

ANNEE 2020 THESE : 2020 – TOU 3 – 4063

DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE D'ANALYSE DE L'EVOLUTION DE L'HEMAGGLUTININE DES VIRUS INFLUENZA AVIAIRES

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

COCHU Anne

Née, le 03/07/1995 à COLOMBES (92)

Directeur de thèse : M. Romain VOLMER

JURY

PRESIDENT :
M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Romain VOLMER
Mme Christelle CAMUS

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

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

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie –Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- 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**, *Productions animales (ruminants)*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAÎTRES DE CONFÉRENCES (HORS CLASSE)

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- 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 **PRIYENKO Nathalie**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

MAÎTRES DE CONFÉRENCES (CLASSE NORMALE)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie-Bactériologie-Pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- 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*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LHERMIE Guillaume**, *Economie de la santé animale*
- 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*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales réglementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

- M. **BOLON Pierrick**, *Production et pathologie aviaire*
- M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
- Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophthalmologie*
- Mme **ROMANOS Lola**, *Pathologie des ruminants*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
- M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*
- M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Christophe PASQUIER

Professeur de virologie-bactériologie à l'université Paul-Sabatier de Toulouse,

Praticien hospitalier

Doyen de la faculté des Sciences Pharmaceutiques et Virologue au CHU de

Toulouse, INSERM

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse,
qu'il trouve ici l'expression de mes hommages respectueux.

A Monsieur le Docteur Romain VOLMER

Maître de Conférences de 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,

qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

A Madame le Docteur Christelle CAMUS

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Biologie cellulaire et moléculaire

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être l'assesseur de cette thèse,
qu'elle trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

SOMMAIRE

TABLE DES FIGURES	11
TABLE DES TABLEAUX	11
LISTE DES ABREVIATIONS	13
I. Introduction	15
a. Généralités sur le virus influenza aviaire	15
i. Famille.....	15
ii. Structure d'un virus influenza	15
iii. Les protéines de l'enveloppe	16
b. Réservoir et flux	17
c. Pathotypes : virus influenza aviaire faiblement pathogène et virus influenza aviaire hautement pathogène	19
d. Mutations virales	21
i. La dérive antigénique.....	21
ii. La cassure antigénique.....	22
iii. Émergence de souches HPAI	23
e. Enjeux	24
f. Facteurs d'évolution	25
i. Facteurs intrinsèques au génome.....	25
ii. Facteurs extrinsèques au génome.....	27
g. Objectif du travail de thèse	28
II. Expériences	33
a. Création d'une HA non fonctionnelle	33
i. Matériel et méthode.....	33
ii. Résultats	36
b. Production de virus dont le segment HA est non fonctionnel par trans-complémentation	37
i. Matériel et méthode.....	37
ii. Résultats	39
o Expérience 1	40
o Expérience 2	43
o Expérience 3	45
o Expérience 4	47
III. Discussion	51
IV. Conclusion	57
V. Bibliographie	61
VI. Annexes	65

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN VIRUS IA (5).....	15
FIGURE 2 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN GENE D'UNE HEMAGGLUTININE	17
FIGURE 4 : LOCALISATION DES PROTEASES CLIVANT L'HA ET SEQUENCES D'ACIDES AMINES ASSOCIEES SUIVANT LE PHENOTYPE LPAI OU HPAI (15).....	20
FIGURE 5 : SCHEMA D'UN PLASMIDE PHW2000	30
FIGURE 6 : TECHNIQUE D'OBTENTION DE VIRION D'IA AVEC UN GENE HA NON FONCTIONNEL	32
FIGURE 7 : PROTOCOLES DE MUTAGENESE DIRIGEE QUIKCHANGE® (53) ET IN-FUSION® (54).....	34
FIGURE 8 : ELECTROPHORESE APRES DIGESTION DU PLASMIDE PAR L'ENZYME SACL	35
FIGURE 9 : ALIGNEMENT DES SEQUENCES INITIALES (PREMIERE LIGNE) AVEC LES SEQUENCES OBTENUES APRES MUTAGENESE (SECONDE LIGNE), SEQUENCES OBTENUES PAR SEQUENÇAGE	36
FIGURE 10 : EXPERIENCE DE GENETIQUE INVERSE	38
FIGURE 11 : TEST D'HEMAGGLUTINATION PUIITS 1.1 A 1.6	42
FIGURE 12 : WESTERN BLOT DES DIFFERENTS LYSATS CELLULAIRES	52

TABLE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : EXEMPLE DE VIRUS HPAI DE SOUS-TYPE H5 OU H7 ET LES SEQUENCES DE LEUR SITE DE CLIVAGE (26,35).....	23
TABLEAU 2 : PLASMIDES AYANT SUBI UNE MUTAGENESE DIRIGEE	33
TABLEAU 3 : CONDITIONS REALISEES DANS L'EXPERIENCE 1	41
TABLEAU 4 : CONDITIONS REALISEES DANS L'EXPERIENCE 2	44
TABLEAU 5 : CONDITIONS REALISEES DANS L'EXPERIENCE 3	46
TABLEAU 6 : CONDITIONS REALISEES DANS L'EXPERIENCE 4.....	47
TABLEAU 7 : RESULTATS DES DIFFERENTS TESTS REALISES.	49

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN c	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARN m	ARN messenger
ARN v	ARN viral
Cellules MDCK	Cellules Madin Darby Canine Kidney
dNTP	Désoxyribonucléoside triphosphate
DRAAF	Direction régionale de l'alimentation, de l'agriculture et de la forêt
DS1	Danger sanitaire de première catégorie
GFP	Green fluorescent protein
HA	Hémagglutinine
HPAI	High pathogenic avian influenza = influenza aviaire hautement pathogène
IA	Influenza aviaire
LPAI	Low pathogenic avian influenza = influenza aviaire faiblement pathogène
M	Protéine de la matrice
NA	Neuraminidase
NP	Nucleoprotéine
NS	Protéine Non Structurale
OIE	Office international des épizooties
PA	Protéase acide
PB	Protéase basique
PCR	Polymerase Chain Reaction
ol	Polymérase
wt	Wild type = sauvage

I. Introduction

a. Généralités sur le virus influenza aviaire

i. Famille

Le virus influenza appartient à la famille des *Orthomyxoviridae* qui contient sept genres :

- le genre Influenzavirus A, qui touche les mammifères et les oiseaux ;
- le genre Influenzavirus B, spécifique des humains ;
- le genre Influenzavirus C, lui- aussi spécifique des humains ;
- le genre Influenzavirus D, découvert récemment, en 2014, infectant les bovins et les porcs (1) ;
- le genre Thogovirus, qui touche les insectes (2) ;
- les genres Isavirus, infectant principalement les saumons, mais aussi d'autres espèces de poissons (3).

ii. Structure d'un virus influenza

Les virus influenza aviaires sont des virus à ARN (acide ribonucléique) simple brin de polarité négative. Leur génome est divisé en huit segments de différentes tailles codant chacun pour des protéines différentes et essentielles au virus (figure 1) :

- PA (protéase acide), PB1 (protéase basique 1), PB2 (protéase basique 2) sont trois sous-unités de la polymérase virale, impliquées dans la réplication et dans la transcription (4) ;
- M1 et M2 sont les protéines de la membrane, M1 donnant sa structure au virion et M2 formant un canal entre le virus et le milieu extérieur, permettant notamment l'entrée d'ions

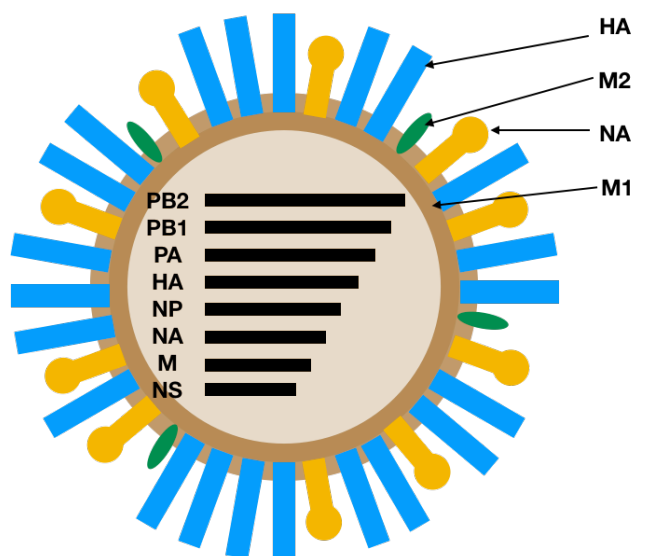


Figure 1 : Représentation schématique d'un virus IA (5)

nécessaire à une acidification du milieu interne (5) ;

- NP (nucléoprotéine), protéine structurelle qui entoure les segments d'ARNv (ARN viral) et assure ainsi la stabilité de l'ARN, mais aussi fonctionnelle via la polymérase virale (6,7) ;
- NA (neuraminidase) et HA (hémagglutinine) sont deux glycoprotéines fondamentales de l'enveloppe lipidique du virus.

La classification entre les différents genres influenza virus est faite selon les propriétés antigéniques de NP et de la structure M1 (1).

iii. Les protéines de l'enveloppe

Les virus influenza sont classés en sous-types en fonction des propriétés antigéniques de l'HA et de la NA. En effet, ceux-ci sont les cibles privilégiées de la réponse immunitaire. Actuellement on recense 18 sous-types HA et 9 sous-types NA. Les HA H17 et H18 n'ont pour le moment été retrouvées que chez des chauves-souris sauvages (8–10). Chaque sous-type est donc une combinaison d'une HA et d'une NA. Pour chaque sous-type, il existe de nombreux variants aux propriétés très différentes, notamment pathologiques, chaque variant étant le produit singulier de l'évolution. Nous détaillerons les mécanismes impliqués dans l'évolution plus loin dans ce travail (partie I.d). Chaque souche est unique et est identifiée selon la nomenclature officielle. Le nom commence par le genre de l'Influenza (A, B, C, ou D), il est suivi par le nom de l'espèce hôte chez laquelle il a été isolé, puis par le lieu géographique, ensuite viennent un numéro propre à chaque isolat, puis l'année et enfin le sous type HxNy (avec x allant de 1 à 18 et y de 1 à 9)(11). Dans le cas où l'espèce est l'humain, le nom de l'espèce n'est pas spécifié.

Par exemple, A/ostrich/SA/AI2887/11/H5N2 désigne une souche influenza A isolée chez des autruches en Afrique du Sud avec comme numéro AI2887, souche détectée en 2011 et de sous type H5N2.

L'HA est constituée de deux sous-unités (figure 2). La structure secondaire de l'HA présente un motif tige / boucle. Une première partie, globulaire, HA1, possédant le site de liaison, site RBS (ribosome-binding site), est mise en contact avec la cellule hôte

et se fixe sur des récepteurs cellulaires, les acides sialiques. L'autre partie, formant une tige, HA2, fusionne les membranes virales et cellulaires pour permettre la sortie du virion de l'endosome. L'ARNv est alors libéré dans le cytoplasme cellulaire grâce à une acidification de l'endosome. Cette fusion n'est possible que lorsque l'HA initialement exprimée sous la forme HA0 est clivée en deux sous-unités HA1 et HA2 reliées par des ponts disulfures. L'ARNv rentre ensuite dans le noyau où la réplication et la transcription ont lieu en simultané. Les ARNv répliqués sont exportés vers la membrane plasmique où se produit le bourgeonnement. La NA permet la libération des nouveaux virions à partir des cellules infectées. Ils vont alors infecter de nouvelles cellules hôtes (12).

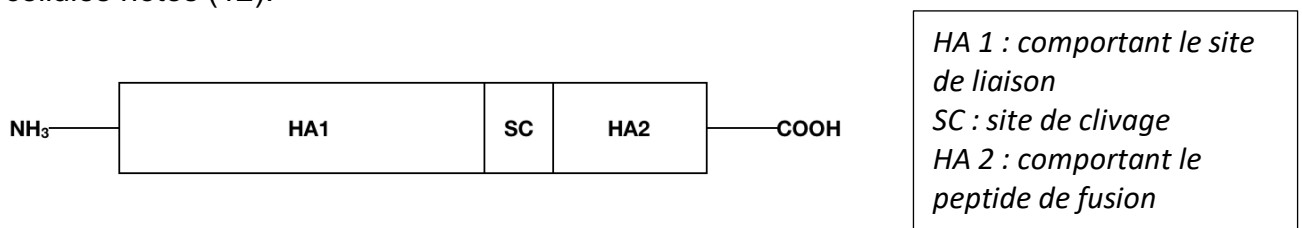


Figure 2 : Représentation schématique d'un gène d'une hémagglutinine

b. Réservoir et flux

Les principaux réservoirs des virus influenza A sont les oiseaux sauvages aquatiques de l'ordre des Ansériformes (canards, oies, cygnes) et des Charadriiformes (goélands, échassiers, sternes) (13,14). Ces espèces peuvent être porteuses du virus influenza aviaires (IA) dans les voies intestinales et respiratoires, mais elles sont souvent porteuses asymptomatiques de souches et n'expriment pas de signes cliniques. Les migrations de ces oiseaux entraînent la propagation du virus sur de grandes distances. Un oiseau infecté excrète en grande quantité des virions dans ses excréments et ses sécrétions respiratoires. Une espèce sensible au contact d'un individu infecté peut être à son tour infectée par le virus. La contamination se fait soit par contact direct soit par contact indirect : via les activités humaines (transports, lisiers, alimentation animale) qui peuvent véhiculer des virions ou via de l'eau souillée (15). Au sein des élevages, le transfert mécanique de fientes contaminées par les activités anthropiques est le facteur majeur de propagation à des foyers secondaires (16).

Le virus IA a un potentiel zoonotique rare. Il infecte les oiseaux mais aussi de nombreux mammifères (figure 3). La transmission inter-espèce est exceptionnelle. Il existe une barrière d'espèces : les récepteurs cellulaires. En effet, les acides sialiques reconnus par les virus de type aviaire sont les acides sialiques de type $\alpha 2,3$. Les souches humaines se lient aux acides sialiques de type $\alpha 2,6$. Le porc est un cas particulier qui présente les 2 types de récepteurs sur ses cellules. Il peut potentiellement multiplier un virus aviaire puis adapter ce virus à la reconnaissance des liaisons $\alpha 2,6$ et le rendre transmissible à l'homme. Des mutations de souches rendent possible la transmission d'un virus reconnaissant les acides sialiques de type $\alpha 2,3$ en virus pouvant se lier à $\alpha 2,6$ (15,17).

