

ANNEE 2021 THESE : 2021 – TOU 3 – 4103

---

# DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE D'ANALYSE DU TAUX DE MUTATION DE L'HEMAGGLUTININE DES VIRUS INFLUENZA

---

THESE

pour obtenir le titre de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

*par*

**PASCOLO Baptiste**

Né le 14/11/1996 à REIMS (51)

**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 BOUCLAINVILLE-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**

**Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire**

**Directeur : Professeur Pierre SANS**

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

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

**PROFESSEURS 1<sup>ère</sup> CLASSE**

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

**PROFESSEURS 2<sup>ème</sup> CLASSE**

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



## MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

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

## MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

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

## INGENIEURS DE RECHERCHE

M. AUMANN Marcel, *Urgences, soins intensifs*  
M. AUVRAY Frédéric, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*  
M. CASSARD Hervé, *Pathologie des ruminants*  
M. CROVILLE Guillaume, *Virologie et génomique cliniques*  
Mme DEBREUQUE Maud, *Médecine interne des animaux de compagnie*  
Mme DIDIER Caroline, *Anesthésie, analgésie*  
Mme DUPOUY GUIRAUTE Véronique, *Innovations thérapeutiques et résistances*  
Mme GAILLARD Elodie, *Urgences, soins intensifs*  
Mme GEFFRE Anne, *Biologie médicale animale et comparée*  
Mme GRISEZ Christelle, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
Mme JEUNESSE Elisabeth, *Bonnes pratiques de laboratoire*  
Mme PRESSANTI Charline, *Dermatologie vétérinaire*  
M. RAMON PORTUGAL Félipe, *Innovations thérapeutiques et résistances*  
M. REYNOLDS Brice, *Médecine interne des animaux de compagnie*  
Mme ROUCH BUCK Pétra, *Médecine préventive*



## **Remerciements**

### **À 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 Virologiste au CHU de*

*Toulouse, INSERM*

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

Hommages respectueux.

### **À Monsieur le Docteur Romain VOLMER**

*Maitre 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,

Sincères remerciements.

### **À Madame le Docteur Christelle BOUCLAINVILLE-CAMUS**

*Maitre de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,*

*Biologie cellulaire et moléculaire*

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

Mes remerciements respectueux.

### **À Monsieur le Docteur Gabriel DUPRÉ**

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

Pour son aide, sa disponibilité et sa gentillesse,

Sincères remerciements.





# Table des matières

<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>13</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>15</b>
<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>19</b>
1.1 Les virus influenza aviaires.....	19
1.1.1 Classification .....	19
1.1.2 Structure du virus .....	20
1.1.3 Réplication virale.....	22
1.1.4 L'hémagglutinine .....	23
1.2 Hôtes et circulation des alpha influenza virus.....	25
1.3 Les virus influenza aviaires faiblement et hautement pathogènes .....	27
1.3.1 Classification en pathotypes .....	27
1.3.2 Le site de clivage .....	28
1.3.3 Evolution des alpha influenza virus.....	29
1.3.4 Facteurs favorisant l'émergence des virus influenza aviaires hautement pathogènes.....	33
1.4 Enjeux .....	36
<b>2 PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>38</b>
2.1 Construction des plasmides phw2000-PA(977)-HA_X et phw2000-NS(977)-HA_X .....	39
2.1.1 Matériel et méthode.....	43
2.1.2 Résultats .....	55
2.2 Production des virus H7N1(977)-HA_X avec un protocole de génétique inverse.....	56
2.2.1 Matériel et méthode .....	58
2.2.2 Résultats .....	61
2.3 Caractérisation des systèmes H7N1(977)-PA-HA_X et H7N1(977)-NS-HA_X.....	62
2.3.1 Cinétique de répllication des systèmes H7N1(977)-PA-HA_X et H7N1(977)-NS-HA_X.....	62
2.3.2 Vérification de la présence des transgènes HA_X dans le génome des virus recombinants H7N1(977)-NS-HA_X et H7N1(977)-PA-HA_X.....	67
2.3.3 Choix du système .....	71
2.4 Extraction des séquences HA_X des virus H7N1(977)-PA-HA_X.....	71
2.4.1 Protocole.....	71
2.4.2 Résultats .....	73
DISCUSSION .....	75
CONCLUSION.....	81
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>85</b>



## Liste des figures

FIGURE 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN VIA. ....	21
FIGURE 2 : CYCLE DE REPLICATION D'UN VIA .....	23
FIGURE 3 : SCHEMA REPRESENTANT LA PROTEINE HA .....	24
FIGURE 4 : SCHEMA REPRESENTANT LA TRANSMISSION DES VIAS AVIAIRES ENTRE LES ESPECES RESERVOIRS AU CENTRE ET LES AUTRES ESPECES, AINSI QUE LES VARIANTS DE HA IDENTIFIES DANS LES DIFFERENTS GROUPES. ....	26
FIGURE 5 : LOCALISATION DES PROTEASES CLIVANT HA ET SEQUENCES D'ACIDES AMINES AU SITE DE CLIVAGE DE HA SELON LE PHENOTYPE FP OU HP.....	28
FIGURE 6 : : SCHEMA REPRESENTANT LA CASSURE ET LA DERIVE ANTIGENIQUE EN PRENANT COMME EXEMPLE L'EMERGENCE DU VIRUS H3N2 RESPONSABLE DE LA GRIPPE DE HONG KONG EN 1968 .....	31
FIGURE 7 : STRUCTURE SECONDAIRE PREDITE PAR BIO-INFORMATIQUE DE LA SEQUENCE D'ARN ENTOURANT LE SITE DE CLIVAGE DU GENE CODANT POUR LA PROTEINE HA DU VIRUS A/WHISTLING SWAN/SHIMANE/499/83, H5N3. ....	35
FIGURE 8 : SCHEMA D'UN PLASMIDE PHW2000-X(977).....	40
FIGURE 9 : SCHEMA REPRESENTANT LA CONSTRUCTION FINALE PHW2000-X(977)-HA_X. ....	41
FIGURE 10 : SCHEMA REPRESENTANT LE PROTOCOLE REALISE POUR LA CONSTRUCTION DES PLASMIDES PHW2000- PA(977)-HA_X ET PHW2000-NS(977)-HA_X.....	42
FIGURE 11 : SCHEMA REPRESENTANT LE PROTOCOLE UTILISE POUR LA CONSTRUCTION DES PLASMIDES PHW2000- PA(977)-LCS ET PHW2000-NS(977)-LCS.....	43
FIGURE 12 : GEL D'ELECTROPHORESE OBTENU APRES MIGRATION DU PLASMIDE PHW2000-PA(977) AYANT ETE OU NON DIGERE PAR PVU II.....	44
FIGURE 13 : GEL D'ELECTROPHORESE OBTENU APRES MIGRATION DU PLASMIDE PHW2000-NS(977) AYANT ETE OU NON DIGERE PAR PVU II ET STU I.....	45
FIGURE 14 : SCHEMA DES CONSTRUCTIONS PA(977)-LCS ET NS(977)-LCS .....	47
FIGURE 15 : GEL D'ELECTROPHORESE OBTENU APRES MIGRATION DES PLASMIDES PUC57-PA(977)-LCS ET PUC57-NS(977)-LCS AYANT ETE OU NON DIGERES .....	48
FIGURE 16 : ALIGNEMENT ENTRE LA SEQUENCE D'ADN THEORIQUE DU PLASMIDE PHW2000-PA(977)-LCS, ET CELLE D'UN CLONE DE PHW2000-PA(977)-LCS CONSTRUIT. ....	49
FIGURE 17 : SCHEMA REPRESENTANT LE PROTOCOLE UTILISE POUR EXTRAIRE LES SEQUENCES HA_X DES PLASMIDES PHW2000-HA_X .....	50
FIGURE 18 : GEL D'ELECTROPHORESE OBTENU APRES MIGRATION DES SEQUENCES HA_X_600NT.....	53
FIGURE 19 : GEL D'ELECTROPHORESE OBTENU APRES MIGRATION DES SEQUENCES HA_X_FULL.....	53

