



HAL
open science

Influence de la séquence nucléotidique sur le taux d'erreur des polymérases des virus influenza A

Paul Lamont

► **To cite this version:**

Paul Lamont. Influence de la séquence nucléotidique sur le taux d'erreur des polymérases des virus influenza A. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04160709

HAL Id: dumas-04160709

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04160709v1>

Submitted on 12 Jul 2023

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

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

INFLUENCE DE LA SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE SUR LE TAUX D'ERREUR DES POLYMERASES DES *VIRUS INFLUENZA A.*

THESE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

LAMONT Paul, Claude, Lucien

Directeur de thèse : M. Romain VOLMER

JURY

PRESIDENT :

M. Stéphane BERTAGNOLI

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Romain VOLMER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mme Christelle CAMUS

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*

PROFESSEURS 2^{ème} CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et économie de la santé animale*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales réglementées*
- Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Anatomie Pathologique*

INGENIEURS DE RECHERCHE

- M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*
- M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
- M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CROVILLE Guillaume**, *Virologie et génomique cliniques*
- Mme **DEBREUQUE Maud**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*
- Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*
- Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*
- Mme **GRISEZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*
- Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **RAMON PORTUGAL Félipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*
- M. **DELPONT Mattias**, *Clinique Aviaire*
- Mme **POUJADE Agnès**, *Anatomie pathologique Vétérinaire*
- Mme **LAYSSOL-LAMOUR Catherine**, *Imagerie Médicale*
- Mme **SAADA Chloé**, *Gestion intégrée de la santé des ruminants*

Remerciements

À Monsieur le Professeur Stéphane BERTAGNOLI

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie Infectieuse

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse,

Hommages respectueux.

À Monsieur le Professeur Romain VOLMER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Microbiologie et Infectiologie

Pour m'avoir fait l'honneur d'encadrer mon travail,

Pour sa disponibilité et sa bienveillance,

Sincères remerciements.

À Madame le Professeur Christelle CAMUS

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Biologie cellulaire et moléculaire

Pour m'avoir fait l'honneur d'être membre de mon jury de thèse,

Mes remerciements respectueux.

À Monsieur le Docteur Gabriel DUPRÉ

Doctorant en virologie moléculaire au sein de l'unité UMR 1225 IHAP

Pour son aide, sa disponibilité et sa gentillesse,

Sincères remerciements.

Table des matières

Liste des figures	9
Liste des tableaux	13
Liste des abréviations	15
I. Introduction	19
A. Classification des virus influenza.....	19
B. Structure virale	21
C. Cycle de réplication virale.....	23
D. Reconnaissance virus – cellule hôte.....	24
1. Hémagglutinine	24
2. Neuraminidase	26
3. Acides sialiques.....	27
4. Sous-types de VIAs.....	28
E. Évolution des VIAs.....	29
1. Dérive antigénique	29
2. Cassure antigénique.....	30
F. Écologie des VIAs.....	33
G. Phénotypes faiblement pathogène et hautement pathogène.....	36
1. Site de clivage de l'hémagglutinine	37
2. Emergence des VIAHP.....	38
3. Predisposition génétique à l'émergence de VIAHP	40
H. Enjeux pour les santés animale et humaine	43
II. Partie expérimentale	45
A. Projet RISKEVOL	45

B.	Plasmide phw2000	45
C.	S'affranchir de la pression de sélection	47
1.	Système PA-HA	47
2.	Système mini-génome.....	49
D.	Projet de thèse	50
1.	Premiers résultats du projet RISKEVOL.....	50
2.	Objectifs et contribution au projet.....	51
E.	Système PA-PR8-HA-Udorn.....	52
1.	Vérification de la construction.....	53
2.	Production du virus recombinant	60
F.	Système mini-génome H7N1(977).....	66
1.	Modification des plasmides phw2000-977-X par mutagenèse	66
2.	Modification des plasmides phw2000-HA-X par mutagenèse	71
3.	Utilisation du système mini-génome H7N1(977)	75
G.	Séquençage haut débit Illumina®.....	82
1.	Construction de bibliothèques de séquençage.....	83
2.	Séquençage par synthèse sur la « Flow cell »	84
3.	Analyse des données de séquençage.....	86
III.	Discussion.....	98
A.	Contexte économique et sanitaire	98
B.	Production de méthodes d'analyse des mutations de HA.....	99
1.	Système PA-HA	99
2.	Système mini-génome.....	100
C.	Séquençage haut débit et comparaison de ces méthodes	102
	Conclusion	106
	Bibliographie	108

Liste des figures

Figure 1: Représentation d'une particule virale Influenza A.....	22
Figure 2 : Cycle de réplication des VIAs	24
Figure 3 : Structure de la molécule d'hémagglutinine (HA).....	25
Figure 4 : Structure quaternaire du tétramère de neuraminidase et position par rapport à l'enveloppe virale.....	26
Figure 5 : Les liaisons α -2,3 et α -2,6 entre l'acide sialique et le galactose	27
Figure 6 : Dérive antigénique et cassure antigénique chez les virus Influenza en prenant pour exemple l'émergence du virus H3N2 responsable de la grippe de Hong-Kong	31
Figure 7 : Histoire des évènements de réassortiment à l'origine de la genèse du virus pandémique H1N1 en 2009.	32
Figure 8 : Ecologie des VIAs.....	34
Figure 9 : Les différences d'acides sialiques le long du tractus respiratoire humain influent sur la fixation de l'hémagglutinine des VIAs.	35
Figure 10 : Localisation des infections dues aux VIAFP et aux VIAHP, en fonction de la séquence du SC et des protéases qui peuvent le cliver.....	38
Figure 11 : Séquence du site de clivage de HA de Shim H5 et de ses variants après des passages chez le poulet.	41
Figure 12 : Prédiction de structure secondaire de l'ARN codant pour le site de clivage de HA du virus Shim H5 et de ses variants Shim H5 24a et Shim H5 24a2b.	42
Figure 13 : Représentation schématique de l'insertion d'un segment d'un VIA dans un plasmide phw2000	46
Figure 14 : Représentation schématique de la construction PA-HA	47
Figure 15 : Protocole de génétique inverse permettant la production d'un VIA à partir de la transfection de 8 plasmides	48

Figure 16 : Séquençage Illumina de la séquence de 80 nucléotides qui entoure le site de clivage.....	50
Figure 17 : Construction phw2000-PA-PR8-HA-Udorn	52
Figure 18 : Digestion du plasmide phw2000-PA-PR8-HA-Udorn par les enzymes de restriction Pvu II et Hind III	53
Figure 19 : Lieu de fixation des amorces GDA 124, GDA 125 et Bm-PA 2232 sur le plasmide phw2000-PA-PR8-HA-Udorn et amplicons théoriques attendus lors de la réaction de PCR.....	54
Figure 20 : Gel d'électrophorèse obtenu après migration des produits de digestion du plasmide phw2000-PA-PR8-HA Udorn par les enzymes de restriction Pvu II et Hind III, et des produits des réactions de PCR décrites plus haut	56
Figure 21 : Gel d'électrophorèse obtenu après migration des produits des réactions de PCR réalisée avec la nouvelle amorce GDA 126.....	58
Figure 22 : Gel obtenu après migration des produits de la réaction de PCR réalisée sur les 8 colonies obtenues après transformation du plasmide phw2000-PA-PR8-HA-Udorn dans des bactéries compétentes	59
Figure 23 : « Alignement » entre la séquence théorique de la construction phw2000-Pr8-PA-HA-Udorn et le résultat du séquençage pour un clone produit expérimentalement	60
Figure 24 : Observation au microscope à fluorescence des conditions GFP à 48h post-transfection	63
Figure 25 : Test d'hémagglutination effectué 72h post-transfection.....	64
Figure 26 : Représentation schématique du test d'hémagglutination réalisé sur les produits de génétique inverse après amplification.	65
Figure 27 : Lieu de fixation des amorces GDA 129 et GDA 130 sur le plasmide phw2000-977-PA et amplicon théorique attendu lors de la réaction de PCR	67
Figure 28 : Gel d'électrophorèse obtenu après migration des produits de la réaction de PCR inverse.....	68
Figure 29 : Lieu de fixation des amorces GDA 137 et GDA 138 sur le plasmide phw2000-HA-ShimH5 et amplicon théorique attendu lors de la réaction de PCR	72

Figure 30 : Gel obtenu après migration des produits des PCR réalisées pour déléter le promoteur CMV sur les plasmides phw2000-HA-X avec les amorces GDA 137 et GDA 138.....	74
Figure 31 : Quantités d'ADN obtenues après la RT-qPCR réalisée sur les surnageants des réactions de transfection des plasmides phw2000-HA-ShimH5 et phw2000-HAShimH5-24a2b avec les systèmes mini-génome WSN et 977	82
Figure 32 : Les bibliothèques de séquençage après les différentes PCR d'amplification.....	84
Figure 33 : La génération d'amplifiats sur la Flow Cell.....	85
Figure 34 : Fréquence d'insertions de nucléotides en fonction de la position dans la séquence nucléotidique du segment HShimH5 ou HShimH524a2b, pour les systèmes RT Pol I, mini-génome 977, mini-génome WSN, MDCK-977-PAHA et DF1-977-PAHA.....	88
Figure 35 : Fréquence moyenne d'insertions de nucléotides entre les positions 1012 et 1029, en fonction du système et du segment HA étudié.....	89
Figure 36 : Fréquence de substitutions de nucléotides en fonction de la position dans la séquence nucléotidique du segment HShimH5 ou HShimH524a2b, pour les systèmes RT Pol I, mini-génome 977, mini-génome WSN, MDCK-977-PAHA et DF1-977-PAHA.	92
Figure 37 : Fréquence moyenne de substitutions de nucléotides entre les positions 1012 et 1029, en fonction du système et du segment HA étudié.....	93
Figure 38 : Proportion des événements de substitutions conduisant à un résidu adénine en position 1016, en fonction du système étudié, pour HShimH5 et HShimH524a2b.....	94
Figure 39 : Fréquence de délétions de nucléotides en fonction de la position dans la séquence nucléotidique du segment HShimH5 ou HShimH524a2b, pour les systèmes RT Pol I, mini-génome 977, mini-génome WSN, MDCK-977-PAHA et DF1-977-PAHA.....	96
Figure 40 : Fréquence moyenne de délétions de nucléotides entre les positions 1012 et 1029, en fonction du système et du segment HA étudié.....	97

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples d'évènements d'émergence de VIAHP pour lesquels le VIAFP précurseur est connu.....	40
Tableau 2 : Protocole des PCR réalisées sur le plasmide phw2000-PA-PR8-HA-Udorn pour vérifier la présence de la construction PA-HA dans le plasmide.....	55
Tableau 3 : Protocole utilisé pour la transfection des plasmides du système PA-PR8-HA-Udorn	62
Tableau 4 : Protocole des PCR inverses réalisées sur les plasmides phw2000-977-X pour déléter le promoteur Pol I.....	67
Tableau 5 : Résultats de dosage par spectrophotométrie et de séquençage Sanger pour les 16 clones purifiés.	70
Tableau 6 : Protocole de la réaction de PCR inverse réalisée sur les plasmides phw2000-HA-X pour déléter le promoteur CMV	73
Tableau 7 : Protocole utilisé pour la transfection des plasmides pour le test de fonctionnalité du système mini-génome H7N1(977)	77
Tableau 8 : Mesures de luminescence pour les conditions 1, 2 et 3 après transfection, lyse cellulaire et réaction luciférase. La mesure est exprimée en URL (unité relative de lumière)	78
Tableau 9 : Protocole utilisé pour la transfection des plasmides pour la production des ARN viraux d'intérêt avec les systèmes mini-génome H1N1(WSN) et H7N1(977).....	79
Tableau 10 : Plaque P96 du protocole de réaction de qPCR sur les ADN produits par RT.....	81
Tableau 11 : Protocole de réaction de qPCR sur les ADN produits par RT. ...	81

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNm	ADN matrice
ARN	Acide ribonucléique
ARNc	ARN complémentaire
ARNm	ARN messenger
ARNv	ARN viral
CAT	Chloramphénicol acétyl transférase
Ct	Cycle seuil (« Cycle threshold »)
DF1	Cellules embryonnaires de poulet
DF1 977-PAHA	Système PA-HA produit avec le virus H7N1 977 dans des cellules DF1
DTT	Dithiothréitol
Fluc	« Firefly luciferase »
G	Glycine
GFP	Protéine fluorescente verte (green fluorescent protein)
HA	Hémagglutinine
HEF	Glycoprotéine de fusion hémagglutinine estérase
Hind III	Enzyme de restriction Hind III
HxNy	VIA de sérotype Hx et Ny
IAFP	Influenza aviaire faiblement pathogène
IAHP	Influenza aviaire hautement pathogène
IHAP	Interaction hôte-agent pathogène
IVPI	Index de pathogénicité intraveineuse
K	Lysine
LB	Milieu de culture « Lysogeny broth »
LTX	Lipofectamine® LTX Reagent
MDCK	Cellules canines de rein Madin-Darby Canine Kidney

MDCK 977-PAHA	Système PA-HA produit avec le virus H7N1 977 dans des cellules MDCK
minigWSN	Système mini-génome produit avec le virus H1N1 WSN
minig977	Système mini-génome produit avec le virus H7N1 977
M1	Protéine matrice
M2	Protéine de membrane
NA	Neuraminidase
NCR	Séquence non codante (non coding region)
NEP	Protéine d'exportation nucléaire
NGS	Site de N-Glycosilation
NGS	« New generation sequencing »
NLS	Signal de localisation nucléaire
Nluc	« Nanoluc® luciferase »
NP	Nucléoprotéine
NS1	Protéine non structurale 1
NS2	Protéine non structurale 2
nt	Nucléotide
OIE	Office international des épizooties
PA	Polymérase acide
pb	Paire de bases
PBS	Phosphate-buffered saline
PB1	Polymérase basique 1
PB2	Polymérase basique 2
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PC6	Proprotéine convertase 6
Pol I	Promoteur humain Pol I
Pol II	Promoteur Pol II
PolyA	Site de polyadénylation
PR8	Virus A/Puerto Rico/8/1934, H1N1
Pvu II	Enzyme de restriction Pvu II
qPCR	PCR quantitative
R	Arginine
RBS	Site de liaison (Receptor binding site)

RNPv	Ribonucléoprotéine virale
RT	Transcription inverse (Reverse transcription)
RT-PCR	PCR précédée d'une étape de transcription inverse
SBS	« Sequencing by Synthesis »
SC	Site de clivage
SCD	Séquence codante
SCMB	Site de clivage monobasique
SCPB	Site de clivage polybasique
ShimH5	Virus A/whistling swan/Shimane/499/1983, H5N3
ShimH524a2b	Virus mutant issu de ShimH5
SNP	« Single nucleotide polymorphism »
Tm	Terminateur murin
TPCK	Tosyl phénylalanyl chlorométhyl ketone
Udorn	Virus A/Udorn/307/1972, H3N2
UMR	Unité multidisciplinaire de recherche
VIA	Virus influenza aviaire
VIAFP	Virus influenza aviaire faiblement pathogène
VIAHP	Virus influenza aviaire hautement pathogène
WSN	Virus A/United Kingdom/WSN/1933, H1N1
wt	Virus sauvage (wild type)
ZP	Zone de protection
ZS	Zone de surveillance
293T	Cellules humaines embryonnaires de rein HEK-293T
977	Virus A/turkey/Italy/977/1999, H7N1

I. Introduction

A. Classification des virus influenza

Les virus influenza, aussi appelés virus de la grippe, appartiennent à la famille des Orthomyxoviridae et constituent le genre Influenzavirus. Ce sont des virus enveloppés dont le génome segmenté est constitué d'acide ribonucléique (ARN) simple brin de polarité négative (Lefkowitz et al. 2018). Ces virus provoquent majoritairement des affections respiratoires chez les mammifères, les oiseaux, les poissons et les insectes. Les Influenzavirus sont divisés en quatre genres ou « types » : A, B, C et D. Ce classement est effectué en fonction de la nature de la protéine matrice (M1) et de la nucléoprotéine (NP) (Hause et al. 2014) :

Les Alphainfluenzavirus (Influenzavirus de type A) sont le seul genre qui touche les oiseaux. Les oiseaux sauvages sont le principal réservoir naturel des virus Influenza A mais plusieurs espèces de mammifères terrestres et marins peuvent également être infectées : porcs, chevaux, furets, chats, baleines, phoques... (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) et al. 2017). Ils causent le plus souvent des symptômes respiratoires. Ces virus mutent rapidement et se sont diversifiés en souches plus ou moins pathogènes.

Les Betainfluenzavirus (Influenzavirus de type B) sont des virus très majoritairement humains mais d'autres réservoirs tels que les phoques existent (Osterhaus et al. 2000). La structure de leur génome ainsi que les signes cliniques qu'ils provoquent sont similaires à ceux des Influenzavirus A mais ils évoluent plus lentement (Chen, Holmes 2008). Ils circulent avec les Influenzavirus A lors d'épidémies et sont responsables d'environ 20 à 30% de l'incidence totale Influenza (Paul Glezen et al. 2013).

Les Gammainfluenzavirus (Influenzavirus de type C) sont également spécifiques de l'Homme et touchent majoritairement les enfants de moins de 2 ans et les patients atteints de comorbidité (Daniels et al. 2020). Ils touchent également les porcs et causent des symptômes respiratoires modérés. Ils sont responsables d'épidémies plus rares et plus locales (Matsuzaki et al. 2006). Ils diffèrent des Influenzavirus de type A et B par la glycoprotéine de fusion hémagglutinine-estérase

(HEF) et partagent cette particularité avec les Influenzavirus de type D (Rosenthal et al. 1998). Ils évoluent rapidement (Matsuzaki et al. 2021).

Les Deltainfluenzavirus (Influenzavirus de type D) ont été découverts en 2011 et sont connus pour infecter les porcins et les bovins, mais pas les humains. Ils sont classés dans un nouveau genre d'Orthomyxoviridae en 2016, alors qu'ils étaient initialement considérés comme un sous-type de Gammainfluenzavirus (Su et al. 2017). Ils sont responsables de symptômes respiratoires mineurs. Comme les Gammainfluenzavirus, leur génome est constitué de 7 segments codant pour 9 protéines alors que les Influenzavirus de type A et B ont un génome de 8 segments codant pour 11 protéines. Leur évolution semble lente et ils semblent échapper peu efficacement au système immunitaire grâce aux réactions croisées (Su et al. 2017).

Les Thogotovirus sont habituellement transmis par les tiques (plus rarement par des insectes). Ils peuvent se répliquer dans les cellules des tiques et des vertébrés (Leahy et al. 1997). La majorité des infections symptomatiques chez l'homme ont montré des symptômes neurologiques et une absence de signes cliniques respiratoires (Kosoy et al. 2014).

Les Isavirus infectent les salmonidés et comportent une seule espèce : l'isavirus du saumon. Ce virus est responsable de l'anémie infectieuse du saumon (Plarre et al. 2012).

Par la suite nous porterons notre intérêt sur le genre des Alphainfluenzavirus (VIAs) puisque c'est le seul qui infecte les oiseaux. La grippe provoquée par les VIAs est une zoonose et la transmission à l'Homme dépend de plusieurs facteurs qui sont à l'origine d'épidémies ou de pandémies. La première pandémie de grippe aviaire est reconnue chez l'Homme en 1510. On a depuis dénombré 14 pandémies soit une tous les 36 ans en moyenne (Morens et al. 2010). La plus célèbre et meurtrière d'entre elles est la pandémie de grippe espagnole (1918-1920), elle a causé environ 50 millions de décès dans le monde (Johnson, Mueller 2002).

B. Structure virale

Les particules virales ont un diamètre de 80 à 120 nm. L'enveloppe du virus est constituée d'une bicouche lipidique appartenant à la cellule infectée. Le génome est segmenté en 8 morceaux d'ARN simple brin de polarité négative (ARNv) et mesure 14 kilobases, avec des segments de tailles différentes : le plus court compte 890 bases alors que le plus long, à l'origine de la polymérase, en compte 2341.

Les 8 segments du génome codent pour 11 protéines avec des rôles distincts :

L'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA) sont des protéines transmembranaires codées par le 4^{ème} et le 6^{ème} segment du génome. L'hémagglutinine est une glycoprotéine qui agit dans la fixation du virus aux membranes cellulaires et dans la pénétration du virus dans la cellule hôte. La neuraminidase est une enzyme qui permet au virion de se détacher de la membrane de la cellule hôte et entraîne la diffusion dans cette cellule (Krammer et al. 2018).

Le complexe polymérase de l'ARN polymérase ARN dépendante est constitué de 3 sous-unités : les polymérase basiques 1 et 2 (PB1 et PB2) et la polymérase acide (PA). Elles sont codées par les 3 premiers segments du génome. Ce complexe permet la transcription du génome en ARN messager (ARNm) ainsi que sa réplication (Krammer et al. 2018). Chez certaines souches de VIAs, le segment PB1 code également pour la protéine accessoire (PB1-F2), une petite protéine de 87 acides aminés avec une activité pro-apoptotique (Bouvier, Palese 2008).

La nucléoprotéine (NP) a pour fonction primaire d'encapsider le génome du virus et joue un rôle clef dans la transcription et la réplication du virus. Elle est codée par le 5^{ème} segment. En se liant au génome, elle lui confère une structure hélicoïdale et assure sa stabilité. Elle interagit également avec les polypeptides de la cellule hôte tels que l'actine (Portela, Digard 2002).

Le 7^{ème} segment code pour deux protéines membranaires : la protéine de matrice (M1) et la protéine de membrane (M2). M1 assure la structure du virus et joue un rôle dans son bourgeonnement. M2 est transmembranaire, c'est un canal à protons qui est nécessaire à l'entrée et à la sortie du virus dans la cellule hôte (Krammer et al. 2018).

La protéine non structurale (NS1) et la protéine d'exportation nucléaire (NEP) sont codées par le 8^{ème} et dernier segment. NS1 est un facteur de virulence qui inhibe la réponse antivirale de la cellule hôte (Krammer et al. 2018). NEP, aussi appelée protéine non structurale 2 (NS2), régule le flux d'ARN dans la cellule et en particulier participe à l'export des ARN viraux depuis le noyau de la cellule hôte (Bouvier, Palese 2008).

Au sein du virus, chaque segment est associé à quatre molécules : les trois protéines du complexe polymérase PB1, PB2 et PA ainsi que des nucléoprotéines NP. Les segments d'ARN du génome des virus Influenza A forment ainsi des ribonucléoprotéines virales (RNPv) (Bouvier, Palese 2008).

La structure d'une particule virale Influenza A est présentée dans la figure 1.

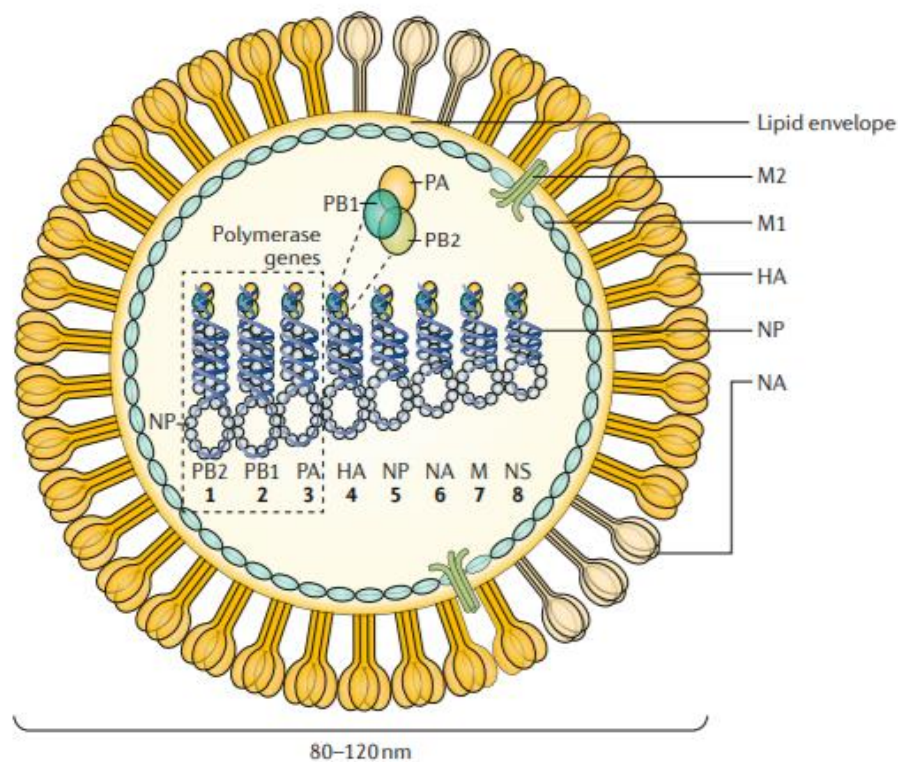


Figure 1: Représentation d'une particule virale Influenza A. (Krammer et al. 2018)

Les chiffres représentent les 8 segments du génome, ils sont liés aux protéines PA, PB1, PB2 et NP pour former les RNPv. Les protéines membranaires HA, NA, M1 et M2 sont schématisées.

C. Cycle de réplication virale

La particule virale se fixe sur la membrane de la cellule hôte grâce à des liaisons entre la protéine HA et les acides sialiques des récepteurs cellulaires (Bouvier, Palese 2008). Puis le virus est endocyté. L'acidité de l'endosome joue un rôle crucial dans la libération du virus dans la cellule. Un pH faible favorise un changement conformationnel de HA, ce qui libère un peptide qui permet la fusion entre la membrane de l'endosome et l'enveloppe du virus. Puis des pores sont ouverts, par lesquels les RNPv transitent dans le cytoplasme de la cellule hôte (Sieczkarski, Whittaker 2005). De plus, l'acidification interne par la protéine M2 perturbe les interactions protéine-protéine dans le virion, permettant le relargage des RNPv de la matrice virale vers le cytoplasme (Martin, Helenius 1991).

Les RNPv sont ensuite acheminées vers le noyau de la cellule hôte par le moyen de signaux de localisation nucléaire (NLSs) qui indiquent à des protéines cellulaires d'importer les RNPv vers le noyau (Cros, Palese 2003). Le noyau est le lieu de la synthèse de tous les ARN viraux. L'ARN polymérase ARN dépendante virale utilise l'ARN simple brin de polarité négative pour synthétiser deux types d'ARN de polarité positive : des ARNm pour la synthèse protéique virale et des ARN complémentaires (ARNc) qui vont à leur tour servir de matrice pour synthétiser l'ARN viral. La queue polyA est codée dans l'ARNv par un segment de cinq à sept résidus uracile qui sont ainsi transcrits en résidus adénine (Li, Palese 1994). Le coiffage des ARNm viraux est réalisé de façon singulière : les protéines PB1 et PB2 « volent » des coiffes aux ARNm de la cellule hôte (Krug 1981). Une fois polyadénylés et coiffés, les ARNm viraux sont exportés et traduits comme les ARNm de la cellule hôte. L'export des ARNv est cependant pris en charge par les protéines M1 et NEP (Cros, Palese 2003). Un VIA n'a pas tout son potentiel infectieux si son virion ne contient pas les 8 segments du génome. Des signaux d'empaquetage sont présents sur tous les segments d'ARNv sous la forme de courtes séquences qui assurent que le génome complet est incorporé dans la majorité des particules virales (Bancroft, Parslow 2002). Le virus bourgeonne au niveau de la membrane cellulaire. Une fois le bourgeonnement achevé, NA neutralise les liaisons entre HA et les acides sialiques cellulaires ce qui permet la libération de la particule virale. Le cycle de réplication complet est résumé dans la figure 2.

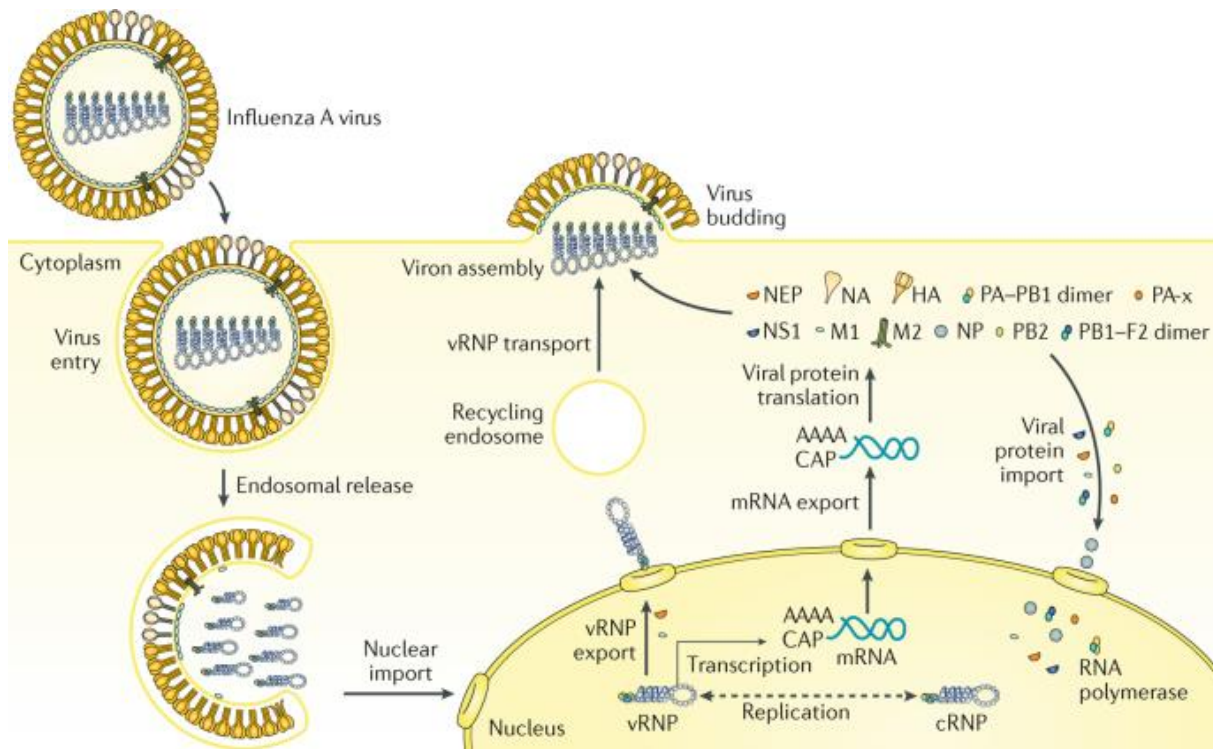


Figure 2 : Cycle de réplication des VIAs (Krammer et al. 2018)

cRNP : ribonucléoprotéine complémentaire ; CAP : coiffe des ARNm.

D. Reconnaissance virus – cellule hôte

L'hémagglutinine et la neuraminidase sont les protéines majeures de l'enveloppe virale. Par leur interaction avec les acides sialiques, elles sont à l'origine de la fixation du virus sur la membrane cellulaire ainsi que de sa libération dans la cellule. Elles sont donc indispensables à l'infection et à la réplication virale. Elles sont également les cibles principales de la réponse immunitaire (Krammer et al. 2018).

1. Hémagglutinine

HA constitue 80 à 90% des protéines exprimées à la surface des VIAs. Elle est synthétisée par le virus sous la forme d'un précurseur inactif nommé HA0. La structure tridimensionnelle de la protéine est un homotrimer (molécule formée de 3 monomères identiques). Chaque monomère est une protéine HA0 constituée de deux sous-unités. HA1 est une sous-unité extracellulaire globulaire aussi appelée « tête », elle contient le site de liaison, appelé RBS (Receptor Binding Site), au récepteur des membranes des cellules comportant un acide sialique. Le RBS confère par ailleurs au virus la capacité d'agglutiner des globules rouges, une propriété importante qui est exploitée dans les tests sérologiques HA. Le domaine HA1 contient également des sites

antigéniques qui sont les cibles préférentielles de la réponse immunitaire (Air, Laver, Webster 1987). HA2, aussi appelée « tige », est responsable de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome de la cellule hôte lors de l'assemblage et de la libération des virions (Steinhauer 1999). HA1 et HA2 sont clivées par des protéines de l'hôte. Les sous-unités HA1 et HA2 sont maintenues entre elles par un pont disulfure après ce clivage. La séquence d'acides aminés au niveau du site de clivage est un facteur important de pathogénicité (Steinhauer 1999). La figure 3 montre les structures tertiaires et quaternaires de la molécule d'hémagglutinine.

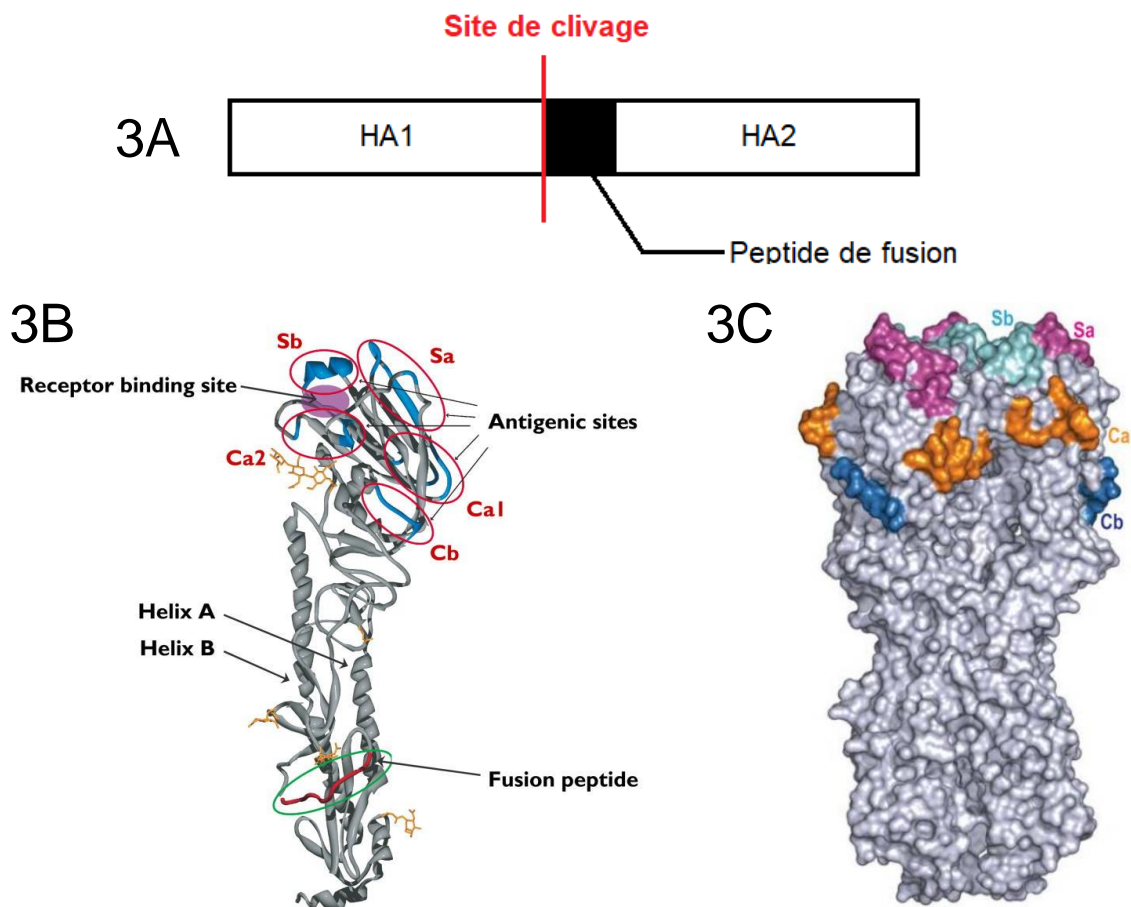


Figure 3 : Structure de la molécule d'hémagglutinine (HA). (Xu et al. 2010)

Légende : 3A) Représentation linéaire d'un monomère HA0. 3B) Structure tertiaire d'un monomère HA montrant les sites antigéniques de la sous-unité HA1 (Bouvier, Palese 2008). 3C) Structure quaternaire d'une HA de sous-type H1 avec les sites antigéniques en couleur.

2. Neuraminidase

La protéine de surface NA représente 10 à 20% de la surface exposée du virus. Son domaine extracellulaire forme des spicules à la surface du virus. Cette glycoprotéine a un site enzymatique et des sites antigéniques qui font d'elle une cible thérapeutique de choix. La neuraminidase est un tétramère de quatre polypeptides identiques. Les quatre monomères se replient pour former trois domaines distincts : la queue cytoplasmique, la tige qui comporte une portion hydrophobe transmembranaire et la tête globulaire contenant le site actif et la plupart des sites antigéniques. L'activité enzymatique de NA est de type sialidase : elle hydrolyse spécifiquement les liaisons alpha-céto-sidiques des acides sialiques α -2,3 et α -2,6 qui se trouvent sur les sites de fixation du virus (Corfield et al. 1983). Les trois étapes où l'action de NA est utile sont la traversée des couches de mucus dans les voies respiratoires, la fusion à l'endosome au début de l'infection et la libération du virus à la fin de l'infection (Colman, Ward 1985) (Klenk, Rott 1988). Les activités relatives de HA et NA doivent être équilibrées pour que les capacités du virus à infecter et à être libéré de la cellule hôte soient optimales (McKimm-Breschkin et al. 1996). La structure tridimensionnelle de la neuraminidase est présentée dans la figure 4.

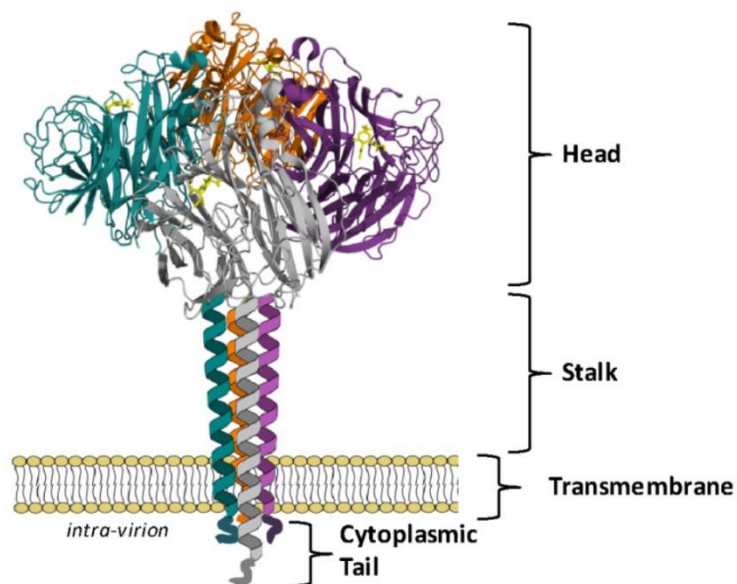


Figure 4 : Structure quaternaire du tétramère de neuraminidase et position par rapport à l'enveloppe virale. (McAuley et al. 2019)

Chaque couleur illustre un monomère NA différent.