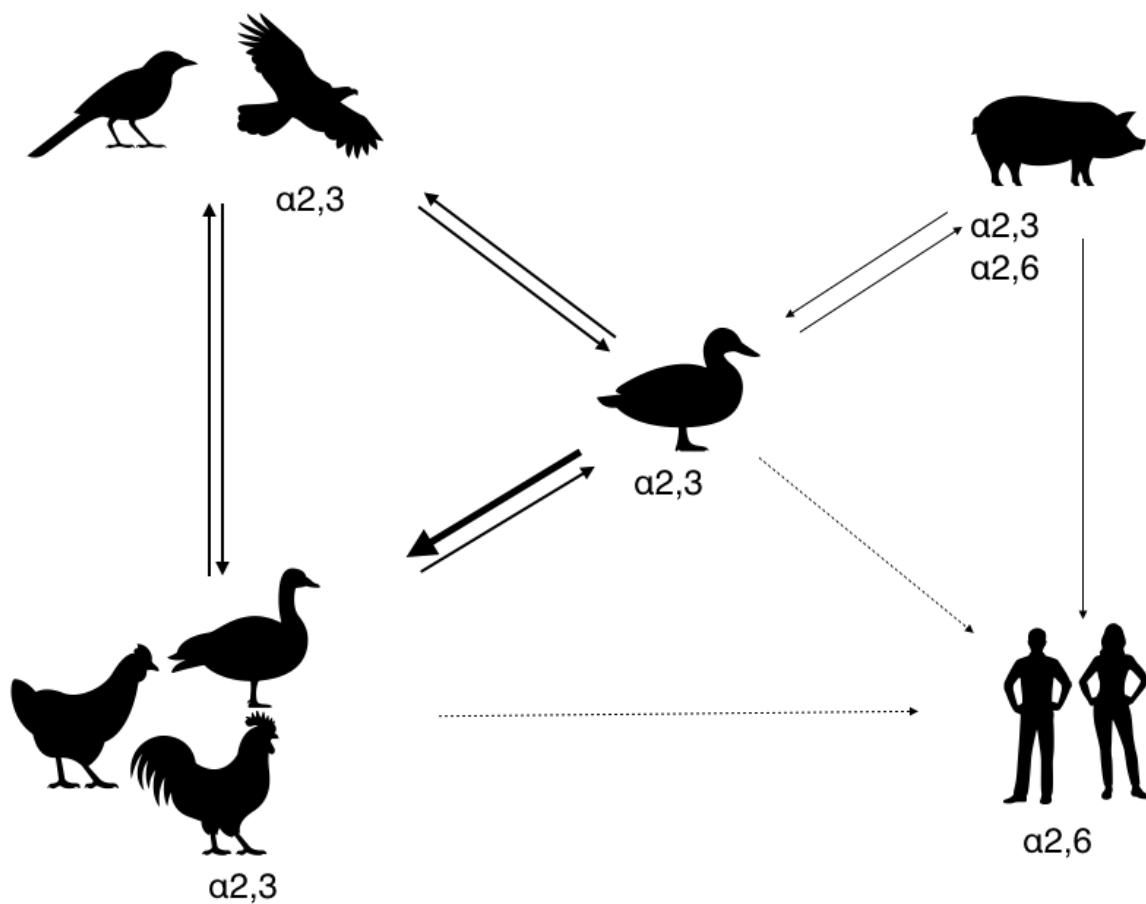


Figure 3 : Représentation schématique simplifiée des flux d'IA et récepteurs cellulaires des différentes espèces (15)

Les flèches indiquent les différents flux entre espèces, la taille du trait représente l'importance de flux de manière non proportionnelle, les pointillés indiquent la présence d'une barrière entre espèces

c. Pathotypes : virus influenza aviaire faiblement pathogène et virus influenza aviaire hautement pathogène

En plus de la classification HxNy, les virus IA sont divisés en deux groupes chez les oiseaux : HPAI (high pathogenic avian influenza virus = hautement pathogène) et LPAI (low pathogenic avian influenza virus = faiblement pathogène).

Les souches virales faiblement pathogènes d'IA provoquent généralement peu ou pas de manifestations cliniques chez les oiseaux tandis que les souches hautement pathogènes sont celles qui entraînent de graves manifestations cliniques et/ou une forte mortalité. La morbidité et la mortalité peuvent atteindre 100%. La classification dans ces deux catégories a été définie par l'OIE (Office International des Epizooties) et repose sur l'indice de pathogénicité du virus par voie intraveineuse chez les poulets âgés de 6 semaines (c'est-à-dire le taux de mortalité chez les poulets infectés par voie intraveineuse) ou sur certains critères génétiques associés à un HPAI, la présence au sein de l'HA d'un site de clivage polybasique. Une souche est considérée comme HPAI si l'indice de pathogénicité est supérieur à 1,2 (18,19).

Comme nous l'avons exposé plus haut, dans le cycle de réplication, il est nécessaire que l'HA soit clivée pour entrer dans une cellule. Dans le cas de LPAI, le clivage s'effectue seulement au niveau des muqueuses respiratoires et digestives. En effet, seules les cellules épithéliales de ces muqueuses expriment des protéases de type trypsine qui coupent l'HA (20) (figure 4). Cela explique une atteinte respiratoire ou entérique des oiseaux en cas de virus LPAI. Lorsque le virus est HP, le site de clivage polybasique est sensible à des protéines ubiquitaires [protéases comme la furine, certaines PC (proprotéines convertases), les subtilisine-like produites par un grand nombre de cellules de l'organisme] et conduit à une atteinte systémique (21,22). De nombreuses études ont corrélé la présence de ce site polybasique chez les virus HPAI à la virulence du virus du fait de la capacité du virus à coloniser tout type cellulaire et non uniquement les cellules exprimant de la trypsine (figure 4) (20,23,24).

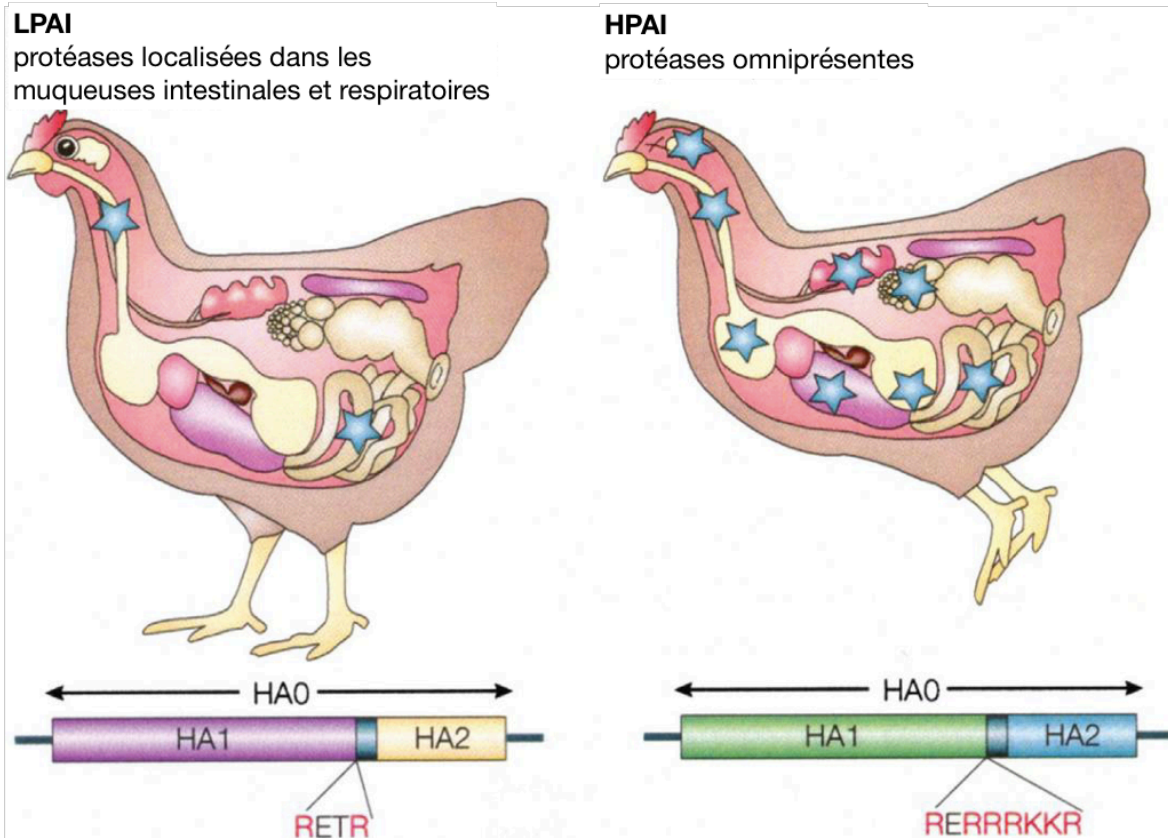


Figure 3 : Localisation des protéases clivant l'HA et séquences d'acides aminés associées suivant le phénotype LPAI ou HPAI (15)

Les étoiles indiquent la localisation des enzymes clivant l'HA suivant le pathotype.

Les acides aminés en rouge correspondent à des acides aminés basiques, l'annexe 1 répertorie les acides aminés et le code génétique.

d. Mutations virales

Les virus Influenza présentent une forte diversité et sont en permanente évolution. Comme tout virus à ARN, ils ont une forte capacité mutagène. Deux mécanismes sont impliqués :

- une évolution lente pas à pas créée par des erreurs de réplication des polymérases, la dérive antigénique ;
- une évolution plus rapide induite lors de co-infection par le mélange de segments d'ARN, la cassure antigénique.

i. La dérive antigénique

La dérive antigénique est un mécanisme naturel, accentué chez les virus à ARN. En effet, l'ARN polymérase ne possède pas de capacité de relecture et de correction. Le taux d'erreurs induit par la polymérase est de l'ordre de 10^{-4} mutations. On estime que cela représente environ deux à trois erreurs par génome, soit une insertion, soit une délétion, soit une substitution de nucléotide (25). Ces modifications minimales créent une variation antigénique constante, ce qui permet au virus d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte et entraîne des ré-infections. Ce mécanisme explique la nécessité d'une modification annuelle du vaccin contre la grippe chez l'homme. Il permet aussi l'adaptation à de nouvelles espèces, par exemple grâce à un changement de récepteurs. Ces mutations progressives permettent la création de nouveaux variants d'un même sous-type.

Des phénomènes de recombinaison non homologues interviennent dans cette dérive antigénique. Ils sont relativement rares. H7 est la seule HA où des recombinaisons aient été trouvées dans la nature, des fragments de gènes de la matrice virale ou de la nucléoprotéine sont transloqués au niveau du site de clivage (26).

ii. La cassure antigénique

Le virus Influenza a la caractéristique d'être segmenté. Cela permet l'échange de segments du génome lors d'une co-infection d'une cellule. Ce processus, appelé réassortiment, est à l'origine de l'émergence des dernières souches pandémiques (27,28).

En 2009, l'émergence du virus H1N1 humain a pour origine le réassortiment chez les porcs entre un virus d'origine asiatique, lui-même réassorti, et un virus nord-américain. L'émergence d'une souche réassortie dépend de nombreux facteurs (29,30). La cellule hôte doit être co-infectée, ce qui implique que les virus puissent infecter les mêmes cellules. La fréquence de réassortiment dépend de la charge virale. Les études montrent que les réassortiments entre les différents segments ne se font pas de manière aléatoire. L'ARN viral et les protéines virales co-évoluent pour interagir de manière optimale. Le réassortiment peut voir émerger des souches moins performantes que les souches parentales du fait d'une mauvaise compatibilité entre le génome et les protéines virales. De plus, les phénomènes de réassortiment sont limités par l'incompatibilité de certaines sous-unités (PA, PB1, PB2) de la polymérase virale (31).

Lors d'une co-infection et de l'apparition d'un nouveau virion, plusieurs évolutions sont possibles :

- Le réassortiment produit une souche non viable qui disparaît ;
- La souche est viable ;
 - o L'hôte combat l'infection par la nouvelle souche et la souche disparaît ;
 - o La souche n'est pas contrôlée par le système immunitaire de l'hôte, elle se réplique fortement et on a alors affaire à un nouveau sous-type émergent.

iii. Émergence de souches HPAI

L'analyse des souches HPAI existantes a permis de montrer que les sous-types retrouvés dans la nature appartiennent toujours au groupe H5 ou H7. Aucune souche hautement pathogène n'a été découverte à ce jour chez un autre sous-type d'HA dans la nature. Les virus LPAI sont les précurseurs des virus HPAI (32). Pour dix virus HPAI, des virus LPIA précurseurs ont été clairement identifiés. La comparaison des génomes des virus HPAI et des virus LPAI a montré la présence d'un site de clivage polybasique (33,34). Le tableau 1 illustre quelques virus HPAI et leur séquence du site de clivage.

Sous-type	Phéno-type	Localisation	Année	Type viral	Site de clivage	Mécanisme évolutif	Séquence LPAI	Temps de circulation de LPAI
H7N9	HP	Chine	2017	A/chicken/Guangdong/GD4/2017 A/chicken/Guangdong/GD15/2016 A/Guangdong/Th005/2017	PEVPKG KRTA R/GLF PEVPKR KRTA R/GLF PEVPKG KRIA R/GLF	Inconnu	Inconnue	Inconnu
H7N7	HP	Italie	2013	A/chicken/Italy/13VIR4527_11/13	PETPK RRER R/GLF	Inconnu	Inconnue	Inconnu
H5N2	HP	Afrique du Sud	2011	A/ostrich/SA/AI2114/11	PQ RRKR R/GLF	Inconnu	Inconnue	Inconnu
H5N2	HP	Afrique du Sud	2011	A/ostrich/SA/AI2887/11	PQ RRKR R/GLF	Inconnu	Inconnue	Inconnu
H7N7	HP	Espagne	2009	A/chicken/Spain/6279-2/2009	PELPKG TKPR RR/GLF	Inconnu	Inconnue	Inconnu
H5N2	HP	Afrique du Sud	2006	A/ostrich/SA/AI1091/06	PQ REKRRKR R/GLF	Inconnu	Inconnue	Inconnu
H7N3	HP	Chili	2002	A/chicken/Chile/4322/02	PEKPKTCSPLSR CRETR /GLF PEKPKTCSPLSR CRKTR /GLF	Recombinaison avec NP	A/chicken/Chile/176822/2002 (séquence non connue)	1 mois
H7N1	HP	Italie	1999	A/chicken/Italy/444/99	PEIPKGS RVRR /GLF PEIPKGS RMRR /GLF PEIPK RSRVRR /GLF	Inconnu	Connue	9 mois
H7N3	HP	Pakistan	1995	A/chicken/Pakistan/447/95 A/chicken/Pakistan/CR2/95 A/chicken/Pakistan/16/99/95	PETPK RRKR R/GLF PETPK RRKR /GLF PETPK RRNR /GLF		A/chicken/Pakistan/447/95	6-8 mois
H5N2	HP	Mexique	1994	A/chicken/Puebla/8623-607/94	PQ RRKRKTR /GLF PQ RRKRKTR /GLF	Duplication	A/chicken/Mexico/31381-7/1994 (PQ RETR /GLF)	14 mois
H5N2	HP	USA	1983	A/chicken/Pennsylvania/1370/83	PQ KKKR '/GLF	Perte du site de glycosylation de Asn 11	A/chicken/Pennsylvania/1/83 (PQ KKRGLF)	6 mois
H5N9	HP	Canada	1966	A/turkey/Ontario/7732/66	PQ RRKR R/GLF	Inconnu	A/turkey/Ontario/6213/1966 H5N1 (PQ RETR /GLF)	3 mois

Tableau 1 : exemple de virus HPAI de sous-type H5 ou H7 et les séquences de leur site de clivage (26,35)

En rouge sont répertoriés les acides aminés basiques présents dans le site de clivage (voir annexe 1)

Les exemples d'épidémies d'HPAI qui suivent illustrent des processus d'évolution LPAI vers HPAI connus.

Au Mexique, à Puebla, en novembre 1983, un virus H5N2 LPAI est détecté chez les poulets. Il a une virulence moyenne. En janvier 1985, une nouvelle souche est observée, avec une létalité proche de 100%. L'analyse du génome révèle la présence d'un site de clivage polybasique (PQ**RRKRKTR**/GLF). La séquence initiale du site de clivage était PQ**RETR**/GLF (35,36).

