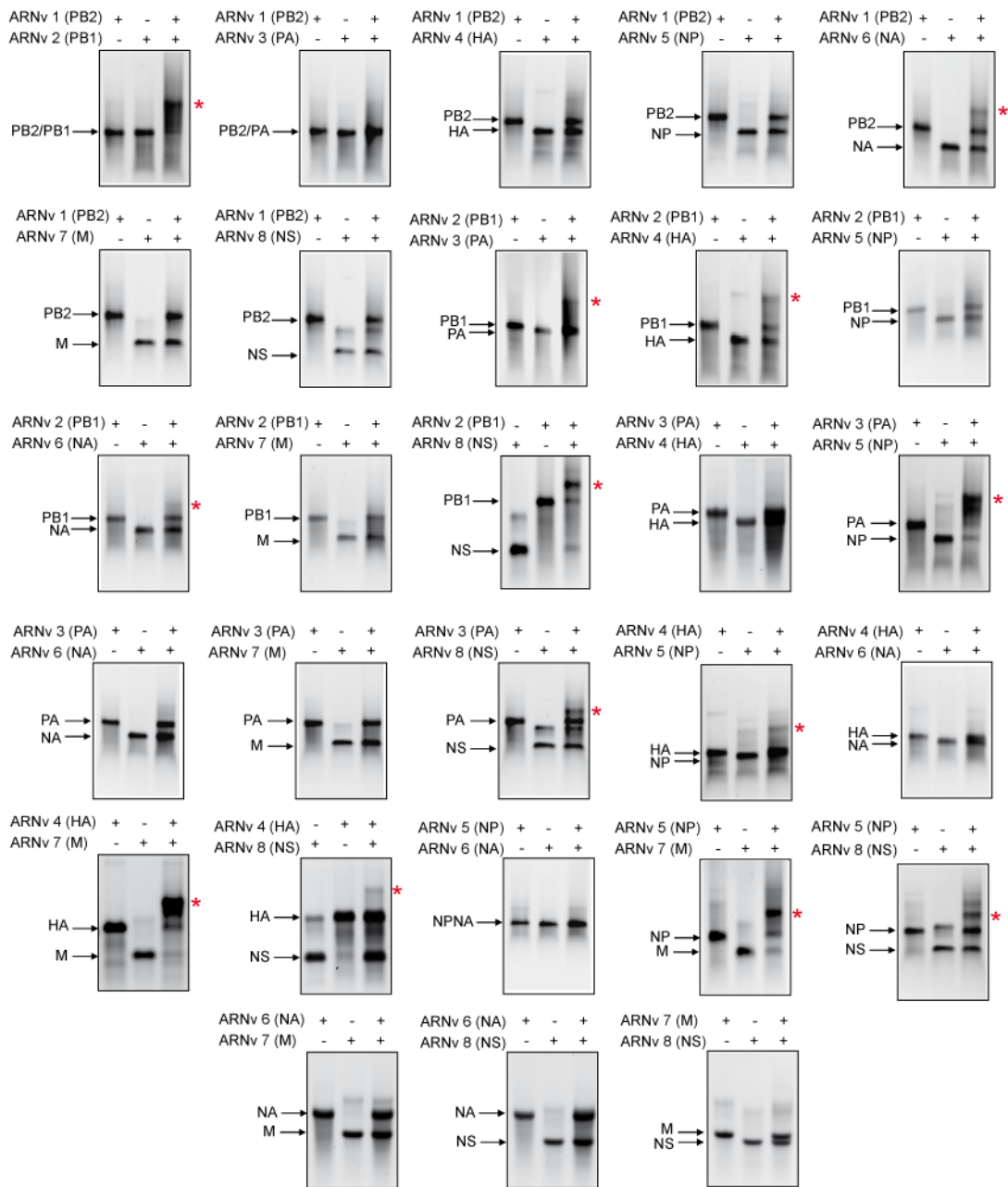
**Figure 43 :** Interactions *in vitro* entre des ARNv 8 (NS) délétés sur toute leur longueur et les ARNv partenaires de l'ARNv 8 (NS) après co-transcription des ARNv deux à deux. **A-F.** Analyse de la formation de complexes entre ARNv par EMSA. **G.** Quantification de la proportion de complexe (en pourcentage) par rapport à la quantité totale d'ARN par piste (une seule expérience a été réalisée).

### **1.1.2. Recherche de conditions expérimentales permettant de mettre en évidence des interactions spécifiques entre les ARNv de la souche England**

Les ARNv de la souche England utilisés ont alors été transcrits *in vitro* par l'ARN polymérase du phage T7 et purifiés (voir la partie « Matériels et Méthodes ») avant d'être utilisés.

Dans un premier temps, nous avons testé l'interaction entre quelques ARNv dans les conditions expérimentales utilisées par Sinck *et al.* afin d'étudier la dimérisation de l'ARN génomique du VIH-1 (223). Après avoir mélangé 2 pmol de chacun des 2 ARNv dans 8 µL d'eau Milli-Q (Millipore), les échantillons ont été dénaturés 2 min. à 90°C, refroidis rapidement 2 min. sur la glace, puis la dimérisation des ARNv a été initiée en incubant les échantillons 30 min. à 37°C dans un tampon dit « dimère » (cacodylate de sodium 50 mM, KCl 300 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 7,5). Les échantillons ont ensuite été chargés sur un gel d'agarose 0,8 % (p/v) contenant du BET dans du tampon TBM (voir la partie « Matériels et Méthodes »). De très faibles interactions ont été soupçonnées d'une part entre l'ARNv 4 (HA) et les ARNv (5) NP, 6 (NA) et 7 (M), et d'autre part entre l'ARNv 5 (NP) et les ARNv 6 (NA) et 7 (M), mais seule une discrète interaction entre les ARNv 6 (NA) et 8 (NS) a pu être clairement mise en évidence (résultats non montrés). Soulignons qu'aucune interaction entre les ARNv de la souche Moscou n'a jamais été mise en évidence dans de telles conditions au laboratoire. Les mêmes résultats ont été obtenus en remplaçant le KCl présent dans le tampon dimère par du NaCl à la même molarité (résultats non montrés). L'effet d'une augmentation de la température sur la dimérisation des ARNv a également été testé. En incubant les ARNv dans du tampon dimère (contenant du KCl) à 55°C, l'interaction entre les ARNv 6 (NA) et 7 (M) disparaît mais nous pouvons observer une faible interaction entre les ARNv 3 (PA) et 6 (NA) (résultats non montrés). Par ailleurs, les 5 interactions que nous soupçonnions lorsque nous avons réalisé l'expérience à 37°C sont maintenant clairement visibles, mais leur intensité reste faible (résultats non montrés).

A



B

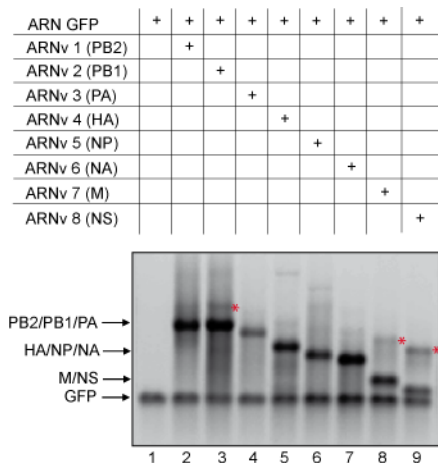
ARNv	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS
PB2		65±8	0	0	0	7±1	0	0
PB1			25±2	25±2	0	9±1	0	82±4
PA				0	69±2	0	0	21±2
HA					17±1	0	66±4	8±1
NP						0	30±1	49±4
NA							0	0
M								0
NS								

**Figure 44 :** Interactions *in vitro* entre les ARNv de la souche England à 55°C dans un milieu à faible force ionique.

**A.** Analyse de la formation de complexes entre ARNv par EMSA. **B.** Quantification de la proportion de complexe (en pourcentage) par rapport à la quantité totale d'ARN par piste (moyenne de 3 expériences ± SEM).

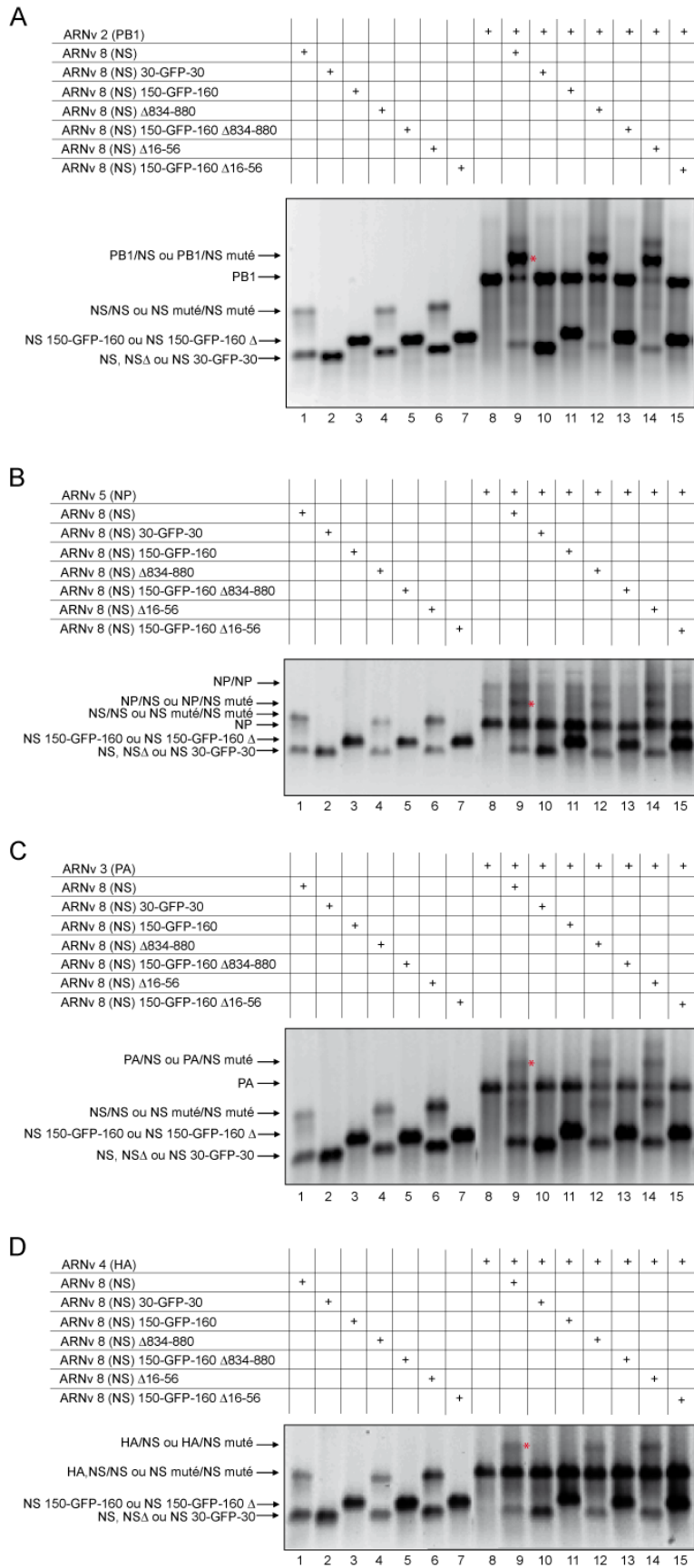
Dans un second temps, nous avons cherché à déterminer si les ARNv interagissent ensemble lorsqu'ils sont incubés en présence du tampon dit « monomère » (cacodylate de sodium 50 mM, KCl 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,1 mM, pH 7,5) utilisé par Sinck *et al.* pour induire le repliement de la forme monomérique de l'ARN génomique du VIH-1 (223). En effet, bien que ce tampon ne permette pas la dimérisation de l'ARN génomique du VIH-1 (223), des interactions entre différentes régions de l'ARN de la télomérase humaine ont pu être mises en évidence en utilisant ce tampon (241). Après incubation des ARNv en présence de ce tampon, à 37°C ou 55°C durant 30 min., des expériences de retard sur gel ont été réalisées comme décrit précédemment. Lorsque les ARNv sont incubés à 37°C, seuls quelques ARNv interagissent très faiblement ensemble (résultats non montrés). L'augmentation de la température d'incubation à 55°C favorise la formation des hétérodimères identifiés après incubation à 37°C et permet de détecter d'autres interactions entre ARNv (Figure 44A). Dans ces conditions, le nombre d'interactions mises en évidence est limité et la proportion d'ARNv engagés dans ces interactions est importante (Figure 44B). De plus, mis à part l'ARNv 8 (NS), les ARNv n'homodimérisent que très peu voire pas du tout. Il semblerait que ces conditions permettent de mettre en évidence des interactions entre ARNv qui soient spécifiques.

Afin d'analyser plus en détail la spécificité des interactions dans ces nouvelles conditions, les ARNv ont été incubés avec un ARN codant la GFP. Les ARNv 1 (PB2), 2 (PB1), 7 (M) et 8 (NS) interagissent très faiblement avec l'ARN codant la GFP (Figure 45, pistes 2, 3, 8 et 9) et aucune interaction n'est visible entre les autres ARNv et l'ARN codant la GFP (Figure 45, pistes 4 à 7).



**Figure 45 :** Interactions *in vitro* entre un ARN codant la GFP et les ARNv de la souche England, à 55°C, dans un milieu à faible force ionique.

Dans un second temps, nous avons étudié l'interaction de certains des ARNv 8 (NS) mutants avec les 4 ARNv qui interagissent avec l'ARNv 8 (NS) sauvage (Figure 46). Le remplacement de la majeure partie de la séquence codante de NS1 par celle de la GFP (ARNv 8 (NS) 30-GFP-30 et ARNv 8 (NS) 150-GFP-160) entraîne une baisse d'interaction avec l'ARNv 5 (NP) (Figure 46B, piste 10 et 11) voire une disparition totale de l'interaction avec les ARNv 2 (PB1), 3 (PA) et 4 (HA) (Figures 46A, 46C et 46D respectivement, pistes 10 et 11). Des résultats similaires sont obtenus avec les ARNv 8 (NS) 150-GFP-160 délétés des régions 834-880 ou 16-56 (Figures 46, pistes 13 et 15) alors que les délétions des régions 834-880 ou 16-56 n'affecte pas l'interaction avec les ARNv partenaires (Figures 46, pistes 12 et 14). Les résultats obtenus avec l'ARNv 5 (NP) diffèrent légèrement (Figure 46B). En effet, dans ce cas, la délétion de la région 834-880 au niveau de l'ARNv 8 (NS) 150-GFP-160 inhibe totalement l'interaction avec l'ARNv 5 (NP) (Figure 46B, piste 13) alors que l'ARNv 8 (NS) 150-GFP-160 et l'ARNv 8 (NS)  $\Delta$ 834-880 interagissent toujours avec l'ARNv 5 (NP) (Figure 46B, pistes 10 et 12 respectivement). Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que les régions impliquées dans l'interaction entre l'ARNv 8 (NS) de la souche England et les ARNv 3 (PA), 4 (HA) et 5 (NP) de cette même souche sont différentes des régions nécessaires à l'incorporation de l'ARNv 8 (NS) de la souche WSN (75). Puisque le remplacement de la majeure partie de la séquence codante de NS1 par celle de la GFP tend à inhiber les interactions avec les ARNv partenaires, ces interactions impliquent des régions des ARNv localisées à distance des extrémités.



**Figure 46 :** Interactions *in vitro* entre les ARNv 8 (NS) délétés de régions présentes aux extrémités, en présence ou en l'absence de la séquence codante de la GFP, avec les ARNv partenaires de l'ARNv 8 (NS) à 55°C dans un milieu à faible force ionique.

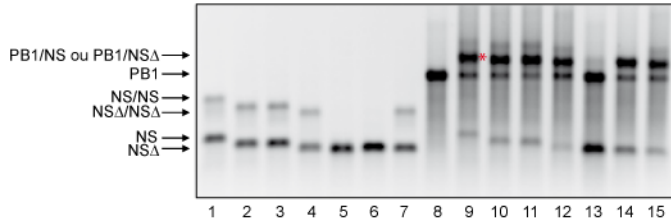
Dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre les ARNv 8 (NS) délétés de grandes régions centrales d'environ 200 nucléotides et ses partenaires (Figure 47). La délétion de la région 235-456 de l'ARNv 8 (NS) inhibe totalement l'interaction avec les ARNv 2 (PB1) et 4 (HA) (Figures 47A et 47D, piste 13) et partiellement l'interaction avec l'ARNv 3 (PA) (Figure 47C, piste 13). La délétion de la région 435-656 inhibe quant à elle totalement l'interaction avec l'ARNv 3 (PA) (Figure 47C, piste 14). Enfin, la délétion de la région 635-834 inhibe totalement l'interaction avec l'ARNv 5 (NP) (Figure 47B, piste 15) et partiellement l'interaction avec l'ARNv 3 (PA) (Figure 47C, piste 15). Ainsi, dans chaque cas, la délétion d'une région centrale de l'ARNv 8 (NS) inhibe totalement (ou presque) l'interaction avec un ARNv partenaire tandis que les autres délétions ont généralement peu ou pas d'effet.

La synthèse des résultats présentés précédemment, laisse penser que les interactions observées entre les ARNv de la souche England sont spécifiques lorsque les ARNv sont incubés à 55°C en présence de tampon monomère. Il a donc été décidé de continuer à utiliser ces conditions expérimentales pour étudier *in vitro* les interactions entre les ARNv de cette souche, même si l'implication systématique de régions de l'ARNv 8 (NS) localisées à distance des extrémités dans les interactions observées peut paraître en contradiction avec les données de la littérature décrivant les régions impliquées dans l'incorporation des ARNv (111). Ces régions n'ont été identifiées que pour les souches WSN et PR8 et il est possible qu'elles soient différentes pour d'autres souches.



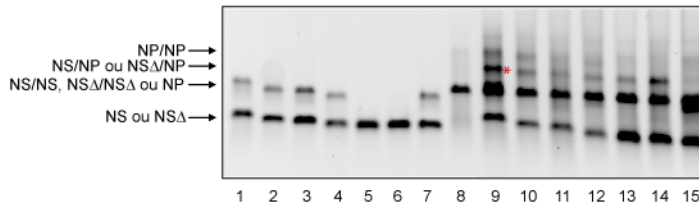
**A**

ARNv 2 (PB1)									+	+	+	+	+	+	+	+
ARNv 8 (NS)	+								+							
ARNv NS Δ16-126		+								+						
ARNv NS Δ57-256				+								+				
ARNv NS Δ235-456					+								+			
ARNv NS Δ435-656						+								+		
ARNv NS Δ635-834							+								+	
ARNv NS Δ765-877		+									+					



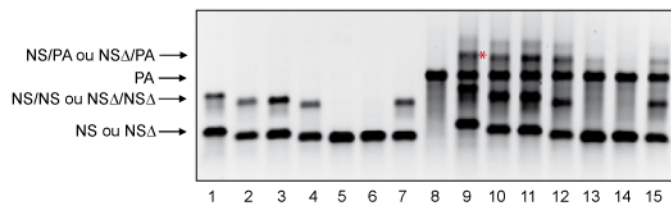
**B**

ARNv 5 (NP)									+	+	+	+	+	+	+	+
ARNv 8 (NS)	+								+							
ARNv NS Δ16-126		+								+						
ARNv NS Δ57-256				+								+				
ARNv NS Δ235-456					+								+			
ARNv NS Δ435-656						+								+		
ARNv NS Δ635-834							+								+	
ARNv NS Δ765-877		+									+					



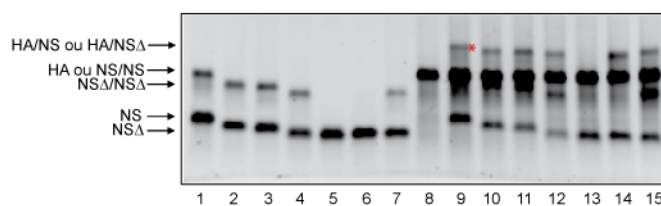
**C**

ARNv 3 (PA)									+	+	+	+	+	+	+	+
ARNv 8 (NS)	+								+							
ARNv NS Δ16-126		+								+						
ARNv NS Δ57-256				+								+				
ARNv NS Δ235-456					+								+			
ARNv NS Δ435-656						+								+		
ARNv NS Δ635-834							+								+	
ARNv NS Δ765-877		+									+					



**D**

ARNv 4 (HA)									+	+	+	+	+	+	+	+
ARNv 8 (NS)	+								+							
ARNv NS Δ16-126		+								+						
ARNv NS Δ57-256				+								+				
ARNv NS Δ235-456					+								+			
ARNv NS Δ435-656						+								+		
ARNv NS Δ635-834							+								+	
ARNv NS Δ765-877		+									+					



**Figure 47 :** Interactions *in vitro* entre les ARNv 8 (NS) délétés de grandes régions centrales, avec les ARNv partenaires de l'ARNv 8 (NS) à 55°C dans un milieu à faible force ionique.

### **1.1.3. Réseaux d'interactions entre les ARNv des souches England et Moscou**

#### 1.1.3.1. Réseau d'interactions entre les ARNv de la souche England

En incubant deux à deux les ARNv de la souche England à 55°C dans un milieu à faible force ionique, 13 interactions ont été mises en évidence (Figure 44). Chaque ARNv interagit avec au moins 2 autres ARNv. Dans ce réseau, l'ARNv 6 (NA) interagit uniquement avec les ARNv 1 (PB2) et 2 (PB1) et ces interactions sont de faible intensité (< 10 %).

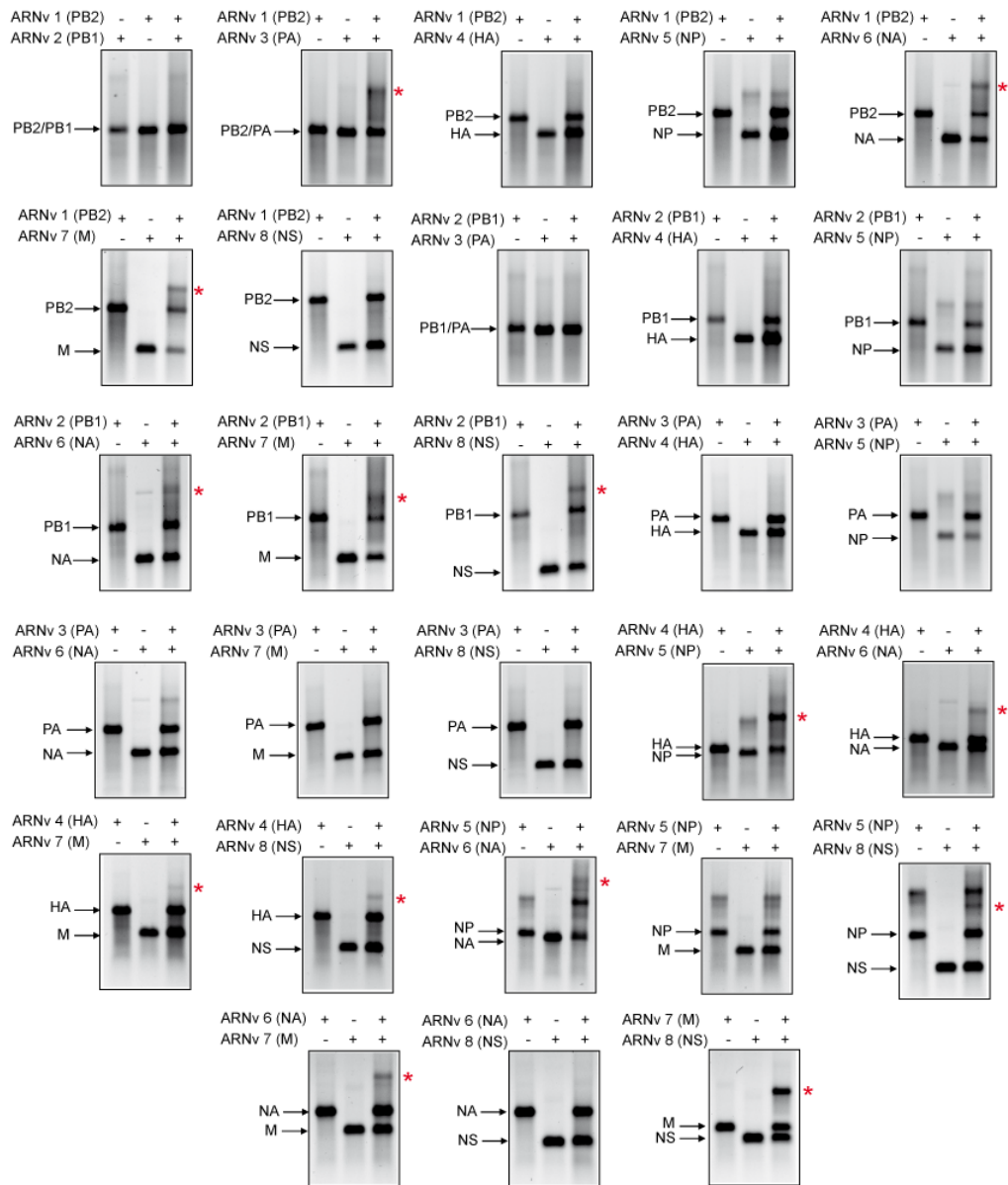
Le réseau d'interactions entre ARNv de la souche England est clairement différent de celui précédemment mis en évidence au laboratoire pour la souche Moscou en co-transcrivant les ARNv deux à deux (comparer la Figure 44 avec la Figure 25) (73).

#### 1.1.3.2. Réseau d'interactions entre les ARNv de la souche Moscou

Il semblait intéressant de déterminer comment les ARNv de la souche Moscou interagissent dans ces mêmes conditions. Les résultats obtenus sont clairement différents de ceux précédemment obtenus au laboratoire en co-transcrivant les ARNv deux à deux (comparer la Figure 48 avec la Figure 25) (73) et de ceux obtenus dans ces mêmes conditions avec les ARNv de la souche England (comparer la Figure 48 avec la Figure 44). Quatorze interactions sont clairement visibles (voir Figure 48), même si certaines sont de faible intensité et il n'est pas possible de conclure avec certitude que les ARNv 3 (PA) et 6 (NA) n'interagissent pas ensemble.

Il est possible que les nouvelles conditions expérimentales donnent des résultats complémentaires de ceux obtenus précédemment au laboratoire en co-transcrivant les ARNv 2 à 2 (73). Des investigations supplémentaires seraient cependant nécessaires pour conclure quant à la spécificité des interactions mises en évidence dans ces nouvelles conditions.

A



B

ARNv	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS
PB2		0	42	0	0	25	27	0
PB1			0	0	0	nq	nq	21
PA				0	0	nd	0	0
HA					51	12	4	9
NP						52	0	nq
NA							11	0
M								27
NS								

**Figure 48 :** Interactions *in vitro* entre les ARNv de la souche Moscou à 55°C dans un milieu à faible force ionique.

**A.** Analyse de la formation de complexes entre ARNv par EMSA. **B.** Quantification de la proportion de complexe (en pourcentage) par rapport à la quantité totale d'ARN par piste (moyenne de 2 expériences). nd : non déterminé, dans le cas où il n'a pas été possible de conclure quant à l'existence d'une interaction entre les 2 ARNv en présence. nq : non quantifiable, dans le cas où, bien qu'un hétérodimère soit clairement visible sur le gel, la proportion de complexe ne peut pas être quantifiée à cause du caractère diffus de la bande et/ou d'un bruit de fond trop important.

### 1.1.4. Conclusion

Les résultats obtenus montrent que les réseaux d'interactions entre ARNv mis en évidence *in vitro* peuvent différer d'une souche à l'autre et, de manière encore plus surprenante, que des conditions expérimentales mettant en évidence des interactions entre ARNv spécifiques pour une souche donnée peuvent ne pas être adaptées à une autre souche. Nous pouvons alors nous demander si les régions impliquées dans les interactions entre ARNv diffèrent également selon les souches.

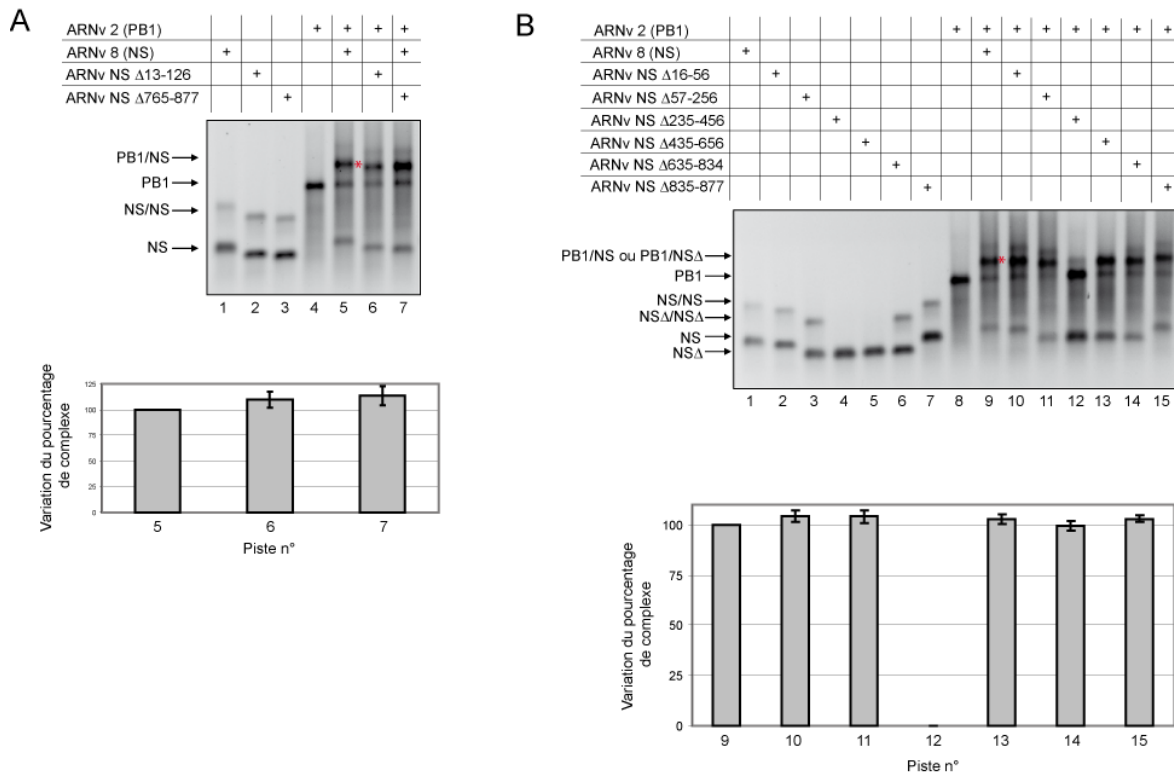
## **1.2. Identification des régions des ARNv de la souche England impliquées dans certaines interactions ARNv/ARNv mises en évidence *in vitro***

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS), qui est l'interaction la plus forte. La démarche expérimentale employée pour caractériser cette interaction sera décrite en détail. Nous présenterons également 7 autres interactions bien caractérisées, mais nous ne présenterons pas la caractérisation des 5 autres, qui est moins fine.

### 1.2.1. Interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS)

Des mutants de délétion de l'ARNv 8 (NS) ont été utilisés dans des expériences de retard sur gel afin d'identifier la région de l'ARNv 8 (NS) qui interagit avec l'ARNv 2 (PB1). La majorité des régions identifiées comme responsables des interactions entre des ARNv de la souche Moscou sont localisées au niveau des 100 nucléotides des régions codantes présentes aux extrémités des ARNv (73). Même si nous avons montré que seule la délétion de la région 235-456 de l'ARNv 8 (NS) inhibe l'interaction avec l'ARNv 2 (PB1) (Figure 47A, piste 13), nous avons souhaité vérifier que la délétion des régions codantes et non codantes à chacune des extrémités de l'ARNv (ARNv NS  $\Delta$ 13-126 et ARNv NS  $\Delta$ 765-877), n'inhibent pas l'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS). Les résultats obtenus indiquent que ces 2 ARNv mutants interagissent avec l'ARNv 2 (PB1) avec la même efficacité que l'ARNv 8 (NS) sauvage (Figure 49A). En utilisant une série d'ARNv 8 (NS) délétés tout le long de l'ARNv, nous confirmons que seule la délétion de la région 235-456 inhibe l'interaction avec l'ARNv 2 (PB1) (Figure 49B, piste 12). Dans la mesure où la délétion des régions 57-256 et 435-656 de l'ARNv 8 (NS) n'affecte pas la dimérisation (Figure 49B, pistes 11 et 13

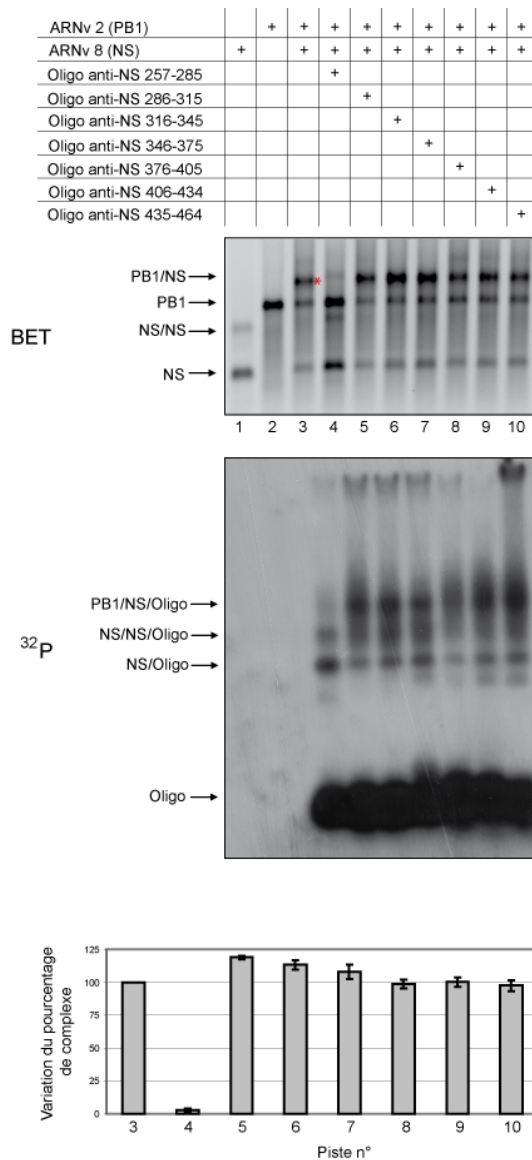
respectivement), la séquence responsable de la dimérisation devrait être localisée au niveau de la région 257-434.