3. Acides sialiques

La fixation de HA aux acides sialiques est indispensable au déroulement du cycle de réplication virale. Les acides N-acétylneuraminiques (acides sialiques) sont des molécules présentes sur la membrane cellulaire, dans laquelle ils sont associés à des chaînes glucidiques. En particulier, le carbone 2 de l'acide sialique peut se lier au carbone 3 ou 6 du galactose de la chaîne glucidique, formant ainsi des liaisons α -2,3 ou α -2,6. Les acides sialiques sont reconnus par les protéines HA à la surface des virus Influenza, qui ont des spécificités préférentielles pour les liaisons α -2,3 ou α -2,6 (Bouvier, Palese 2008). Par exemple, les liaisons α -2,6 prédominent à la surface des cellules de l'épithélium trachéal humain alors que les liaisons α -2,3 sont retrouvées dans l'épithélium digestif et respiratoire des oiseaux. Ces différentes liaisons sont schématisées dans la figure 5.

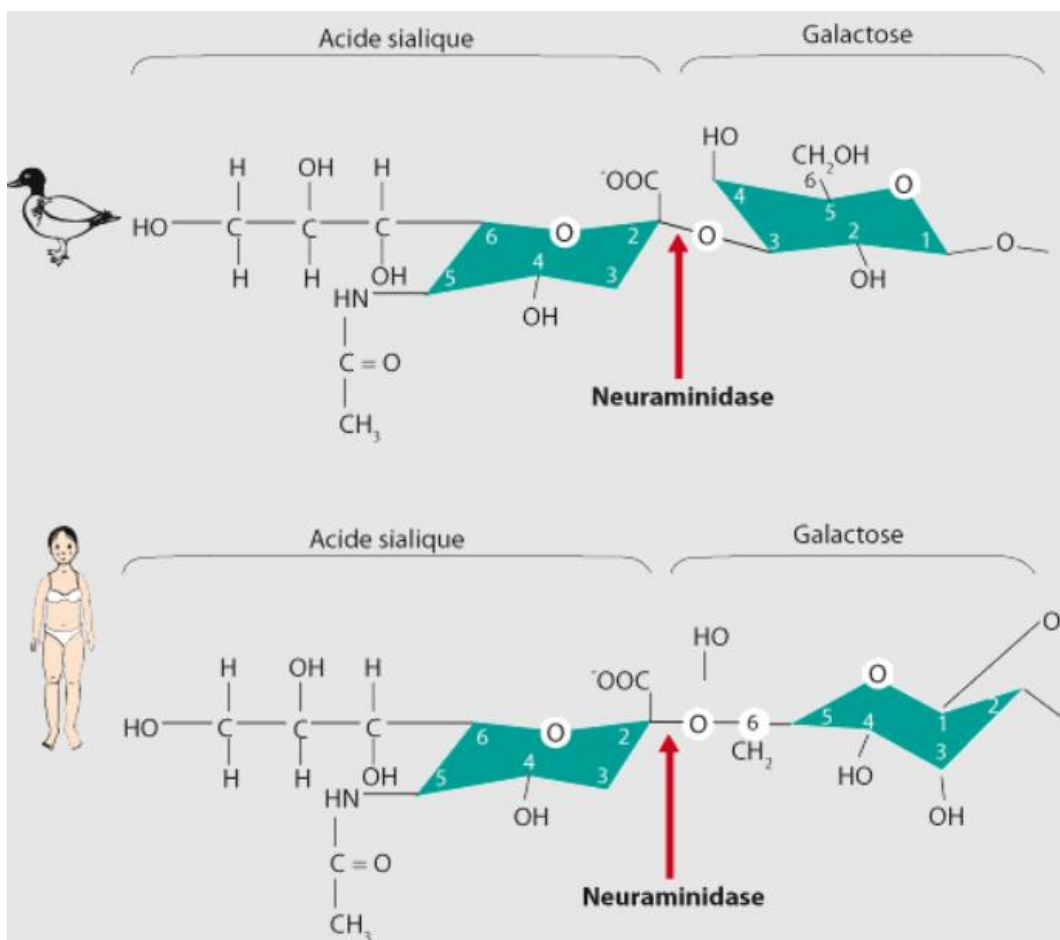


Figure 5 : Les liaisons α -2,3 et α -2,6 entre l'acide sialique et le galactose (UCLouvain FDP Virologie)

4. Sous-types de VIAs

Les VIAs présentent une caractéristique unique : ils circulent non seulement chez l'homme mais aussi chez les animaux domestiques, les cochons, les chevaux, la volaille et chez les oiseaux migratoires sauvages (plus de 100 espèces de canards, cygnes, oies, goélands, échassiers et d'oiseaux aquatiques sauvages sont considérées comme réservoir naturel (Olsen et al. 2006)). Ces réservoirs animaux sont une source de diversité génétique. En particulier, les gènes de HA et NA peuvent être échangés entre différentes souches virales par réassortiment lors d'une co-infection du même hôte. Il en résulte une forte variabilité antigénique des deux glycoprotéines de surface et les VIAs sont classés en sous-types en fonction des propriétés antigéniques de HA et NA. 16 sérotypes HA et 9 sérotypes NA (18 HA et 11 NA si on inclut les VIAs des chauve-souris, qui sont phylogénétiquement proches des VIAs aviaires mais ne peuvent se réassortir avec ces derniers (Tong et al. 2012)) ont été identifiés parmi les souches aviaires des VIAs (Fouchier et al. 2005). En théorie, il existe donc une combinaison de 16 sérotypes HA et 9 sérotypes NA soit 144 sous-types différents mais on ne les retrouve pas tous dans la nature. Chez l'homme les sous-types H1N1, H2N2 et H3N2 sont les plus fréquemment observés. Des VIAs de sous-type H1N1 sont à l'origine des pandémies de 1918 (grippe espagnole) et 2009. Des VIAs de sous-type H2N2 et H3N2 ont causé respectivement les pandémies de 1957 et 1968.

Chaque sous-type contient de nombreuses souches virales. Chaque souche virale est identifiée selon une nomenclature précise. Ce nom décrit le genre du virus, l'espèce (sauf si c'est un virus humain) et le lieu où il a été isolé, le numéro d'isolat, l'année où il a été découvert et le sous-type de HA et NA écrits sous la forme HxNy entre parenthèses.

Exemple : A/Turkey/Ontario/6118/1968 (H8N4) est un VIA isolé sur des dindes dans l'Ontario en 1968, de numéro 6118. Il possède une hémagglutinine de sérotype 8 et une neuraminidase de sérotype 4.

E. Évolution des VIAs

Les virus Influenza évoluent rapidement. Le caractère segmenté de leur génome est un facteur favorisant cette évolution. De plus, les protéines de l'enveloppe virale représentent des antigènes qui stimulent le système immunitaire des hôtes infectés, ce qui les expose à une pression de sélection élevée. Les mutations qui apparaissent sur la séquence ARN de HA et NA peuvent présenter un avantage sélectif fort pour échapper au système immunitaire des hôtes. Ainsi, même si un organisme est infecté ou vacciné plusieurs fois, de nouvelles contaminations sont possibles, en dépit de l'immunité existante. Cette variabilité, indispensable à la survie du virus, est garantie par deux grands mécanismes qui interviennent durant le cycle de réplication virale : la dérive antigénique et la cassure antigénique (Forrest, Webster 2010).

1. Dérive antigénique

L'ARN polymérase ARN dépendante virale n'a pas de fonction de réparation des erreurs de réplication de l'ARN. Il en résulte un taux de mutation d'environ 10^{-4} nucléotide (soit 1000 fois plus que l'ADN polymérase humaine) ce qui correspond à un peu plus d'une erreur par cycle de réplication virale (Pauly, Procaro, Luring 2017a). La pression de sélection va s'exercer sur ces mutations aléatoires qui apparaissent progressivement. Cette modification est appelée dérive génétique. Si elle concerne des séquences du génome qui codent pour les antigènes à la surface de HA et NA, la structure de ces protéines sera modifiée et on parle de dérive antigénique. Les virus Influenza sont ainsi capables d'échapper à l'immunité induite par des infections précédentes ou par la vaccination en accumulant progressivement des mutations de HA et NA (Webster et al. 1992).

Ce mécanisme, responsable des épidémies saisonnières de VIAs (Bedford et al. 2014), nécessite des mises à jour fréquentes des vaccins contre la grippe pour assurer une cohérence entre les antigènes à la surface des variants émergents et les vaccins. L'hémagglutinine est le principal composant des vaccins inactivés contre la grippe, si bien que les programmes en place pour surveiller les changements antigéniques du virus utilisent principalement des tests d'inhibition de l'hémagglutination et des analyse de la séquence de l'ARN viral (Barr et al. 2014). Des

méthodes informatiques, regroupées sous le nom de cartographie antigénique permettent des analyses quantitatives de la dérive antigénique de HA ainsi que de NA. Ces méthodes ont révélé qu'une dérive antigénique importante peut être provoquée par une ou quelques substitutions d'acides aminés proches des sites enzymatiques tels que le RBS dans la tête globulaire (mais pas la tige) de HA (Koel et al. 2013) (Lewis et al. 2011).

L'évolution antigénique des virus Influenza est plus rapide chez les Influenzavirus humains que chez les virus équin et porcins, ce qui est probablement dû à la taille, au mélange et à la structure d'âge (les humains ont une espérance de vie plus longue) des populations d'hôtes (Smith et al. 2004). Chez les oiseaux sauvages, la dérive antigénique au sein d'un sous-type semble limitée. Mais dès qu'un virus est introduit chez la volaille, des variations antigéniques plus fortes sont observées (Koel et al. 2014). Cela peut être expliqué par une différence de pression de sélection dont l'origine reste à déterminer formellement, même si dans certains cas la pression immunitaire induite par les vaccins pourrait intervenir.

2. Cassure antigénique

A contrario, la cassure antigénique correspond à des changements drastiques de l'antigénicité de HA : elle à l'origine des pandémies de grippe. Comme évoqué plus tôt, le caractère segmenté du génome des VIAs favorise leur évolution puisque qu'il permet des réassortiments du génome. Un réassortiment est un échange d'ARNv entre deux VIAs lors de co-infection de la même cellule d'un hôte. Pendant l'assemblage des virions, il est possible que des segments d'ARNv appartenant aux deux virus soient assemblés dans le même virion car le système répliatif de l'hôte ne différencie pas l'origine des ARNv. On parle de cassure antigénique lorsque ces réassortiments apparaissent sur des gènes codant pour les protéines de surface, et en particulier HA, et entre des virus de sous-type différents. Cela conduit à l'apparition soudaine d'un nouveau sous-type de virus, avec une structure antigénique très différente. La population n'est pas immunisée contre ce nouveau virus qui peut donc circuler rapidement et provoquer des pandémies. Les pandémies humaines de grippe de 1957 (H2N2) et 1968 (H3N2) sont dues à des réassortiments entre des virus aviaires et des virus humains (Kawaoka et al. 1989). Le virus H1N1 à l'origine de la pandémie de 2009 est apparu suite à plusieurs évènements de réassortiments chez

le porc (Vijaykrishna et al. 2010). L'apparition d'un virus pandémique conduit souvent à l'extinction des souches qui circulaient avant son apparition. Le virus H1N1 responsable de la pandémie de 2009 était antigéniquement très différent du H1N1 saisonnier qui circulait à ce moment-là. Le virus pandémique a été sélectionné ce qui a conduit à l'extinction de la lignée existante mais pas à celle des souches H3N2. Depuis 2009, les virus circulants sont donc des sous-types H3N2 et des sous-types H1N1 dérivés de la souche pandémique.

Les figures 6 et 7 illustrent ces événements de dérive et de cassure antigénique.

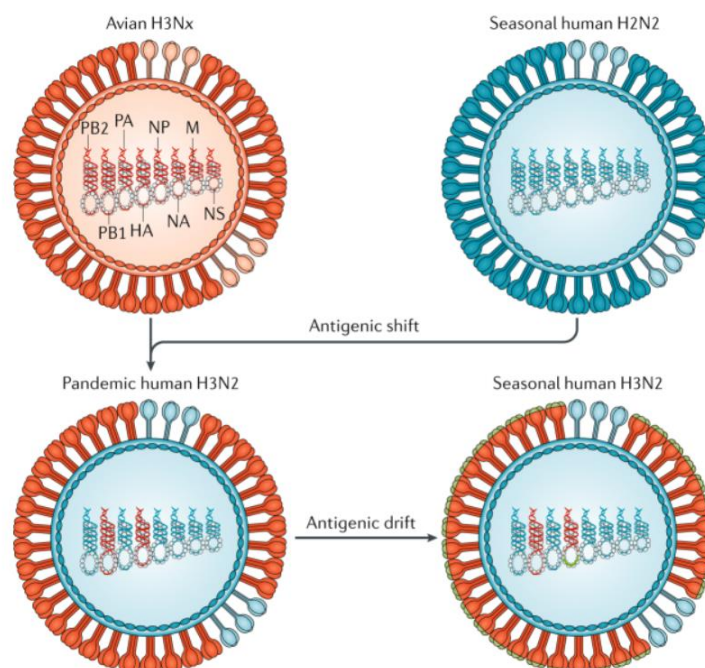


Figure 6 : Dérive antigénique et cassure antigénique chez les virus Influenza en prenant pour exemple l'émergence du virus H3N2 responsable de la grippe de Hong-Kong (Krammer et al. 2018)

En 1968, des co-infections entre un virus aviaire H3Nx (x compris entre 1 et 9) et le virus saisonnier humain H2N2 ont permis des réassortiments puis la sélection du virus pandémique humain H3N2, qui possède les segments PB1 et HA du virus aviaire et les 6 autres segments du virus humain. Une fois H3N2 établi chez l'humain, la dérive antigénique a commencé, provoquant de légers changements antigéniques qui sont sélectionnés s'ils permettent d'échapper à la réponse immunitaire. Ces changements sont bien moins importants et bien plus lents que ceux provoqués par le premier événement de cassure antigénique.

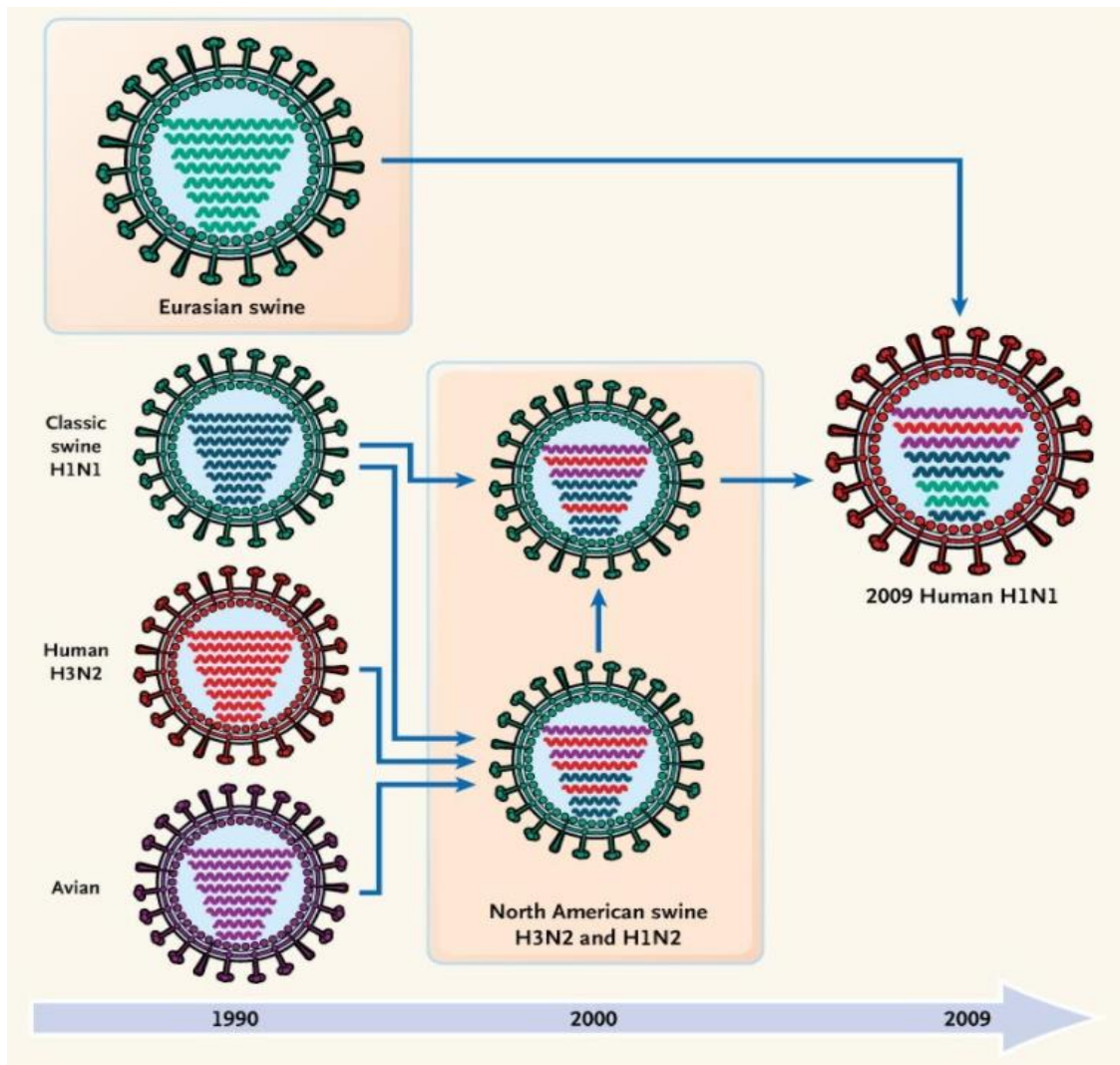


Figure 7 : Histoire des évènements de réassortiment à l'origine de la genèse du virus pandémique H1N1 en 2009 (Trifonov et al. 2009)

Le dernier phénomène responsable de la variabilité des VIAs est la recombinaison génétique. Bien que ce phénomène soit rare et que les conséquences pour la santé animale et humaine soient de moindre ampleur, elle peut augmenter la pathogénicité d'un virus de façon considérable. La recombinaison génétique est l'incorporation d'un court fragment d'ARN viral ou cellulaire dans un des segments de l'ARN viral. Des analyses de séquences du virus H7N3 hautement pathogène qui a émergé en 2005 au Canada ont montré qu'un fragment du segment M a été intégré au segment HA par recombinaison génétique, dans la partie codant pour le site de clivage, ce qui a conféré au virus une forte augmentation de pathogénicité (Pasick et al. 2005).

F. Écologie des VIAs

Les oiseaux aquatiques, et en particulier l'ordre des Anseriformes (qui comprend, les canards, les cygnes et les oies) et l'ordre des Charadriiformes (qui contient les goélands et les mouettes) constituent le réservoir majoritaire des virus Influenza (Webster et al. 1992). Ils sont infectés de façon asymptomatique par des virus antigéniquement très variés de sous-type H1 à H16 et N1 à N9 (Long et al. 2019). Certains virus, dont les hôtes étaient probablement des oiseaux aquatiques dans un premier temps, se sont adaptés à d'autres oiseaux, comme les Galliformes (qui comprend les cailles, les dindes et les poulets) ainsi qu'à des mammifères (comme les humains, les porcs, les chevaux, les chiens, les visons et certains mammifères marins) (Webster, Hulse 2004). Une transmission à un grand nombre d'espèces associée à une telle adaptation implique des adaptations génétiques au nouvel hôte qui sont attribuées aux ARN polymérases virales, qui sont sujettes aux erreurs et ont des taux de mutations plus élevés que les ADN polymérases cellulaires. La diversité génétique intra-hôte produite (parfois associée à la notion de quasi-espèce) résulte en un « essaim » de variants ce qui facilite l'adaptation à la nouvelle pression de sélection. Ces mutations limitent ensuite la capacité des virus à réinfecter les espèces réservoir (Swayne 2007).

Le spectre d'hôtes des VIAs est large chez les mammifères. Ils circulent chez les mammifères sauvages et domestiques (Figure 8). Les sous-types H1N1 et H3N2 circulent chez l'Homme, puisque la pandémie de 1968 à H3N2 a mis un terme à la circulation du sous-type H2N2. Ces mêmes sous-types circulent également chez le porc. Les sous-type H17 et H18 circulent uniquement chez la chauve-souris (Long et al. 2019). Des études suggèrent que toutes les souches de VIAs isolées chez les mammifères ont pour origine des virus aviaires. Les mammifères sauvages ne sont cependant pas des hôtes stables pour les VIAs, les épidémies observées sont sporadiques et ne persistent pas (Taubenberger, Kash 2010). Les espèces aviaires domestiques infectées par les VIAs ne sont pas un réservoir mais elles sont très sensibles aux infections par des virus en provenance des oiseaux sauvages. Les différents réservoirs de VIAs et les communications entre eux sont illustrés dans la figure 8.

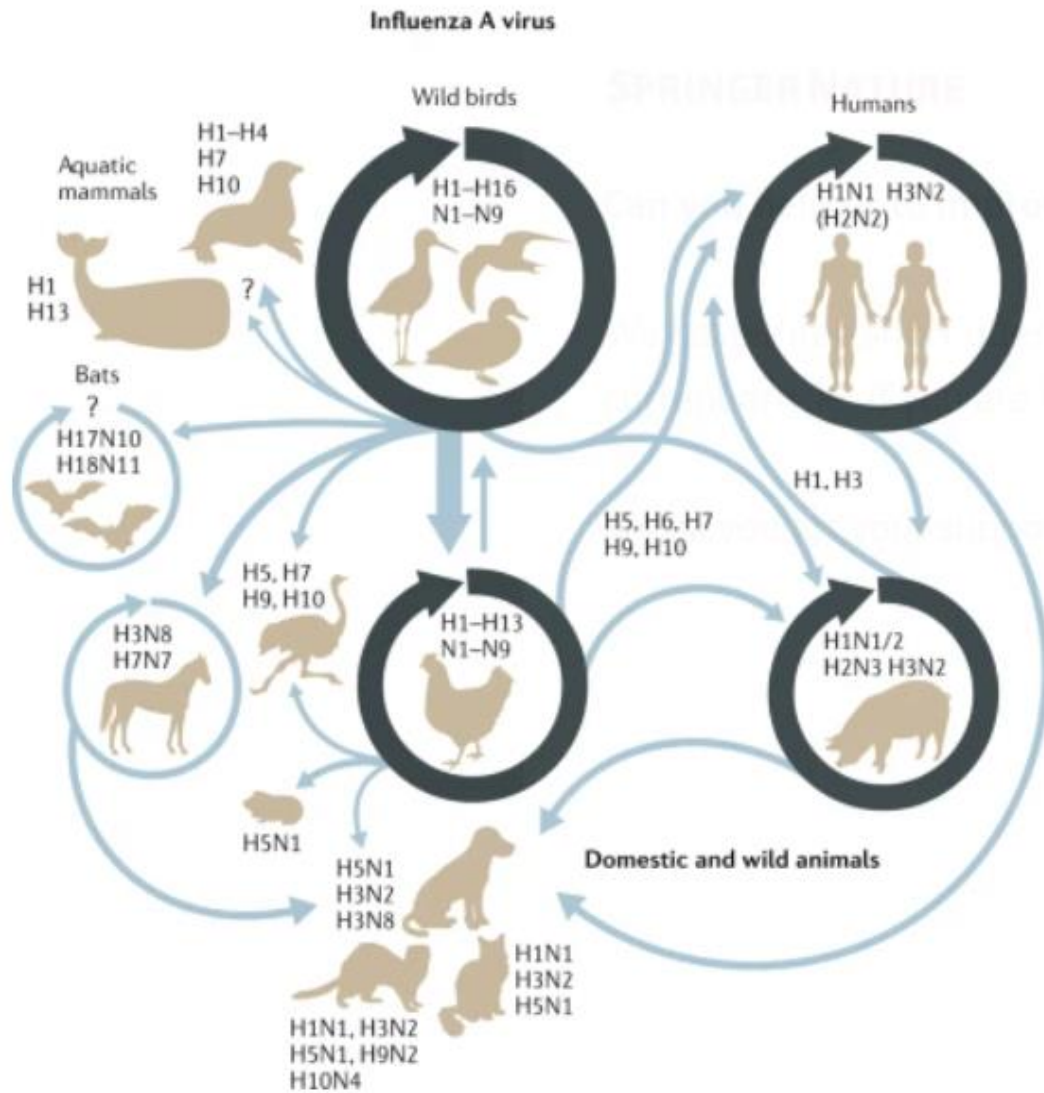


Figure 8 : Ecologie des VIAs.

Certains sous-types sont capables d'infecter plusieurs espèces différentes, parfois avec des hôtes intermédiaires, en accumulant des mutations adaptatives (flèches bleues) alors que d'autres sous-types prédominent chez certaines espèces (cercles noirs). (Long et al. 2019)

La première barrière à la transmission des VIAs chez de nouvelles espèces est la fixation du virus sur la cellule hôte. L'hémagglutinine se fixe sur les acides sialiques, qui sont les sucres terminaux de la majorité des glycoprotéines et glycolipides à la surface des cellules de vertébrés. Les différences inter-espèces dans la structure de ces acides sialiques détermine la sensibilité à l'infection par les VIAs. On sait que l'hémagglutinine des virus adaptés à l'homme se fixe aux acides sialiques α -2,6, que l'on trouve dans l'épithélium respiratoire humain, alors que celle des virus aviaires se

fixe aux acides sialiques α -2,3, situés dans l'épithélium respiratoire et digestif des oiseaux. Néanmoins, les acides sialiques avec des liaisons α -2,3 sont aussi présents dans l'épithélium respiratoire humain, mais en minorité (Couceiro, Paulson, Baum 1993), et plutôt dans l'arbre respiratoire inférieur (bronchioles et alvéoles). Comme les poumons ne sont pas aussi accessibles que l'arbre respiratoire supérieur (nasopharynx, sinus, trachée, bronches), l'Homme peut être infecté par les virus Influenza aviaires (Figure 9) mais avec moins d'efficacité que les souches humaines (Beare, Webster 1991) . En revanche, quand des souches aviaires infectent les poumons humains, il peut en résulter une pneumonie sévère et d'évolution rapide dont le taux de mortalité dépasse 60% (Gambotto et al. 2008). De plus, le porc possède des acides sialiques de type α -2,3 et α -2,6 à la surface de ses cellules. Il peut donc être infecté par des virus humains et aviaires, ce qui est très favorable à des réassortiments entre ces virus, comme c'est arrivé lors de l'émergence des virus pandémiques H3N2 en 1968 et H1N1 en 2009. La liaison de HA aux acides sialiques est l'élément majeur mais d'autres facteurs, tels que la structure des autres glycanes membranaires et de la neuraminidase, contribuent à barrière d'espèces. Les interactions entre hémagglutinine et acides sialiques sont schématisées dans la figure 9.

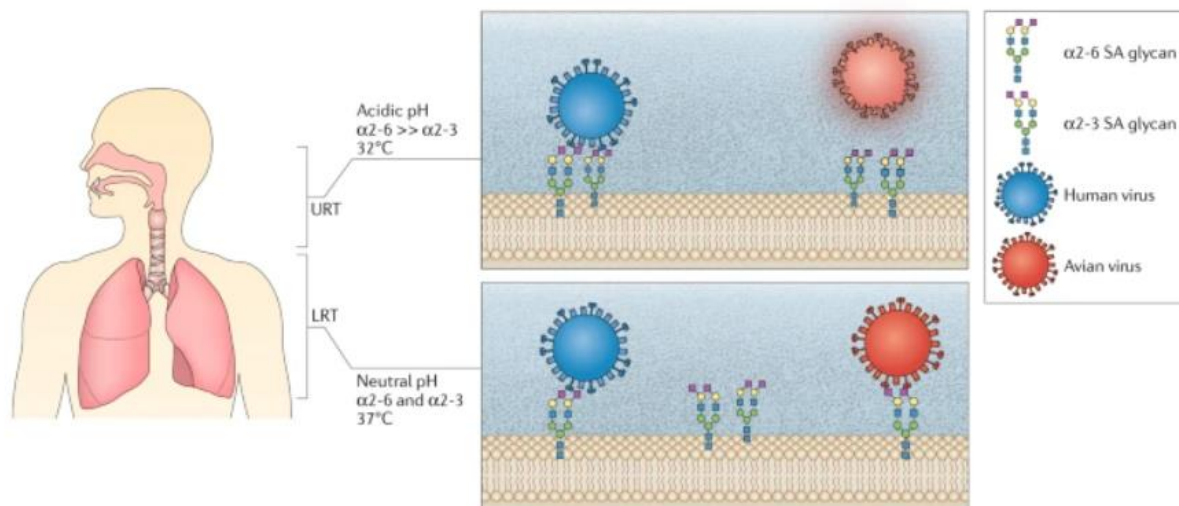


Figure 9 : Les différences d'acides sialiques le long du tractus respiratoire humain influent sur la fixation de l'hémagglutinine des VIAs. (Long et al. 2019)

L'acidité (Russell et al. 2018) et la température (Massin et al. 2001) modulent également la virulence des VIAs. URT : Upper respiratory tract. LRT : Lower respiratory tract.

G. Phénotypes faiblement pathogène et hautement pathogène

On peut également classer les VIAs selon leur pathogénicité chez l'oiseau. On distingue ainsi 2 types de virus. La majorité des virus provoquent une atteinte respiratoire bénigne chez les poulets, et sont appelés virus influenza aviaires faiblement pathogènes (VIAFP). Les virus influenza aviaires hautement pathogènes (VIAHP) peuvent se développer à partir des VIAFP, en particulier quand ceux-ci circulent dans des élevages de poulets (Swayne 2007). Les VIAHP peuvent être mortels pour 90 à 100% de l'élevage, causent des épidémies qui se propagent rapidement et peuvent dévaster l'industrie de la volaille. Des restrictions commerciales sévères sont souvent prises à cause de ces virus. A ce jour, les VIAHP recensés appartiennent tous aux sous-types H5 ou H7 (Lee et al. 2021). La structure moléculaire de la protéine HA ainsi que des tests in vivo permettent de classer les virus. Le manuel terrestre de l'Office International des Epizooties (OIE) définit un VIA comme hautement pathogène s'il répond à un des deux critères suivants :

- Le VIA a un fort pouvoir pathogène. Ce pouvoir pathogène peut être déterminé par deux méthodes :
 - Si, dans un délai de 10 jours après l'inoculation intraveineuse d'un VIA chez 8 poulets de 4 à 8 semaines d'âge, 6 poulets ou plus sont morts (soit 75% de létalité ou plus), alors ce VIA a un fort pouvoir pathogène.
 - Si un VIA possède un IVPI (Intravenous pathogenicity index) supérieur à 1,2 alors ce VIA a un fort pouvoir pathogène. Pour calculer cet index, le virus est inoculé par voie intraveineuse à un groupe de 10 poulets de 4 à 8 semaines d'âge. Les 10 poulets sont ensuite observés toutes les 24 heures pendant 10 jours. A chaque observation, un score de 0 à 3 leur est attribué : 0 pour un poulet sain, 1 pour un poulet malade, 2 pour un poulet sévèrement atteint et 3 pour un poulet mort (un poulet est malade s'il présente un des signes suivants et sévèrement atteint s'il en présente plus d'un : atteinte respiratoire, abattement, diarrhée, cyanose de la peau exposée, œdème de la face, signes nerveux. Les poulets morts sont scorés à

3 à chacune des observations qui suit leur mort). L'IVPI est le score moyen par animal par observation sur la période de 10 jours.

- La séquence nucléotidique du site de clivage de tout VIAFP de sous-type H5 ou H7 est déterminée. Si sa séquence a déjà été identifiée chez des VIAHP dans le passé, alors ce virus est classé comme hautement pathogène, indépendamment du pouvoir pathogène déterminé par les deux méthodes ci-dessus. De plus, l'IVPI de chaque virus avec un nouveau motif nucléotidique est testé in vivo (OIE 2021)

1. Site de clivage de l'hémagglutinine

Le site de clivage correspond à la séquence d'acides aminés qui sépare les sous-unités HA1 et HA2 dans le précurseur HA0. HA0 doit être clivée par des protéases cellulaires pour être activée et ce clivage représente une étape essentielle qui conditionne le pouvoir infectieux du virus puisque seules les hémagglutinines clivées assurent la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire de l'hôte (Huang et al. 1980). Les analyses de séquence montrent que, pour la majorité des sous-types HA, les protéases clivent HA0 entre la partie N-terminale de HA2 (glycine (G) conservée) et un résidu arginine (R) adjacent (Garten, Klenk 1983). La séquence du site de clivage (SC) et en particulier le nombre d'acides aminés basiques (à savoir arginine (R) ou lysine (K)) détermine le type de protéases cellulaires qui pourra cliver le précurseur et donc le type de cellules et de tissus dans lesquels le virus pourra se répliquer (Bosch et al. 1981). Cette séquence est ainsi fortement corrélée au pouvoir pathogène des VIAs. On distingue deux types de SC. Les SC monobasiques (SCMB) contiennent en général un ou deux acides aminés basiques (exemple : PEKQTR/GLF) à la position déterminante et sont clivés par des protéases de type trypsine ce qui limite la réplication du virus aux cellules épithéliales des appareils respiratoires et digestifs (Influenza - Diseases of Poultry - Wiley Online Library). Une augmentation du nombre d'acides aminés basiques et/ou un allongement du site de clivage à un minimum de quatre acides aminés basiques (exemple : PQRKKR/GLF) constitue un SC polybasique (SCPB). Cela modifie la virulence des VIAs et augmente leur pouvoir pathogène en permettant le clivage de HA0 par des protéases de type furine ou la proprotéine convertase 6 (PC6). Le virus peut ainsi se répliquer dans les cellules d'un plus grand nombre de tissus, ce qui permet des infections systémiques potentiellement

mortelles chez les gallinacés. La figure 10 illustre la localisation des infections en fonction du type de site de clivage de l'hémagglutinine.

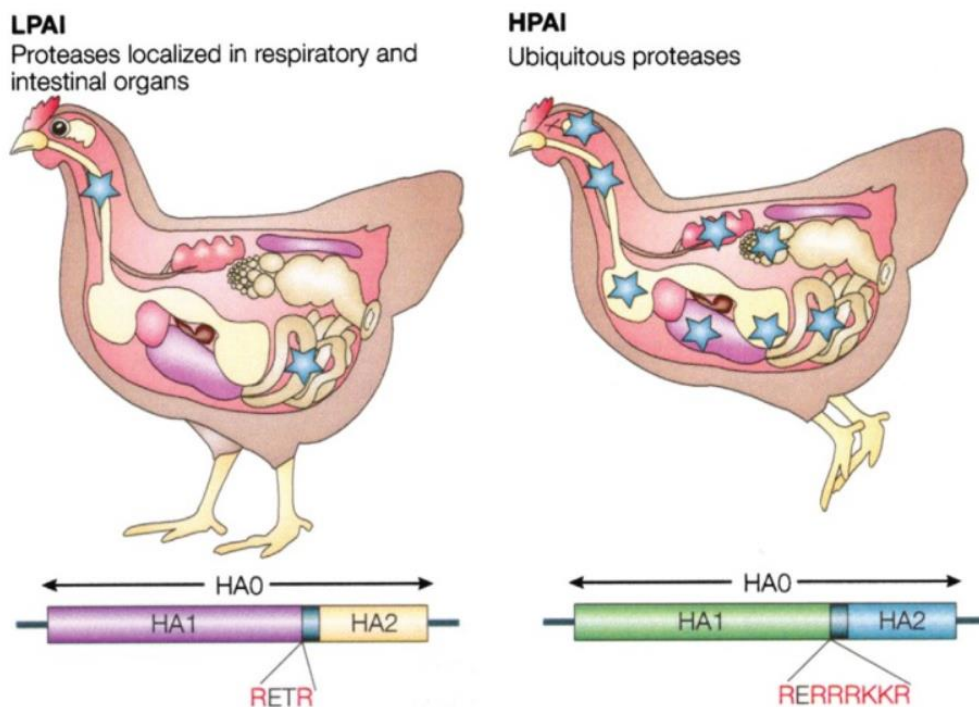


Figure 10 : Localisation des infections dues aux VIAFP et aux VIAHP, en fonction de la séquence du SC et des protéases qui peuvent le cliver (Horimoto, Kawaoka 2005)

Légende : acides aminés basiques en rouge et protéases représentées par des étoiles bleues

2. Emergence des VIAHP

Les oiseaux aquatiques sauvages, et en particulier les oiseaux migrateurs comme les canards, sont le réservoir principal des VIAs dans la nature. Dans ce réservoir, une majorité de VIAFP circule. Dans un premier temps, un VIAFP acquiert un SCPB lorsqu'il infecte un nouvel hôte dit précurseur. L'acquisition du SCPB est un évènement nécessaire mais pas suffisant pour obtenir une souche hautement pathogène. La virulence des VIAHP repose également sur des facteurs de pathogénicité supplémentaires tels que des altérations de HA et des autres protéines virales (Stech et al. 2009). Dans un second temps, le nouveau VIAHP doit présenter un avantage sélectif par rapport à la souche IAFP dont il est issu, pour devenir le virus majoritaire en circulation. L'acquisition d'un SCPB est observée dans la nature uniquement chez des virus de sous-type H5 et H7.