FIGURE 20 : ALIGNEMENT ENTRE LA SEQUENCE D'ADN THEORIQUE DU PLASMIDE CONSTRUIT PHW2000-NS(977)-HA_SHIMH5_600NT ET CELLE D'UN CLONE DE PHW2000-NS(977)_HA_SHIMH5_600NT PRODUIT.....	55
FIGURE 21 : SCHEMA REPRESENTANT LE PROTOCOLE DE GENETIQUE INVERSE UTILISE POUR PRODUIRE DES VIRUS H7N1(977)-HA_X EN UTILISANT LE SYSTEME H7N1(977)-PA-HA_X.....	57
FIGURE 22 : FIGURE ILLUSTRANT LES RESULTATS D'UN TEST D'HEMAGGLUTINATION. ....	60
FIGURE 23 : PHOTOGRAPHIE PRESENTANT LES RESULTATS DU TEST D'HEMAGGLUTINATION REALISE SUR LES SURNAGEANTS DES CONDITIONS 1 A 6 RECOLTES APRES 72H D'AMPLIFICATION .....	61
FIGURE 24 : PHOTOGRAPHIE PRESENTANT LES RESULTATS DES TITRAGES, PAR LA METHODE DE DOSAGE TCID50, DES VIRUS DES CONDITIONS 1 A 5 ET DU VIRUS PR8.....	64
FIGURE 25 : GRAPHIQUE PRESENTANT LES RESULTATS DE LA CINETIQUE DE REPLICATION DES VIRUS DES CONDITIONS 1 A 5 AVEC LE TITRE DES VIRUS, EXPRIME EN LOG (TCID50/mL), EN FONCTION DU TEMPS. ....	66
FIGURE 26 : SCHEMA REPRESENTANT LA PLAQUE P96 DU PROTOCOLE DE RT-QPCR PERMETTANT L'AMPLIFICATION DES SEQUENCES DU GENOME DES VIRUS H7N1(977)-NS-HA_X.....	68
FIGURE 27 : GRAPHIQUES PRESENTANT LES RESULTATS DES RT-QPCR REALISEES SUR LES SURNAGEANTS DES VIRUS H7N1(977)-NS-HA_X ET H7N1(977)-PA-HA_X OBTENUES APRES UN PREMIER PASSAGE CELLULAIRE SUR DES CELLULES MDCK .....	70
FIGURE 28 : GEL OBTENU APRES MIGRATION DES PRODUITS DE LA PCR AYANT PERMIS L'AMPLIFICATION DES SEQUENCES HA_X DES VIRUS H7N1(977)-HA_X.....	74

## Liste des tableaux

TABLEAU 1 : EXEMPLES DE VIRUS IAHP, DONT LEUR VIRUS IAHP PRECURSEUR A ETE IDENTIFIE, ET LEUR SEQUENCE D'ACIDES AMINES AU NIVEAU DU SITE DE CLIVAGE DE LEUR HA .....	33
TABLEAU 2 : TABLEAU PRESENTANT LES PROTOCOLES DES PCR REALISEES SUR LES PLASMIDES PHW2000-HA_X POUR OBTENIR LES FRAGMENTS HA_X_600NT ET HA_X_FULL, AVEC LES AMORCES, LA POLYMERASE ET LE PROGRAMME UTILISES. ....	52
TABLEAU 3 : TABLEAU PRESENTANT LE PROTOCOLE DE CO-TRANSFECTION UTILISE. ....	58
TABLEAU 4 : TABLEAU PRESENTANT LES RESULTATS DU TITRAGE DES VIRUS PAR LA METHODE DE DOSAGE TCID50, AVEC POUR CHAQUE VIRUS, LE NOMBRE DE PUIITS POSITIFS PAR COLONNE ET SON TCID50/ML CALCULE. ....	65
TABLEAU 5 : TABLEAU PRESENTANT LE PROTOCOLE DE LA RT REALISEE SUR LES ARNV DES H7N1(977)-HA_X POUR OBTENIR LES SEQUENCES D'ADN PA-HA_X_600NT ET PA-HA_X_FULL, AVEC L'AMORCE, LA TRANSCRIPTASE INVERSE ET LE PROGRAMME UTILISES. ....	72
TABLEAU 6 : TABLEAU PRESENTANT LE PROTOCOLE DE LA PCR REALISEE SUR LES SEQUENCES PA-HA_X OBTENUES APRES UNE REACTION DE RT SUR LES VIRUS H7N1(977)-HA_X, POUR OBTENIR LES FRAGMENTS HA_X_600NT ET HA_X_FULL, AVEC LES AMORCES, LA POLYMERASE ET LE PROGRAMME UTILISES. ....	73



## Liste des abréviations

ARN	Acide ribonucléique
VIA	Alpha influenza virus
PB1 et PB2	Protéine basique 1 et 2
PA	Protéine acide
ARN <sub>v</sub>	ARN viral
ARN <sub>m</sub>	ARN messenger
RNP <sub>v</sub>	Complexe ribonucléoprotéique viral
HA	Hémagglutinine
NA	Neuraminidase
NP	Nucléoprotéine
M1	Protéine de matrice
M2	Protéine de membrane
NS1 et NS2	Protéine non structurale 1 et 2
NEP	Protéine d'exportation nucléaire
IAHP	Influenza aviaire hautement pathogène
IAFP	Influenza aviaire faiblement pathogène
OIE	Office International des Epizooties
HP	Hautement pathogène
IVPI	« Intravenous pathogenicity index »
SC	Site de clivage
SCPB	Site de clivage polybasique
FAO	« Food and Agriculture Organisation »
FP	Faiblement pathogène
R	Arginine
K	Lysine
G	Glycine
DS1	Danger sanitaire de 1ère catégorie
DRAAF	Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt
H7N1(977)	A/turkey/Italy/977/1999, H7N1
Nt	Nucléotide