**Figure 49 :** Identification de la région de l'ARNv 8 (NS) impliquée dans l'interaction avec l'ARNv 2 (PB1) à l'aide d'ARNv 8 (NS) délétés.

**A.** Délétions de régions localisées aux extrémités de l'ARNv 8 (NS). La quantification de la proportion de complexe associé à chaque piste est reportée sous le gel (moyenne de 4 expériences  $\pm$  SEM). **B.** Délétions systématiques de régions localisées au niveau de l'ARNv 8 (NS). La quantification de la proportion de complexe associé à chaque piste est reportée sous le gel (moyenne de 3 expériences  $\pm$  SEM).

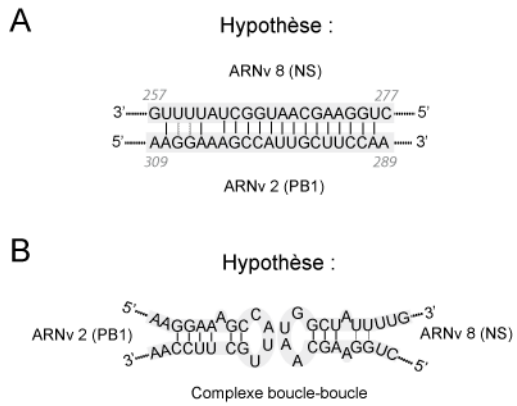
La région de l'ARNv 8 (NS) impliquée dans l'interaction avec l'ARNv 2 (PB1) a ensuite été localisée plus finement en ajoutant des oligonucléotides anti-sens d'une trentaine de nucléotides lors de l'incubation des 2 ARNv de pleine taille à 55°C en présence du tampon d'hybridation. Ces oligonucléotides sont complémentaires à la région 257-434 de l'ARNv 8 (NS) définie comme étant la région minimale responsable de l'interaction avec l'ARNv 2 (PB1) (Figure 49B). Si l'oligonucléotide ajouté cible un ou plusieurs nucléotides impliqués dans l'interaction, l'hétérodimérisation des 2 ARNv devrait en être affectée. Lors des expériences de retard sur gel réalisées en présence d'oligonucléotides, l'hybridation de ces derniers aux ARNv est systématiquement vérifiée. Le seul oligonucléotide affectant la dimérisation est celui s'hybridant à la région 257-285 de l'ARNv 8 (NS) (Figure 50, piste 4). L'hybridation de ce court fragment d'ADN synthétique à l'ARNv 8 (NS) inhibe autant l'interaction avec l'ARNv 2 (PB1) que la délétion de la région 235-456 de l'ARNv 8 (NS).



**Figure 50 :** Expérience de retard sur gel après incubation des ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) en présence d'oligonucléotides compétiteurs ciblant l'ARNv 8 (NS).

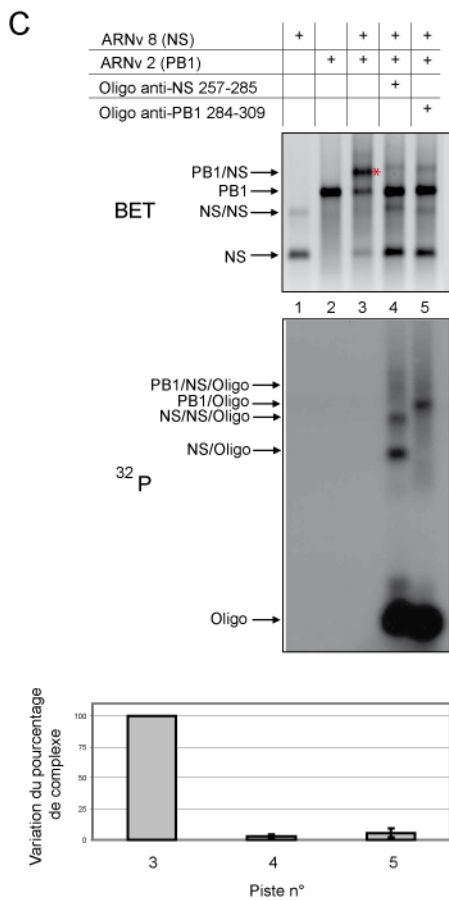
Lors de l'utilisation d'un oligonucléotide, une faible quantité de cet oligonucléotide marqué au  $^{32}\text{P}$  en 5' a également été ajoutée afin de vérifier son hybridation à l'ARNv. La quantification de la proportion de complexe associé à chaque piste est reportée sous le gel (moyenne de 5 expériences  $\pm$  SEM).

Afin d'identifier les séquences partenaires sur les 2 ARNv, la séquence de l'ARNv 2 (PB1) présentant la complémentarité la plus importante avec la région 257-285 de l'ARNv 8 (NS), dans la configuration d'un appariement anti-parallèle, a été recherchée. Nous avons trouvé que les régions 290-303 de l'ARNv 2 (PB1) et 257-285 de l'ARNv 8 (NS) peuvent s'apparier sans discontinuité par des appariements Watson-Crick ou Wobble (Figure 51A). L'analyse des 2 séquences montre que les 2 régions peuvent adopter un repliement en tige-boucle (Figure 51B). Si tel est le cas, l'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) pourrait être initiée par un complexe boucle-boucle (*kissing complex*) (Figure 51B). Afin de montrer un rôle éventuel de cette région de l'ARNv 2 (PB1) dans son interaction avec l'ARNv 8 (NS), un oligonucléotide s'hybridant à la région 284-309 de l'ARNv 2 (PB1) a été ajouté aux 2 ARNv co-incubés. Cet oligonucléotide inhibe la dimerisation des ARNv aussi efficacement que l'oligonucléotide s'hybridant la région 257-285 de l'ARNv 8 (NS) (Figure 51C).

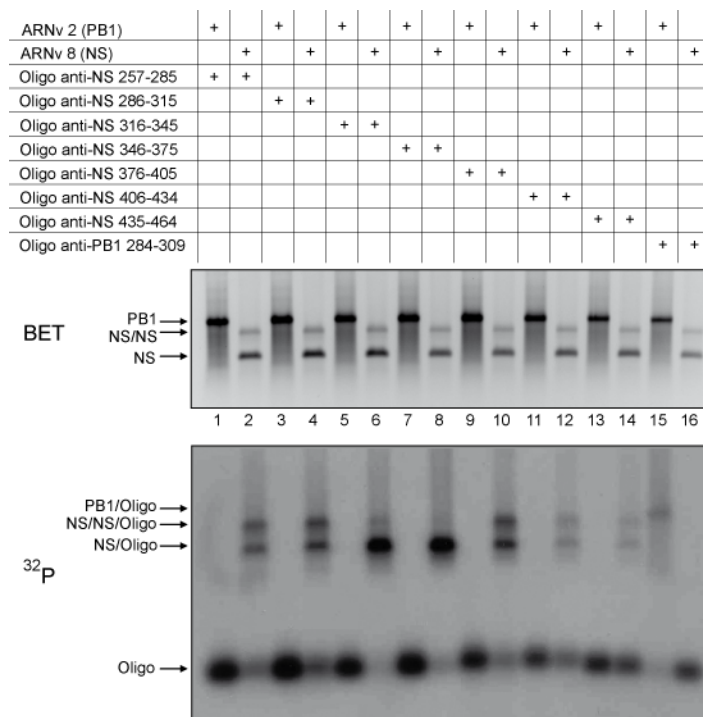


**Figure 51 :** Identification de la région de l'ARNv 2 (PB1) impliquée dans l'interaction avec l'ARNv 8 (NS) par analyse de séquences nucléotidiques et utilisation d'un oligonucléotide compétiteur dirigé contre l'ARNv 2 (PB1).

**A et B.** Hypothèses quant à l'appariement des ARNv 2 (PB1) et 8 (NS). **C.** Effet d'un oligonucléotide anti-sens dirigé contre la région 284-309 de l'ARNv 2 (PB1). Lors de l'utilisation d'un oligonucléotide, une faible quantité de cet oligonucléotide marqué radioactivement au  $^{32}\text{P}$  en 5' a également été ajoutée afin de vérifier son hybridation à l'ARNv. La quantification de la proportion de complexe associé à chaque piste est reportée sous le gel (moyenne de 13 expériences  $\pm$  SEM).



L'hybridation spécifique des oligonucléotides aux ARNv contre lesquels ils sont dirigés a été vérifiée en incubant, dans les mêmes conditions que précédemment, de faibles quantités d'oligonucléotides marqués au  $^{32}\text{P}$  avec les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) (Figure 52). Tous les oligonucléotides s'hybrident uniquement à l'ARNv contre lequel ils sont dirigés, même si l'hybridation des oligonucléotides anti-NS 406-434 et anti-NS 435-464 à l'ARNv 8 (NS) ne semble pas optimale (Figure 52, pistes 12 et 14 respectivement).



**Figure 52 :** Hybridation spécifique des oligonucléotides aux ARNv 2 (PB1) et 8 (NS). Chaque oligonucléotide, marqué radioactivement au  $^{32}\text{P}$ , a été incubé en présence des ARNv 2 (PB1) et 8 (NS), dans les mêmes conditions que celles utilisées pour tester l'interaction entre les ARNv, afin de vérifier son hybridation spécifique à l'ARNv ciblé.

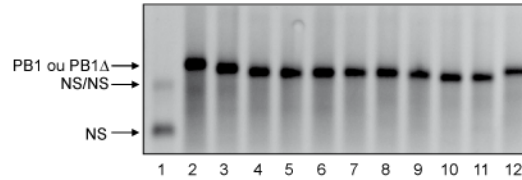
La construction *a posteriori* d'ARNv 2 (PB1) délétés a permis de conforter ces résultats et de montrer que seule la région 125-384 de cet ARN est impliquée dans l'interaction avec l'ARNv 8 (NS) (Figure 53).

Afin de déterminer si l'hypothèse d'appariement entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) présentée dans la Figure 51A est correcte, 4 mutations compensatoires ont été introduites au niveau des régions identifiées comme étant nécessaires à l'interaction entre les 2 ARNv (Figure 54A). Ces mutations ont été réalisées de façon à ne pas modifier la séquence des protéines PB1, NS1 et NEP/NS2, afin de pouvoir utiliser ultérieurement ces mutants dans des expériences de production et de caractérisation de virus *in vitro*. Les ARNv mutés ont été incubés ensemble ou avec les ARNv sauvages afin d'étudier l'impact des mutations sur la dimérisation des 2 ARNv. L'ARNv 8 (NS) muté n'interagit pratiquement pas avec l'ARNv 2 (PB1) sauvage (Figure 54B, piste 6). De même, l'ARNv 2 (PB1) muté n'interagit presque pas avec l'ARNv 8 (NS) sauvage (Figure 54B, piste 7). En revanche, les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) mutés interagissent ensemble (Figure 54B, piste 8), la proportion de dimères entre ces 2 ARNv mutés étant même plus importante que la proportion de dimères entre les 2 ARNv sauvages.



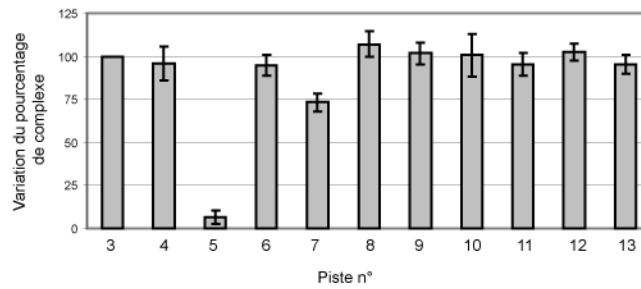
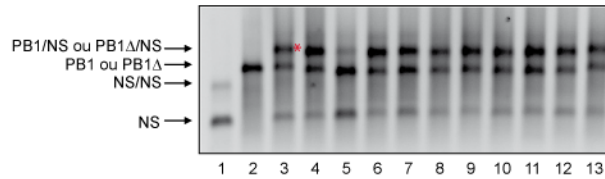
A

ARNv 8 (NS)	+													
ARNv 2 (PB1)		+												
ARNv PB1 $\Delta$ 13-124			+											
ARNv PB1 $\Delta$ 125-384				+										
ARNv PB1 $\Delta$ 385-644					+									
ARNv PB1 $\Delta$ 645-904						+								
ARNv PB1 $\Delta$ 905-1164							+							
ARNv PB1 $\Delta$ 1165-1418								+						
ARNv PB1 $\Delta$ 1419-1678									+					
ARNv PB1 $\Delta$ 1679-1938										+				
ARNv PB1 $\Delta$ 1939-2198											+			
ARNv PB1 $\Delta$ 2199-2328												+		



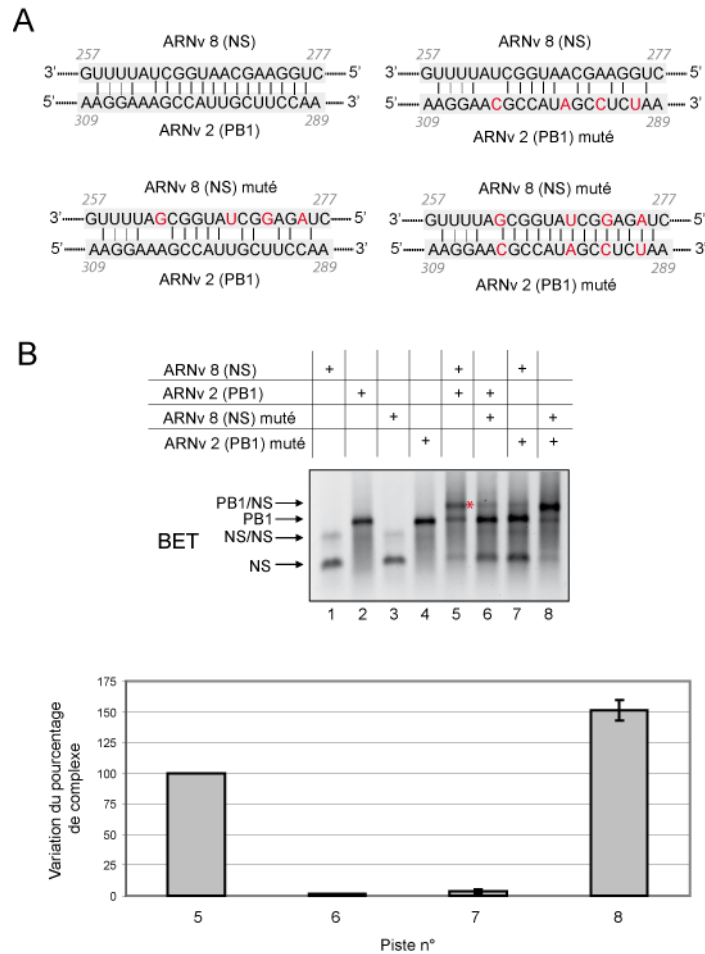
B

ARNv 8 (NS)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARNv 2 (PB1)		+	+											
ARNv PB1 $\Delta$ 13-124				+										
ARNv PB1 $\Delta$ 125-384					+									
ARNv PB1 $\Delta$ 385-644						+								
ARNv PB1 $\Delta$ 645-904							+							
ARNv PB1 $\Delta$ 905-1164								+						
ARNv PB1 $\Delta$ 1165-1418									+					
ARNv PB1 $\Delta$ 1419-1678										+				
ARNv PB1 $\Delta$ 1679-1938											+			
ARNv PB1 $\Delta$ 1939-2198												+		
ARNv PB1 $\Delta$ 2199-2328													+	



**Figure 53 :** Identification de la région de l'ARNv 2 (PB1) impliquée dans l'interaction avec l'ARNv 8 (NS) à l'aide d'ARNv 2 (PB1) délétés.

**A.** ARNv sauvages et mutants incubés indépendamment. **B.** Interaction entre l'ARNv 8 (NS) sauvage et les ARNv 2 (PB1) délétés. La proportion de complexe formé lors des expériences a été quantifiée (moyenne de 3 expériences  $\pm$  SEM).



**Figure 54 :** Impact de mutations compensatoires au niveau des régions impliquées dans l'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) sur cette interaction.

**A.** Description des mutations compensatoires introduites. **B.** Effet des mutations sur les interactions entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS). La quantification de la proportion de complexe associé à chaque piste est reportée sous le gel (moyenne de 8 expériences  $\pm$  SEM).

Ainsi, nous avons identifié, sans aucune ambiguïté possible, les régions impliquées dans l'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) mise en évidence *in vitro*. Il est intéressant de souligner que les régions impliquées dans l'interaction sont toutes les deux localisées à environ 250-300 nucléotides de l'extrémité 3' des ARNv et qu'elles pourraient donc interagir facilement ensemble si les ARNv sont suspendus parallèlement les uns par rapport aux autres à partir d'une plate-forme formée des complexes polymérase, comme c'est le cas pour la souche Moscou (Figure 26) (73).

Pour finir l'étude de l'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS), nous avons analysé succinctement, à partir d'une quarantaine de séquences aviaires de sous-type H3N2 et d'environ 150 séquences aviaires de sous-type H5N2 référencées dans la base de données du NCBI, les séquences présentes au niveau des régions homologues à celles interagissant ensemble *in vitro*. Ces séquences sont assez conservées, surtout au niveau de certaines

positions. Nous avons recherché, au niveau de chaque variation nucléotidique, s'il existait une mutation compensatoire au niveau de l'ARNv partenaire qui permettrait aux ARNv d'interagir comme nous l'avons décrit dans le cas de la souche England. Le nombre de mutations compensatoires potentielles est très restreint par rapport au nombre de mutations non compensatoires mises en évidence. Il semblerait donc que l'interaction identifiée soit peu ou pas conservée entre différentes souches de virus aviaires de sous-type H3N2 ou H5N2. Cette étude préliminaire devra cependant être affinée.

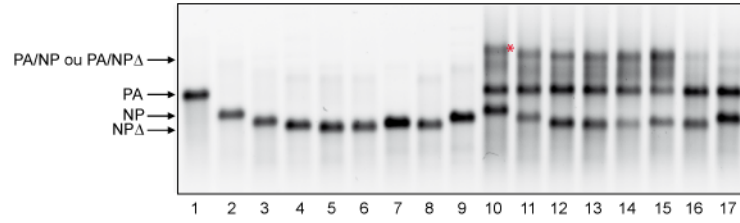
### **1.2.2. Interaction entre les ARNv 3 (PA) et 5 (NP)**

La seconde interaction la plus forte concerne les ARNv 3 (PA) et 5 (NP). Afin de caractériser cette interaction, de grandes délétions de chacun des 2 ARNv ont tout d'abord été réalisées. Les délétions des régions 1165-1419 et 1420-1552 de l'ARNv 5 (NP) inhibent presque totalement l'interaction avec l'ARNv 3 (PA) (Figure 55A, pistes 16 et 17), tandis que les autres délétions de l'ARNv 5 (NP) n'ont pas d'effet majeur sur l'interaction (Figure 55A, pistes 11 à 15). Une inhibition prononcée de l'interaction est également observée en utilisant des oligonucléotides anti-sens dirigés contre les régions 1253-1282 et 1283-1312 de l'ARNv 5 (NP) (Figure 55B, pistes 7 et 8). L'utilisation de ces 2 oligonucléotides n'abolit cependant pas totalement l'interaction, à la différence des 2 délétions précédentes, et il semblerait que la région 1373-1462 puisse également être impliquée, dans une moindre mesure, dans cette interaction (Figure 55B, pistes 11 à 13). Au niveau de l'ARNv 3 (PA), la délétion de la région 905-1292 inhibe totalement l'interaction avec l'ARNv 5 (NP) (Figure 55C, piste 14), alors que les autres délétions de cet ARNv ont un impact bien moindre sur l'interaction (Figure 55C, pistes 11 à 13 et 15 à 17).

L'analyse des séquences présentes au niveau des régions précédemment identifiées a montré que la région 1273-1283 de l'ARNv 5 (NP) est parfaitement complémentaire à la région 1153-1163 de l'ARNv 3 (PA) (Figure 55D). Les 2 ARNv ont alors été incubés en présence d'un oligonucléotide s'hybridant à la région 1143-1172, ce qui a pour effet d'inhiber l'interaction entre ces 2 ARNv (Figure 55E, piste 4).

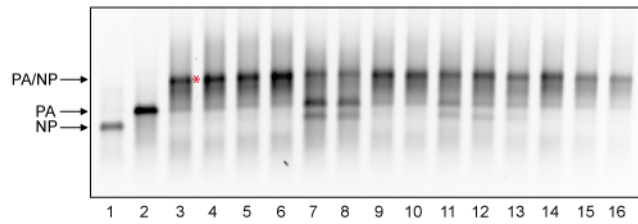
A

ARNv 3 (PA)	+										+	+	+	+	+	+	+	+
ARNv 5 (NP)		+									+							
ARNv NP Δ13-145			+									+						
ARNv NP Δ146-400				+									+					
ARNv NP Δ401-655					+									+				
ARNv NP Δ656-909						+									+			
ARNv NP Δ910-1164							+									+		
ARNv NP Δ1165-1419								+									+	
ARNv NP Δ1420-1552									+									+



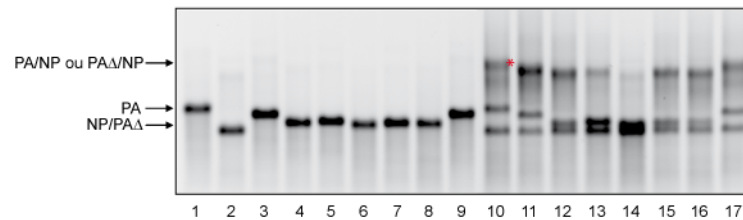
B

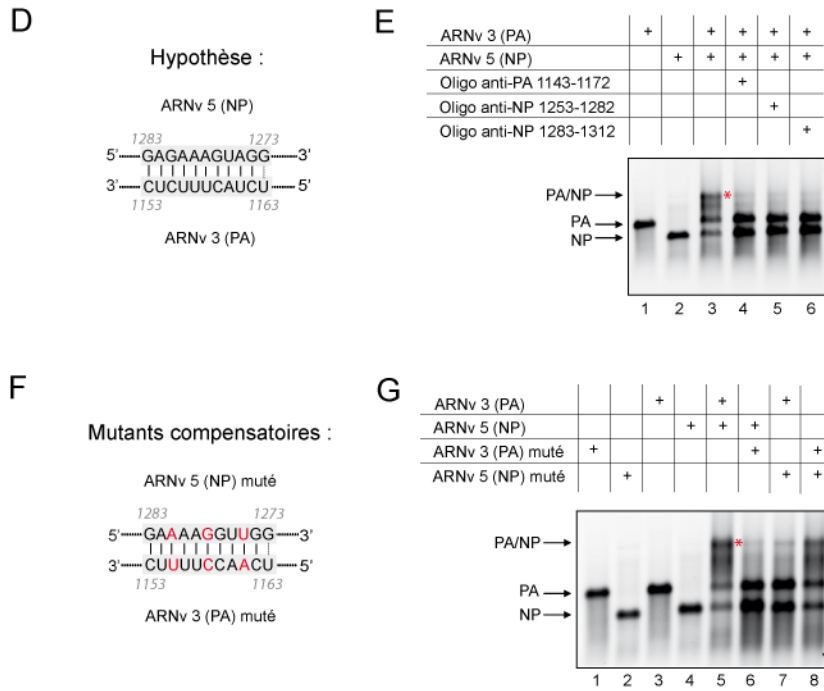
ARNv 3 (PA)		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARNv 5 (NP)	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oligo anti-NP 1163-1192				+														
Oligo anti-NP 1193-1222					+													
Oligo anti-NP 1223-1252						+												
Oligo anti-NP 1253-1282							+											
Oligo anti-NP 1283-1312								+										
Oligo anti-NP 1313-1342									+									
Oligo anti-NP 1343-1372										+								
Oligo anti-NP 1373-1402											+							
Oligo anti-NP 1403-1432												+						
Oligo anti-NP 1433-1462													+					
Oligo anti-NP 1463-1492														+				
Oligo anti-NP 1493-1522															+			
Oligo anti-NP 1523-1552																	+	



C

ARNv 3 (PA)	+										+	+	+	+	+	+	+	+
ARNv 5 (NP)		+									+							
ARNv PA Δ13-124			+									+						
ARNv PA Δ125-514				+									+					
ARNv PA Δ515-904					+									+				
ARNv PA Δ905-1292						+									+			
ARNv PA Δ1293-1682							+									+		
ARNv PA Δ1683-2072								+									+	
ARNv PA Δ2073-2230									+									+





**Figure 55 :** Identification des régions impliquées dans l'interaction entre l'ARNv 3 (PA) et l'ARNv 5 (NP)

**A.** Interaction entre des ARNv 5 (NP) délétés et l'ARNv 3 (PA). **B.** Interaction entre les ARNv sauvages en présence d'oligonucléotides complémentaires à la région 1163-1552 de l'ARNv 5 (NP). L'hybridation des oligonucléotides aux ARNv a été vérifiée par ailleurs. **C.** Interaction entre des ARNv 3 (PA) délétés et l'ARNv 5 (NP). **D.** Hypothèse quant au mécanisme d'interaction des 2 ARNv. **E.** Interaction entre les ARNv sauvages en présence d'un oligonucléotide complémentaire à la région 1143-1172 de l'ARNv 3 (PA). **F.** Description des ARNv possédant des mutations compensatoires. **G.** Interaction entre les ARNv possédant des mutations compensatoires.

Afin d'apporter la preuve que ces 2 régions interagissent ensemble selon le modèle proposé, 3 mutations compensatoires silencieuses ont été introduites au niveau de chaque ARNv (Figure 55F). L'ARNv 3 (PA) muté n'interagit pas avec l'ARNv 5 (NP) sauvage (Figure 55G, piste 6). De même, l'ARNv 5 (NP) muté n'interagit pas avec l'ARNv 3 (PA) sauvage (Figure 55G, piste 7). Par contre, les ARNv 3 (PA) et 5 (NP) mutés interagissent ensemble (Figure 55G, piste 8) de manière similaire aux ARNv sauvages. Ces résultats permettent de conclure que les 2 ARNv interagissent *via* la région 1153-1163 de l'ARNv 3 (PA) et la région 1273-1283 de l'ARNv 5 (NP) comme décrit au niveau de la Figure 55D, et que ces 2 régions sont absolument nécessaires à l'interaction. Ainsi, l'inhibition de l'interaction, suite à la délétion de la région 1420-1552 de l'ARNv 5 (NP) ou en utilisant des oligonucléotides complémentaires à la région 1373-1462 de ce même ARNv, pourrait s'expliquer par une modification de la structure de l'ARNv au niveau de la région de 1273-1283 dans ces 2 conditions.

### 1.2.3. Interaction entre les ARNv 4 (HA) et 7 (M)

L'interaction entre les ARNv 4 (HA) et 7 (M) a également été étudiée en détail. Dans un premier temps, des délétions de 100 à 200 nucléotides ont été réalisées au niveau de l'ARNv 7 (M). Mise à part la délétion de la région 514-724, toutes les autres délétions favorisent l'homodimérisation des ARNv (Figure 56A, pistes 3 à 8). Par ailleurs, seule la délétion de cette région inhibe l'interaction avec l'ARNv 4 (HA) (Figure 56A, piste 13). L'incubation des 2 ARNv en présence d'un oligonucléotide complémentaire à la région 605-634 de l'ARNv inhibe leur interaction (Figure 56B, piste 7). L'oligonucléotide complémentaire à la région 575-604, localisée immédiatement en amont, inhibe légèrement cette interaction (Figure 56B, piste 6).

Nous avons ensuite recherché au niveau de l'ARNv 4 (HA) des séquences présentant une complémentarité importante avec les nucléotides 575-634 de l'ARNv 7 (M). Deux régions, localisées au niveau des nucléotides 595-608 et 626-633, ont été identifiées (Figure 56C). L'incubation des ARNv 4 (HA) et 7 (M) en présence d'oligonucléotides complémentaires à ces régions n'inhibe pratiquement pas l'interaction (Figure 56D, pistes 6 et 7) bien que les oligonucléotides s'hybrident aux ARNv (résultat non montré). La région de l'ARNv 4 (HA) interagissant avec l'ARNv 7 (M) a alors été recherchée à l'aide d'ARNv 4 (HA) délétés (Figure 56E). La délétion de la région 613-857 de l'ARNv 4 (HA) inhibe partiellement l'interaction avec l'ARNv 7 (M) (Figure 56E, piste 15) tandis que les autres délétions ont un effet plus limité voire inexistant. De manière surprenante, aucun des oligonucléotides complémentaires à cette région n'inhibe l'interaction avec l'ARNv 7 (M) (Figure 56F) bien qu'ils s'hybrident aux ARNv (résultat non montré).

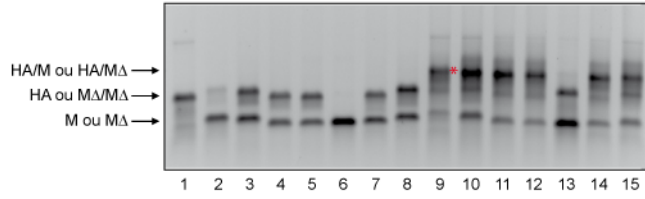
La région de l'ARNv 7 (M) impliquée dans l'interaction a été clairement identifiée, alors qu'aucune région de l'ARNv 4 (HA) ne semble jouer un rôle crucial dans cette interaction. Il est donc possible que la région 575-634 de l'ARNv 7 (M) puisse interagir avec plusieurs régions de l'ARNv 4 (HA). Deux régions de l'ARNv 4 (HA) présentent une complémentarité de séquence importante avec la région 575-634 de l'ARNv 7 (M) (Figure 56C). Nous avons cherché à déterminer si cette région de l'ARNv 7 (M) peut interagir, sans préférence, avec l'une ou l'autre des 2 régions de l'ARNv 4 (HA) partiellement complémentaires. Alors que la seule délétion de la région 613-857 de l'ARNv 4 (HA)

n'inhibe que très partiellement l'interaction avec l'ARNv 7 (M) (Figure 56E, piste 15 et Figure 56G, piste 5), l'ajout de l'oligonucléotide complémentaire à la région 325-354 de l'ARNv 4 (HA) abolit totalement l'hétérodimérisation entre l'ARNv 4 (HA)  $\Delta$ 613-857 et l'ARNv 7 (M) (Figure 56G, piste 6). De même, la délétion des régions 103-357 ou 358-612 de l'ARNv 4 (HA) n'est pas suffisante pour inhiber l'interaction avec l'ARNv 7 (M) (Figure 56E, pistes 13 et 14 et Figure 56G, pistes 7 et 8), mais l'ajout de l'oligonucléotide complémentaire à la région 646-675 de l'ARNv 4 (HA) inhibe presque totalement l'interaction entre ces ARNv mutants et l'ARNv 7 (M) sauvage. Enfin, L'incubation des ARNv 4 (HA) et 7 (M) sauvages en présence d'oligonucléotides complémentaires aux régions 325-354 et 646-675 de l'ARNv 4 (HA) inhibe très fortement l'hétérodimérisation des 2 ARNv (Figure 56G, piste 7).

L'ensemble de ces résultats suggère fortement que la région 575-634 de l'ARNv 7 (M) peut interagir indifféremment avec l'ARNv 4 (HA) *via* la région 325-354 de ce dernier ou bien *via* sa région 646-675.

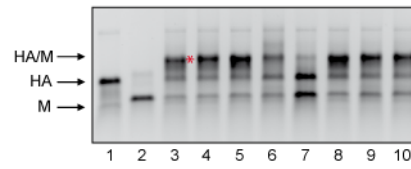
A

ARNv 4 (HA)	+								+	+	+	+	+	+	+	+
ARNv 7 (M)		+							+							
ARNv M Δ113-102			+							+						
ARNv M Δ103-302				+							+					
ARNv M Δ303-513					+							+				
ARNv M Δ514-724						+							+			
ARNv M Δ724-924							+							+		
ARNv M Δ925-1014								+							+	



B

ARNv 4 (HA)	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARNv 7 (M)		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oligo anti-M 514-544						+										
Oligo anti-M 545-574							+									
Oligo anti-M 575-604								+								
Oligo anti-M 605-634									+							
Oligo anti-M 635-664										+						
Oligo anti-M 665-694											+					
Oligo anti-M 695-676												+				

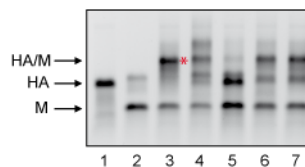


C



D

ARNv 4 (HA)	+			+	+	+	+	+	+
ARNv 7 (M)		+	+	+	+	+	+	+	+
Oligo anti-M 575-604					+				
Oligo anti-M 605-635						+			
Oligo anti-HA 646-675							+		
Oligo anti-HA 325-354								+	







#### 1.2.4. Interaction entre les ARNv 1 (PB2) et 2 (PB1)

Les ARNv 1 (PB2) et 2 (PB1) sont deux autres ARNv interagissant fortement *in vitro* pour lesquels nous souhaitons identifier les régions responsables de cette interaction. L'utilisation d'ARNv 2 (PB1) délétés montre que la région 1939-2198 de cet ARNv joue un rôle important dans l'interaction avec l'ARNv 1 (PB2) (Figure 57A, piste 12 ; pour la migration des ARNv 2 (PB1) délétés seuls, voir la Figure 53A). L'utilisation d'oligonucléotides complémentaires à cette région restreint la zone importante pour cette interaction aux nucléotides 2059-2118 de l'ARNv 2 (PB1) (Figure 57B, pistes 8 et 9). La région 2119-2178 pourrait également jouer un rôle dans l'interaction avec l'ARNv 1 (PB2) puisque l'utilisation d'oligonucléotides complémentaires inhibe légèrement l'interaction (Figure 57B, pistes 10 et 11).