Les modifications observées sur le site de clivage de HA des VIAHP sont dus à plusieurs mécanismes :

- Des substitutions d'acides aminés non basiques en acides aminés basiques, dues à des substitutions nucléotidiques. Ce mécanisme est parfois associé à un ajout ou une perte de sites de N-glycosylation (NGS) (Lee et al. 2021). Les NGS sont situés dans la tête globulaire de HA et forment un bouclier qui protège les antigènes de HA contre les anticorps de l'hôte (Kobayashi, Suzuki 2012).
- Des insertions d'acides aminés basiques dues à des duplications de codons nucléotidiques ou à des erreurs de glissement de la polymérase. Parfois la source de ces insertions est inconnue (Lee et al. 2021). Ce mécanisme est le plus fréquemment observé chez les virus de sous-type H5 (Nao et al. 2017).
- Des recombinaisons non homologues avec de l'ARN cellulaire ou viral qui provoquent un allongement du site de clivage par insertion d'acides aminés basiques ou non basiques. Alors que les deux mécanismes précédents ont été observés chez des virus de sous-type H5 et H7, ce dernier n'est observé à ce jour que chez des virus de sous-type H7 (Erasmus Medical Centre (NL) et al. 2017).

L'émergence d'un VIAHP est un phénomène rare. Les virus responsables des 42 émergences de VIAHP recensées entre 1959 et 2016 ont tous été isolés chez des espèces d'oiseaux domestiques, à l'exception d'un cas chez la faune sauvage : un H5N3 a émergé chez des sternes sauvages en 1961 en Afrique du Sud (Becker 1966). Le tableau 1 répertorie quelques évènements d'émergence pour lesquels on connaît le VIAFP précurseur. Seules deux émergences sont décrites dans des basses-cours ces dernières années alors que la quasi-totalité a eu lieu dans des élevages commerciaux de volaille. Le poulet, la dinde et l'autruche sont les 3 espèces confirmées comme ayant hébergé l'évolution de ces VIAFP en VIAHP. Dans les cas où ce virus est connu, le temps avant de voir la souche IAHP émerger varie de 10 jours à 2 ans (Erasmus Medical Centre (NL) et al. 2017). Le principal rôle connu des oiseaux sauvages dans les épidémies est la transmission du virus sur de longues distances, comme cela a pu être le cas pendant une épidémie à H5N1 en 1996 (Capua, Marangon 2000). L'âge des volailles, la taille et le type des élevages ainsi que la densité de volailles dans les élevages ne semble pas influencer les évènements d'émergence. Néanmoins la densité d'élevages de volailles a un rôle important dans

la transmission du virus après son émergence (Capua, Marangon 2000). Cette densité est très élevée dans certains départements du Sud-Ouest de la France comme le Gers (32) ou les Landes (40), dans lesquels des épisodes hivernaux d'IAHP sont fréquents ces dernières années.

Tableau 1 : Exemples d'évènements d'émergence de VIAHP pour lesquels le VIAFP précurseur est connu

Sous-type	Année	Pays	Espèce	Séquence AA du SC	Mécanisme	Temps avant émergence	Réf
H5N9	1966	USA	Poulet	RKKRR/G	Réassortiment avec un H5N1	3 mois	(Ping et al. 2012)
H5N2	1994	Mexique	Poulet	RKRKTR/G	Insertion	14 mois	(Swayne et al. 1997)
H7N1	1999	Italie	Dinde	PKRSRVRR/G	Recombinaison	9 mois	(Monne et al. 2014)
H7N7	2003	Pays-Bas	Poulet	PKRRR/G	Réassortiment avec un H7N3	3 ans	(de Wit et al. 2010)
H7N3	2004	Canada	Poulet	AYRKRMTTR/G	Recombinaison avec le segment M	11 jours	(Pasick et al. 2005)
H7N8	2016	USA	Dinde	PKKRKTR/G	Insertion	Inconnu	(Killian et al. 2016)

3. Prédilection génétique à l'émergence de VIAHP

Toutes les émergences de VIAHP connues sont rapportées uniquement chez des VIAs de sous-types H5 et H7. Néanmoins, il est rapporté qu'un virus de sous-type H6 avec un SCPB introduit artificiellement a acquis une clivabilité élevée de HA sans trypsine et avait un phénotype VIAHP chez des poulets infectés expérimentalement (Munster et al. 2010). Un virus de sous-type H9 a également acquis un fort pouvoir pathogène après l'insertion artificielle d'acides aminés basiques au niveau du SC de HA (Soda et al. 2011). Des virus d'autres sous-types (H2, H4, H6, H8 et H14) ont également développé un phénotype HP après introduction artificielle d'un SCPB (Veits et al. 2012). Ces études suggèrent que la restriction de l'acquisition naturelle d'un SCPB par insertion ou substitution de nucléotides aux seuls virus de sous-type H5 et

H7 est due uniquement à une prédisposition génétique de ces sous-types et non pas à une limite structurale ou fonctionnelle du SC de HA des autres sous-types.

Une étude japonaise s'est focalisée sur la souche A/whistling swan/Shimane/499/1983 (H5N3) (ShimH5) qui a été isolée dans un premier temps comme un VIAFP et a montré un phénotype HP après plusieurs passages chez des poulets infectés expérimentalement (Ito et al. 2001). Après plusieurs passages chez le poulet, la souche ShimH5 a subi deux mutations aux positions 1022 (C → A [ShimH5 24a]) et 1018 (G → A [ShimH5 24a2b]) dans la séquence codant pour le site de clivage de HA. Elle a ensuite obtenu cinq acides aminés basiques consécutifs, R-R-K-K-R par l'insertion d'un codon pour un résidu arginine sur le site de clivage (Shim H5 24a3b). La figure 11 montre l'évolution de la séquence du SC de HA au fur et à mesure des passages chez le poulet.

		HA1					HA2					
ShimH5 strains	Pathogenicity	R	-	E	T	R	G	L	F			
Parent	Low	AGA	---	GAA	ACA	AGA	GGT	CTG	TTT			
↓												
24a	Low	AGA	---	GAA	AAA	AGA	GGT	CTG	TTT			
↓												
24a2b	Intermediate	AGA	---	AAA	AAA	AGA	GGT	CTG	TTT			
↓												
24a3b	High	AGA	AGA	AAA	AAA	AGA	GGT	CTG	TTT			

Figure 11 : Séquence du site de clivage de HA de Shim H5 et de ses variants après des passages chez le poulet. (Nao et al. 2017)

Les nucléotides et acides aminés différents de celui du virus précurseur Shim H5 sont écrits en rouge

Selon des prédictions de bio-informatique, cette séquence d'environ 20 nucléotides aux positions 1012 à 1029 (Shim H5 24a2b) et 1012 à 1032 (Shim H5 24a3b) présente une structure secondaire avec un motif tige-boucle. Ces structures sont représentées pour les différentes souches dans la figure 12. De plus les premières mutations aux positions 1018 et 1022 ont induit la présence d'un motif de 8 résidus adénine consécutifs qui agrandissent la structure tige-boucle et corrélent avec une fréquence d'insertion de nucléotides plus élevée. Ainsi la séquence d'ARN qui détermine les acides aminés du SC de HA pourrait jouer un rôle clef dans l'induction

de glissements de l'ARN polymérase virale, ce qui augmenterait la fréquence d'insertions de nucléotides. Ce mécanisme pourrait contribuer à l'acquisition de codons supplémentaires pour des acides aminés basiques afin de créer un SCPB (Nao et al. 2017). Les structures tige-boucle et l'accumulation de résidus adénine consécutifs dans cette région de l'ARN sont souvent retrouvées dans la séquence des HA des virus de sous-type H5 et H7.

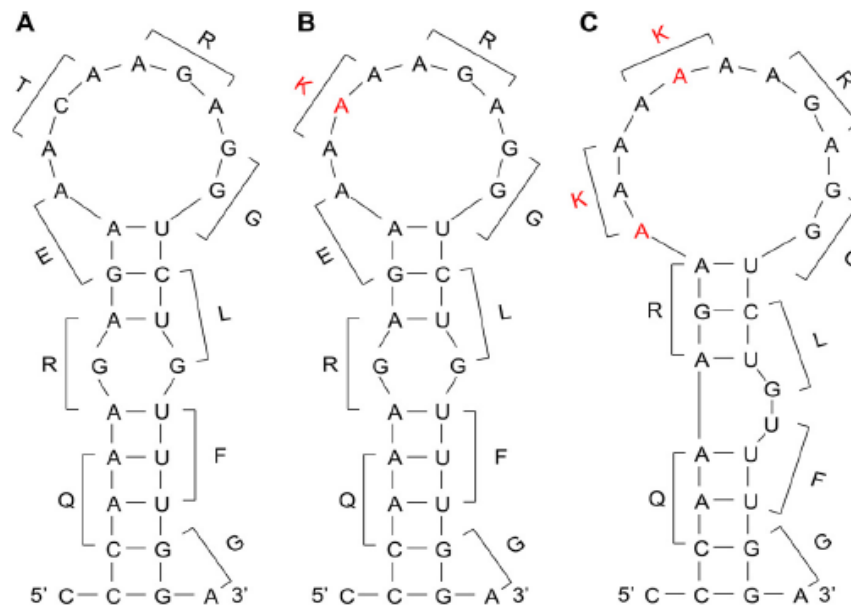


Figure 12 : Prédiction de structure secondaire de l'ARN codant pour le site de clivage de HA du virus Shim H5 et de ses variants Shim H5 24a et Shim H5 24a2b. (Nao et al. 2017)

Légende : A : Shim H5, B : Shim H5 24a, C : Shim H5 24a2b. Les acides aminés correspondant à chaque codon sont indiqués. Les nucléotides et acides aminés différents du virus précurseur Shim H5 sont écrits en rouge.

L'obtention d'un SCPB est essentielle à l'évolution d'un VIAFP en VIAHP mais d'autres mécanismes altèrent le phénotype du virus. Les sites de glycosylation affectent la pathogénicité des VIAs (Hulse et al. 2004). Ils contribuent également à la réplication du virus et à la transmission entre poulets, qui sont directement liés à la virulence des VIAs (Abdelwhab et al. 2016). La présence ou l'absence de certains résidus histidine dits « critiques » peut modifier les changements conformationnels de HA post clivage. Des études montrent que des mutations sur le codon de l'histidine 184 ou proche de ce dernier peuvent moduler la dépendance au pH et donc la conformation de HA (Mair et al. 2014). D'autres études ont montré que des mutations altérant le pH de fusion peuvent modifier la pathogénicité de virus H5N1 chez des mammifères et des oiseaux (Reed et al. 2010) (DuBois et al. 2011). Également, des

mutations dans la partie C-terminale de NS1 et des délétions dans la queue de NA apparaissant pendant l'évolution d'un VIAFP en VIAHP peuvent contribuer à la virulence, augmenter l'excrétion virale et l'adaptation aux poulets (Keiner et al. 2010) (Munier et al. 2010). Une étude comparative des modifications génétiques entre les précurseurs VIAFP et les VIAHP qui en sont issus, dans des émergences qui ont eu lieu entre 1956 et 2016 a montré, que même si des mutations apparaissent sur tous les segments du génome des VIAs, elles apparaissent principalement sur ceux codant pour PA et HA (Erasmus Medical Centre (NL) et al. 2017). Le nombre de modifications varie de 7 à 68 substitutions (en dehors du site de clivage de HA) sans qu'aucune semble être un prérequis à l'émergence d'un VIAHP.

Ainsi l'acquisition d'un SCPB est accompagnée d'autres modifications dans d'autres segments du génome des VIAs. Cependant, nous ne savons pas si ces changements sont nécessaires à l'émergence et la sélection des VIAHP ou s'ils sont une conséquence de cette émergence et permettent une meilleure adaptation à l'hôte en améliorant la capacité à infecter une multitude d'organes chez l'hôte (Erasmus Medical Centre (NL) et al. 2017).

H. Enjeux pour les santés animale et humaine

Les VIAs et en particulier les VIAHP provoquent des épidémies chaque année sur toute la planète. En France, quatre épisodes d'épizooties ont été rapportés ces dernières années lors des hivers 2015, 2016, 2020 et 2021. Un autre est en cours pendant l'hiver 2022. La première a eu lieu suite à des réassortiments entre des virus de sous-type H5 (Briand et al. 2017) et les deux autres après l'introduction de virus H5N8 sur le territoire français (Guinat et al. 2018) (Vergne et al. 2021). Ces virus sont une menace pour la santé animale. Les oiseaux domestiques y sont très sensibles car les VIAHP peuvent atteindre un taux de mortalité de 100% en trois à cinq jours dans certains élevages, et se transmettent très rapidement à travers les élevages, les régions, et parfois même le monde. Les oiseaux sauvages et les mammifères sont aussi touchés, avec des taux de mortalité variables mais plus faibles.

Les VIAHP ont souvent un potentiel zoonotique plus élevé que les VIAFP car ils sont excrétés à des niveaux plus élevés. La menace pour la santé humaine existe puisque certaines souches peuvent infecter des humains en particulier s'ils sont en

contact étroit avec des oiseaux. Ces infections restent sporadiques. Parfois les VIAHP sont capables de franchir la barrière d'espèce et ainsi d'infecter l'Homme, qui est sans cesse en contact la volaille domestique touchée par ces épidémies. L'évolution de ces VIAHP vers des virus plus adaptés à notre espèce peut donner lieu à des pandémies mortelles qui seraient une catastrophe sanitaire pour l'humanité. Cela a déjà été le cas avec le virus de la grippe espagnole en 1918, ayant causé plus de 50 millions de morts. Ce virus aviaire s'est adapté à l'homme (Taubenberger et al. 2005).

La compréhension des facteurs qui mènent à l'émergence et la diffusion des VIAHP est donc un enjeu majeur pour les santés animale et humaine et s'inscrit dans le concept international « One Health, une seule santé ». (Krammer et al. 2018)

II. Partie expérimentale

A. Projet RISKEVOL

RISKEVOL est un projet dans lequel l'Unité Multidisciplinaire de Recherche sur l'Interaction Hôte Agent Pathogène (UMR 1225 IHAP), que j'ai rejoint temporairement pour mon travail de thèse, est impliquée. Romain Volmer est le coordinateur principal de ce projet. L'objectif du projet est d'analyser les risques d'évolution des VIAFP en VIAHP et en particulier d'étudier dans quelle mesure et par quels mécanismes la séquence nucléotidique de HA pourrait influencer l'acquisition d'un SCPB et donc l'évolution vers un VIAHP. Concrètement, cela consiste en la production de systèmes permettant de mettre en évidence *in vitro* des points clés de la séquence nucléotidique de HA, en particulier autour du SC, au niveau desquels la fréquence d'insertions de nucléotides est différente.

Chaque acide aminé est codé par 3 nucléotides. Les événements d'insertion, et délétion de nucléotides modifient le cadre de lecture des ribosomes lorsqu'ils concernent un nombre de nucléotides qui n'est pas un multiple de 3. Dans ce cas, la séquence d'acides aminés de la protéine concernée sera entièrement modifiée. Lorsqu'ils concernent un multiple de 3 nucléotides, le cadre de lecture est conservé. Cette modification peut modifier la structure et le fonctionnement de la protéine. Dans les deux cas, une pression de sélection sera appliquée sur les virus les moins viables qui finiront par disparaître. L'objectif du projet RISKEVOL est de produire des systèmes dans lesquels on s'affranchit de la pression de sélection pour que toutes les mutations qui apparaissent soient conservées et observables. Ces systèmes sont le système PA-HA et le système mini-génome. Ils seront présentés plus tard.

B. Plasmide phw2000

Le plasmide phw2000 constituera notre support de travail. Les plasmides sont des constructions contenant un ADN double brin circulaire modifié pour être utilisé en recherche biologique. Ils possèdent des promoteurs qui permettent aux polymérase cellulaires de se fixer pour répliquer ou transcrire la séquence d'intérêt, ainsi qu'un gène de sélection qui lui permet de se maintenir au fil des multiplications cellulaires.

Le plasmide phw2000 est employé comme vecteur des séquences d'ADN qui codent pour les différents segments des VIAs. Il comporte 2 promoteurs. Un promoteur Pol I qui, associé à un terminateur murin (Tm), permet à la polymérase humaine de former un ARNv négatif à partir de l'ADN complémentaire (ADNc) du plasmide. Les séquences d'ADN double brin qui codent pour les VIAs sont insérées entre Pol I et Tm. On appelle ces séquences des inserts. Un promoteur Pol II permet à la polymérase II de produire un ARN messenger (ARNm) à partir du brin d'ADN matrice (ADNm). Un site polyA permet la polyadénylation de cet ARNm, indispensable à sa maturation et à son fonctionnement. Enfin le gène β -lactamase est le gène de sélection. Il permet la résistance à l'ampicilline, un antibiotique utilisé lors des transformations bactériennes. Ainsi les bactéries ayant intégré le plasmide phw2000 seront sélectionnées. La figure 13 montre un plasmide phw2000 dans lequel un segment d'un VIA a été inséré.

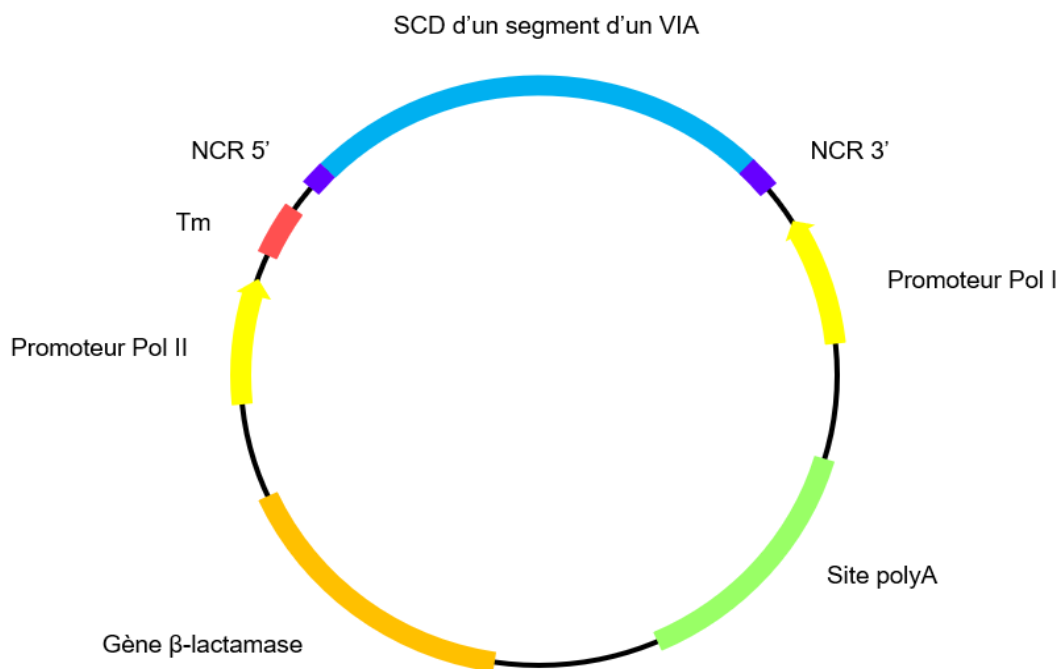


Figure 13 : Représentation schématique de l'insertion d'un segment d'un VIA dans un plasmide phw2000

Les inserts contiennent la séquence codante (SCD) d'un segment viral, et une séquence non codante, « non coding region » (NCR), aux extrémités 3' et 5'. Ces NCR font partie des séquences d'empaquetage, qui permettent aux ARNV d'être assemblés en RNPv et d'être intégrées dans un virion. Les séquences d'empaquetage sont spécifiques de chaque segment. Il a été démontré que la présence des NCR ainsi que d'une partie des extrémités des SCD était essentielle à la réplication et à l'empaquetage des particules virales (Fujii et al. 2003) (Fujii et al. 2005). Par exemple, l'empaquetage efficace des ARNV de PA et PB1 nécessite au moins 66 nucléotides de SCD en 3' et 40 nucléotides en 5' (Liang, Hong, Parslow 2005).

C. S'affranchir de la pression de sélection

1. Système PA-HA

L'objectif du système PA-HA est de produire des virus recombinants dans lesquels le gène codant pour HA n'est pas soumis à la pression de sélection. Ce système consiste à insérer par clonage moléculaire la séquence d'ARNV codant pour la HA d'un virus Y dans un plasmide phw2000 contenant la séquence codant pour PA d'un virus X. Ce segment jouera le rôle de transporteur pour le segment de HA de Y, que nous appellerons transgène, et ils seront entre autres séparés par de multiples codons stop. Ainsi, le transgène se situe en dehors du cadre de lecture de PA. Cette construction est représentée dans la figure 14.

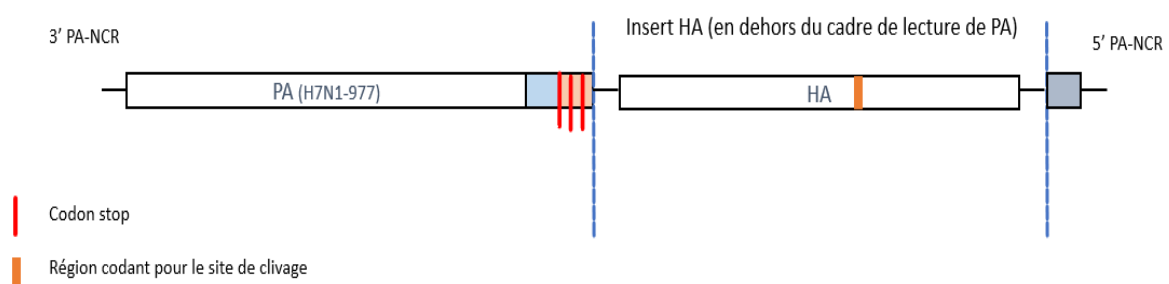


Figure 14 : Représentation schématique de la construction PA-HA

Le plasmide phw2000-PA-X-HA-Y et 7 autres plasmides phw2000 comportant les segments PB1, PB2, NP, HA, NA, M et NS du virus X seront transfectés dans des cellules eucaryotes selon un protocole de génétique inverse décrit par Hoffmann et al. en 2000. Puisque chaque plasmide contient les ADNc viraux insérés entre les

promoteurs Pol I et Pol II, les ARN Pol I et II cellulaires vont transcrire le plasmide, et synthétiser des ARNm et des ARNv viraux. Les ribosomes cellulaires traduisent les ARNm en protéines. La formation du complexe polymérase viral permet l'initiation du cycle de réplication. Le regroupement et l'interaction de l'ensemble des molécules synthétisées, génère une nouvelle particule virale. Ce protocole est représenté dans la figure 15.

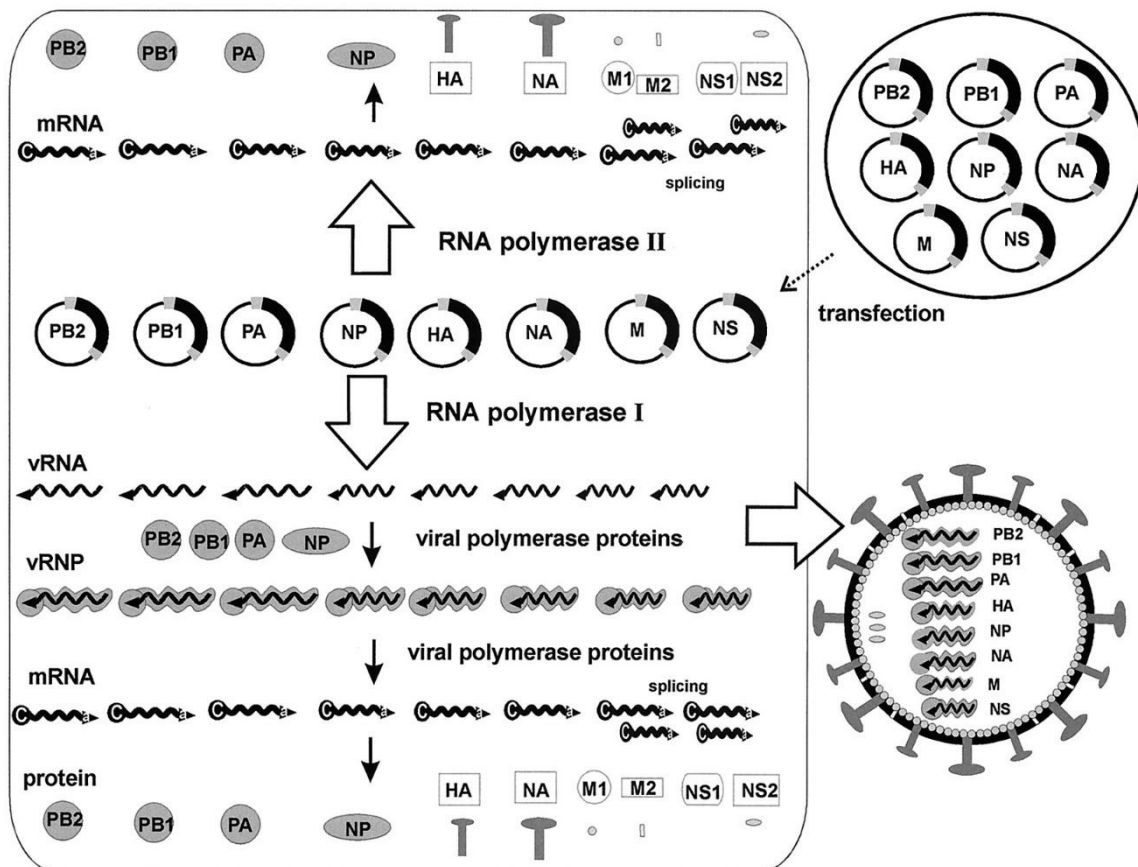


Figure 15 : Protocole de génétique inverse permettant la production d'un VIA à partir de la transfection de 8 plasmides (Hoffmann et al. 2000)

Ce protocole permet la production d'un virus recombinant contenant deux séquences HA : la HA de X sur laquelle une pression de sélection est appliquée et la HA de Y, située après la PA de X, qui n'est pas traduit en protéine et sur laquelle la pression de sélection ne s'applique pas. Ainsi, toutes les mutations qui apparaissent sur la HA de Y sont conservées et observables. Ensuite, ce virus est inoculé dans des cellules pour lui permettre de se répliquer. Les séquences d'ARNv d'intérêt (HA-Y) sont alors isolées grâce à une réaction de « Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction » (RT-PCR) et séquencée avec des méthodes de séquençage haut débit afin d'analyser les mutations apparues.

2. Système mini-génome

L'objectif du système mini-génome est de reconstruire le complexe polymérase viral d'un virus X *in vitro* pour répliquer le segment d'ARNv codant pour la HA d'un virus Y à étudier. Plusieurs études ont montré que la transfection de 4 plasmides contenant chacun un des segments codant pour PA, PB1, PB2, et NP d'un VIA, avec un plasmide contenant la séquence codant pour la chloramphénicol acétyl transférase (CAT) en antisens, entourée de régions non codantes de gènes de VIA, a permis l'expression de la protéine CAT (Neumann et al. 1994) (Pleschka et al. 1996). Cela signifie que les 4 segments de la polymérase virale ont été transcrits par la polymérase des cellules dans lesquelles ils ont été transfectés, puis reconstitués en RNPv. Le complexe polymérase viral ainsi fonctionnel a produit des ARNv puis des ARNm qui ont été traduits en protéine CAT. De plus, l'expression de chacune des 4 protéines virales était nécessaire à l'expression de la protéine CAT.

Le système mini-génome est similaire et consiste à appliquer ce protocole à un ARNv codant pour la HA de Y. Dans un premier temps, 4 plasmides phw2000 contenant les segments PA, PB1, PB2, et NP de X sont modifiés par clonage moléculaire pour déléter le promoteur Pol I. Le plasmide phw2000-HA-Y est également modifié pour déléter le promoteur Pol II. Ces 5 plasmides sont ensuite transfectés dans des cellules humaines. L'ARN Pol II cellulaire produit des ARNm à partir des 4 plasmides du complexe polymérase, qui sont ensuite traduits en protéines. L'ARN Pol I cellulaire produit des ARNv à partir du plasmide phw2000-HA-Y. Une fois le complexe polymérase reconstitué, il produit des ARNm et des ARNc, puis des ARNv. Plusieurs cycles de répllication vont se répéter permettant l'accumulation de séquences d'ARNv d'intérêt. Enfin ces séquences sont isolées avec une réaction de RT-PCR et séquencées pour analyser les mutations apparues. Avec ce système, aucune particule virale n'est produite, la séquence HA-Y est simplement répliquée. On se place donc dans un contexte où il n'y a pas de pression de sélection.

D. Projet de thèse

1. Premiers résultats du projet RISKEVOL

Des virus recombinants ont déjà été produits par l'équipe UMR 1225 IHAP grâce au système PA-HA à partir du virus H7N1 A/turkey/Italy/977/1999 (977) en tant que virus transporteur. Plusieurs séquences HA ont été choisies pour être insérées dans les plasmides phw2000. Elles diffèrent par leur origine et par leur mutabilité au niveau du site de clivage. La séquence HA-ShimH5 provient du virus IAFP H5N3 A/whistling swan/Shimane/499/1983 (ShimH5). La séquence HA-ShimH524a2b diffère de HA-ShimH5 par 2 mutations en position 1018 (G→A) et 1022 (C→A). Ces mutations conduisent à la succession de 8 adénines dans la séquence du SC, ce qui permet un élargissement de la structure en boucle et une accélération de la fréquence d'insertions de nucléotides (Nao et al. 2017). Les virus PA-977-HA-ShimH5 et PA-977-HAShimH524a2b ont été produits et des premiers résultats ont été obtenus : la fréquence d'insertion de nucléotides est significativement supérieure dans la séquence codant le SC de HA de ShimH524a2b comparé à ShimH5. Ces résultats sont présentés dans la figure 16.

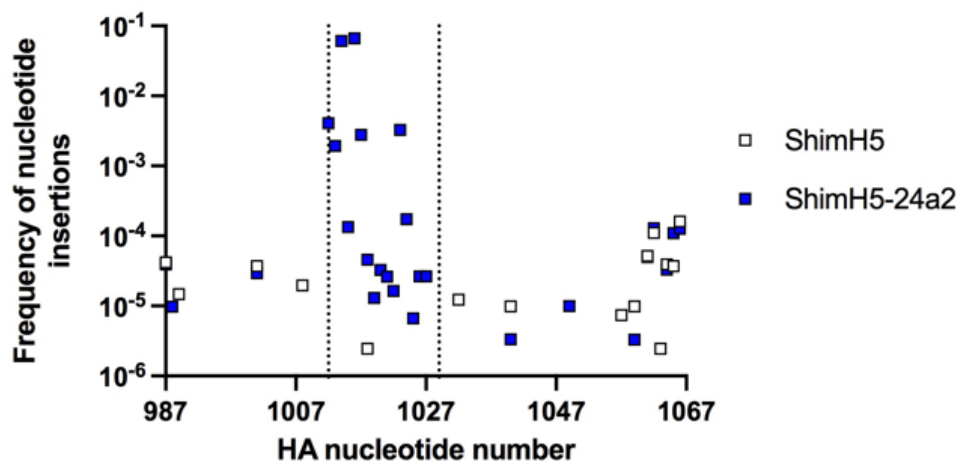


Figure 16 : Séquençage Illumina de la séquence de 80 nucléotides qui entoure le site de clivage.

Les traits verticaux en pointillés délimitent le site de clivage. Les fréquences d'insertion de nucléotides sont montrées si elles sont non nulles pour les 2 virus testés.

Un système mini-génome fonctionnel a également été conçu avec le virus H1N1 A/United Kingdom/WSN/1933 (WSN).

2. Objectifs et contribution au projet

Dans un premier temps, l'objectif est de produire à partir du virus H1N1 A/Puerto Rico/8/1934 (PR8) des virus recombinants PA-PR8-HA-X afin de tester si les composantes virales (complexe polymérase et NP différents) ont un effet sur le type et la fréquence des mutations observées. De plus, pour les virus PA-977-HA-X, les plasmides avaient été transfectés dans des cellules rénales de mammifères (cellules humaines embryonnaires de rein HEK-293T (293T) et cellules canines de rein Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)). Utiliser les plasmides du virus PR8 dans ces mêmes cellules permettra de modifier l'environnement viral pour comparer différents types de conditions de réplication (virus aviaire dans des cellules de mammifère et virus humain dans des cellules de mammifères). Le transgène utilisé sera la HA du virus H3N2 A/Udorn/307/1972 (Udorn). Le but est d'identifier et de cartographier des zones où la fréquence de mutations est plus élevée, appelées zones mutagènes, sur la séquence de HA. Par ailleurs, l'utilisation de la HA du virus Udorn en tant que transgène permettra d'avoir un contrôle du système PA-HA. En effet ce virus n'est pas de sous-type H5 ou H7 et est donc censé avoir une séquence stable au niveau du SC. Des fréquences d'insertion faibles sont donc attendues sur la séquence qui entoure le SC.

Le deuxième objectif est de produire un système mini-génome à partir du complexe polymérase du virus 977, répliquer les HA de ShimH5 et ShimH524a2b et séquencer les ARNv produits, puis de comparer les résultats avec ceux obtenus pour les systèmes PA-977-HA-ShimH5 et PA-977-HA-ShimH524a2b. Une fois de plus, l'environnement de réplication du complexe polymérase sera modifié puisque les particules virales ne sont pas assemblées dans le système mini-génome.

E. Système PA-PR8-HA-Udorn

Pour produire le virus recombinant PA-PR8-HA-Udorn, il faut transfecter 8 plasmides dans des cellules eucaryotes. 7 plasmides phw2000 contiennent les segments PB1, PB2, HA, NP, NA, M et NS du virus PR8. Le dernier plasmide contient le segment PA du virus PR8 à la suite duquel est inséré le transgène HA du virus Udorn. Le segment PA-HA est entouré des séquences d'empaquetage de PA. La structure de la construction est schématisée dans la figure 17. Ce plasmide a une longueur de 7036 pb (paire de bases).

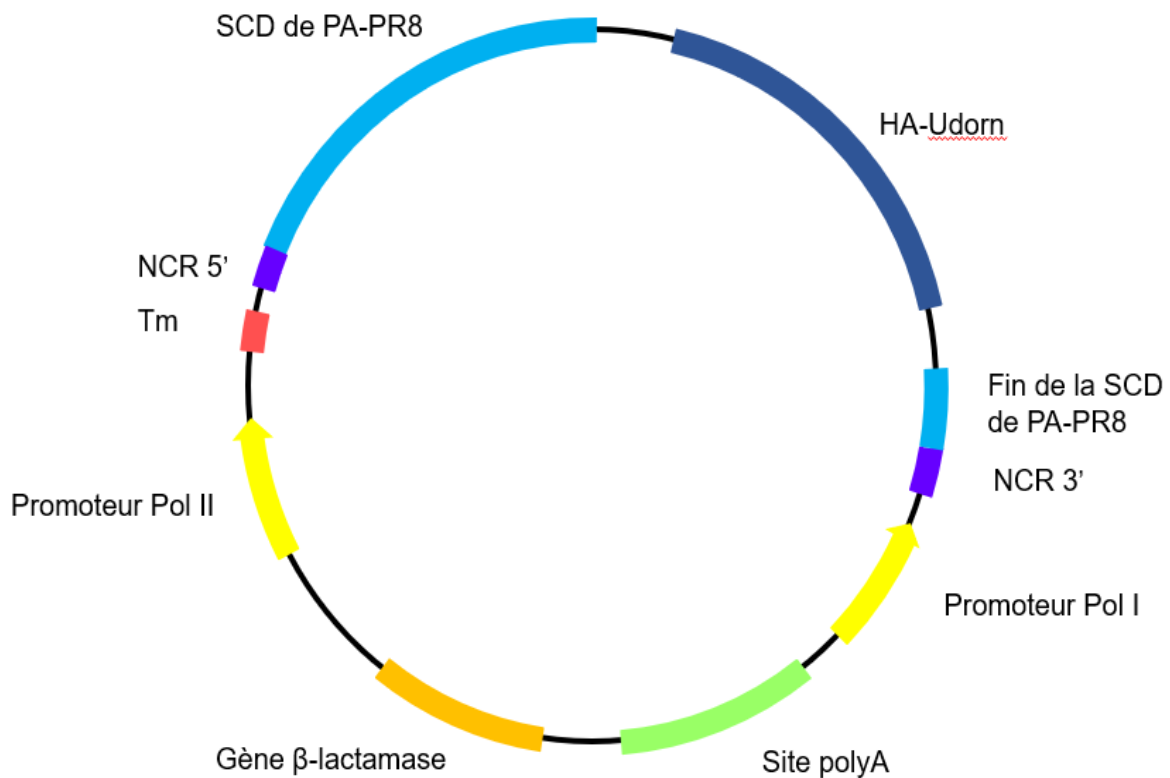


Figure 17 : Construction phw2000-PA-PR8-HA-Udorn

1. Vérification de la construction

L'étape de clonage a été réalisée par un autre membre de l'équipe, Typhaine Filhol, qui nous a confié un clone phw2000-PA-PR8-HA-Udorn. Nous avons dans un premier temps vérifié que ce clone présentait la structure et la séquence attendues.

1.1. Digestion analytique du plasmide

Le plasmide a été digéré par les enzymes de restriction Pvu II et Hind III. Il s'agit d'endonucléases qui digèrent l'ADN double brin pour créer des extrémités franches. L'enzyme Pvu II est spécifique de la séquence CAGCTG et digère l'ADN à 37°C au niveau de celle-ci. Cette séquence est retrouvée dans le segment PA-PR8 et dans le site PolyA. La digestion du plasmide par cette enzyme doit donc le séparer en 2 fragments d'ADN linéaires d'environ 4500 pb (paire de bases) et 2600 pb. De la même façon l'enzyme Hind III reconnaît les séquences AAGCTT, retrouvées dans le segment PA-PR8 et dans le transgène, ainsi la digestion du plasmide par celle-ci doit produire 2 fragments d'ADN d'environ 5200 pb et 1900 pb. Le protocole de digestion du plasmide par ces 2 enzymes est présenté dans la figure 18.