HA_X	HA insérée dans le système
H7N1-HA_X	H7N1(977) recombinant
ADN	Acide désoxyribonucléique
Pol I	Promoteur humain Pol I
Tm	Terminateur murin
ADNc	ADN complémentaire
Pol II	Promoteur Pol II
PolyA	Site de polyadénylation
SCD	Séquence codante
NCR	« Non coding region »
Pvu II	Enzyme de restriction Pvu II
Phw2000-PA/NS(977)_lin	Phw2000-PA/NS(977) linéarisé
Echelle 2 log	Echelle d'ADN allant de 10 000 à 100 nt
Stu I	Enzyme de restriction Stu I
LCS	Linker Cloning Site
BsmB1	Enzyme de restriction BsmB1
PCR	« Polymerase Chain Reaction »
SNP	« Single nucleotide polymorphism »
LTX	Lipofectamine® LTX Reagent
293T	Cellules humaines de rein embryonnaire HEK 293T
MDCK	Cellules canines de rein Madin-Darby Canine Kidney
F25	Flasque Falcon® F25
PBS	« Phosphate-buffered saline »
TCID50	« 50% Tissue culture infectious dose »
PR8	A/Puerto Rico/8/1934, H1N1
DMEM	«Dulbecco's Modified Eagle Medium»
BSA	« Bovine Serum Albumin »
MOI	« Multiplicity of infection »
séqNS	Séquence de 198 nt de la SCD de NS
séqPA	Séquence de 170 nt de la SCD de PA
séqHA_ShimH5	Séquence de 167 nt de la SCD de HA_ShimH5 ou HA_ShimH5 24a2b
séqHA_H5N8	Séquence de 177 nt de la SCD de HA_H5N8, HA_H5N8mut1 ou HA_H5N8mut2



RT	Transcription inverse
qPCR	PCR quantitative
WSN	A/WSN/1933, H1N1



# 1 Introduction

## 1.1 Les virus influenza aviaires

### 1.1.1 Classification

Les virus influenza, plus communément appelés virus de la grippe, appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae* (1). Cette famille regroupe des virus enveloppés, possédant un génome segmenté à acide ribonucléique (ARN) simple brin de polarité négative. Ces virus sont responsables principalement d'affections respiratoires chez les mammifères, oiseaux ainsi que chez les poissons et les insectes.

Au sein de cette famille, ces virus sont classés en différents genres :

- **Influenzavirus de type A** : aussi appelés alpha influenza virus (VIAs), ils touchent les mammifères et sont les seuls à toucher majoritairement les oiseaux. Ils sont responsables d'épidémies saisonnières ainsi que de pandémies.
- **Influenzavirus de type B** : ils sont spécifiques de l'homme. Leur structure génomique, leurs mécanismes d'évolution ainsi que les signes cliniques qu'ils engendrent sont les mêmes que ceux des VIAs. Ils co-circulent avec les VIAs lors des épidémies saisonnières. Cependant, contrairement aux VIAs, leurs taux d'évolution sont beaucoup plus lents (2).
- **Influenzavirus de type C** : tout comme les influenza virus de type B, ils sont spécifiques de l'homme et en particulier des jeunes. Ils causent des symptômes respiratoires modérés (3). Ils peuvent également infecter les porcs. Ces virus évoluent rapidement mais il existe des réactions croisées avec les anticorps rendant la réponse immunitaire efficace face aux différents variants (4).
- **Influenzavirus de type D** : ils ont été découverts récemment, en 2011, et dériveraient des influenza virus de type C. Ils touchent les bovins et les porcins mais peuvent également infecter l'homme. Ils entraînent des symptômes respiratoires modérés souvent en association avec d'autres virus. L'évolution de ces virus semble lente et comme les influenza virus de type C, la réponse immunitaire est efficace face aux différents variants (5).

- **Thogotovirus** : ce sont des arbovirus transmis principalement par les tiques, qui sont eux-mêmes infectés par ces virus (6).
- **Isavirus** : ils infectent seulement les salmonidés (7).
- **Quaranjavirus** : ce genre n'a été classé dans cette famille que récemment, en 2013 (8). Tout comme les thogotovirus, ce sont des arbovirus transmis par des tiques. Ils ont également été retrouvés chez les oiseaux et chez l'homme (9).

Les virus influenza aviaires appartiennent au genre des VIAs

### 1.1.2 Structure du virus

Les VIAs sont constitués d'un génome d'ARN simple brin de polarité négative, segmenté en huit fragments de taille différente codant pour onze protéines ayant chacune un rôle bien précis (Figure 1) :

- Les protéines basiques 1 et 2 (PB1 et PB2) et la protéine acide (PA) forment les trois sous-unités de l'ARN polymérase ARN-dépendante qui permet la synthèse d'ARN messenger (ARNm) et la réplication du virus dans les cellules infectées. Cette polymérase se lie aux brins d'ARN viral (ARNv) pour former des complexes ribonucléoprotéiques viraux (RNPv) (10).
- L'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA) sont des glycoprotéines localisées sur l'enveloppe du virion. HA permet la fixation du virion aux récepteurs membranaires de la cellule, contenant des acides sialiques, et son entrée dans celle-ci. NA permet de rompre la liaison entre le virion et la membrane cellulaire autorisant ainsi sa diffusion (11).
- La nucléoprotéine (NP) se lie au génome viral et lui confère une stabilité ainsi qu'une structure hélicoïdale. Elle joue également un rôle dans la transcription et la réplication du génome viral (12).
- La protéine de matrice (M1) et la protéine de membrane (M2) sont des protéines localisées dans la membrane de la particule virale. M1 donne sa structure au virion et

joue un rôle dans le bourgeonnement de celui-ci. M2 forme un canal à proton qui joue un rôle dans l'entrée et la sortie du virion au sein de la cellule.

- La protéine non structurale 1 (NS1) permet d'inhiber la réponse antivirale de la cellule infectée (11).
- La protéine d'exportation nucléaire (NEP), aussi appelée protéine non structurale 2 (NS2) joue un rôle dans l'exportation des RNPv du noyau cellulaire jusque dans la nouvelle particule virale (10).

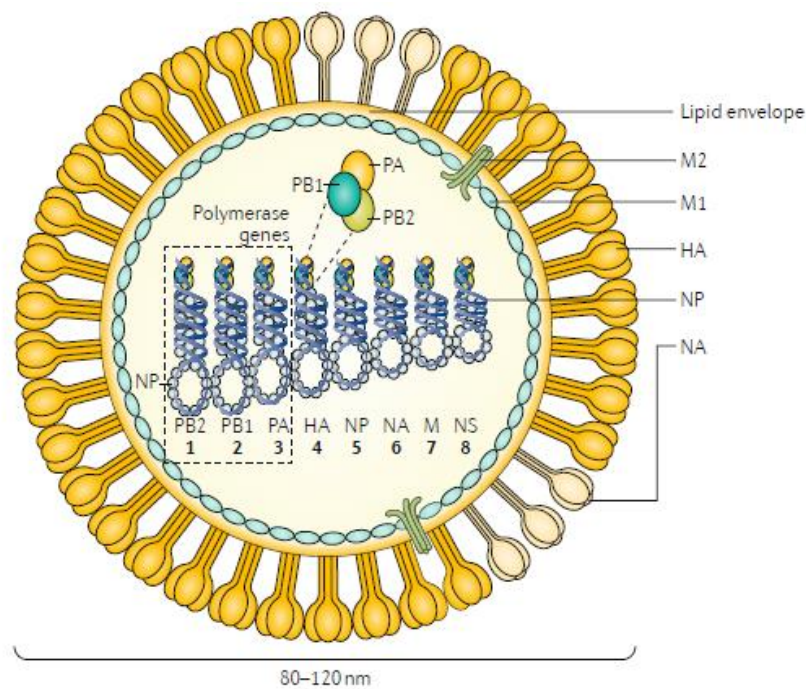


Figure 1 : Représentation schématique d'un VIA.

Légende : Les numéros 1 à 8 représentent les huit RNPv du génome viral, chacun codant pour une ou plusieurs protéines, indiquées au-dessus du chiffre. Le segment M code pour les protéines M1 et M2. Le segment NS code pour les protéines NS1 et NEP (ou NS2). Les autres structures représentées correspondent aux protéines virales. Figure tirée de (11).