En Italie, en 1999, la circulation d'un virus LPAI H7N1 est détectée dans l'avifaune. Après 9 mois, une nouvelle souche HPAI émerge dans des élevages de volaille. L'analyse génétique du site de clivage révèle le passage d'un site monobasique (PKGR/GLF) à un site polybasique (PKGSRVRR/GLF). D'autres modifications génétiques ont été mises en évidence, elles impliquent notamment les gènes de la NA et de la NS1 (protéine non structurale) (36,37).

Au Pakistan, en 1995, le mécanisme identifié lors d'une épidémie est une duplication du site de clivage. Le virus HPAI est apparu quelques mois après l'isolement d'une souche H7N3 LPAI dans des élevages de poulets de chair (36).

e. Enjeux

L'IA est une maladie réglementée. Elle est sur la liste de l'OIE (18). Les virus LPAI de sous-type H5 et H7 et les virus HPAI sont classés dans les DS1 (dangers sanitaires de première catégorie) par l'arrêté du 29/07/2013. La DRAAF (direction régionale de l'alimentation, de l'agriculture et de la forêt) définit les DS1 comme « des dangers sanitaires susceptibles de porter une atteinte à la santé publique, ou à mettre gravement en cause les capacités de production nationales ou la salubrité de l'environnement » (38). Ces dangers sont soumis à des mesures de prévention, des plans de surveillance et des mesures de lutttes définies et imposées. Le risque sanitaire est important du fait de la contagiosité du virus. Le risque zoonotique accentue l'importance de la détection des foyers d'IA. Lorsqu'une souche H5 ou H7 LPAI ou qu'une souche HPAI est détectée dans un élevage, tout le foyer est systématiquement abattu, tous les cadavres et produits issus de ces animaux sont détruits. Les souches H5 ou H7 LPAI sont surveillées car elles sont susceptibles de muter en virus HPAI. Une surveillance active dans la zone géographique infectée est mise en place pour localiser tous les foyers secondaires et les éradiquer. Les mesures prises sont fixées par l'arrêté du 18 janvier 2008 (39). Les conséquences économiques sont catastrophiques : les coûts engendrés pour lutter contre l'épidémie associés à un ralentissement voire un arrêt de la filière sont considérables.

En Europe, l'épidémie de fin 2016 à début 2017 a conduit à la mort (naturelle ou abattage) de 13 millions d'oiseaux domestiques. Environ 3000 personnes ont été exposées d'octobre 2016 à avril 2017. Aucune sérologie positive, qui aurait pu suggérer une transmission humaine n'a été détectée sur ces 3000 personnes. Le coût estimé pour l'éradication est de 250 à 300 millions d'euros (40). L'épidémie de 1999 en Italie a nécessité l'abattage de 13 millions d'oiseaux domestiques et un arrêt de la production aviaire (37). En 2004, au Canada, plus de 17 millions d'oiseaux ont été abattus lors de l'épidémie de H7N3. Le coût pour maîtriser l'épidémie a été estimé à 380 millions de dollars canadiens (41).

f. Facteurs d'évolution

Les virus IA représentent un risque économique et sanitaire majeur d'une part pour la filière de production de volailles et de porcs, d'autre part pour l'homme avec un risque zoonotique. La compréhension des mécanismes et des différents facteurs intervenant dans l'émergence d'un virus HPAI issu d'un LPAI est donc un enjeu primordial.

Dans cette partie, nous nous intéresserons aux différents facteurs pouvant être identifiés comme prédictors d'un fort risque de mutation d'un virus LPAI en HPAI. Dans un premier temps, nous étudierons les caractéristiques génotypiques et phénotypiques d'un variant favorisant l'évolution d'un virus LPAI en HPAI. Puis nous rechercherons des causes liées à l'hôte et à l'environnement.

i. Facteurs intrinsèques au génome

L'émergence d'un virus HPAI est un phénomène rare. Entre 1959 et 2019, 42 émergences de HPAI ont été recensées. Les sous-types d'HA appartiennent à H5 dans 15 cas et à H7 dans 27 cas (42). Naturellement, les sous-types H5 et H7 sont les seuls présentant des sites polybasiques. Expérimentalement, il est possible d'obtenir par la technique de génétique inverse des HA avec des sites de clivage polybasiques fonctionnels pour chaque sous-type. Cela suggère que la prédisposition des sous-types H5 et H7 à acquérir un site de clivage polybasique n'est pas due à des contraintes liées à la séquence protéique des HA. Cela suggère au contraire que la

séquence nucléotidique des virus H5 et H7 les prédispose à acquérir un site de clivage polybasique.

Lorsque le génome de différents virus HPAI est étudié, certaines associations d'HA et de NA semblent favoriser l'émergence d'un virus HPAI. En effet, les virus HPAI des 60 dernières années ne sont combinés qu'avec un nombre limité de NA. Pour le sous-type H5, il est combiné avec N1, N2, N3, N8 et N9. Concernant H7, les sous-types retrouvés de NA sont N1, N3 et N7 en majorité. Cependant à cause de la répartition géographique inégale des NA et du peu d'études sur l'importance de la NA associée à un sous-type HA dans l'émergence d'un HP, le sous-type NA ne peut être identifié comme un facteur de risque potentiel (21).

Lorsque le précurseur LPAI d'un virus HPAI est connu, les séquences nucléotidiques des génomes sont alignées et comparées. Le nombre de variations génétiques observées entre ces deux génomes diffère fortement en fonction du couple étudié et la localisation de ses variations est aussi très différente. Seule la présence d'un site polybasique est commune aux virus HPAI. Deux hypothèses permettent d'expliquer ces mutations génétiques en dehors du site de clivage :

- Soit les changements sont antérieurs et nécessaires à l'émergence d'un virus HPAI;
- Soit les mutations sont des conséquences de l'émergence d'un virus HPAI et une adaptation pour favoriser l'infection systémique (21,26).

Les séquences les plus conservées, présentant le moins de substitutions concernent les gènes de la matrice et de NEP (Nuclear Export Protein). Cela suggère qu'ils ont un rôle marginal dans l'évolution des virus de LPAI à HPAI (21).

Le processus évolutif est fortuit. En Italie en 1999, le virus HPAI H7N1 a émergé 9 mois après l'isolement du précurseur LPAI (37). Au Mexique en 1983, la durée entre l'isolation du LPAI et l'apparition du HPAI a été d'environ 14 mois (35). La durée d'apparition d'un virus HPAI après l'isolement d'un virus LPAI varie de 10 jours à 24 mois. Toutes les souches LPAI ne conduisent pas à l'émergence d'une souche HP, et la durée nécessaire à cette émergence, quand elle a lieu, n'est pas prévisible.

L'étude de la structure secondaire de l'ARN du site de clivage de l'HA révèle un motif tige / boucle. La taille de la boucle est très variable. Les boucles larges sont retrouvées en grande majorité dans les sous-type H5 et H7 et associées à beaucoup d'adénine et/ou guanine consécutives. La présence de cette boucle favorise l'insertion de nucléotides, principalement d'adénine. Le codon AAA code pour la lysine, acide aminé basique. Un élargissement de la boucle est donc associé à une augmentation du nombre d'acides aminés basiques au niveau du site de clivage (43).

L'étude phylogénétique des séquences d'HA ne peut être utilisée pour prédire le potentiel évolutif d'un virus LP. En effet, les virus HPAI ne sont pas tous regroupés et ne possèdent pas un ancêtre commun. Ils sont répartis dans plusieurs groupes. Certains groupes phylogénétiques n'ont pour le moment jamais évolué vers un phénotype HPAI. Il s'agit principalement de virus isolés chez les oiseaux sauvages (21,37).

ii. Facteurs extrinsèques au génome

La grande majorité des virus HPAI est issue des gallinacés et palmipèdes domestiques. Les poulets et les dindes sont les espèces les plus fréquemment observées ayant conduit à des épidémies mais du virus HPAI a aussi été isolé principalement chez des Autruches en Afrique et chez des canards domestiques et d'autres espèces domestiques. Un cas est rapporté dans la littérature chez des Oiseaux sauvages, il s'agit de la souche A/tern/South Africa/61 (H5N3) datant de 1961 et ayant provoqué une forte mortalité chez les Sternes communes en Afrique du Sud (44). Généralement les virus HPAI isolés au sein de la faune sauvage proviennent de la contamination de ces derniers par la volaille. On peut remarquer que la volaille étant plus symptomatique que les oiseaux sauvages, les virus HPAI sont plus susceptibles d'être détectés chez les oiseaux domestiques.

La tranche d'âge n'est pas un facteur prédisposant à l'apparition d'un virus HPAI. L'émergence a lieu aussi bien chez les jeunes, plus sensibles à l'infection, que chez la volaille plus âgée (26,45).

Les foyers d'HPAI sont détectés aussi bien dans des exploitations industrielles, intensives ou de plein air, que dans des basses-cours. Il n'y a pas de corrélation entre la taille de l'exploitation et l'émergence d'un HPAI. Cependant les zones géographiques avec une forte densité avicole sont les zones avec le plus grand nombre d'épidémies. La densité est un facteur majeur, favorisant la transmission après l'émergence d'une nouvelle souche HPAI(21,26).

La présence d'oiseaux sauvages favorise les flux de virus LPAI et l'introduction de souches LPAI chez la volaille. Dans quelques cas, des contacts entre les faunes sauvage et domestique sont rapportés. L'avifaune sauvage, notamment les oiseaux migrateurs, joue un rôle prépondérant dans la transmission du virus et dans la propagation de l'épidémie lors de l'émergence d'un virus HPAI (46,47).

Certains facteurs liés à l'espèce hôte ou aux conditions environnementales présentent donc un risque accru d'émergence d'un virus HPAI par mutation d'un virus LP. Certains facteurs favorisent la propagation d'une souche, par exemple, la présence d'oiseaux aquatiques sauvages, ou encore une forte densité avicole.

g. Objectif du travail de thèse

Les mécanismes d'apparition de virus HPAI issus de souches LPAI sont encore mal connus, les facteurs génétiques, moléculaires et environnementaux ne sont pas clairement identifiés. Les connaissances actuelles ne permettent pas de prédire si et quand cela va arriver. Cependant, essayer de prédire l'apparition de souche HPAI est un enjeu primordial pour mieux gérer les enjeux sanitaires qui en découlent notamment les abattages préventifs de tous les cheptels infectés par du virus LPAI H5 ou H7. L'objectif de ce travail est d'étudier les insertions dans des gènes HA en culture cellulaire pour déterminer les sites préférentiels d'insertion de nucléotides et si certaines séquences nucléotidiques sont associées à un plus fort taux d'insertion que d'autres.

Lors de la dérive génétique, une partie des virus ne sont pas viables et disparaissent spontanément. En effet, l'insertion ou la délétion de un ou deux nucléotides crée un décalage du cadre de lecture. Chaque acide aminé étant codé par trois nucléotides, ce décalage de cadre de lecture modifie sur toute la longueur la protéine. Quand le nombre de nucléotides ajoutés (ou supprimés) est multiple de trois, un acide aminé est ajouté (ou supprimé) à la protéine. Cet acide aminé peut modifier la structure secondaire et tertiaire de la protéine et la rendre non fonctionnelle. Ces mutations sont souvent délétères, car elles entraînent une dysfonction de la protéine qui ne joue plus son rôle.

Afin de se soustraire à la pression de sélection où seules les HA viables sont sélectionnées, nous souhaitons utiliser des gènes HA avec une mutation du codon départ AUG. Cela devrait permettre de favoriser l'accumulation d'insertion de un ou deux nucléotides. Pour modifier l'HA, nous utiliserons la technique de mutagenèse dirigée sur des plasmides pW2000 contenant une séquence HA.

Le plasmide pW2000 (figure 5) est un plasmide à ADN double brin contenant les séquences en HA que l'on souhaite muter. Il possède :

- Un gène de résistance à l'ampicilline (β -lactamase) qui permet lors de transformations de sélectionner les bactéries présentant cette résistance ;
- Le promoteur pol I, promoteur de la polymérase humaine, polymérase transcrivant l'ADNc (ADN complémentaire) en ARNv (ARN viral) ;
- Le site terminateur murin TM qui stoppe pol I ;
- Le promoteur pol II, promoteur de l'ARN polymérase II qui permet la transcription de l'ADNc en ARNm (ARN messenger) ;
- Un site de polyadénylation, qui ajoute une queue polyA, reconnue par pol II

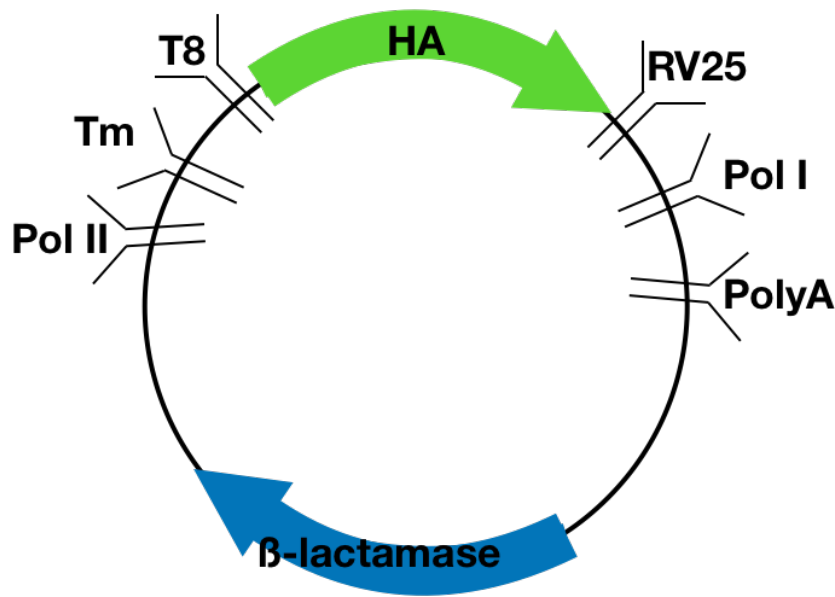


Figure 4 : Schéma d'un plasmide phW2000

Une fois les plasmides phW2000 exprimant HA avec le codon départ muté obtenus, une transfection avec un protocole de génétique inverse permet l'obtention de virions par transcomplémentation. Hoffmann *et al.* a décrit cette méthode de génétique inverse en 2000 (48). Le but est de récupérer des virions à partir de plasmides d'ADNc contenant chacun un segment du génome d'IA. Ces plasmides phW2000 contiennent pol I et pol II (figure 5). Les huit plasmides contenant chacun un segment du génome IA sont transfectés dans des cellules. Les polymérases pol I et pol II produisent des ARNm et ARNv. L'ARNm est traduit en protéines. Le complexe polymérase virale avec NP initie alors la réplication de l'ARNv. Toutes les molécules virales sont ensuite assemblées et cela génère des virions d'IA (48) (figure 6).

Dans notre construction, le plasmide HA inséré ne serait pas fonctionnel. Martínez-Sobrido *et al.* (49) a montré que l'utilisation pour la transfection de cellules exprimant une HA exogène permet de créer des virions possédant une séquence HA non fonctionnelle. Powell *et al.* (50) a ajouté un plasmide pcDNA contenant une séquence codante d'une HA. Dans ces deux études, ils ont réussi à obtenir des virions par la méthode de génétique inverse avec un plasmide contenant la séquence HA mutée. Les virions présentent le segment HA muté. L'observation des virions montre des particules de taille et de morphologie similaires. Les virions ne sont pas capables de se répliquer en l'absence d'HA exogène exprimée par la cellule.