L'analyse de l'interaction entre l'ARNv 2 (PB1) et des ARNv 1 (PB2) délétés indique que seule la délétion de la région 785-1170 de l'ARNv 1 (PB2) inhibe drastiquement l'hétérodimérisation (Figure 57C, piste 6). Signalons que l'absence d'homodimérisation entre les ARNv 1 (PB2) délétés a été vérifiée (résultat non montré). L'incubation des 2 ARNv de pleine taille en présence d'oligonucléotides s'hybridant au niveau des nucléotides 785-1170 indique que la région 961-1020 de l'ARNv 1 (PB2) est très importante dans l'interaction entre les 2 ARNv (Figure 57D, pistes 10 et 11). La région 841-870 semble également jouer un rôle, mais ne paraît pas essentielle (Figure 57D, piste 6).

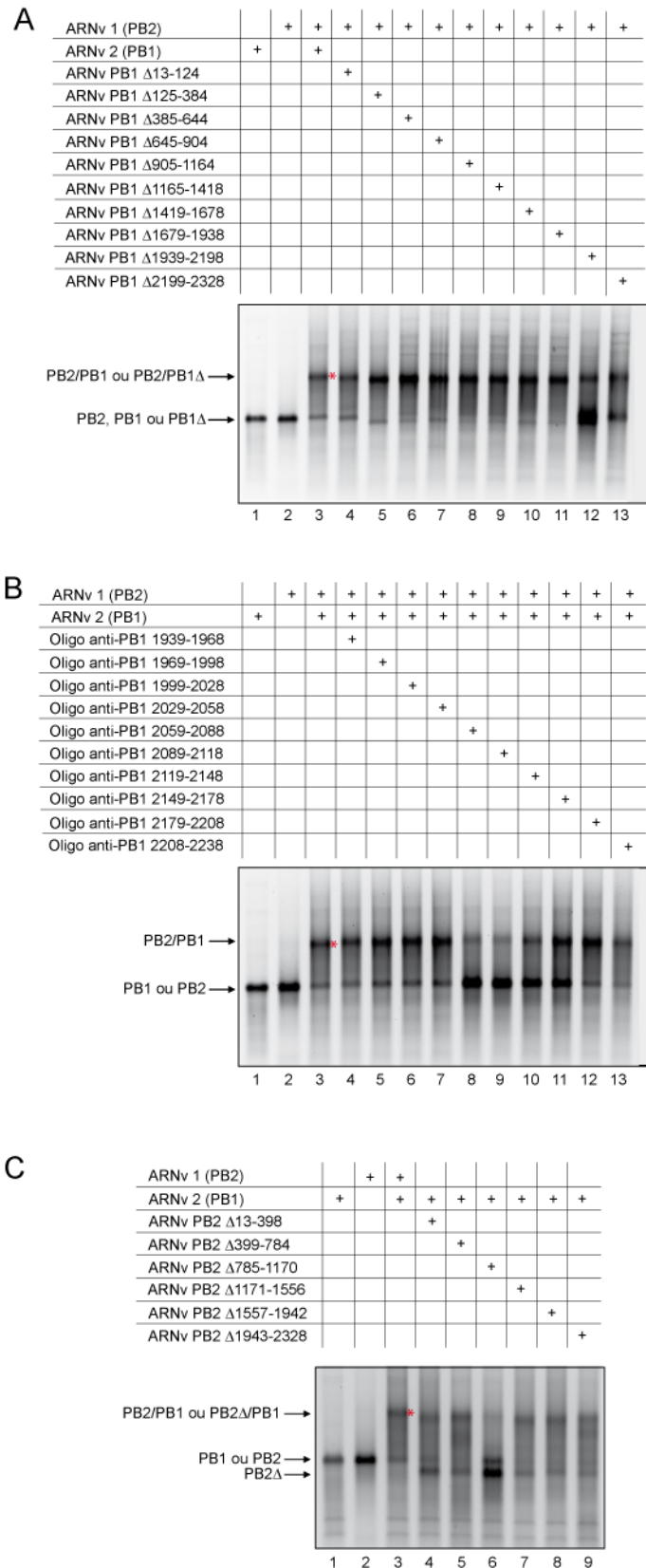
La combinaison des résultats présentés précédemment et une analyse des séquences nucléotidiques nous a conduit à proposer le modèle représenté au niveau de la Figure 57E. Dans ce modèle, l'interaction entre les 2 ARNv se ferait principalement au niveau de 3 régions présentant des complémentarités de séquence. Les régions 2075-2083, 2096-2103 et 2142-2150 de l'ARNv 2 (PB1) interagiraient respectivement avec les régions 994-986, 971-964 et 855-863 de l'ARNv 1 (PB2). Nous avons testé cette hypothèse en introduisant des mutations compensatoires silencieuses au niveau de 2 de ces régions (Figure 57F). Les ARNv 1 (PB2) et 2 (PB1) mutés # 1 semblent interagir plus faiblement avec les ARNv 2 (PB1) et 1 (PB2) respectivement que les ARNv homologues sauvages (Figure 57G, pistes 7 à 9). En revanche, les ARNv 1 (PB2) et 2 (PB1) mutés # 1 semblent interagir ensemble au moins aussi fortement que les ARNv 1 (PB2) et 2 (PB1) sauvages (Figure 57G, piste 10). Les résultats obtenus avec les ARNv 1 (PB2) et 2 (PB1) mutés # 2 semblent être similaires (Figure 57G, pistes 11 à 14). Néanmoins, l'expérience devra être répétée afin de valider ces résultats.

### 1.2.5. Interaction entre les ARNv 5 (NP) et 8 (NS)

L'interaction entre les ARNv 5 (NP) et 8 (NS) a été étudiée en détail (Figure 58). La région 635-834 de l'ARNv 8 (NS) semble être impliquée dans l'interaction avec l'ARNv 5 (NP) puisque sa délétion inhibe totalement l'interaction (Figure 58A, piste 9 ; pour la migration des ARNv 8 (NS) délétés seuls, voir la Figure 49B). Néanmoins, toutes les autres délétions de l'ARNv 8 (NS) inhibent partiellement l'interaction (Figure 58A, pistes 4 à 8).

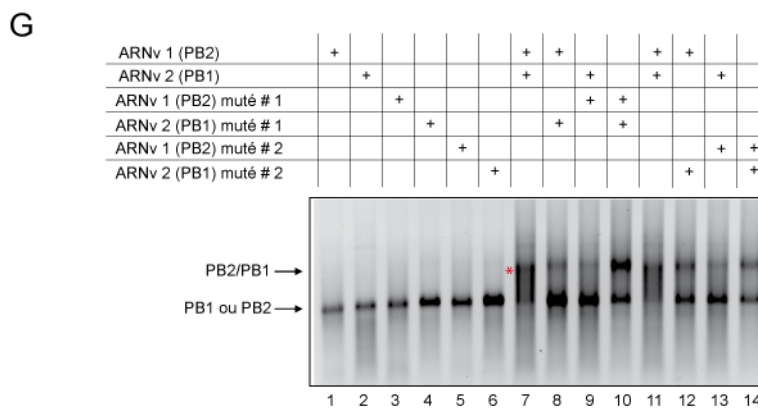
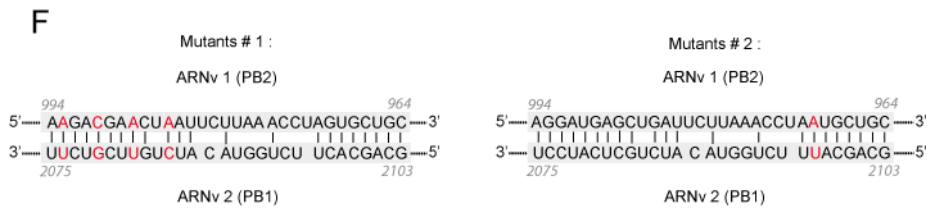
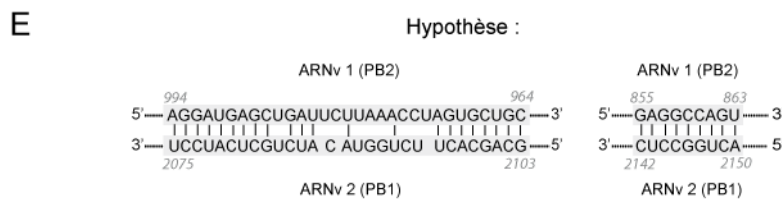
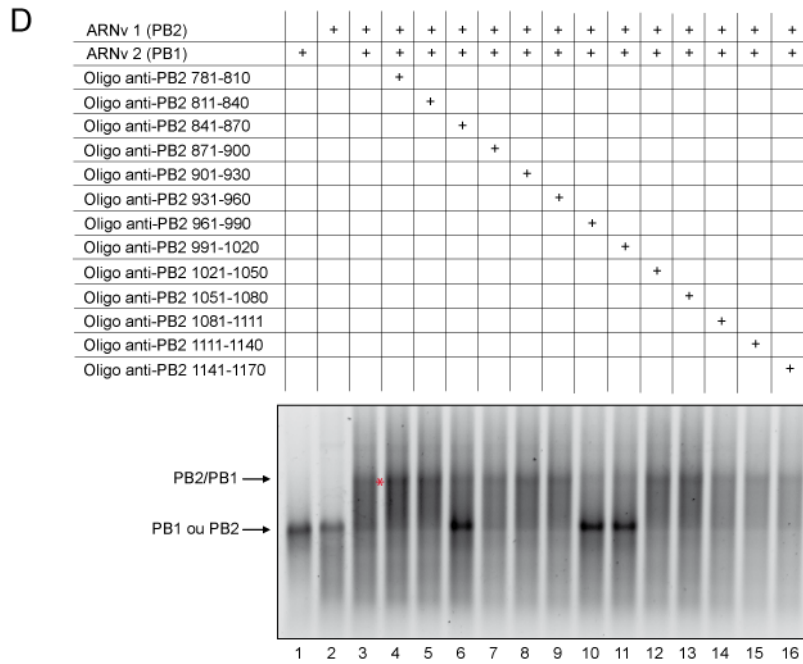
Au niveau de l'ARNv 5 (NP), seule la délétion de la région 1165-1419 inhibe l'interaction (Figure 58B, piste 9 ; pour la migration des ARNv 5 (NP) délétés seuls, voir la Figure 55A). De courts oligonucléotides complémentaires à cette région ont été incubés en présence des 2 ARNv sauvages. Seuls les oligonucléotides s'hybridant aux régions 1193-1222 et 1223-1252 inhibent clairement l'interaction (Figure 58C, pistes 5 et 6). L'analyse des séquences nucléotidiques au niveau des régions précédemment identifiées a permis de trouver une complémentarité de séquence entre la région 1216-1226 de l'ARNv 5 (NP) et la région 660-670 de l'ARNv 8 (NS) (Figure 58D). Un oligonucléotide complémentaire à la région 654-676 de l'ARNv 5 (NP) inhibe en effet l'interaction (Figure 58E, piste 4).

Six mutations compensatoires ont ensuite été introduites au niveau de chacune des régions potentielles d'interaction (Figure 58F). Ces mutations ne modifient pas la séquence de la protéine NP, mais modifient les séquences des protéines NS1 et NEP/NS2. Comme prévu, l'hétérodimérisation entre un ARNv sauvage et la version mutée de l'ARNv partenaire n'est pas possible (Figure 58G, piste 6 et 7). En revanche, contrairement à ce que nous pensions, les 2 ARNv possédant des mutations compensatoires n'interagissent pas ensemble (Figure 58G, piste 8). Ainsi, l'utilisation de mutants compensatoires n'a pas permis de vérifier l'hypothèse émise quant au mécanisme d'interaction entre les ARNv 5 (NP) et 8 (NS). Les résultats obtenus ne remettent cependant pas totalement en question cette hypothèse. En effet, il est possible que l'introduction des 6 mutations au niveau de l'un ou l'autre des ARNv crée une nouvelle structure secondaire ne permettant pas l'interaction avec l'ARNv partenaire. Il pourrait être intéressant de réaliser d'autres ARNv possédant un nombre plus restreint de mutations compensatoires.



**Figure 57 :** Identification des régions impliquées dans l'interaction entre l'ARNv 1 (PB2) et l'ARNv 2 (PB1).

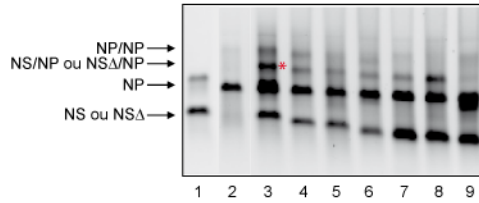
**A.** Interaction entre des ARNv 2 (PB1) délétés et l'ARNv 1 (PB2). **B.** Interaction entre les ARNv sauvages en présence d'oligonucléotides complémentaires à la région 1939-2238 de l'ARNv 2 (PB1). **C.** Interaction entre des ARNv 1 (PB2) délétés et l'ARNv 2 (PB1).



**D.** Interaction entre les ARNv sauvages en présence d'oligonucléotides complémentaires à la région 781-1170 de l'ARNv 1 (PB2). **E.** Hypothèse quant au mécanisme d'interaction des 2 ARNv. **F.** Description des ARNv possédant des mutations compensatoires. **G.** Interaction entre les ARNv possédant des mutations compensatoires.

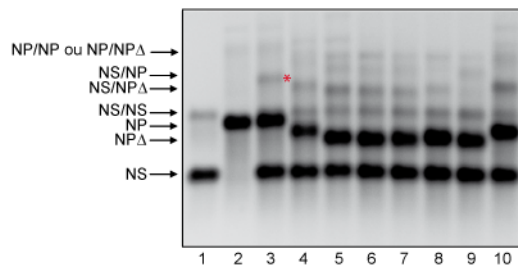
A

ARNv 5 (NP)		+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARNv 8 (NS)	+		+							
ARNv NS $\Delta$ 13-126				+						
ARNv NS $\Delta$ 57-256							+			
ARNv NS $\Delta$ 235-456								+		
ARNv NS $\Delta$ 435-656									+	
ARNv NS $\Delta$ 635-834										+
ARNv NS $\Delta$ 765-877					+					



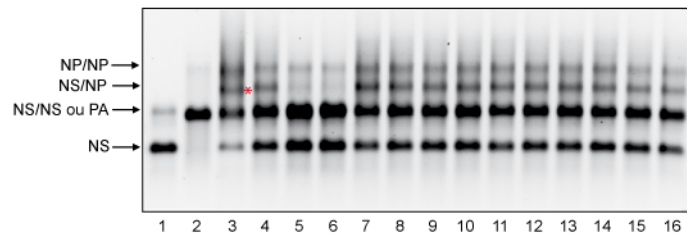
B

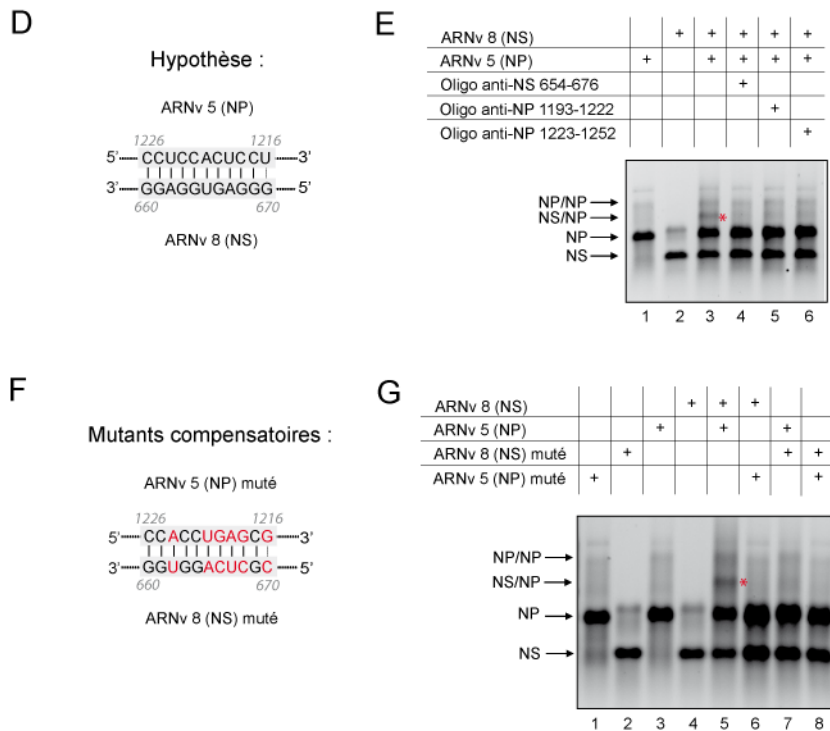
ARNv 8 (NS)	+		+	+	+	+	+	+	+	+
ARNv 5 (NP)		+	+							
ARNv NP $\Delta$ 13-145				+						
ARNv NP $\Delta$ 146-400					+					
ARNv NP $\Delta$ 401-655						+				
ARNv NP $\Delta$ 656-909							+			
ARNv NP $\Delta$ 910-1164								+		
ARNv NP $\Delta$ 1165-1419									+	
ARNv NP $\Delta$ 1420-1552										+



C

ARNv 8 (NS)	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARNv 5 (NP)		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oligo anti-NP 1163-1192				+												
Oligo anti-NP 1193-1222					+											
Oligo anti-NP 1223-1252						+										
Oligo anti-NP 1253-1282							+									
Oligo anti-NP 1283-1312								+								
Oligo anti-NP 1313-1342									+							
Oligo anti-NP 1343-1372										+						
Oligo anti-NP 1373-1402											+					
Oligo anti-NP 1403-1432												+				
Oligo anti-NP 1433-1462													+			
Oligo anti-NP 1463-1492														+		
Oligo anti-NP 1493-1522															+	
Oligo anti-NP 1523-1552																+





**Figure 58 :** Identification des régions impliquées dans l'interaction entre l'ARNv 5 (NP) et l'ARNv 8 (NS).

**A.** Interaction entre des ARNv 8 (NS) délétés et l'ARNv 5 (NP). **B.** Interaction entre des ARNv 5 (NP) délétés et l'ARNv 8 (NS). **C.** Interaction entre les ARNv sauvages en présence d'oligonucléotides complémentaires à la région 1163-1552 de l'ARNv 5 (NP). **D.** Hypothèse quant au mécanisme d'interaction des 2 ARNv. **E.** Interaction entre les ARNv sauvages en présence d'un oligonucléotide complémentaire à la région 654-676 de l'ARNv 8 (NS). **F.** Description des ARNv possédant des mutations compensatoires. **G.** Interaction entre les ARNv possédant des mutations compensatoires.

### 1.2.6. Interaction entre les ARNv 3 (PA) et 8 (NS)

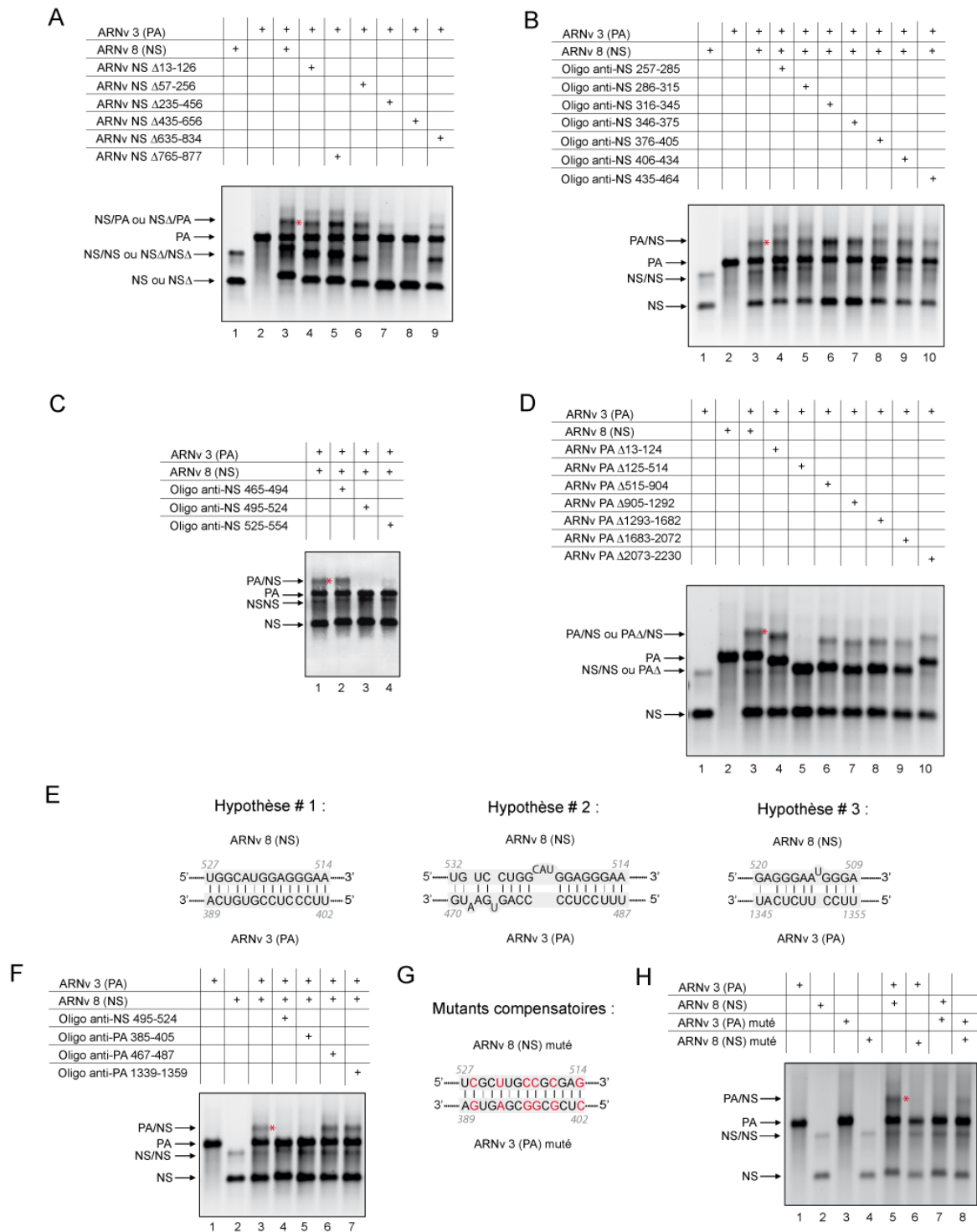
Les régions impliquées dans l'interaction entre les ARNv 3 (PA) et 8 (NS) ont également été identifiées. Les ARNv 8 (NS) délétés des régions 235-456 et 435-656 n'interagissent pratiquement pas avec l'ARNv 3 (PA) sauvage (Figure 59A, pistes 13 et 14 ; pour la migration des ARNv 8 (NS) délétés seuls, voir la Figure 49B), laissant penser que la région impliquée dans l'interaction est la région 435-456 ou une région située à proximité. Nous notons cependant que la délétion de la région 635-834 de l'ARNv 8 (NS) inhibe également légèrement l'interaction (Figure 59A, piste 15). Parmi les oligonucléotides complémentaires à la région 257-464, seul l'oligonucléotide complémentaire à la région 435-464 de l'ARNv 8 (NS) inhibe légèrement l'interaction (Figure 59B, piste 10), bien que tous les oligonucléotides puissent s'hybrider à l'ARNv 8 (NS) (Figure 50). Nous avons donc analysé l'effet d'oligonucléotides complémentaires à des séquences plus en aval : un oligonucléotide

complémentaire à la région 495-524 de l'ARNv 8 (NS) inhibe totalement l'interaction (Figure 59C, piste 3) et l'oligonucléotide complémentaire à la région 525-554, située immédiatement en aval, inhibe quant à lui l'interaction de manière prononcée (Figure 59C, piste 4).

Au niveau de l'ARNv 3 (PA), seule la délétion de la région 13-124 n'affecte pas l'interaction avec l'ARNv 8 (NS) (Figure 59D ; pour la migration des ARNv 3 (PA) délétés seuls, voir la Figure 55C). Néanmoins, parmi toutes les délétions testées, seule la délétion de la région 125-514 inhibe totalement l'interaction (Figure 59D, piste 5). La région de l'ARNv 3 (PA) impliquée dans l'interaction devrait donc se trouver au niveau de la région 125-514.

La combinaison des résultats précédents et d'une analyse bioinformatique des séquences nucléotidiques nous a conduit à proposer 3 hypothèses quant au mécanisme d'interaction entre les ARNv (Figure 59E), l'une d'elle n'impliquant pas les nucléotides 125-514. L'effet d'oligonucléotides complémentaires à ces 3 régions de l'ARNv 3 (PA) a ensuite été testé. Seul l'oligonucléotide complémentaire à la région 385-405 a un effet sur l'interaction (Figure 59F, piste 5) bien que les 3 oligonucléotides s'hybrident à l'ARNv 3 (PA) (résultat non montré). Six mutations compensatoires ont été introduites au niveau des régions des ARNv censées interagir d'après le modèle # 1 (Figure 59G). Les mutations réalisées au niveau de l'ARNv 3 (PA) sont silencieuses, mais pas celles au niveau de l'ARNv 8 (NS). Comme prévu, l'hétérodimérisation entre un ARNv sauvage et la version mutée de l'ARNv partenaire n'est pas possible (Figure 59H, piste 6 et 7). L'ARNv 3 (PA) muté peut interagir avec l'ARNv 8 (NS) muté (Figure 59H, piste 8), mais la proportion de complexe formé est inférieure à celle observée entre les 2 ARNv sauvages. Cette différence pourrait s'expliquer par une légère modification de la structure secondaire des ARNv qui rendrait la formation d'hétérodimère plus difficile. Cette expérience valide cependant l'hypothèse d'appariement #1 (Figure 59E).





**Figure 59 :** Identification des régions impliquées dans l'interaction entre l'ARNv 3 (PA) et l'ARNv 8 (NS).

**A.** Interaction entre des ARNv 8 (NS) délétés et l'ARNv 3 (PA). **B.** Interaction entre les ARNv sauvages en présence d'oligonucléotides complémentaires à la région 257-464 de l'ARNv 8 (NS). **C.** Interaction entre les ARNv sauvages en présence d'oligonucléotides complémentaires à la région 465-554 de l'ARNv 8 (NS). **D.** Interaction entre des ARNv 3 (PA) délétés et l'ARNv 8 (NS). **E.** Hypothèses quant aux mécanismes d'interaction des 2 ARNv. **F.** Interaction entre les ARNv sauvages en présence d'oligonucléotides complémentaires aux régions de l'ARNv 3 (PA) interagissant avec l'ARNv 8 (NS) dans les 3 modèles proposés dans le panel D. **G.** Description des ARNv possédant des mutations compensatoires. **H.** Interaction entre les ARNv possédant des mutations compensatoires.

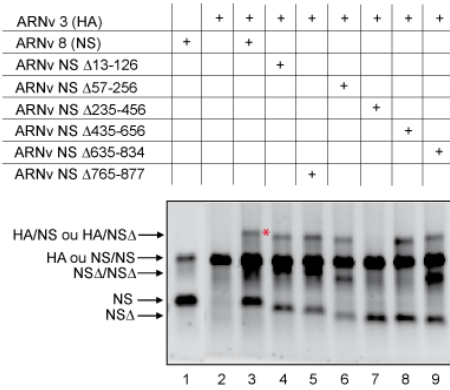
### 1.2.7. Interaction entre les ARNv 4 (HA) et 8 (NS)

L'interaction entre les ARNv 4 (HA) et 8 (NS) a également été étudiée. Parmi les délétions de l'ARNv 8 (NS), seule la délétion de la région 235-456 inhibe l'interaction avec l'ARNv 4 (HA) (Figure 60A, piste 7 ; pour la migration des ARNv 8 (NS) délétés seuls, voir la Figure 49B). L'interaction entre les 2 ARNv sauvages est également inhibée en présence d'oligonucléotides complémentaires à la région 346-405 de l'ARNv 8 (NS) (Figure 60B, pistes 7 et 8).

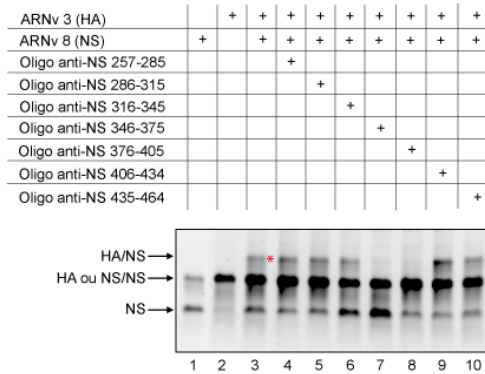
Au niveau de l'ARNv 4 (HA), seule la délétion de la région 368-612 inhibe l'interaction (Figure 60C, piste 6 ; pour la migration des ARNv 4 (HA) délétés seuls, voir la Figure 56E).

En combinant les résultats précédents et une analyse bioinformatique des séquences nucléotidiques, nous proposons que la région 364-374 de l'ARNv 8 (NS) interagit avec la région 449-459 de l'ARNv 4 (HA) (Figure 60D). Ces deux régions peuvent s'apparier en orientation anti-parallèle par des interactions de type Watson-Crick, avec néanmoins un mésappariement ou un appariement non canonique. Afin de tester cette hypothèse, les ARNv ont été incubés en présence d'oligonucléotides complémentaires à ces régions. Les 2 oligonucléotides testés, complémentaires aux régions 442-466 de l'ARNv 4 (HA) et 357-381 de l'ARNv 8 (NS), abolissent totalement l'interaction entre les 2 ARNv (Figure 60E, pistes 4 et 5 respectivement) confortant l'hypothèse émise quant aux régions impliquées.

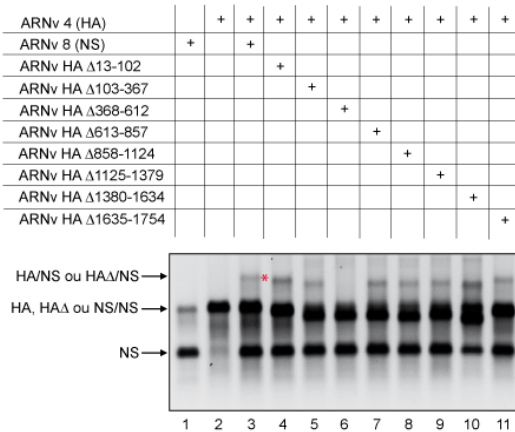
A



B



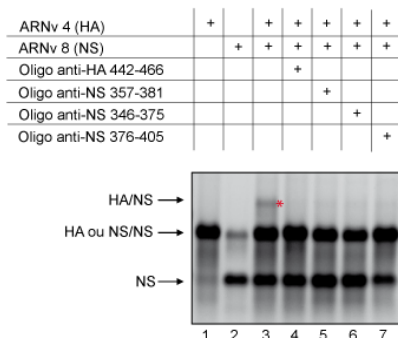
C



D



E

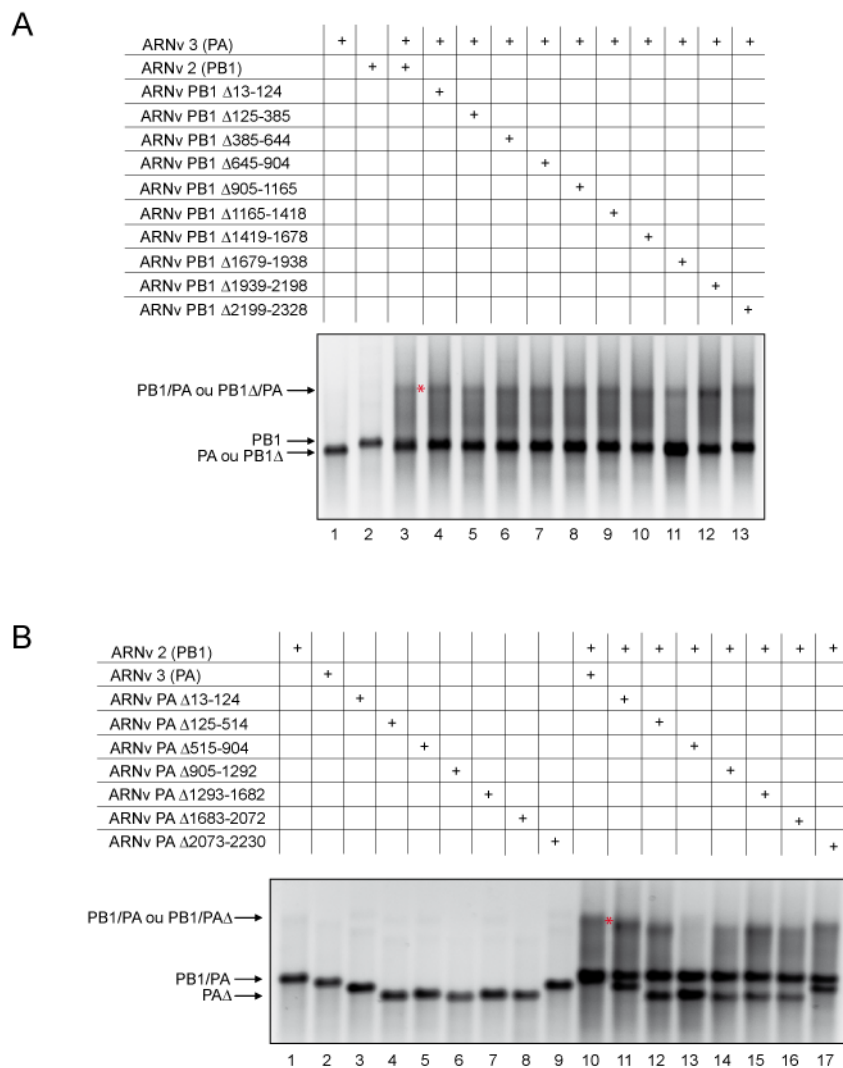


**Figure 60 :** Identification des régions impliquées dans l'interaction entre l'ARNv 4 (HA) et l'ARNv 8 (NS).

**A.** Interaction entre des ARNv 8 (NS) délétés et l'ARNv 4 (HA). **B.** Interaction entre les ARNv sauvages en présence d'oligonucléotides complémentaires à la région 257-554 de l'ARNv 8 (NS). **C.** Interaction entre des ARNv 4 (HA) délétés et l'ARNv 8 (NS). **D.** Hypothèses quant aux mécanismes d'interaction des 2 ARNv. **E.** Interaction entre les ARNv sauvages en présence d'oligonucléotides complémentaires à la région 442-466 de l'ARNv 4 (HA) et à la région 357-381 de l'ARNv 8 (NS).