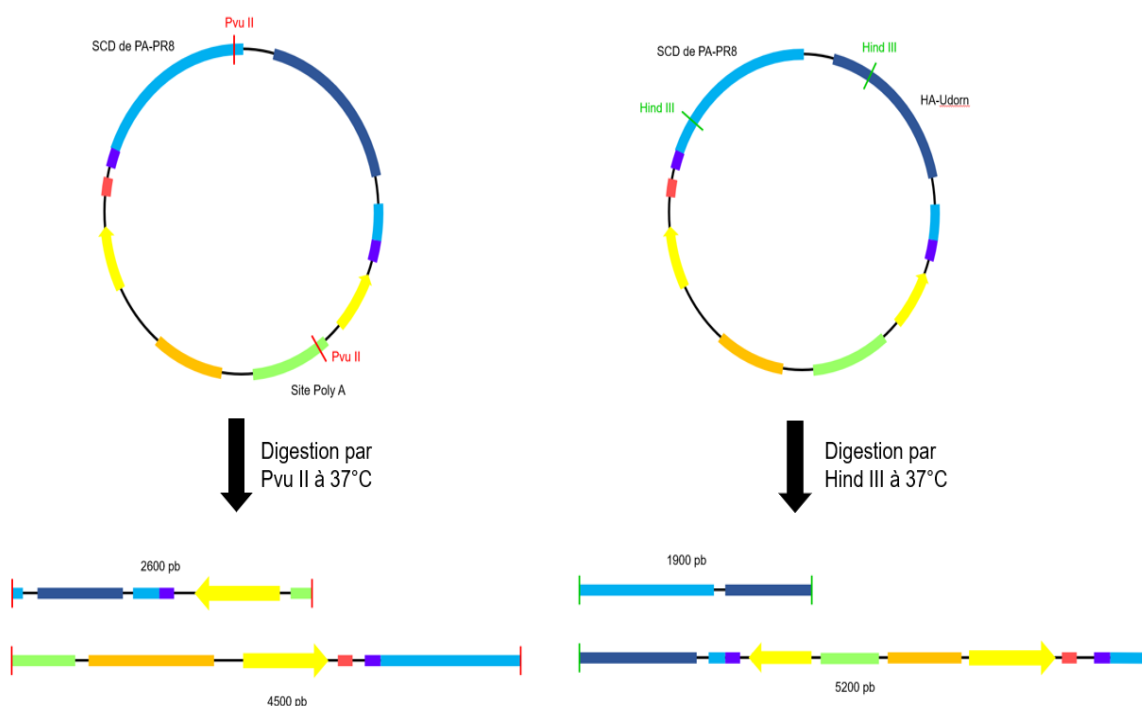


Figure 18 : Digestion du plasmide phw2000-PA-PR8-HA-Udorn par les enzymes de restriction Pvu II et Hind III

1.2. Caractérisation de la structure PA-HA par PCR

Des séquences précises du plasmide ont été amplifiées par « Polymerase Chain Reaction » (PCR) avec le kit « GoTaq® G2 DNA Polymerase ». Pour ce faire, les amorces GDA 124, GDA 125 ont été construites avec le logiciel Geneious Prime® puis produites par l'entreprise Eurogentec®. Une autre amorce déjà produite et stockée par l'équipe a été utilisée : Bm-PA 2232. Ces amorces vont se fixer sur une séquence spécifique ce qui permet l'amplification de segments d'ADN d'une taille attendue connue. Les ADNm utilisés sont le plasmide d'intérêt et le plasmide phw2000-PA-PR8 wild type (wt) qui contient uniquement la SCD de PA-PPR8 et qui est le témoin positif de la réaction de PCR. Le lieu de fixation des amorces et les amplicons attendus sont représentés dans la figure 19. Le protocole des réactions de PCR est représenté dans le tableau 2.

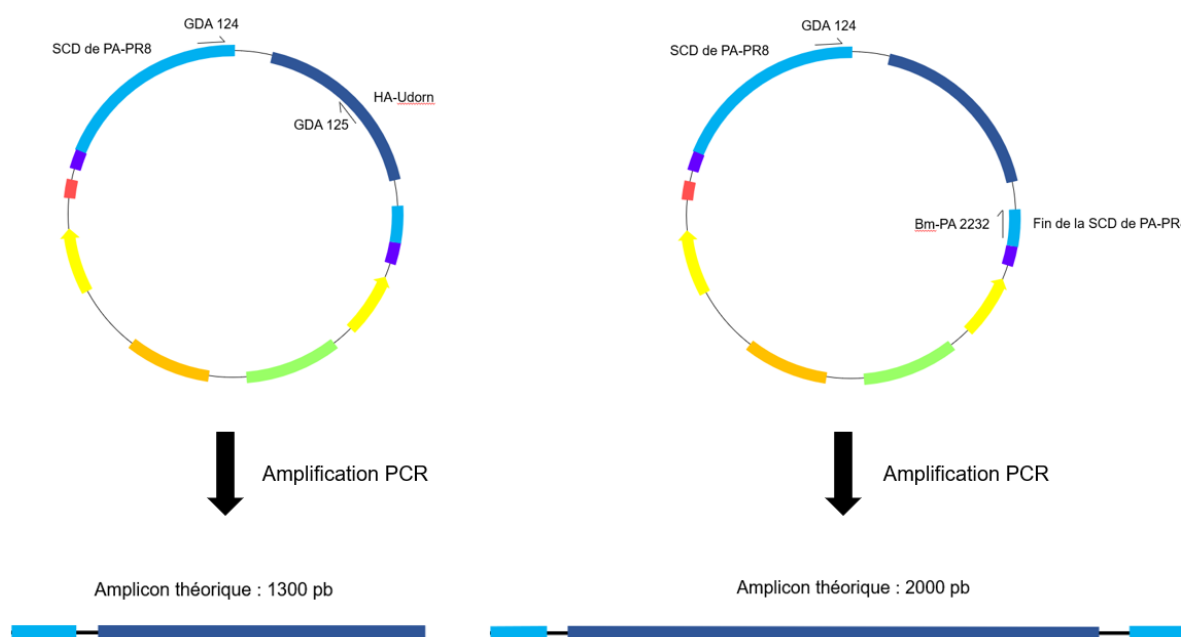


Figure 19 : Lieu de fixation des amorces GDA 124, GDA 125 et Bm-PA 2232 sur le plasmide phw2000-PA-PR8-HA-Udorn et amplicons théoriques attendus lors de la réaction de PCR

Tableau 2 : Protocole des PCR réalisées sur le plasmide phw2000-PA-PR8-HA-Udorn pour vérifier la présence de la construction PA-HA dans le plasmide

ADN matrice	Amorces	Polymérase	Programme PCR	Amplicon théorique	
phw2000-PA-PR8 wt	GDA 124 GDA 125	GoTaq® G2 DNA	Dénaturation initiale : 95°C 2'	Aucun	
phw2000-PA-PR8-HA-Udorn			Dénaturation : 95 °C 30''	} 30x	Environ 1300 pb
H2O			Hybridation : 56 °C 30''		
			Elongation finale : 72 °C 5'	Aucun	
phw2000-PA-PR8 wt	GDA 124 Bm-PA 2232			Réfrigération : 4 °C 5'	Environ 300 pb
phw2000-PA-PR8-HA-Udorn				Stockage : 20 °C	Environ 2000 pb
H2O				Aucun	

1.3. Migration par électrophorèse sur gel

Les produits de digestion et de PCR ont ensuite migré sur un même gel d'agarose 1%. Le gel obtenu après migration est présenté dans la figure 20.

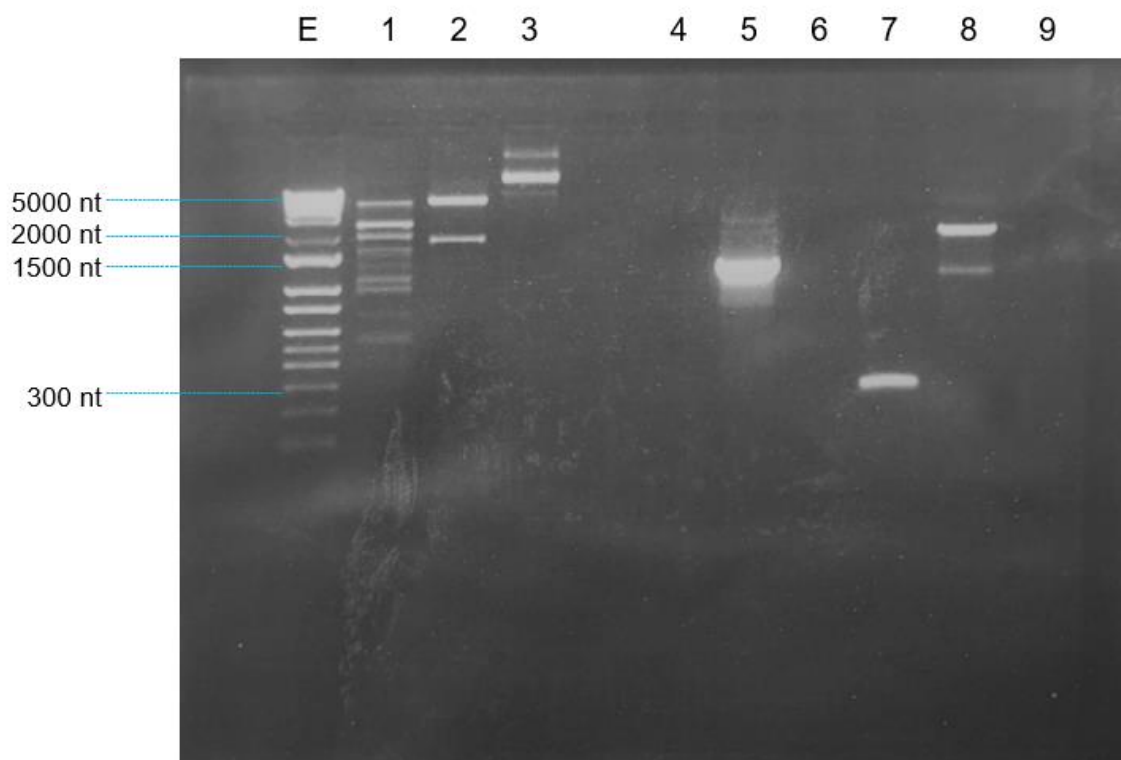


Figure 20 : Gel d'électrophorèse obtenu après migration des produits de digestion du plasmide phw2000-PA-PR8-HA Udorn par les enzymes de restriction Pvu II et Hind III, et des produits des réactions de PCR décrites plus haut

Légende : E : échelle d'ADN allant de 5000 à 100 nt ; 1 : phw2000-PA-PR8-HA-Udorn digéré par Pvu II ; 2 : phw2000-PA-PR8-HA-Udorn digéré par Hind III ; 3 : phw2000-PA-PR8-HA-Udorn non digéré ; 4 : produit de PCR phw2000-PA-PR8 wt avec les amorces GDA 124 et GDA 125 ; 5 : produit de PCR phw2000-PA-PR8-HA-Udorn avec les amorces GDA 124 et GDA 125 ; 6 : H₂O ; 7 : produit de PCR phw2000-PA-PR8 wt avec les amorces avec les amorces GDA 124 et Bm-PA 2232 ; 8 : produit de PCR phw2000-PA-PR8-HA-Udorn avec les amorces GDA 124 et Bm-PA 2232 ; 9 : H₂O

La digestion par Hind III a permis l'obtention de deux fragments d'ADN linéarisés d'environ 5200 et 1900 pb (puits 1). La digestion par Pvu II a permis l'obtention de deux fragments d'ADN linéarisés d'environ 4500 et 2600 pb mais également de nombreux autres fragments de plus petite taille (puits 2). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat : Ce clone n'est pas pur et plusieurs populations plasmidiques cohabitent, ou l'enzyme de restriction s'est fixé sur la

séquence d'ADN à plus d'endroits que ce qui était attendu. La présence de plusieurs ADN de plus de 5000 pb pour le plasmide non digéré (puits 3) semble confirmer la première hypothèse.

La PCR réalisée avec les amorces GDA 124 et GDA 125 a produit un amplicon d'environ 1300 pb pour le plasmide phw2000-PA-PR8-HA-Udorn (puits 5) alors qu'elle n'en a pas produit pour le plasmide phw2000-PA-PR8 wt (puits 4), ce qui était attendu puisque l'amorce GDA 125 se fixe sur une séquence du transgène HA que ce plasmide ne contient pas. La PCR réalisée avec les amorces GDA 124 et Bm-PA 2232 a produit un amplicon d'environ 300 pb pour le plasmide phw2000-PA-PR8 wt (puits 7) et 2 amplicons différents : 1 de 2000 pb, tel qu'attendu, et 1 autre de 1300 pb, pour le plasmide phw2000-PA-PR8-HA-Udorn (puits 8). Ce second amplicon suggère une fois de plus que le clone récupéré comporte 2 populations plasmidiques différentes dont l'une serait minoritaire et délétée, probablement sur un segment du transgène HA. Il est également possible que l'amorce Bm-PA 2232 ne soit pas assez spécifique et mène à l'amplification de ces 2 ADN de taille différente. Les puits 6 et 9, témoins négatifs de la réaction de PCR, ont bien montré une absence d'amplification.

Pour tester l'hypothèse d'une amorce insuffisamment spécifique, une nouvelle amorce GDA 126 a été construite avec le logiciel Geneious Prime® puis produite par l'entreprise Eurogentec®. Celle-ci se fixe à la fin du transgène HA. Une réaction de PCR avec le kit « GoTaq® G2 DNA Polymerase », les 2 mêmes plasmides et les amorces GDA 124 et GDA 126 a été effectuée. L'amplicon théorique fait environ 1900 pb pour le plasmide phw2000-PA-PR8-HA-Udorn et 200 pb pour le plasmide phw2000-PA-PR8. Les produits de cette PCR ont ensuite migré sur un gel d'agarose 1%. Le gel obtenu après migration est présenté dans la figure 21.

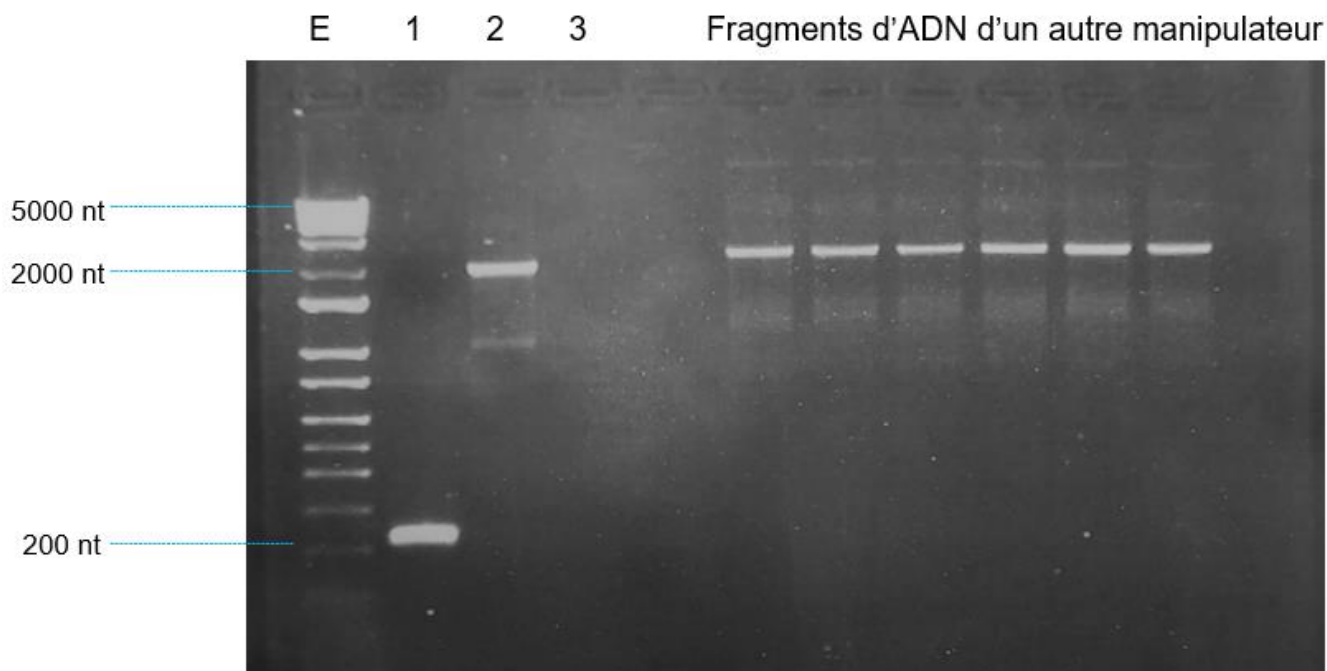


Figure 21 : Gel d'électrophorèse obtenu après migration des produits des réactions de PCR réalisée avec la nouvelle amorce GDA 126

Légende : E : échelle d'ADN allant de 5000 à 100 nt ; 1 : produit de PCR phw2000-PA-PR8 wt avec les amorces GDA 124 et GDA 126 ; 2 : produit de PCR phw2000-PA-PR8-HA-Udorn avec les amorces GDA 124 et GDA 126 ; 3 : H₂O

La PCR réalisée avec le plasmide phw2000-PA-PR8 wt a produit 1 amplicon d'environ 200 pb (puits 1), tel qu'attendu. La PCR avec le plasmide phw2000-PA-PR8-HA-Udorn a de nouveau produit 2 amplicons d'environ 2000 pb et 1200 pb (puits 2), ce qui confirme l'hypothèse de 2 populations plasmidiques différentes. L'objectif était alors d'isoler le plasmide ayant la bonne construction PA-HA.

1.4. Transformation bactérienne et purification

Le plasmide phw2000-PA-PR8-HA-Udorn a été transformé dans des bactéries compétentes *E. Coli* Stbl 3™ avec un milieu contenant de l'ampicilline, en suivant le protocole « One Shot™ Stbl3™ Chemically Competent *E. Coli* ». 8 colonies ont été sélectionnées et une réaction de PCR a été réalisée sur ces 8 colonies avec le kit « GoTaq® G2 DNA Polymerase » et les amorces GDA 124 et GDA 126. L'amplicon théorique fait environ 1900 nt. Les produits de la réaction de PCR ont ensuite migré sur gel d'agarose 1%. Le gel obtenu après migration est présenté dans la figure 22.

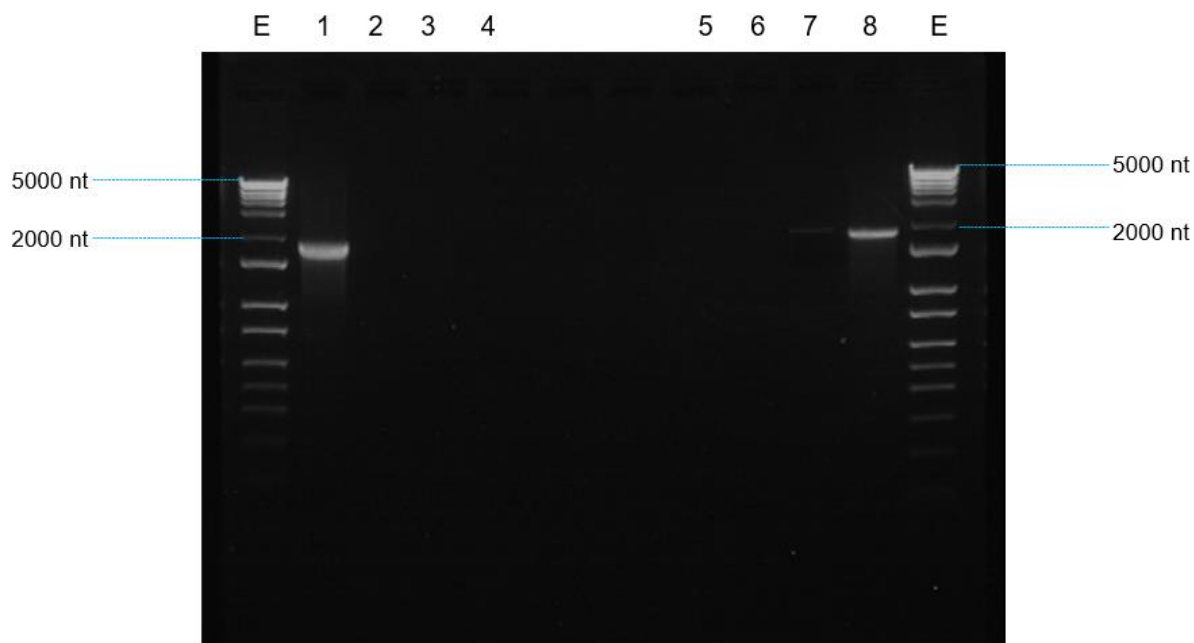


Figure 22 : Gel obtenu après migration des produits de la réaction de PCR réalisée sur les 8 colonies obtenues après transformation du plasmide phw2000-PA-PR8-HA-Udorn dans des bactéries compétentes

Légende : E : échelle d'ADN allant de 5000 à 100 nt ; 1 à 8 : produit de PCR réalisée sur les colonies 1 à 8

La PCR a permis la production d'un amplicon d'environ 1900 pb pour les colonies 1 et 8. Ces 2 colonies sont repiquées et cultivées dans 10 mL de milieu de culture « lysogeny broth » (LB) à 37°C avec de l'ampicilline. 24h plus tard les bouillons de culture sont purifiés avec le protocole du kit Macherey Nagel « Nucleospin Plasmid® ».

1.5. Séquençage

Les plasmides obtenus ont été séquencés par la méthode Sanger afin de vérifier la présence de la structure PA-HA ainsi que sa séquence. Avec une amorce il est possible de séquencer précisément une séquence d'environ 1000 nt (nucléotides). Les amorces « forward » comme GDA 124 permettent un séquençage dans le sens 5' vers 3' du brin codant. Les amorces « reverse » comme GDA 125 et GDA 126 permettent un séquençage dans le sens 3' vers 5'. Plusieurs séquençages sont donc réalisés avec des amorces différentes déjà construites par l'équipe UMR 1225 IHAP grâce au logiciel Geneious Prime® et produites par l'entreprise Eurogentec®. Ces amorces se fixent sur les segments PA-PR8 et HA-Udorn afin de vérifier leur séquence et la continuité de la construction PA-PR8-HA-Udorn. Des tubes Eppendorf contenant

500 ng de l'ADN plasmidique à tester, 2,5 µL d'amorce concentrée à 10 µmol/L et un volume d'eau variable permettant d'obtenir un volume total de 10 µL sont préparés et envoyés à l'entreprise Eurofins Genomics®. Puis les résultats sont reçus informatiquement et analysés avec le logiciel Geneious Prime® : des « alignements » ou comparaisons sont effectués entre la séquence théorique connue et le résultat du séquençage envoyé. La figure 23 présente un « alignement » entre la séquence théorique enregistrée dans le logiciel et le clone envoyé au séquençage. Ce séquençage a permis de sélectionner un clone correct qui a ensuite été utilisé en génétique inverse.



Figure 23 : « Alignement » entre la séquence théorique de la construction phw2000-Pr8-PA-HA-Udorn et le résultat du séquençage pour un clone produit expérimentalement

2. Production du virus recombinant

Le protocole de génétique inverse de Hoffman et al. décrit dans la partie II.C.1 a été utilisé avec les plasmides contenant les 8 gènes du virus H1N1(PR8) en remplaçant le plasmide phw2000-PA-PR8 par le plasmide phw2000-PA-PR8-HA-Udorn obtenu dans la partie II.E.1. Ce plasmide permettra d'obtenir des ARNv contenant la séquence PA-PR8-HA-Udorn mais seule celle de PA sera traduite en protéine.

2.1. Transfection des plasmides

Le protocole de transfection comprend 6 conditions. La condition 1 correspond au virus H1N1(PR8)-PA-HA-Udorn. La condition 2 correspond au virus sauvage H1N1(PR8) wt. Elle sert de contrôle positif au protocole de génétique inverse. La condition 3 correspond au virus sauvage H1N1(PR8) wt privé de son segment NP. Elle sert de contrôle négatif au protocole de génétique inverse. Les condition 4 et 5 correspondent à 0,5 et 1 µg de plasmide GFP. La « Green Fluorescent Protein » (GFP) est une protéine capable d'émettre une fluorescence de couleur verte. La séquence

codant pour cette protéine a été insérée dans un plasmide phw2000-GFP. Celui-ci va servir de témoin positif au protocole de transfection. En effet, si la transfection fonctionne, les cellules vont produire des ARNm puis les traduire en protéine GFP. L'intensité de la fluorescence observée avec un microscope à fluorescence sera alors proportionnelle à la quantité d'ARNm dans les cellules transfectées (Soboleski et al. 2005). La condition 6 correspond à de l'eau. Elle sert de témoin de contamination.

La transfection des plasmides a été réalisée avec le protocole du kit Invitrogen™ « Lipofectamin™ LTX DNA Transfection Reagent Protocol ». 2 mélanges sont préparés pour chacune des 5 conditions. Le premier mélange « Opti+DNA » contient 125 µL de milieu de culture Opti-MEM™ dans lequel est ajouté 500 ng de chaque plasmide et 1 x (volume total d'ADN) µL de réactif PLUS™ Reagent. Le deuxième mélange « Opti+LTX » contient 115 µL de milieu de culture Opti-MEM™ et 10 µL de Lipofectamine® LTX Reagent (LTX). Le mélange Opti+LTX est ajouté au mélange Opti+DNA et le tout est incubé pendant 10 minutes à température ambiante. Le protocole de transfection est résumé dans le tableau 3.

Tableau 3 : Protocole utilisé pour la transfection des plasmides du système PA-PR8-HA-Udorn

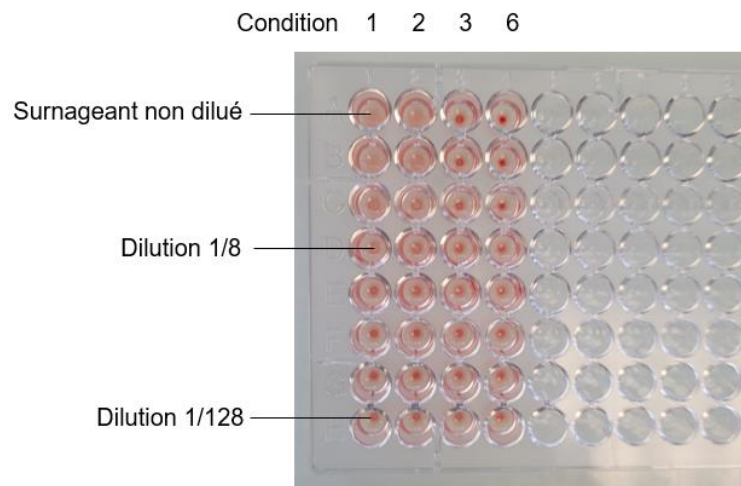
Condition	Plasmides	Opti-MEM™ + réactif PLUS™ Reagent	Opti-MEM™ + LTX
1 H1N1(PR8)-PA-HA-Udorn	7 plasmides phw2000-X(PR8) 1 plasmide phw2000-PA-PR8-HA-Udorn	125 µL + 4µL	115 µL + 10 µL
2 H1N1(PR8) wt	8 plasmides phw2000-X(PR8)		
3 H1N1(PR8) wt sans NP	7 plasmides phw2000-X(PR8) (Sans phw2000-NP(PR8))	125 µL + 3,5 µL	
4 GFP 1 µg	1 plasmide phw2000-GFP	125 µL + 1 µL	
5 GFP 0,5 µg	1 plasmide phw2000-GFP	125 µL + 0,5 µL	
6 H2O	Aucun plasmide	125 µL + 0 µL	

Dans le même temps une plaque P6 a été préparée. Chaque puits contient 2 mL de milieu Opti-MEM™ avec de la pénicilline et de la streptomycine à une concentration de 1 mg/mL, ainsi qu'une culture de cellules MDCK et 293T. La culture cellulaire a été réalisée avec 2 types cellulaires différents car les 293T sont très transfectables mais ne permettent pas la réplication du virus alors que les MDCK sont peu transfectables mais permettent la réplication du virus. Pour chaque condition, le mélange préalablement préparé a été ajouté dans un puits de la plaque P6. La plaque P6 est ensuite incubée à 37°C.

rempli avec 50 μL de PBS et 1 autre avec 25 μL de PBS et 25 μL de virus H1N1(PR8). Ces 2 puits servent respectivement de témoin négatif et de témoin positif du test. On laisse réagir 30 minutes avant de lire les résultats. Un dépôt de globules rouges au fond du puits correspond à un résultat négatif alors qu'une absence de dépôt traduit un résultat positif. Un dépôt partiel de globules rouges correspond à un résultat partiellement positif. Pour faciliter la lecture du résultat, on réalise le test de la larme qui consiste à incliner la plaque P96 à la verticale ce qui permet aux dépôts de globules rouges de couler le long de la paroi des puits, formant ainsi une larme (Killian 2014).

La figure 25 montre les résultats du test effectué. Les 3 premières colonnes correspondent aux trois premières conditions. La 4^{ème} colonne correspond au témoin négatif (H₂O). Les puits des conditions 1 et 2 présentent une agglutination jusqu'à la dilution 1/8. Les puits des conditions 3 et 6 ne présentent pas d'agglutination. La transfection a donc permis la production de VIAs pour les conditions 1 et 2. Le protocole de génétique inverse a donc fonctionné partiellement.

Figure 25 : Test d'hémagglutination effectué 72h post-transfection.



Légende : Lignes A à H : dilutions progressives des surnageants de 1 à 1/128. Le test est positif pour les conditions 1 et 2 jusqu'à la 3^{ème} dilution (1/8).

2.2. Amplification du virus produit

Pour augmenter la quantité de virus obtenue lors de la transfection, les virus ont été amplifiés. Pour chaque condition, 1 mL du surnageant récupéré à 72h post-transfection a été placé dans une flasque Falcon® F25 (F25) contenant des cellules MDCK à confluence. Ce mélange a été incubé à 37°C pendant 1h. Puis les surnageants ont été retirés et 2 mL d'un mélange contenant de l'OPTIMEM™, de la trypsine-TPCK concentrée à 1 µg/mL et de la pénicilline et streptomycine concentrées à 1 mg/mL, ont été ajoutés dans chaque F25. Elles ont ensuite été incubées pendant 72h à 37°C, puis les surnageants ont été récupérés et centrifugés. Un test d'hémagglutination est de nouveau réalisé sur ces surnageants. Ce test est positif pour la condition 2 (virus sauvage) et négatif pour toutes les autres conditions à toutes les dilutions. L'amplification n'a donc pas permis la production de virus recombinant. Le protocole de génétique inverse (transfection puis amplification) a été répété 3 fois, sans permettre la production de ce virus après amplification.

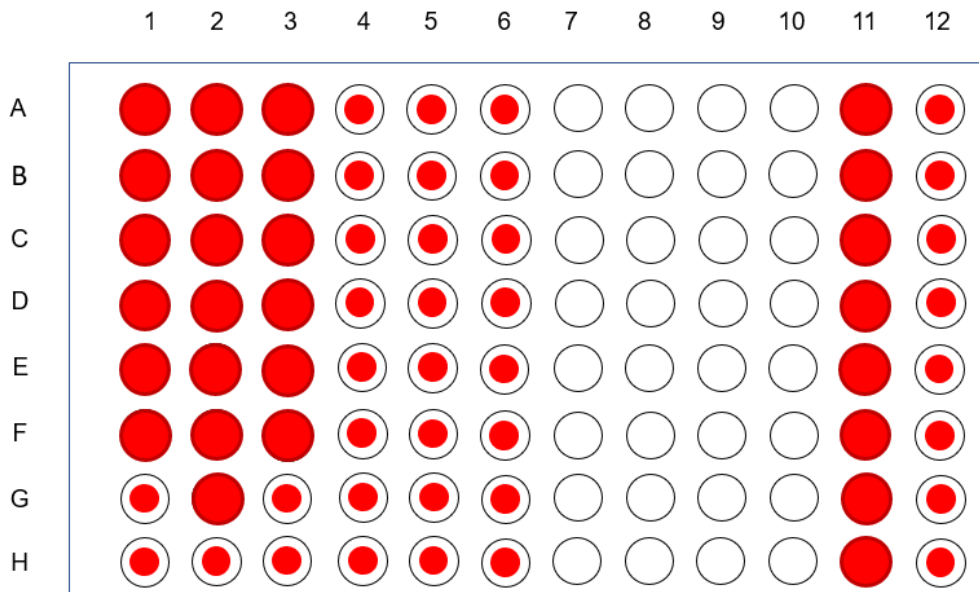


Figure 26 : Représentation schématique du test d'hémagglutination réalisé sur les produits de génétique inverse après amplification.

Légende : Lignes A à H : dilutions successives des surnageants de 1 à 1/128. Colonnes 1 à 3 : produits de génétique inverse H1N1(Pr8) wt ; colonnes 4 à 6 : produits de génétique inverse H1N1(Pr8)-PA-HA-Udorn ; colonne 11 : témoin positif (H1N1(Pr8) wt) ; colonne 12 : témoin négatif (PBS)

Pour contrôler cette amplification, des effets cytopathiques viraux ont également été recherchés. Ces effets sont des changements qui se produisent au sein des cellules après qu'elles aient été infectées par un virus. Ils peuvent être observés après examen des cellules au microscope. Les changements recherchés sont des irrégularités de la membrane nucléaire, des modifications de la couleur de la chromatine, des cellules multinucléées ou des inclusions cellulaires. Ces modifications ont été observées sur les virus H1N1(PR8) wt mais pas sur les produits de génétique inverse PA-PR8-HA-Udorn, confirmant les résultats obtenus par le test HA.

F. Système mini-génome H7N1(977)

1. Modification des plasmides phw2000-977-X par mutagenèse

1.1. Délétion du promoteur Pol I par PCR inverse

Les plasmides de départ sont les plasmides phw2000-977-PA, phw2000-977-PB1, phw2000-977-PB2, phw2000-977-NP, comprenant chacun une des 4 séquences codant pour le complexe polymérase du virus H7N1(977). Ces plasmides ont été produits par un membre de l'équipe UMR 1225 IHAP, Pierre Bessière. L'objectif est de déléter le promoteur Pol I afin d'empêcher la production d'ARNv par les polymérases cellulaires, à partir du brin d'ADN complémentaire du plasmide. Ainsi, les ARNv produits seront majoritairement ceux codant pour la séquence HA-Y d'intérêt.

La délétion du promoteur Pol I a été réalisée par PCR inverse avec des amorces dont les extrémités 5' ne correspondent pas à la zone à déléter mais à l'autre zone du vecteur qui va être « accolée » à la suite de la séquence du vecteur en 3'. Les extrémités 3' s'hybrident sur le plasmide correspondant au vecteur en aval de la région à déléter. Le kit utilisé pour la PCR est le kit In-Fusion® HD Cloning. Quatre couples de deux amorces ont été construites avec le logiciel Geneious® puis produites par l'entreprise Eurogentec®. Le lieu de fixation des amorces et les amplicons attendus sont représentés dans la figure 27, avec l'exemple du plasmide phw2000-977-PA. Le protocole des réactions de PCR est représenté dans le tableau 4.

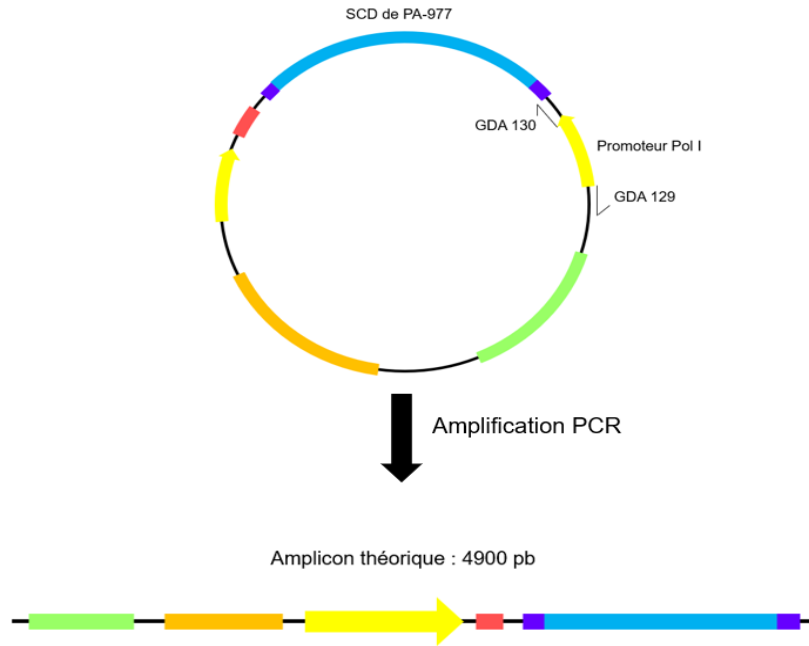


Figure 27 : Lieu de fixation des amorces GDA 129 et GDA 130 sur le plasmide phw2000-977-PA et amplicon théorique attendu lors de la réaction de PCR

Tableau 4 : Protocole des PCR inverses réalisées sur les plasmides phw2000-977-X pour déléter le promoteur Pol I

ADN matrice	Amorces	Polymérase	Programme PCR	Amplicon théorique
phw2000-977-PA	GDA 129 et 130	CloneAmp™ DNA	Dénaturation initiale : 95 °C 30''	Environ 4900 pb
phw2000-977-PB1	GDA 131 et 132		Dénaturation : 98 °C 10''	Environ 5100 pb
			Hybridation : 54 °C 30''	
			Elongation : 72 °C 60''	
phw2000-977-PB2	GDA 133 et 134		Elongation finale : 72 °C 5'	Environ 5000 pb
phw2000-977-NP	GDA 135 et 136		Réfrigération : 4 °C 5'	Environ 4300 pb
			Stockage : 20 °C	

Les produits de PCR ont ensuite été migrés sur gel d'agarose à 1%. Le gel obtenu après migration est présenté dans la figure 28. La réaction de PCR a permis la formation d'amplicons ayant les tailles attendues.