### 1.1.3 Réplication virale

Le cycle de réplication d'un VIA est schématisé dans la Figure 2.

La particule virale commence par se fixer à la cellule infectée grâce à la liaison entre sa protéine de surface HA et l'acide sialique des récepteurs cellulaires (10). Suite à cette liaison, le virion est endocyté. L'acidité de l'endosome joue un rôle crucial dans le relargage du matériel génétique du virus dans le cytoplasme. Premièrement, elle entraîne un changement de conformation de HA, exposant ainsi un peptide de fusion qui permet la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de l'endosome. Cela crée des pores par lesquels les RNPv seront relargués dans le cytoplasme (13). Deuxièmement, elle active le canal à protons M2, qui permet d'acidifier l'intérieur de la particule virale, ce qui perturbe les interactions entre les protéines et autorise le relargage des RNPv de la matrice virale vers le cytoplasme (14).

Les RNPv sont ensuite acheminés dans le noyau cellulaire. L'ARN polymérase ARN-dépendante virale, contenue dans les RNPv, permet à la fois la transcription et la réplication des segments d'ARN viral négatif. Elle produit un ARN complémentaire, positif, qui à son tour va servir de matrice pour synthétiser l'ARN viral négatif. Elle produit également des ARNm qui ne nécessitent pas l'ajout d'une queue polyA, puisque celle-ci est déjà contenue dans le code génétique viral (15), et qui seront coiffés par des coiffes volées à des ARNm de la cellule hôte (16).

Ces ARNm sont ensuite exportés dans le cytoplasme de la cellule où ils seront traduits en protéines comme les ARNm de l'hôte. L'exportation nucléaire des segments d'ARNv est médiée par les protéines M1 et NEP (17). Les RNPv se regroupent ensuite entre eux grâce à des séquences d'empaquetage qui permettent le regroupement des huit segments du génome viral (18). Le bourgeonnement de la nouvelle particule virale a lieu au niveau de la membrane cellulaire. Une fois le bourgeonnement complet, HA est toujours liée aux acides sialiques cellulaires et le relargage de la particule virale est permis par l'activité sialidase de NA (19).

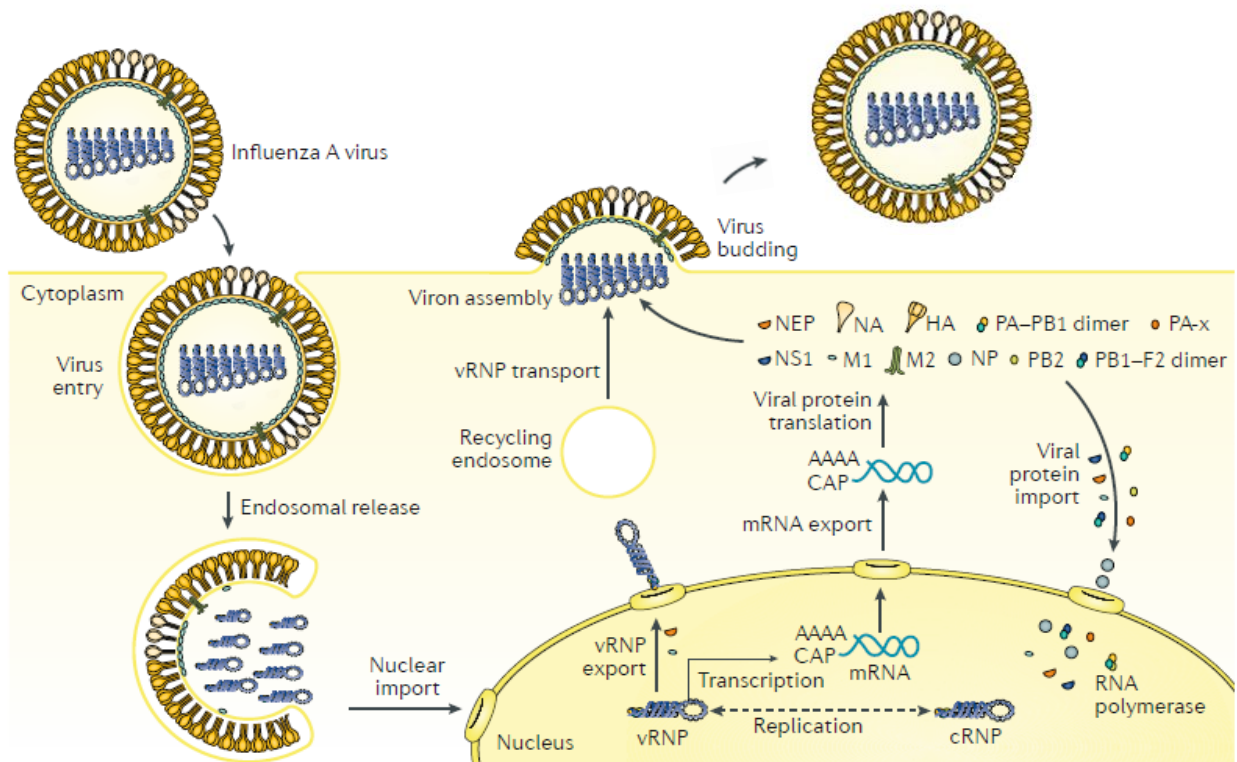


Figure 2 : Cycle de réplication d'un VIA

*Légende :* La schématisation de la structure de la particule virale est identique à celle de la Figure 1.

*Signification des abréviations :* vRNP correspond à RNPv, cRNP correspond à l'ARN complémentaire, CAP correspond à la coiffe de l'ARNm. Figure d'après (11).

#### 1.1.4 L'hémagglutinine

HA est l'une des deux principales protéines de l'enveloppe avec NA. Ces deux protéines jouent un rôle majeur dans la réplication virale et sont les principales cibles de la réponse immunitaire (11). HA joue également un rôle dans la pathogénicité du virus et est la cible de nombreuses mutations permettant l'évolution du virus.

##### 1.1.4.1 Structure de l'hémagglutinine

HA est une glycoprotéine qui est synthétisée dans un premier temps sous une forme non fonctionnelle HA0. Le clivage de HA0 en HA1 et HA2 est essentiel pour la réplication du virus. Il est réalisé par des protéases spécifiques et ces deux sous-unités restent liées par un pont disulfure. Sa structure secondaire comprend deux éléments, une tige qui correspond à HA2 et une tête globulaire correspondant à HA1 (19). La tête contient un site de liaison aux acides

sialiques qui permet la fixation du virus à la cellule, ainsi que des sites antigéniques qui jouent un rôle dans la réponse immunitaire (21). C'est la sous-unité HA2 qui permet la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de l'endosome, conduisant ainsi au relargage des RNPv dans le cytoplasme de la cellule infectée (22). HA est schématisée dans la Figure 3.