### 1.2.8. Interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 3 (PA)

L'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 3 (PA) a été étudiée de manière plus succincte. L'utilisation d'ARNv délévés a permis de montrer que les régions 1679-1938 de l'ARNv 2 (PB1) (Figure 61A, piste 11 ; pour la migration des ARNv 2 (PB1) délévés seuls, voir la Figure 53A) et 515-904 de l'ARNv 3 (PA) (Figure 61B, piste 13) sont impliquées dans l'interaction entre ces 2 ARNv.

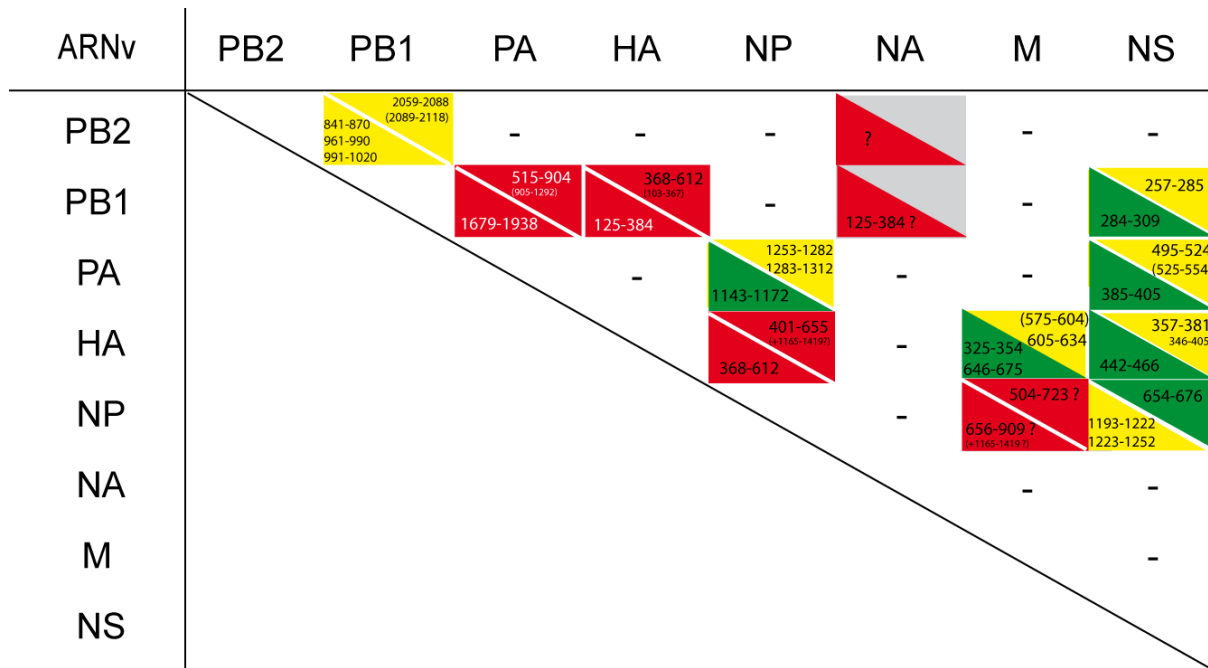


**Figure 61 :** Identification des régions impliquées dans l'interaction entre l'ARNv 2 (PB1) et l'ARNv 3 (PA).

**A.** Interaction entre des ARNv 2 (PB1) délévés et l'ARNv 3 (PA). **B.** Interaction entre des ARNv 3 (PA) délévés et l'ARNv 2 (PB1).

## 1.2.9. Conclusion

La Figure 62 résume les résultats obtenus quant aux régions impliquées dans les interactions entre ARNv, ainsi que les résultats obtenus lors de l'étude succincte d'autres interactions que nous avons choisi de ne pas détailler afin de rendre la lecture moins fastidieuse.

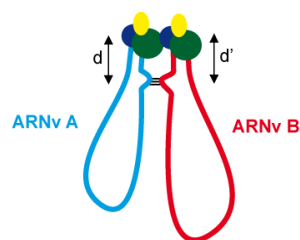


**Figure 62 :** Bilan des régions des ARNv de la souche England responsables des interactions observées à 55°C en présence d'un tampon de faible force ionique.

Rouge : régions identifiées uniquement à l'aide de délétions au niveau des ARNv. Jaune : régions identifiées à l'aide de délétions au niveau des ARNv, puis à l'aide d'oligonucléotides anti-sens s'hybridant tout le long de la région délétée. Vert : régions identifiées à l'aide d'oligonucléotides anti-sens s'hybridant au niveau de régions identifiées par analyse de séquences. Les positions des régions de l'ARNv sont données dans le sens 3' vers 5'. Les positions indiquées entre parenthèses indiquent des régions pour lesquelles la délétion diminue faiblement l'interaction. Le symbole « ? » signifie qu'il existe un doute sur la caractérisation de l'interaction.

Nous avons montré que les régions impliquées dans les interactions entre les ARNv de la souche England observées *in vitro* ne sont pas situées aux extrémités des ARNv comme c'est majoritairement le cas pour la souche Moscou (73) et ne correspondent pas aux régions décrites dans la littérature comme étant dédiées à l'incorporation des ARNv des souches WSN et PR8 (111). Si, comme dans le cas du virus Moscou, les RNPv sont suspendues parallèlement les unes par rapport aux autres à partir d'une plate-forme formée des complexes polymérase, les régions impliquées dans une interaction donnée devraient être situées à des distances semblables de cette plate-forme. A ce jour, les résultats préliminaires de tomographie obtenus sur des particules virales de la souche England n'ont pas permis de

mettre en évidence une telle plate-forme et on ne sait donc pas si elle existe. Néanmoins, afin de déterminer si les interactions identifiées peuvent exister si ce modèle est correct, nous avons calculé la distance en terme de nucléotides entre les régions impliquées dans les interactions identifiées et le promoteur qui est lié au complexe polymérase (Figure 63). Parmi les interactions bien caractérisées *in vitro*, nous pensons que seules les interactions entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS), entre les ARNv 4 (HA) et 7 (M), entre les ARNv 3 (PA) et 8 (NS) et entre les ARNv 4 (HA) et 8 (NS) peuvent avoir lieu au sein de particules virales en cours de bourgeonnement (Figure 63). Nous avons montré que la région 575-634 de l'ARNv 7 (M) peut interagir indifféremment avec l'ARNv 4 (HA) *via* les régions 325-354 ou 646-675 de ce dernier. Nous pensons cependant qu'au sein des particules virales, la région 654-667 est trop éloignée de l'extrémité 3' de l'ARNv pour pouvoir interagir avec la région 595-608 de l'ARNv 7 (M) et que l'interaction ne pourrait réellement se faire qu'entre les régions 336-343 de l'ARNv 4 (HA) et 626-633 de l'ARNv 7 (M). Le modèle proposé par Fournier *et al.* (73) pourrait ne pas s'appliquer au virus England et les RNPv pourraient s'assembler en un complexe macromoléculaire dans le cytoplasme sans que les complexes polymérase ne soient pour autant au même niveau. Dans ce cas, des interactions qualifiées de « peu probables » pourraient exister dans les particules virales en cours de bourgeonnement.



**Figure 63 :** Probabilité que les interactions identifiées entre les ARNv de la souche England existent dans les particules virales si les complexes polymérase associés aux promoteurs des ARNv sont disposés au même niveau.

ARNv A	ARNv B	Distance d	Distance d'	Existence de l'interaction dans les virions
ARNv 8 (NS)	ARNv 2 (PB1)	257-285 nts	284-309 nts	Possible
ARNv 5 (NP)	ARNv 3 (PA)	283-293 nts	1072-1082 nts	Peu probable
ARNv 7 (M)	ARNv 4 (HA)	420-432 nts	654-667 nts	Peu probable
ARNv 7 (M)	ARNv 4 (HA)	395-402 nts	336-343 nts	Possible
ARNv 2 (PB1)	ARNv 1 (PB2)	239-267 nts	964-994 nts	Peu probable
ARNv 8 (NS)	ARNv 5 (NP)	660-670 nts	340-350 nts	Peu probable
ARNv 8 (NS)	ARNv 3 (PA)	514-529 nts	389-402 nts	Possible
ARNv 8 (NS)	ARNv 4 (HA)	364-374 nts	449-459 nts	Possible

ARNv A	ARNv B	Distance d	Distance d'	Existence de l'interaction dans les virions
ARNv 3 (PA)	ARNv 2 (PB1)	515-904 nts	404-663 nts	Possible
ARNv 4 (HA)	ARNv 2 (PB1)	103-367 nts	125-384 nts	Possible
ARNv 4 (HA)	ARNv 2 (PB1)	368-612 nts	125-384 nts	Peu probable

### **1.3. Rôle de l'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) dans l'incorporation des ARNv et sur la réplication virale**

Nous nous sommes alors demandé si les interactions observées *in vitro* entre les ARNv de la souche England jouent un rôle dans l'incorporation d'un génome complet et/ou ont un impact sur la réplication virale. Nous nous sommes focalisés sur l'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) afin de répondre à cette question en produisant et en caractérisant des virus *in vitro* par génétique inverse (voir la partie « Matériels et Méthodes »).

L'ensemble des travaux présentés dans cette partie ont été réalisés dans le laboratoire Virologie et Pathologies Humaines (EMR 4610, Lyon) dirigé par le Pr B. Lina. Au cours de ma thèse, j'ai passé un peu plus de 3 mois dans ce laboratoire (du 24 janvier au 29 avril 2011). J'y ai travaillé en étroite collaboration avec Matthieu Yver (doctorant), sous la direction du Dr Vincent Moules. Afin de confirmer des résultats préliminaires obtenus par M. Yver, nous avons analysé la cinétique de réplication de particules virales possédant l'ARNv 2 (PB1) et/ou l'ARNv 8 (NS) muté(s) par RT-PCR quantitative et par détermination du titre viral en DICT<sub>50</sub>. Nous avons également cherché à déterminer par RT-PCR quantitative si l'incorporation d'un ou plusieurs ARNv est affectée. Enfin, nous avons produit des particules virales par génétique inverse compétitive et nous avons analysé leur génotype afin de déterminer si l'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) joue un rôle dans la sélection des ARNv qui sont incorporés. Signalons que la majorité de ces expériences dites de « compétition » ont été réalisées par M. Yver après mon départ.

#### **1.3.1. Phénotype de virus possédant l'ARNv 2 (PB1) et/ou l'ARNv 8 (NS) muté(s)**

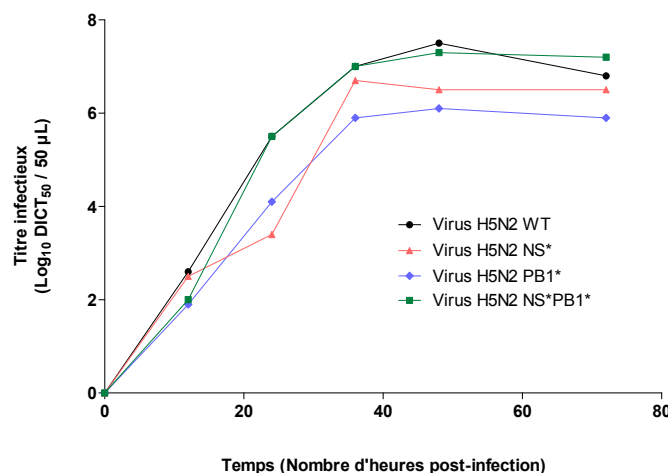
Les séquences des ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) portant les 4 mutations compensatoires décrites précédemment (voir § 1.2.1.) ont été clonées dans les vecteurs pHW2000. Nous avons ensuite produit par génétique inverse (voir la partie « Matériels et Méthodes ») 4 types de particules virales : (i) des particules virales sauvages (appelées « Virus H5N2 WT »), (ii) des particules dont l'ARNv 8 (NS) sauvage est remplacé par la version possédant les mutations compensatoires (« Virus H5N2 NS\* »), (iii) des particules dont l'ARNv 2 (PB1) sauvage est remplacé par la version possédant les mutations compensatoires (« Virus H5N2 PB1\* »), et enfin, (iv) des particules dont les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) sauvages sont tous

deux remplacés par leur version possédant les mutations compensatoires (« Virus H5N2 NS\*PB1\* »). Après 2 passages des surnageants de cultures sur cellules MDCK, des stocks de chacun des 4 virus ont été réalisés et congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  sous forme de fractions aliquotes à partir desquelles les caractéristiques phénotypiques des virus ont été étudiées.

### 1.3.1.1. Etude de la réplication du virus

Des cellules MDCK ont été infectées avec les 4 types de virus à une MOI de  $10^{-4}$ . Des fractions aliquotes des surnageants de culture ont été prélevées au cours du temps afin de caractériser les propriétés réplcatives des virus.

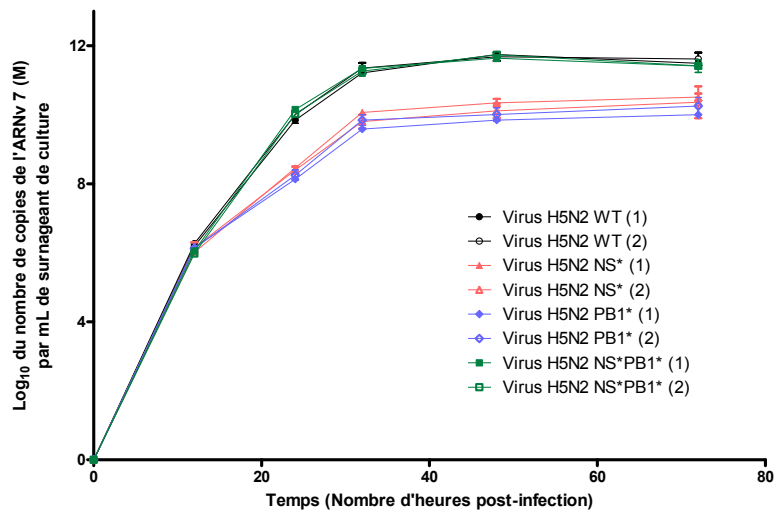
Dans un premier temps, les titres viraux en  $\text{DICT}_{50} / 50 \mu\text{L}$  ont été déterminés aux différents temps de la cinétique pour chaque virus (Figure 64). Les titres infectieux des virus H5N2 WT et H5N2 NS\*PB1\* sont très proches à tous les temps étudiés. En revanche, les titres des virus H5N2 NS\* et H5N2 PB1\* sont plus faibles que ceux du virus H5N2 WT (Figure 64). Ainsi, 24 heures après l'infection, le titre du virus H5N2 WT est égal à  $10^{5,5}$   $\text{DICT}_{50} / 50 \mu\text{L}$ , le titre du virus H5N2 NS\* est de  $10^{3,4}$   $\text{DICT}_{50} / 50 \mu\text{L}$  et le titre du virus H5N2 PB1\* est de  $10^{4,1}$   $\text{DICT}_{50} / 50 \mu\text{L}$ . A 48 heures post-infection, le titre du virus H5N2 WT est égal à  $10^{7,5}$   $\text{DICT}_{50} / 50 \mu\text{L}$ , le titre du virus H5N2 NS\* est de  $10^{6,5}$   $\text{DICT}_{50} / 50 \mu\text{L}$  et le titre du virus H5N2 PB1\* est de  $10^{6,1}$   $\text{DICT}_{50} / 50 \mu\text{L}$ . Il semble donc que l'absence d'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) inhibe légèrement la réplication virale et provoque une baisse du titre viral d'au moins un log.



**Figure 64 :** Effet des mutations compensatoires réalisées au niveau des régions responsables de l'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) de la souche England sur la cinétique de réplication virale déterminée en  $\text{Log}_{10} \text{DICT}_{50} / 50 \mu\text{L}$  de surnageant de culture.



Dans un second temps, les ARNv présents dans les surnageants de culture ont été extraits et la quantité d'ARNv 7 (M) a été dosée par RT-PCR quantitative (Figure 65). Le nombre de copies de l'ARNv 7 (M) est très similaire dans le surnageant de culture des virus H5N2 WT et H5N2 NS\*PB1\*, mais il est plus faible dans les surnageants des cultures des virus H5N2 NS\* et H5N2 PB1\* : à 48 heures post-infection, il y a en moyenne 30 et 65 fois moins d'ARNv 7 (M) dans les surnageants de culture des virus H5N2 NS\* et H5N2 PB1\* respectivement que dans ceux des cultures de virus H5N2 WT. Ces différences suggèrent que l'absence d'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et (NS) inhibe légèrement la réplication virale et que moins de particules virales incorporant des ARNv sont formées.



**Figure 65 :** Effet des mutations compensatoires réalisées au niveau des régions responsables de l'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) de la souche England sur la cinétique de réplication virale déterminée en quantifiant l'ARNv 7 (M) présent dans les surnageants de culture.

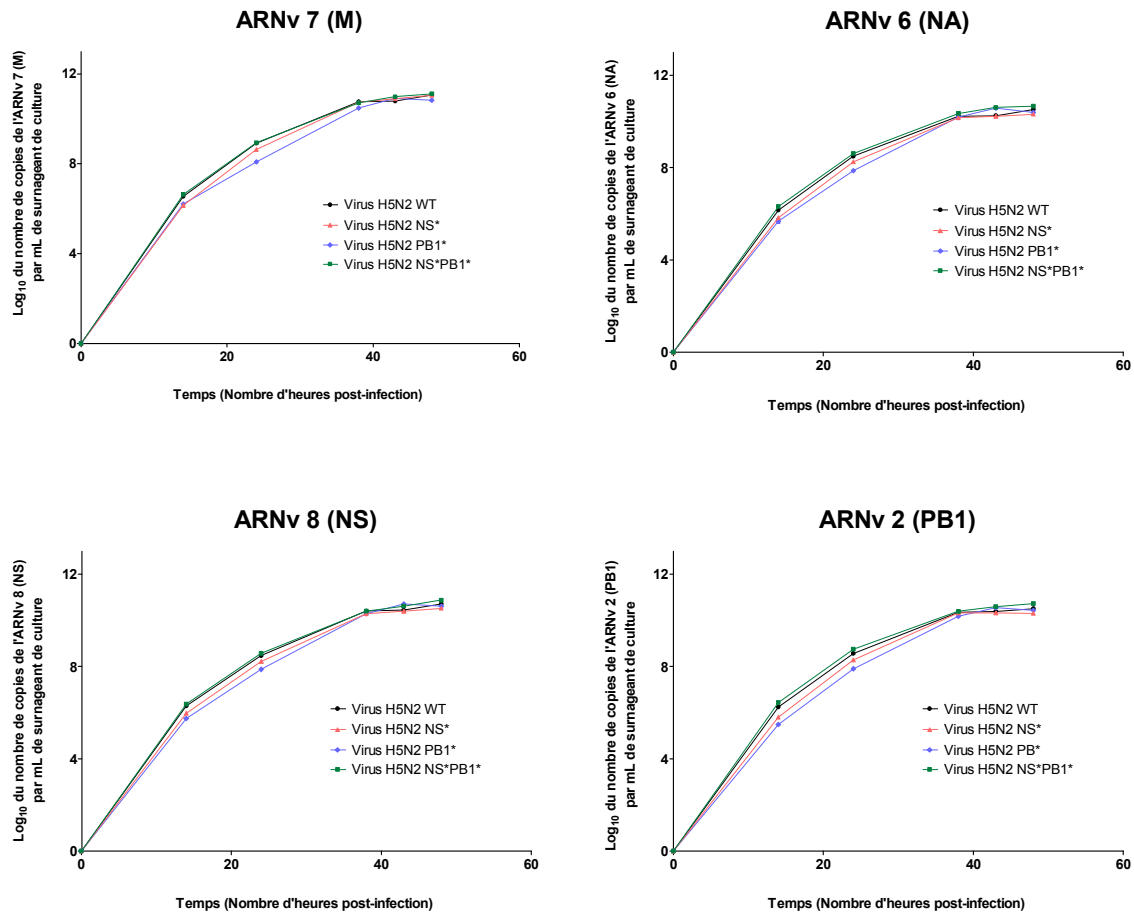
Pour chaque virus, les résultats obtenus pour 2 expériences indépendantes, désignées par (1) et (2), ont été reportés indépendamment sur le graphique. Dans l'expérience (1), l'ARNv 7 (M) a été dosé 3 fois au cours de la même expérience de RT-PCR quantitative alors que dans l'expérience (2), il n'a été dosé que 2 fois. Les barres d'erreurs représentent la SEM.

### 1.3.1.2. Etude de l'incorporation des ARNv dans les particules virales

#### 1.3.1.2.1. RT-PCR quantitative sur des ARNv extraits des surnageants de culture

Afin de déterminer si les mutations affectent l'incorporation des ARNv dans les virions, des cellules MDCK ont été infectées avec les 4 virus à MOI  $10^{-4}$ , des fractions aliquotes des surnageants de culture ont été prélevées à différents temps et les quantités d'ARNv 2 (PB1), 6 (NA) et 8 (NS) ont été déterminées par RT-PCR quantitative. Les résultats obtenus sont reportés sur la Figure 66 au niveau de laquelle l'évolution de la quantité de l'ARNv 7 (M) au cours de la même cinétique a également été représentée.

Les résultats obtenus indiquent que, globalement, l'évolution au cours du temps de la quantité des ARNv 7 (M), 6 (NA), 8 (NS) ou 2 (PB1) dans les surnageants de cultures des virus mutants est presque similaire à celle observée dans le surnageant de culture du virus H5N2 WT (Figure 66). Nous pensons donc que les mutations n'affectent pas, ou peu, l'incorporation dans les virions d'un des 4 ARNv quantifiés. Nous avons cependant été surpris de constater que les différences en terme de nombre de copies de l'ARNv 7 (M) dans les surnageants de cultures sont moins marquées que dans les expériences précédentes (Figure 65). En effet, à 24 heures post-infection, ce nombre de copies est à peine 2 et 7 fois plus faible dans les surnageants de culture des virus H5N2 NS\* et H5N2 PB1\* respectivement que dans le surnageant de culture du virus H5N2 WT. A 48 heures post-infection, le nombre de copies de l'ARNv 7 (M) est similaire quelque soit le virus. Il est donc important de reproduire l'expérience pour valider nos résultats.



**Figure 66 :** Effet des mutations compensatoires réalisées au niveau des régions responsables de l'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) de la souche England sur la cinétique de répllication virale déterminée en quantifiant dans le surnageant de culture l'ARNv 7 (M), l'ARNv 6 (NA), l'ARNv 8 (NS) et l'ARNv 2 (PB1).

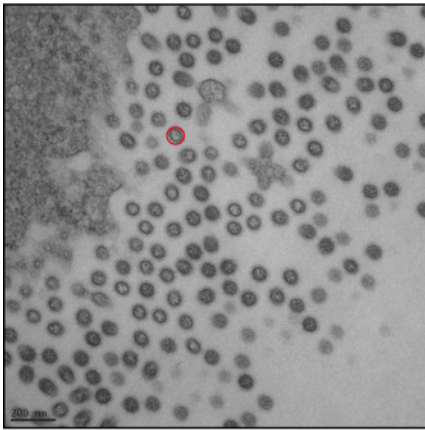
Pour chaque virus, 2 fractions aliquotes du surnageant de culture ont été prélevées à chacun des temps indiqués, puis les ARNv présents dans ces fractions ont été extraits indépendamment. Les ARNv présents dans ces 2 échantillons ont été dosés de manière indépendante par 2 expériences de RT-PCR quantitative distinctes. Au cours de chaque expérience de RT-PCR quantitative, chaque ARNv à un temps donné est quantifié 3 fois. Nous représentons ici pour chaque virus à un temps donné la moyenne des 6 valeurs obtenues  $\pm$  la SEM.

### 1.3.1.2.2. Etude par microscopie électronique à transmission

Nous avons également observé le contenu en RNPv de particules virales par microscopie électronique à transmission. Des cellules MDCK ont été infectées à MOI  $10^{-4}$  avec les 4 types de virus et, dès l'apparition d'ECP, les cellules ont été fixées. Toutes les étapes après la fixation des cellules ont été réalisées par le Centre Technologique des Microstructures (EZUS LYON 1, UCBL, Villeurbanne).

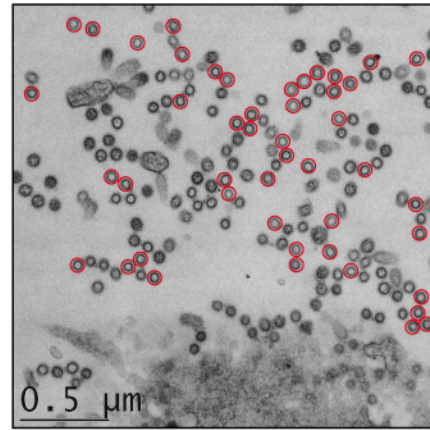
La majorité des particules virales du virus H5N2 WT possèdent une ou plusieurs RNPv clairement visibles sur les coupes observées, puisque seules 20 particules virales sur 410 observées (5 %) sont vides (Figure 67). La proportion de particules virales ne possédant pas de RNPv est sensiblement supérieure pour le virus H5N2 NS\* puisque 61 particules sur 135 observées (45 %) ne présentent pas de RNPv (Figure 67). La proportion de particules virales ne possédant pas de RNPv est également supérieure pour le virus H5N2 PB1\* puisque 231 particules sur 558 observées (41 %) ne présentent pas de RNPv (Figure 67). Dans la mesure, où les mutations sont localisées au niveau de 2 ARNv différents et qu'elles n'affectent pas les séquences des protéines PB1, NS1 et NEP/NS2, il est peu probable que ces observations puissent s'expliquer par un allongement des particules virales et/ou une stimulation du bourgeonnement en l'absence de RNPv. Bien que nous n'ayons pas cherché à quantifier la production de particules virales par microscopie électronique, le nombre de particules de virus simple mutant par coupe est systématiquement inférieur à celui des virus sauvage et double mutant. Nous pensons que les mutations, et donc l'absence d'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS), conduisent à un retard d'incorporation des RNPv dans les particules virales. Si tel est effectivement le cas, la présence simultanée des ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) mutés devrait permettre d'observer une faible proportion de particules virales vides. Sur 574 particules du virus H5N2 NS\* PB1\*, 108 (19 %) ne présentent pas de RNPv visible (Figure 67). La proportion de particules vides est donc inférieure à celle observée à partir de coupes de virus ne possédant qu'un ARNv muté, mais elle reste tout de même supérieure à la situation sauvage. Quoiqu'il en soit, la restauration partielle du défaut d'incorporation des RNPv dans les virus H5N2 NS\* PB1\* étaye le rôle de l'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) dans ce mécanisme.

Virus H5N2 WT



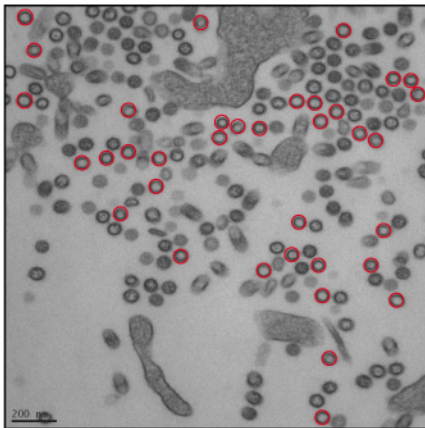
5 % de particules virales vides  
(20 / 410)

Virus H5N2 NS\*



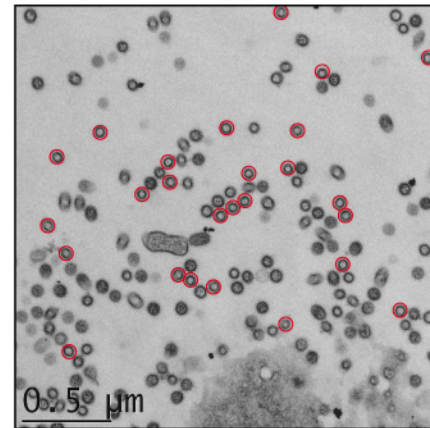
45 % de particules virales vides  
(61 / 135)

Virus H5N2 PB1\*



41 % de particules virales vides  
(231 / 558)

Virus H5N2 NS\* PB1\*



19 % de particules virales vides  
(108 / 574)

**Figure 67:** Observation de coupes transversales de particules virales en cours de bourgeonnement.

Les particules virales ne contenant pas de RNPv sont entourées en rouge.

## **1.3.2. Etude de l'incorporation des ARNv dans les virions par génétique inverse compétitive et par la méthode de « transfection-infection »**

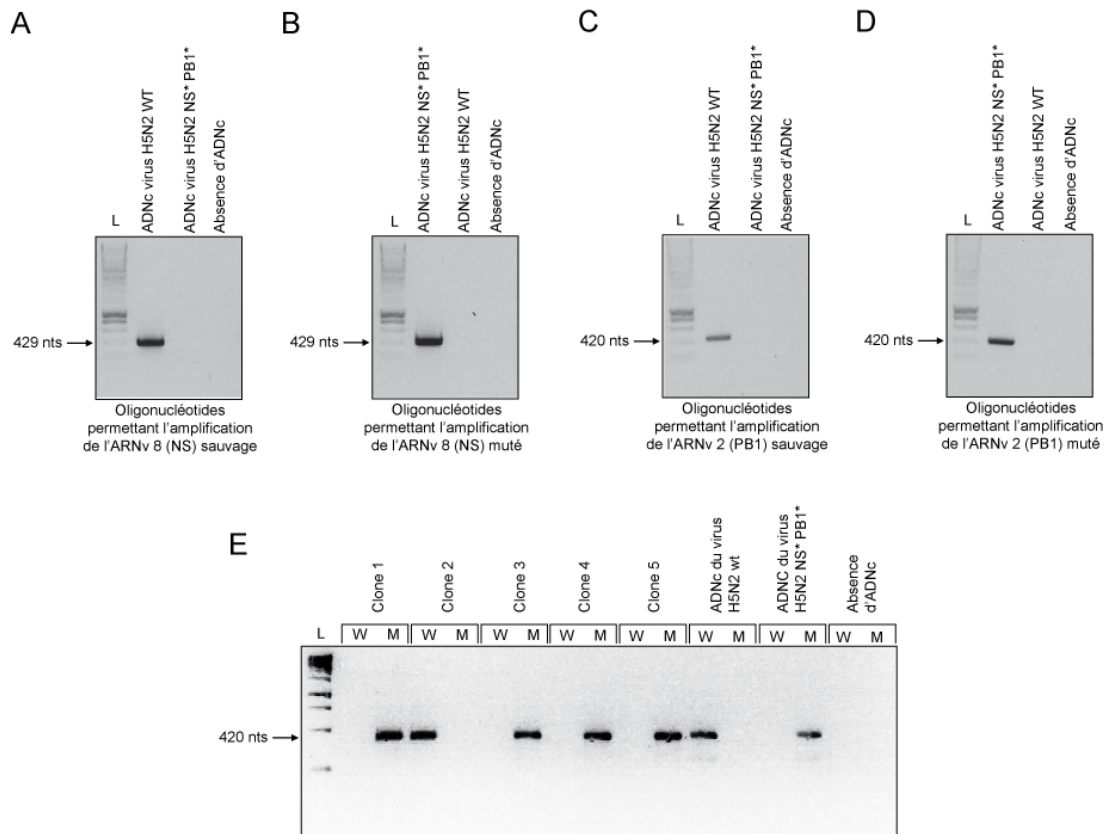
### 1.3.2.1. Etude par génétique inverse compétitive

Si l'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) caractérisée *in vitro* est importante au moment de la sélection des ARNv qui seront incorporés dans les particules virales, les 2 ARNv partenaires sauvages (ou les 2 ARNv partenaires mutés) devraient être incorporés plus efficacement qu'un ARNv sauvage et son ARNv partenaire muté.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons utilisé une stratégie de génétique inverse compétitive basée sur la transfection de cellules 293T/17 avec 9 plasmides : les 6 plasmides du système de génétique inverse du virus England dans lesquels sont clonées les séquences des ARNv 1 (PB2), 3 (PA), 4 (HA), 5 (NP), 6 (NA) et 7 (M) et 3 plasmides dans lesquels sont clonées les séquences des ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) sauvages et/ou mutés selon les cas. Les virus produits ont été isolés par plage de lyse et leur génotype a partiellement été déterminé par PCR (Figure 68).

En présence de l'ARNv 8 (NS) sauvage, l'ARNv 2 (PB1) sauvage est incorporé dans 83 % des particules virales (39 clones sur 47 analysés) tandis que la version mutée de l'ARNv 2 (PB1) n'est incorporée que dans 17 % des particules (Figure 69, condition 1). Par ailleurs, en présence de l'ARNv 2 (PB1) sauvage, l'ARNv 8 (NS) sauvage est systématiquement incorporé dans les particules virales (30 clones analysés) bien que l'ARNv 8 (NS) muté soit présent dans la cellule (Figure 69, condition 2). La mutation d'un ARNv inhibe donc son incorporation.