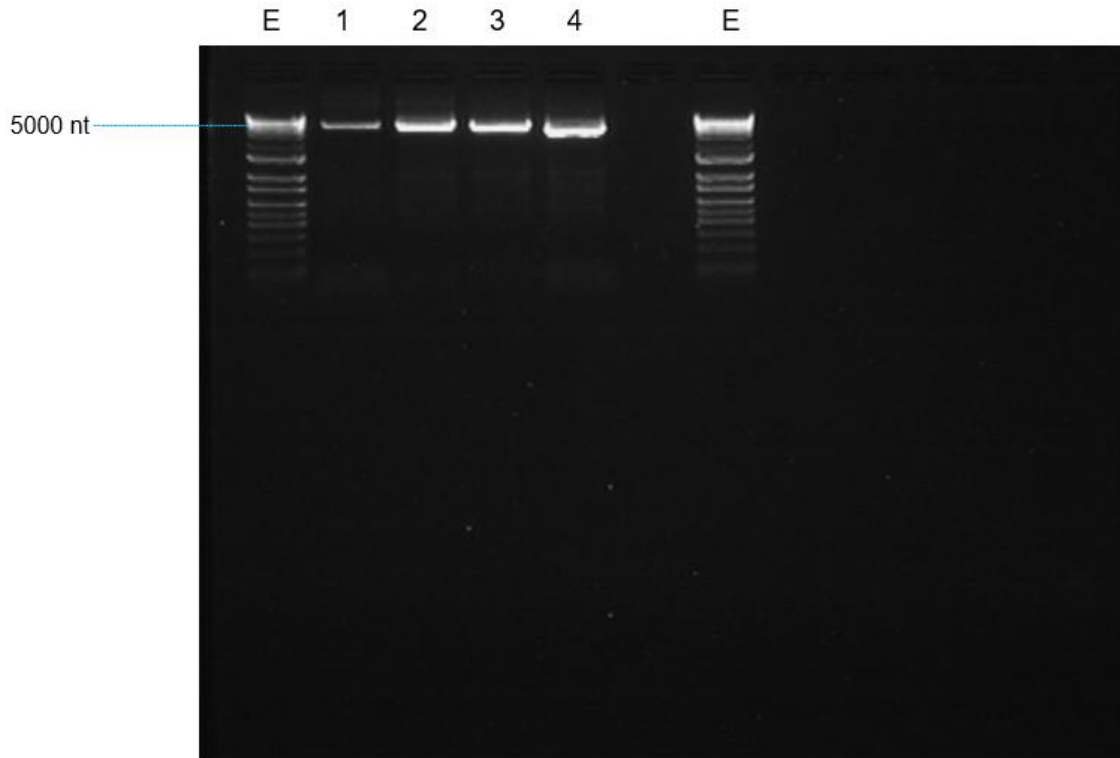


Figure 28 : Gel d'électrophorèse obtenu après migration des produits de la réaction de PCR inverse

Légende : E : échelle d'ADN allant de 5000 à 100 nt; 1 : produit de PCR phw2000-977-PA avec les amorces GDA 129 et GDA 130 ; 2 : produit de PCR phw2000-977-PB1 avec les amorces GDA 131 et GDA 132 ; 3 : produit de PCR phw2000-977-PB2 avec les amorces GDA 133 et GDA 134 ; produit de PCR phw2000-977-NP avec les amorces GDA 135 et GDA 136

Les solutions contenant les plasmides linéarisés produits par la réaction de PCR contiennent également une fraction de vecteur parental. Ce vecteur a été éliminé par traitement avec l'enzyme Dpn I, qui est sensible à la méthylation de l'ADN. Cette enzyme coupe $G^{m6}ATC$, retrouvée dans tous les plasmides parentaux, mais ne coupe pas GATC non méthylée. Pour chaque condition, 18 μ L de réaction de PCR ont été mélangés avec 4,5 μ L de Dpn I concentrée à 10 U/ μ L. Les mélanges ont ensuite été placés dans un thermocycleur, et incubés à 37°C pendant 20 minutes puis à 80°C pendant 15 min.

Puis les plasmides linéarisés ont été circularisés par hybridation de leurs extrémités 5'. Pour chaque condition, 1 mélange contenant 1 μ L de réaction de PCR

traitée au Dpn I, 2 μ L de « 5x In-fusion HD Enzyme Premix » contenu dans le kit In-fusion® HD Cloning, et 7 μ L d'eau a été préparé. Ces mélanges ont été incubés à 50°C pendant 15 minutes. 4 nouveaux plasmides ont ainsi été obtenus : phw2000-977-PA-del-Pol-I, phw2000-977-PB1-del-Pol-I, phw2000-977-PB2-del-Pol-I et phw2000-977-NP-del-Pol-I.

1.2. Transformation, purification et vérification des plasmides finaux

Les 4 plasmides ont été transformés dans des bactéries compétentes E. Coli Stellar™ avec un milieu contenant de l'ampicilline, en suivant le protocole du kit « In-Fusion® HD Cloning ». Les bactéries transformées, placées dans des boîtes de Pétri, ont ensuite été incubées dans une étuve à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, pour chaque plasmide modifié, 4 colonies ont été repiquées et mises en culture dans du milieu LB à 37°C avec de l'ampicilline, pendant une nuit. 24h plus tard les bouillons de culture ont été purifiés avec le protocole du kit Macherey Nagel « Nucleospin Plasmid® ».

Les clones obtenus ont été dosés par spectrophotométrie et séquencés par la méthode Sanger afin de vérifier l'absence du promoteur Pol I. L'amorce reverse RV25 a été utilisée pour ce séquençage. Elle se fixe normalement sur la séquence des plasmides phw2000 située entre le promoteur Pol I et le site PolyA. Le tableau 5 résume les résultats du séquençage et du dosage des 16 clones produits. Pour les plasmides contenant les segments PA, NP et PB2, le clone juste (c'est-à-dire avec le promoteur Pol I correctement délété) avec la plus haute concentration est conservé. En ce qui concerne les 4 clones phw2000-977-PB1-del-Pol-I, leurs concentrations sont faibles. De nouvelles transformations et purifications ont été effectués pour PB1, mais elles n'ont pas permis d'obtenir des concentrations supérieures à 40 ng/ μ L.

Tableau 5 : Résultats de dosage par spectrophotométrie et de séquençage Sanger pour les 16 clones purifiés.

Les clones retenus pour la suite des manipulations sont situés dans les cases bleues

Plasmide	Concentration (ng/μL)	Promoteur Pol I délété
phw2000-977-PA-del-Pol-I 1	53,5	Non
phw2000-977-PA-del-Pol-I 2	122,3	Oui
phw2000-977-PA-del-Pol-I 3	54,9	Non
phw2000-977-PA-del-Pol-I 4	125,8	Non
phw2000-977-PB1-del-Pol-I 1	37,6	Oui
phw2000-977-PB1-del-Pol-I 2	35,1	Oui
phw2000-977-PB1-del-Pol-I 3	34,2	Oui
phw2000-977-PB1-del-Pol-I 4	17,4	Non
phw2000-977-PB2-del-Pol-I 1	104,4	Oui
phw2000-977-PB2-del-Pol-I 2	104,8	Oui
phw2000-977-PB2-del-Pol-I 3	90,9	Non
phw2000-977-PB2-del-Pol-I 4	115,7	Oui
phw2000-977-NP-del-Pol-I 1	69,8	Oui
phw2000-977-NP-del-Pol-I 1	101,2	Oui
phw2000-977-NP-del-Pol-I 1	82,1	Oui
phw2000-977-NP-del-Pol-I 1	103,1	Oui

Devant la difficulté à obtenir des clones phw2000-977-PB1-del-Pol-I correctement délétés et suffisamment concentrés, un traitement au chloramphénicol a été réalisé. Ce traitement permet d'augmenter le nombre de copies de plasmides produits en inhibant la synthèse protéique et la réplication du chromosome bactérien et en favorisant la réplication de l'ADN plasmidique (Sambrook, Russell 2001).

Une pré-culture #0 dont les bactéries possèdent le plasmide voulu (clone 10) été réalisée dans du milieu LB avec de l'ampicilline (LB + Amp). 50 µL de cette pré-culture ont été prélevés et ajoutés dans 5 mL de LB + Amp. Cette nouvelle culture #1 est mise à incuber à 37°C et sa DO600 (densité optique de l'échantillon mesurée à une longueur d'onde de 600 nm avec un spectrophotomètre) a été contrôlée régulièrement. Lorsque sa DO600 a dépassé 0,6, 2,5 mL de cette culture #1 ont été prélevés et ajoutés dans 50 mL de LB + Amp pour former la culture #2. Cette culture est incubée à 37°C jusqu'à ce que sa DO600 dépasse 0,4. 250 µL de chloramphénicol concentré à 34 ng/mL ont été ajoutés à cette culture pour atteindre une concentration finale de 170 µg/mL. La culture #3 ainsi formée a été incubée à 37°C pour une nuit. 24h plus tard plusieurs échantillons ont été prélevés de ce bouillon de culture puis purifiés avec le protocole du kit Macherey Nagel « Nucleospin Plasmid® », dosés et séquencés.

De plus hautes concentrations ont été obtenues, à savoir jusqu'à 80 ng/mL pour certains échantillons, mais les résultats de séquençage montrent des populations trop hétérogènes avec un promoteur Pol I non correctement délété. La délétion du promoteur Pol I sur le plasmide phw2000-977-PB1 est abandonnée et ce dernier sera utilisé dans notre système mini-génome avec les plasmides phw2000-977-PA-del-Pol-I, phw2000-977-PB2-del-Pol-I et phw2000-977-NP-del-Pol-I.

2. Modification des plasmides phw2000-HA-X par mutagénèse

2.1. Délétion du promoteur CMV par PCR inverse

Les plasmides de départ sont les plasmides phw2000-HA-ShimH5, phw2000-HA-ShimH524a2b, phw2000-HA-H5N8LP, phw2000-HA-H5N8mut1, phw2000-HA-H5N8mut2. La séquence HA-H5N8LP est issue de la séquence HA du virus H5N8 A/duck/France/161108h/2016, hautement pathogène, modifiée par mutagénèse dirigée pour obtenir une séquence faiblement pathogène. Les séquences HA-H5N8mut1 et HA-H5N8mut2 ont été construites par l'équipe UMR 1225 IHAP à partir de HA-H5N8LP. Elles diffèrent de H5N8LP par des mutations au sein du SC. Ces mutations permettent d'obtenir une structure secondaire d'ARNv plus stable pour HA-H5N8mut1 et moins stable pour HA-H5N8mut2. Ces séquences ont été créées pour étudier l'effet de la structure secondaire de l'ARN du segment HA sur la fréquence d'apparition des mutations au niveau du SC. L'objectif est de déléter le promoteur CMV

afin de limiter la synthèse d'ARNm par les polymérases cellulaires, à partir du brin d'ADN matrice de ces plasmides. Ainsi, les ARNm synthétisés seront en majorité des ARNm codant pour les 4 protéines du complexe polymérase du virus H7N1 977. Cela limite donc la synthèse d'hémagglutinine pour éviter tout biais lié à une éventuelle toxicité de HA sur la cellule, qui pourrait influencer le métabolisme cellulaire et donc l'activité de la polymérase, et par voie de conséquence les résultats finaux de séquençage.

La délétion du promoteur CMV a été réalisée par PCR inverse avec un protocole similaire à celui utilisé pour la délétion du promoteur Pol I sur les plasmides phw2000-977-X. Le kit utilisé pour la PCR est le kit In-Fusion® HD Cloning. Un couple d'amorces GDA 137 et 138 a été construit avec le logiciel Geneious® puis produit par l'entreprise Eurogentec®. Le lieu de fixation des amorces et les amplicons attendus sont représentés dans la figure 29, avec l'exemple du plasmide phw2000-977-PA. Le protocole des réactions de PCR est représenté dans le tableau 6.

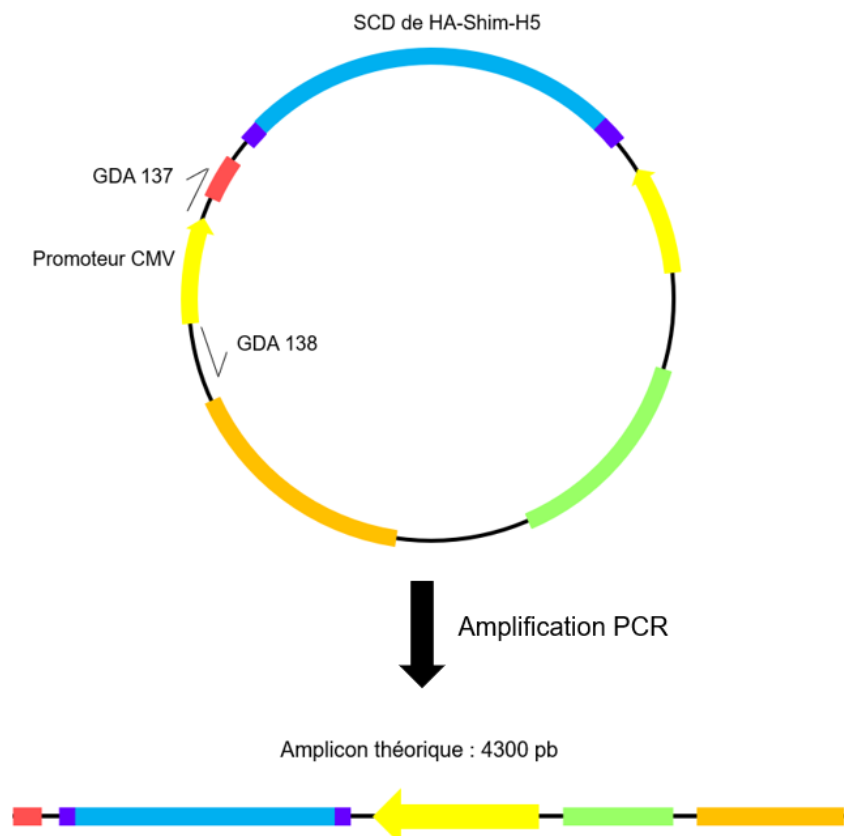


Figure 29 : Lieu de fixation des amorces GDA 137 et GDA 138 sur le plasmide phw2000-HA-ShimH5 et amplicon théorique attendu lors de la réaction de PCR

Tableau 6 : Protocole de la réaction de PCR inverse réalisée sur les plasmides phw2000-HA-X pour déléter le promoteur CMV

ADN matrice	Amorces	Polymérase	Programme PCR	Amplicon théorique
phw2000-HA-ShimH5	GDA 137 et GDA 138	CloneAmp™ DNA	Dénaturation initiale : 95°C 30''	Environ 4300 pb
phw2000-HA-ShimH524a2b			Dénaturation : 98 °C 10''	
phw2000-HA-H5N8LP			Hybridation 55 ou 60 °C 15''	
phw2000-HA-H5N8mut1			Elongation : 72 °C 60''	
Phw2000-HA-H5N8mut2			Elongation finale : 72 °C 5'	
			Réfrigération : 4 °C 5'	
	Stockage : 20 °C			

Les produits de PCR ont ensuite été migré sur gel d'agarose à 1%. La réaction de PCR n'a dans un premier temps pas permis de produire les amplicons recherchés. La température d'hybridation a alors été modifiée avec une première condition à 55°C et une seconde à 60°C. Ces réactions ont permis la production des amplicons attendus. Le gel obtenu après migration est présenté dans la figure 30.

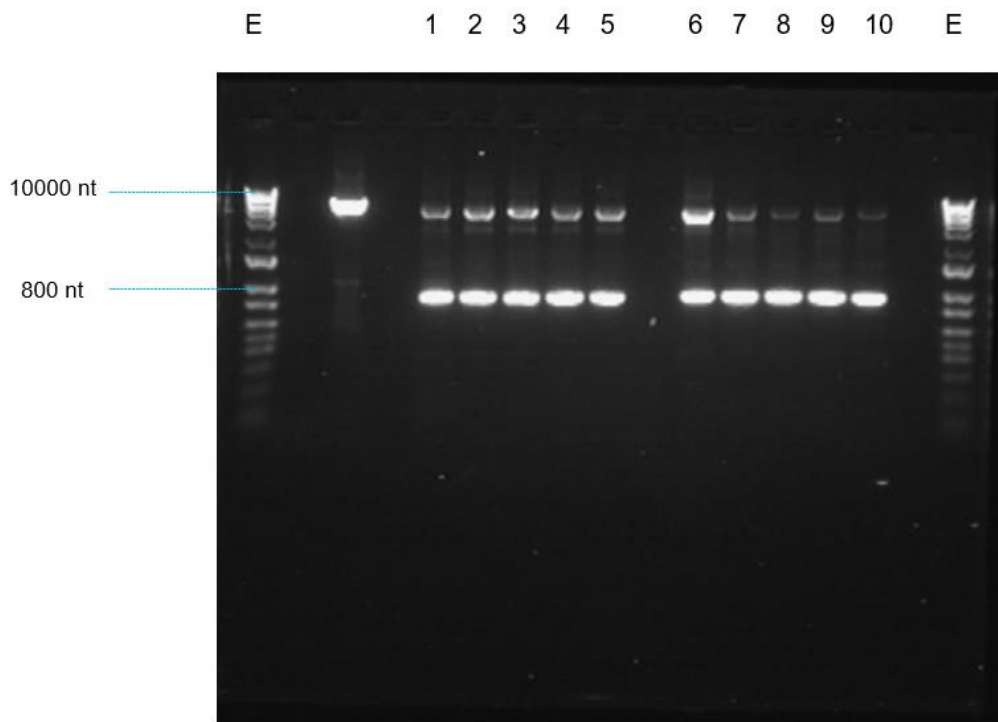


Figure 30 : Gel obtenu après migration des produits des PCR réalisées pour déléter le promoteur CMV sur les plasmides phw2000-HA-X avec les amorces GDA 137 et GDA 138

Légende : E : échelle d'ADN allant de 10 000 à 100 nt ; puits 1 à 5 : produits de PCR (respectivement pour phw2000-HA-ShimH5, phw2000-HA-ShimH524a2b, phw2000-HA-H5N8LP, phw2000-HA-H5N8mut1, phw2000-HA-H5N8mut2) avec une température d'hybridation de 55°C ; puits 6 à 10 : produits de PCR (même ordre) avec une température d'hybridation de 60°C

La PCR a effectivement permis la production d'amplicons de taille attendue (environ 4300 pb) mais également d'une autre population d'une taille d'environ 700 pb. Comme les produits de PCR à 55°C semblaient en plus grande quantité que les produits de PCR à 60°C, ils ont été sélectionnés et purifiés sur gel avec le protocole du kit Macherey Nagel « NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up » afin d'éliminer la population non voulue.

Suivant le même protocole que pour les plasmides du système mini-génome, les vecteurs parentaux ont été éliminés par un traitement avec l'enzyme Dpn I, à 37°C pendant 20 minutes puis à 80°C pendant 15 minutes. Puis les plasmides linéarisés ont été circularisés par hybridation de leurs extrémités, avec le «5x In-fusion HD Enzyme Premix » contenu dans le kit In-fusion® HD Cloning, à 50°C pendant 15 minutes. 5 nouveaux plasmides ont ainsi été obtenus : phw2000-HA-ShimH5-del-CMV,

phw2000-HA-ShimH524a2b-del-CMV, phw2000-HA-H5N8LP-del-CMV, phw2000-HA-H5N8mut1-del-CMV et phw2000-HA-H5N8mut2-del-CMV.

2.2. Transformation, purification et vérification des plasmides finaux

Les 5 plasmides ont été transformés dans des bactéries compétentes E. Coli Stellar™ avec un milieu contenant de l'ampicilline, en suivant le protocole du kit « In-Fusion® HD Cloning ». Les bactéries transformées, placées dans des boîtes de Pétri, ont ensuite été incubées dans une étuve à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, pour chaque plasmide modifié, 2 colonies ont été repiquées et mises en culture dans du milieu LB à 37°C avec de l'ampicilline, pendant une nuit. 24h plus tard les bouillons de culture ont été purifiés avec le protocole du kit Macherey Nagel « Nucleospin Plasmid® ».

Les clones obtenus ont été dosés par spectrophotométrie et séquencés par la méthode Sanger afin de vérifier l'absence du promoteur Pol I. L'amorce reverse TFA15 a été utilisée pour ce séquençage. Les résultats du séquençage montrent que le promoteur CMV a correctement été délété pour les 2 clones des 5 plasmides. Le clone 2 du plasmide phw2000-HA-ShimH524a2b-del-CMV présente quelques SNP (Single Nucleotide Polymorphism), il ne sera pas utilisé pour l'étape de transfection.

3. Utilisation du système mini-génome H7N1(977)

3.1. Test de fonctionnalité

Pour tester qualitativement et quantitativement la fonctionnalité du système mini-génome H7N1(977), des luciférases ont été utilisées. Ces enzymes catalysent une réaction de bioluminescence en oxydant la luciférine en oxyluciférine, ce qui provoque la libération de photons. Elles sont utilisées en tant que marqueurs de l'expression de certains gènes, en conjonction avec un rapporteur fluorescent (Paley, Prescher 2014). Ici, la « Firefly luciferase » (Fluc), issue de *Photinus pyralis*, une luciole de la famille des Lampyridae, et la Nanoluc® luciferase (Nluc), conçue par l'entreprise Promega® pour avoir une performance optimale en tant que rapporteur luminescent, ont été utilisées. Les 4 plasmides du système mini-génome H7N1(977) ont été transfectés dans des cellules 293T, avec un plasmide pPoll-Fluc contenant la séquence codant pour la Fluc sous dépendance du complexe polymérase viral, et un

plasmide pUASNluc contenant la séquence codant pour la Nluc sous dépendance du complexe polymérase cellulaire.

Le protocole de transfection comprend 5 conditions. La condition 1 correspond au système mini-génome H7N1(977). La condition 2 correspond au système mini-génome H7N1(977) privé du plasmide phw2000-977-PB1. Elle sert de contrôle négatif au système mini-génome. La condition 3 correspond au système mini-génome H1N1(WSN) déjà produit par l'équipe de Romain Volmer. Connue comme fonctionnelle, ce système sert de comparaison quantitative à l'efficacité du système mini-génome H7N1(977). Les conditions 4 et 5 correspondent à 0,5 et 1µg de plasmide GFP. Elles servent de contrôle à la transfection.

La transfection des plasmides a été réalisée avec le protocole du kit Invitrogen™ « Lipofectamin™ LTX DNA Transfection Reagent Protocol ». 2 mélanges sont préparés pour chacune des 5 conditions. Le premier mélange « Opti+DNA » contient 125 µL de milieu de culture Opti-MEM™ dans lequel est ajouté 500 ng de chaque plasmide (250 ng pour les plasmides Fluc et Nluc) et 1 x (volume total d'ADN) µL de réactif PLUS™ Reagent. Le deuxième mélange « Opti+LTX » contient 115 µL de milieu de culture Opti-MEM™ et 10 µL de Lipofectamine® LTX Reagent (LTX). Le mélange Opti+LTX est ajouté au mélange Opti+DNA et le tout est incubé pendant 10 minutes à température ambiante. Le protocole de transfection est résumé dans le tableau 7.

Tableau 7 : Protocole utilisé pour la transfection des plasmides pour le test de fonctionnalité du système mini-génome H7N1(977)

Condition	Plasmide	Opti-MEM™ + réactif PLUS™ Reagent	Opti-MEM™ + LTX
1 Mini-génome H7N1(977)	3 plasmides phw2000-977-X-del-Pol-I 1 plasmide phw2000-977-PB1 1 plasmide pPoll-Fluc 1 plasmide pUASnluc	125 µL + 2,5 µL	115 µL + 10 µL
2 Mini-génome H7N1(977) sans PB1	3 plasmides phw2000-977-X-del-Pol-I 1 plasmide pPoll-Fluc 1 plasmide pUASnluc	125 µL + 2 µL	
3 Mini-génome H1N1(WSN)	4 plasmides phw2000-WSN-X-del-Pol-I 1 plasmide pPoll-Fluc 1 plasmide pUASnluc	125 µL + 2,5 µL	
4 GFP 1 µg	1 plasmide phw2000-GFP	125 µL + 1 µL	
5 GFP 0,5 µg	1 plasmide phw2000-GFP	125 µL + 0,5 µL	

Dans le même temps une plaque P6 a été préparée. Chaque puits contient 2 mL de milieu Opti-MEM™ avec de la pénicilline et de la streptomycine à une concentration de 1 mg/mL, ainsi qu'une culture de cellules 293T. Pour chaque condition, le mélange préalablement préparé a été ajouté dans un puits de la plaque P6. La plaque P6 est ensuite incubée à 37°C.

24h après la transfection, une lyse cellulaire a été réalisée. Pour cela, le milieu de culture a été retiré et 50 µL de « Passive Lysis Buffer » et 200 µL de tampon de lyse, tous deux compris dans le kit Oneglo Promega®, ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque P6 a été incubée en rotation à température ambiante pendant 30 minutes. Puis les lysats ont été transférés dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL et placés sur glace.

Puis, les réactions luciférases ont été effectuées. Pour chaque condition, 50 µL de lysat cellulaire a été placé dans 2 puits d'une plaque P96. Dans le premier puits 50µL de réactif Fluc (contenant la solution tampon, la luciférine, et les réactifs) ont été ajoutés, et dans le second puits 50 µL de réactif Nluc. Les résultats ont été lus 3 minutes plus tard, avec le lecteur de plaques Clariostar et des programmes pré-édités pour mesurer la luminescence émise dans chaque puits. Les résultats sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Mesures de luminescence pour les conditions 1, 2 et 3 après transfection, lyse cellulaire et réaction luciférase. La mesure est exprimée en URL (unité relative de lumière)

Condition	1 (H7N1)	2 (H7N1 sans PB1)	3 (WSN)
Fluc (URL)	86870	0	1075539
Nluc (URL)	4670094	5486379	6227322
Fluc/Nluc (Normalisation)	0,019	NC	0,173

La condition 1 a montré une émission de lumière, en raison de réactions de luminescence qui ont eu lieu car le gène de la Fluc était exprimé et traduit. Cela montre que le système mini-génome H7N1(977) est fonctionnel. Après normalisation des résultats, on remarque que l'intensité de la lumière émise est 9 fois supérieure pour le système mini-génome H1N1(WSN), ce qui sous-entend qu'il permet la production d'une quantité plus importante d'ARNv.

3.2. Comparaison avec le système mini-génome WSN

Dans un second temps, le protocole de transfection a été répété en utilisant les plasmides phw2000-HA-X-del-CMV, préparés précédemment. Le protocole de transfection est identique à celui utilisé pour le test de fonctionnalité. Il est résumé dans le tableau 9.

Tableau 9 : Protocole utilisé pour la transfection des plasmides pour la production des ARN viraux d'intérêt avec les systèmes mini-génome H1N1(WSN) et H7N1(977)

Condition	Plasmide	Opti-MEM™ + réactif PLUS™ Reagent	Opti-MEM™ + LTX
1 Mini-génome H7N1(977) HA-ShimH5	3 plasmides phw2000-977-X-del-Pol-I 1 plasmide phw2000-977-PB1 1 plasmide phw2000-HA-ShimH5-del-CMV	125 µL + 2,5 µL	115 µL + 10 µL
2 Mini-génome H7N1(977) HA-ShimH524a2b	3 plasmides phw2000-977-X-del-Pol-I 1 plasmide phw2000-977-PB1 1 plasmide phw2000-HA-ShimH524a2b-del-CMV	125 µL + 2,5 µL	
3 Mini-génome H1N1(WSN) HA-ShimH5	4 plasmides phw2000-WSN-X-del-Pol-I 1 plasmide phw2000-HA-ShimH5-del-CMV	125 µL + 2,5 µL	
4 Mini-génome H1N1(WSN) HA-ShimH524a2b	4 plasmides phw2000-WSN-X-del-Pol-I 1 plasmide phw2000-HA-ShimH524a2b-del-CMV	125 µL + 2,5 µL	
5 GFP 1 µg	1 plasmide phw2000-GFP	125 µL + 1 µL	
6 GFP 0,5 µg	1 plasmide phw2000-GFP	125 µL + 0,5 µL	

24h post-transfection, les ARNv ont été extraits avec le protocole du kit Macherey Nagel « Nucleospin® RNA » et une PCR quantitative après transcription inverse (RT-qPCR) a été réalisée sur les 4 premiers échantillons, afin de mesurer la quantité d'ARN produite par les systèmes mini-génome.

Dans un premier temps, une transcription inverse a été réalisée. Pour cela, le kit Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase® a été utilisé. Pour chaque condition, un mélange constitué de 2 µL d'échantillon de lysat, 1,2 µL d'amorce Bm-HA-1 (qui s'hybride sur la partie universelle NCR3' de HA) et 9,3 µL d'eau sans nucléase, pour un total de 12,5 µL, a été placé dans deux tubes RT qui ont été incubés à 65°C pendant 5 minutes puis placés sur glace. Un second mélange constitué de 4 µL de tampon de réaction, 2 µL de dNTP (nucléotides pour la synthèse d'ADN), 0,5 µL d'inhibiteur RiboLock®, 0,5 µL de RT, et 0,5 µL d'eau sans nucléase, a été ajouté dans chaque tube RT. L'inhibiteur Thermo Scientific RiboLock®, fourni avec le kit, protège efficacement l'ARN de la dégradation à des températures pouvant atteindre 55°C. Puis les tubes ont été incubés à 42°C pendant 60 minutes puis à 70°C pendant 10 minutes.

Dans un second temps, une PCR en temps réel a été réalisée afin de déterminer les quantités d'ARNv produites par les systèmes mini-génome. Pour cela, le kit QuantiFast SYBR Green PCR® a été utilisé. La technologie SYBR™ utilise des marqueurs fluorescents qui se fixent sur l'ADN. La quantité d'ADN totale est mesurée après chaque cycle d'amplification grâce à ce marqueur. Un seuil de fluorescence est établi par l'appareil qui réalise la PCR en temps réel. Une fois que la quantité d'ADN permet aux marqueurs de dépasser ce seuil on obtient un numéro de cycle PCR appelé Ct pour « cycle threshold » (cycle seuil). On peut ensuite déterminer la quantité d'ADN initiale à partir de cette valeur Ct et de la valeur de l'efficacité E de la PCR, déterminée en réalisant une PCR en temps réel sur des échantillons de dilution croissante pour obtenir une courbe étalon. Des puits d'une plaque P96 de PCR ont été remplis avec les échantillons, des gammes d'ADN allant de 10² à 10⁸ copies pour HA-ShimH5 et HA-ShimH524a2b, et des contrôles négatifs (H₂O). Le remplissage de la plaque est représenté dans le tableau 10. Le programme de PCR est représenté dans le tableau 11.

Tableau 10 : Plaque P96 du protocole de réaction de qPCR sur les ADN produits par RT.

Les abréviations GD-R-193, GD-R-194, GD-R-195 et GD-R-196 correspondent respectivement aux conditions 977 HShimH5, 977 HShimH524a2b, WSN HShimH5, WSN HShimH524a2b. Les puits des colonnes 4 et 5 correspondent respectivement aux gammes de HShimH5 et HShimH524a2b.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	GD-R-193	GD-R-193		10 ²	10 ²			
B	GD-R-194	GD-R-194		10 ³	10 ³			
C	GD-R-195	GD-R-195		10 ⁴	10 ⁴			
D	GD-R-196	GD-R-196		10 ⁵	10 ⁵			
E				10 ⁶	10 ⁶			
F				10 ⁷	10 ⁷			
G				10 ⁸	10 ⁸			
H	H2O	H2O						

Tableau 11 : Protocole de réaction de qPCR sur les ADN produits par RT.

ADN matrice	Amorces	Polymérase	Programme PCR	Amplicon théorique
HA ShimH5 (977)	BPA 3 et BPA 4	HotStarTaq Plus DNA Polymerase	Dénaturation initiale et activation de la polymérase : 95°C 5"	Environ 1800 pb
HA ShimH524a2b (977)			Dénaturation : 95 °C 10"	
HA ShimH5 (WSN)			Hybridation et élongation combinées : 60 °C 30"	
HA ShimH524a2b (WSN)			Réfrigération : 4 °C 5'	
			Stockage : 20 °C	

Une fois la qPCR réalisée les Ct ont été récupérés, les quantités initiales d'ADN ont été obtenues pour chaque puits et la moyenne calculée pour chaque condition. Les résultats sont représentés dans la figure 31.

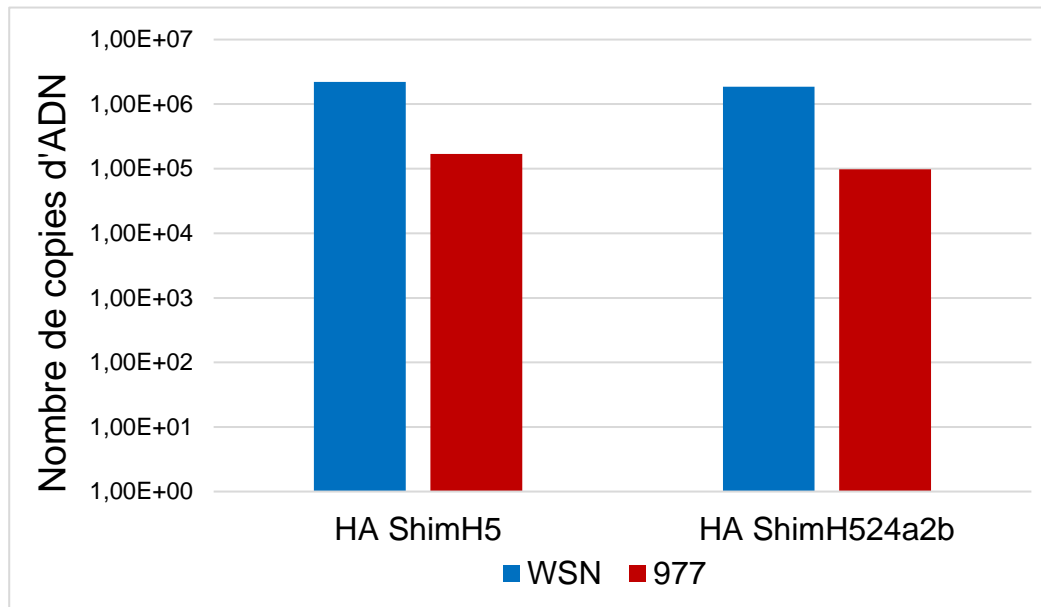


Figure 31 : Quantités d'ADN obtenues après la RT-qPCR réalisée sur les surnageants des réactions de transfection des plasmides phw2000-HA-ShimH5 et phw2000-HAShimH5-24a2b avec les systèmes mini-génome WSN et 977

Ce graphique montre que le système mini-génome WSN a permis la production d'une quantité d'ARNv plus importante que le système mini-génome 977, soit 12,9 fois plus pour HA ShimH5 et 19,2 fois plus pour HA ShimH524a2b. Les quantités d'ARNv produites pour HAShimH524ab et HAShimH5 ne sont pas significativement différentes pour les deux systèmes.

G. Séquençage haut débit Illumina®

L'objectif est désormais de séquencer les ARNv produits pour analyser le profil de mutations de HA pour les différentes conditions, en particulier la séquence qui entoure le site de clivage. Pour cela, la technologie de séquençage à haut débit Illumina® a été utilisée. Elle permet le séquençage de millions de courtes séquences d'ADN simultanément. La première étape de ce séquençage nouvelle génération NGS (New Generation Sequencing) est la préparation de « banques » ou « librairies » de

séquençage. La préparation des bibliothèques consiste à modifier le matériel génétique de départ pour qu'il ait une taille adaptée, et à ajouter deux types de séquences : les « barcodes » et les adaptateurs Illumina (Doud, Bloom 2016).

1. Construction de bibliothèques de séquençage

1.1. Transcription inverse des ARNv produits

Dans un premier temps l'ADNc complémentaire des ARNv produits par les systèmes mini-génome et extraits en II.3.2 a été synthétisé par transcription inverse avec le protocole du kit « Accuscript High-Fidelity 1st Strand cDNA Synthesis ». Un premier mix réactionnel a été préparé pour chaque condition en ajoutant ces réactifs dans un tube Eppendorf de 1,5 mL : 4,4 µL d'eau sans nucléase, 1 µL de 10x Accuscript Buffer (tampon de réaction), 0,6 µL d'amorce BM-HA1 concentrée à 100 ng/µL, 1 µL de mix dNTP concentré à 10 µmol/L pour chaque nucléotide, et 1 µL d'ARNv (correspondant à environ 200 ng d'ARNv). Ces tubes ont été incubés à 65°C pendant 5 minutes puis refroidis à température ambiante pendant 5 minutes. Puis 1µL de RT Accuscript et 1 µL de dithiothréitol (DTT) concentré à 100 µmol/L ont été ajoutés dans les tubes qui ont été placés dans un thermocycleur et incubés à 42°C pendant 30 minutes. Ainsi l'ADN correspondant aux séquences ARNv HA produites par les deux systèmes mini-génome a été produit.

1.2. Modification de l'ADN à analyser

Dans un second temps, une série d'amplifications PCR a permis la préparation de bibliothèques de séquençages. L'ADN a d'abord été fragmenté lors d'une première PCR1 amplifiant la zone qui entoure le site de clivage de HA. Cette étape a été réalisée car le séquençage Illumina® est optimal pour des courtes de séquences, de 150 à 200 paires de bases au maximum. Dans notre cas la séquence concernée mesure 113 paires de bases (des nucléotides 974 à 1086 de HA).

Une seconde PCR2 a permis l'ajout de « barcodes » et d'une partie des adaptateurs Illumina®. Cette PCR a été réalisée en utilisant des amorces possédant une queue flottante de 8 nucléotides aléatoires. Ces séquences sont appelées les « barcodes ». L'utilisation d'une faible quantité d'ADN matrice permet de s'assurer que chaque amplicon sera produit avec un couple d'amorces différent. Les adaptateurs

ajoutés lors de cette seconde PCR sont des régions de fixation des amorces de séquençage permettant la lecture de l'ADN dans les deux sens.

La troisième PCR3 a permis d'amplifier chaque famille de barcodes uniques, chaque famille étant reconnaissable par les 16 nucléotides uniques aux extrémités de chacun de ses clones. Lors de l'étape de séquençage, chaque séquence initiale correspondra à une famille de barcodes ce qui permettra d'obtenir une séquence consensus de cette séquence initiale. Si une mutation est observée chez chacun des clones d'une famille alors elle existe réellement alors que si elle est observée chez une partie des clones seulement elle correspond à une erreur de séquençage (Doud, Bloom 2016). Cette PCR3 permet également d'ajouter d'autres adaptateurs Illumina® qui permettent la fixation des séquences à la « Flow Cell », qui est une lame de verre sur laquelle est fixé l'ADN qui va être séquençé. Les bibliothèques prêtes à être séquençées sont représentées dans la figure 32.