Cette technique de trans-complémentation permet la production de virus possédant un gène HA muté non traduit. Powell *et al.* (50), lorsqu'il a utilisé cette technique, avait un but vaccinal. L'incapacité à se répliquer en dehors des cellules exprimant une HA exogène est recherchée, le but étant que le virus ne réalise qu'un cycle de réplication (51,52).

Dans notre cas, nous désirons réaliser plusieurs cycles de réplication du virus pour accumuler les mutations. Pour cela, nous voulons réaliser des passages cellulaires successifs sur des cellules exprimant une HA trans-complémentante. Cela devrait permettre l'accumulation de mutations. Les virions ainsi obtenus seront séquencés à haut débit. Notre objectif est d'étudier comment la séquence d'HA influence les mutations accumulées au cours des différents passages cellulaires.

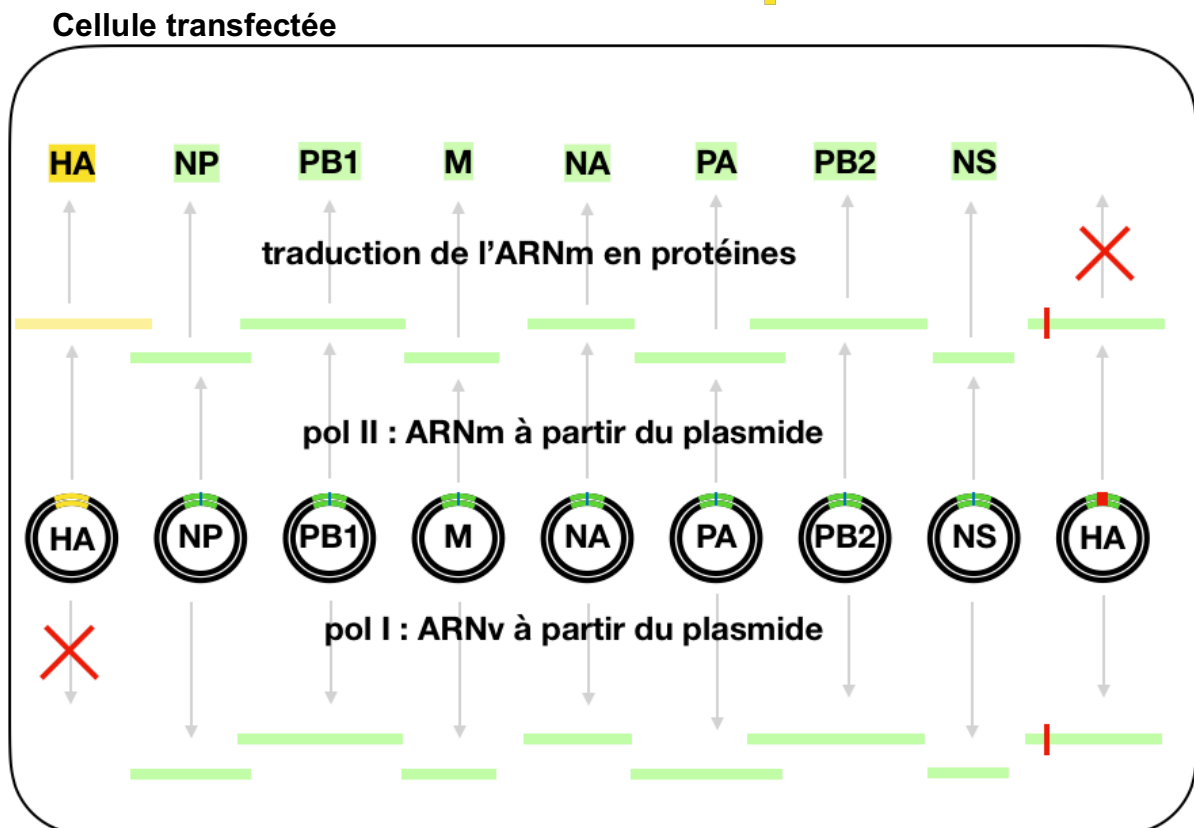
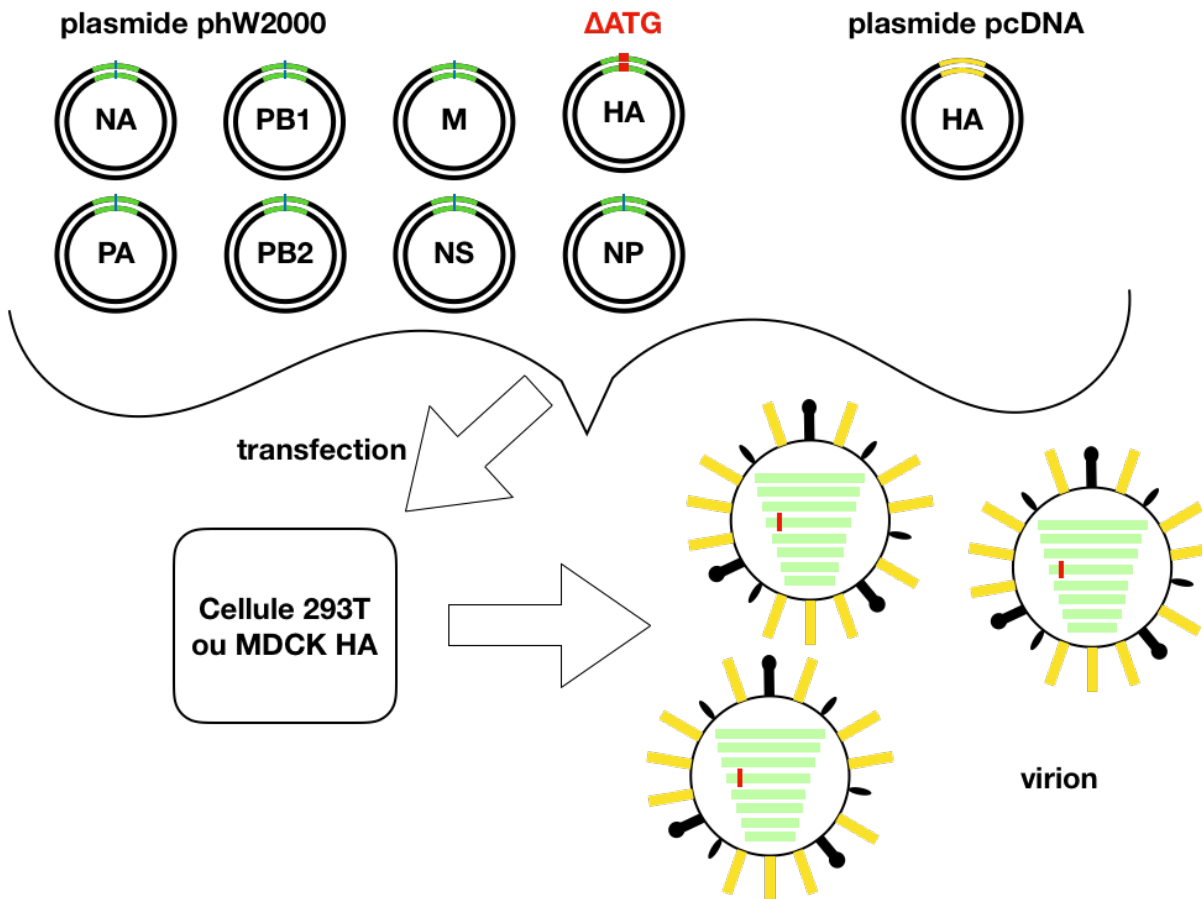


Figure 5 : technique d'obtention de virion d'IA avec un gène HA non fonctionnel

II. Expériences

a. Création d'une HA non fonctionnelle

i. Matériel et méthode

Quatre plasmides ont été utilisés avec un H5, un H7, un H3 et un H1 (Tableau 2).

Nom	Phénotype	Protocole	Nucléotides mutés
phW2000_H7N1_977_HA	H7	InFusion®	A ₁₄₈ T ₁₄₉ G ₁₅₀ → T ₁₄₈ A ₁₄₉ A ₁₅₀
phW2000_rgH5N8 Tarn LP	H5 LP	QuikChange®	A ₆₇ T ₆₈ G ₆₉ → T ₆₇ A ₆₈ A ₆₉ A ₇₆ T ₇₇ G ₇₈ → C ₇₆ A ₇₇ A ₇₈
phW2000_perth09_HA	H3	QuikChange®	A ₇₅ T ₇₆ G ₇₇ → T ₇₅ A ₇₆ A ₇₇
pHW2000-HA (PR8)P4	H1	QuikChange® puis InFusion®	A ₇₉ T ₈₀ G ₈₁ → T ₇₉ A ₈₀ A ₈₁

Tableau 2 : plasmides ayant subi une mutagenèse dirigée

Le protocole utilisé permettant l'obtention d'un plasmide présentant la mutation est précisé ainsi que le numéro des acides aminés mutés.

Les amorces utilisées ont été conçues avec le programme Agilent Quikchange ou InFusion primer-design de conception d'amorces avec substitutions de trois nucléotides à partir des séquences HA connues. Elles font entre 46 et 48 paires de bases.

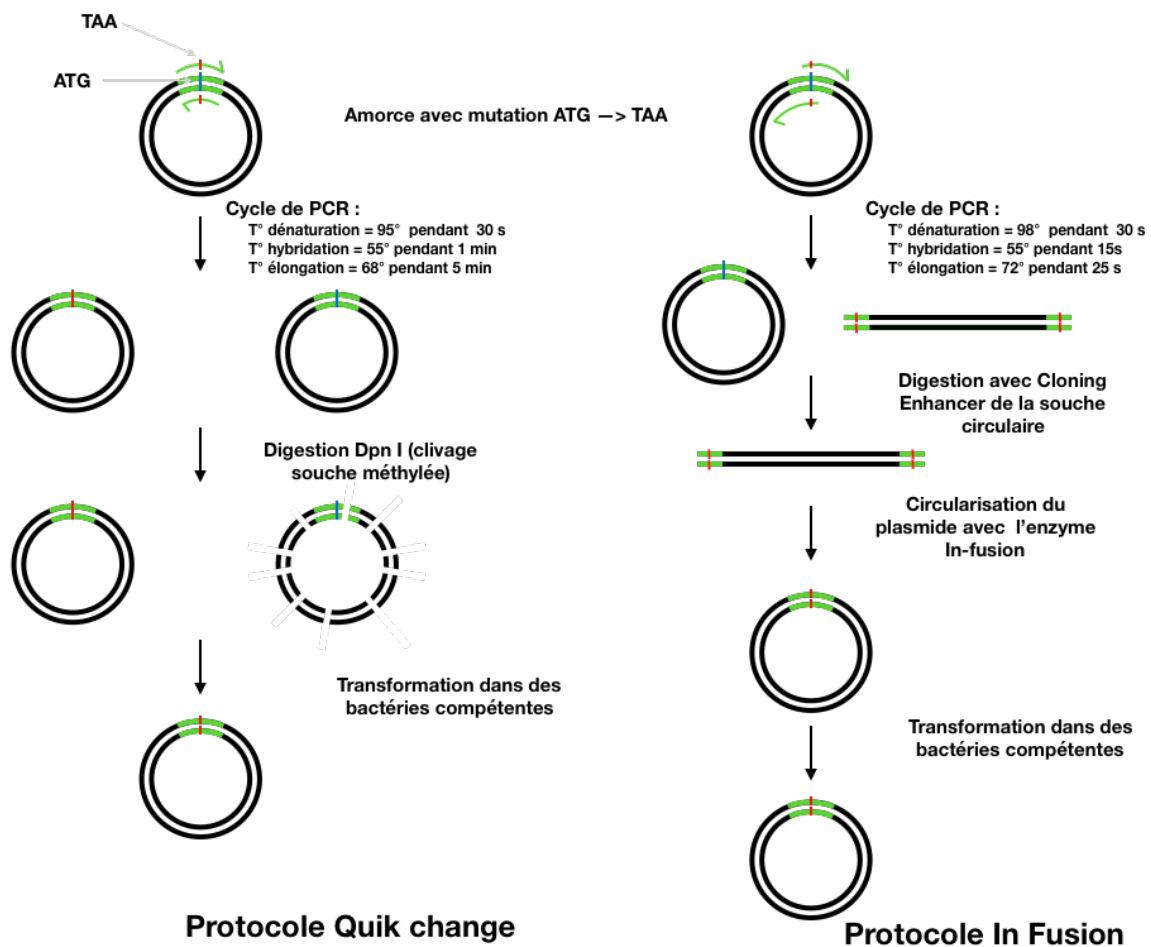


Figure 6 : Protocoles de mutagenèse dirigée QuikChange® (53) et In-fusion® (54)

Dans un premier temps, un protocole de mutagenèse dirigée QuikChange® (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit) a été employé. Les amorces synthétisées comportent la mutation Δ ATG et sont encadrées par la séquence de nucléotides présente autour du codon ATG de l'HA non modifié. Une PCR (Polymerase Chain Reaction) est ensuite réalisée permettant l'obtention d'un plasmide avec la mutation Δ ATG. Les plasmides obtenus sont alors digérés avec l'enzyme DpnI, une endonucléase. Cette enzyme clive les plasmides méthylés, donc dans notre cas le plasmide HA parental ne comportant pas la mutation. Les plasmides sont transformés dans des bactéries compétentes sur un milieu supplémenté en ampicilline. Les colonies obtenues sont purifiées avec un protocole MiniPrep (QIAprep®Spin miniprep kit) puis envoyées à séquencer (figure 7).

Pour H7 et H1, un autre protocole de mutagenèse (In-Fusion®) dirigée a été utilisé dans un second temps. Les amorces conçues sont différentes, elles se chevauchent sur une vingtaine de paires de bases. La PCR permet l'obtention de plasmides linéaires. Une étape de plus est nécessaire pour rendre les plasmides circulaires (figure 7).

De plus, nous avons ajouté une étape de digestion par une enzyme de restriction suivie d'une migration par électrophorèse pour vérifier la présence d'ADN en quantité et purifier ensuite le produit avant de les envoyer à séquencer (figure 8).