En présence de l'ARNv 8 (NS) muté, c'est la version mutée de l'ARNv 2 (PB1) qui est majoritairement incorporée, puisque 87 % des particules virales (13 clones sur 15 analysés) incorporent l'ARNv 2 (PB1) muté (Figure 69, condition 3). D'autre part, en présence de l'ARNv 2 (PB1) muté, c'est la version mutée de l'ARNv 8 (NS) qui est majoritairement incorporée, puisque 95 % des particules virales (52 clones sur 55 analysés) incorporent l'ARNv 8 (NS) muté (Figure 69, condition 4). Ce résultat démontre que l'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) de la souche England joue un rôle important au niveau de la sélection des ARNv qui seront incorporés dans les particules virales. Ainsi nous avons démontré, pour la première fois, qu'une interaction directe entre 2 ARNv est impliquée dans leur incorporation au sein des particules virales.



**Figure 68 :** Identification par PCR des ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) incorporés dans les virions **A-D**. Contrôle de la spécificité des amorces de PCR. **E**. Exemple de gel réalisé afin d'identifier la version de l'ARNv 8 (NS) incorporée dans les particules virales. W : amplification de l'ARNv 8 (NS) sauvage ; M : amplification de l'ARNv 8 (NS) muté ; L : échelle de poids moléculaire.

	Condition 1	Condition 2	Condition 3	Condition 4
Plasmides utilisés pour la transfection				
Génotype attendu pour le virus majoritairement produit	 	 	 	 
Génotype du virus majoritairement produit	 	 	 	 
Proportion de virus produits présentant le génotype majoritaire	<b>83 %</b> (39 clones / 47)	<b>100 %</b> (30 clones / 30)	<b>87 %</b> (13 clones / 15)	<b>95 %</b> (52 clones / 55)

**Figure 69 :** Etude de l'incorporation d'un ARNv 2 (PB1) ou 8 (NS) dans sa version sauvage ou mutée dans différents contextes génétiques par génétique inverse compétitive. Les 6 plasmides dans lesquels les séquences des ARNv 1 (PB2), 3 (PA), 4 (HA), 5 (NP), 6 (NA) et 7 (M) ont été clonées n'ont pas été représentés.

### 1.3.2.2. Etude par la méthode de « transfection-infection »

Une autre méthode, appelée « transfection-infection », a été utilisée pour déterminer le rôle de l'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) détectée *in vitro* dans la sélection des RNPv. Cette méthode consiste à transfecter les cellules avec un plasmide dans lequel la séquence de l'un des 2 ARNv, sous sa version sauvage ou mutée, est clonée, puis à infecter les cellules avec différents virus afin de déterminer dans quel contexte génétique l'ARNv exprimé à partir du plasmide transfecté est incorporé le plus efficacement.

Lorsque les cellules sont transfectées avec un plasmide codant l'ARNv 2 (PB1) ou l'ARNv 8 (NS) sauvages puis sont infectées avec le virus H5N2 NS\* PB1\* (Figure 70, conditions 1 et 2), l'ARNv sauvage n'est jamais incorporé dans les particules virales. De même, lorsque les cellules sont transfectées avec un plasmide codant l'ARNv 2 (PB1) ou l'ARNv 8 (NS) mutés puis sont infectées avec le virus H5N2 WT (Figure 70, conditions 3 et 4), l'ARNv muté n'est jamais incorporé dans les particules virales. En revanche, la transfection des cellules avec le plasmide codant l'ARNv 2 (PB1) sauvage suivie de son infection avec le virus H5N2 PB1\* (Figure 70, conditions 5) permet l'incorporation de l'ARNv 2 (PB1) sauvage dans 100 % des particules virales produites. Après transfection des cellules avec le plasmide codant l'ARNv 8 (NS) sauvage et infection par le virus H5N2 NS\* (Figure 70, condition 6), l'ARNv 8 (NS) sauvage est incorporé dans 91 % des particules virales. Enfin, la transfection des cellules avec le plasmide codant l'ARNv 2 (PB1) muté suivie de leur infection avec le virus H5N2 NS\* (Figure 70, conditions 7) permet l'incorporation de l'ARNv 2 (PB1) muté dans 67 % des particules virales produites. Ces résultats montrent que l'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) de la souche England joue un rôle crucial au moment de la sélection des ARNv qui seront incorporés dans les virions.



	Condition 1	Condition 2	Condition 3	Condition 4	Condition 5	Condition 6	Condition 7	Condition 8
Plasmide utilisé pour la transfection								
Génotype du virus utilisé pour l'infection	PB1 muté NS muté	PB1 muté NS muté	PB1 sauvage NS sauvage	PB1 sauvage NS sauvage	PB1 muté NS sauvage	PB1 sauvage NS muté	PB1 sauvage NS muté	PB1 muté NS sauvage
Génotype attendu pour le virus majoritairement produit	PB1 muté NS muté	PB1 muté NS muté	PB1 sauvage NS sauvage	PB1 sauvage NS sauvage	PB1 sauvage NS sauvage	PB1 sauvage NS sauvage	PB1 muté NS muté	PB1 muté NS muté
Génotype du virus majoritairement produit	PB1 muté NS muté	PB1 muté NS muté	PB1 sauvage NS sauvage	PB1 sauvage NS sauvage	PB1 sauvage NS sauvage	PB1 sauvage NS sauvage	PB1 muté NS muté	En cours
Proportion de virus produit présentant le génotype majoritaire	<b>100 %</b> (20 clones / 20)	<b>100 %</b> (16 clones / 16)	<b>100 %</b> (20 clones / 20)	<b>100 %</b> (18 clones / 18)	<b>100 %</b> (10 clones / 10)	<b>91 %</b> (10 clones / 11)	<b>67 %</b> (12 clones / 18)	En cours

**Figure 70 :** Etude de l'incorporation d'un ARNv 2 (PB1) ou 8 (NS) dans sa version sauvage ou mutée dans différents contextes génétiques par la méthode de « transfection-infection ». Les virus utilisés pour l'infection possèdent des ARNv 1 (PB2), 3 (PA), 4 (HA), 5 (NP), 6 (NA) et 7 (M) sauvages. Ces ARNv sauvages sont également présents dans les particules virales nouvellement produites.

### 1.3.3. Conclusion

Dans cette partie, nous avons cherché à déterminer si l'interaction mise en évidence *in vitro* entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) de la souche England joue un rôle dans l'incorporation des ARNv dans les virions. Dans ce but, des ARNv possédant des mutations compensatoires qui n'affectent pas les séquences des protéines PB1, NS1 et NEP/NS2 ont été utilisés.

Nous avons montré que les virus ne possédant qu'un des 2 ARNv mutés (virus H5N2 NS\* et virus H5N2 PB1\*) se répliquent plus lentement que le virus H5N2 WT. En revanche, le virus possédant les 2 ARNv mutés (virus H5N2 NS\* PB1\*) se réplique au moins aussi bien que le virus H5N2 WT. L'absence d'interaction entre les 2 ARNv inhibe donc la réplication virale. Nous avons également montré par observation de coupes de particules virales en microscopie électronique que la présence d'un seul ARNv muté conduit à une augmentation de la proportion de particules virales dépourvues de RNPv. En revanche, la présence de mutations compensatoires au niveau des 2 ARNv permet de restaurer partiellement l'incorporation des RNPv. Dans la mesure où nos données de RT-PCR quantitatives indiquent que les ARNv 2 (PB1), 6 (NA), 7 (M) ou 8 (NS) sont présents à des taux similaires dans les particules virales d'un type de virus donné, il est probable que l'incorporation des 8 ARNv

soit inhibée simultanément. Enfin, les stratégies de génétique inverse compétitive utilisées nous ont permis de démontrer que l'interaction identifiée entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) joue un rôle essentiel dans le processus de sélection des ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) qui seront incorporés dans les virions.

Nous avons donc montré, pour la première fois, que l'interaction directe entre 2 ARNv joue un rôle essentiel dans leur incorporation au sein des particules virales.

#### **1.4. Discussion**

Nous avons commencé ce travail en cherchant à mettre en évidence *in vitro* un réseau d'interactions spécifiques entre les ARNv de la souche England en co-transcrivant ces ARNv 2 à 2 comme cela avait été réalisé précédemment au laboratoire avec les ARNv de la souche Moscou (73). Nous nous sommes alors rendu compte que les conditions expérimentales qui avaient été utilisées pour mettre en évidence un réseau d'interactions entre les ARNv de la souche Moscou n'étaient pas adaptées dans notre cas. Les génomes d'*Influenzavirus A* aviaires sont connus pour être enrichis en dinucléotides CpG dans un contexte riche en A/U par rapport aux génomes des virus humains (91, 207). Il semblerait également que les ARNv des *Influenzavirus A* aviaires soient plus structurés que les ARNv des souches humaines. En effet, afin d'obtenir des ADNc à partir d'ARNv extraits de virus aviaires, il est nécessaire de les chauffer à 70°C avant de réaliser une RT-PCR, ce qui n'est pas le cas avec des ARNv extraits de virus humains. Enfin, les virus aviaires et humains n'ont pas le même tropisme puisque les virus aviaires se répliquent dans le tractus digestif des volailles à une température de 41°C environ tandis que les virus humains se répliquent dans l'appareil respiratoire supérieur à une température de 33°C environ (154). Ces différences pourraient expliquer que des conditions permettant de mettre en évidence des interactions spécifiques entre les ARNv d'une souche humaine ne soient pas adaptées pour une souche aviaire.

Nous avons testé différentes conditions expérimentales afin de mettre en évidence des interactions spécifiques entre les ARNv de la souche England. Nous avons montré que l'incubation des ARNv à 55°C dans un milieu de faible force ionique permet de mettre en évidence des interactions intermoléculaires *a priori* spécifiques, alors qu'une incubation à 37°C et/ou l'ajout de sels inhibent la formation de ces interactions. De prime abord, ces résultats sont également assez surprenants car on considère traditionnellement que les conditions deviennent plus stringentes lorsque la température augmente et/ou lorsque la

concentration en  $Mg^{2+}$  diminue. Cependant, comme les ARNv des virus aviaires sont vraisemblablement plus structurés que ceux des virus humains, nous pensons que les conditions testées pourraient déstabiliser certaines structures secondaires des ARNv, permettant ainsi aux régions responsables des interactions intermoléculaires de se reconnaître.

On pourrait nous reprocher que les conditions *in vitro* utilisées ne reflètent pas la réalité des particules virales, notamment parce que les ARNv ne sont pas associés à un complexe polymérase et à des protéines NP. L'absence de complexe polymérase ne nous semble pas cruciale car des ARNv associés à des protéines NP peuvent adopter des structures semblables à des RNPv (262). L'absence de protéine NP est plus critique puisqu'il semble que ce soit cette protéine qui impose sa structure à la RNPv (214). Néanmoins, la structure cristallographique de cette protéine suggère que l'ARNv est présent à la surface des protéines NP (179, 265) et il a été montré par cartographie en solution que la présence de protéines NP augmente l'accessibilité des bases de l'ARNv (10). La présence de protéines NP devrait donc faciliter les interactions intermoléculaires entre ARNv plutôt que les prévenir. De plus, il a été montré au laboratoire que la protéine NP n'affecte pas la spécificité de l'interaction entre les ARNv 6 (NA) et 7 (M) de la souche Moscou (73). Enfin, dans la mesure où durant ma thèse nous avons montré que l'interaction identifiée par EMSA entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) de la souche England joue un rôle crucial dans le processus d'incorporation des ARNv dans les particules virales, nous pensons que la méthodologie utilisée pour mettre en évidence des interactions entre ARNv en l'absence de protéine virale est valide.

Nous avons mis en évidence *in vitro* un réseau d'interactions intermoléculaires spécifiques entre les ARNv de la souche England qui est clairement différent de celui de la souche Moscou étudiée précédemment au laboratoire. L'intérieur de particules virales de la souche England par la technique de tomographie électronique est actuellement en cours d'étude par l'équipe de D. Thomas (Rennes). Cette reconstitution devrait permettre d'identifier la position relative de certaines RNPv dans les particules virales. Etant donné les résultats des expériences de retard sur gel, nous nous attendons à ce que la disposition relative des RNPv diffère entre les virus Moscou et England.

Pour la plupart des interactions entre ARNv de la souche England, nous avons identifié les nucléotides impliqués. Alors que les données de la littérature montrent que les régions responsables de l'incorporation des ARNv sont localisées à leurs extrémités (111) et que les régions responsables des interactions *in vitro* entre les ARNv de la souche Moscou sont majoritairement à leurs extrémités (73), les régions responsables des interactions entre les ARNv de la souche England sont localisées beaucoup plus à distance des extrémités des

ARNv (Figure 63). Bien que cette localisation puisse paraître surprenante, certains auteurs ont déjà suggéré que les régions centrales de certains ARNv pourraient tout de même être impliquées dans le processus d'incorporation des ARNv (161, 251) et des travaux récents menés au laboratoire montrent que certaines interactions entre ARNv de la souche Moscou ne se font pas *via* leurs extrémités (Sirbat *et al.*, données non publiées).

Le rôle de régions conservées entre différentes souches dans le processus d'incorporation des ARNv a été démontré (89, 110-112, 149) bien que deux études récentes suggèrent que les séquences au niveau des régions dédiées à l'incorporation des ARNv ne jouent pas un rôle crucial (76, 195). Au cours de ma thèse, nous avons réalisé une analyse bioinformatique préliminaire afin de rechercher dans la base de données du NCBI l'existence de mutations compensatoires au niveau des régions homologues à celles responsables de l'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) de la souche England. Bien que nous ayons mis en évidence quelques mutations compensatoires pour des ARNv de souches aviaires de sous-types H3N2 et H5N2, leur nombre est nettement inférieur au nombre de mutations non compensatoires. Nous pensons néanmoins qu'une étude similaire devrait être reproduite par des bioinformaticiens en augmentant la taille de l'échantillon de séquences et analysant les ARNv de souches appartenant à tous les sous-types connus. De telles études bioinformatiques devraient également être envisagées dans tous les cas où les nucléotides impliqués dans des interactions entre ARNv ont été identifiés précisément.

Durant ma thèse, nous avons analysé le rôle de l'interaction identifiée *in vitro* entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) de la souche England au niveau du processus d'incorporation des ARNv dans les particules virales. Nous avons montré l'importance de cette interaction dans l'incorporation des 8 ARNv et que la présence de mutations inhibant cette interaction affecte, de façon plus limitée, la réplication virale. Nous pensons donc que cette interaction joue un rôle déterminant car chacun de ces 2 ARNv interagit également *in vitro* avec d'autres ARNv et ces interactions pourraient être suffisantes pour maintenir un complexe macromoléculaire de 8 RNPv différentes.

L'incorporation préférentielle dans les particules virales d'ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) qui peuvent interagir, démontrée par 2 techniques de génétique inverse compétitive différentes, constitue la preuve indiscutable que l'interaction mise en évidence *in vitro* entre ces 2 ARNv existe réellement au moment de la sélection des ARNv qui seront incorporés dans les virions et qu'elle joue un rôle primordial dans la sélection des ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) qui seront incorporés. Bien que l'existence d'interactions directes et spécifiques entre

ARNv gouvernant leur incorporation soit soupçonnée depuis longtemps, nous apportons ici la preuve qu'un tel mécanisme existe.

## **2. Réassortiment génétique entre les souches Moscou et England**

### **2.1. Incorporation de l'ARNv 4 (HA) du virus England dans le virus Moscou**

Le réassortiment génétique *in vitro* entre les souches Moscou et England est étudié au laboratoire Virologie et Pathologies Humaines (EMR 4610, Lyon) dirigé par le Pr B. Lina et a fait l'objet du travail de thèse de Boris Essere (thèse soutenue à Lyon le 16 juin 2011). Au cours de sa thèse, B. Essere s'est plus particulièrement intéressé à l'incorporation de l'ARNv 4 (HA) du virus England dans le fond génétique du virus Moscou, car un tel virus réassortant pourrait potentiellement être à l'origine d'une pandémie grippale. Dans la mesure où les mécanismes permettant l'incorporation des ARNv des souches Moscou et England sont étudiés dans l'équipe Rétrovirus et Virus à ARN (UPR 9002 du CNRS, Strasbourg) dirigée par le Dr R. Marquet, les 2 laboratoires ont collaboré afin de caractériser les incompatibilités génomiques qui limitent le réassortiment génétique entre ces souches. Dans une première partie, je décrirai succinctement les résultats des expériences de réassortiment génétique *in vitro* réalisées par B. Essere (paragraphe 2.1.1.), puis, dans une seconde partie, je présenterai ma contribution à ce projet (paragraphe 2.1.2.).

#### **2.1.1. Réassortiment génétique entre les deux souches (Thèse de B. Essere)**

##### **2.1.1.1. Co-ségrégation de certains ARNv au cours du réassortiment génétique**

Dans un premier temps, des cellules 293T/17 ont été co-transfectées par les deux jeux de plasmides de génétique inverse permettant la production des particules virales Moscou et England. Cette méthodologie permet une équimolarité des ARNv lors du processus de réassortiment génétique sans tenir compte des paramètres virologiques des deux virus parentaux. Les virus produits à l'issue de cette co-transfection ont été isolés et purifiés par plage de lyse. L'origine de chaque segment de gène a ensuite été déterminée en restreignant le criblage aux virus réassortants possédant l'ARNv 4 (HA) England dans le fond génétique du virus Moscou (21 sur 100 clones analysés). Parmi ces virus, seuls 6 génotypes différents ont été trouvés (Tableau 15) et dans tous les cas, les ARNv 3 (PA) et 7 (M) England ont été incorporés dans les virus réassortants avec l'ARNv 4 (HA) England.

	ARNv 1 (PB2)	ARNv 2 (PB1)	ARNv 3 (PA)	ARNv 4 (HA)	ARNv 5 (NP)	ARNv 6 (NA)	ARNv 7 (M)	ARNv 8 (NS)	Nombre de virus
Génotype 1	England	Moscou	England	England	England	Moscou	England	Moscou	8
Génotype 2	Moscou	Moscou	England	England	Moscou	Moscou	England	Moscou	5
Génotype 3	England	England	England	England	England	Moscou	England	Moscou	2
Génotype 4	England	England	England	England	England	Moscou	England	England	2
Génotype 5	Moscou	Aviaire	England	England	England	England	England	Moscou	1
Génotype 6	Moscou	Moscou	England	England	Moscou	England	England	England	1

**Tableau 15 :** Compositions génétiques des virus réassortants possédant l'ARNv 4 (HA) aviaire suite à la co-transfection de cellules 293T/17 avec les plasmides de génétique inverse permettant de produire les virus Moscou et England.

Dans un second temps, comme il est possible que certains paramètres virologiques favorisent le réassortiment génétique, des cellules MDCK ont été co-infectées par les virus Moscou et England à une MOI de 5 et les virus produits ont été isolés par plage de lyse 10 heures plus tard. Sur 100 clones analysés, 20 sont des virus réassortants qui possèdent l'ARNv 4 (HA) England. Ces virus présentent 7 génotypes différents (Tableau 16) qui diffèrent de ceux obtenus précédemment en co-transfectant les cellules avec les plasmides de génétique inverse permettant de produire les 2 virus parentaux. Cependant, comme précédemment, les ARNv 3 (PA) et 7 (M) England sont incorporés en plus de l'ARNv 4 (HA) England (sauf dans un cas où l'ARNv 7 (M) provient de la souche Moscou).

	ARNv 1 (PB2)	ARNv 2 (PB1)	ARNv 3 (PA)	ARNv 4 (HA)	ARNv 5 (NP)	ARNv 6 (NA)	ARNv 7 (M)	ARNv 8 (NS)	Nombre de virus
Génotype 1	Moscou	Moscou	England	England	Moscou	Moscou	England	Moscou	5
Génotype 2	England	England	England	England	Moscou	Moscou	England	Moscou	4
Génotype 3	Moscou	Moscou	England	England	Moscou	Moscou	Moscou	Moscou	3
Génotype 4	Moscou	Moscou	England	England	England	Moscou	England	Moscou	3
Génotype 5	Moscou	England	England	England	Moscou	Moscou	England	Moscou	2
Génotype 6	Moscou	England	England	England	Moscou	Moscou	England	Moscou	2
Génotype 7	Moscou	England	England	England	England	Moscou	England	Moscou	1

**Tableau 16 :** Compositions génétiques des virus réassortants possédant l'ARNv 4 (HA) aviaire suite à la co-infection de cellules MDCK avec les virus Moscou et England.

Les résultats obtenus suggèrent fortement l'existence d'un phénomène de restriction au sein du processus de réassortiment génétique limitant le nombre de compositions génomiques différentes des virus réassortants. Ce phénomène a déjà été décrit dans la littérature, et il a notamment été montré que l'incorporation d'un ARNv 4 (HA) non humain

(aviaire, porcin ou équin) dans le fond génétique d'un virus humain circulant est toujours associée à l'incorporation d'autres ARNv non humains (115, 139, 187, 243).

Dans les expériences de réassortiment génétique présentées ici, les ARNv 3 (PA) et 7 (M) sont presque toujours systématiquement associés à l'ARNv 4 (HA), même s'il est possible de produire par génétique inverse un virus réassortant possédant uniquement l'ARNv 4 (HA) England et que ce virus présente une cinétique de réplication et un titre infectieux similaires à ceux observés pour le virus Moscou. Il se pourrait donc que le nombre de compositions génomiques différentes des virus réassortants soit limité par une incompatibilité entre les ARNv des 2 souches parentales.

### 2.1.1.2. Les séquences aux extrémités des ARNv dans le réassortiment génétique

Une stratégie de génétique inverse compétitive a été utilisée pour étudier l'incorporation de l'ARNv 4 (HA) England dans un fond génétique d'un virus humain. Lorsque les ARNv 4 (HA) des souches England et Moscou sont exprimés simultanément dans la cellule infectée en présence des 7 autres ARNv de la souche Moscou, l'ARNv 4 (HA) Moscou est toujours incorporé dans les particules virales, même si, pour la transfection des cellules, la quantité du plasmide codant cet ARNv est deux fois plus faible que la quantité de plasmide codant l'ARNv 4 (HA) England (Tableau 17, condition 1). Comme il est possible de remplacer l'ARNv 4 (HA) Moscou par l'ARNv homologue de la souche England par génétique inverse « classique », ce résultat suggère une incompatibilité génomique entre l'ARNv 4 (HA) England et les autres ARNv de la souche Moscou.

	ARNv 1 (PB2)	ARNv 2 (PB1)	ARNv 3 (PA)	ARNv 4 (HA)	ARNv 5 (NP)	ARNv 6 (NA)	ARNv 7 (M)	ARNv 8 (NS)	Pourcentage de virus réassortants
<b>Condition 1</b>	Moscou	Moscou	Moscou	Moscou & England	Moscou	Moscou	Moscou	Moscou	0 %
<b>Condition 2</b>	Moscou	Moscou	Moscou	Moscou	Moscou	Moscou & England	Moscou	Moscou	21 %
<b>Condition 3</b>	Moscou	Moscou	Moscou	Moscou & Chimère	Moscou	Moscou	Moscou	Moscou	44 %

**Tableau 17 :** Résultats des expériences de génétique inverse compétitive entre les ARNv des souches England et Moscou.

Le terme « chimère » désigne un ARNv possédant les extrémités de l'ARNv 4 (HA) Moscou et la partie centrale de l'ARNv 4 (HA) England.



Les séquences nucléotidiques des ARNv 4 (HA) des souches England et Moscou présentent 49,18% d'identité. Afin de définir un lien possible entre le pourcentage d'identité nucléotidique entre deux ARNv et leur capacité à s'intégrer dans un fond génétique donné, l'approche de génétique inverse compétitive a été utilisée pour mettre en compétition les ARNv 6 (NA) des souches England et Moscou qui présentent un pourcentage d'identité nucléotidique de 82,61 %. Dans ce cas, 21 % des virus incorporent l'ARNv 6 (NA) England en présence des 7 autres ARNv de la souche Moscou (Tableau 17, condition 2). Ce résultat suggère que le faible pourcentage d'identité entre les 2 ARNv 4 (HA) est responsable de l'incapacité de l'ARNv 4 (HA) England à s'incorporer dans le fond génétique du virus Moscou.

Les régions codantes et non-codantes aux extrémités des ARNv sont impliquées dans leur incorporation au sein des virions (111) et il a été montré pour l'ARNv 4 (HA) de la souche WSN que, en plus des régions non-codantes, les 9 et les 80 nucléotides respectivement en 3' et 5' de la séquence codante, sont nécessaires et suffisants à son incorporation dans les particules virales (251). Dans le cas des ARNv 4 (HA) des souches England et Moscou, ces régions sont très différentes. Un ARNv 4 (HA) chimérique au niveau duquel les régions aux extrémités de l'ARNv 4 (HA) England ont été remplacées par les régions homologues de l'ARNv 4 (HA) Moscou a été construit. Des cellules 293T/17 ont été transfectées avec le plasmide exprimant cet ARNv chimérique et avec les 8 plasmides de génétique inverse codant les ARNv de la souche Moscou (Tableau 17, condition 3). Dans ce cas, l'ARNv chimérique est incorporé dans 44 % des particules virales. Les régions aux extrémités de l'ARNv 4 (HA) Moscou semblent donc jouer un rôle capital au moment de la sélection des ARNv qui seront incorporés dans les particules virales.

### 2.1.1.3. Rôle de la composition génomique sur la réplication des virus réassortants

Au sein de la souche Moscou, l'ARNv 4 (HA) interagit *in vitro* avec les ARNv 3 (PA), 7 (M) et 8 (NS) (73). Des virus Moscou dans lesquels les ARNv 3 (PA), 5 (NP), 7 (M) ou 8 (NS) ont été remplacés par les ARNv homologues de la souche England, en présence de l'ARNv 4 (HA) Moscou ou de l'ARNv homologue de la souche England, ont été produits par génétique inverse. L'analyse des titres infectieux indique que seules trois compositions génétiques permettent la production de particules virales infectieuses. Ces 3 virus sont : (i) le

virus Moscou au sein duquel les ARNv 3 (PA) et 4 (HA) sont remplacés par leurs homologues de la souche England (Tableau 18, génotype 1), (ii) le virus Moscou au sein duquel l'ARNv 7 (M) est remplacé par son homologue de la souche England (Tableau 18, génotype 2), et (iii) le virus Moscou au sein duquel les ARNv 4 (HA) et 7 (M) sont remplacés par leurs homologues de la souche England (Tableau 18, génotype 3).

	ARNv 1 (PB2)	ARNv 2 (PB1)	ARNv 3 (PA)	ARNv 4 (HA)	ARNv 5 (NP)	ARNv 6 (NA)	ARNv 7 (M)	ARNv 8 (NS)
<b>Génotype 1</b>	Moscou	Moscou	England	England	Moscou	Moscou	Moscou	Moscou
<b>Génotype 2</b>	Moscou	Moscou	Moscou	Moscou	Moscou	Moscou	England	Moscou
<b>Génotype 3</b>	Moscou	Moscou	Moscou	England	Moscou	Moscou	England	Moscou

**Tableau 18 :** Compositions génomiques permettant la production de virus infectieux.

#### 2.1.1.4. Rôle de l'ARNv 7 (M) England dans l'incorporation de l'ARNv 4 (HA) dans le fond génétique du virus Moscou

Suite aux résultats précédents (Tableau 18), B. Essere s'est focalisé sur le rôle de l'ARNv 7 (M) England dans l'incorporation de l'ARNv 4 (HA) dans le fond génétique du virus Moscou. Dans ce but, des cellules 293T/17 ont été transfectées avec les plasmides de génétique inverse codant les ARNv 1 (PB2), 2 (PB1), 3 (PA), 4 (HA), 5 (NP), 6 (NA) et 8 (NS) Moscou et ceux codant les ARNv 4 (HA) et 7 (M) England (Tableau 19, condition 1). L'analyse des virus produits montre qu'en présence de l'ARNv 7 (M) England, 70 % des particules virales incorporent l'ARNv 4 (HA) England et seulement 30 % l'ARNv 4 (HA) Moscou. L'ARNv 7 (M) England joue donc un rôle crucial dans l'incorporation de l'ARNv 4 (HA) England dans le fond génétique du virus Moscou.

	ARNv 1 (PB2)	ARNv 2 (PB1)	ARNv 3 (PA)	ARNv 4 (HA)	ARNv 5 (NP)	ARNv 6 (NA)	ARNv 7 (M)	ARNv 8 (NS)	Pourcentage d'incorporation de l'ARNv 4 (HA) England
<b>Condition 1</b>	Moscou	Moscou	Moscou	Moscou & England	Moscou	Moscou	England	Moscou	70 %
<b>Condition 2</b>	Moscou	Moscou	Moscou	Moscou & England	Moscou	Moscou	Chimère 3'	Moscou	60 %
<b>Condition 3</b>	Moscou	Moscou	Moscou	Moscou & England	Moscou	Moscou	Chimère 5'	Moscou	0 %

**Tableau 19 :** Résultats des expériences de génétique inverse compétitive entre les ARNv des souches England et Moscou.

Chimère 3' : ARNv 7 (M) Moscou dont l'extrémité 3' est remplacée par celle de l'ARNv 7 (M) England.  
Chimère 5' : ARNv 7 (M) Moscou dont l'extrémité 5' est remplacée par celle de l'ARNv 7 (M) England.

Dans la mesure où l'extrémité 3' de l'ARNv 7 (M) Moscou est impliquée dans l'interaction *in vitro* avec l'ARNv 4 (HA) Moscou (73), les 100 nucléotides à son extrémité 3' ont été remplacés par la région homologue de l'ARNv 7 (M) England. La comparaison des 100 premiers nucléotides à l'extrémité 3' de l'ARNv 7 (M) des 2 souches ne révèle que 5 différences (G/A en position 31, A/G en position 55, A/G en position 70, U/C en position 73 et U/C en position 94 ; positions données le sens 3' vers 5' de l'ARNv) qui ne modifient pas la séquence de la protéine M1. Des cellules 293T/17 ont été transfectées avec le plasmide de génétique inverse codant cet ARNv 7 (M) Moscou muté en 3', avec le plasmide codant l'ARNv 4 (HA) England et avec les plasmides codant les ARNv 1 (PB2), 2 (PB1), 3 (PA), 4 (HA), 5 (NP), 6 (NA) et 8 (NS) Moscou (Tableau 19, condition 2). Soixante % des particules virales produites ont incorporé l'ARNv 4 (HA) England tandis que 40 % ont incorporé l'ARNv 4 (HA) Moscou. En revanche, le remplacement de l'ARNv 7 (M) Moscou muté en 3' par un ARNv 7 (M) Moscou possédant une extrémité 5' identique à celle de l'ARNv 7 (M) England ne permet pas l'incorporation de l'ARNv 4 (HA) England dans les particules virales produites (Tableau 19, condition 3). L'extrémité 3' de l'ARNv 7 (M) Moscou semble donc permettre l'incorporation spécifique de l'ARNv 4 (HA) Moscou dans les particules virales au détriment de l'ARNv 4 (HA) England.

### **2.1.2. Corrélacion entre réassortiment génétique *in vitro* et interactions entre ARNv (Thèse de C. Gavazzi)**

Nous souhaitons déterminer si les interactions entre ARNv observées *in vitro* peuvent expliquer les résultats de réassortiment génétique obtenus par B. Essere. Dans la mesure où ces travaux avaient pour but de comprendre comment l'ARNv 4 (HA) England peut être incorporé dans le fond génétique du virus Moscou, nous avons pensé que le plus logique était de tester les interactions *in vitro* entre ARNv en co-transcrivant les ARNv deux à deux comme cela a été fait pour définir le réseau d'interactions entre les ARNv de la souche Moscou (73).

Au cours d'un travail préliminaire réalisé conjointement avec Emilie Fournier, nous avons testé toutes les possibilités d'interactions entre les ARNv de la souche Moscou et ceux de la souche England en les co-transcrivant deux à deux (Tableau 20). Les résultats indiquent

que l'ARNv 4 (HA) England n'interagit clairement qu'avec l'ARNv 7 (M) Moscou. Néanmoins, cette interaction est de faible intensité. Nous soupçonnons également que l'ARNv 4 (HA) England puisse interagir faiblement avec les ARNv 1 (PB2) et 3 (PA) Moscou, sans pouvoir cependant le prouver avec la technique utilisée.

		Souche Moscou							
		ARNv 1 (PB2)	ARNv 2 (PB1)	ARNv 3 (PA)	ARNv 4 (HA)	ARNv 5 (NP)	ARNv 6 (NA)	ARNv 7 (M)	ARNv 8 (NS)
Souche England	ARNv 1 (PB2)	-	-	?	+/-	-	-	-	-
	ARNv 2 (PB1)	-	-	?	+/-	-	-	-	-
	ARNv 3 (PA)	-	-	-	?	-	-	-	-
	ARNv 4 (HA)	?	-	?	-	-	-	+/-	-
	ARNv 5 (NP)	++	+	++	?	-	-	?	?
	ARNv 6 (NA)	++	+	+	?	-	-	+	+
	ARNv 7 (M)	+/-	+/-	++	+/-	-	-	-	-
	ARNv 8 (NS)	?	?	++	-	-	-	-	-

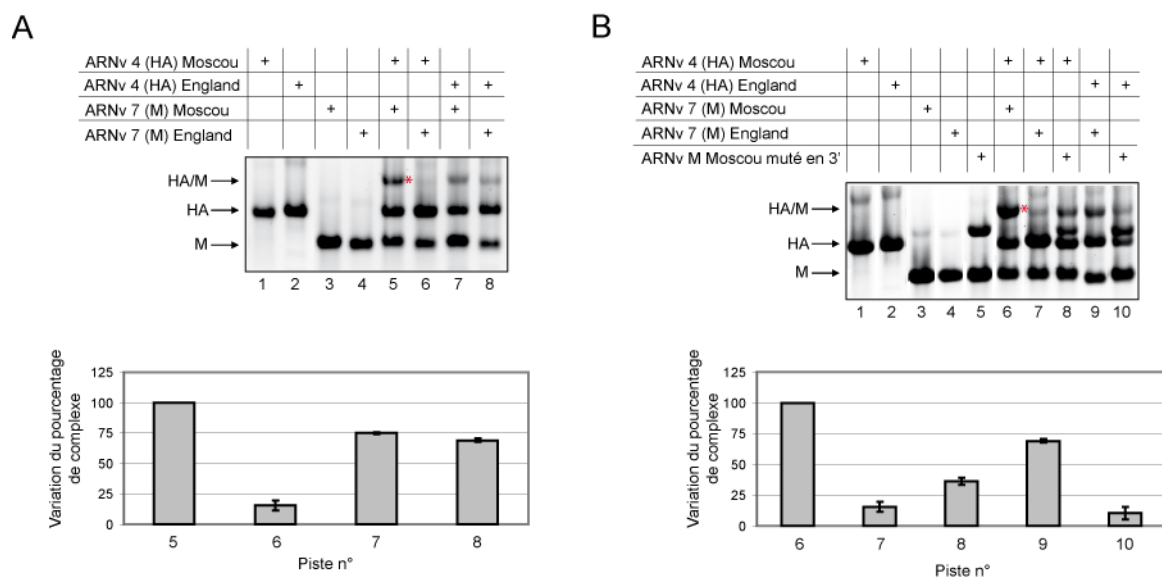
**Tableau 20 :** Interactions *in vitro* entre les ARNv de la souche Moscou et ceux de la souche England.