Figure 32 : Les bibliothèques de séquençage après les différentes PCR d'amplification. (Séquençage : la technologie d'Illumina [02 décembre 2022])

Les adaptateurs PS permettent la fixation des amorces de séquençage. Les adaptateurs P5 et P7 sont responsables de la fixation sur les « Flow Cell ». Les Index 1 et 2 sont les séquences « barcode » aléatoires et uniques pour chaque séquence initiale.

2. Séquençage par synthèse sur la « Flow cell »

Les « Flow Cell » sont de fines lamelles de verres qui comportent des canaux aussi appelés lignes fluidiques où s'effectue le séquençage. La surface de la Flow cell est enduite d'oligonucléotides (de courts segments de quelques dizaines de nucléotides) qui sont complémentaires aux adaptateurs fixés sur les bibliothèques de séquençage précédemment. Ainsi les bibliothèques s'hybrident sur la Flow cell et sont amplifiées par des polymérases. Chaque fragment d'une bibliothèque est ainsi cloné en milliers de copies identiques appelées des amplifiats.

Puis un séquençage par synthèse SBS (Sequencing by Synthesis) est réalisé. Pour cela les réactifs de séquençage et en particulier des nucléotides avec des marqueurs fluorescents sont ajoutés aux brins d'ADN. Puis la Flow Cell est imagée, chaque base émet une intensité de longueur d'onde différente ce qui permet de l'identifier. A chaque cycle, un nucléotide marqué est incorporé. Il est déterminé par fluorescence et après un certain nombre de cycles la séquence de tous les fragments est déterminée. Le séquençage de chaque brin d'ADN est effectué dans un sens puis dans l'autre grâce adaptateurs de lecture 1 et 2 (Figure 33) puis les deux résultats sont comparés pour diminuer les erreurs de séquençage. C'est la méthode dite en « paired end ».

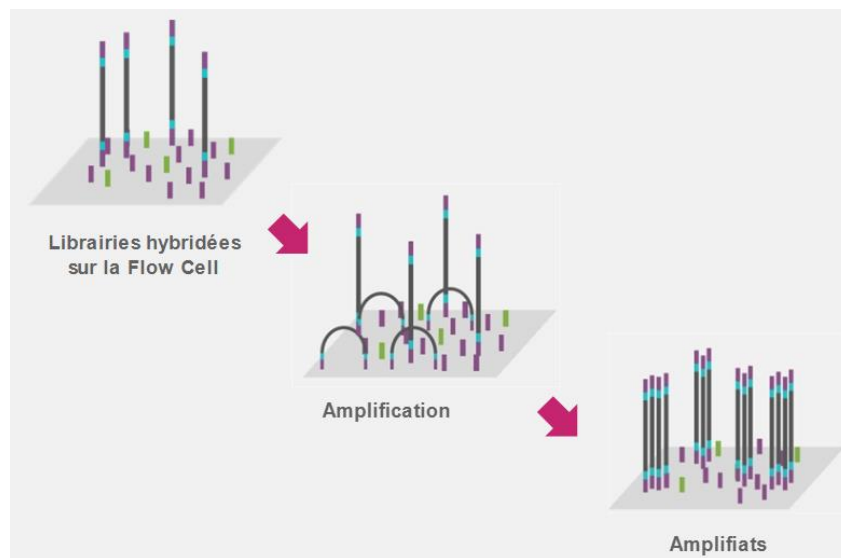


Figure 33 : La génération d'amplifiats sur la Flow Cell. (Séquençage : la technologie d'Illumina [02 décembre 2022])

3. Analyse des données de séquençage

Les données de séquençage nous ensuite été fournies et elles ont été analysées. 5 conditions ont été comparées pour les séquences entourant le site de clivage de HAsHimH5 et HAsHimH524a2b. Ces 5 conditions sont :

- Le système RT Pol I ARNv, qui sert de contrôle. Ces contrôles sont produits par l'action de Pol I sur un plasmide de génétique inverse codant pour le segment HA que l'on a transfecté dans des cellules humaines 293T. Les mutations observées sur ces échantillons ne dépendent que de l'action de la Pol I cellulaire et de la RT, et non pas de la polymérase virale ;
- Le système mini-génome H7N1(977), que nous abrègerons minig977, issu de nos travaux ;
- Le système mini-génome H1N1(WSN), que nous abrègerons minigWSN, issu des travaux de l'équipe UMR 1225 IHAP ;
- Le système 977-PA-HA produit dans des cellules MDCK (cellules rénales de chien), que nous abrègerons MDCK-977-PAHA, issu des travaux de Gabriel Dupré, membre de l'équipe UMR 1225 IHAP ;
- Le système 977-PA-HA produit dans des cellules DF1 (cellules embryonnaires de poulet), que nous abrègerons DF1-977-PAHA, issu des travaux de Gabriel Dupré.

Le séquençage a été réalisé entre les bases 974 et 1086 de la séquence HAsHimH5 ou HAsHimH524a2b. L'intérêt de notre analyse sera porté sur un segment de 80 nucléotides qui entouré le site de clivage, à savoir des bases 987 à 1067, puisque ce segment a déjà été choisi lors des premiers résultats produits par le projet RISKEVOL. De plus la quantité de lectures consensus diminue en fin de séquençage donc pour les premières et les dernières bases puisque le séquençage est effectué dans les deux sens. En choisissant cet intervalle, les premières et dernières bases sont exclues ce qui assure des données de plus haute qualité. Un intérêt particulier a été porté aux bases 1012 à 1029 qui codent pour les 6 acides aminés qui entourent le site de clivage.

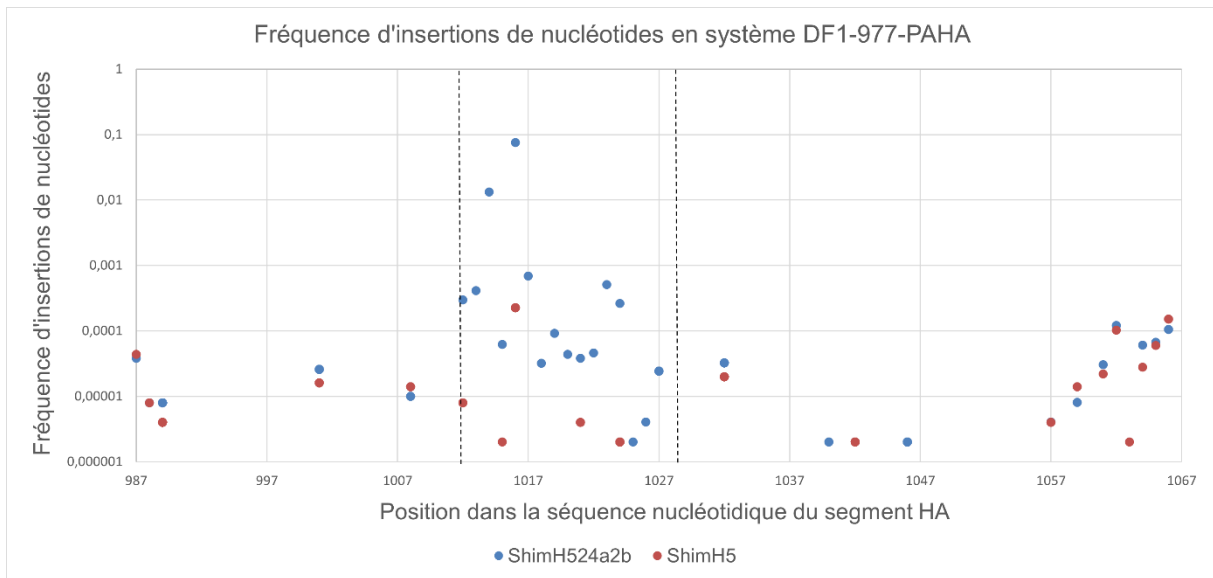
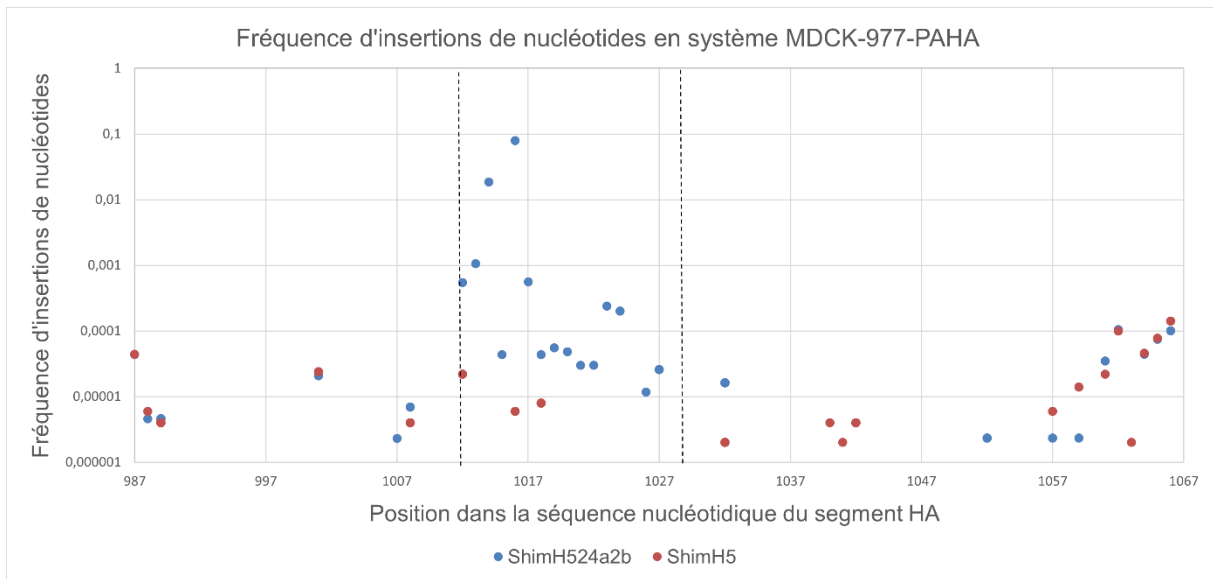


Figure 34 : Fréquence d'insertions de nucléotides en fonction de la position dans la séquence nucléotidique du segment HShimH5 ou HShimH524a2b, pour les systèmes RT Pol I, mini-génome 977, mini-génome WSN, MDCK-977-PAHA et DF1-977-PAHA.

Seules les valeurs non nulles sont représentées. Les traits pointillés verticaux délimitent le site de clivage.

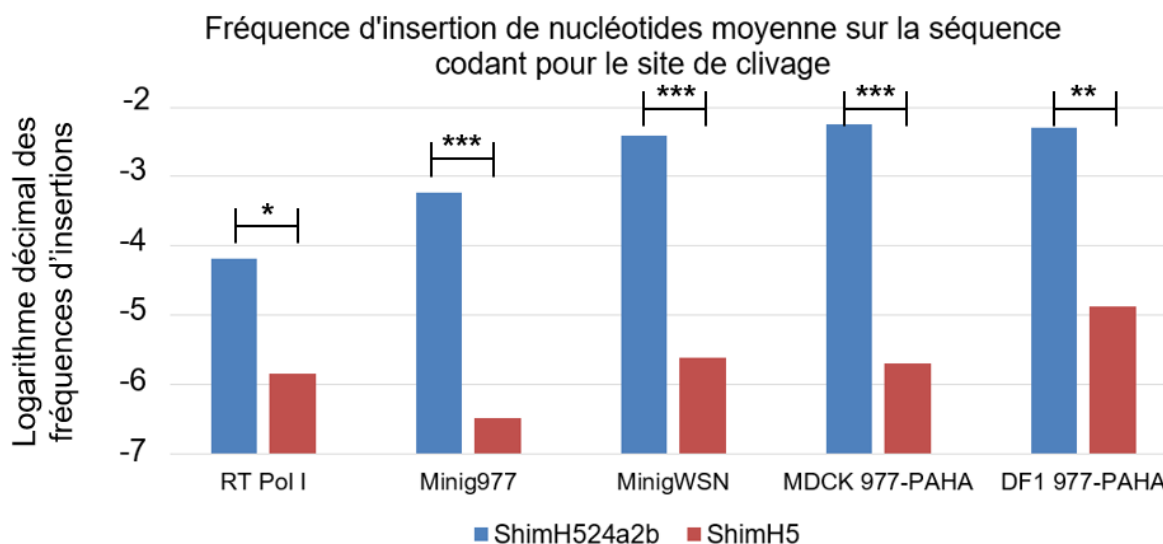


Figure 35 : Fréquence moyenne d'insertions de nucléotides entre les positions 1012 et 1029, en fonction du système et du segment HA étudié.

Les mentions *, ** et *** signifient qu'un test de Student a montré que les moyennes comparées étaient significativement différentes et que les p-valeurs obtenues sont respectivement inférieures à 0,05, 0,01 et 0,001

Dans la séquence codant pour le site de clivage de HShimH524a2b, nous observons une augmentation significative de la fréquence d'insertions de nucléotides par rapport à HShimH5, et ce pour tous les systèmes (figure 35). Cette différence de fréquence d'insertions existe également pour le système contrôle RT Pol I, contexte dans lequel seules la polymérase cellulaire et la RT Accuscript interviennent, mais elle est bien plus élevée pour les 4 autres systèmes, où la polymérase virale entre en jeu. Comme ShimH524a2b et ShimH5 diffèrent par 2 substitutions dans la séquence codant pour le site de clivage de HA, ces résultats montrent que de légères modifications dans la séquence nucléotidique qui entoure le site de clivage ont un impact majeur sur la fréquence d'insertions de nucléotides. Ces modifications entraînent une augmentation du taux d'erreur de la polymérase Pol I, qui commet 45 fois plus d'erreur, comme le montrent les résultats pour le système contrôle. Mais cette augmentation est bien plus élevée lorsque la polymérase virale entre en jeu : de 378,5 à 2789 fois plus d'erreur dans la séquence codant pour le site de clivage, selon le système d'étude considéré. Cela suggère que ces légères modifications dans la séquence nucléotidique ont des conséquences sur le bon fonctionnement de la polymérase virale, que ce soit par la séquence nucléotidique en elle-même (les 2 nucléotides qui diffèrent entre ShimH524a2b et ShimH5 entraînent une succession de

8 adénines consécutives dans la séquence codant pour le site de clivage) ou par les modifications qui en découlent dans la structure secondaire de l'ARN.

Si l'on compare les résultats obtenus en fonction des différents systèmes d'études, on observe que les deux systèmes mini-génome obtiennent des résultats similaires. En effet, bien qu'en valeur absolue environ 10 fois plus d'évènements d'insertions ont lieu pour HAsHimH5 et HAsHimH524a2b avec le système mini-génome WSN, le quotient entre les fréquences d'insertions moyennes pour HAsHimH5 et HAsHimH524a2b n'est pas significativement différent (1787 fois plus d'insertions pour le mini-génome 977 et 1604 fois plus pour le mini-génome WSN).

En ce qui concerne les méthodes PA-HA, les deux systèmes diffèrent seulement par les conditions de répliation dans lesquelles le virus est placé. On rappelle que le virus H7N1(977) est un virus aviaire. La fréquence d'insertions moyenne sur la séquence codant pour le site de clivage est environ 7 fois supérieure en système DF1 977-PAHA pour ShimH5 mais les fréquences d'insertions ne sont pas significativement différentes pour ShimH524a2b. Cela suggère que dans notre cas l'environnement de répliation virale n'a pas eu d'effet sur le taux d'erreur de la polymérase virale. Pour HAsHimH524a2b, les systèmes PA-HA ont par ailleurs obtenu un résultat qui n'est pas significativement différent de celui obtenu par le système mini-génome WSN.

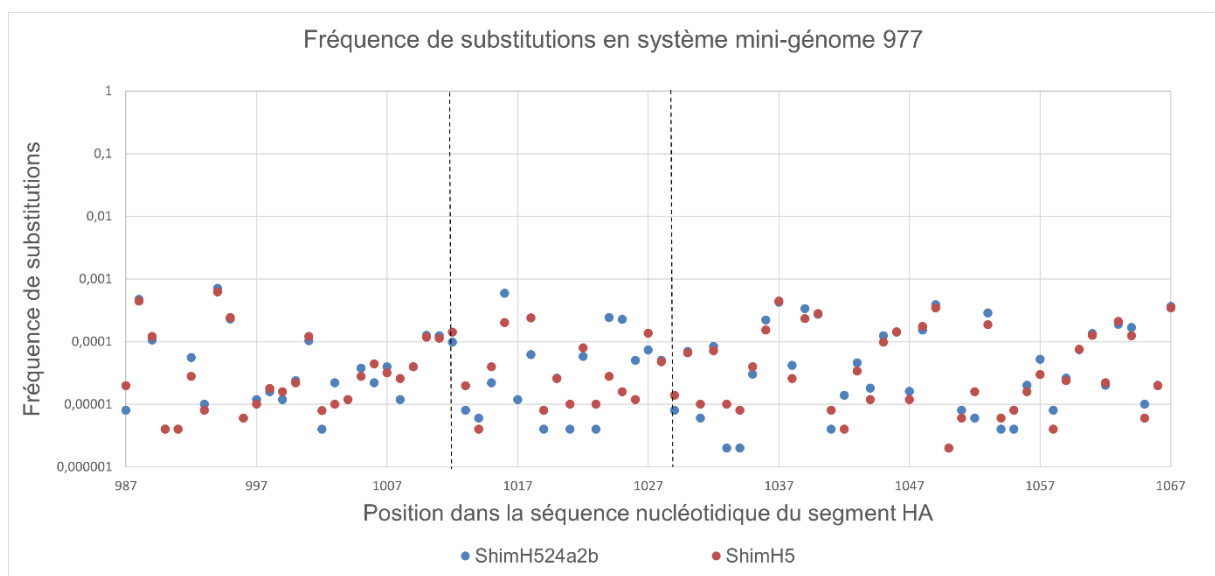
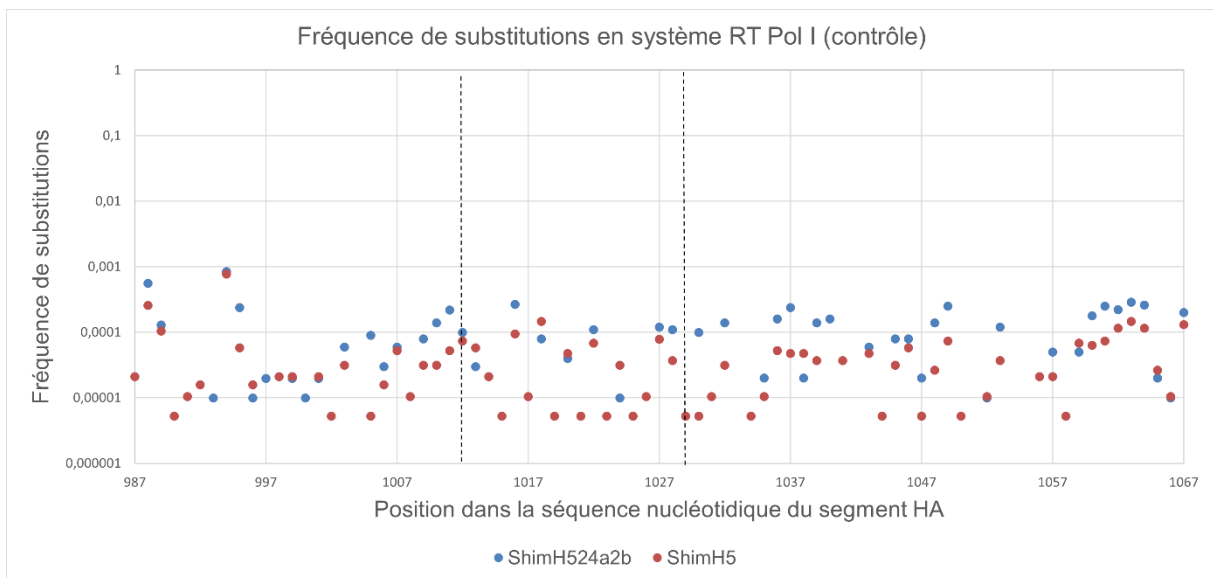
Quel que soit le système étudié, les positions 1014 et 1016 montrent des fréquences d'insertions de nucléotides significativement supérieures à la moyenne observée sur la séquence qui code pour le site de clivage (figure 34). Pour ShimH524a2b, ces deux positions représentent à elles seules de 97,1 à 99,3% (selon le système considéré, contrôle compris) du total des évènements d'insertion sur la séquence codant pour le site de clivage, alors que ce total varie de 13,6% à 63,4% pour ShimH5, selon le système étudié.

En position 1016, la fréquence d'insertions de nucléotides atteint 1,03% en système mini-génome 977, 5,68% en système mini-génome WSN, 7,58% en système DF1-977-PAHA et 7,90% en système MDCK-977-PAHA. Si on s'intéresse aux nucléotides insérés à cette position, on observe qu'il s'agit dans plus de 99% des cas de résidus adénines, et dans le reste des cas de résidus guanines. Pour 77% des

événements d'insertion à cette position, 1 seule adénine est insérée. Les 23% restants correspondent à l'insertion d'une suite d'adénines (2 adénines dans 12% des cas, 3 adénines dans 4% des cas, 4 adénines dans 3% des cas, 5 adénines dans 1% des cas, de 6 à 14 adénines dans le reste des cas) très rarement séparées de guanines.

En position 1014, la fréquence d'insertions atteint 1,19% en système mini-génome WSN, 1,33% en système DF1-977-PAHA et 1,85% en système MDCK-977-PAHA, mais seulement 0,04% en système mini-génome 977. Si on regarde plus particulièrement les nucléotides insérés à cette position, on observe qu'il s'agit systématiquement d'un doublon AG.

3.2. Évènements de substitutions de nucléotides



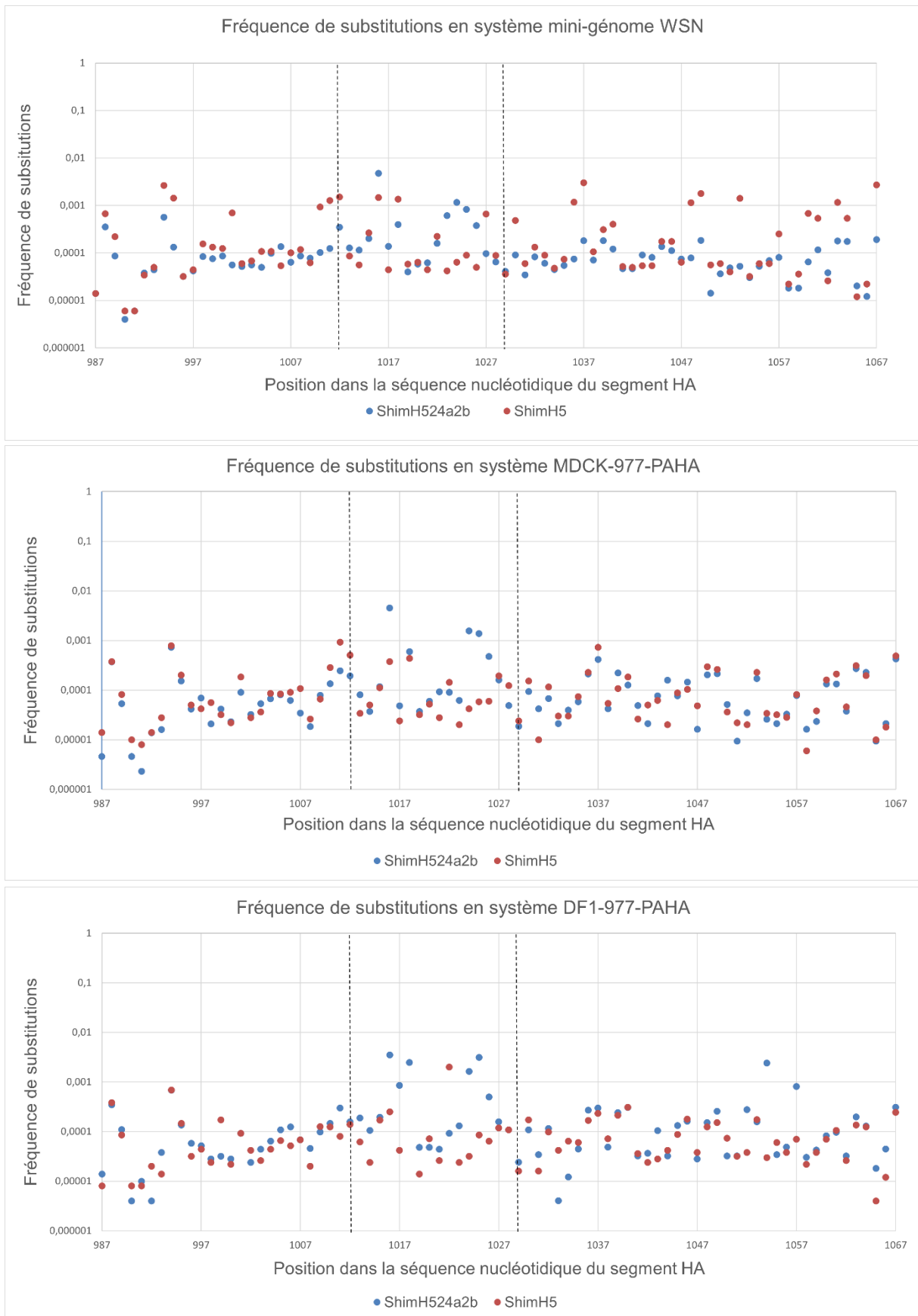


Figure 36 : Fréquence de substitutions de nucléotides en fonction de la position dans la séquence nucléotidique du segment HAShimH5 ou HAShimH524a2b, pour les systèmes RT Pol I, mini-génomme 977, mini-génomme WSN, MDCK-977-PAHA et DF1-977-PAHA.

Seules les valeurs non nulles sont représentées. Les traits pointillés verticaux délimitent le site de clivage.

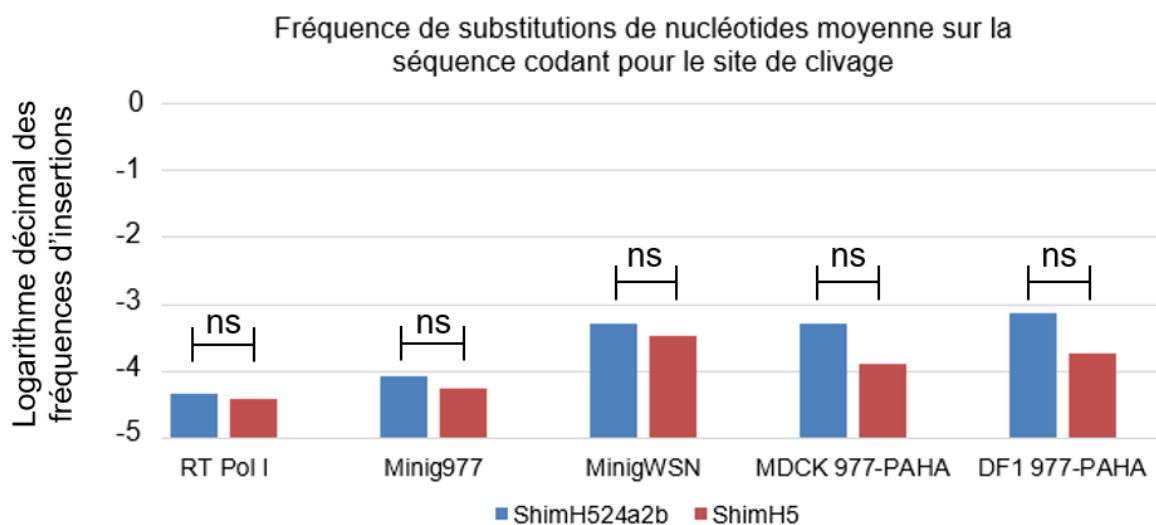


Figure 37 : Fréquence moyenne de substitutions de nucléotides entre les positions 1012 et 1029, en fonction du système et du segment HA étudié.

La mention « ns » signifie que les p-valeurs obtenues en comparant les moyennes par un test de Student sont supérieures à 0,05, et donc que ces moyennes ne sont pas significativement différentes

Les différents systèmes montrent tous un profil de substitutions plus homogène que pour les insertions (figure 36). Les fréquences de substitutions de nucléotides ne sont pas significativement différentes entre HShimH5 et HShimH524a2b dans les 5 systèmes (figure 37). Ces fréquences sont significativement supérieures pour les systèmes mini-génome WSN, MDCK 977-PAHA et DF1 977-PAHA par rapport au contrôle RT Pol I. Ces fréquences ne sont pas significativement différentes que l'on s'intéresse à la séquence 1012-1029 codant pour le site de clivage ou à la séquence 987-1067. De plus, elles correspondent à l'ordre de grandeur du taux d'erreur des ARN polymérases virales soit 10^{-4} .

Bien que la fréquence de substitutions de nucléotides ne soit pas significativement différente pour HShimH524a2b, certaines positions se démarquent car les événements de substitutions sont « polarisés », c'est-à-dire que les nucléotides obtenus après substitution ne sont pas également répartis avec un tiers des événements pour chaque nouveau nucléotide. En position 1016 par exemple, le nucléotide initial, qui est un résidu guanine, devient dans une grande majorité des cas un résidu adénine pour HShimH524a2b, soit de 81,5% à 98,4% selon le système considéré, alors que cette proportion varie de 8,8% à 36% pour HShimH5 (figure 38).

Proportion des évènements de substitutions conduisant à un résidu adénine en position 1016 (G)

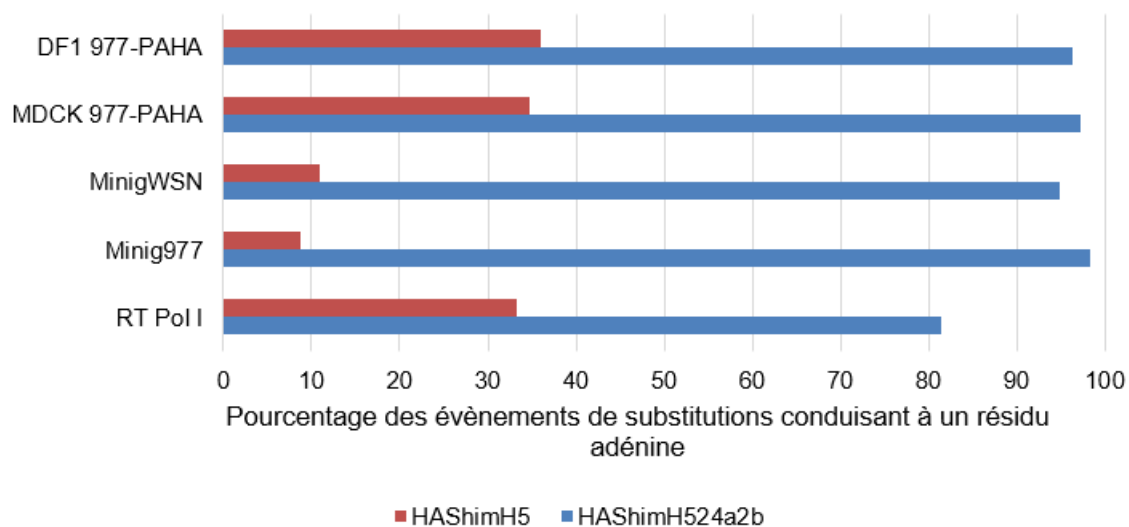
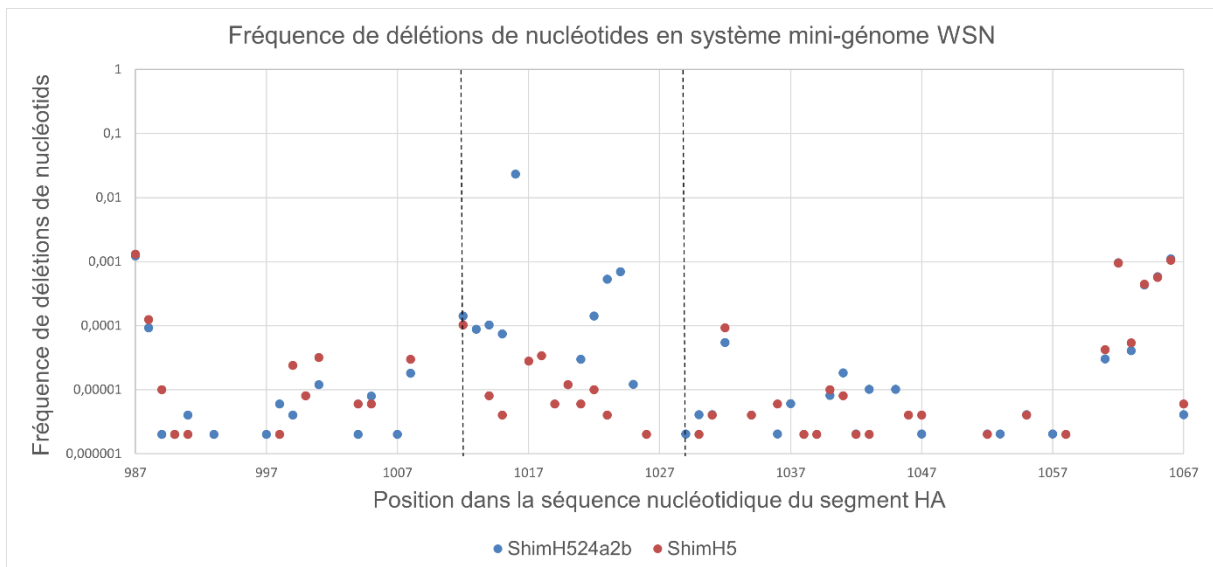
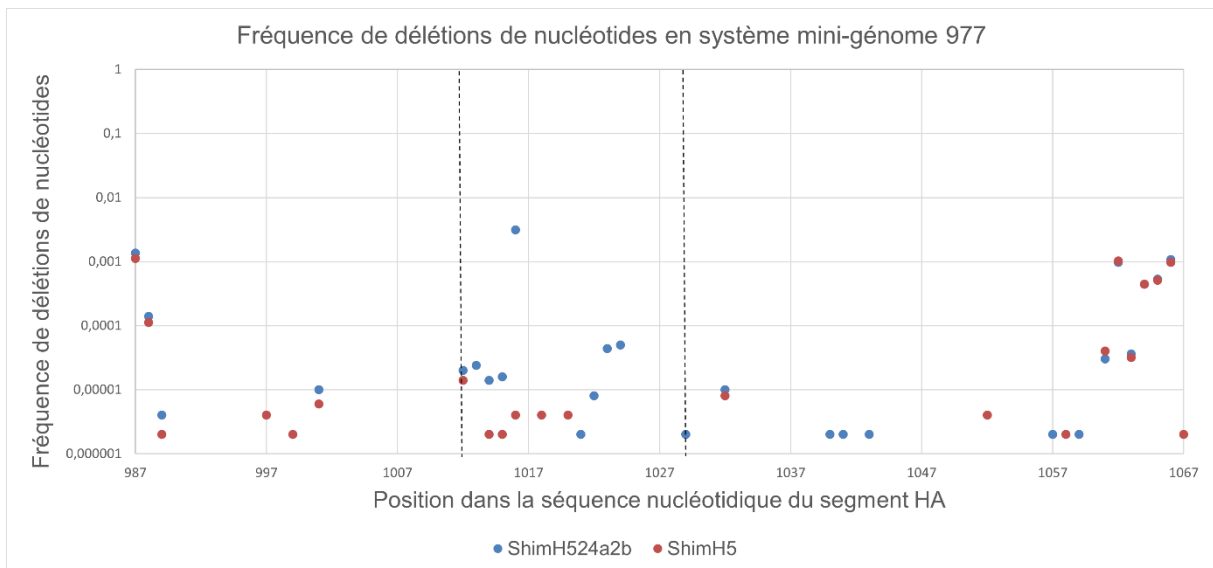
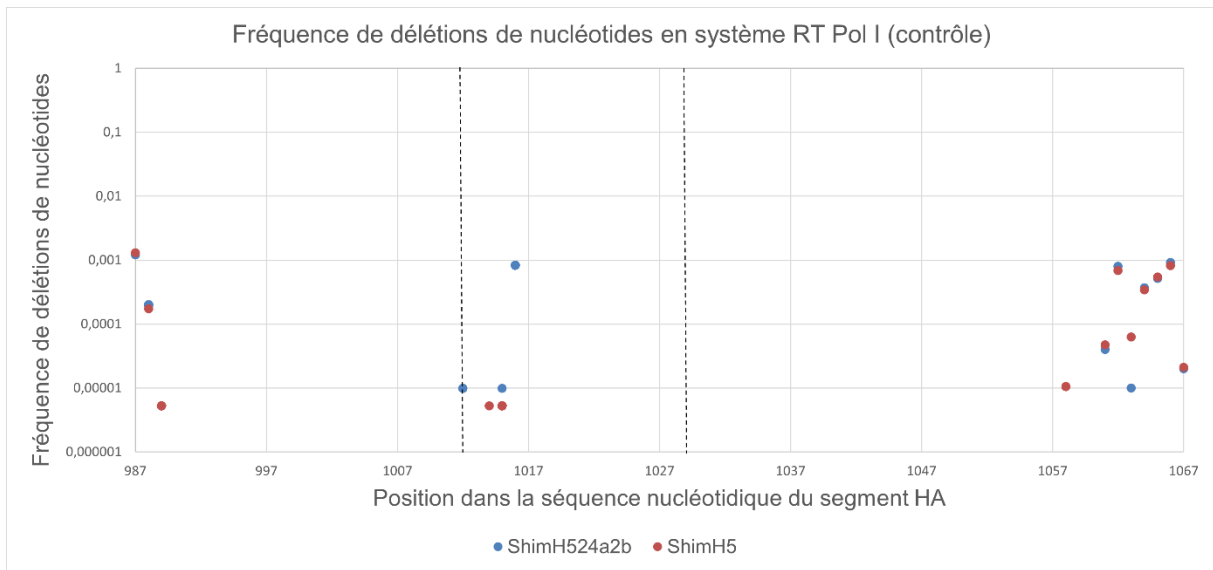


Figure 38 : Proportion des évènements de substitutions conduisant à un résidu adénine en position 1016, en fonction du système étudié, pour HShimH5 et HShimH524a2b