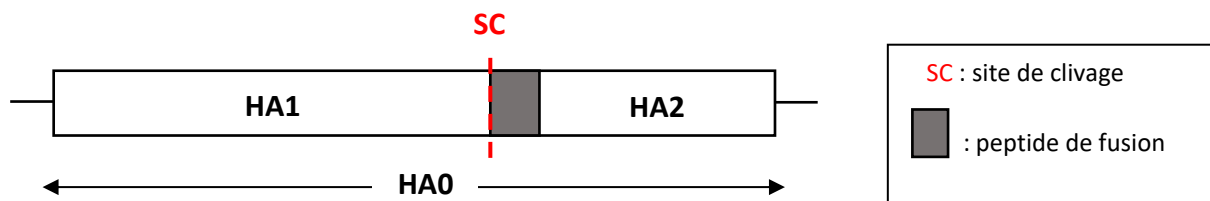


Figure 3 : Schéma représentant la protéine HA

#### 1.1.4.2 Les acides sialiques

La fixation de HA aux acides sialiques des récepteurs cellulaires est indispensable pour la réplication virale. Ces acides sialiques sont retrouvés à la surface de nombreux types cellulaires chez de nombreuses espèces, ce qui explique la grande variété d'hôtes sensibles aux VIAs. Cependant, il existe deux familles d'acides sialiques à l'origine de deux types de liaison avec HA :  $\alpha$ -2,3 et  $\alpha$ -2,6. Chaque virus se lie spécifiquement à une des deux familles d'acides sialiques. Habituellement, ces deux dernières ne sont pas retrouvées ensemble sur les mêmes types de cellule et chez les mêmes espèces. Ainsi, cette liaison est propre à chaque espèce. Chez l'homme, on retrouve majoritairement des acides sialiques  $\alpha$ -2,6 qui sont présents dans l'appareil respiratoire supérieur, tandis que chez les oiseaux on retrouve des acides sialiques  $\alpha$ -2,3 au niveau de l'appareil respiratoire supérieur et de l'épithélium digestif (22,23).

#### 1.1.4.3 Classification en sous-types

Les VIAs sont classés en sous-types basés sur les propriétés génétiques et antigéniques de leurs glycoprotéines de surface HA et NA. Actuellement il existe dix-huit variants de HA (H1 à H18) et onze variants de NA (N1 à N11). Parmi ces variants, seize HA (H1 à H16) et neuf NA (N1 à N9) ont été retrouvés chez les oiseaux aquatiques et les variants H17, H18, N10, N11 ont été retrouvés exclusivement chez les chauves-souris (25). Les sous-types sont nommés



ainsi « HxNy » où Hx représente un variant de HA et Ny représente un variant de NA. En théorie, toutes les combinaisons de sous-types sont possibles. Cependant, dans la nature on ne les observe pas toutes. La plupart des sous-types de VIA ont été retrouvés chez les oiseaux aquatiques (26). Cependant, chez l'homme, seulement trois d'entre eux sont récurrents et certains ont causé des pandémies, à savoir les sous-types H1N1, H2N2 et H3N2. Seuls les sous-types H1N1 et H3N2 sont endémiques actuellement (26,27).

Chaque virus est unique et est identifié selon la nomenclature officielle. D'abord il est écrit le genre de l'influenza (A, B, C ou D), puis l'espèce et le lieu géographique où il a été isolé, un numéro propre à chaque isolat, l'année et enfin le sous-type écrit sous la forme HxNy. Dans le cas où un virus a été isolé chez l'homme, il n'est pas nécessaire d'indiquer l'espèce.

Par exemple, le virus ayant causé l'épidémie de 2003 en Chine avant de se répandre à travers le monde est un virus influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) de sous-types H5N1, isolé pour la première fois chez des oies (« goose » en anglais) en 1996 dans la province chinoise de Guangdong. Il est donc identifié : A/Goose/Guandong/1/1996, H5N1. Tous les virus apparentés à cette souche appartiennent à ce qu'on appelle « la lignée asiatique » (29).

## 1.2 Hôtes et circulation des alpha influenza virus

Les espèces d'oiseaux sauvages aquatiques et plus particulièrement les Ansériformes (canards, oies, cygnes, etc.) et Charadriiformes (mouettes, sternes, etc.) sont considérées comme le réservoir naturel des VIAs. Dans la majorité des cas, un portage sain a lieu chez ces espèces (26). Les VIAs infectent également d'autres espèces d'oiseaux, tels que les oiseaux domestiques (poules, dindes, etc.) qui sont plus sensibles aux VIAs, mais aussi de nombreux mammifères (hommes, cochons, chevaux, phoques, etc.). Ces infections peuvent parfois conduire à des signes cliniques avec notamment des atteintes respiratoires et digestives (30).

Les espèces réservoirs, chez qui les VIAs circulent en grande majorité, disséminent et transmettent les virus aux autres espèces. De plus, certaines sont migratrices et disséminent ainsi le virus sur de plus grandes distances (31). La transmission du virus se fait de manière horizontale, soit directement au contact d'un individu infecté, soit indirectement via le plus souvent des matières fécales ou, de l'eau, de la nourriture ou du matériel souillés (31). Les élevages de canard en extérieur jouent un rôle d'intermédiaire entre les espèces réservoirs et les élevages de volailles (32).

Cependant, la transmission du virus entre différentes espèces reste rare car il existe une barrière d'espèce. Cette barrière est due aux acides sialiques des récepteurs cellulaires qui sont différents d'une espèce à l'autre, et à la spécificité d'une HA pour un type d'acide sialique. Les virus aviaires ne devraient donc pas infecter l'homme car ils ne possèdent pas les mêmes acides sialiques que les oiseaux (voir partie 1.1.4.2). Cependant, l'homme possède également des acides sialiques  $\alpha$ -2,3 présents au sein de l'appareil respiratoire profond. Ceux-ci sont moins accessibles pour le virus mais une contamination par des virus aviaires est donc possible. Celle-ci reste rare mais elle entraîne des formes plus graves avec des pneumonies rapides et sévères associées à un taux de mortalité supérieur à 60% (33).

Le porc est un cas particulier car il possède des cellules présentant à leur surface les deux familles d'acides sialiques  $\alpha$ -2,3 et  $\alpha$ -2,6. Il peut donc servir d'intermédiaire entre les VIAs aviaires et humains soit en permettant des réassortiments entre eux, soit en permettant à un virus aviaire d'acquérir la capacité de se lier à des acides sialiques  $\alpha$ -2,6 (34). La circulation des VIAs chez les espèces est schématisée dans la Figure 4.

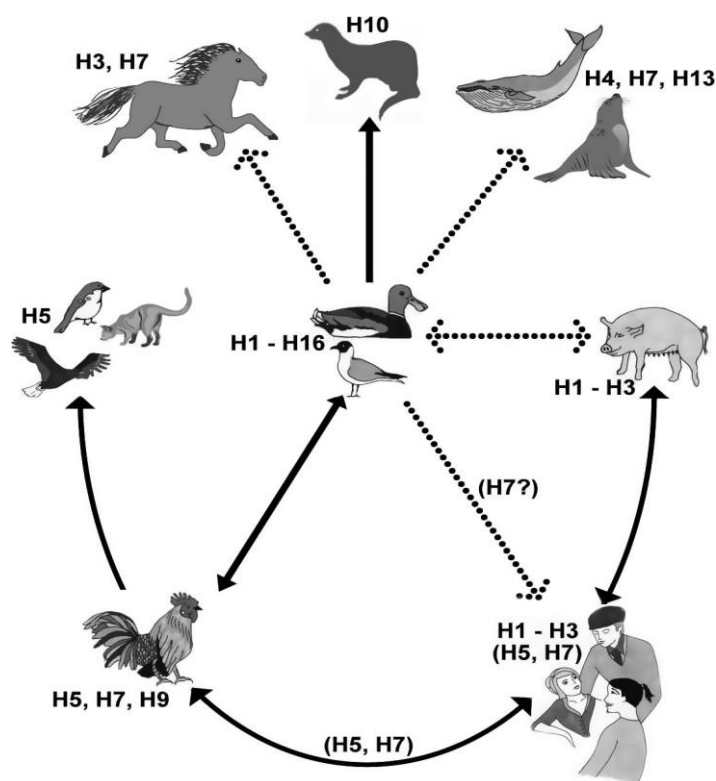


Figure 4 : Schéma représentant la transmission des VIAs aviaires entre les espèces réservoirs au centre et les autres espèces, ainsi que les variants de HA identifiés dans les différents groupes.