Le symbole « - » indique que les 2 ARN testés n'interagissent pas ensemble dans les conditions testées. Les symboles « +/- », « + » et « ++ » indiquent respectivement des interactions faibles, moyennes et fortes. Le symbole « ? » signifie que nous ne savons pas avec la technique utilisée si les 2 ARN testés interagissent entre eux ou non.

Etant donné que B. Essere a montré, par des expériences de génétique inverse compétitive, que l'extrémité 3' de l'ARNv 7 (M) Moscou est responsable de l'incorporation spécifique de l'ARNv 4 (HA) Moscou dans les particules virales au détriment de l'ARNv 4 (HA) England, nous avons décidé de nous focaliser sur les interactions entre les ARNv 4 (HA) et 7 (M) dans la suite de ce travail.

Au cours des expériences réalisées, les ARNv 4 (HA) et 7 (M) Moscou interagissent (Figure 71A, piste 5) et la proportion de complexe est estimée à 34 %. Ces résultats sont en bonne adéquation avec ceux obtenus précédemment au laboratoire puisqu'il avait été estimé que 35 % des 2 ARNv interagissaient ensemble (73). L'ARNv 4 (HA) Moscou interagit faiblement avec l'ARNv 7 (M) England puisque seuls 5 % des ARNv sont complexés (Figure 71A, piste 6). L'ARNv 4 (HA) England interagit quant à lui de façon similaire avec les ARNv 7 (M) des souches Moscou et England (Figure 71A, pistes 7 et 8 respectivement). La proportion de complexe formé est aux alentours de 25 %.

Le fait que l'ARNv 7 (M) Moscou interagisse plus fortement avec l'ARNv 4 (HA) Moscou qu'avec l'ARNv 4 (HA) England pourrait expliquer en partie l'incorporation exclusive de l'ARNv 4 (HA) Moscou dans le fond génétique du virus Moscou lors des expériences de compétition entre ARNv 4 (HA) (Tableau 17, condition 1). Le fait que l'interaction entre l'ARNv 7(M) England et l'ARNv 4 (HA) Moscou est beaucoup plus faible que celle entre l'ARNv 7 (M) England et l'ARNv 4 (HA) England pourrait expliquer que, en présence de l'ARNv 7 (M) England, l'ARNv 4 (HA) England est majoritairement incorporé dans le fond génétique du virus Moscou lors des expériences de compétition entre ARNv 4 (HA) (Tableau 19, condition 1).



**Figure 71 :** Interactions *in vitro* entre les ARNv 4 (HA) et 7 (M) Moscou et England co-transcrits deux à deux.

**A.** Interactions entre les ARNv 4 (HA) et 7 (M) Moscou et England. La proportion de complexe (en pourcentage) par rapport à la quantité totale d'ARN par piste a été déterminée (moyenne de 2 à 9 expériences  $\pm$  SEM). **B.** Effet du remplacement de la région 3' de l'ARNv 7 (M) Moscou par la région homologue de l'ARNv 7 (M) England sur les interactions avec les ARNv 4 (HA) Moscou et England. La proportion de complexe (en pourcentage) par rapport à la quantité totale d'ARN par piste a été déterminée (moyenne de 2 à 9 expériences  $\pm$  SEM).

L'interaction *in vitro* de l'ARNv 7 (M) Moscou dont l'extrémité 3' est identique à celle de l'ARNv 7 (M) England (« ARNv M Moscou muté en 3' ») avec les ARNv 4 (HA) des souches Moscou et England a également été analysée. Rappelons que l'extrémité 3' de l'ARN 7 (M) Moscou est responsable de son interaction *in vitro* avec l'ARNv 4 (HA) Moscou (73). Nous montrons que le remplacement de l'extrémité 3' de l'ARNv 7 (M) Moscou par l'extrémité 3' de l'ARNv 7 (M) England inhibe l'interaction avec l'ARNv 4 (HA) Moscou

puisque le pourcentage de complexe entre les 2 ARNv passe de 34 % à 13 % (Figure 71B, pistes 6 et 8 respectivement). L'interaction est tout de même plus forte que celle observée entre les ARNv 4 (HA) et 7 (M) England, puisque dans ce dernier cas, le pourcentage de complexe n'est que de 5 % (Figure 71B, piste 7). L'ARNv 4 (HA) England quant à lui ne forme que 4 % de complexe avec l'ARNv 7 (M) Moscou muté en 3' alors qu'il forme 24 % de complexe avec l'ARNv 7 (M) England (Figure 71B, pistes 10 et 9 respectivement). Il est donc possible que l'extrémité 3' de l'ARNv 7 (M) England ne soit pas impliquée dans l'interaction avec l'ARNv 4 (HA) England. Enfin, signalons que, pour une raison indéterminée, le remplacement de l'extrémité 3' de l'ARNv 7 (M) Moscou par l'extrémité 3' de l'ARNv 7 (M) England induit une forte homodimérisation de l'ARNv (Figure 71B, piste 5) qui ne disparaît pas lorsque cet ARNv est impliqué dans une interaction avec les ARNv 4 (HA) des souches Moscou et England (Figure 71B, pistes 8 et 10 respectivement).

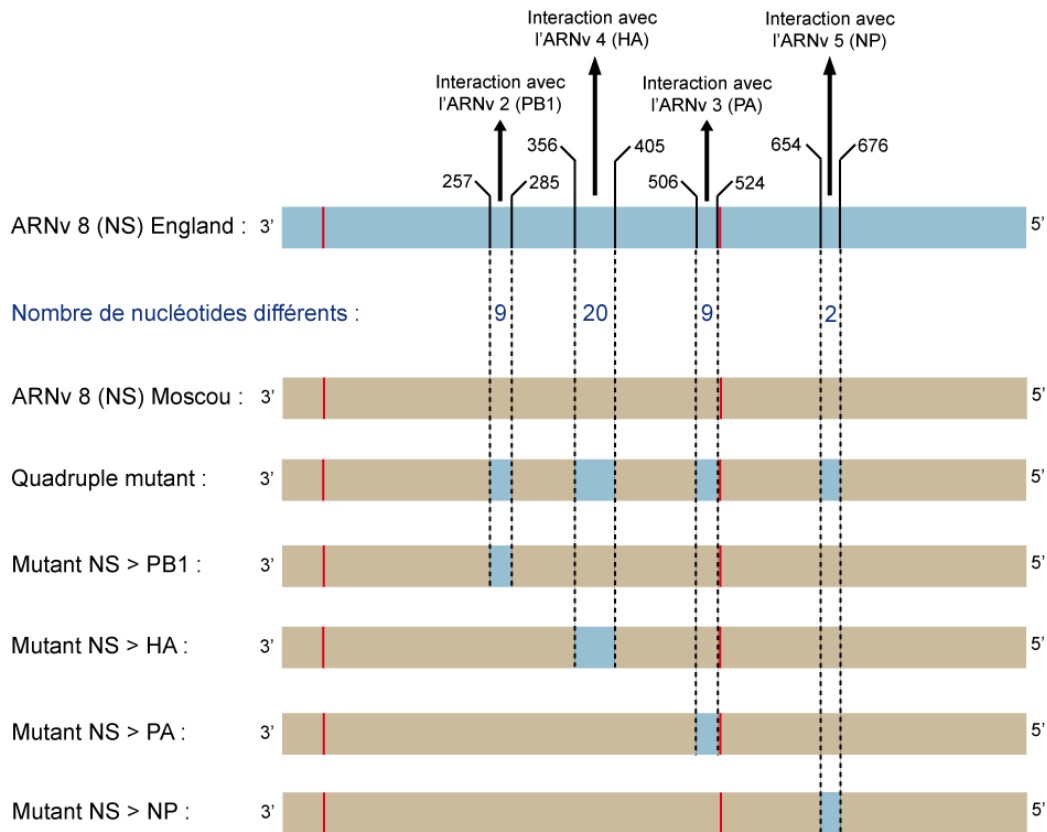
La diminution prononcée de l'interaction entre l'ARNv 4 (HA) Moscou et l'ARNv 7 (M) Moscou lorsque ce dernier est muté en 3' pourrait expliquer que, lors des expériences de compétition entre les ARNv 4 (HA) Moscou et England, l'ARNv 4 (HA) Moscou n'est pas majoritairement incorporé en présence de l'ARNv 7 (M) Moscou muté en 3' (Tableau 19, condition 2) alors qu'il est systématiquement incorporé en présence de l'ARNv 7 (M) Moscou (Tableau 17, condition 1). Les résultats de nos expériences d'EMSA ne permettent cependant pas d'expliquer que l'ARNv 4 (HA) England soit un peu plus incorporé que l'ARNv 4 (HA) Moscou en présence de l'ARNv 7 (M) muté en 3' (Tableau 19, condition 2).

Dans l'ensemble, les résultats des expériences de réassortiment génétique réalisées par B. Essere peuvent être expliqués par la force des interactions observées *in vitro* en co-transcrivant des ARNv des souches Moscou et England ensemble ou avec l'ARNv 7 (M) Moscou muté en 3'.

## **2.2. Modification de l'ARNv 8 (NS) de la souche Moscou afin d'optimiser son incorporation dans le fond génétique du virus England**

L'ARNv 8 (NS) England interagit *in vitro* avec les ARNv 2 (PB1), 3 (PA), 4 (HA) et 5 (NP) de la même souche (Figure 44). Nous avons souhaité savoir si les régions responsables de ces quatre interactions ont une influence sur l'interaction de l'ARNv 8 (NS) Moscou avec les ARNv de la souche England et d'autre part, si elles peuvent diriger ou améliorer l'incorporation de l'ARNv 8 (NS) Moscou dans le virus England.

Dans ce but, les gènes d'ARNv 8 (NS) Moscou mutants possédant tout ou partie des régions de l'ARNv 8 (NS) England identifiées, grâce à l'hybridation d'oligonucléotides anti-sens, comme responsables de son interaction avec les ARNv 2 (PB1), 3 (PA), 4 (HA) et 5 (NP) aviaires (Figure 72) ont été synthétisés *in vitro* (Eurogentec®) puis clonés dans les vecteurs pUC2000 et pHW2000. Nous avons inclus dans la région de l'ARNv 8 (NS) responsable de l'interaction avec l'ARNv 4 (HA) le nucléotide en position 356 localisé immédiatement en amont de la région à laquelle s'hybrident les 2 oligonucléotides inhibant l'interaction entre les ARNv de la souche England. La région de l'ARNv 8 (NS) responsable de l'interaction avec l'ARNv 3 (PA) a été localisée entre les positions 495-554 grâce à des oligonucléotides anti-sens et la zone d'interaction a été réduite aux positions 514-527 en y introduisant des mutations compensatoires (voir Figure 59). Le site accepteur d'épissage utilisé pour former le transcrit codant NEP/NS2 étant localisé aux positions 527-528, nous avons décidé de n'insérer que la région 506-524 de l'ARNv 8 (NS) England dans l'ARNv homologue de la souche Moscou (les nucléotides aux positions 525-527 sont identiques entre les ARNv des 2 souches) afin de diminuer les risques de perturber l'épissage du transcrit. Par ailleurs, l'insertion dans l'ARNv 8 (NS) de séquences provenant de l'ARNv homologue de la souche England modifie les séquences des protéines NS1 et NEP/NS2, et nous ne pouvons pas savoir quel est l'impact de ces mutations sur la fonctionnalité des protéines qui seront produites.



**Figure 72 :** Description des ARNv 8 (NS) de la souche Moscou mutants possédant les régions de l'ARNv 8 (NS) England identifiées comme responsables de l'interaction avec les ARNv 2 (PB1), 3 (PA), 4 (HA) et 5 (NP).

Les positions sont indiquées dans le sens 3' vers 5' de l'ARNv. Les positions indiquées correspondent aux premiers et aux derniers nucléotides des régions impliquées dans les interactions. Le nombre de nucléotides différents entre les régions homologues des ARNv 8 (NS) Moscou et England est indiqué. Les 2 traits rouges indiquent les positions des sites donneurs et accepteurs d'épissage.

Une expérience de retard sur gel préliminaire a été réalisée en incubant les ARNv de la souche England avec les différents ARNv 8 (NS) Moscou mutants. Même si certaines interactions témoins sont plus faibles que précédemment, nous avons tout de même choisi de présenter succinctement ces résultats.

Nous avons montré précédemment que les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) England interagissent fortement ensemble et que 82 % des ARNv participent au complexe. Dans l'expérience réalisée ici, nous avons rencontré un problème technique puisque l'interaction entre ces 2 ARNv est moins forte que prévu, seuls 47 % des ARNv participant au complexe (Figure 73A, piste 15). L'interaction entre l'ARNv 2 (PB1) England avec l'ARNv 8 (NS) Moscou est environ 5 fois plus faible (Figure 73A, piste 9). Parmi les ARNv 8 (NS) Moscou mutants, seuls 2 ARNv mutants, d'une part le « quadruple mutant » possédant les régions de



l'ARNv 8 (NS) England identifiées comme responsables de son interaction avec les ARNv 2 (PB1), 3 (PA), 4 (HA) et 5 (NP) England et d'autre part le « mutant NS > PB1 » possédant la région de l'ARNv 8 (NS) responsable de l'interaction avec l'ARNv 2 (PB1) England, interagissent plus fortement que l'ARNv 8 (NS) Moscou avec l'ARNv 2 (PB1) England (Figure 73A, pistes 10 et 11). Même si l'interaction n'est pas aussi forte que celle entre les 2 ARNv England, ces résultats montrent que la région de l'ARNv 8 (NS) England responsable de l'interaction avec l'ARNv 2 (PB1) England peut favoriser *in vitro* l'interaction d'un ARNv 8 (NS) Moscou dans lequel elle est insérée avec l'ARNv 2 (PB1) England.

L'ARNv 8 (NS) Moscou interagit environ 2 fois moins que l'ARNv 8 (NS) England avec l'ARNv 3 (PA) (Figure 73B, pistes 9 et 15). Parmi les mutants testés, seul le « mutant NS > PA » possédant la région de l'ARNv 8 (NS) England impliquée dans son interaction avec l'ARNv 3 (PA) England interagit plus fortement que l'ARNv 8 (NS) Moscou avec l'ARNv 3 (PA) England (Figure 73B, piste 12). De façon surprenante, le quadruple mutant n'interagit pas plus fortement que l'ARNv 8 (NS) Moscou avec l'ARNv 3 (PA) (Figure 73B, piste 10).

Lors de l'expérience présentée ici, les ARNv 8 (NS) Moscou et England interagissent de façon quasiment similaire avec l'ARNv 5 (NP) (Figure 73C, pistes 9 et 15). Nous remarquons que, parmi les mutants testés, le quadruple mutant et le « mutant NS > NP » possédant la région de l'ARNv 8 (NS) England impliquée dans son interaction avec l'ARNv 5 (NP) England interagissent plus fortement que l'ARNv 8 (NS) England avec l'ARNv 3 (PA) England (Figure 73C, pistes 10 et 13), les autres mutants testés interagissant moins fortement que l'ARNv 8 (NS) Moscou avec l'ARNv 3 (PA) England (Figure 73C, pistes 11, 12 et 14).

L'ARNv 8 (NS) Moscou présente la particularité d'interagir 2,5 fois plus que l'ARNv 8 (NS) England avec l'ARNv 4 (HA) England (Figure 73D, pistes 9 et 15). De façon très surprenante, tous les ARNv mutants testés interagissent autant que l'ARNv 8 (NS) Moscou avec l'ARNv 4 (HA) England, sauf le « mutant NS > PB1 » et le « mutant NS > HA » qui interagissent quant à eux un peu plus fortement que l'ARNv 8 (NS) Moscou avec l'ARNv 4 (HA) England (Figure 73D, pistes 9 à 15). Nous n'avons actuellement aucune explication à cette observation.



L'ARNv 8 (NS) England n'interagit pas avec l'ARNv 7 (M) England (Figure 73E, piste 15) à la différence de l'ARNv 8 (NS) Moscou (Figure 73E, piste 9). A la différence des mutants « NS > PA », « NS > NP » et « NS > HA » qui peuvent toujours interagir avec l'ARNv 7 (M) England (Figure 73E, pistes 12 à 14), le quadruple mutant et le « mutant NS > PB1 » n'interagissent plus avec l'ARNv 7 (M) England (Figure 73E, pistes 10 et 11). Ces résultats semblent indiquer que la région de l'ARNv 8 (NS) Moscou homologue à la région de l'ARNv 8 (NS) responsable de l'interaction avec l'ARNv 2 (PB1) England est quant à elle responsable de l'interaction avec l'ARNv 7 (M) England.

L'ARNv 8 (NS) Moscou, l'ARNv 8 (NS) England et les différents mutants testés ici n'interagissent pas avec les ARNv 1 (PB2) et 6 (NA) (résultats non montrés).

Les données présentées ici ne correspondent pas totalement à ce que nous attendions, mais dans la moitié des cas, la présence au niveau de l'ARNv 8 (NS) Moscou d'une région d'interaction pour un ARNv donné de la souche England augmente spécifiquement l'interaction de l'ARNv 8 (NS) Moscou avec cet ARNv (Figure 73A, pistes 10 et 11 ; Figure 73B, piste 12 ; Figure 73B, pistes 10 et 13).

Nous avons produit par génétique inverse d'une part un virus England dans lequel l'ARNv 8 (NS) est remplacé par l'ARNv 8 (NS) Moscou et d'autre part, un virus England dans lequel l'ARNv 8 (NS) est remplacé par le « quadruple mutant » (Figure 72). Nous essayons actuellement de déterminer, par une stratégie de génétique inverse compétitive entre l'ARNv 8 (NS) Moscou et le « quadruple mutant », si comme nous le pensons le quadruple mutant est préférentiellement incorporé dans le fond génétique du virus England. Nous cherchons également à déterminer, toujours par génétique inverse compétitive, si le quadruple mutant s'incorpore aussi efficacement que l'ARNv 8 (NS) England dans le fond génétique du virus England. Enfin, les 4 régions de l'ARNv 8 (NS) England étant également insérées individuellement dans l'ARNv 8 (NS) Moscou, nous avons commencé à évaluer le rôle de chaque région dans l'incorporation du quadruple mutant dans un fond génétique England.

### **2.3. Discussion**

Au cours de sa thèse, B. Essere a étudié *in vitro* le réassortiment génétique entre les souches Moscou et England. L'analyse du génotype des particules virales réassortantes produites a montré que l'ARNv 4 (HA) England est toujours incorporé avec d'autres ARNv de la souche England dans le fond génétique du virus Moscou, alors que le remplacement de l'ARNv 4 (HA) Moscou par celui du virus England n'inhibe pas la réplication virale. Ces résultats concordent avec des données publiées précédemment quant à l'incorporation d'un ARNv 4 (HA) étranger dans le fond génétique d'un virus humain (115, 138, 187, 192). La co-ségrégation de certains ARNv au cours du réassortiment semble assez courante (139, 144, 243). Dans cette étude, il a été remarqué que pratiquement toutes les particules virales réassortantes qui possèdent l'ARNv 4 (HA) England incorporent également les ARNv 3 (PA) et 7 (M) England. Le nombre de génotypes différents au sein des particules virales réassortantes possédant un ARNv 4 (HA) étranger dans un fond génétique humain est généralement très limité par rapport au nombre théorique de génotypes possibles par réassortiment génétique ( $2^7 = 128$  génotypes différents) (115, 138, 187). L'analyse du génotype de 41 particules réassortantes possédant l'ARNv 4 (HA) England dans le fond génétique du virus Moscou n'a mis en évidence que 13 génotypes différents. Ce résultat suggère une incompatibilité entre certaines protéines virales et/ou certains ARNv des virus Moscou et England. Il a également été remarqué que les génotypes des virus réassortants possédant l'ARNv 4 (HA) England sont différents selon leur mode de production : production par co-transfection de cellules avec les 2 jeux de plasmides de génétique inverse codant les ARNv des virus parentaux ou production par co-infection de cellules avec les 2 virus parentaux. Les paramètres virologiques mis en jeu dans l'émergence de virus réassortants obtenus par co-infection (notamment l'absence d'équimolarité des ARNv) pourraient expliquer en partie les différences observées.

B. Essere a recherché les facteurs génomiques limitant le réassortiment génétique entre les souches Moscou et England. Il a montré l'importance de l'origine des régions aux extrémités des ARNv au cours du réassortiment génétique. En effet, lorsque les séquences aux extrémités de l'ARNv 4 (HA) England sont remplacées par les séquences homologues de la souche Moscou, l'ARNv recombinant peut être incorporé dans le fond génétique du virus Moscou, contrairement à l'ARNv 4 (HA) England. Il a ensuite cherché à déterminer si les interactions de l'ARNv 4 (HA) Moscou avec les autres ARNv de la souche Moscou, mises en

évidence par EMSA (73), peuvent être un facteur limitant l'incorporation de l'ARNv 4 (HA) England dans le fond génétique du virus Moscou. Il s'est alors focalisé sur le rôle de l'interaction entre les ARNv 4 (HA) et 7 (M). Il a montré que lorsque l'ARNv 7 (M) Moscou est remplacé par l'ARNv 7 (M) England, l'ARNv 4 (HA) England peut être incorporé dans un fond génétique humain malgré la présence de l'ARNv 4 (HA) Moscou dans les cellules. Un résultat similaire est observé lorsque l'extrémité 3' de l'ARNv 7 (M) Moscou, responsable *in vitro* de l'interaction avec l'ARNv 4 (HA) Moscou (73), est remplacée par la région homologue de l'ARNv 7 (M) England, alors que ces 2 régions ne diffèrent que par 5 nucléotides.

Nous avons apporté notre concours à cette étude en analysant *in vitro* l'interaction entre certains ARNv des souches Moscou et England, puis entre certains ARNv de ces souches et l'ARNv 7 (M) Moscou dont l'extrémité 3' est remplacée par celle de l'ARNv 7 (M) England. Nous proposons que, lors des expériences de compétition entre les ARNv 4 (HA) Moscou et England, l'absence d'incorporation de l'ARNv 4 (HA) England dans le fond génétique du virus Moscou est due au fait que l'ARNv 7 (M) Moscou interagit plus fortement avec l'ARNv 4 (HA) Moscou qu'avec l'ARNv 4 (HA) England. L'incorporation préférentielle de l'ARNv 4 (HA) England dans le fond génétique du virus Moscou en présence de l'ARNv 7 (M) England pourrait quant à elle être expliquée par le fait que les ARNv 4 (HA) et 7 (M) England interagissent ensemble alors que l'ARNv 7 (M) England n'interagit pratiquement pas avec l'ARNv 4 (HA) Moscou. Nous pensons également que le fait que, lors des expériences de compétition entre les ARNv 4 (HA) Moscou et England, l'ARNv 4 (HA) Moscou n'est pas majoritairement incorporé en présence de l'ARNv 7 (M) Moscou muté en 3' alors qu'il est systématiquement incorporé en présence de l'ARNv 7 (M) Moscou peut s'expliquer par une diminution prononcée de l'interaction entre l'ARNv 4 (HA) Moscou et l'ARNv 7 (M) Moscou lorsque ce dernier est muté en 3'. En revanche, le fait que l'ARNv 4 (HA) England soit un peu plus incorporé que l'ARNv 4 (HA) Moscou en présence de l'ARNv 7 (M) muté en 3' ne peut pas s'expliquer par nos résultats d'EMSA, car nous montrons que l'ARNv 7 (M) Moscou muté en 3' interagit un peu plus fortement avec l'ARNv 4 (HA) Moscou qu'avec l'ARNv 4 (HA) England.

Au cours de nos expériences d'EMSA, l'ARNv 7 (M) Moscou muté en 3' homodimérise fortement. Certains pourraient avancer que cette homodimérisation est la cause et non la conséquence de la baisse d'interaction de cet ARNv muté avec les ARNv 4 (HA) Moscou et England. Nous pensons néanmoins que ce n'est pas le cas puisque de nombreux ARNv de la souche Moscou tendent à s'homodimériser lorsqu'ils sont seuls, mais, lorsqu'un

ARNv partenaire est ajouté, l'homodimère disparaît au profit de la formation d'un hétérodimère (73).

L'explication que nous proposons ne tient cependant compte que de l'interaction entre les ARNv 4 (HA) et 7 (M) alors que ces derniers interagissent avec d'autres ARNv. En effet, (i) l'ARNv 7 (M) England interagit avec les ARNv 1 (PB2), 2 (PB1), 3 (PA) et 4 (HA) Moscou (Tableau 20), (ii) l'ARNv 7 (M) Moscou interagit avec les ARNv 1 (PB2), 4 (HA) et 6 (NA) Moscou (73), (iii) l'ARNv 4 (HA) England interagit avec l'ARNv 7 (M) Moscou et peut-être aussi avec les ARNv 1 (PB2) et 3 (PA) Moscou (Tableau 20), et (iv) l'ARNv 4 (HA) Moscou interagit avec les ARNv 3 (PA), 5 (NP), 7 (M) et 8 (NS) Moscou (73). Il est donc possible que l'ensemble du réseau d'interactions entre les ARNv soit remodelé lorsque les ARNv 4 (HA) et 7 (M) du virus Moscou sont remplacés par les ARNv 4 (HA) et 7 (M) de la souche England.

Néanmoins, notre technique d'analyse des interactions entre ARNv semble pouvoir mettre en évidence des facteurs génomiques limitant le réassortiment génétique. Par ailleurs, comme les interactions mises en évidence *in vitro* entre ARNv jouent vraisemblablement un rôle dans l'incorporation d'un jeu complet d'ARNv dans les virions, nous pensons que le réassortiment génétique est intimement lié aux mécanismes régulant d'incorporation des ARNv dans les particules virales.

Les résultats obtenus au cours d'une expérience préliminaire semblent montrer que les régions de l'ARNv 8 (NS) England responsables de son interaction avec d'autres ARNv de la souche England favorisent l'interaction de l'ARNv 8 (NS) Moscou avec les ARNv de la souche England lorsqu'elles sont insérées au niveau de l'ARNv 8 (NS) Moscou. Certains résultats ne correspondent tout de même pas exactement à ce que nous attendions lorsque nous avons imaginé l'expérience. Dans la mesure où certains problèmes techniques ont été rencontrés au cours de cette expérience unique, il sera nécessaire de la reproduire. Actuellement, nous attendons également de savoir si les mutations réalisées au niveau de l'ARNv 8 (NS) Moscou favorisent son incorporation dans un virus England.

# CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

## **1. Incorporation des ARNv dans les particules virales**

### **1.1. Bilan des principaux résultats obtenus durant ma thèse**

Les résultats que nous avons obtenus apportent un certain nombre d'informations cruciales à la compréhension du mécanisme d'incorporation d'un jeu complet de 8 ARNv dans les virions.

Nous avons montré par des expériences d'EMSA que les réseaux d'interactions entre ARNv des virus Moscou et England sont radicalement différents tout comme la localisation des régions des ARNv impliquées dans ces interactions. En effet, les ARNv de la souche humaine Moscou interagissent essentiellement *via* des régions localisées à leurs extrémités, au niveau des régions décrites dans la littérature comme impliquées dans l'incorporation des ARNv dans les particules virales, tandis que les ARNv de la souche aviaire England interagissent *via* des régions situées beaucoup plus à distance des extrémités des ARNv.

L'interaction mise en évidence *in vitro* entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) England a été caractérisée en détail et, grâce à l'introduction de mutations compensatoires au niveau des régions des 2 ARNv qui interagissent ensemble *in vitro*, nous avons montré, pour la première fois, qu'une interaction directe entre 2 ARNv contrôle l'incorporation des ARNv dans les particules virales et l'assemblage des virus.

### **1.2. Perspectives de mon travail de thèse**

A l'issue de ma thèse, le rôle de l'interaction identifiée *in vitro* entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) England dans la formation de particules virales possédant un jeu complet de 8 ARNv a été bien étudié, même si certaines expériences doivent être confirmées. Liang *et al.* (142) ont montré que des mutations introduites au niveau de régions importantes pour l'incorporation des ARNv peuvent reverser. Si l'interaction mise en évidence entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) confère un avantage sélectif aux particules virales, nous pensons que nous

pourrions observer l'apparition spontanée de mutations compensatoires après plusieurs passages des virus ne possédant qu'un des deux ARNv mutés.

De nombreuses questions restent cependant en suspens. Nous nous demandons notamment si toutes les interactions mises en évidence *in vitro* entre les ARNv de la souche England jouent un rôle dans la formation de particules virales incorporant un jeu complet d'ARNv. Pour répondre à cette question, un travail similaire à celui réalisé pour l'interaction entre les ARNv 2 (PB1) et 8 (NS) devrait être réalisé pour chaque interaction identifiée *in vitro*. Néanmoins, dans de nombreux cas, des mutations compensatoires au niveau des régions d'interaction entre 2 ARNv ne peuvent pas être introduites sans modifier les séquences des protéines. De plus, un tel travail serait titanesque et représenterait un investissement financier considérable si bien que nous pensons ne le réaliser que pour une ou deux autres interactions.

La caractérisation des interactions mises en évidence *in vitro* entre les ARNv de la souche England montrent que les régions impliquées dans ces interactions sont toutes localisées à distance des extrémités des ARNv. Il pourrait être intéressant de passer les virus à haute MOI sur des œufs de poules embryonnés et de chercher à déterminer si des ARN DI peuvent ou non apparaître dans cette souche. Si des ARN DI apparaissaient, nous pourrions identifier les régions conservées au niveau des ARN DI et regarder si les régions responsables des interactions mises en évidence *in vitro* sont ou non dans ces régions. Nous pensons que les régions non conservées au niveau des ARN DI pourraient ne pas jouer de rôle crucial dans la formation de particules virales possédant un jeu complet de 8 ARNv. L'apparition d'ARN DI qui ne posséderaient aucune des régions responsables des interactions *in vitro* pourrait signifier que notre stratégie d'étude *in vitro* des interactions entre ARNv ne permet pas de mettre en évidence toutes les régions impliquées dans l'incorporation des ARNv.

Jusqu'à présent, seules 2 souches d'*Influenzavirus A* ont été étudiées au laboratoire. L'étude des interactions *in vitro* entre les ARNv des souches modèles WSN et PR8 va cependant débuter prochainement. Cette analyse permettra de confronter plus facilement les données obtenues au laboratoire avec celles publiées par d'autres équipes utilisant ces souches. Nous prévoyons également d'étudier d'autres souches aviaires afin d'avoir une vision plus large de la variabilité qu'il peut exister au niveau des réseaux d'interactions entre ARNv de différentes souches. Nous pourrons aussi rechercher si les réseaux d'interactions entre ARNv varient ou non selon l'hôte et/ou selon le sous-type d'*Influenzavirus A*. Dans ce but, il pourrait être intéressant de coupler notre approche expérimentale à une approche bioinformatique.



A plus long terme, notre stratégie pourrait permettre d'envisager le développement de molécules thérapeutiques. En effet, en nous basant sur les travaux de Giannecchini *et al.* (85, 86), nous pouvons imaginer utiliser un cocktail d'oligonucléotides correspondant aux régions responsables des interactions entre ARNv que nous mettrions en évidence *in vitro* pour les souches circulantes de l'année afin d'inhiber l'incorporation de leur génome et donc leur réplication. Cette stratégie serait particulièrement intéressante pour inhiber la réplication de souches résistantes aux antiviraux. De plus, cette approche pouvant permettre de cibler de façon concomitante plusieurs régions du génome serait efficace malgré la dérive génétique des souches d'*Influenzavirus A*.

## **2. Réassortiment génétique**

### **2.1. Bilan des principaux résultats obtenus durant ma thèse**

L'analyse de l'interaction d'ARNv de la souche humaine Moscou avec des ARNv de la souche aviaire England nous a permis de proposer une explication quant au fait que, lors du réassortiment génétique entre ces 2 souches, l'ARNv 4 (HA) England ne peut pas être incorporé seul dans le fond génétique du virus Moscou, mais que la présence de l'ARNv 7 (M) England favorise son incorporation. Nous pensons que l'interaction entre l'ARNv 4 (HA) Moscou et l'extrémité 3' de l'ARNv 7 (M) Moscou joue un rôle crucial dans l'incorporation de l'ARNv 4 (HA) Moscou et que le fait que l'ARNv 7 (M) Moscou interagissent plus faiblement avec l'ARNv 4 (HA) England qu'avec l'ARNv 4 (HA) Moscou est le principal facteur qui empêche l'incorporation de l'ARNv 4 (HA) England dans le fond génétique du virus Moscou. Nous proposons également que l'interaction de l'ARNv 7 (M) England avec les ARNv 4 (HA) des souches Moscou et England permettrait l'incorporation de l'ARNv 4 (HA) England ou de l'ARNv 4 (HA) Moscou dans le fond génétique du virus Moscou.