3.3 Évènements de délétions de nucléotides



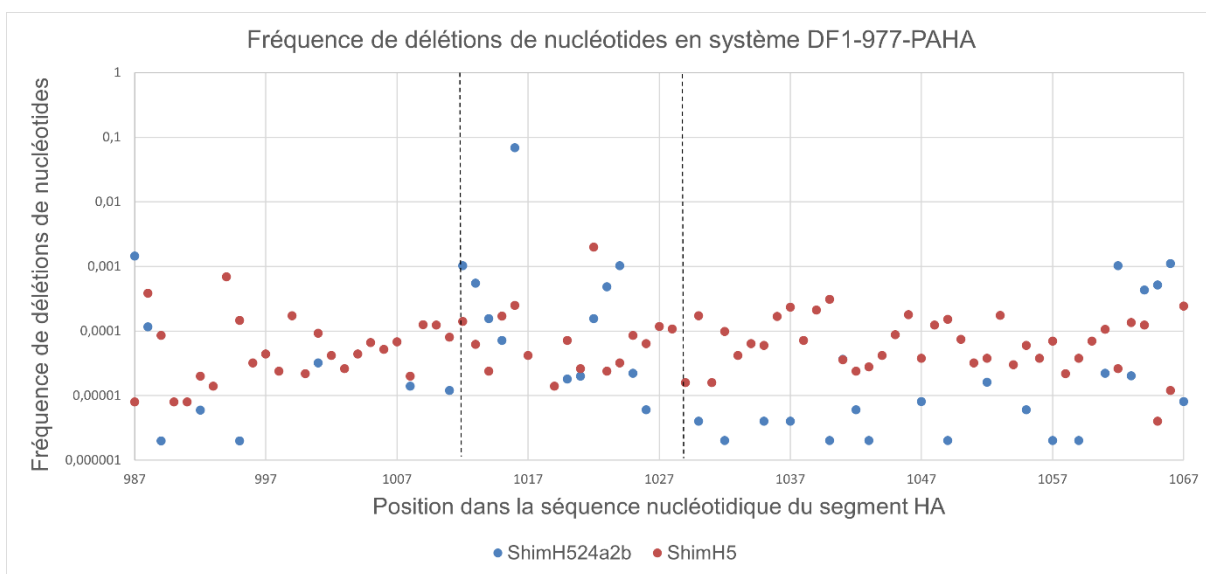
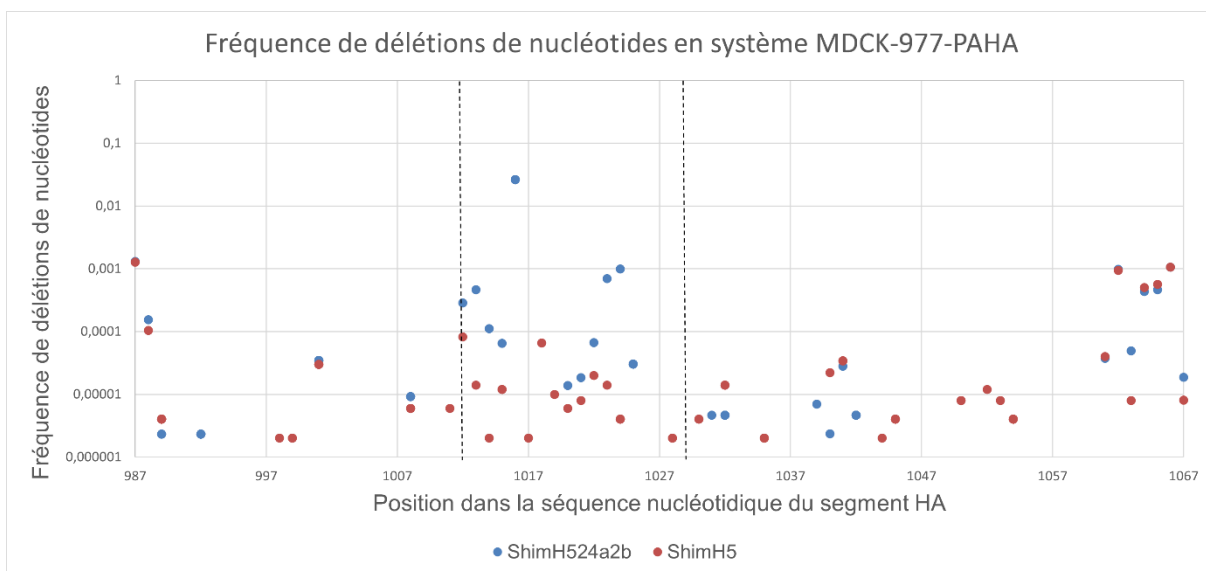


Figure 39 : Fréquence de délétions de nucléotides en fonction de la position dans la séquence nucléotidique du segment H_AShimH5 ou H_AShimH524a2b, pour les systèmes RT Pol I, mini-génome 977, mini-génome WSN, MDCK-977-PAHA et DF1-977-PAHA

Seules les valeurs non nulles sont représentées. Les traits pointillés verticaux délimitent le site de clivage

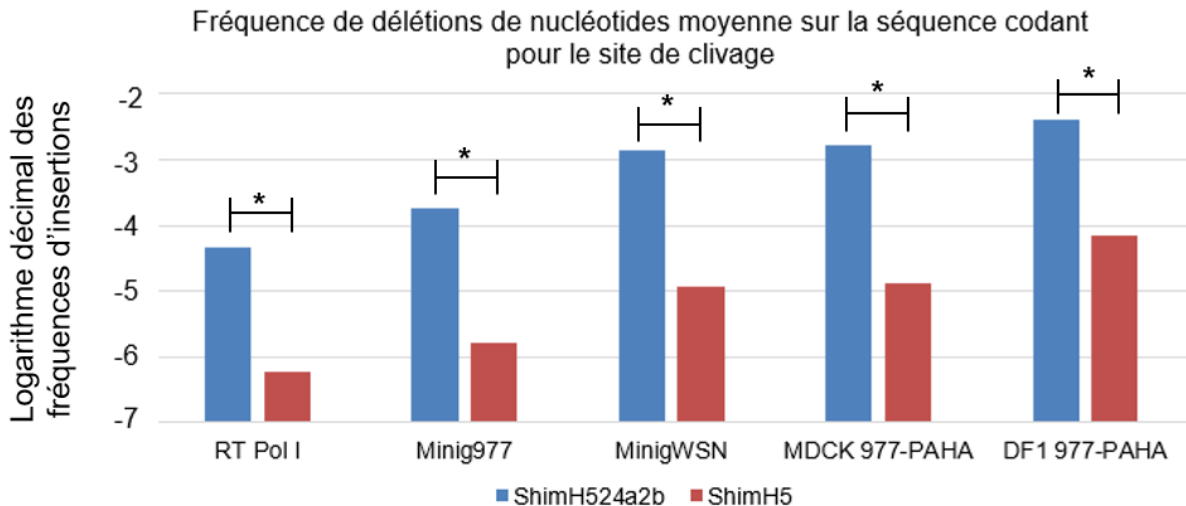


Figure 40 : Fréquence moyenne de délétions de nucléotides entre les positions 1012 et 1029, en fonction du système et du segment HA étudié.

La mention * signifie qu'un test de Student a montré que les moyennes comparées étaient significativement différentes.

Les fréquences de délétions de nucléotides observées sont, pour chaque système y compris le système contrôle, significativement supérieures pour ShimH524a2b par rapport à ShimH5 (Figure 40). Mais cette différence n'est pas significativement supérieure pour les 4 systèmes étudiés par rapport au système contrôle.

En position 1016 de la séquence nucléotidique, la fréquence de délétions de nucléotides est nettement supérieure à la fréquence moyenne observée sur le segment 1012-1029 quel que soit le système d'étude considéré. Cette fréquence atteint 0,5% pour le système mini-génome 977, 2,3% pour le système mini-génome WSN, 2,6% pour le système MDCK 977-PAHA et 6,9% pour le système DF1 977-PAHA.

III. Discussion

A. Contexte économique et sanitaire

La lutte contre les épizooties à virus Influenza aviaries hautement pathogènes représente à la fois un enjeu économique et de santé animale et humaine. La viande de volaille est en 2020 la viande la plus produite et consommée avec près de 130 millions de tonnes chaque année dans le monde. Les 4 plus gros producteurs mondiaux sont les Etats-Unis, la Chine, le Brésil et l'Union Européenne (avec notamment, la Pologne, l'Espagne, la France et l'Allemagne). En France, la fréquence et la gravité des épizooties à VIAHP augmente depuis 2015. Alors que l'épizootie de l'hiver 2016-2017 avait touché principalement des élevages situés dans le Sud-Ouest du pays (Gers, Landes, Pyrénées Atlantiques) et mené à l'abattage de 6,8 millions de volailles (Guinat et al. 2018), 21,8 millions d'animaux ont été abattus entre Août 2021 et Mai 2022 (Influenza aviaire : la situation en France [18 novembre 2022]) et les foyers se sont étendus au Grand Ouest (Deux-Sèvres, Maine-et-Loire, Loire-Atlantique, Vendée). Ces épisodes causent des pertes économiques majeures pour l'industrie de la volaille Française, de l'ordre de plusieurs centaines de millions d'euros chaque année. Plusieurs mesures de biosécurité sont mises en place chaque année pour contenir l'apparition de ces foyers, telles que l'abattage des foyers et l'abattage préventif des animaux dans un périmètre défini par arrêté préfectoral, le nettoyage et la désinfection des foyers, et l'interdiction des mouvements de volailles dans des zones de protection (ZP) et des zones de surveillance (ZS) définies autour des foyers. Mais ces mesures ne suffisent pas et le nombre de foyers augmente chaque année, principalement dans des régions où la densité d'élevage est très élevée.

Ces épizooties représentent également un risque pour la santé humaine puisque le virus a un potentiel zoonotique. Les infections humaines par des virus aviaries étaient considérées comme bénignes et un seul décès avait été notifié jusqu'à la survenue en 1997 à Hong Kong de 18 cas humains dont 6 décès après une épizootie VIAHP dûe au virus A/Goose/Guangdong/1/96 de sous-type H5N1 (Chan 2002). Les infections humaines se sont succédé après la réapparition de ce virus en 2003 et la survenue d'une panzootie. Le virus a depuis évolué en 10 clades phylogénétiques HA et des dizaines de sous-clades (Smith et al. 2015). En 2016 les virus de clade 2.3.4.4.b

se sont répandus de l'Asie à l'Europe et à l'Afrique et y ont dévasté l'industrie de la volaille (Lee et al. 2017). Des études récentes montrent que les virus H5N8 de clade 2.3.4.4.b responsables des récents épisodes d'épizooties hivernales en Europe sont zoonotiques mais les personnes recensées infectées n'ont pas présenté de symptôme (Pyankova et al. 2021). La quasi-totalité des infections humaines à VIAHP est liée à un contact direct avec les oiseaux contaminés et la transmission interhumaine reste limitée à quelques cas isolés. Si un VIAHP parvient à s'adapter suffisamment à l'être humain pour permettre une transmission interhumaine, cela provoquera très probablement une pandémie sans précédent. Limiter la propagation des VIAHP chez la volaille d'élevage permet de réduire la probabilité que ces virus franchissent la barrière d'espèce et se transmettent d'homme à homme (Js et al. 2004).

Ainsi, ce travail s'inscrit dans un projet qui vise à mieux comprendre l'évolution des VIAs pour ensuite tenter de limiter leur propagation et donc d'en réduire les conséquences économiques et sanitaires. Il a consisté à analyser le taux de mutations de l'hémagglutinine et en particulier de la séquence entourant le site de clivage pour pouvoir mieux comprendre l'émergence des VIAHP. Nous avons dans un premier temps tenté de produire des méthodes d'analyse des mutations de l'hémagglutinine des VIAs, et dans un second temps nous avons utilisé ces méthodes pour effectivement analyser le profil de mutations de l'hémagglutinine via un séquençage haut débit des ARNv produits par ces méthodes, et comparer les différents résultats obtenus.

B. Production de méthodes d'analyse des mutations de HA

1. Système PA-HA

Tout d'abord ce travail a consisté à tenter de produire une méthode d'analyse des mutations de HA permettant de s'affranchir de la pression de sélection pour pouvoir observer toutes les mutations apparues lors de plusieurs cycles de réplication virale et non pas seulement celles qui sont sélectionnées car conférant un avantage au virus. Pour cela, le but était de produire par un protocole de génétique inverse un VIA recombinant comportant un transgène codant pour l'hémagglutinine du virus H3N2 A/Udorn/307/1972 (Udorn), inséré après le segment PA du virus A/Puerto Rico/8/1934 (PR8).

Ce travail a permis la construction d'un plasmide contenant la séquence d'ADN codant pour le segment PA du virus H1N1(PR8) suivie d'un transgène codant pour le segment HA du virus H3N2(Udorn) mais le protocole de génétique inverse n'a cependant pas permis la production du VIA recombinant. Cela suggère que la construction PA-PR8-HA-Udorn n'est pas suffisamment stable pour permettre une réplication correcte du virus. Des travaux réalisés par Hou et al. avaient pourtant permis en 2018 l'insertion de la séquence codant pour le peptide HA1 du VIAHP A/chicken/Jiangsu/7/2017, longue de 978 nt, dans le génome d'un virus PR8 mais ce transgène avait été inséré dans le segment NS entre la SCD de NS1 et la SCD de NEP, et non pas après le segment PA comme dans notre travail (Hou et al. 2018).

Des travaux de l'équipe UMR 1225 IHAP ont permis pour la première fois l'insertion de séquences HA-X d'environ 1700 nucléotides à la suite des segments PA et NS du virus H7N1(977) et la production de virus recombinants contenant ces transgènes (Pascolo 2021). Les virus PA-977-HAShimH5 et PA-977-HAShimH524a2b ont été produits et répliqués par l'équipe UMR 1225 IHAP, dans des cellules de mammifères MDCK et aviaires DF1. Les ARNv produits ont été extraits et séquencés par la méthode de séquençage haut débit Illumina. Les données de séquençage nous ont été fournies par l'équipe et analysées. Ces 2 conditions expérimentales ont été appelées systèmes MDCK 977-PAHA et DF1 977-PAHA.

2. Système mini-génome

Dans un deuxième temps l'objectif de notre travail a été de produire une autre méthode d'analyse des mutations de HA permettant elle aussi de se placer dans un contexte où la pression de sélection est absente. Cette deuxième méthode consiste à reproduire par un protocole de génétique inverse le complexe polymérase d'un VIA pour répliquer la séquence HA d'un autre VIA. Cette méthode appelée mini-génome a déjà été produite et utilisée dans d'autres études sur des VIAs (Neumann, Hobom 1995) (Isel et al. 2020).

Notre travail a d'abord permis de produire 4 plasmides phw2000 contenant les 4 segments (PA, PB1, PB2, NP) codant pour le complexe polymérase du virus H7N1(977), délétés pour le promoteur Pol I, à l'exception du plasmide phw2000-977-PB1 pour lequel l'étape de délétion de Pol I par mutagénèse dirigée n'a pas permis la

production de clones correctement délétés et suffisamment concentrés (au moins 100 ng/ μ L d'ADN pour les autres segments), et ce malgré l'utilisation d'un traitement au chloramphénicol. Nous avons également produit 5 plasmides phw2000-HAShimH5, phw2000-HAShimH524a2b, phw2000-HAH5N8LP, phw2000-HAH5N8mut1 et phw2000-HAH5N8mut2 délétés pour le promoteur Pol II, afin d'éviter l'expression de la protéine HA lors de l'utilisation du système mini-génome, et donc sa toxicité pour les cellules dans lesquelles la transfection est réalisée.

Puis notre système mini-génome H7N1(977) ainsi que le système mini-génome H1N1(WSN), fourni par l'équipe UMR 1225 IHAP, ont été transfectés avec des plasmides codant pour des luciférases. Des mesures de luminescence après transfection, lyse cellulaire et réaction luciférase ont permis de constater que ces deux systèmes mini-génome permettaient la réplication de la séquence comprise dans le plasmide avec lequel ils avaient été transfectés et étaient donc fonctionnels. Par ailleurs, les mesures de luminescence réalisées suggèrent que le système mini-génome WSN permettait, à conditions initiales égales, de produire plus d'ARNv que le système mini-génome 977.

Ces deux systèmes ont ensuite été transfectés avec les plasmides phw2000-HAShimH5-del-Pol-II et phw2000-HAShimH524a2-del-Pol-II. Les ARNv produits ont été extraits et soumis à un protocole de RT-qPCR utilisant la technologie SYBR™. Ce protocole a permis de quantifier les quantités d'ARNv initialement produites par les systèmes mini-génome et montré que le système mini-génome WSN avait produit significativement plus d'ARNv que le système mini-génome 977, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus lors des mesures de luminescence. Les ARNv produits par ces deux systèmes ont ensuite été séquencés par la méthode de séquençage haut débit Illumina®.

C. Séquençage haut débit et comparaison de ces méthodes

Les séquences produites par 5 systèmes différents, à savoir MDCK 977-PAHA, DF1 977-PAHA, mini-génome 977, mini-génome WSN, et RT Pol I (qui constitue notre contrôle) et pour 2 conditions différentes HShimH5 et HShimH524a2b ont ensuite été modifiées pour préparer des bibliothèques de séquençage. En effet, une transcription inverse spécifique et plusieurs PCR différentes ont été effectuées pour ajouter des séquences spécifiques indispensables au séquençage haut débit. En particulier, l'ajout des « barcodes », qui sont des séquences de 8 nucléotides aléatoires ajoutées à chaque extrémité des inserts d'ADN à séquencer augmente la fiabilité du séquençage en ajoutant une étape de relecture permettant de distinguer les mutations des erreurs de séquençage, s'appuie sur une étude de *Doud et al.* en 2016.

On rappelle que les deux séquences étudiées, HShimH5 et HShimH524a2b diffèrent par deux mutations aux positions 1018 (G→A) et 1022 (C→A), permettant une suite de 8 résidus adénine consécutifs et la formation d'une structure tige-boucle au niveau du site de clivage.

Les résultats montrent que les fréquences moyennes d'insertions de nucléotides sont significativement plus élevées pour ShimH524a2b que pour ShimH5, pour chacun des 5 systèmes. La différence de fréquence d'insertion moyenne entre ShimH524a2b et ShimH5 est significativement plus élevée pour les systèmes PA-HA et mini-génome par rapport au système contrôle RT Pol I, suggérant une implication importante de la polymérase virale dans ce taux d'erreur. Cela signifie que de légères modifications de la séquence nucléotidique et potentiellement de la structure secondaire de l'ARN dans la région concernée ont des répercussions majeures sur le glissement de la polymérase virale et sur son taux d'erreur dans cette région. Ces résultats avaient déjà été obtenus par l'équipe UMR 1225 IHAP mais l'obtention de résultats similaires par 4 systèmes d'études différents vient renforcer leur cohérence et montre que nous avons trouvé plusieurs conditions expérimentales différentes qui permettent d'obtenir des résultats importants pour ce projet. La fréquence moyenne d'insertions est également plus élevée pour ShimH524a2b en système RT-Pol I. Cela montre que la séquence nucléotidique a également une influence sur la polymérase cellulaire et que n'importe quelle ARN polymérase est susceptible de faire ce type d'erreurs.

Les positions 1014 et 1016 ont retenu notre attention puisque les évènements d'insertions ayant eu lieu sur ces deux positions représentent la quasi-totalité des évènements d'insertions sur la séquence codant pour le site de clivage de HAAshimHA24a2b. De plus, les nucléotides insérés dans ces positions sont dans une écrasante majorité des cas des suites de résidus adénine, parfois séparés par un résidu guanine. En ne considérant que les évènements qui ne modifient pas le cadre de lecture, ces évènements amènent majoritairement à l'insertion d'un ou plusieurs codons codant pour des acides aminés basiques, que sont la lysine (AAA, AAG) et l'arginine (AGA), et très rarement à l'insertion d'un codon codant pour un acide glutamique (GAA). Cela suggère que non seulement la séquence nucléotidique a une influence sur le taux d'erreur de la polymérase virale mais également sur les nucléotides insérés, et ainsi qu'un environnement « basique » (codant pour des acides aminés basiques donc riche en résidus adénines) dans la séquence codant pour le site de clivage de HA aura tendance à devenir de plus en plus basique, permettant ainsi l'obtention d'un SCPB et la possibilité pour les VIAs de se répliquer en l'absence de trypsine.

Les fréquences moyennes de substitutions sont équivalentes pour HAAshimH5 et HAAshimH524a2b, quel que soit le système pris en compte. Ces fréquences sont similaires sur la séquence codant pour le site de clivage et sur la séquence de 80 nucléotides qui l'entoure, et elles sont de l'ordre de grandeur du taux de mutation des VIAs décrit dans la littérature scientifique (Pauly et al. 2017).

Les fréquences moyennes de délétions sont significativement supérieures pour HAAshimH524a2b, quel que soit le système considéré. Ces fréquences ne sont pas significativement supérieures pour les systèmes PA-HA et mini-génome par rapport au système contrôle, ce qui suggère que la polymérase cellulaire est grandement impliquée dans ces erreurs supplémentaires. Ces fréquences sont également similaires sur la séquence codant pour le site de clivage et sur la séquence de 80 nucléotides qui l'entoure.

Alors que le résidu guanine situé en position 1016 est entouré de 3 résidus adénines en 5' et 8 résidus adénine en 3' pour HAAshimH524a2b, les résultats obtenus pour les évènements de substitutions et de délétions montrent par ailleurs une

tendance à allonger cet enchaînement de résidus adénine. L'évènement de substitution le plus fréquent pour ShimH524a2b a lieu en position 1016 et dépasse la fréquence moyenne de substitutions sur la séquence étudiée. Le résidu guanine à cette position est remplacé presque systématiquement par un résidu adénine. De la même façon, la fréquence de délétions à cette position dépasse largement la fréquence de délétions moyenne sur la séquence codant pour le site de clivage, et cette délétion permet également un enchaînement de 11 résidus adénine, même si elle entraîne un décalage du cadre de lecture.

Certaines interprétations sont cependant à nuancer. En effet, il n'est pas rigoureusement correct de comparer les taux de mutation obtenus entre les différents systèmes du fait des différences de quantités d'ARN produites. Comme nous l'avons observé plus tôt, les systèmes mini-génome 977 et WSN produisent des niveaux d'ARN différents (environ 10 fois plus d'ARNv pour le mini-génome WSN). Pour obtenir la même quantité de matériel génétique pour réaliser le séquençage, un volume plus important d'ARNv produit par le mini-génome 977 devra être utilisé, mais ce volume comprend une part d'ARN produit par la polymérase virale bien moins important. Ainsi, à volume d'ARN équivalent, on peut s'attendre à des taux de mutation plus élevés pour le système mini-génome WSN, et c'est ce qui est observé. Nous ne devrions idéalement comparer les fréquences de mutation que lorsque les quantités d'ARNv sont équivalentes, donc pour un même système comparer entre ShimH524a2b et ShimH5 et pas entre plusieurs systèmes. Ces comparaisons ont été faites plusieurs fois dans cette discussion mais en gardant en mémoire qu'elles peuvent être biaisées par le fait que les quantités d'ARNv initiales sont différentes.

Notre travail a montré que la séquence nucléotidique exerçait une influence sur les taux d'insertions et de délétions des polymérases virale et cellulaire et suggère également que cette séquence a un effet sur le type d'erreur commis par ces polymérases. Ces évènements d'insertions et de délétions proviennent de mouvements de « back and forth » des polymérases. En effet, les ARN polymérases réalisent des allers-retours le long de l'ARN au cours desquels elles passent d'un état inactivé à un état activé (Komissarova, Kashlev 1997). C'est au cours de ces glissements que les polymérases commettent des erreurs.

Une récente étude japonaise a démontré que la présence d'une structure tige-boucle et d'une suite de résidus adénine au niveau de la séquence codant pour le site de clivage de HA étaient des éléments déterminants pour l'émergence de VIAHP de sous-type H5 dans la nature (Kida et al. 2021). L'enjeu est désormais de comprendre qui de la séquence primaire ARN ou de la structure secondaire joue le rôle le plus important dans l'obtention du SCPB. L'équipe UMR 1225 IHAP porte un grand intérêt à cette question. L'objectif à moyen terme est de pouvoir prédire sur la base de leurs séquences ARN quels sont les VIAFP qui ont le plus de chance d'évoluer vers des VIAHP.

Conclusion

Les VIAs, et en particulier les VIAHPs, représentent des enjeux sanitaires et économiques majeurs du XXIème siècle. Il n'est pour l'instant pas possible de prédire précisément les évènements d'émergence de VIAHP même si nous savons d'ores et déjà que ces évènements nécessitent l'obtention d'un SCPB. L'objectif du projet RISKEVOL est d'analyser dans quelle mesure et par quels mécanismes la séquence nucléotidique de HA pourrait influencer l'acquisition d'un SCPB et donc l'évolution vers un VIAHP. Ce travail s'inscrit dans ce projet. Il a permis la création d'un système permettant d'étudier *in vitro* le taux de mutations de la séquence HA des VIAs, le système mini-génome H7N1(977). Ce système consiste à transférer dans des cellules 4 plasmides codant pour les 4 segments du complexe polymérase du virus H7N1(977), avec un plasmide codant pour le segment HA à étudier. Une fois reconstitué par la machinerie cellulaire, le complexe polymérase viral peut répliquer massivement ce dernier plasmide, et produire des ARNv qui vont accumuler des mutations. Cette méthode se place dans un contexte sans pression de sélection puisqu'aucune particule virale n'est reconstituée. Elle représente un outil supplémentaire dans l'étude du taux de mutations des séquences HA. Ce système a été utilisé avec les séquences HA des virus ShimH5 et ShimH524a2b, qui varient par 2 mutations au niveau du site de clivage de HA. Les ARNv produits ont été extraits et séquencés par la méthode de séquençage haut débit Illumina®, avec notamment une étape de relecture supplémentaire améliorant la précision du séquençage, par l'ajout de « barcodes ». Les résultats obtenus ont été confrontés avec ceux mis en évidence par d'autres méthodes que sont les systèmes MDCK 977-PAHA, DF1 977-PAHA, et mini-génome WSN, déjà produits par l'équipe UMR 1225 IHAP. Ils convergent vers un résultat déjà obtenu par l'équipe : la séquence nucléotidique exerce une influence sur le taux d'erreur de la polymérase virale. Ce résultat est très important pour la recherche dans ce domaine et pourra être complété par l'analyse d'autres séquences HA par les méthodes produites par l'équipe. Ces recherches ont pour but d'arriver à prédire, sur la base de la séquence ARN qui entoure le site de clivage, les VIAFP plus susceptibles d'évoluer en VIAHP, pour ainsi mieux anticiper et combattre les épisodes d'épizooties à VIAHP.

Bibliographie

ABDELWHAB, El-Sayed M., VEITS, Jutta, TAUSCHER, Kerstin, ZILLER, Mario, GRUND, Christian, HASSAN, Mohamed K., SHAHEEN, Momtaz, HARDER, Timm C., TEIFKE, Jens, STECH, Jürgen et METTENLEITER, Thomas C., 2016. Progressive glycosylation of the haemagglutinin of avian influenza H5N1 modulates virus replication, virulence and chicken-to-chicken transmission without significant impact on antigenic drift. *The Journal of General Virology*. décembre 2016. Vol. 97, n° 12, pp. 3193-3204. DOI 10.1099/jgv.0.000648.

AIR, G. M., LAVER, W. G. et WEBSTER, R. G., 1987. Antigenic variation in influenza viruses. *Contributions to Microbiology and Immunology*. 1987. Vol. 8, pp. 20-59.

BANCROFT, Christa T. et PARSLOW, Tristram G., 2002. Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza A virus genome. *Journal of Virology*. juillet 2002. Vol. 76, n° 14, pp. 7133-7139. DOI 10.1128/jvi.76.14.7133-7139.2002.

BARR, Ian G., RUSSELL, Colin, BESSELAAR, Terry G., COX, Nancy J., DANIELS, Rod S., DONIS, Ruben, ENGELHARDT, Othmar G., GROHMANN, Gary, ITAMURA, Shigeyuki, KELSO, Anne, MCCAULEY, John, ODAGIRI, Takato, SCHULTZ-CHERRY, Stacey, SHU, Yuelong, SMITH, Derek, TASHIRO, Masato, WANG, Dayan, WEBBY, Richard, XU, Xiyang, YE, Zhiping, ZHANG, Wenqing, et WRITING COMMITTEE OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION CONSULTATION ON NORTHERN HEMISPHERE INFLUENZA VACCINE COMPOSITION FOR 2013–2014, 2014. WHO recommendations for the viruses used in the 2013-2014 Northern Hemisphere influenza vaccine: Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from October 2012 to January 2013. *Vaccine*. 20 août 2014. Vol. 32, n° 37, pp. 4713-4725. DOI 10.1016/j.vaccine.2014.02.014.

BEARE, A. S. et WEBSTER, R. G., 1991. Replication of avian influenza viruses in humans. *Archives of Virology*. 1991. Vol. 119, n° 1-2, pp. 37-42. DOI 10.1007/BF01314321.

BECKER, W. B., 1966. The isolation and classification of Tern virus: influenza A-Tern South Africa--1961. *The Journal of Hygiene*. septembre 1966. Vol. 64, n° 3, pp. 309-320.

BEDFORD, Trevor, SUCHARD, Marc A, LEMEY, Philippe, DUDAS, Gytis, GREGORY, Victoria, HAY, Alan J, MCCAULEY, John W, RUSSELL, Colin A, SMITH, Derek J et RAMBAUT, Andrew, 2014. Integrating influenza antigenic dynamics with molecular evolution. LOSICK, Richard (éd.), *eLife*. 4 février 2014. Vol. 3, pp. e01914. DOI 10.7554/eLife.01914.

BOSCH, F. X., GARTEN, W., KLENK, H. -D. et ROTT, R., 1981. Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins: primary structure of the connecting

peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability and pathogenicity of avian influenza viruses. *Virology*. 1 septembre 1981. Vol. 113, n° 2, pp. 725-735. DOI 10.1016/0042-6822(81)90201-4.

BOUVIER, Nicole M. et PALESE, Peter, 2008. THE BIOLOGY OF INFLUENZA VIRUSES. *Vaccine*. 12 septembre 2008. Vol. 26, n° Suppl 4, pp. D49-D53.

BRIAND, François-Xavier, SCHMITZ, Audrey, OGOR, Katell, LE PRIOUX, Aurélie, GUILLOU-CLOAREC, Cécile, GUILLEMOTO, Carole, ALLÉE, Chantal, LE BRAS, Marie-Odile, HIRCHAUD, Edouard, QUENAULT, Hélène, TOUZAIN, Fabrice, CHERBONNEL-PANSART, Martine, LEMAITRE, Evelyne, COURTILLON, Céline, GARES, Hélène, DANIEL, Patrick, FEDIAEVSKY, Alexandre, MASSIN, Pascale, BLANCHARD, Yannick, ETERRADOSSI, Nicolas, VAN DER WERF, Sylvie, JESTIN, Véronique et NIQUEUX, Eric, 2017. Emerging highly pathogenic H5 avian influenza viruses in France during winter 2015/16: phylogenetic analyses and markers for zoonotic potential. *Euro Surveillace: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*. 2 mars 2017. Vol. 22, n° 9, pp. 30473. DOI 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.9.30473.

CAPUA, I. et MARANGON, S., 2000. The avian influenza epidemic in Italy, 1999-2000: a review. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.* août 2000. Vol. 29, n° 4, pp. 289-294. DOI 10.1080/03079450050118403.

CHAN, Paul K. S., 2002. Outbreak of avian influenza A(H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1 mai 2002. Vol. 34 Suppl 2, pp. S58-64. DOI 10.1086/338820.

CHEN, Rubing et HOLMES, Edward C., 2008. The evolutionary dynamics of human influenza B virus. *Journal of Molecular Evolution*. juin 2008. Vol. 66, n° 6, pp. 655-663. DOI 10.1007/s00239-008-9119-z.

COLMAN, P. M. et WARD, C. W., 1985. Structure and diversity of influenza virus neuraminidase. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 1985. Vol. 114, pp. 177-255. DOI 10.1007/978-3-642-70227-3_5.

CORFIELD, Anthony P., HIGA, Herman, PAULSON, James C. et SCHAUER, Roland, 1983. The specificity of viral and bacterial sialidases for $\alpha(2-3)$ - and $\alpha(2-6)$ -linked sialic acids in glycoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 28 avril 1983. Vol. 744, n° 2, pp. 121-126. DOI 10.1016/0167-4838(83)90080-8.

COUCEIRO, J. N., PAULSON, J. C. et BAUM, L. G., 1993. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Research*. août 1993. Vol. 29, n° 2, pp. 155-165. DOI 10.1016/0168-1702(93)90056-s.

CROS, Jerome F. et PALESE, Peter, 2003. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus*

Research. septembre 2003. Vol. 95, n° 1-2, pp. 3-12. DOI 10.1016/s0168-1702(03)00159-x.

DANIELS, Rodney S., TSE, Herman, ERMETAL, Burcu, XIANG, Zheng, JACKSON, Deborah J., GUNTORO, Jeremy, NICOD, Jérôme, STEWART, Aengus, CROSS, Karen J., HUSSAIN, Saira, MCCAULEY, John W. et LO, Janice, 2020. Molecular Characterization of Influenza C Viruses from Outbreaks in Hong Kong SAR, China. *Journal of Virology* [en ligne]. 19 août 2020. [Consulté le 6 janvier 2022]. DOI 10.1128/JVI.01051-20. Disponible à l'adresse : <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/JVI.01051-201752> N St., N.W., Washington, DC

DE WIT, Emmie, MUNSTER, Vincent J., VAN RIEL, Debby, BEYER, Walter E. P., RIMMELZWAAN, Guus F., KUIKEN, Thijs, OSTERHAUS, Albert D. M. E. et FOUCHIER, Ron A. M., 2010. Molecular determinants of adaptation of highly pathogenic avian influenza H7N7 viruses to efficient replication in the human host. *Journal of Virology*. février 2010. Vol. 84, n° 3, pp. 1597-1606. DOI 10.1128/JVI.01783-09.

DOUD, Michael B. et BLOOM, Jesse D., 2016. Accurate Measurement of the Effects of All Amino-Acid Mutations on Influenza Hemagglutinin. *Viruses*. juin 2016. Vol. 8, n° 6, pp. 155. DOI 10.3390/v8060155.

DUBOIS, Rebecca M., ZARAKET, Hassan, REDDIVARI, Muralidhar, HEATH, Richard J., WHITE, Stephen W. et RUSSELL, Charles J., 2011. Acid Stability of the Hemagglutinin Protein Regulates H5N1 Influenza Virus Pathogenicity. *PLoS Pathogens*. 1 décembre 2011. Vol. 7, n° 12, pp. e1002398. DOI 10.1371/journal.ppat.1002398.

EFSA PANEL ON ANIMAL HEALTH AND WELFARE (AHAW), MORE, Simon, BICOUT, Dominique, BØTNER, Anette, BUTTERWORTH, Andrew, CALISTRÌ, Paolo, DEPNER, Klaus, EDWARDS, Sandra, GARIN-BASTUJI, Bruno, GOOD, Margaret, GORTÁZAR SCHMIDT, Christian, MICHEL, Virginie, MIRANDA, Miguel Angel, NIELSEN, Søren Saxmose, RAJ, Mohan, SIHVONEN, Liisa, SPOOLDER, Hans, THULKE, Hans-Hermann, VELARDE, Antonio, WILLEBERG, Preben, WINCKLER, Christoph, BREED, Andrew, BROUWER, Adam, GUILLEMAIN, Matthieu, HARDER, Timm, MONNE, Isabella, ROBERTS, Helen, BALDINELLI, Francesca, BARRUCCI, Federica, FABRIS, Chiara, MARTINO, Laura, MOSBACH-SCHULZ, Olaf, VERDONCK, Frank, MORGADO, Joana et STEGEMAN, Jan Arend, 2017. Avian influenza. *EFSA Journal* [en ligne]. octobre 2017. Vol. 15, n° 10. [Consulté le 9 décembre 2021]. DOI 10.2903/j.efsa.2017.4991. Disponible à l'adresse : <https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2017.4991>

ERASMUS MEDICAL CENTRE (NL), ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLE VENEZIE (IT), RICHARD, Mathilde, FOUCHIER, Ron, MONNE, Isabella et KUIKEN, Thijs, 2017. Mechanisms and risk factors for mutation from low to highly pathogenic avian influenza virus. *EFSA Supporting Publications* [en ligne]. octobre 2017. Vol. 14, n° 10. [Consulté le 9 décembre 2021]. DOI 10.2903/sp.efsa.2017.EN-1287. Disponible à l'adresse : <https://data.europa.eu/doi/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1287>

FORREST, Heather L. et WEBSTER, Robert G., 2010. Perspectives on influenza evolution and the role of research. *Animal Health Research Reviews*. juin 2010. Vol. 11, n° 1, pp. 3-18. DOI 10.1017/S1466252310000071.

FOUCHIER, Ron A. M., MUNSTER, Vincent, WALLENSTEN, Anders, BESTEBROER, Theo M., HERFST, Sander, SMITH, Derek, RIMMELZWAAN, Guus F., OLSEN, Björn et OSTERHAUS, Albert D. M. E., 2005. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *Journal of Virology*. mars 2005. Vol. 79, n° 5, pp. 2814-2822. DOI 10.1128/JVI.79.5.2814-2822.2005.

FUJII, Ken, FUJII, Yutaka, NODA, Takeshi, MURAMOTO, Yukiko, WATANABE, Tokiko, TAKADA, Ayato, GOTO, Hideo, HORIMOTO, Taisuke et KAWAOKA, Yoshihiro, 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. *Journal of Virology*. mars 2005. Vol. 79, n° 6, pp. 3766-3774. DOI 10.1128/JVI.79.6.3766-3774.2005.

FUJII, Yutaka, GOTO, Hideo, WATANABE, Tokiko, YOSHIDA, Tetsuya et KAWAOKA, Yoshihiro, 2003. Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 18 février 2003. Vol. 100, n° 4, pp. 2002-2007. DOI 10.1073/pnas.0437772100.