Légende : Les flèches noires en trait plein représentent la circulation classique des virus et les flèches en pointillé représentent les transmissions accidentelles. Les flèches à double sens signifient que la transmission du virus peut se faire dans les deux sens entre les deux espèces. Figure tirée de (35).

## 1.3 Les virus influenza aviaires faiblement et hautement pathogènes

### 1.3.1 Classification en pathotypes

Au sein de la classification en sous-types des VIAs, il existe une distinction supplémentaire, qui repose sur leur pathogénicité chez les oiseaux. On retrouve ainsi des virus faiblement pathogènes, appelés influenza aviaires faiblement pathogènes (IAFP), qui entraînent des formes asymptomatiques ou provoquent des atteintes respiratoires ou digestives modérées, et des virus IAHP, causant des atteintes systémiques graves chez les oiseaux avec un fort taux de mortalité (29). Jusqu'à aujourd'hui, seuls des virus de sous-types H5 et H7 ont été recensés comme IAHP (29). Cette classification est basée sur des tests *in vivo* et sur des caractéristiques moléculaires de la protéine HA. Un virus est défini comme IAHP par le manuel terrestre de l'Office International des Epizooties (OIE), s'il répond à un des deux critères ci-dessous :

- 1) Un virus est considéré comme hautement pathogène (HP) s'il a un fort pouvoir pathogène et celui-ci peut être déterminé par deux méthodes :
  - S'il possède un taux de létalité supérieur à 75% dans un délai de 10 jours après son inoculation chez 8 poulets de 4 à 8 semaines d'âge.
  - S'il possède un « intravenous pathogenicity index » (IVPI) supérieur à 1,2 chez des poulets de 4 à 8 semaines d'âge. Pour calculer cet index, le virus est inoculé aux poulets par voie intraveineuse. Puis ceux-ci sont observés toutes les 24 heures pendant 10 jours et un score leur est attribué : 0 pour un animal sain, 1 pour un animal malade, 2 s'il est sévèrement atteint et 3 s'il est mort. L'index IVPI correspond à la moyenne par animal des scores attribués sur les 10 jours d'observation. Par exemple, un index égal à 3 signifie que tous les poulets sont morts en moins de 24 heures et un index égal à 0 signifie qu'aucun n'a présenté de signes cliniques.
  
- 2) Pour tous les virus de sous-types H5 et H7 possédant un faible pouvoir pathogène selon les critères des deux méthodes ci-dessus, la séquence nucléotidique doit être déterminée afin de vérifier si le site de clivage (SC) présente un motif mono ou polybasique. Dans le cas d'un site de clivage polybasique (SCPB), si une même séquence a été retrouvée chez de précédents virus IAHP, alors le virus est considéré comme HP. Dans le cas contraire, un laboratoire de référence de l'OIE ou de la « Food and Agriculture Organisation » (FAO) doit être consulté afin de déterminer la nature HP ou faiblement pathogène (FP) du virus (36).

### 1.3.2 Le site de clivage

La séquence d'acides aminés et surtout le nombre d'acides aminés basiques, arginine (R) ou lysine (K), au niveau du SC de HA0 est fortement corrélée à la pathogénicité des VIAs puisqu'elle va conditionner le type de protéases cellulaires qui pourra le cliver. Le site de clivage est constitué d'un résidu R adjacent à une glycine (G) qui deviendra la partie N-terminale de HA2 (37). Les virus IAFP ont généralement deux acides aminés basiques non consécutifs au niveau de leur site de clivage (exemple : PQR**RETR**/GLF) (29), le rendant clivable seulement par des protéases de type trypsine. Ces protéases ne sont retrouvées qu'à la surface de certaines cellules de l'organisme comme les muqueuses respiratoires et digestives par exemple, ce qui détermine le tropisme des IAFP et les rend peu virulents. A l'inverse, les IAHP H5 et H7 possèdent un SCPB (exemple : PQR**KRKR**TR/GLF) (29) qui autorise un clivage par d'autres protéases comme des protéases de type furine qui sont intracellulaires et ubiquitaires dans l'organisme. Ces virus entraînent donc des atteintes systémiques, les rendant beaucoup plus pathogènes (38)(Figure 5).

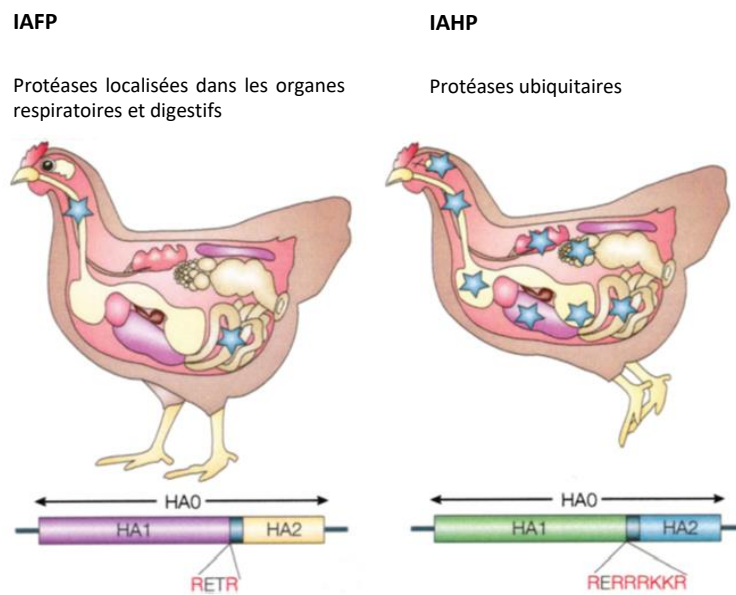


Figure 5 : Localisation des protéases clivant HA et séquences d'acides aminés au site de clivage de HA selon le phénotype FP ou HP

Légende : Les étoiles indiquent la localisation des enzymes clivant HA suivant le pathotype.

Les acides aminés en rouge correspondent à des acides aminés basiques, lysine (K) et arginine (R). Figure d'après (35).

### 1.3.3 Evolution des alpha influenzavirus

Les VIAs, de par leur génome à ARN segmenté, subissent une évolution constante. Cela leur permet de s'adapter à de nouveaux hôtes et de nouveaux environnements. Les mutations intervenant au niveau des antigènes de surface, HA et NA, représentent un enjeu pour la réponse immunitaire des hôtes. Il existe deux mécanismes par lesquels les VIAs évoluent :

- La dérive antigénique : elle correspond à l'accumulation progressive de mutations et engendre une évolution lente des virus.
- La cassure antigénique : elle correspond à un échange de segments d'ARN entre deux souches et engendre une évolution rapide des virus

Ces mécanismes sont présentés ci-après dans la Figure 6.