Enfin, des travaux préliminaires montrent que, dans un certain nombre de cas, les régions de l'ARNv 8 (NS) England responsables de son interaction avec d'autres ARNv de la souche England favorisent l'interaction de l'ARNv 8 (NS) Moscou avec les ARNv de la souche England lorsqu'elles sont insérées au niveau de l'ARNv 8 (NS) Moscou.

## **2.2. Perspectives de mon travail de thèse**

Dans les expériences de réassortiment génétique réalisées par B. Essere, les ARNv 3 (PA) et 7 (M) England sont presque toujours incorporés en même temps que l'ARNv 4 (HA) England dans le fond génétique du virus Moscou. Nous avons analysé le rôle de l'ARNv 7 (M) dans ce processus mais pas celui de l'ARNv 3 (PA). Il serait donc intéressant de nous focaliser maintenant sur le rôle de l'ARNv 3 (PA). Nous pourrions ensuite chercher à déterminer si la présence concomitante de ces 2 ARNv favorise l'incorporation de l'ARNv 4 (HA) England dans le fond génétique du virus Moscou. Il se pourrait aussi que l'association de la protéine PA codée par l'ARNv aviaire aux protéines PB1 et PB2 codées par les ARNv humains optimise la réplication des virus réassortants. La quantification de l'activité polymérase de complexes polymérase hétérogènes pourrait apporter des éléments de réponse.

Il a été montré que l'insertion de 5 mutations ponctuelles en 3' de l'ARNv 7 (M) Moscou favorise l'incorporation de l'ARNv 4 (HA) England dans le fond génétique du virus Moscou. Il est cependant probable que ces 5 mutations n'aient pas toutes la même importance. En utilisant des ARNv 7 (M) humains possédant différentes combinaisons de ces mutations, nous pourrions identifier les nucléotides nécessaires et suffisants à l'incorporation de l'ARNv 4 (HA) England dans le fond génétique du virus Moscou.

Lors des expériences de génétique inverse compétitive entre les ARNv 6 (NA) des souches Moscou et England, l'incorporation de l'ARNv 6 (NA) England dans le fond génétique du virus Moscou pourrait être expliquée par la forte identité des séquences aux extrémités des ARNv 6 (NA) des 2 souches. Nous avons montré que l'ARNv 6 (NA) England interagit avec de nombreux ARNv de la souche Moscou (Tableau 20). Il serait intéressant de caractériser ces interactions et de déterminer le rôle qu'elles jouent dans l'incorporation de l'ARNv 6 (NA) England dans le fond génétique du virus Moscou.

Suite à ces résultats, nous pensons qu'en étudiant et définissant les réseaux d'interactions entre ARNv des virus circulants de différentes espèces, nous pourrions déterminer les compositions génomiques les plus à même d'émerger par réassortiment génétique et identifier les interactions jouant un rôle prépondérant dans l'émergence de ces virus. Si des interactions entre ARNv sont indispensables au réassortiment génétique entre 2 souches, l'utilisation d'oligonucléotides correspondant aux régions responsables de ces interactions pourrait théoriquement prévenir l'émergence de ces virus réassortants. Dans le principe, ces oligonucléotides pourraient être administrés à titre préventif aux porcs qui sont

le creuset des phénomènes de réassortiment génétique entre *Influenzavirus A* humains et aviaires qui peuvent conduire à l'émergence de virus pandémiques.

Nous allons également poursuivre les expériences visant à déterminer si l'insertion au niveau de l'ARNv 8 (NS) Moscou de régions de l'ARNv 8 (NS) England impliquées dans des interactions avec des ARNv de la souche England facilite son incorporation dans le fond génétique du virus England. Si cette approche fonctionne, nous pourrions commencer à maîtriser les processus de réassortiment génétique *in vitro*.

Les semences vaccinales sont issues d'un réassortiment génétique entre les souches d'*Influenzavirus A* circulantes choisies par l'OMS et la souche PR8 qui est une souche permettant d'obtenir de bons rendements sur œufs de poules. Les virus réassortants possédant au moins les ARNv 4 (HA) et 6 (NA) des souches circulantes et qui ont de bonnes capacités répliquatives sont utilisés comme semences vaccinales. En définissant le réseau d'interactions de la souche PR8 et en caractérisant les régions responsables des interactions impliquant les ARNv 4 (HA) et 6 (NA), nous pourrions introduire ces régions au niveau des régions homologues des ARNv 4 (HA) et 6 (NA) des souches circulantes afin de diriger leur incorporation dans le fond génétique du virus PR8.



## **ANNEXE : COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES**

➤ 8<sup>ème</sup> Rencontre SifrARN – Dourdan, 22-24 novembre 2010 – Communication orale N°19 :

### **L'encapsidation sélective des segments d'ARN génomiques des virus influenza A est gouvernée par des interactions ARN/ARN**

Gavazzi<sup>1</sup> Cyrille, Fournier<sup>1</sup> Emilie, Moules<sup>2</sup> Vincent, Essere<sup>2</sup> Boris, Paillart<sup>1</sup> Jean-Christophe, Cavalier<sup>3</sup> Annie, Rolland<sup>3</sup> Jean-Paul, Isel<sup>1</sup> Catherine, Thomas<sup>3</sup> Daniel, Lina<sup>2</sup> Bruno & Marquet<sup>1</sup> Roland

<sup>1</sup> Architecture et Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg, CNRS, IBMC, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg cedex, France.

<sup>2</sup> Virologie et Pathologie Humaine, Université Lyon 1, FRE 3011 CNRS, Faculté de Médecine RTH Laennec, 69008 Lyon, France.

<sup>3</sup> Interactions Cellulaires et Moléculaires, Université Rennes 1, UMR 6026 CNRS, Campus de Beaulieu, bâtiment 13, 35042 Rennes, France.

Adresse e-mail du présentateur : [c.gavazzi@ibmc.u-strasbg.fr](mailto:c.gavazzi@ibmc.u-strasbg.fr)

Les virus influenza A ont un génome composé de 8 ARNv (-). Cette segmentation du génome permet le réassortiment génétique entre virus mais implique l'existence de mécanismes spécifiques permettant l'encapsidation d'un jeu complet d'ARNv. Nous avons mis en évidence *in vitro*, pour un virus humain et un virus aviaire, la formation d'un réseau complexe d'interactions entre les 8 ARNv. De manière inattendue, les deux réseaux d'interactions et les régions impliquées dans la formation de ces réseaux sont différents. Pour le virus humain, ces régions sont proches des extrémités des ARNv et correspondent à des régions nécessaires à l'encapsidation des ARNv d'autres virus influenza humains. La reconstitution de l'intérieur du virus humain par tomographie électronique montre que ces régions forment une plateforme commune au pôle apical du virus d'où émergent les 8 ribonucléoparticules virales. La caractérisation précise de plusieurs interactions entre des ARNv du virus aviaire a quant à elle montré que les régions établissant le réseau d'interactions sont localisées plus au centre des ARNv. En introduisant des mutations compensatoires au niveau de 2 de ces régions, nous avons démontré pour la première fois que des interactions directes entre ARNv contrôlent leur encapsidation et l'assemblage des virus. Nos résultats prouvent l'existence de mécanismes complexes gouvernant l'incorporation sélective du génome des virus influenza A et régissant vraisemblablement le réassortiment génétique entre virus.

- Cyrille Gavazzi, Catherine Isel, Matthieu Yver, Emilie Fournier, Daniel Thomas, Bruno Lina, Vincent Moules and Roland Marquet. Selective packaging of influenza A viral genomic RNA segments is mediated by RNA/RNA interactions. En préparation.
  
- Boris Essere, Matthieu Yver, Cyrille Gavazzi, Catherine Isel, Emilie Fournier, Fabienne Giroux, Lin Yi Pu, Alan Hay, John Skehel, Bruno Lina, Manuel Rosa-Calatrava, Roland Marquet and Vincent Moules. Critical role of selective genome packaging signals in the emergence of influenza A reassortant viruses *in vitro*. En préparation.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. **Akarsu, H., W. P. Burmeister, C. Petosa, I. Petit, C. W. Muller, R. W. Ruigrok, and F. Baudin.** 2003. Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *Embo J* **22**:4646-55.
2. **Akkina, R. K., T. M. Chambers, and D. P. Nayak.** 1984. Mechanism of interference by defective-interfering particles of influenza virus: Differential reduction of intracellular synthesis of specific polymerase proteins *Virus Research* **1**:687-702
3. **Amorim, M. J., E. K. Read, R. M. Dalton, L. Medcalf, and P. Digard.** 2007. Nuclear export of influenza A virus mRNAs requires ongoing RNA polymerase II activity. *Traffic* **8**:1-11.
4. **Apostolov, K., and T. H. Flewett.** 1969. Further observations on the structure of influenza viruses A and C. *J Gen Virol* **4**:365-70.
5. **Aragon, T., S. de la Luna, I. Novoa, L. Carrasco, J. Ortin, and A. Nieto.** 2000. Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol Cell Biol* **20**:6259-68.
6. **Area, E., J. Martin-Benito, P. Gastaminza, E. Torreira, J. M. Valpuesta, J. L. Carrascosa, and J. Ortin.** 2004. 3D structure of the influenza virus polymerase complex: localization of subunit domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:308-13.
7. **Bachi, T., W. Gerhard, J. Lindenmann, and K. Muhlethaler.** 1969. Morphogenesis of influenza A virus in Ehrlich ascites tumor cells as revealed by thin-sectioning and freeze-etching. *J Virol* **4**:769-76.
8. **Bancroft, C. T., and T. G. Parslow.** 2002. Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza A virus genome. *J Virol* **76**:7133-9.
9. **Barman, S., A. Ali, E. K. Hui, L. Adhikary, and D. P. Nayak.** 2001. Transport of viral proteins to the apical membranes and interaction of matrix protein with glycoproteins in the assembly of influenza viruses. *Virus Res* **77**:61-9.
10. **Baudin, F., C. Bach, S. Cusack, and R. W. Ruigrok.** 1994. Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *Embo J* **13**:3158-65.
11. **Bean, W. J., Jr., and R. W. Simpson.** 1976. Transcriptase activity and genome composition of defective influenza virus. *J Virol* **18**:365-9.
12. **Bean, W. J., Y. Kawaoka, J. M. Wood, J. E. Pearson, and R. G. Webster.** 1985. Characterization of virulent and avirulent A/chicken/Pennsylvania/83 influenza A viruses: potential role of defective interfering RNAs in nature. *J Virol* **54**:151-60.
13. **Beaton, A. R., and R. M. Krug.** 1986. Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:6282-6.

14. **Beneteau, C., E. Landais, M. Doco-Fenzy, C. Gavazzi, C. Philippe, M. Beridexheimer, C. Bonnet, J. Vigneron, P. Walrafen, J. Motte, B. Leheup, and P. Jonveaux.** 2011. Microtriplication of 11q24.1: a highly recognisable phenotype with short stature, distinctive facial features, keratoconus, overweight, and intellectual disability. *J Med Genet* **48**:635-9.
15. **Bergmann, M., and T. Muster.** 1996. Mutations in the nonconserved noncoding sequences of the influenza A virus segments affect viral vRNA formation. *Virus Res* **44**:23-31.
16. **Bergmann, M., and T. Muster.** 1995. The relative amount of an influenza A virus segment present in the viral particle is not affected by a reduction in replication of that segment. *J Gen Virol* **76 ( Pt 12)**:3211-5.
17. **Birch-Andersen, A., and K. Paucker.** 1959. Studies on the structure of influenza virus. II. Ultrathin sections of infectious and noninfectious particles. *Virology* **8**:21-40.
18. **Biswas, S. K., P. L. Boutz, and D. P. Nayak.** 1998. Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J Virol* **72**:5493-501.
19. **Boni, M. F., Y. Zhou, J. K. Taubenberger, and E. C. Holmes.** 2008. Homologous recombination is very rare or absent in human influenza A virus. *J Virol* **82**:4807-11.
20. **Booy, F. P., R. W. Ruigrok, and E. F. van Bruggen.** 1985. Electron microscopy of influenza virus. A comparison of negatively stained and ice-embedded particles. *J Mol Biol* **184**:667-76.
21. **Burgui, I., T. Aragon, J. Ortin, and A. Nieto.** 2003. PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J Gen Virol* **84**:3263-74.
22. **Cady, S. D., W. Luo, F. Hu, and M. Hong.** 2009. Structure and function of the influenza A M2 proton channel. *Biochemistry* **48**:7356-64.
23. **Calder, L. J., S. Wasilewski, J. A. Berriman, and P. B. Rosenthal.** 2010. Structural organization of a filamentous influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:10685-90.
24. **Chambers, T. M., and R. G. Webster.** 1987. Defective interfering virus associated with A/Chicken/Pennsylvania/83 influenza virus. *J Virol* **61**:1517-23.
25. **Chare, E. R., E. A. Gould, and E. C. Holmes.** 2003. Phylogenetic analysis reveals a low rate of homologous recombination in negative-sense RNA viruses. *J Gen Virol* **84**:2691-703.
26. **Chen, B. J., G. P. Leser, D. Jackson, and R. A. Lamb.** 2008. The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding. *J Virol* **82**:10059-70.
27. **Chen, B. J., G. P. Leser, E. Morita, and R. A. Lamb.** 2007. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. *J Virol* **81**:7111-23.



28. **Chen, G. W., S. C. Chang, C. K. Mok, Y. L. Lo, Y. N. Kung, J. H. Huang, Y. H. Shih, J. Y. Wang, C. Chiang, C. J. Chen, and S. R. Shih.** 2006. Genomic signatures of human versus avian influenza A viruses. *Emerg Infect Dis* **12**:1353-60.
29. **Chen, L. M., C. T. Davis, H. Zhou, N. J. Cox, and R. O. Donis.** 2008. Genetic compatibility and virulence of reassortants derived from contemporary avian H5N1 and human H3N2 influenza A viruses. *PLoS Pathog* **4**:e1000072.
30. **Chen, R., and E. C. Holmes.** 2006. Avian influenza virus exhibits rapid evolutionary dynamics. *Mol Biol Evol* **23**:2336-41.
31. **Chen, W., P. A. Calvo, D. Malide, J. Gibbs, U. Schubert, I. Bacik, S. Basta, R. O'Neill, J. Schickli, P. Palese, P. Henklein, J. R. Bennink, and J. W. Yewdell.** 2001. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* **7**:1306-12.
32. **Cheung, T. K., Y. Guan, S. S. Ng, H. Chen, C. H. Wong, J. S. Peiris, and L. L. Poon.** 2005. Generation of recombinant influenza A virus without M2 ion-channel protein by introduction of a point mutation at the 5' end of the viral intron. *J Gen Virol* **86**:1447-54.
33. **Choppin, P. W., and M. W. Pons.** 1970. The RNAs of infective and incomplete influenza virions grown in MDBK and HeLa cells. *Virology* **42**:603-10.
34. **CMIT.** 2010. Grippe saisonnière, p. 382-386. *In.* (ed.), E. PILLY, 22th ed. Vivactis Plus, Paris.
35. **Coloma, R., J. M. Valpuesta, R. Arranz, J. L. Carrascosa, J. Ortin, and J. Martin-Benito.** 2009. The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. *PLoS Pathog* **5**:e1000491.
36. **Compans, R. W., J. Content, and P. H. Duesberg.** 1972. Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol* **10**:795-800.
37. **Compans, R. W., and N. J. Dimmock.** 1969. An electron microscopic study of single-cycle infection of chick embryo fibroblasts by influenza virus. *Virology* **39**:499-515.
38. **Cottet, L., A. Rivas-Aravena, M. Cortez-San Martin, A. M. Sandino, and E. Spencer.** 2011. Infectious salmon anemia virus--genetics and pathogenesis. *Virus Res* **155**:10-9.
39. **Cros, J. F., A. Garcia-Sastre, and P. Palese.** 2005. An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic* **6**:205-13.
40. **Cros, J. F., and P. Palese.** 2003. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res* **95**:3-12.
41. **Cross, K. J., W. A. Langley, R. J. Russell, J. J. Skehel, and D. A. Steinhauer.** 2009. Composition and functions of the influenza fusion peptide. *Protein Pept Lett* **16**:766-78.

42. **Crow, M., T. Deng, M. Addley, and G. G. Brownlee.** 2004. Mutational analysis of the influenza virus cRNA promoter and identification of nucleotides critical for replication. *J Virol* **78**:6263-70.
43. **Crumpton, W. M., N. J. Dimmock, P. D. Minor, and R. J. Avery.** 1978. The RNAs of defective-interfering influenza virus. *Virology* **90**:370-3.
44. **Da Silva, E. V., A. P. Da Rosa, M. R. Nunes, J. A. Diniz, R. B. Tesh, A. C. Cruz, C. M. Vieira, and P. F. Vasconcelos.** 2005. Araguari virus, a new member of the family Orthomyxoviridae: serologic, ultrastructural, and molecular characterization. *Am J Trop Med Hyg* **73**:1050-8.
45. **Davis, A. R., A. L. Hiti, and D. P. Nayak.** 1980. Influenza defective interfering viral RNA is formed by internal deletion of genomic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:215-9.
46. **Davis, A. R., and D. P. Nayak.** 1979. Sequence relationships among defective interfering influenza viral RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:3092-6.
47. **de Wit, E., M. I. Spronken, T. M. Bestebroer, G. F. Rimmelzwaan, A. D. Osterhaus, and R. A. Fouchier.** 2004. Efficient generation and growth of influenza virus A/PR/8/34 from eight cDNA fragments. *Virus Res* **103**:155-61.
48. **de Wit, E., M. I. Spronken, G. F. Rimmelzwaan, A. D. Osterhaus, and R. A. Fouchier.** 2006. Evidence for specific packaging of the influenza A virus genome from conditionally defective virus particles lacking a polymerase gene. *Vaccine* **24**:6647-50.
49. **Deng, T., J. Sharps, E. Fodor, and G. G. Brownlee.** 2005. In vitro assembly of PB2 with a PB1-PA dimer supports a new model of assembly of influenza A virus polymerase subunits into a functional trimeric complex. *J Virol* **79**:8669-74.
50. **Deng, T., F. T. Vreede, and G. G. Brownlee.** 2006. Different de novo initiation strategies are used by influenza virus RNA polymerase on its cRNA and viral RNA promoters during viral RNA replication. *J Virol* **80**:2337-48.
51. **Deyde, V., R. Garten, T. Sheu, C. Smith, A. Myrick, J. Barnes, X. Xu, M. Shaw, A. Klimov, and L. Gubareva.** 2009. Genomic events underlying the changes in adamantane resistance among influenza A(H3N2) viruses during 2006-2008. *Influenza Other Respi Viruses* **3**:297-314.
52. **Dias, A., D. Bouvier, T. Crepin, A. A. McCarthy, D. J. Hart, F. Baudin, S. Cusack, and R. W. Ruigrok.** 2009. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* **458**:914-8.
53. **Digard, P., V. C. Blok, and S. C. Inglis.** 1989. Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes. *Virology* **171**:162-9.
54. **Donald, H. B., and A. Isaacs.** 1954. Counts of influenza virus particles. *J Gen Microbiol* **10**:457-64.
55. **Dong, J., M. G. Roth, and E. Hunter.** 1992. A chimeric avian retrovirus containing the influenza virus hemagglutinin gene has an expanded host range. *J Virol* **66**:7374-82.

56. **Dos Santos Afonso, E., N. Escriou, I. Leclercq, S. van der Werf, and N. Naffakh.** 2005. The generation of recombinant influenza A viruses expressing a PB2 fusion protein requires the conservation of a packaging signal overlapping the coding and noncoding regions at the 5' end of the PB2 segment. *Virology* **341**:34-46.
57. **Duan, M., Z. Zhou, R. X. Lin, J. Yang, X. Z. Xia, and S. Q. Wang.** 2008. In vitro and in vivo protection against the highly pathogenic H5N1 influenza virus by an antisense phosphorothioate oligonucleotide. *Antivir Ther* **13**:109-14.
58. **Duchamp, M. B., J. S. Casalegno, Y. Gillet, E. Frobert, E. Bernard, V. Escuret, G. Billaud, M. Valette, E. Javouhey, B. Lina, D. Floret, and F. Morfin.** 2010. Pandemic A(H1N1)2009 influenza virus detection by real time RT-PCR: is viral quantification useful? *Clin Microbiol Infect* **16**:317-21.
59. **Duesberg, P. H.** 1969. Distinct subunits of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Mol Biol* **42**:485-99.
60. **Duesberg, P. H.** 1968. The RNA of influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **59**:930-7.
61. **Dugan, V. G., R. Chen, D. J. Spiro, N. Sengamalay, J. Zaborsky, E. Ghedin, J. Nolting, D. E. Swayne, J. A. Runstadler, G. M. Happ, D. A. Senne, R. Wang, R. D. Slemons, E. C. Holmes, and J. K. Taubenberger.** 2008. The evolutionary genetics and emergence of avian influenza viruses in wild birds. *PLoS Pathog* **4**:e1000076.
62. **Duhaut, S., and N. J. Dimmock.** 2000. Approximately 150 nucleotides from the 5' end of an influenza A segment 1 defective virion RNA are needed for genome stability during passage of defective virus in infected cells. *Virology* **275**:278-85.
63. **Duhaut, S. D., and N. J. Dimmock.** 2002. Defective segment 1 RNAs that interfere with production of infectious influenza A virus require at least 150 nucleotides of 5' sequence: evidence from a plasmid-driven system. *J Gen Virol* **83**:403-11.
64. **Duhaut, S. D., and N. J. Dimmock.** 1998. Heterologous protection of mice from a lethal human H1N1 influenza A virus infection by H3N8 equine defective interfering virus: comparison of defective RNA sequences isolated from the DI inoculum and mouse lung. *Virology* **248**:241-53.
65. **Duhaut, S. D., and J. W. McCauley.** 1996. Defective RNAs inhibit the assembly of influenza virus genome segments in a segment-specific manner. *Virology* **216**:326-37.
66. **Elton, D., P. Digard, L. Tiley, and J. Ortin.** 2006. Structure and function of the influenza virus RNP, p. 1-36. *In* Y. Kawaoka (ed.), *Current Topics in Influenza Virology*. Horizon Scientific Press, Norfolk.
67. **Elton, D., M. Simpson-Holley, K. Archer, L. Medcalf, R. Hallam, J. McCauley, and P. Digard.** 2001. Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol* **75**:408-19.
68. **Enami, M., G. Sharma, C. Benham, and P. Palese.** 1991. An influenza virus containing nine different RNA segments. *Virology* **185**:291-8.

69. **Falcon, A. M., R. M. Marion, T. Zurcher, P. Gomez, A. Portela, A. Nieto, and J. Ortin.** 2004. Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive influenza viruses expressing deleted forms of the NS1 protein. *J Virol* **78**:3880-8.
70. **Fernandez-Sesma, A., S. Marukian, B. J. Ebersole, D. Kaminski, M. S. Park, T. Yuen, S. C. Sealfon, A. Garcia-Sastre, and T. M. Moran.** 2006. Influenza virus evades innate and adaptive immunity via the NS1 protein. *J Virol* **80**:6295-304.
71. **Fiers, W., M. De Filette, A. Birkett, S. Neiryneck, and W. Min Jou.** 2004. A "universal" human influenza A vaccine. *Virus Res* **103**:173-6.
72. **Fodor, E., and M. Smith.** 2004. The PA subunit is required for efficient nuclear accumulation of the PB1 subunit of the influenza A virus RNA polymerase complex. *J Virol* **78**:9144-53.
73. **Fournier, E., V. Moules, B. Essere, J. C. Paillart, J. D. Sirbat, C. Isel, A. Cavalier, J. P. Rolland, D. Thomas, B. Lina, and R. Marquet.** *Accepté.* A supramolecular assembly formed by influenza A virus genomic RNA segments. *Nucleic Acids Res.*
74. **Freed, E. O.** 2002. Viral late domains. *J Virol* **76**:4679-87.
75. **Fujii, K., Y. Fujii, T. Noda, Y. Muramoto, T. Watanabe, A. Takada, H. Goto, T. Horimoto, and Y. Kawaoka.** 2005. Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J Virol* **79**:3766-74.
76. **Fujii, K., M. Ozawa, K. Iwatsuki-Horimoto, T. Horimoto, and Y. Kawaoka.** 2009. Incorporation of influenza A virus genome segments does not absolutely require wild-type sequences. *J Gen Virol* **90**:1734-40.
77. **Fujii, Y., H. Goto, T. Watanabe, T. Yoshida, and Y. Kawaoka.** 2003. Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:2002-7.
78. **Furuse, Y., A. Suzuki, T. Kamigaki, M. Shimizu, N. Fuji, and H. Oshitani.** 2009. Reversion of influenza A (H3N2) virus from amantadine resistant to amantadine sensitive by further reassortment in Japan during the 2006-to-2007 influenza season. *J Clin Microbiol* **47**:841-4.
79. **Gao, Q., E. W. Brydon, and P. Palese.** 2008. A seven-segmented influenza A virus expressing the influenza C virus glycoprotein HEF. *J Virol* **82**:6419-26.
80. **Gao, Q., A. C. Lowen, T. T. Wang, and P. Palese.** 2010. A nine-segment influenza A virus carrying subtype H1 and H3 hemagglutinins. *J Virol* **84**:8062-71.
81. **Gao, Q., and P. Palese.** 2009. Rewiring the RNAs of influenza virus to prevent reassortment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:15891-6.
82. **Garaigorta, U., and J. Ortin.** 2007. Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleo-cytoplasmic transport of its own viral mRNA. *Nucleic Acids Res* **35**:4573-82.

83. **Garten, R. J., C. T. Davis, C. A. Russell, B. Shu, S. Lindstrom, A. Balish, W. M. Sessions, X. Xu, E. Skepner, V. Deyde, M. Okomo-Adhiambo, L. Gubareva, J. Barnes, C. B. Smith, S. L. Emery, M. J. Hillman, P. Rivaller, J. Smagala, M. de Graaf, D. F. Burke, R. A. Fouchier, C. Pappas, C. M. Alpuche-Aranda, H. Lopez-Gatell, H. Olivera, I. Lopez, C. A. Myers, D. Faix, P. J. Blair, C. Yu, K. M. Keene, P. D. Dotson, Jr., D. Boxrud, A. R. Sambol, S. H. Abid, K. St George, T. Bannerman, A. L. Moore, D. J. Stringer, P. Blevins, G. J. Demmler-Harrison, M. Ginsberg, P. Kriner, S. Waterman, S. Smole, H. F. Guevara, E. A. Belongia, P. A. Clark, S. T. Beatrice, R. Donis, J. Katz, L. Finelli, C. B. Bridges, M. Shaw, D. B. Jernigan, T. M. Uyeki, D. J. Smith, A. I. Klimov, and N. J. Cox.** 2009. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* **325**:197-201.
84. **Ghedin, E., A. Fitch, A. Boyne, S. Griesemer, J. DePasse, J. Bera, X. Zhang, R. A. Halpin, M. Smit, L. Jennings, K. St George, E. C. Holmes, and D. J. Spiro.** 2009. Mixed infection and the genesis of influenza virus diversity. *J Virol* **83**:8832-41.
85. **Giannecchini, S., V. Clausi, D. Nosi, and A. Azzi.** 2009. Oligonucleotides derived from the packaging signal at the 5' end of the viral PB2 segment specifically inhibit influenza virus in vitro. *Arch Virol* **154**:821-32.
86. **Giannecchini, S., H. M. Wise, P. Digard, V. Clausi, E. D. Poggetto, L. Vesco, S. Puzelli, I. Donatelli, and A. Azzi.** 2011. Packaging signals in the 5'-ends of influenza virus PA, PB1, and PB2 genes as potential targets to develop nucleic-acid based antiviral molecules. *Antiviral Res.*
87. **Gibbs, M. J., J. S. Armstrong, and A. J. Gibbs.** 2001. The haemagglutinin gene, but not the neuraminidase gene, of 'Spanish flu' was a recombinant. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**:1845-55.
88. **Gibbs, M. J., J. S. Armstrong, and A. J. Gibbs.** 2001. Recombination in the hemagglutinin gene of the 1918 "Spanish flu". *Science* **293**:1842-5.
89. **Gog, J. R., S. Afonso Edos, R. M. Dalton, I. Leclercq, L. Tiley, D. Elton, J. C. von Kirchbach, N. Naffakh, N. Escriou, and P. Digard.** 2007. Codon conservation in the influenza A virus genome defines RNA packaging signals. *Nucleic Acids Res* **35**:1897-907.
90. **Gomez-Puertas, P., C. Albo, E. Perez-Pastrana, A. Vivo, and A. Portela.** 2000. Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol* **74**:11538-47.
91. **Greenbaum, B. D., A. J. Levine, G. Bhanot, and R. Rabadan.** 2008. Patterns of evolution and host gene mimicry in influenza and other RNA viruses. *PLoS Pathog* **4**:e1000079.
92. **Greenbaum, B. D., R. Rabadan, and A. J. Levine.** 2009. Patterns of oligonucleotide sequences in viral and host cell RNA identify mediators of the host innate immune system. *PLoS One* **4**:e5969.
93. **Gregory, V., M. Bennett, M. H. Orkhan, S. Al Hajjar, N. Varsano, E. Mendelson, M. Zambon, J. Ellis, A. Hay, and Y. P. Lin.** 2002. Emergence of influenza A H1N2 reassortant viruses in the human population during 2001. *Virology* **300**:1-7.

94. **Guilligay, D., F. Tarendeau, P. Resa-Infante, R. Coloma, T. Crepin, P. Sehr, J. Lewis, R. W. Ruigrok, J. Ortin, D. J. Hart, and S. Cusack.** 2008. The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nat Struct Mol Biol* **15**:500-6.
95. **Guo, Y. J., X. Y. Xu, and N. J. Cox.** 1992. Human influenza A (H1N2) viruses isolated from China. *J Gen Virol* **73 ( Pt 2)**:383-7.
96. **Hale, B. G., R. E. Randall, J. Ortin, and D. Jackson.** 2008. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol* **89**:2359-76.
97. **Han, G. Z., M. F. Boni, and S. S. Li.** 2010. No observed effect of homologous recombination on influenza C virus evolution. *Virol J* **7**:227.
98. **Han, G. Z., X. P. Liu, and S. S. Li.** 2008. Homologous recombination is unlikely to play a major role in influenza B virus evolution. *Virol J* **5**:65.
99. **Harris, A., G. Cardone, D. C. Winkler, J. B. Heymann, M. Brecher, J. M. White, and A. C. Steven.** 2006. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:19123-7.
100. **Harrison, S. C.** 2008. Viral membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* **15**:690-8.
101. **Hatada, E., M. Hasegawa, J. Mukaigawa, K. Shimizu, and R. Fukuda.** 1989. Control of influenza virus gene expression: quantitative analysis of each viral RNA species in infected cells. *J Biochem* **105**:537-46.
102. **Hay, A. J., B. Lomniczi, A. R. Bellamy, and J. J. Skehel.** 1977. Transcription of the influenza virus genome. *Virology* **83**:337-55.
103. **He, X., J. Zhou, M. Bartlam, R. Zhang, J. Ma, Z. Lou, X. Li, J. Li, A. Joachimiak, Z. Zeng, R. Ge, Z. Rao, and Y. Liu.** 2008. Crystal structure of the polymerase PA(C)-PB1(N) complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature* **454**:1123-6.
104. **Heggeness, M. H., P. R. Smith, I. Ulmanen, R. M. Krug, and P. W. Choppin.** 1982. Studies on the helical nucleocapsid of influenza virus. *Virology* **118**:466-70.
105. **Helenius, A.** 1992. Unpacking the incoming influenza virus. *Cell* **69**:577-8.
106. **Hemerka, J. N., D. Wang, Y. Weng, W. Lu, R. S. Kaushik, J. Jin, A. F. Harmon, and F. Li.** 2009. Detection and characterization of influenza A virus PA-PB2 interaction through a bimolecular fluorescence complementation assay. *J Virol* **83**:3944-55.
107. **Hoffmann, E., G. Neumann, Y. Kawaoka, G. Hobom, and R. G. Webster.** 2000. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6108-13.
108. **Holmes, E. C., E. Ghedin, N. Miller, J. Taylor, Y. Bao, K. St George, B. T. Grenfell, S. L. Salzberg, C. M. Fraser, D. J. Lipman, and J. K. Taubenberger.** 2005. Whole-genome analysis of human influenza A virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses. *PLoS Biol* **3**:e300.