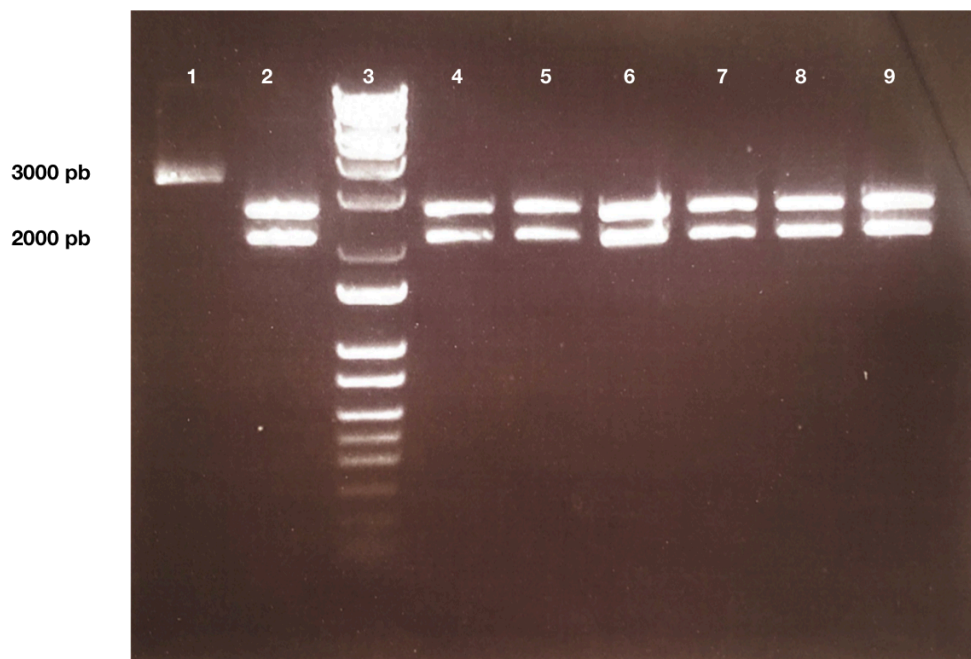


Figure 7 : électrophorèse après digestion du plasmide par l'enzyme ScaI

*1 = témoin (phW2000_HA_PR8_P4) non digéré, 2 = témoin digéré,
3 = échelle de taille (2 log), 4 à 9 produits de mutagenèse dirigée digérés*

L'enzyme ScaI clive le plasmide phW2000_HA_PR8_P4 en 2 bandes de 2100 et 2600 paires de bases. L'électrophorèse révèle deux bandes entre 2000 et 3000 paires de bases. Les clones 4 à 9 sont alors du plasmide phW2000_HA_PR8_P4 et sont envoyés à séquencer pour vérifier la présence ou l'absence de la mutation Δ ATG.

Le séquençage a été réalisé avec deux amorces, T8 et RV25, permettant de balayer tout le gène HA (Figure 5).

Les plasmides présentant la mutation de ATG en TAA sont purifiés suivant le protocole du kit NucleoBond® Extra EF plasmid purification. Les plasmides avec un codon stop sont nommés Δ ATG pour la suite.

ii. Résultats

L'alignement et la comparaison avec les séquences initiales nous permettent de vérifier l'insertion de la mutation dans le plasmide obtenu (Figure 9).

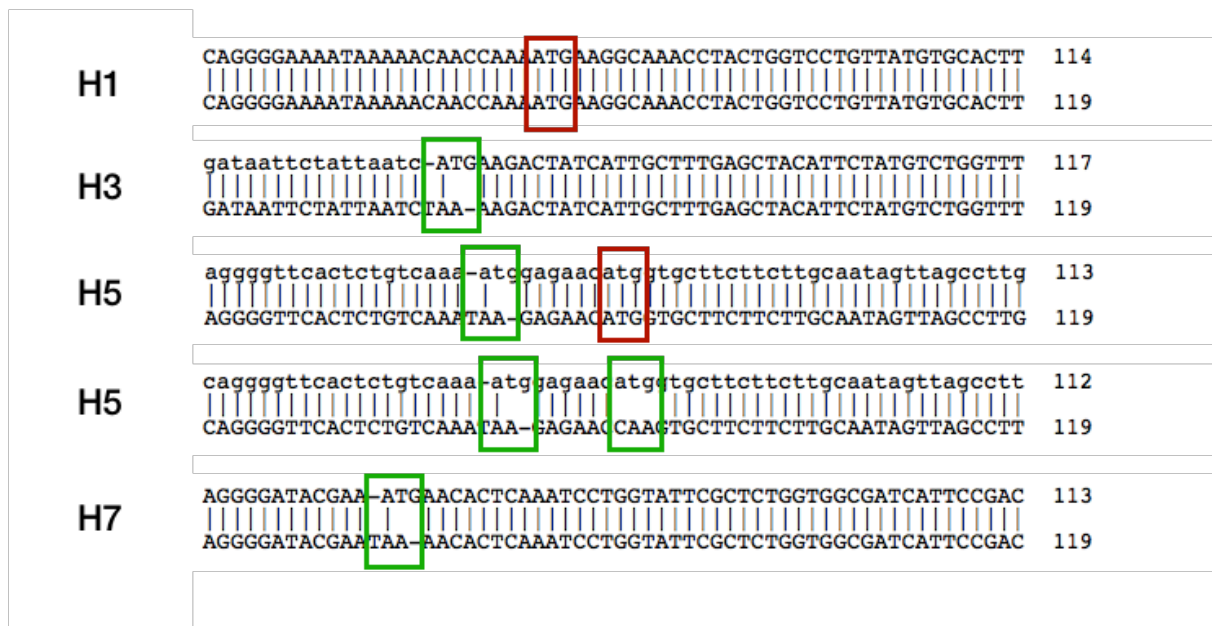


Figure 8 : Alignement des séquences initiales (première ligne) avec les séquences obtenues après mutagenèse (seconde ligne), séquences obtenues par séquençage

H1 = absence de mutation ATG, H3 = mutation du codon ATG, H5 = deux mutagenèses successives pour muter les deux ATG, H7 = mutation du codon ATG

Pour H5 et H3, la mutagenèse dirigée avec le protocole QuikChange® a permis l'obtention de plasmides présentant un codon stop à la place d'un codon start. Le nombre de colonies observées après chaque transformation était faible.

Pour H7 et H1, la mutagénèse dirigée avec le protocole QuikChange® n'a pas fonctionné. L'utilisation d'un autre protocole, protocole In-Fusion, a permis l'obtention d'un plasmide H7 Δ ATG mais n'a pas fonctionné avec H1.

Pour H5, la présence de deux codons ATG espacés seulement de deux acides aminés a nécessité la réalisation d'une double mutation dirigée par la protocole QuikChange®, la premier ATG a été changé en TAA, le second en CAA (glutamine).

Le séquençage avec les deux amorces de sens inverse a permis d'exclure la présence de substitution, d'insertion ou de délétion au niveau du gène HA dans les plasmides Δ ATG par rapport aux plasmides initiaux.

b. Production de virus dont le segment HA est non fonctionnel par trans-complémentation

i. Matériel et méthode

La méthode utilisée est la technique décrite dans la figure 6 et détaillée dans la partie I.g. La technique de génétique inverse est employée pour produire des virions, elle est associée à une méthode de transcomplémentation avec une HA fonctionnelle, le gène HA transfecté étant muté Δ ATG.

Dans notre étude, les plasmides sont transfectés dans des co-cultures de cellules 293T et de cellules MDCK (Madin Darby Canine Kidney) exprimant une HA. Ce sont des cellules transduites par un vecteur lentiviral qui expriment la HA3 de manière stable car elles l'ont intégrée dans leur génome. Ces cellules nous ont été fournies par Monsieur Townsend (Université d'Oxford, Royaume-Uni).

Les transfections sont réalisées en co-culture de 293T et MDCK HA3 préparée la veille de la manipulation. La monoculture 293T ne permet pas la réplication du virus HA Δ ATG obtenu par génétique inverse lors de transfection car les cellules 293T supportent mal la trypsine qui est ajoutée dans le milieu pour permettre la maturation de la HA trans-complémentante. C'est pourquoi un protocole avec de la co-culture de

293T et de MDCK HA a été utilisé. Les cellules 293T présentent l'avantage d'être de meilleures cellules transfectables par rapport aux cellules MDCK HA. Les cellules MDCK HA sont moins fragiles que les cellules 293T. Les cellules MDCK HA permettent une réplication du virion HAΔATG.

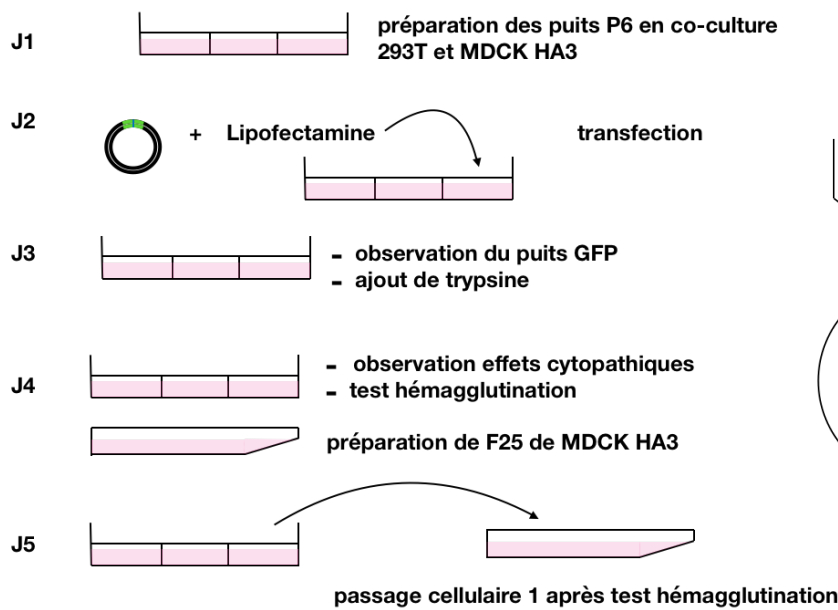


Figure 10 A : protocole

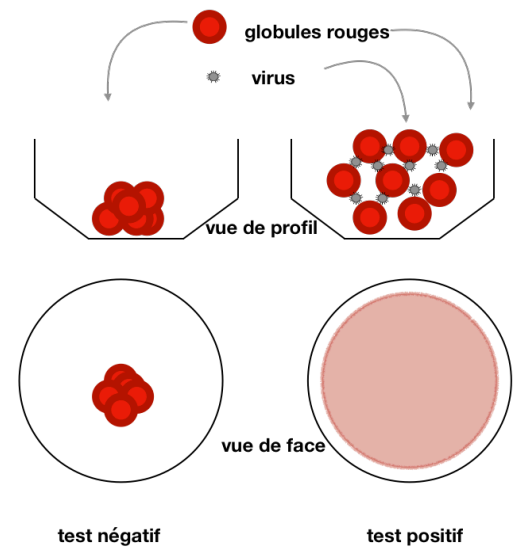


Figure 10 B : test d'hémagglutination

Figure 9 : expérience de génétique inverse

Les différents plasmides sont mélangés et du PlusReagent est ajouté. Dans un autre Eppendorf, la LTX (lipofectamine) est diluée dans de l'OptiMEM. Les plasmides et la LTX sont réunis. Après chaque mélange, un temps d'attente à température ambiante est observé. Le milieu de culture cellulaire est changé juste avant la transfection. 24h après la transfection, le puits de contrôle (GFP) de la transfection est vérifié par microscopie fluorescente et de la trypsine est ajoutée (figure 10 A).

La présence de virus est déterminée par l'observation d'effet cytopathique sur les cellules et par un test d'hémagglutination (figure 10 B). L'HA présente à la surface des virus interagit avec une glycoprotéine (acide sialique) à la surface des globules rouges. Cela crée une agglutination des hématies qui ne sédimentent pas au fond du puits. Le

test d'hémagglutination mélange le surnageant des cultures cellulaires et des érythrocytes de poulet dans des puits. Après 30 à 40 min, les puits contenant du virus ne sont pas sédimentés. Des tests d'hémagglutination avec des dilutions successives permettent de titrer la quantité de virus.

Après la transfection, nous avons réalisé un passage cellulaire sur des cellules MDCK-HA3 préparées dans des flasques F25 :

- Si le puits a réagi au test d'hémagglutination après la transfection, nous avons réalisé ce premier passage dans le but de répliquer et d'amplifier le virus obtenu ;
- Quand le test d'hémagglutination est négatif, nous avons quand même réalisé une première inoculation sur des cellules MDCK-HA dans l'hypothèse où le seuil de détection viral par le test d'hémagglutination n'était pas atteint. Le but était de répliquer le virus et de l'amplifier.

ii. Résultats

Nous avons effectué successivement quatre expériences. Pour chacune, nous avons réalisé différentes conditions. Pour la présentation et l'exploitation des résultats, le puits numéro 1 de l'expérience 1 est nommé puits 1.1, le puits numéro 2 de l'expérience 1 est nommé puits 1.2.

Les puits GFP servent de contrôle de la transfection, 2 µg de plasmide sont transfectés par puits. Ils servent également de témoin négatif.

La quantité d'ADN transfectée par plasmide est de 500 ng, sauf dans le puits 3.2 où seulement 300 ng par plasmide ont été transfectés.

- Expérience 1

Dans l'expérience 1, les puits 1.1 à 1.6 sont transfectés sur une co-culture de cellules 293T et MDCK-HA3 et les puits 1.7 à 1.10 sur une mono-culture 293T seulement.

Dans les puits 1.1 et 1.7, nous avons transfecté les 8 plasmides pHW2000-PR8 contenant chacun un segment d'IA (PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M et NS). Dans le puits 1.2, nous avons transfecté les 8 plasmides pHW2000-H7N1-977 contenant chacun un segment d'IA (PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M et NS). Ces trois puits sont des témoins positifs.

Dans le puits 1.3, nous avons transfecté les 8 plasmides pHW2000-PR8 contenant chacun un segment d'IA (PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M et NS) et le plasmide pcDNA-HA3. Ce puits sert aussi de contrôle positif. Il permet de vérifier que l'ajout de pcDNA-HA3, plasmide exprimant HA ne bloque pas la production de virions.

Dans les puits 1.4 et 1.9, nous avons transfecté 7 plasmides pHW2000-PR8 (PB1, PB2, PA, NP, NA, M et NS), le plasmide pHW2000 – HA3 Δ ATG et le plasmide pcDNA-HA3. Les puits 1.4 et 1.9 correspondent à nos puits test.

Dans les puits 1.5 et 1.8, nous nous avons transfecté 7 plasmides pHW2000-PR8 (PB1, PB2, PA, NP, NA, M et NS), le plasmide pHW2000 – HA3 Δ ATG sans le plasmide pcDNA-HA3. Le puits 1.5 (co-culture 293T et MDCK-HA3) est un puits visant à évaluer si les plasmides qui pourraient entrer dans les cellules MDCK-HA3 permettraient de mener à la production de virus sans le pcDNA-HA3. Le puits 1.8 (mono-culture 293T) est un contrôle négatif. Il permet de s'assurer que la HA Δ ATG ne s'exprime pas quand il n'y a pas de HA trans-complémentante fournie par le pcDNA-HA3.

Dans le puits 1.6 et le puits 1.10, nous avons transfecté de la GFP. Ils servent de contrôle de la transfection et aussi de contrôle négatif.

Expérience 1 - puit n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Plasmides	293T + MDCK HA3						293T			
phW 2000 - PB2 - PR8 -P1	X		X	X	X		X	X	X	
phW 2000 - PB1- PR8 –P2	X		X	X	X		X	X	X	
phW 2000 - PA - PR8 – P3	X		X	X	X		X	X	X	
phW 2000 - HA - PR8 - P4	X		X				X			
phW 2000 - NP - PR8 - P5	X		X	X	X		X	X	X	
phW 2000 - NA - PR8 - P6	X		X	X	X		X	X	X	
phW 2000 - M - PR8 - P7	X		X	X	X		X	X	X	
phW 2000 - NS - PR8 - P8	X		X	X	X		X	X	X	
phW_H7N1_977_PB2		X								
phW_H7N1_977_PB1		X								
phW_H7N1_977_P1		X								
phW_H7N1_977_HA wt		X								
phW_H7N1_977_NP		X								
phW_H7N1_977_NA		X								
phW_H7N1_977_M		X								
phW_H7N1_977_NS		X								
phW_perth09_HA ΔATG				X	X			X	X	
pcDNA – HA 3			X	X					X	
phW 2000 - NA 2 - Perth										
pmax - GFP						X				X

Tableau 3 : conditions réalisées dans l'expérience 1

Pour les puits 1.7 à 1.10, la transfection sur des cellules 293T seules est suivie d'un premier passage sur des cellules MDCK HA3 puis d'un test d'hémagglutination. Les cellules 293T se sont décollées dans les 24h qui suivent la transfection.