#### 1.3.3.1 La dérive antigénique

Les VIAs possèdent une ARN polymérase à l'origine de nombreuses erreurs de réplication car elle ne possède pas de système de correction. Le taux d'erreur est d'environ  $10^{-4}$  mutations ce qui représente environ une erreur par cycle de réplication pour l'ensemble du génome (39). Ces mutations progressives et aléatoires subissent ensuite une pression de sélection. La dérive antigénique correspond à la sélection de virus, qui grâce à ces mutations, se multiplient et se transmettent plus facilement. Les mutations au niveau des antigènes de surface, HA et NA, permettent aux virus d'échapper au système immunitaire des hôtes et ainsi d'entraîner des réinfections chez ces mêmes hôtes (Figure 6).

Ce mécanisme est responsable des épidémies saisonnières de VIAs. (40). C'est pour cela que les vaccins contre la grippe doivent être fréquemment adaptés aux nouveaux variants afin de garantir une protection optimale. La stratégie vaccinale est principalement centrée sur la protéine HA qui est l'antigène surveillé pour détecter l'apparition de nouveaux variants. Des études ont montré que des variations antigéniques importantes chez des VIAs pouvaient être causées seulement par une ou très peu de substitutions d'acides aminés au niveau du site fonctionnel de la tête de HA, mais pas au niveau de la queue (41). Cependant, sa structure secondaire en tige/boucle reste conservée chez toutes les souches et sous-types des VIAs (10).

Chez les espèces réservoirs où de très nombreux sous-types circulent, il semblerait que les variations antigéniques des virus soient limitées alors qu'elles sont plus importantes lors de leur introduction dans des élevages de volailles (41). Ces mutations jouent également un rôle

dans l'adaptation du virus à un nouvel hôte. Par exemple, des mutations au niveau de la tête de HA peuvent permettre la liaison d'un virus à d'autres acides sialiques (42).

### *1.3.3.2 La cassure antigénique*

Les VIAs possèdent un génome segmenté, ce qui autorise des réassortiments entre eux. Un réassortiment est un échange d'ARNv entre deux VIAs lors de la co-infection d'une même cellule. La cassure antigénique apparaît lorsqu'il y a un réassortiment de gènes codant pour les protéines de surface (principalement HA) entre des virus de sous-types différents. Cela conduit à l'apparition brutale d'un nouveau sous-type de virus possédant une structure antigénique complètement différente. Ce dernier peut ainsi se répandre rapidement du fait d'un manque d'immunité préexistante dans les populations et conduire à des pandémies, bien que ce phénomène reste rare (Figure 6)(43). Le porc joue un rôle de mélangeur car il permet des co-infections entre des virus aviaires et humains. Il favorise ainsi l'émergence de nouvelles souches pouvant potentiellement conduire à des pandémies (44).

Ce phénomène est à l'origine de plusieurs pandémies humaines comme la grippe asiatique en 1957 causée par un virus H2N2 émergent suite à un réassortiment entre un virus humain H1N1 et un virus aviaire, ou encore la grippe de Hong Kong en 1968, causée par un virus H3N2 ayant reçu le gène H3 d'un virus aviaire (45). Plus récemment, plusieurs événements de réassortiment chez des porcs ont conduit à la grippe porcine H1N1 en 2009 (45,46).

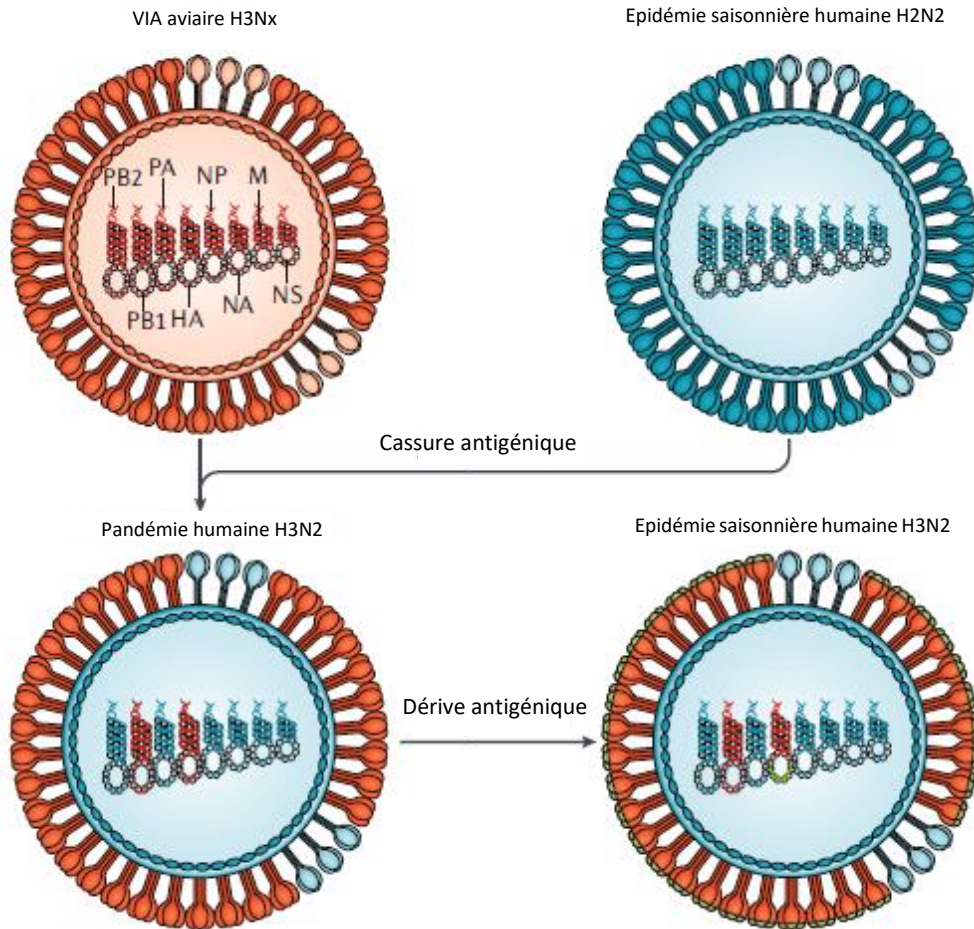


Figure 6 : Schéma représentant la cassure et la dérive antigénique en prenant comme exemple l'émergence du virus H3N2 responsable de la grippe de Hong Kong en 1968

*Légende* : La légende de la structure des virions est identique à la figure 1.

Le réassortiment entre un virus aviaire de sous-type H3 (en rouge) et un virus humain H2N2 (en bleu) a conduit à l'émergence d'un virus humain H3N2 possédant les segments d'ARNv codant pour PB1 et HA du virus aviaire et les 6 autres segments du virus humain. Une fois émergé, le virus H3N2 a subi des événements de dérive antigénique représentés par une modification de la tête des HA. Figure d'après (11).

### 1.3.3.3 Emergence des virus influenza aviaires hautement pathogènes

Les oiseaux aquatiques sauvages sont le réservoir des VIAs aviaires et ils hébergent principalement des virus IAFP. L'émergence d'un virus IAHP reste un phénomène rare. Entre 1959 et 2016, 42 émergences ont été recensées (29). L'émergence d'un virus IAHP se fait en deux étapes. Premièrement, il doit acquérir un SCPB lui permettant d'être clivé par des protéases de type furine. Cette évolution génétique a lieu chez un animal infecté par un virus IAFP H5 ou H7 dit précurseur (48). Cependant, tous les virus IAFP H5 et H7 n'évoluent pas en virus IAHP.