GAMBOTTO, Andrea, BARRATT-BOYES, Simon M., DE JONG, Menno D., NEUMANN, Gabriele et KAWAOKA, Yoshihiro, 2008. Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus. *Lancet (London, England)*. 26 avril 2008. Vol. 371, n° 9622, pp. 1464-1475. DOI 10.1016/S0140-6736(08)60627-3.

GARTEN, Wolfgang et KLENK, Hans-Dieter YR 1983, [sans date]. Characterization of the Carboxypeptidase Involved in the Proteolytic Cleavage of the Influenza Haemagglutinin. *Journal of General Virology*. Vol. 64, n° 10, pp. 2127-2137. DOI 10.1099/0022-1317-64-10-2127.

GUINAT, Claire, NICOLAS, Gaëlle, VERGNE, Timothée, BRONNER, Anne, DURAND, Benoit, COURCOUL, Aurélie, GILBERT, Marius, GUÉRIN, Jean-Luc et PAUL, Mathilde C., 2018a. Spatio-temporal patterns of highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N8 spread, France, 2016 to 2017. *Euro Surveillace: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*. juin 2018. Vol. 23, n° 26. DOI 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.26.1700791.

GUINAT, Claire, NICOLAS, Gaëlle, VERGNE, Timothée, BRONNER, Anne, DURAND, Benoit, COURCOUL, Aurélie, GILBERT, Marius, GUÉRIN, Jean-Luc et PAUL, Mathilde C., 2018b. Spatio-temporal patterns of highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N8 spread, France, 2016 to 2017. *Eurosurveillance*. 28 juin 2018. Vol. 23, n° 26, pp. 1700791. DOI 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.26.1700791.

HAUSE, Ben M., COLLIN, Emily A., LIU, Runxia, HUANG, Bing, SHENG, Zizhang, LU, Wuxun, WANG, Dan, NELSON, Eric A. et LI, Feng, 2014.

Characterization of a novel influenza virus in cattle and Swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *mBio*. 4 mars 2014. Vol. 5, n° 2, pp. e00031-00014. DOI 10.1128/mBio.00031-14.

HOFFMANN, E., NEUMANN, G., KAWAOKA, Y., HOBOM, G. et WEBSTER, R. G., 2000. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 23 mai 2000. Vol. 97, n° 11, pp. 6108-6113. DOI 10.1073/pnas.100133697.

HORIMOTO, Taisuke et KAWAOKA, Yoshihiro, 2005. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nature Reviews Microbiology*. août 2005. Vol. 3, n° 8, pp. 591-600. DOI 10.1038/nrmicro1208.

HOU, Guangyu, LI, Jinping, WANG, Yan, WANG, Suchun, PENG, Cheng, YU, Xiaohui, JIN, Jihui et JIANG, Wenming, 2018. Influenza viral vectors expressing two kinds of HA proteins for bivalent vaccines against clade 2.3.4.4 and clade 2.3.2.1 H5 HP AIVs. *Scientific Reports*. 19 juin 2018. Vol. 8, pp. 9327. DOI 10.1038/s41598-018-27722-5.

HUANG, R. T., ROTT, R., WAHN, K., KLENK, H. D. et KOHAMA, T., 1980. The function of the neuraminidase in membrane fusion induced by myxoviruses. *Virology*. décembre 1980. Vol. 107, n° 2, pp. 313-319. DOI 10.1016/0042-6822(80)90299-8.

HULSE, Diane J., WEBSTER, Robert G., RUSSELL, Rupert J. et PEREZ, Daniel R., 2004. Molecular determinants within the surface proteins involved in the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens. *Journal of Virology*. septembre 2004. Vol. 78, n° 18, pp. 9954-9964. DOI 10.1128/JVI.78.18.9954-9964.2004.

Influenza - Diseases of Poultry - Wiley Online Library, [sans date]. [en ligne]. [Consulté le 17 janvier 2022]. Disponible à l'adresse : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119421481.ch6>

Influenza aviaire : la situation en France, [sans date]. *Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire* [en ligne]. [Consulté le 20 novembre 2022]. Disponible à l'adresse : <https://agriculture.gouv.fr/influenza-aviaire-la-situation-en-france>

ISEL, Catherine, CHEN, Kuang-Yu et NAFFAKH, Nadia, 2020. La dimérisation, une nouvelle propriété de l'ARN polymérase des virus influenza. *médecine/sciences*. 1 avril 2020. Vol. 36, n° 4, pp. 332-335. DOI 10.1051/medsci/2020053.

ITO, T., GOTO, H., YAMAMOTO, E., TANAKA, H., TAKEUCHI, M., KUWAYAMA, M., KAWAOKA, Y. et OTSUKI, K., 2001. Generation of a highly pathogenic avian influenza A virus from an avirulent field isolate by passaging in chickens. *Journal of Virology*. mai 2001. Vol. 75, n° 9, pp. 4439-4443. DOI 10.1128/JVI.75.9.4439-4443.2001.

JOHNSON, Niall P. A. S. et MUELLER, Juergen, 2002. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 « Spanish » influenza pandemic. *Bulletin*

of the *History of Medicine*. 2002. Vol. 76, n° 1, pp. 105-115.
DOI 10.1353/bhm.2002.0022.

JS, Peiris, WC, Yu, CW, Leung, CY, Cheung, WF, Ng, JM, Nicholls, TK, Ng, KH, Chan, ST, Lai, WL, Lim, KY, Yuen et Y, Guan, 2004. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet (London, England)* [en ligne]. 21 février 2004. Vol. 363, n° 9409. [Consulté le 26 novembre 2022].
DOI 10.1016/S0140-6736(04)15595-5. Disponible à l'adresse :
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14987888/>

KAWAOKA, Y., KRAUSS, S. et WEBSTER, R. G., 1989. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *Journal of Virology*. novembre 1989. Vol. 63, n° 11, pp. 4603-4608.
DOI 10.1128/JVI.63.11.4603-4608.1989.

KEINER, Bjoern, MAENZ, Benjamin, WAGNER, Ralf, CATTOLI, Giovanni, CAPUA, Ilaria et KLENK, Hans-Dieter, 2010. Intracellular Distribution of NS1 Correlates with the Infectivity and Interferon Antagonism of an Avian Influenza Virus (H7N1). *Journal of Virology* [en ligne]. novembre 2010. [Consulté le 18 janvier 2022].
DOI 10.1128/JVI.01011-10. Disponible à l'adresse :
<https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/JVI.01011-10world>

KIDA, Yurie, OKUYA, Kosuke, SAITO, Takeshi, YAMAGISHI, Junya, OHNUMA, Aiko, HATTORI, Takanari, MIYAMOTO, Hiroko, MANZOOR, Rashid, YOSHIDA, Reiko, NAO, Naganori, KAJIHARA, Masahiro, WATANABE, Tokiko et TAKADA, Ayato, 2021. Structural Requirements in the Hemagglutinin Cleavage Site-Coding RNA Region for the Generation of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus. *Pathogens*. 9 décembre 2021. Vol. 10, n° 12, pp. 1597.
DOI 10.3390/pathogens10121597.

KILLIAN, Mary Lea, 2014. Hemagglutination Assay for Influenza Virus. In : SPACKMAN, Erica (éd.), *Animal Influenza Virus* [en ligne]. New York, NY : Springer. pp. 3-9. *Methods in Molecular Biology*. [Consulté le 7 octobre 2022]. ISBN 978-1-4939-0758-8. Disponible à l'adresse : https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_1

KILLIAN, Mary Lea, KIM-TORCHETTI, Mia, HINES, Nichole, YINGST, Sam, DELIBERTO, Thomas et LEE, Dong-Hun, 2016. Outbreak of H7N8 Low Pathogenic Avian Influenza in Commercial Turkeys with Spontaneous Mutation to Highly Pathogenic Avian Influenza. *Genome Announcements*. 16 juin 2016. Vol. 4, n° 3, pp. e00457-16. DOI 10.1128/genomeA.00457-16.

KLENK, Hans-Dieter et ROTT, Rudolf, 1988. The Molecular Biology of Influenza Virus Pathogenicity. *Advances in Virus Research*. 1988. Vol. 34, pp. 247-281. DOI 10.1016/S0065-3527(08)60520-5.

KOBAYASHI, Yuki et SUZUKI, Yoshiyuki, 2012. Evidence for N-Glycan Shielding of Antigenic Sites during Evolution of Human Influenza A Virus Hemagglutinin. *Journal of Virology*. avril 2012. Vol. 86, n° 7, pp. 3446-3451.
DOI 10.1128/JVI.06147-11.

KOEL, Björn F., BURKE, David F., BESTEBROER, Theo M., VAN DER VLIET, Stefan, ZONDAG, Gerben C. M., VERVAET, Gaby, SKEPNER, Eugene, LEWIS, Nicola S., SPRONKEN, Monique I. J., RUSSELL, Colin A., EROPKIN, Mikhail Y., HURT, Aeron C., BARR, Ian G., DE JONG, Jan C., RIMMELZWAAN, Guus F., OSTERHAUS, Albert D. M. E., FOUCHIER, Ron A. M. et SMITH, Derek J., 2013. Substitutions near the receptor binding site determine major antigenic change during influenza virus evolution. *Science (New York, N.Y.)*. 22 novembre 2013. Vol. 342, n° 6161, pp. 976-979. DOI 10.1126/science.1244730.

KOEL, Björn F., VAN DER VLIET, Stefan, BURKE, David F., BESTEBROER, Theo M., BHAROTO, Eny E., YASA, I. Wayan W., HERLIANA, Inna, LAKSONO, Brigitta M., XU, Kemin, SKEPNER, Eugene, RUSSELL, Colin A., RIMMELZWAAN, Guus F., PEREZ, Daniel R., OSTERHAUS, Albert D. M. E., SMITH, Derek J., PRAJITNO, Teguh Y. et FOUCHIER, Ron A. M., 2014. Antigenic variation of clade 2.1 H5N1 virus is determined by a few amino acid substitutions immediately adjacent to the receptor binding site. *mBio*. 10 juin 2014. Vol. 5, n° 3, pp. e01070- 01014. DOI 10.1128/mBio.01070-14.

KOMISSAROVA, Natalia et KASHLEV, Mikhail, 1997. RNA Polymerase Switches between Inactivated and Activated States By Translocating Back and Forth along the DNA and the RNA *. *Journal of Biological Chemistry*. 13 juin 1997. Vol. 272, n° 24, pp. 15329-15338. DOI 10.1074/jbc.272.24.15329.

KOSOY, Olga I., LAMBERT, Amy J., HAWKINSON, Dana J., PASTULA, Daniel M., GOLDSMITH, Cynthia S., HUNT, D. Charles et STAPLES, J. Erin, [sans date]. Novel Thogotovirus Associated with Febrile Illness and Death, United States, 2014 - Volume 21, Number 5—May 2015 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. [en ligne]. [Consulté le 6 janvier 2022]. DOI 10.3201/eid2105.150150. Disponible à l'adresse : https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/5/15-0150_article

KRAMMER, Florian, SMITH, Gavin J. D., FOUCHIER, Ron A. M., PEIRIS, Malik, KEDZIERSKA, Katherine, DOHERTY, Peter C., PALESE, Peter, SHAW, Megan L., TREANOR, John, WEBSTER, Robert G. et GARCÍA-SASTRE, Adolfo, 2018a. Influenza. *Nature Reviews Disease Primers*. 28 juin 2018. Vol. 4, n° 1, pp. 1-21. DOI 10.1038/s41572-018-0002-y.

KRAMMER, Florian, SMITH, Gavin J. D., FOUCHIER, Ron A. M., PEIRIS, Malik, KEDZIERSKA, Katherine, DOHERTY, Peter C., PALESE, Peter, SHAW, Megan L., TREANOR, John, WEBSTER, Robert G. et GARCÍA-SASTRE, Adolfo, 2018b. Influenza. *Nature Reviews. Disease Primers*. 2018. Vol. 4, n° 1, pp. 3. DOI 10.1038/s41572-018-0002-y.

KRUG, R. M., 1981. Priming of influenza viral RNA transcription by capped heterologous RNAs. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 1981. Vol. 93, pp. 125-149. DOI 10.1007/978-3-642-68123-3_6.

LEAHY, M. B., DESSENS, J. T., WEBER, F., KOCHS, G. et NUTTALL, P. A., 1997. The fourth genus in the Orthomyxoviridae: sequence analyses of two Thogoto virus polymerase proteins and comparison with influenza viruses. *Virus Research*. août 1997. Vol. 50, n° 2, pp. 215-224. DOI 10.1016/s0168-1702(97)00072-5.

LEE, Dong-Hun, BERTRAN, Kateri, KWON, Jung-Hoon et SWAYNE, David E., 2017. Evolution, global spread, and pathogenicity of highly pathogenic avian influenza H5Nx clade 2.3.4.4. *Journal of Veterinary Science*. 31 août 2017. Vol. 18, n° S1, pp. 269-280. DOI 10.4142/jvs.2017.18.S1.269.

LEE, Dong-Hun, CRIADO, Miria Ferreira et SWAYNE, David E., 2021. Pathobiological Origins and Evolutionary History of Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. février 2021. Vol. 11, n° 2, pp. a038679. DOI 10.1101/cshperspect.a038679.

LEFKOWITZ, Elliot J, DEMPSEY, Donald M, HENDRICKSON, Robert Curtis, ORTON, Richard J, SIDDELL, Stuart G et SMITH, Donald B, 2018. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research*. 4 janvier 2018. Vol. 46, n° D1, pp. D708-D717. DOI 10.1093/nar/gkx932.

LEWIS, N. S., DALY, J. M., RUSSELL, C. A., HORTON, D. L., SKEPNER, E., BRYANT, N. A., BURKE, D. F., RASH, A. S., WOOD, J. L. N., CHAMBERS, T. M., FOUCHIER, R. a. M., MUMFORD, J. A., ELTON, D. M. et SMITH, D. J., 2011. Antigenic and genetic evolution of equine influenza A (H3N8) virus from 1968 to 2007. *Journal of Virology*. décembre 2011. Vol. 85, n° 23, pp. 12742-12749. DOI 10.1128/JVI.05319-11.

LI, X. et PALESE, P., 1994. Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA. *Journal of Virology*. février 1994. Vol. 68, n° 2, pp. 1245-1249. DOI 10.1128/JVI.68.2.1245-1249.1994.

LIANG, Yuying, HONG, Ying et PARSLOW, Tristram G., 2005. cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments. *Journal of Virology*. août 2005. Vol. 79, n° 16, pp. 10348-10355. DOI 10.1128/JVI.79.16.10348-10355.2005.

LONG, Jason S., MISTRY, Bhakti, HASLAM, Stuart M. et BARCLAY, Wendy S., 2019. Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. *Nature Reviews Microbiology*. février 2019. Vol. 17, n° 2, pp. 67-81. DOI 10.1038/s41579-018-0115-z.

MAIR, Caroline M., MEYER, Tim, SCHNEIDER, Katjana, HUANG, Qiang, VEIT, Michael et HERRMANN, Andreas, 2014. A histidine residue of the influenza virus hemagglutinin controls the pH dependence of the conformational change mediating membrane fusion. *Journal of Virology*. novembre 2014. Vol. 88, n° 22, pp. 13189-13200. DOI 10.1128/JVI.01704-14.

MARTIN, K. et HELENIUS, A., 1991. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *Journal of Virology*. janvier 1991. Vol. 65, n° 1, pp. 232-244. DOI 10.1128/JVI.65.1.232-244.1991.

MASSIN, Pascale, VAN DER WERF, Sylvie et NAFFAKH, Nadia, 2001. Residue 627 of PB2 Is a Determinant of Cold Sensitivity in RNA Replication of Avian Influenza Viruses. *Journal of Virology*. juin 2001. Vol. 75, n° 11, pp. 5398-5404. DOI 10.1128/JVI.75.11.5398-5404.2001.

MATSUZAKI, Yoko, KATSUSHIMA, Noriko, NAGAI, Yukio, SHOJI, Makoto, ITAGAKI, Tsutomu, SAKAMOTO, Michiyo, KITAOKA, Setsuko, MIZUTA, Katsumi et NISHIMURA, Hidekazu, 2006. Clinical Features of Influenza C Virus Infection in Children. *The Journal of Infectious Diseases*. 1 mai 2006. Vol. 193, n° 9, pp. 1229-1235. DOI 10.1086/502973.

MATSUZAKI, Yoko, SUGAWARA, Kanetsu, SHIMOTAI, Yoshitaka, KADOWAKI, Yoko, HONGO, Seiji, MIZUTA, Katsumi et NISHIMURA, Hidekazu, 2021. Growth Kinetics of Influenza C Virus Antigenic Mutants That Escaped from Anti-Hemagglutinin Esterase Monoclonal Antibodies and Viral Antigenic Changes Found in Field Isolates. *Viruses*. 3 mars 2021. Vol. 13, n° 3, pp. 401. DOI 10.3390/v13030401.

MCAULEY, Julie L., GILBERTSON, Brad P., TRIFKOVIC, Sanja, BROWN, Lorena E. et MCKIMM-BRESCHKIN, Jennifer L., 2019. Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Frontiers in Microbiology*. 29 janvier 2019. Vol. 10, pp. 39. DOI 10.3389/fmicb.2019.00039.

MCKIMM-BRESCHKIN, J. L., BLICK, T. J., SAHASRABUDHE, A., TIONG, T., MARSHALL, D., HART, G. J., BETHELL, R. C. et PENN, C. R., 1996. Generation and characterization of variants of NWS/G70C influenza virus after in vitro passage in 4-amino-Neu5Ac2en and 4-guanidino-Neu5Ac2en. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. janvier 1996. Vol. 40, n° 1, pp. 40-46. DOI 10.1128/AAC.40.1.40.

MONNE, Isabella, FUSARO, Alice, NELSON, Martha I., BONFANTI, Leana, MULATTI, Paolo, HUGHES, Joseph, MURCIA, Pablo R., SCHIVO, Alessia, VALASTRO, Viviana, MORENO, Ana, HOLMES, Edward C. et CATTOLI, Giovanni, 2014. Emergence of a highly pathogenic avian influenza virus from a low-pathogenic progenitor. *Journal of Virology*. avril 2014. Vol. 88, n° 8, pp. 4375-4388. DOI 10.1128/JVI.03181-13.

MORENS, David M., TAUBENBERGER, Jeffery K., FOLKERS, Gregory K. et FAUCI, Anthony S., 2010. Pandemic influenza's 500th anniversary. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 15 décembre 2010. Vol. 51, n° 12, pp. 1442-1444. DOI 10.1086/657429.

MUNIER, S., LARCHER, T., CORMIER-ALINE, F., SOUBIEUX, D., SU, B., GUIGAND, L., LABROSSE, B., CHEREL, Y., QUÉRÉ, P., MARC, D. et NAFFAKH, N., 2010. A genetically engineered waterfowl influenza virus with a deletion in the stalk of the neuraminidase has increased virulence for chickens. *Journal of Virology*. janvier 2010. Vol. 84, n° 2, pp. 940-952. DOI 10.1128/JVI.01581-09.

MUNSTER, Vincent J., SCHRAUWEN, Eefje J. A., WIT, Emmie de, BRAND, Judith M. A. van den, BESTEBROER, Theo M., HERFST, Sander, RIMMELZWAAN, Guus F., OSTERHAUS, Albert D. M. E. et FOUCHIER, Ron A. M., 2010. Insertion of a Multibasic Cleavage Motif into the Hemagglutinin of a Low-Pathogenic Avian Influenza H6N1 Virus Induces a Highly Pathogenic Phenotype. *Journal of Virology* [en ligne]. août 2010. [Consulté le 18 janvier 2022]. DOI 10.1128/JVI.00449-10. Disponible à l'adresse : <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/JVI.00449-10world>

NAO, Naganori, YAMAGISHI, Junya, MIYAMOTO, Hiroko, IGARASHI, Manabu, MANZOOR, Rashid, OHNUMA, Aiko, TSUDA, Yoshimi, FURUYAMA, Wakako, SHIGENO, Asako, KAJIHARA, Masahiro, KISHIDA, Noriko, YOSHIDA, Reiko et TAKADA, Ayato, 2017a. Genetic Predisposition To Acquire a Polybasic Cleavage Site for Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Hemagglutinin. *mBio*. 14 février 2017. Vol. 8, n° 1, pp. e02298-16. DOI 10.1128/mBio.02298-16.

NAO, Naganori, YAMAGISHI, Junya, MIYAMOTO, Hiroko, IGARASHI, Manabu, MANZOOR, Rashid, OHNUMA, Aiko, TSUDA, Yoshimi, FURUYAMA, Wakako, SHIGENO, Asako, KAJIHARA, Masahiro, KISHIDA, Noriko, YOSHIDA, Reiko et TAKADA, Ayato, 2017b. Genetic Predisposition To Acquire a Polybasic Cleavage Site for Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Hemagglutinin. *mBio*. 14 février 2017. Vol. 8, n° 1, pp. e02298-16. DOI 10.1128/mBio.02298-16.

NEUMANN, G. et HOBOM, G., 1995. Mutational analysis of influenza virus promoter elements in vivo. *Journal of General Virology*. 1 juillet 1995. Vol. 76, n° 7, pp. 1709-1717. DOI 10.1099/0022-1317-76-7-1709.

NEUMANN, G., ZOBEL, A. et HOBOM, G., 1994. RNA polymerase I-mediated expression of influenza viral RNA molecules. *Virology*. juillet 1994. Vol. 202, n° 1, pp. 477-479. DOI 10.1006/viro.1994.1365.

OIE, 2021. Accès en ligne au manuel terrestre. *OMSA - Organisation mondiale de la santé animale* [en ligne]. 2021. [Consulté le 5 janvier 2023]. Disponible à l'adresse : <https://www.woah.org/fr/ce-que-nous-faisons/normes/codes-et-manuels/acces-en-ligne-au-manuel-terrestre/>

OLSEN, Björn, MUNSTER, Vincent J., WALLENSTEN, Anders, WALDENSTRÖM, Jonas, OSTERHAUS, Albert D. M. E. et FOUCHIER, Ron A. M., 2006. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science (New York, N.Y.)*. 21 avril 2006. Vol. 312, n° 5772, pp. 384-388. DOI 10.1126/science.1122438.

OSTERHAUS, A. D., RIMMELZWAAN, G. F., MARTINA, B. E., BESTEBROER, T. M. et FOUCHIER, R. A., 2000. Influenza B virus in seals. *Science (New York, N.Y.)*. 12 mai 2000. Vol. 288, n° 5468, pp. 1051-1053. DOI 10.1126/science.288.5468.1051.

PALEY, Miranda A. et PRESCHER, Jennifer A., 2014. Bioluminescence: a versatile technique for imaging cellular and molecular features. *MedChemComm*. 1 mars 2014. Vol. 5, n° 3, pp. 255-267. DOI 10.1039/C3MD00288H.

PASCOLO, Baptiste, 2021. *Développement d'une méthode d'analyse du taux de mutation de l'hémagglutinine des virus influenza*. [en ligne]. other. [Consulté le 17 décembre 2022]. Disponible à l'adresse : <https://oatao.univ-toulouse.fr/28935/>

PASICK, John, HANDEL, Katherine, ROBINSON, John, COPPS, John, RIDD, Deidre, HILLS, Kevin, KEHLER, Helen, COTTAM-BIRT, Colleen, NEUFELD, James, BERHANE, Yohannes et CZUB, Stefanie, 2005. Intersegmental recombination between the haemagglutinin and matrix genes was responsible for the emergence of a highly pathogenic H7N3 avian influenza virus in British Columbia. *The Journal of*

General Virology. mars 2005. Vol. 86, n° Pt 3, pp. 727-731. DOI 10.1099/vir.0.80478-0.

PAUL GLEZEN, W., SCHMIER, Jordana K., KUEHN, Carrie M., RYAN, Kellie J. et OXFORD, John, 2013. The burden of influenza B: a structured literature review. *American Journal of Public Health*. mars 2013. Vol. 103, n° 3, pp. e43-51. DOI 10.2105/AJPH.2012.301137.

PAULY, Matthew D, PROCARIO, Megan C et LAURING, Adam S, 2017a. A novel twelve class fluctuation test reveals higher than expected mutation rates for influenza A viruses. KIRKEGAARD, Karla (éd.), *eLife*. 9 juin 2017. Vol. 6, pp. e26437. DOI 10.7554/eLife.26437.

PAULY, Matthew D, PROCARIO, Megan C et LAURING, Adam S, 2017b. A novel twelve class fluctuation test reveals higher than expected mutation rates for influenza A viruses. KIRKEGAARD, Karla (éd.), *eLife*. 9 juin 2017. Vol. 6, pp. e26437. DOI 10.7554/eLife.26437.

PING, Jihui, SELMAN, Mohammed, TYLER, Shaun, FORBES, Nicole, KELETA, Liya et BROWN, Earl G., 2012. Low-pathogenic avian influenza virus A/turkey/Ontario/6213/1966 (H5N1) is the progenitor of highly pathogenic A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9). *The Journal of General Virology*. août 2012. Vol. 93, n° Pt 8, pp. 1649-1657. DOI 10.1099/vir.0.042895-0.

PLARRE, Heidrun, NYLUND, Are, KARLSEN, Marius, BREVIK, Øyvind, SÆTHER, Per Anton et VIKE, Siri, 2012. Evolution of infectious salmon anaemia virus (ISA virus). *Archives of Virology*. décembre 2012. Vol. 157, n° 12, pp. 2309-2326. DOI 10.1007/s00705-012-1438-0.

PLESCHKA, S, JASKUNAS, R, ENGELHARDT, O G, ZÜRCHER, T, PALESE, P et GARCÍA-SASTRE, A, 1996. A plasmid-based reverse genetics system for influenza A virus. *Journal of Virology*. juin 1996. Vol. 70, n° 6, pp. 4188-4192.

PORTELA, Agustín et DIGARD, Paul, 2002. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *The Journal of General Virology*. avril 2002. Vol. 83, n° Pt 4, pp. 723-734. DOI 10.1099/0022-1317-83-4-723.

PYANKOVA, Olga G., SUSLOPAROV, Ivan M., MOISEEVA, Anastasia A., KOLOSOVA, Natalia P., ONKHONOVA, Galina S., DANILENKO, Aleksey V., VAKALOVA, Elena V., SHENDO, Gennady L., NEKESHINA, Natalia N., NOSKOVA, Lyudmila N., DEMINA, Julia V., FROLOVA, Natalia V., GAVRILOVA, Elena V., MAKSYUTOV, Rinat A. et RYZHIKOV, Aleksandr B., 2021. Isolation of clade 2.3.4.4b A(H5N8), a highly pathogenic avian influenza virus, from a worker during an outbreak on a poultry farm, Russia, December 2020. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*. juin 2021. Vol. 26, n° 24, pp. 2100439. DOI 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.24.2100439.

REED, Mark L., BRIDGES, Olga A., SEILER, Patrick, KIM, Jeong-Ki, YEN, Hui-Ling, SALOMON, Rachelle, GOVORKOVA, Elena A., WEBSTER, Robert G. et

RUSSELL, Charles J., 2010. The pH of Activation of the Hemagglutinin Protein Regulates H5N1 Influenza Virus Pathogenicity and Transmissibility in Ducks. *Journal of Virology* [en ligne]. février 2010. [Consulté le 18 janvier 2022]. DOI 10.1128/JVI.02069-09. Disponible à l'adresse : <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/JVI.02069-09world>

ROSENTHAL, Peter B., ZHANG, Xiaodong, FORMANOWSKI, Frank, FITZ, Wolfgang, WONG, Chi-Huey, MEIER-EWERT, Herbert, SKEHEL, John J. et WILEY, Don C., 1998. Structure of the haemagglutinin-esterase-fusion glycoprotein of influenza C virus. *Nature*. novembre 1998. Vol. 396, n° 6706, pp. 92-96. DOI 10.1038/23974.

RUSSELL, Charles J., HU, Meng et OKDA, Faten A., 2018. Influenza Hemagglutinin Protein Stability, Activation, and Pandemic Risk. *Trends in Microbiology*. octobre 2018. Vol. 26, n° 10, pp. 841-853. DOI 10.1016/j.tim.2018.03.005.

SAMBROOK, Joseph et RUSSELL, David William, 2001. *Molecular Cloning: Plasmids and their usefulness in molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 978-0-87969-577-4.

Séquençage : la technologie d'Illumina, [sans date]. [en ligne]. [Consulté le 13 décembre 2022]. Disponible à l'adresse : https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/courses/sequencing-illumina-technology-wbt-frca/story_html5.html?iframe

SIECZKARSKI, S. B. et WHITTAKER, G. R., 2005. Viral entry. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2005. Vol. 285, pp. 1-23. DOI 10.1007/3-540-26764-6_1.

SMITH, Derek J., LAPEDES, Alan S., DE JONG, Jan C., BESTEBROER, Theo M., RIMMELZWAAN, Guus F., OSTERHAUS, Albert D. M. E. et FOUCHIER, Ron A. M., 2004. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science (New York, N.Y.)*. 16 juillet 2004. Vol. 305, n° 5682, pp. 371-376. DOI 10.1126/science.1097211.

SMITH, Gavin J. D., DONIS, Ruben O., et WORLD HEALTH ORGANIZATION/WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH/FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (WHO/OIE/FAO) H5 EVOLUTION WORKING GROUP, 2015. Nomenclature updates resulting from the evolution of avian influenza A(H5) virus clades 2.1.3.2a, 2.2.1, and 2.3.4 during 2013-2014. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. septembre 2015. Vol. 9, n° 5, pp. 271-276. DOI 10.1111/irv.12324.

SOBOLESKI, Mark R., OAKS, Jason et HALFORD, William P., 2005. Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. mars 2005. Vol. 19, n° 3, pp. 440-442. DOI 10.1096/fj.04-3180fje.

SODA, Kosuke, ASAKURA, Shingo, OKAMATSU, Masatoshi, SAKODA, Yoshihiro et KIDA, Hiroshi, 2011. H9N2 influenza virus acquires intravenous pathogenicity on the introduction of a pair of di-basic amino acid residues at the cleavage site of the hemagglutinin and consecutive passages in chickens. *Virology Journal*. 10 février 2011. Vol. 8, pp. 64. DOI 10.1186/1743-422X-8-64.

STECH, Olga, VEITS, Jutta, WEBER, Siegfried, DECKERS, Daniela, SCHRÖER, Diana, VAHLENKAMP, Thomas W., BREITHAUPT, Angele, TEIFKE, Jens, METTENLEITER, Thomas C. et STECH, Jürgen, 2009. Acquisition of a polybasic hemagglutinin cleavage site by a low-pathogenic avian influenza virus is not sufficient for immediate transformation into a highly pathogenic strain. *Journal of Virology*. juin 2009. Vol. 83, n° 11, pp. 5864-5868. DOI 10.1128/JVI.02649-08.

STEINHAUER, D. A., 1999. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology*. 25 mai 1999. Vol. 258, n° 1, pp. 1-20. DOI 10.1006/viro.1999.9716.

SU, Shuo, FU, Xinliang, LI, Gairu, KERLIN, Fiona et VEIT, Michael, 2017. Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence*. 17 novembre 2017. Vol. 8, n° 8, pp. 1580-1591. DOI 10.1080/21505594.2017.1365216.

SWAYNE, D. E., PERDUE, M. L., GARCIA, M., RIVERA-CRUZ, E. et BRUGH, M., 1997. Pathogenicity and diagnosis of H5N2 Mexican avian influenza viruses in chickens. *Avian Diseases*. juin 1997. Vol. 41, n° 2, pp. 335-346.

SWAYNE, David E., 2007. Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds. *Avian Diseases*. mars 2007. Vol. 51, n° 1 Suppl, pp. 242-249. DOI 10.1637/7763-110706-REGR.1.

TAUBENBERGER, Jeffery K. et KASH, John C., 2010. Influenza Virus Evolution, Host Adaptation and Pandemic Formation. *Cell host & microbe*. 25 juin 2010. Vol. 7, n° 6, pp. 440-451. DOI 10.1016/j.chom.2010.05.009.

TAUBENBERGER, Jeffery K., REID, Ann H., LOURENS, Raina M., WANG, Ruixue, JIN, Guozhong et FANNING, Thomas G., 2005. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature*. 6 octobre 2005. Vol. 437, n° 7060, pp. 889-893. DOI 10.1038/nature04230.

TONG, Suxiang, LI, Yan, RIVAILLER, Pierre, CONRARDY, Christina, CASTILLO, Danilo A. Alvarez, CHEN, Li-Mei, RECUENCO, Sergio, ELLISON, James A., DAVIS, Charles T., YORK, Ian A., TURMELLE, Amy S., MORAN, David, ROGERS, Shannon, SHI, Mang, TAO, Ying, WEIL, Michael R., TANG, Kevin, ROWE, Lori A., SAMMONS, Scott, XU, Xiyang, FRACE, Michael, LINDBLADE, Kim A., COX, Nancy J., ANDERSON, Larry J., RUPPRECHT, Charles E. et DONIS, Ruben O., 2012. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 13 mars 2012. Vol. 109, n° 11, pp. 4269-4274. DOI 10.1073/pnas.1116200109.

TRIFONOV, Vladimir, KHIABANIAN, Hossein et RABADAN, Raul, 2009. Geographic Dependence, Surveillance, and Origins of the 2009 Influenza A (H1N1)

Virus. *New England Journal of Medicine*. 9 juillet 2009. Vol. 361, n° 2, pp. 115-119. DOI 10.1056/NEJMp0904572.

UCCLOUVAIN FDP Virologie, [sans date]. *Initiation à la virologie* [en ligne]. [Consulté le 12 janvier 2022]. Disponible à l'adresse : <https://www.virologie-uclouvain.be/fr/chapitres/exemples-choisis/virus-de-la-grippe>

VEITS, Jutta, WEBER, Siegfried, STECH, Olga, BREITHAUPT, Angele, GRÄBER, Marcus, GOHRBANDT, Sandra, BOGS, Jessica, HUNDT, Jana, TEIFKE, Jens P., METTENLEITER, Thomas C. et STECH, Jürgen, 2012. Avian influenza virus hemagglutinins H2, H4, H8, and H14 support a highly pathogenic phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 14 février 2012. Vol. 109, n° 7, pp. 2579-2584. DOI 10.1073/pnas.1109397109.

VERGNE, Timothée, GUBBINS, Simon, GUINAT, Claire, BAUZILE, Billy, DELPONT, Mattias, CHAKRABORTY, Debapriyo, GRUSON, Hugo, ROCHE, Benjamin, ANDRAUD, Mathieu, PAUL, Mathilde et GUÉRIN, Jean-Luc, 2021. Inferring within-flock transmission dynamics of highly pathogenic avian influenza H5N8 virus in France, 2020. *Transboundary and Emerging Diseases*. novembre 2021. Vol. 68, n° 6, pp. 3151-3155. DOI 10.1111/tbed.14202.

VIJAYKRISHNA, D., POON, L. L. M., MA, S. K., LI, O. T. W., CHEUNG, C. L., SMITH, G. J. D., PEIRIS, J. S. M. et GUAN, Y., 2010. Reassortment of pandemic H1N1/2009 influenza A virus in swine. *Science (New York, N.Y.)*. 18 juin 2010. Vol. 328, n° 5985, pp. 1529. DOI 10.1126/science.1189132.

WEBSTER, R. G., BEAN, W. J., GORMAN, O. T., CHAMBERS, T. M. et KAWAOKA, Y., 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*. mars 1992. Vol. 56, n° 1, pp. 152-179. DOI 10.1128/mr.56.1.152-179.1992.

WEBSTER, R. G. et HULSE, D. J., 2004. Microbial adaptation and change: avian influenza. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*. août 2004. Vol. 23, n° 2, pp. 453-465. DOI 10.20506/rst.23.2.1493.

XU, Rui, EKIERT, Damian C., KRAUSE, Jens C., HAI, Rong, CROWE, James E. et WILSON, Ian A., 2010. Structural basis of preexisting immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. *Science (New York, N.Y.)*. 16 avril 2010. Vol. 328, n° 5976, pp. 357-360. DOI 10.1126/science.1186430.

NOM Prénom : LAMONT Paul

INFLUENCE DE LA SÉQUENCE NUCLÉOTIDIQUE SUR LE TAUX D'ERREUR DES POLYMÉRASES DES VIRUS INFLUENZA A

Résumé :

Les virus influenza aviaires hautement pathogènes représentent un enjeu économique et sanitaire majeur. Il n'est actuellement pas possible de prédire l'émergence de ces virus. L'objectif du projet RISKEVOL est de comprendre comment la séquence de l'hémagglutinine pourrait influencer l'acquisition d'un site de clivage polybasique. Ce travail a permis l'élaboration d'une nouvelle méthode d'analyse des mutations de l'hémagglutinine qui permet de s'affranchir de la pression de sélection, le système mini-génome 977. Il consiste à reconstituer le complexe polymérase du virus H7N1 977 pour répliquer des séquences ARN d'intérêt. Il a été utilisé avec les séquences HA des virus H5N3 ShimH5 et ShimH524a2b. Les ARN produits ont été séquencés par une méthode de séquençage haut débit et les résultats convergent avec ceux obtenus par d'autres méthodes produites par l'UMR 1225 IHAP : la séquence nucléotidique exerce une influence sur le taux d'erreur des polymérases des virus influenza aviaires.

Mots clefs : virus, influenza aviaire, hémagglutinine, génétique inverse, polymérase, mutation, séquençage

Abstract :

Highly pathogenic avian influenza viruses represent a major economic and health issue. We are currently unable to predict the emergence of these viruses. The aim of RISKEVOL project is to understand how the nucleotide sequence of the hemagglutinin could influence the acquisition of a polybasic cleavage site. This work permitted the development of a new method of analysis of hemagglutinin mutation that allows to eliminate the selection pressure : the mini-genome 977 system. It consists in rebuilding the 977 H7N1 virus polymerase complex to replicate ARN sequences of interest. It was used with HA sequences of H5N3 ShimH5 and ShimH524a2b viruses. The ARN produced were sequenced with a high throughput sequencing method. The results were compared with the ones obtained with other methods developed by UMR 1225 IHAP and they converge towards the same conclusion : the nucleotide sequence has a decisive influence over the error rate of avian influenza viruses polymerases.

Key words : virus, avian influenza, hemagglutinin, reverse genetics, polymerase, mutation, sequencing