Le puits 1.10 ne présente qu'une très faible fluorescence. La transfection en cellules 293T seules a peu marché. Aucun virus n'a été détecté par le test d'hémagglutination, y compris dans le puits témoin positif (1.7).

Le puits 1.6 a montré une forte fluorescence par microscopie fluorescente, environ 95% des cellules expriment la GFP. La transfection a fonctionné dans les puits 1.1 à 1.6 en co-culture 293T et MDCK HA3. Peu d'effet cytopathique est observé dans les puits 1.1 à 1.6.

Le test d'hémagglutination a mis en évidence la présence de virus dans les puits 1.1 à 1.5. Le puits 1.6, témoin négatif, est négatif. L'obtention de virus dans le puits 1.5 confirme l'expression de HA3 par les cellules MDCK et suggère que les plasmides de

généétiques inverses sont rentrés efficacement dans ces cellules. Cette première expérience nous permet d'obtenir des virions avec une séquence H3 Δ ATG associée à sept segments PR8 (figure 11).

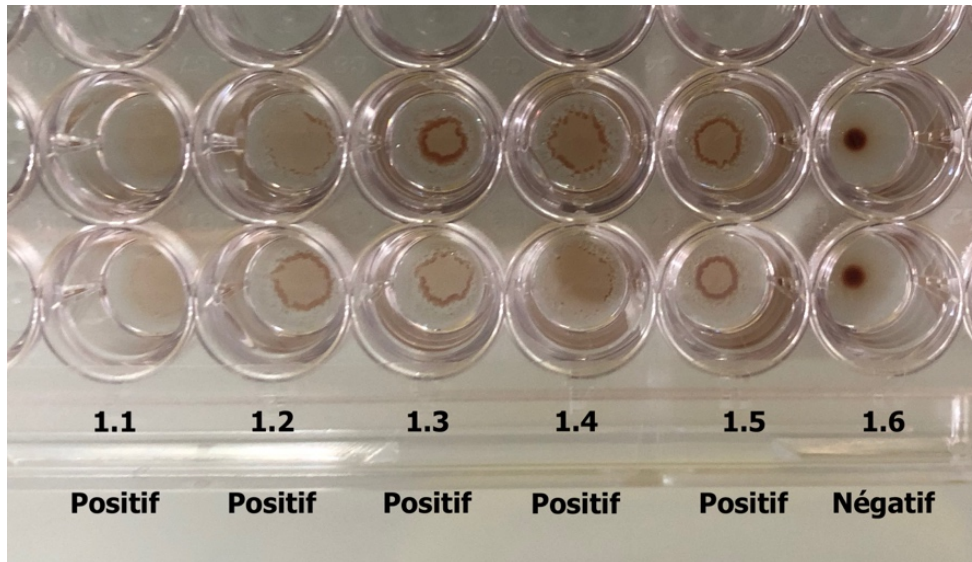


Figure 10 : test d'hémagglutination puits 1.1 à 1.6

1.1 = témoin positif (8PR8), 1.2 = témoin positif (8H7N1),
1.3 = 8PR8 + pCDNA HA, 1.4 = 7PR8 + HA3 Δ ATG + pCDNA HA,
1.5 = 7PR8 + HA3 Δ ATG, 1,6 = pmaxGFP

Après une inoculation sur des cellules MDCK-HA3, aucun titre viral n'est détecté sur tous les puits 1.1 à 1.6 par le test d'hémagglutination.

Conclusion

La transfection en co-culture permet d'obtenir du virus mais l'inoculation sur des cellules MDCK-HA3 ne permet pas l'amplification de ce virus. Une de nos hypothèses pour expliquer l'absence d'amplification du virus produit est que la balance HA/NA n'est pas optimale. La NA et l'HA fonctionnent de manière complémentaire. L'équilibre entre ces deux protéines est important pour la multiplication et la transmission virale (55).

- Expérience 2

Dans l'expérience 2, les puits 2.1 à 2.5 sont transfectés sur une co-culture de cellules 293T et MDCK-HA3 et les puits 2.6 à 2.10 sur une co-culture 293T et MDCK n'exprimant pas HA.

Comme pour l'expérience 1, les puits 2.1 et 2.6 sont les puits témoins positifs, ils sont transfectés avec les 8 plasmides phW2000-PR8 contenant chacun un segment d'IA (PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M et NS).

Les puits 2.2 et 2.7, sont des puits test. Ils sont transfectés avec 6 plasmides phW2000-PR8 (PB1, PB2, PA, NP, M et NS), le plasmide phW2000-NA2, le plasmide phW2000-HA3 Δ ATG, respectivement phW2000-HA7 Δ ATG, et le plasmide pcDNA-HA3.

Les puits 2.3 et 2.8, sont des puits test. Ils sont transfectés avec 6 plasmides phW2000-PR8 (PB1, PB2, PA, NP, M et NS), le plasmide phW2000-NA2, le plasmide phW2000-HA7 Δ ATG, et le plasmide pcDNA-HA3.

Le plasmide phW2000-NA2 contient le segment NA complémentaire de HA3 exprimé par les cellules MDCK-HA3 et le plasmide pcDNA-HA3. Il est utilisé afin de respecter la balance HA3/NA2.

Dans les puits 2.4 et 2.9, nous avons transfecté les 6 plasmides phW2000-PR8 (PB1, PB2, PA, NP, M et NS), le plasmide phW2000-NA2, et le plasmide phW2000-HA3 wt. Ces puits servent aussi de contrôle positif. Ils permettront d'obtenir des virions IA HA3 wt avec les mêmes autres segments que les virions IA HA3 Δ ATG du puits 2.2 ou 2.7. Cela permet d'avoir un couple de virus et après séquençage de comparer les mutations induites et le taux de mutation.

Dans le puits 2.10, nous avons transfecté les 6 plasmides phW2000-PR8 (PB1, PB2, PA, NP, M et NS), le plasmide phW2000-H7N1-977-NA, et le plasmide phW2000-HA7 wt. Ce puits sert aussi de contrôle positif. Il a le même but que les puits 2.4 et 2.9.

Le puits 2.5 est transfecté avec de la GFP. Il sert de contrôle de la transfection et aussi de contrôle négatif.

Expérience 2 - puit n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Plasmides	293T + MDCK HA3					293T + MDCK				
phW 2000 - PB2 - PR8 -P1	X	X	X	X		X	X	X	X	X
phW 2000 - PB1- PR8 -P2	X	X	X	X		X	X	X	X	X
phW 2000 - PA - PR8 - P3	X	X	X	X		X	X	X	X	X
phW 2000 - HA - PR8 - P4	X					X				
phW 2000 - NP - PR8 - P5	X	X	X	X		X	X	X	X	X
phW 2000 - NA - PR8 - P6	X					X				
phW 2000 - M - PR8 - P7	X	X	X	X		X	X	X	X	X
phW 2000 - NS - PR8 - P8	X	X	X	X		X	X	X	X	X
phW_H7N1_977_HA_wt										X
phW_H7N1_977_NA										X
phW_H7N1_977_HA_ΔATG			X					X		
phW_perth09_HA_wt				X					X	
phW_perth09_HA_ΔATG		X					X			
pcDNA – HA 3		X	X				X	X		
phW 2000 - NA 2 - Perth		X	X	X			X	X	X	
pmax - GFP					X					

Tableau 4 : conditions réalisées dans l'expérience 2

Le puits GFP présente une forte fluorescence (puits 2.5, environ 90 % des cellules expriment la GFP). Peu d'effets cytopathiques ont été observés.

Seuls les puits 2.1, 2.3 et 2.10 se sont révélés positifs au test d'hémagglutination. Le témoin positif 2.6 n'a pas fonctionné ainsi que les puits 2.4 et 2.9, transfectés avec un HA3 wt. Comme aucun puits GFP n'a été réalisé dans le cas de la co-culture 293T MDCK, la qualité de la transfection sur cette co-culture ne peut pas être vérifiée.

Cette seconde expérience permet d'acquérir du virus avec une HA H7ΔATG, une NA2 et six segments PR8 ainsi que du virus avec la souche HAH7 wt associée à un segment NA issu du plasmide phW2000-H7N1-977 et à six segments PR8.

Après cette transfection, aucun passage cellulaire sur MDCK-HA3 n'a permis de conserver le virus obtenu.

Conclusion

La production de virus n'a pas fonctionné à chaque fois, et l'inoculation sur des cellules MDCK-HA n'a pas permis l'amplification des virions produits.

- Expérience 3

Dans l'expérience 3, les puits sont transfectés sur une co-culture de cellules 293T et MDCK-HA3.

Les puits 3.3 et 3.4 sont des puits contrôles positifs transfectés avec 8 plasmides contenant chacun un segment d'IA (PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M et NS). Dans le puits 3.3, nous avons transfecté les 6 plasmides phW2000-PR8 (PB1, PB2, PA, NP, M et NS) avec le plasmide H7 wt et le plasmide NA associé (phW200-H7N1-977-NA). Le puits 3.4 est transfecté avec les 8 plasmides phW200-H7N1-977.

Le puits 3.5 est le puits transfecté avec le plasmide contenant la GFP, puits contrôle de la transfection et aussi témoin négatif.

Les puits 3.1 et 3.2 sont transfectés avec 6 plasmides phW2000-PR8 (PB1, PB2, PA, NP, M et NS), le plasmide phW2000-NA2, le plasmide phW2000-HA7 Δ ATG, et le plasmide pcDNA-HA3. Pour le puits 3.1, la quantité par plasmide transfectée est de 500 ng alors que pour le puits 3.2, seulement 300 ng de chaque plasmide a été transfecté.

Expérience 3 - puit n°	1	2	3	4	5
Plasmides	293T + MDCK HA3				
phW 2000 - PB2 - PR8 -P1	X	X	X		
phW 2000 - PB1- PR8 -P2	X	X	X		
phW 2000 - PA - PR8 - P3	X	X	X		
phW 2000 - NP - PR8 - P5	X	X	X		
phW 2000 - M - PR8 - P7	X	X	X		
phW 2000 - NS - PR8 - P8	X	X	X		
phW_H7N1_977_PB2				X	
phW_H7N1_977_PB1				X	
phW_H7N1_977_P1				X	
phW_H7N1_977_HA wt			X	X	
phW_H7N1_977_NP				X	
phW_H7N1_977_NA			X	X	
phW_H7N1_977_M				X	
phW_H7N1_977_NS				X	
phW_H7N1_977_HA ΔATG	X	X			
pcDNA – HA 3	X	X			
phW 2000 - NA 2 - Perth	X	X			
pmax - GFP					X

Tableau 5 : conditions réalisées dans l'expérience 3

Seulement 40% des cellules ont exprimé la GFP, la transfection a moins bien fonctionné. Le test d'hémagglutination est revenu négatif pour chaque puits.

Après une inoculation sur des cellules MDCK-HA3, aucun titre viral n'est détecté sur tous les puits 3.1 à 3.5 par le test d'hémagglutination.

Conclusion

Un bon taux de transfection est nécessaire à la production de virus.

- Expérience 4

Dans l'expérience 4, les puits sont transfectés sur une co-culture de cellules 293T et MDCK-HA3.

Le puits 4.1 est un puits test. Il est transfecté avec 6 plasmides phW2000-PR8 (PB1, PB2, PA, NP, M et NS), le plasmide phW2000-NA2, le plasmide phW2000-HA7 Δ ATG, et le plasmide pcDNA-HA3.

Le puits 4.2 est transfecté avec 6 plasmides phW2000-PR8 (PB1, PB2, PA, NP, M et NS), le plasmide phW2000-HA7 Δ ATG, et le plasmide pcDNA-HA3. C'est un puits témoin négatif car il manque le segment NA.

Le puits 4.3 est le puits transfecté avec le plasmide contenant la GFP, puits contrôle de la transfection.

Expérience 4 - puit n°	1	2	3
Plasmides	293T + MDCK HA3		
phW 2000 - PB2 - PR8 -P1	X	X	
phW 2000 - PB1- PR8 -P2	X	X	
phW 2000 - PA - PR8 - P3	X	X	
phW 2000 - NP - PR8 - P5	X	X	
phW 2000 - M - PR8 - P7	X	X	
phW 2000 - NS - PR8 - P8	X	X	
phW H7N1 977 HA Δ ATG	X	X	
pcDNA – HA 3	X	X	
phW 2000 - NA 2 - Perth	X		
pmax - GFP			X

Tableau 6 : conditions réalisées dans l'expérience 4

Le puits 4.3 a montré une forte fluorescence par microscopie fluorescente, environ 90% des cellules expriment la GFP. Peu à pas d'effet cytopathique est observé dans les puits 4.1 et 4.2.

Le test d'hémagglutination a mis en évidence la présence de virus dans le puits 4.1. Le puits 4.2, témoin négatif, est négatif. Cette quatrième expérience nous permet d'obtenir des virions avec une séquence H7 Δ ATG associée à six segments PR8, et à NA2 complémentaire de HA3.

Après la transfection, le passage cellulaire sur MDCK-HA3 n'a pas permis de conserver le virus obtenu.

Conclusion

Cette expérience a permis de produire des virions avec une HA Δ ATG mais l'amplification n'a pas fonctionné une fois de plus.

Le tableau 7 résume les différentes conditions des quatre expériences ainsi que les résultats.

Tableau 7 : résultats des différents tests réalisés.

Expérience n°	1										2										3					4						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	1	2	3				
	293T + MDCK HA3					293 T					293T + MDCK HA3					293T + MDCK					293T + MDCK HA3											
phW 2000 - PB2 - PR8 -P1	X		X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
phW 2000 - PB1- PR8 -P2	X		X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
phW 2000 - PA - PR8 - P3	X		X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
phW 2000 - HA - PR8 - P4	X		X				X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
phW 2000 - NP - PR8 - P5	X		X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
phW 2000 - NA - PR8 - P6	X		X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
phW 2000 - M - PR8 - P7	X		X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
phW 2000 - NS - PR8 - P8	X		X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
phW_H7N1_977_PB2	X																										X					
phW_H7N1_977_PB1	X																										X					
phW_H7N1_977_P1	X																										X					
phW_H7N1_977_HA wt	X																										X					
phW_H7N1_977_NP	X																										X					
phW_H7N1_977_NA	X																										X					
phW_H7N1_977_M	X																										X					
phW_H7N1_977_NS	X																										X					
phW_H7N1_977_HA_ΔATG																											X					
phW_perth09_HA wt																																
phW_perth09_HA_ΔATG				X	X			X	X																							
pcDNA – HA 3			X	X																												
phW 2000 - NA 2 - Perth																																
pmax - GFP						X				X																	X					
Présence de virus : test hémagglutination (O = oui ; N = Non ; / = non réalisé)																																
Après la transfection	O	O	O	O	O	N	N	N	N	N	O	N	O	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Après 1 ^{er} passage cellulaire	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

III. Discussion

La mutagénèse dirigée sur des plasmides contenant le génome de l'HA de virus influenza a pour objectif d'obtenir des segments HA ne comportant pas de codon départ et n'étant donc pas traduits. Le protocole de mutagénèse QuikChange® n'a pas fonctionné avec le plasmide contenant H1 et H7. Dans le manuel d'instruction du kit QuikChange (53), les causes d'échec sont citées et les solutions possibles expliquées. Comme aucune colonie n'a poussé après la transformation, nous avons commencé par refaire nos gels d'Agarose et par utiliser des bactéries plus compétentes. Nous avons aussi vérifié que les amorces conçues s'hybrident bien avec la séquence du plasmide. Les quelques colonies obtenues ne présentaient pas la mutation, le produit de PCR a alors été redigéré par l'enzyme de DpnI. Notre protocole de mutagénèse ne comporte pas de témoin, nous ne pouvons pas exclure que les paramètres du cycle PCR ne soient pas bien réglés. Plusieurs aligots de dNTP (Désoxyribonucléoside Triphosphate) sont réalisés pour limiter la décongélation / congélation. Comme le nombre de mutations est assez important, nous avons choisi de changer de protocole et d'utiliser le protocole In-Fusion®. Ce protocole est indiqué quand le nombre de substitutions est important. Ce protocole a permis l'obtention d'un plasmide H7 Δ ATG mais H1 n'a pas fonctionné avec le protocole In-Fusion®. L'ajout d'un témoin de PCR semble indispensable pour s'assurer du bon fonctionnement du protocole.