109. **Huet, S., S. V. Avilov, L. Ferbitz, N. Daigle, S. Cusack, and J. Ellenberg.** 2010. Nuclear import and assembly of influenza A virus RNA polymerase studied in live cells by fluorescence cross-correlation spectroscopy. *J Virol* **84**:1254-64.
110. **Hutchinson, E. C., M. D. Curran, E. K. Read, J. R. Gog, and P. Digard.** 2008. Mutational analysis of cis-acting RNA signals in segment 7 of influenza A virus. *J Virol* **82**:11869-79.
111. **Hutchinson, E. C., J. C. von Kirchbach, J. R. Gog, and P. Digard.** 2010. Genome packaging in influenza A virus. *J Gen Virol* **91**:313-28.
112. **Hutchinson, E. C., H. M. Wise, K. Kudryavtseva, M. D. Curran, and P. Digard.** 2009. Characterisation of influenza A viruses with mutations in segment 5 packaging signals. *Vaccine* **27**:6270-5.
113. **Ito, T., J. N. Couceiro, S. Kelm, L. G. Baum, S. Krauss, M. R. Castrucci, I. Donatelli, H. Kida, J. C. Paulson, R. G. Webster, and Y. Kawaoka.** 1998. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* **72**:7367-73.
114. **Iwatsuki-Horimoto, K., T. Horimoto, T. Noda, M. Kiso, J. Maeda, S. Watanabe, Y. Muramoto, K. Fujii, and Y. Kawaoka.** 2006. The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *J Virol* **80**:5233-40.
115. **Jackson, S., N. Van Hoven, L. M. Chen, T. R. Maines, N. J. Cox, J. M. Katz, and R. O. Donis.** 2009. Reassortment between avian H5N1 and human H3N2 influenza viruses in ferrets: a public health risk assessment. *J Virol* **83**:8131-40.
116. **Janda, J. M., A. R. Davis, D. P. Nayak, and B. K. De.** 1979. Diversity and generation of defective interfering influenza virus particles. *Virology* **95**:48-58.
117. **Janda, J. M., and D. P. Nayak.** 1979. Defective influenza viral ribonucleoproteins cause interference. *J Virol* **32**:697-702.
118. **Jennings, P. A., J. T. Finch, G. Winter, and J. S. Robertson.** 1983. Does the higher order structure of the influenza virus ribonucleoprotein guide sequence rearrangements in influenza viral RNA? *Cell* **34**:619-27.
119. **Jimenez-Baranda, S., B. Greenbaum, O. Manches, J. Handler, R. Rabadan, A. Levine, and N. Bhardwaj.** 2011. Oligonucleotide motifs that disappear during the evolution of influenza virus in humans increase alpha interferon secretion by plasmacytoid dendritic cells. *J Virol* **85**:3893-904.
120. **Jorba, N., R. Coloma, and J. Ortin.** 2009. Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication. *PLoS Pathog* **5**:e1000462.
121. **Josset, L., E. Frobort, and M. Rosa-Calatrava.** 2008. Influenza A replication and host nuclear compartments: many changes and many questions. *J Clin Virol* **43**:381-90.
122. **Kati, W. M., D. Montgomery, R. Carrick, L. Gubareva, C. Maring, K. McDaniel, K. Steffy, A. Molla, F. Hayden, D. Kempf, and W. Kohlbrenner.** 2002. In vitro characterization of A-315675, a highly potent inhibitor of A and B strain influenza

- virus neuraminidases and influenza virus replication. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:1014-21.
123. **Kawaguchi, A., F. Momose, and K. Nagata.** 2011. Replication-coupled and host factor-mediated encapsidation of the influenza virus genome by viral nucleoprotein. *J Virol* **85**:6197-204.
  124. **Kawaguchi, A., and K. Nagata.** 2007. De novo replication of the influenza virus RNA genome is regulated by DNA replicative helicase, MCM. *Embo J* **26**:4566-75.
  125. **Kawaoka, Y., O. T. Gorman, T. Ito, K. Wells, R. O. Donis, M. R. Castrucci, I. Donatelli, and R. G. Webster.** 1998. Influence of host species on the evolution of the nonstructural (NS) gene of influenza A viruses. *Virus Res* **55**:143-56.
  126. **Khiabaniyan, H., V. Trifonov, and R. Rabadan.** 2009. Reassortment patterns in Swine influenza viruses. *PLoS One* **4**:e7366.
  127. **Kingsbury, D. W.** 1970. Replication and functions of myxovirus ribonucleic acids. *Prog Med Virol* **12**:49-77.
  128. **Klumpp, K., R. W. Ruigrok, and F. Baudin.** 1997. Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *Embo J* **16**:1248-57.
  129. **Krug, R. M., M. A. Morgan, and A. J. Shatkin.** 1976. Influenza viral mRNA contains internal N6-methyladenosine and 5'-terminal 7-methylguanosine in cap structures. *J Virol* **20**:45-53.
  130. **Krumbholz, A., A. Philipps, H. Oehring, K. Schwarzer, A. Eitner, P. Wutzler, and R. Zell.** 2011. Current knowledge on PB1-F2 of influenza A viruses. *Med Microbiol Immunol* **200**:69-75.
  131. **Lai, J. C., W. W. Chan, F. Kien, J. M. Nicholls, J. S. Peiris, and J. M. Garcia.** 2010. Formation of virus-like particles from human cell lines exclusively expressing influenza neuraminidase. *J Gen Virol* **91**:2322-30.
  132. **Lamb, R. A., P. W. Choppin, R. M. Chanock, and C. J. Lai.** 1980. Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:1857-61.
  133. **Lamb, R. A., and R. M. Krug.** 2001. *Orthomyxoviridae*: the viruses and their replication, p. 1487-1531. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 4th ed, vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, Philadelphia, PA.
  134. **Lamb, R. A., and C. J. Lai.** 1980. Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned DNA coding for the two overlapping nonstructural proteins of influenza virus. *Cell* **21**:475-85.
  135. **Lamb, R. A., C. J. Lai, and P. W. Choppin.** 1981. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:4170-4.



136. **Latham, T., and J. M. Galarza.** 2001. Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. *J Virol* **75**:6154-65.
137. **Lee, K. H., and B. L. Seong.** 1998. The position 4 nucleotide at the 3' end of the influenza virus neuraminidase vRNA is involved in temporal regulation of transcription and replication of neuraminidase RNAs and affects the repertoire of influenza virus surface antigens. *J Gen Virol* **79 ( Pt 8)**:1923-34.
138. **Li, C., M. Hatta, C. A. Nidom, Y. Muramoto, S. Watanabe, G. Neumann, and Y. Kawaoka.** 2010. Reassortment between avian H5N1 and human H3N2 influenza viruses creates hybrid viruses with substantial virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:4687-92.
139. **Li, C., M. Hatta, S. Watanabe, G. Neumann, and Y. Kawaoka.** 2008. Compatibility among polymerase subunit proteins is a restricting factor in reassortment between equine H7N7 and human H3N2 influenza viruses. *J Virol* **82**:11880-8.
140. **Li, K. S., Y. Guan, J. Wang, G. J. Smith, K. M. Xu, L. Duan, A. P. Rahardjo, P. Puthavathana, C. Buranathai, T. D. Nguyen, A. T. Estoepangestie, A. Chaisingh, P. Auewarakul, H. T. Long, N. T. Hanh, R. J. Webby, L. L. Poon, H. Chen, K. F. Shortridge, K. Y. Yuen, R. G. Webster, and J. S. Peiris.** 2004. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* **430**:209-13.
141. **Liang, Y., Y. Hong, and T. G. Parslow.** 2005. cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments. *J Virol* **79**:10348-55.
142. **Liang, Y., T. Huang, H. Ly, and T. G. Parslow.** 2008. Mutational analyses of packaging signals in influenza virus PA, PB1, and PB2 genomic RNA segments. *J Virol* **82**:229-36.
143. **Lindstrom, S. E., Y. Hiromoto, H. Nishimura, T. Saito, R. Nerome, and K. Nerome.** 1999. Comparative analysis of evolutionary mechanisms of the hemagglutinin and three internal protein genes of influenza B virus: multiple cocirculating lineages and frequent reassortment of the NP, M, and NS genes. *J Virol* **73**:4413-26.
144. **Lubeck, M. D., P. Palese, and J. L. Schulman.** 1979. Nonrandom association of parental genes in influenza A virus recombinants. *Virology* **95**:269-74.
145. **Ludwig, S., U. Schultz, J. Mandler, W. M. Fitch, and C. Scholtissek.** 1991. Phylogenetic relationship of the nonstructural (NS) genes of influenza A viruses. *Virology* **183**:566-77.
146. **Luo, G., M. Bergmann, A. Garcia-Sastre, and P. Palese.** 1992. Mechanism of attenuation of a chimeric influenza A/B transfectant virus. *J Virol* **66**:4679-85.
147. **Luytjes, W., M. Krystal, M. Enami, J. D. Parvin, and P. Palese.** 1989. Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus. *Cell* **59**:1107-13.

148. **Marsh, G. A., R. Hatami, and P. Palese.** 2007. Specific residues of the influenza A virus hemagglutinin viral RNA are important for efficient packaging into budding virions. *J Virol* **81**:9727-36.
149. **Marsh, G. A., R. Rabadan, A. J. Levine, and P. Palese.** 2008. Highly conserved regions of influenza A virus polymerase gene segments are critical for efficient viral RNA packaging. *J Virol* **82**:2295-304.
150. **Matrosovich, M. N., T. Y. Matrosovich, T. Gray, N. A. Roberts, and H. D. Klenk.** 2004. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:4620-4.
151. **McCown, M. F., and A. Pekosz.** 2006. Distinct domains of the influenza A virus M2 protein cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus production. *J Virol* **80**:8178-89.
152. **McCown, M. F., and A. Pekosz.** 2005. The influenza A virus M2 cytoplasmic tail is required for infectious virus production and efficient genome packaging. *J Virol* **79**:3595-605.
153. **McGeoch, D., P. Fellner, and C. Newton.** 1976. Influenza virus genome consists of eight distinct RNA species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**:3045-9.
154. **Medina, R. A., and A. Garcia-Sastre.** 2011. Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol* **9**:590-603.
155. **Min, J. Y., and R. M. Krug.** 2006. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:7100-5.
156. **Min, J. Y., S. Li, G. C. Sen, and R. M. Krug.** 2007. A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. *Virology* **363**:236-43.
157. **Moreno, A., I. Barbieri, E. Sozzi, A. Luppi, D. Lelli, G. Lombardi, M. G. Zanoni, and P. Cordioli.** 2009. Novel swine influenza virus subtype H3N1 in Italy. *Vet Microbiol* **138**:361-7.
158. **Morgan, C., H. M. Rose, and D. H. Moore.** 1956. Structure and development of viruses observed in the electron microscope. III. Influenza virus. *J Exp Med* **104**:171-82.
159. **Moules, V., O. Ferraris, O. Terrier, E. Giudice, M. Yver, J. P. Rolland, M. Bouscambert-Duchamp, C. Bergeron, M. Ottmann, E. Fournier, A. Traversier, C. Boule, A. Rivoire, Y. Lin, A. Hay, M. Valette, R. Marquet, M. Rosa-Calatrava, N. Naffakh, G. Schoehn, D. Thomas, and B. Lina.** 2010. In vitro characterization of naturally occurring influenza H3NA- viruses lacking the NA gene segment: toward a new mechanism of viral resistance? *Virology* **404**:215-24.
160. **Moules, V., O. Terrier, M. Yver, B. Riteau, C. Moriscot, O. Ferraris, T. Julien, E. Giudice, J. P. Rolland, A. Erny, M. Bouscambert-Duchamp, E. Frobert, M. Rosa-Calatrava, Y. Pu Lin, A. Hay, D. Thomas, G. Schoehn, and B. Lina.** 2011. Importance of viral genomic composition in modulating glycoprotein content on the surface of influenza virus particles. *Virology* **414**:51-62.

161. **Muramoto, Y., A. Takada, K. Fujii, T. Noda, K. Iwatsuki-Horimoto, S. Watanabe, T. Horimoto, H. Kida, and Y. Kawaoka.** 2006. Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J Virol* **80**:2318-25.
162. **Naffakh, N., A. Tomoiu, M. A. Rameix-Welti, and S. van der Werf.** 2008. Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins. *Annu Rev Microbiol* **62**:403-24.
163. **Nagata, K., A. Kawaguchi, and T. Naito.** 2008. Host factors for replication and transcription of the influenza virus genome. *Rev Med Virol* **18**:247-60.
164. **Naito, T., F. Momose, A. Kawaguchi, and K. Nagata.** 2007. Involvement of Hsp90 in assembly and nuclear import of influenza virus RNA polymerase subunits. *J Virol* **81**:1339-49.
165. **Nakajima, K., and A. Sugiura.** 1977. Three-factor cross of influenza virus. *Virology* **81**:486-9.
166. **Nakajima, K., M. Ueda, and A. Sugiura.** 1979. Origin of small RNA in von Magnus particles of influenza virus. *J Virol* **29**:1142-8.
167. **Nakajima, S., N. J. Cox, and A. P. Kendal.** 1981. Antigenic and genomic analyses of influenza A(H1N1) viruses from different regions of the world, February 1978 to March 1980. *Infect Immun* **32**:287-94.
168. **Narayan, P., D. F. Ayers, F. M. Rottman, P. A. Maroney, and T. W. Nilsen.** 1987. Unequal distribution of N6-methyladenosine in influenza virus mRNAs. *Mol Cell Biol* **7**:1572-5.
169. **Nayak, D. P., R. A. Balogun, H. Yamada, Z. H. Zhou, and S. Barman.** 2009. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res* **143**:147-61.
170. **Nayak, D. P., N. Sivasubramanian, A. R. Davis, R. Cortini, and J. Sung.** 1982. Complete sequence analyses show that two defective interfering influenza viral RNAs contain a single internal deletion of a polymerase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**:2216-20.
171. **Nayak, D. P., K. Tobita, J. M. Janda, A. R. Davis, and B. K. De.** 1978. Homologous interference mediated by defective interfering influenza virus derived from a temperature-sensitive mutant of influenza virus. *J Virol* **28**:375-86.
172. **Nelson, M. I., L. Simonsen, C. Viboud, M. A. Miller, J. Taylor, K. S. George, S. B. Griesemer, E. Ghedin, N. A. Sengamalay, D. J. Spiro, I. Volkov, B. T. Grenfell, D. J. Lipman, J. K. Taubenberger, and E. C. Holmes.** 2006. Stochastic processes are key determinants of short-term evolution in influenza a virus. *PLoS Pathog* **2**:e125.
173. **Nelson, M. I., C. Viboud, L. Simonsen, R. T. Bennett, S. B. Griesemer, K. St George, J. Taylor, D. J. Spiro, N. A. Sengamalay, E. Ghedin, J. K. Taubenberger, and E. C. Holmes.** 2008. Multiple reassortment events in the evolutionary history of H1N1 influenza A virus since 1918. *PLoS Pathog* **4**:e1000012.

174. **Neumann, G., and G. Hobom.** 1995. Mutational analysis of influenza virus promoter elements in vivo. *J Gen Virol* **76 ( Pt 7):**1709-17.
175. **Neumann, G., M. T. Hughes, and Y. Kawaoka.** 2000. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *Embo J* **19:**6751-8.
176. **Neumann, G., M. A. Whitt, and Y. Kawaoka.** 2002. A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA - what have we learned? *J Gen Virol* **83:**2635-62.
177. **Newcomb, L. L., R. L. Kuo, Q. Ye, Y. Jiang, Y. J. Tao, and R. M. Krug.** 2009. Interaction of the influenza a virus nucleocapsid protein with the viral RNA polymerase potentiates unprimed viral RNA replication. *J Virol* **83:**29-36.
178. **Ng, A. K., J. H. Wang, and P. C. Shaw.** 2009. Structure and sequence analysis of influenza A virus nucleoprotein. *Sci China C Life Sci* **52:**439-49.
179. **Ng, A. K., H. Zhang, K. Tan, Z. Li, J. H. Liu, P. K. Chan, S. M. Li, W. Y. Chan, S. W. Au, A. Joachimiak, T. Walz, J. H. Wang, and P. C. Shaw.** 2008. Structure of the influenza virus A H5N1 nucleoprotein: implications for RNA binding, oligomerization, and vaccine design. *Faseb J* **22:**3638-47.
180. **Nicholls, J. M., R. W. Chan, R. J. Russell, G. M. Air, and J. S. Peiris.** 2008. Evolving complexities of influenza virus and its receptors. *Trends Microbiol* **16:**149-57.
181. **Noble, S., and N. J. Dimmock.** 1995. Characterization of putative defective interfering (DI) A/WSN RNAs isolated from the lungs of mice protected from an otherwise lethal respiratory infection with influenza virus A/WSN (H1N1): a subset of the inoculum DI RNAs. *Virology* **210:**9-19.
182. **Nobusawa, E., and K. Sato.** 2006. Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. *J Virol* **80:**3675-8.
183. **Noda, T., and Y. Kawaoka.** 2010. Structure of influenza virus ribonucleoprotein complexes and their packaging into virions. *Rev Med Virol* **20:**380-91.
184. **Noda, T., H. Sagara, A. Yen, A. Takada, H. Kida, R. H. Cheng, and Y. Kawaoka.** 2006. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* **439:**490-2.
185. **Obayashi, E., H. Yoshida, F. Kawai, N. Shibayama, A. Kawaguchi, K. Nagata, J. R. Tame, and S. Y. Park.** 2008. The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature* **454:**1127-31.
186. **Octaviani, C. P., C. Li, T. Noda, and Y. Kawaoka.** 2011. Reassortment between seasonal and swine-origin H1N1 influenza viruses generates viruses with enhanced growth capability in cell culture. *Virus Res* **156:**147-50.
187. **Octaviani, C. P., M. Ozawa, S. Yamada, H. Goto, and Y. Kawaoka.** 2010. High level of genetic compatibility between swine-origin H1N1 and highly pathogenic avian H5N1 influenza viruses. *J Virol* **84:**10918-22.

188. **Odagiri, T., and M. Tashiro.** 1997. Segment-specific noncoding sequences of the influenza virus genome RNA are involved in the specific competition between defective interfering RNA and its progenitor RNA segment at the virion assembly step. *J Virol* **71**:2138-45.
189. **Odagiri, T., and K. Tobita.** 1990. Mutation in NS2, a nonstructural protein of influenza A virus, extragenetically causes aberrant replication and expression of the PA gene and leads to generation of defective interfering particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:5988-92.
190. **Odagiri, T., K. Tominaga, K. Tobita, and S. Ohta.** 1994. An amino acid change in the non-structural NS2 protein of an influenza A virus mutant is responsible for the generation of defective interfering (DI) particles by amplifying DI RNAs and suppressing complementary RNA synthesis. *J Gen Virol* **75 ( Pt 1)**:43-53.
191. **Ortega, J., J. Martin-Benito, T. Zurcher, J. M. Valpuesta, J. L. Carrascosa, and J. Ortin.** 2000. Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J Virol* **74**:156-63.
192. **Ottmann, M., M. B. Duchamp, J. S. Casalegno, E. Frobert, V. Moules, O. Ferraris, M. Valette, V. Escuret, and B. Lina.** 2010. Novel influenza A(H1N1) 2009 in vitro reassortant viruses with oseltamivir resistance. *Antivir Ther* **15**:721-6.
193. **Oxford, J. S., and D. J. Hockley.** 1987. Orthomyxoviridae, p. 213-232. *In* M. V. Nermut and A. C. Steven (ed.), *Animal Virus Structure*. Elsevier, New York.
194. **Ozawa, M., K. Fujii, Y. Muramoto, S. Yamada, S. Yamayoshi, A. Takada, H. Goto, T. Horimoto, and Y. Kawaoka.** 2007. Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication. *J Virol* **81**:30-41.
195. **Ozawa, M., J. Maeda, K. Iwatsuki-Horimoto, S. Watanabe, H. Goto, T. Horimoto, and Y. Kawaoka.** 2009. Nucleotide sequence requirements at the 5' end of the influenza A virus M RNA segment for efficient virus replication. *J Virol* **83**:3384-8.
196. **Palese, P., and J. L. Schulman.** 1976. Differences in RNA patterns of influenza A viruses. *J Virol* **17**:876-84.
197. **Palese, P. A., and M. L. Shaw.** 2007. *Orthomyxoviridae: the viruses and their replication*, p. 1647-1689. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 5th ed, vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, Philadelphia, PA.
198. **Park, Y. W., and M. G. Katze.** 1995. Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation. *J Biol Chem* **270**:28433-9.
199. **Perez, J. T., A. Varble, R. Sachidanandam, I. Zlatev, M. Manoharan, A. Garcia-Sastre, and B. R. tenOever.** 2010. Influenza A virus-generated small RNAs regulate the switch from transcription to replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:11525-30.
200. **Pons, M., and G. K. Hirst.** 1969. The single- and double-stranded RNA's and the proteins of incomplete influenza virus. *Virology* **38**:68-72.

201. **Pons, M. W., I. T. Schulze, G. K. Hirst, and R. Hauser.** 1969. Isolation and characterization of the ribonucleoprotein of influenza virus. *Virology* **39**:250-9.
202. **Poole, E., D. Elton, L. Medcalf, and P. Digard.** 2004. Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology* **321**:120-33.
203. **Poon, L. L., D. C. Pritlove, E. Fodor, and G. G. Brownlee.** 1999. Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. *J Virol* **73**:3473-6.
204. **Portela, A., and P. Digard.** 2002. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* **83**:723-34.
205. **Presti, R. M., G. Zhao, W. L. Beatty, K. A. Mihindukulasuriya, A. P. da Rosa, V. L. Popov, R. B. Tesh, H. W. Virgin, and D. Wang.** 2009. Quarantfil, Johnston Atoll, and Lake Chad viruses are novel members of the family Orthomyxoviridae. *J Virol* **83**:11599-606.
206. **Rabadan, R., A. J. Levine, and M. Krasnitz.** 2008. Non-random reassortment in human influenza A viruses. *Influenza Other Respi Viruses* **2**:9-22.
207. **Rabadan, R., A. J. Levine, and H. Robins.** 2006. Comparison of avian and human influenza A viruses reveals a mutational bias on the viral genomes. *J Virol* **80**:11887-91.
208. **Resa-Infante, P., N. Jorba, R. Coloma, and J. Ortin.** 2011. The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. *RNA Biol* **8**:207-15.
209. **Robb, N. C., M. Smith, F. T. Vreede, and E. Fodor.** 2009. NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. *J Gen Virol* **90**:1398-407.
210. **Rossman, J. S., X. Jing, G. P. Leser, V. Balannik, L. H. Pinto, and R. A. Lamb.** 2010. Influenza virus m2 ion channel protein is necessary for filamentous virion formation. *J Virol* **84**:5078-88.
211. **Rossman, J. S., X. Jing, G. P. Leser, and R. A. Lamb.** 2010. Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell* **142**:902-13.
212. **Rossman, J. S., and R. A. Lamb.** 2011. Influenza virus assembly and budding. *Virology* **411**:229-36.
213. **Roth, M. G., and R. W. Compans.** 1981. Delayed appearance of pseudotypes between vesicular stomatitis virus influenza virus during mixed infection of MDCK cells. *J Virol* **40**:848-60.
214. **Ruigrok, R. W., and F. Baudin.** 1995. Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that are indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles. *J Gen Virol* **76 ( Pt 4)**:1009-14.

215. **Schnell, J. R., and J. J. Chou.** 2008. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature* **451**:591-5.
216. **Scholtissek, C., W. Rohde, E. Harms, R. Rott, M. Orlich, and C. B. Boschek.** 1978. A possible partial heterozygote of an influenza A virus. *Virology* **89**:506-16.
217. **Schroeder, C., H. Heider, E. Moncke-Buchner, and T. I. Lin.** 2005. The influenza virus ion channel and maturation cofactor M2 is a cholesterol-binding protein. *Eur Biophys J* **34**:52-66.
218. **Schulze, I. T., M. W. Pons, and G. K. Hirst.** 1970. The RNA and proteins of influenza virus, p. 324-346. *In* R. D. Barry and B. W. J. Mahy (ed.), *The Biology of Large RNA Viruses*. Academic Press, New York.
219. **Schweiger, B., L. Bruns, and K. Meixenberger.** 2006. Reassortment between human A(H3N2) viruses is an important evolutionary mechanism. *Vaccine* **24**:6683-90.
220. **Shinya, K., Y. Fujii, H. Ito, T. Ito, and Y. Kawaoka.** 2004. Characterization of a neuraminidase-deficient influenza a virus as a potential gene delivery vector and a live vaccine. *J Virol* **78**:3083-8.
221. **Sieczkarski, S. B., and G. R. Whittaker.** 2002. Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **76**:10455-64.
222. **Silverman, R. H.** 2007. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *J Virol* **81**:12720-9.
223. **Sinck, L., D. Richer, J. Howard, M. Alexander, D. F. Purcell, R. Marquet, and J. C. Paillart.** 2007. In vitro dimerization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) spliced RNAs. *RNA* **13**:2141-50.
224. **Sivasubramanian, N., and D. P. Nayak.** 1983. Defective interfering influenza RNAs of polymerase 3 gene contain single as well as multiple internal deletions. *Virology* **124**:232-7.
225. **Skehel, J. J., and D. C. Wiley.** 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* **69**:531-69.
226. **Smith, G. J., D. Vijaykrishna, J. Bahl, S. J. Lycett, M. Worobey, O. G. Pybus, S. K. Ma, C. L. Cheung, J. Raghvani, S. Bhatt, J. S. Peiris, Y. Guan, and A. Rambaut.** 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* **459**:1122-5.
227. **Smith, G. L., and A. J. Hay.** 1982. Replication of the influenza virus genome. *Virology* **118**:96-108.
228. **Stevens, J., A. L. Corper, C. F. Basler, J. K. Taubenberger, P. Palese, and I. A. Wilson.** 2004. Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. *Science* **303**:1866-70.
229. **Stouffer, A. L., R. Acharya, D. Salom, A. S. Levine, L. Di Costanzo, C. S. Soto, V. Tereshko, V. Nanda, S. Stayrook, and W. F. DeGrado.** 2008. Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel. *Nature* **451**:596-9.

230. **Sugiyama, K., E. Obayashi, A. Kawaguchi, Y. Suzuki, J. R. Tame, K. Nagata, and S. Y. Park.** 2009. Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA polymerase. *Embo J* **28**:1803-11.
231. **Suzuki, Y.** 2010. A phylogenetic approach to detecting reassortments in viruses with segmented genomes. *Gene* **464**:11-6.
232. **Suzuki, Y., and M. Nei.** 2002. Origin and evolution of influenza virus hemagglutinin genes. *Mol Biol Evol* **19**:501-9.
233. **Takizawa, N., M. Kumakura, K. Takeuchi, N. Kobayashi, and K. Nagata.** 2010. Sorting of influenza A virus RNA genome segments after nuclear export. *Virology* **401**:248-56.
234. **Tarendeau, F., J. Boudet, D. Guilligay, P. J. Mas, C. M. Bougault, S. Boulo, F. Baudin, R. W. Ruigrok, N. Daigle, J. Ellenberg, S. Cusack, J. P. Simorre, and D. J. Hart.** 2007. Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nat Struct Mol Biol* **14**:229-33.
235. **Tarendeau, F., T. Crepin, D. Guilligay, R. W. Ruigrok, S. Cusack, and D. J. Hart.** 2008. Host determinant residue lysine 627 lies on the surface of a discrete, folded domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *PLoS Pathog* **4**:e1000136.
236. **Taubenberger, J. K., and J. C. Kash.** 2010. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell Host Microbe* **7**:440-51.
237. **Tchatalbachev, S., R. Flick, and G. Hobom.** 2001. The packaging signal of influenza viral RNA molecules. *Rna* **7**:979-89.
238. **Torbet, J.** 1983. Internal structural anisotropy of spherical viruses studied with magnetic birefringence. *EMBO J* **2**:63-6.
239. **Torreira, E., G. Schoehn, Y. Fernandez, N. Jorba, R. W. Ruigrok, S. Cusack, J. Ortin, and O. Llorca.** 2007. Three-dimensional model for the isolated recombinant influenza virus polymerase heterotrimer. *Nucleic Acids Res* **35**:3774-83.
240. **Tsai, K. N., and G. W. Chen.** 2011. Influenza genome diversity and evolution. *Microbes Infect* **13**:479-88.
241. **Ueda, C. T., and R. W. Roberts.** 2004. Analysis of a long-range interaction between conserved domains of human telomerase RNA. *RNA* **10**:139-47.
242. **Ueda, M., K. Nakajima, and A. Sugiura.** 1980. Extra RNAs of von Magnus particles of influenza virus cause reduction of particular polymerase genes. *J Virol* **34**:1-8.
243. **Varich, N. L., A. K. Gitelman, A. A. Shilov, Y. A. Smirnov, and N. V. Kaverin.** 2008. Deviation from the random distribution pattern of influenza A virus gene segments in reassortants produced under non-selective conditions. *Arch Virol* **153**:1149-54.
244. **Von Magnus, P.** 1954. Incomplete forms of influenza virus. *Adv Virus Res* **2**:59-79.
245. **Vreede, F. T., and G. G. Brownlee.** 2007. Influenza virion-derived viral ribonucleoproteins synthesize both mRNA and cRNA in vitro. *J Virol* **81**:2196-204.



246. **Vreede, F. T., H. Gifford, and G. G. Brownlee.** 2008. Role of initiating nucleoside triphosphate concentrations in the regulation of influenza virus replication and transcription. *J Virol* **82**:6902-10.
247. **Wagner, R., M. Matrosovich, and H. D. Klenk.** 2002. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev Med Virol* **12**:159-66.
248. **Wang, W., Z. Q. Cui, H. Han, Z. P. Zhang, H. P. Wei, Y. F. Zhou, Z. Chen, and X. E. Zhang.** 2008. Imaging and characterizing influenza A virus mRNA transport in living cells. *Nucleic Acids Res* **36**:4913-28.
249. **Wanitchang, A., P. Patarasirin, J. Jengarn, and A. Jongkaewwattana.** 2011. Atypical characteristics of nucleoprotein of pandemic influenza virus H1N1 and their roles in reassortment restriction. *Arch Virol* **156**:1031-40.
250. **Watanabe, K., H. Handa, K. Mizumoto, and K. Nagata.** 1996. Mechanism for inhibition of influenza virus RNA polymerase activity by matrix protein. *J Virol* **70**:241-7.
251. **Watanabe, T., S. Watanabe, T. Noda, Y. Fujii, and Y. Kawaoka.** 2003. Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes. *J Virol* **77**:10575-83.
252. **Webster, R. G., W. J. Bean, O. T. Gorman, T. M. Chambers, and Y. Kawaoka.** 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* **56**:152-79.
253. **Winter, G., S. Fields, and G. Ratti.** 1981. The structure of two subgenomic RNAs from human influenza virus A/PR/8/34. *Nucleic Acids Res* **9**:6907-15.
254. **Wise, H. M., A. Foeglein, J. Sun, R. M. Dalton, S. Patel, W. Howard, E. C. Anderson, W. S. Barclay, and P. Digard.** 2009. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol* **83**:8021-31.
255. **Worobey, M., A. Rambaut, O. G. Pybus, and D. L. Robertson.** 2002. Questioning the evidence for genetic recombination in the 1918 "Spanish flu" virus. *Science* **296**:211 discussion 211.
256. **Wright, P. F., G. Neumann, and Y. Kawaoka.** 2007. Orthomyxovirus, p. 1691-1740. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 5th ed, vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, Philadelphia, PA.
257. **Wu, R., Y. Guan, Z. Yang, J. Chen, H. Wang, Q. Chen, Z. Sui, F. Fang, and Z. Chen.** 2010. A live bivalent influenza vaccine based on a H9N2 virus strain. *Vaccine* **28**:673-80.
258. **Xu, X., C. B. Smith, B. A. Mungall, S. E. Lindstrom, H. E. Hall, K. Subbarao, N. J. Cox, and A. Klimov.** 2002. Intercontinental circulation of human influenza A(H1N2) reassortant viruses during the 2001-2002 influenza season. *J Infect Dis* **186**:1490-3.

259. **Xu, X., X. Zhu, R. A. Dwek, J. Stevens, and I. A. Wilson.** 2008. Structural characterization of the 1918 influenza virus H1N1 neuraminidase. *J Virol* **82**:10493-501.
260. **Yamada, S., M. Hatta, B. L. Staker, S. Watanabe, M. Imai, K. Shinya, Y. Sakai-Tagawa, M. Ito, M. Ozawa, T. Watanabe, S. Sakabe, C. Li, J. H. Kim, P. J. Myler, I. Phan, A. Raymond, E. Smith, R. Stacy, C. A. Nidom, S. M. Lank, R. W. Wiseman, B. N. Bimber, D. H. O'Connor, G. Neumann, L. J. Stewart, and Y. Kawaoka.** 2010. Biological and structural characterization of a host-adapting amino acid in influenza virus. *PLoS Pathog* **6**.
261. **Yamaguchi, M., R. Danev, K. Nishiyama, K. Sugawara, and K. Nagayama.** 2008. Zernike phase contrast electron microscopy of ice-embedded influenza A virus. *J Struct Biol* **162**:271-6.
262. **Yamanaka, K., A. Ishihama, and K. Nagata.** 1990. Reconstitution of influenza virus RNA-nucleoprotein complexes structurally resembling native viral ribonucleoprotein cores. *J Biol Chem* **265**:11151-5.
263. **Yang, P., A. Bansal, C. Liu, and G. M. Air.** 1997. Hemagglutinin specificity and neuraminidase coding capacity of neuraminidase-deficient influenza viruses. *Virology* **229**:155-65.
264. **Yazaki, K., T. Sano, K. Nerome, and K. Miura.** 1984. Arrangement of coiled ribonucleoprotein in influenza A virus particles. *J Electron Microsc (Tokyo)* **33**:395-400.
265. **Ye, Q., R. M. Krug, and Y. J. Tao.** 2006. The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature* **444**:1078-82.
266. **Yondola, M., and C. Carter.** 2011. Un-"ESCRT"-ed Budding. *Viruses* **3**:26-31.
267. **Young, J. F., and P. Palese.** 1979. Evolution of human influenza A viruses in nature: recombination contributes to genetic variation of H1N1 strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:6547-51.
268. **Yuan, P., M. Bartlam, Z. Lou, S. Chen, J. Zhou, X. He, Z. Lv, R. Ge, X. Li, T. Deng, E. Fodor, Z. Rao, and Y. Liu.** 2009. Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site. *Nature* **458**:909-13.
269. **Zhang, J., A. Pekosz, and R. A. Lamb.** 2000. Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. *J Virol* **74**:4634-44.
270. **Zheng, H., H. A. Lee, P. Palese, and A. Garcia-Sastre.** 1999. Influenza A virus RNA polymerase has the ability to stutter at the polyadenylation site of a viral RNA template during RNA replication. *J Virol* **73**:5240-3.
271. **Zheng, H., P. Palese, and A. Garcia-Sastre.** 1996. Nonconserved nucleotides at the 3' and 5' ends of an influenza A virus RNA play an important role in viral RNA replication. *Virology* **217**:242-51.