Nous avons réussi à produire quelques virions Δ ATG avec le protocole de génétique inverse. Cependant, nous n'obtenions pas systématiquement des virus Δ ATG et les passages cellulaires ne permettaient pas d'amplifier le virus obtenu. Une des hypothèses de cette absence d'amplification est que les cellules MDCK HA n'expriment pas assez l'HA3. Un travail ultérieur a étudié l'expression de HA par des cellules MDCK HA et essayé de sur-exprimer HA. Les cellules étudiées sont des cellules fournies aussi par Monsieur Townsend (université d'Oxford). Ces cellules expriment HA1. Dans cette étude, l'expression de HA a été comparée chez des MDCK wt non infectées, des MDCK wt infectées par le virus IA PR8, des MDCK HA1, et des MDCK-Flp-In™T-REx™HA1, cellules ayant reçu de la doxycycline à deux concentrations différentes pour induire l'expression de HA. Flp-In est un vecteur d'expression permettant une forte expression du gène qui nous intéresse, T-REX est un système permettant de réguler l'expression de protéines ayant pour promoteur

CMV. Cela permet une expression forte contrôlée par la doxycycline. Ainsi, les cellules MDCK Flp-In™ T-REx™ HA1 sur-expriment HA1 en présence de doxycycline. La quantification de l'expression d'HA a été réalisée en comparant l'intensité des bandes obtenues par Western blot (figure 12).

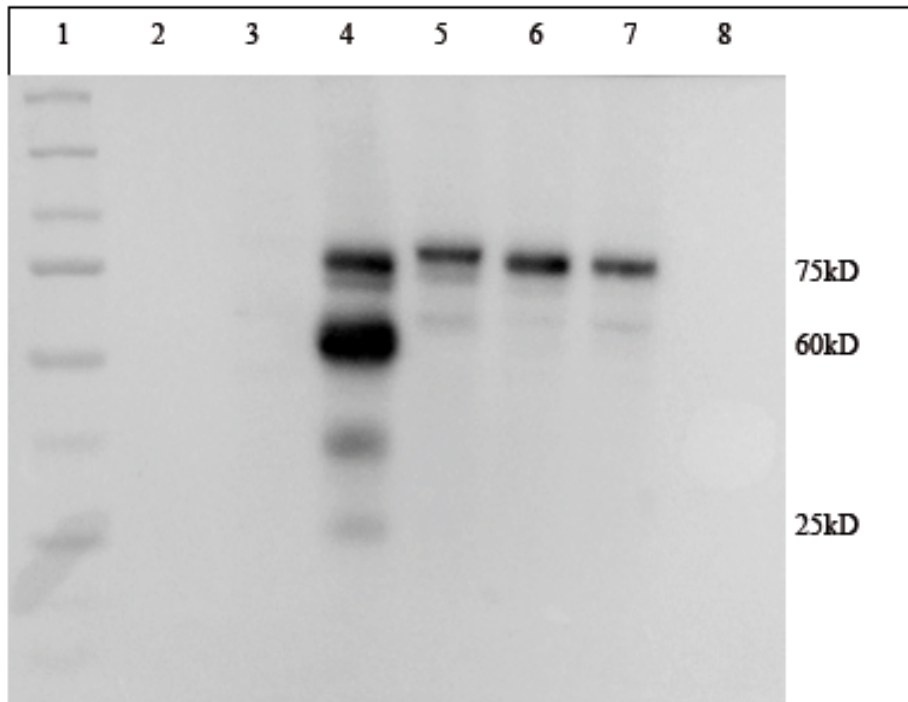


Figure 11 : Western blot des différents lysats cellulaires

1 = Échelle de protéine, 2 = Bleu de Laemmli, 3 = MDCK non infectées,
 4 = MDCK wt infectées par le virus IA PR8, 5 = MDCK HA1,
 6 = MDCK-Flp-In™ T-REx™ HA1 + dox 1µg/mL,
 7 = MDCK-Flp-In™ T-REx™ HA1 + dox 0,2µg/mL

Les résultats montrent une expression de HA beaucoup moins importante dans les cellules MDCK exprimant HA que lorsqu'un virus infecte une cellule.

Une autre hypothèse expliquant l'absence d'amplification lors d'utilisation de souches avec une HA non mutée est la compétition entre les HA. Dans l'expérience 1, les puits 1.1, 1.2 et 1.3 ont la particularité d'exprimer plusieurs HA, une HA issue des cellules MDCK, une HA du plasmide transfecté (PR8 ou H7N1 977) et pour le puits 1.3, en plus une HA3 issue du plasmide pcDNA. Lors de la transfection, des virions ont été détectés mais un premier passage cellulaire sur des cellules MDCK HA n'a pas permis

de conserver le virus obtenu. La présence de cellules 293T peut être à l'origine de la réplication du néo-virus. Pour étudier cela, il serait intéressant de comparer la quantité de virus produite sur des co-cultures 293T avec MDCK HA et des 293T avec MDCK n'exprimant pas HA sur des expériences de génétique inverse avec un plasmide HA wt ou Δ ATG. Dans notre étude, nous avons détecté la présence de virus hémagglutinant mais nous n'avons pas réalisé de titrage. La comparaison des quantités de virus produites, obtenues par titrage, a pour but de déterminer si la présence de multiples protéines HA exprimées crée une compétition entre les HA.

De nouvelles expériences seraient intéressantes à réaliser dans le cadre de notre étude. Il faudrait essayer de voir si une transfection transitoire des cellules MDCK avec un plasmide pcDNA-HA ne permettrait pas d'obtenir un taux d'HA plus élevé. Dans un premier temps, comparer par western blot la quantité de HA produite par rapport à des MDCK infectées par un virus influenza. Ensuite, si l'expression de HA est satisfaisante, ces cellules pourraient servir pour les passages cellulaires.

La puissance du séquençage haut débit détecte les événements rares et permet de détecter les mutations d'un nucléotide du gène HA. Wu *et al.* a étudié une technique de séquençage avec une PCR en deux étapes. Les deux étapes servent à exclure les mutations induites par des erreurs de séquençage. Dans sa méthode, 98% du gène HA est séquencé, les 2% restant correspondent aux extrémités de l'HA (56). Une méthode alternative est d'utiliser un plasmide HA sauvage, non muté Δ ATG et d'étudier les séquences en HA de virus après plusieurs inoculations cellulaires et d'étudier les sites de mutations préférentiels. Les virus exprimeront ainsi leur propre HA fonctionnelle. Le protocole de génétique inverse ne nécessitera donc plus de transcomplémentation. Dans ce cas, les mutations viables seront préférentiellement détectées par séquençage haut-débit. Les autres étant délétères seront moins fréquentes.

Une autre méthode permettant l'étude des mutations de l'HA est l'utilisation de mini-génome. Un plasmide contenant le gène HA est transfecté dans des cellules avec des plasmides contenant des polymérase (PB1, PB2, PA et NP) pour permettre la traduction en protéine. L'intérêt de cette technique est la facilité de réalisation. Elle présente aussi l'avantage de ne subir aucune pression de sélection sur la HA

puisque aucune particule virale infectieuse n'est produite. Cette technique présente un inconvénient majeur : il n'est pas possible de transmettre ce gène ni de l'amplifier, l'utilisation de plasmide source de HA confère une stabilité à la source de matériel génétique. Les mutations détectées ne peuvent donc pas s'accumuler.

Le site du clivage a un rôle important dans le phénotype d'un virus. Pour certains virus HP, le site de clivage n'est pas polybasique mais le phénotype et la mortalité correspondent à un virus HPAI. Cependant d'autres virus présentent ce site polybasique associé à une clinique peu virulente. La présence d'un site polybasique n'est pas systématiquement suffisant pour passer d'un virus LPAI à un HPAI(21,26). La virulence d'une souche n'est pas déterminée uniquement par la présence d'un site de clivage polybasique. La NA a aussi un rôle déterminant dans l'expression du phénotype. NA est complémentaire de HA. Les gènes HA/NA ont co-évolué (57,58). Pour maximiser les chances de réussite de nos expériences de génétique inverse, respecter l'équilibre HA / NA semble nécessaire, c'est pourquoi à partir de l'expérience 2, nous avons changé le plasmide exprimant NA pour une NA2 correspondant à l'HA3 exprimée par les cellules MDCK. En effet, des études se sont penchées sur l'importance de NA dans le cycle cellulaire. Les protéines HA et NA ont des effets antagonistes, les deux sont nécessaires à la réalisation d'un cycle viral mais leurs activités respectives (affinité de HA pour les acides sialiques, versus activité sialidase pour la neuraminidase) doivent être équilibrée.

L'importance de ce site de clivage polybasique a été montrée chez les oiseaux. D'autres études révèlent que la présence de ce site n'est pas un facteur de virulence chez toutes les espèces, notamment chez les primates (34). Le site de clivage est un paramètre fortement étudié chez les virus enveloppés car il permet la fusion des membranes cellulaires et l'entrée dans la cellule hôte. Le clivage d'une protéine virale est réalisé par des protéases de l'hôte. Souvent une séquence particulière d'acide aminé basique est reconnue par les protéases cellulaires. Par exemple, la maladie de Newcastle chez la volaille est transmise par un virus dont la virulence est déterminée par le site de clivage. La modification de deux acides aminés basiques du site de clivage (K et R) en acide aminé neutre (G) permet l'atténuation de la souche (59,60). L'étude des coronavirus révèle que la protéine impliquée dans l'entrée des virus dans les cellules est la protéine S, clivée en S1 et S2. Les souches hautement pathogènes

retrouvées chez l'homme comme le SARS-CoV-2 à l'origine de la pandémie humaine de 2019 présentent un site de clivage multibasique. La protéine S du SARS-CoV-2 est clivée par la furine, protéase omniprésente chez l'homme (61,62).

Chaque année le vaccin contre la grippe doit être modifié en raison des mutations génétiques fréquentes et rapides pour correspondre aux souches circulantes. Cependant l'efficacité du vaccin ne peut pas être totale, de nouvelles souches pouvant émerger à tout moment (63). Afin de développer de nouveaux traitements antiviraux contre les virus influenza, d'autres méthodes de traitement de la grippe sont actuellement en cours d'analyse et s'intéressent aux protéases impliquées dans l'entrée des virus dans les cellules hôtes. Ces études s'intéressent à l'utilisation d'inhibiteurs des protéases. Pour les virus comme les virus influenza ou le coronavirus infectant les cellules épithéliales de la muqueuse respiratoire, les chercheurs étudient la protéase transmembranaire sérine 2 appartenant à la famille des subtilisines (64). L'utilisation d'inhibiteurs de protéases est une des pistes actuellement étudiée pour traiter les patients atteints de SARS-CoV-2. Lors de l'épidémie de SARS-CoV-1 (2005) et de MERS-CoV (2015), les protéases de type papaïne et de type C3 étaient la cible de traitement antiviraux expérimentaux (65).

IV. Conclusion

Les mutations du virus IA et surtout de l'HA ont des enjeux sanitaire et économique majeurs. L'objectif était de créer une méthode d'analyse des mutations de l'HA. Pour cela, nous avons voulu étudier les insertions, délétions et substitutions induites lors de passages cellulaires avec une HA non fonctionnelle. Ce travail a permis d'obtenir des virus par génétique inverse et complémentation en HA mais pour le moment, aucune amplification n'a fonctionné. Quand ce système marchera, il permettra d'étudier l'influence de l'environnement nucléotidique HA sur le taux de mutation du site de clivage, de déterminer si certaines zones du gène présentent des mutations de manière plus fréquente et si certains schémas génétiques, notamment la structure tige / boucle, du gène favorisent les mutations.

D'autres expériences doivent être réalisées pour compléter notre étude, notamment sur l'expression d'une HA par les cellules MDCK permettant la réplication du virus avec une HA mutée ne s'exprimant pas.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, Romain VOLMER, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Anne COCHU** intitulée « **Développement d'une méthode d'analyse de l'évolution de l'hémagglutinine des virus influenza aviaries** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 20/10/2020
Enseignant-chercheur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Docteur Romain VOLMER



Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
M. Pierre SANS




Vu :
Le Président du jury
Professeur Christophe PASQUIER



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université Paul Sabatier
M. Jean-Marc BROTO




Le Président de l'Université Paul Sabatier,
M. Jean-Marc BROTO

Mme Anne COCHU
a été admis(e) sur concours en : 2015
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le: 09/09/2019
a validé son année d'approfondissement le: 24/09/2020
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

V. Bibliographie

1. Hause BM, Collin EA, Liu R, Huang B, Sheng Z, Lu W, et al. Characterization of a novel influenza virus in cattle and Swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *mBio*. 4 mars 2014;5(2):e00031-00014.
2. Contreras-Gutiérrez MA, Nunes MRT, Guzman H, Uribe S, Gallego Gómez JC, Suaza Vasco JD, et al. Sinu virus, a novel and divergent orthomyxovirus related to members of the genus Thogotovirus isolated from mosquitoes in Colombia. *Virology*. janv 2017;501:166-75.
3. Krossøy B, Hordvik I, Nilsen F, Nylund A, Endresen C. The putative polymerase sequence of infectious salmon anemia virus suggests a new genus within the Orthomyxoviridae. *J Virol*. mars 1999;73(3):2136-42.
4. Te Velthuis AJW, Fodor E. Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(8):479-93.
5. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*. mars 1992;56(1):152-79.
6. Portela A, Digard P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol*. avr 2002;83(Pt 4):723-34.
7. Mullin AE, Dalton RM, Amorim MJ, Elton D, Digard P. Increased amounts of the influenza virus nucleoprotein do not promote higher levels of viral genome replication. *J Gen Virol*. déc 2004;85(Pt 12):3689-98.
8. Fouchier RAM, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*. mars 2005;79(5):2814-22.
9. Tong S, Li Y, Rivailler P, Conrardy C, Castillo DAA, Chen L-M, et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13 mars 2012;109(11):4269-74.
10. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog*. 2013;9(10):e1003657.
11. Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, et al. Influenza. *Nat Rev Dis Primer*. 28 2018;4(1):3.
12. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*. 18 juin 2009;459(7249):931-9.
13. Poen MJ, Fouchier RAM, Webby RJ, Webster RG, El Zowalaty ME. Evidence of the Presence of Low Pathogenic Avian Influenza A Viruses in Wild Waterfowl in 2018 in South Africa. *Pathog Basel Switz*. 25 sept 2019;8(4).
14. Smietanka K, Minta Z, Włodarczyk R, Wyrostek K, Józwiak M, Olszewska M, et al. Avian influenza viruses in wild birds at the Jeziorsko reservoir in Poland in 2008-2010. *Pol J Vet Sci*. 2012;15(2):323-8.
15. Wahlgren J. Influenza A viruses: an ecology review. *Infect Ecol Epidemiol*. 2011;1.
16. Alexander DJ. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine*. juill 2007;25(30):5637-44.
17. Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol*. sept 1998;72(9):7367-73.
18. CFSPH. OIE- Highly pathogenic Avian Influenza [Internet]. 2016 [cité 28 juill 2020]. Disponible sur: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/HPAI.pdf

19. Luczo JM, Stambas J, Durr PA, Michalski WP, Bingham J. Molecular pathogenesis of H5 highly pathogenic avian influenza: the role of the haemagglutinin cleavage site motif. *Rev Med Virol.* nov 2015;25(6):406-30.
20. Scheibner D, Ulrich R, Fatola OI, Graaf A, Gischke M, Salaheldin AH, et al. Variable impact of the hemagglutinin polybasic cleavage site on virulence and pathogenesis of avian influenza H7N7 virus in chickens, turkeys and ducks. *Sci Rep.* 09 2019;9(1):11556.
21. More S, Bicout D, Bøtner A, Butterworth A, Calistri P, Depner K, et al. Avian influenza overview. *EFSA J Eur Food Saf Auth.* 17 oct 2017;
22. Kido H, Okumura Y, Takahashi E, Pan H-Y, Wang S, Chida J, et al. Host envelope glycoprotein processing proteases are indispensable for entry into human cells by seasonal and highly pathogenic avian influenza viruses. *J Mol Genet Med Int J Biomed Res.* 29 nov 2008;3(1):167-75.
23. Bogs J, Veits J, Gohrbandt S, Hundt J, Stech O, Breithaupt A, et al. Highly pathogenic H5N1 influenza viruses carry virulence determinants beyond the polybasic hemagglutinin cleavage site. *PloS One.* 27 juill 2010;5(7):e11826.
24. Horimoto T, Kawaoka Y. Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus. *J Virol.* mai 1994;68(5):3120-8.
25. Pauly MD, Procaro MC, Lauring AS. A novel twelve class fluctuation test reveals higher than expected mutation rates for influenza A viruses. *eLife.* 09 2017;6.
26. Mathilde Richard, Fouchier R, Monne I, Kuiken T. Mechanisms and risk factors for mutation from low to highly pathogenic avian influenza virus. 9 août 2017;
27. Tao H, Steel J, Lowen AC. Intrahost dynamics of influenza virus reassortment. *J Virol.* juill 2014;88(13):7485-92.
28. Lowen AC. Constraints, Drivers, and Implications of Influenza A Virus Reassortment. *Annu Rev Virol.* 29 2017;4(1):105-21.
29. Vijaykrishna D, Poon LLM, Zhu HC, Ma SK, Li OTW, Cheung CL, et al. Reassortment of pandemic H1N1/2009 influenza A virus in swine. *Science.* 18 juin 2010;328(5985):1529.
30. Smith GJD, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature.* juin 2009;459(7250):1122-5.
31. Chen K-Y, Santos Afonso ED, Enouf V, Isel C, Naffakh N. Influenza virus polymerase subunits co-evolve to ensure proper levels of dimerization of the heterotrimer. *PLoS Pathog.* 2019;15(10):e1008034.
32. Monne I, Fusaro A, Nelson MI, Bonfanti L, Mulatti P, Hughes J, et al. Emergence of a highly pathogenic avian influenza virus from a low-pathogenic progenitor. *J Virol.* avr 2014;88(8):4375-88.
33. Perdue ML, García M, Senne D, Fraire M. Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Res.* juin 1997;49(2):173-86.
34. Suguitan AL, Matsuoka Y, Lau Y-F, Santos CP, Vogel L, Cheng LI, et al. The multibasic cleavage site of the hemagglutinin of highly pathogenic A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) avian influenza virus acts as a virulence factor in a host-specific manner in mammals. *J Virol.* mars 2012;86(5):2706-14.
35. Horimoto T, Rivera E, Pearson J, Senne D, Krauss S, Kawaoka Y, et al. Origin and molecular changes associated with emergence of a highly pathogenic H5N2 influenza virus in Mexico. *Virology.* 20 oct 1995;213(1):223-30.
36. Abdelwhab E-SM, Veits J, Mettenleiter TC. Genetic changes that accompanied shifts of low pathogenic avian influenza viruses toward higher pathogenicity in poultry. *Virulence.*

15 août 2013;4(6):441-52.

37. Capua I, Mutinelli F, Pozza MD, Donatelli I, Puzelli S, Cancellotti FM. The 1999-2000 avian influenza (H7N1) epidemic in Italy: veterinary and human health implications. *Acta Trop.* juill 2002;83(1):7-11.

38. DRAAF. Catégorisation des dangers sanitaires [Internet]. [cité 30 juill 2020]. Disponible sur: <http://draaf.occitanie.agriculture.gouv.fr/Categorisation-des-dangers>

39. République Française. Arrêté du 18 janvier 2008 fixant des mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre l'influenza aviaire [Internet]. [cité 30 juill 2020]. Disponible sur:

<https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000017958300&fastPos=71&fastReqId=1412359884&categorieLien=cid&oldAction=rechTexte>

40. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, European Union Reference Laboratory for Avian influenza, Brown I, Mulatti P, Smietanka K, et al. Avian influenza overview October 2016-August 2017. *EFSA J Eur Food Saf Auth.* oct 2017;15(10):e05018.

41. Pasick J, Berhane Y, Hooper-McGrevy K. Avian influenza: the Canadian experience. *Rev Sci Tech Int Off Epizoot.* avr 2009;28(1):349-58.

42. Lee D-H, Criado MF, Swayne DE. Pathobiological Origins and Evolutionary History of Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 21 janv 2020;

43. Nao N, Yamagishi J, Miyamoto H, Igarashi M, Manzoor R, Ohnuma A, et al. Genetic Predisposition To Acquire a Polybasic Cleavage Site for Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Hemagglutinin. *mBio.* 14 2017;8(1).

44. Becker WB. The isolation and classification of Tern virus: influenza A-Tern South Africa--1961. *J Hyg (Lond).* sept 1966;64(3):309-20.

45. Pasick J, Robinson J, Hooper-McGrevy K, Wright P, Kitching P, Handel K, et al. The roles of national and provincial diagnostic laboratories in the eradication of highly pathogenic H7N3 avian influenza virus from the Fraser Valley of British Columbia, Canada. *Avian Dis.* mars 2007;51(1 Suppl):309-12.

46. Keawcharoen J, van Riel D, van Amerongen G, Bestebroer T, Beyer WE, van Lavieren R, et al. Wild ducks as long-distance vectors of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerg Infect Dis.* avr 2008;14(4):600-7.

47. Global Consortium for H5N8 and Related Influenza Viruses. Role for migratory wild birds in the global spread of avian influenza H5N8. *Science.* 14 2016;354(6309):213-7.

48. Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23 mai 2000;97(11):6108-13.

49. Martínez-Sobrido L, Cadagan R, Steel J, Basler CF, Palese P, Moran TM, et al. Hemagglutinin-Pseudotyped Green Fluorescent Protein-Expressing Influenza Viruses for the Detection of Influenza Virus Neutralizing Antibodies. *J Virol.* 15 févr 2010;84(4):2157-63.

50. Powell TJ, Silk JD, Sharps J, Fodor E, Townsend ARM. Pseudotyped Influenza A Virus as a Vaccine for the Induction of Heterotypic Immunity. *J Virol.* 15 déc 2012;86(24):13397-406.

51. Baz M, Boonnak K, Paskel M, Santos C, Powell T, Townsend A, et al. Nonreplicating Influenza A Virus Vaccines Confer Broad Protection against Lethal Challenge. Palese P, éditeur. *mBio.* 20 oct 2015;6(5):e01487-15.

52. Powell TJ, Rijal P, McEwen-Smith RM, Byun H, Hardwick M, Schimanski LM, et al. A single cycle influenza virus coated in H7 hemagglutinin provides heterotypic protection and neutralising antibody responses to both glycoproteins [Internet]. *Immunology*; 2017 nov [cité 30 juill 2020]. Disponible sur: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/224550>

53. Agilent Technologies. QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit [Internet]. [cité 8 sept 2019]. Disponible sur: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/200523.pdf>
54. Takara Bio USA. In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual [Internet]. [cité 15 sept 2019]. Disponible sur: https://www.takarabio.com/assets/documents/User%20Manual/In-Fusion%20HD%20Cloning%20Kit%20User%20Manual_102518.pdf
55. Gaymard A, Le Briand N, Frobert E, Lina B, Escuret V. Functional balance between neuraminidase and haemagglutinin in influenza viruses. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* déc 2016;22(12):975-83.
56. Wu NC, Young AP, Al-Mawsawi LQ, Olson CA, Feng J, Qi H, et al. High-throughput profiling of influenza A virus hemagglutinin gene at single-nucleotide resolution. *Sci Rep.* mai 2015;4(1):4942.
57. Diederich S, Berhane Y, Embury-Hyatt C, Hisanaga T, Handel K, Cottam-Birt C, et al. Hemagglutinin-Neuraminidase Balance Influences the Virulence Phenotype of a Recombinant H5N3 Influenza A Virus Possessing a Polybasic HA0 Cleavage Site. *J Virol.* nov 2015;89(21):10724-34.
58. Yen H-L, Liang C-H, Wu C-Y, Forrest HL, Ferguson A, Choy K-T, et al. Hemagglutinin-neuraminidase balance confers respiratory-droplet transmissibility of the pandemic H1N1 influenza virus in ferrets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23 août 2011;108(34):14264-9.
59. Liu H, Servan de Almeida R, Gil P, Albina E. Cleavage site of Newcastle disease virus determines viral fitness in persistent infection cells. *Vet Microbiol.* mars 2018;216:123-31.
60. Kim S-H, Chen Z, Yoshida A, Paldurai A, Xiao S, Samal SK. Evaluation of fusion protein cleavage site sequences of Newcastle disease virus in genotype matched vaccines. *PloS One.* 2017;12(3):e0173965.
61. Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, Canard B, Seidah NG, Decroly E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res.* 2020;176:104742.
62. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Mol Cell.* 21 2020;78(4):779-784.e5.
63. Ainslie KEC, Haber M, Orenstein WA. Challenges in estimating influenza vaccine effectiveness. *Expert Rev Vaccines.* 2019;18(6):615-28.
64. Laporte M, Naesens L. Airway proteases: an emerging drug target for influenza and other respiratory virus infections. *Curr Opin Virol.* 2017;24:16-24.
65. Báez-Santos YM, St John SE, Mesecar AD. The SARS-coronavirus papain-like protease: structure, function and inhibition by designed antiviral compounds. *Antiviral Res.* mars 2015;115:21-38.

VI. Annexes

Annexe 1 : Liste des acides aminés et code génétique

Acide aminé	Code 3 lettres	Code 1 lettre	pHi	
Acide glutamique	Glu	E	3,22	Acide
Acide aspartique	Asp	D	2,77	Acide
Alanine	Ala	A	6	Hydrophobe
Arginine	Arg	R	11,15	Basique
Asparagine	Asn	N	5,41	Neutre
Cystéine	Cys	C	5,03	Neutre
Glutamine	Gln	Q	5,65	Neutre
Glycine	Gly	G	5,97	Hydrophobe
Histidine	His	H	7,47	Basique
Isoleucine	Ile	I	5,94	Hydrophobe
Leucine	Leu	L	5,98	Hydrophobe
Lysine	Lys	K	9,59	Basique
Méthionine	Met	M	5,74	Hydrophobe
Phénylalanine	Phe	F	5,48	Hydrophobe
Proline	Pro	P	6,30	Hydrophobe
Sérine	Ser	S	5,68	Neutre
Thréonine	Thr	T	5,64	Neutre
Tryptophane	Trp	W	5,89	Hydrophobe
Tyrosine	Tyr	Y	5,66	Neutre
Valine	Val	V	5,96	Hydrophobe

		2 ^e nucléotide					
		T	C	A	G		
1 ^{er} nucléotide	T	TTT	TCT	TAT	TGT	T	
		TTC	TCC	TAC	TGC	C	
		TTA	TCA	TAA	TGA	A	
		TTG	TCG	TAG	TGG	G	
	C	CTT	CCT	CAT	CGT	T	
		CTC	CCC	CAC	CGC	C	
		CTA	CCA	CAA	CGA	A	
		CTG	CCG	CAG	CGG	G	
	A	ATT	ACT	AAT	AGT	T	
		ATC	ACC	AAC	AGC	C	
		ATA	ACA	AAA	AGA	A	
		ATG	ACG	AAG	AGG	G	
	G	GTT	GCT	GAT	GGT	T	
		GTC	GCC	GAC	GGC	C	
		GTA	GCA	GAA	GGA	A	
		GTG	GCG	GAG	GGG	G	
		3 ^e nucléotide					

NOM PRENOM : Anne Cochu

TITRE : Développement d'une méthode d'analyse de l'évolution de l'hémagglutinine des virus influenza aviaries

RESUME :

L'objectif de ce travail est de développer une méthode d'analyse de l'évolution de l'HA des virus influenza aviaries, virus avec un enjeu sanitaire et économique important. Pour déterminer les sites préférentiels d'insertion de nucléotides dans la séquence d'HA et si certaines séquences nucléotidiques sont associées à un plus fort taux d'insertion, nous avons réalisé de la mutagenèse dirigée pour produire des plasmides contenant une HA non fonctionnelle car présentant un codon stop ATG à la place de son codon départ. Puis un protocole de génétique inverse avec une transcomplémentation a été utilisé. L'utilisation de cellules MDCK exprimant à leur surface une HA transcomplémentante a permis la production de virions possédant un segment HA muté Δ ATG. Cependant l'amplification des virus obtenus n'a pas fonctionné. D'autres expériences doivent compléter notre étude.

The objective of our study is to develop a method for analyzing the evolution of HA of avian influenza viruses, viruses with a major health and economic effect. To determine the preferred nucleotide insertion sites in the HA sequence and whether some nucleotide sequences are associated with a higher rate of insertion, we performed site-directed mutagenesis to produce plasmids containing a non-functional HA because it has an ATG stop codon in place of its start codon. Then a reverse genetics protocol with transcomplementation was used. The use of MDCK cells expressing on their surface an HA allowed the production of virion possessing a mutated HA Δ ATG segment. However, the amplification of the resulting viruses did not work. Other experiences should complement our study.

MOTS CLES :

- Influenza aviaire,
- hémagglutinine,
- mutation,
- transcomplémentation

JURY :

Président : Monsieur le Professeur Christophe PASQUIER

1^{er} assesseur : Monsieur le Docteur Romain VOLMER

2nd assesseur : Madame le Docteur Christelle CAMUS

DATE DE SOUTENANCE : 20 novembre 2020