En effet, ce nouveau virus doit être plus compétitif que son précurseur FP afin de devenir le virus dominant et se transmettre à d'autres individus.

La pathogénicité des IAHP a une origine multigénique. La protéine HA et notamment l'acquisition d'une SCPB, va jouer le rôle principal même si dans certains cas le SCPB seul n'est pas suffisant pour conférer un phénotype HP (49). Les mécanismes par lesquels un virus IAHP évolue en IAHP restent mal connus. L'analyse des différentes émergences de virus IAHP, a montré que les mécanismes d'insertion d'acides aminés basiques au niveau du SC diffèrent à chaque fois (29). Il existe en effet :

- Des substitutions de nucléotides conduisant à des substitutions d'acides aminés non basiques en acides aminés basiques.
- Des insertions de plusieurs acides aminés basiques dues à des duplications de codons ou des phénomènes de glissement de la polymérase lors de la réplication. Ce mécanisme est le plus fréquent chez les virus IAHP de sous-types H5 (47,49).
- Des recombinaisons non-homologues conduisant à l'insertion de plusieurs acides aminés basiques ou non basiques, provenant d'ARNv ou non. Ce mécanisme n'a été observé dans la nature que chez des virus IAHP H7 (29). Des expériences de passage sérié en œufs embryonnés de poulet ont récemment montré qu'un virus IAHP H5N2 avait évolué en IAHP par recombinaison non-homologue (51).

Des exemples d'émergence de virus IAHP sont présentés dans le Tableau 1.



Tableau 1 : Exemples de virus IAHP, dont leur virus IAFP précurseur a été identifié, et leur séquence d'acides aminés au niveau du site de clivage de leur HA (28,51,52).

Sous-type	Pays (Année)	Souche	IAFP précurseur(s)	Séquence d'acides aminés au site de clivage	Mécanisme	Temps avant émergence
H5N2	USA (1983)	A/chicken/Pennsylvania/1370/1983	A/chicken/Pennsylvania/1/1983, H5N2	FP : P <span style="color:red">QKKKR</span> /GLF HP : P <span style="color:red">QKKKR</span> /GLF	Perte d'un site de glycosylation	6 mois
H5N2	Mexique (1994)	A/chicken/Puebla/8623-07/1994	A/chicken/Mexico/31381-7/1994, H5N2	FP : P <span style="color:red">QRETR</span> /GLF P <span style="color:red">QKETR</span> /GLF HP : P <span style="color:red">QRKRKTR</span> /GLF P <span style="color:red">QRKRKRKTR</span> /GLF	Duplication	8 - 14 mois
H7N3	Pakistan (1995)	A/chicken/Pakistan/447/1995	H7N3 (1994) Souche précise non connue	FP : P <span style="color:red">KGR</span> /R HP : P <span style="color:red">KRKRKR</span> /GLF P <span style="color:red">KRRKR</span> /GLF P <span style="color:red">KRRNR</span> /GLF	Duplication	8 mois
H7N1	Italie (1999)	A/turkey/Italy/4580/1999	A/turkey/Italy/977/1999, H7N1	FP : P <span style="color:red">KGR</span> /GLF HP : P <span style="color:red">KGSRVRR</span> /GLF P <span style="color:red">KGSRMRR</span> /GLF P <span style="color:red">KRSRVRR</span> /GLF	Inconnu	9 mois
H7N3	Chili (2002)	A/chicken/Chile/4322/2002	A/chicken/Chile/176822/2002, H7N3	FP : P <span style="color:red">KTR</span> /GLF HP : P <span style="color:red">KTCSPLSRCRETR</span> /GLF P <span style="color:red">KTCSPLSRCKTR</span> /GLF	Recombinaison avec le segment NP	1 mois
H7N7	Pays-Bas (2003)	A/chicken/Netherlands/1/2003	A/Mallard/Netherlands/12/2000, H7N3 A/Mallard/Netherlands/2/2000, H10N7	FP : P <span style="color:red">KGR</span> /GLF HP : P <span style="color:red">KRRRR</span> /GLF	Inconnu	3 ans
H7N3	Canada (2004)	A/chicken/British Columbia/2004	A/chicken/British Columbia/2004, H7N3	FP : P <span style="color:red">KTR</span> /GLF HP : P <span style="color:red">KQAYRKRMTTR</span> /GLF	Recombinaison avec le segment M (M1)	11 jours
H5N2	USA (2004)	A/chicken/Texas/298313/2004	A/chicken/Texas/16 7280-4-/2002, H5N3	FP : P <span style="color:red">QREKR</span> /GLF HP : P <span style="color:red">QRKRKR</span> /GLF P <span style="color:red">QREKRKRKR</span> /GLF	Inconnu	2 ans
H5N2	Afrique du sud (2006)	A/ostrich/South Africa/AI1091/2006	A/ostrich/South_Africa/AI1160/2006, H5N2	FP : P <span style="color:red">QRETR</span> /GLF HP : P <span style="color:red">QRKRKR</span> /GLF	Inconnu	Inconnu
H7N8	USA (2016)	A/turkey/Indiana/16-001403- 1/2016	A/turkey/Indiana/1 6-001573- 2/2016, H7N8	FP : P <span style="color:red">KTR</span> /GLF HP : P <span style="color:red">KKRKRTR</span> /GLF	Inconnu	Inconnu

*Légende* : Ce tableau présente des exemples de virus IAHP, dont leur virus précurseur IAFP a été identifié, la séquence d'acides aminés au niveau du site de clivage de leur HA, le mécanisme à l'origine de l'acquisition d'un SCPB lorsque celui-ci est connu, et la durée de circulation du virus précurseur avant l'émergence. Les acides aminés basiques sont représentés en rouge.

### 1.3.4 Facteurs favorisant l'émergence des virus influenza aviaires hautement pathogènes.

#### 1.3.4.1 Facteurs intrinsèques au virus

Tous les virus IAHP recensés appartiennent aux sous-types H5 et H7. Cependant des études ont montré que d'autres sous-types (H2, H4, H6, H8, H9 et H14) peuvent acquérir un phénotype HP après l'introduction d'un SCPB au laboratoire par génie génétique (50). Cela suggère que la restriction naturelle, pour l'acquisition d'un SCPB, aux virus H5 et H7 pourrait être due à leurs prédispositions génétiques à acquérir des mutations dans la séquence codant pour le SC. Cette prédisposition a été reliée à la présence d'une séquence de vingt nucléotides entourant le site de clivage de HA0, conduisant à une structure secondaire particulière, prédite par des techniques de bio-informatique. Cette structure secondaire présente un motif tige-

boucle qui est retrouvé chez de nombreux sous-types bien que chez la plupart des virus H5 et H7 cette boucle soit plus large (Figure 7)(47,49). Cette prédisposition génétique est également reliée à la présence de plusieurs adénines consécutives dans cette même région. En effet, une étude a montré que des mutations sur la séquence d'ARN au niveau du SC, conduisant à l'acquisition de plusieurs adénines consécutives et un élargissement de la boucle, accélèrent la fréquence d'insertion de nucléotides au SC. Il est supposé que ces modifications génétiques entraînent des phénomènes de glissement de polymérase conduisant à l'insertion de nucléotides (50).

La présence d'un site de glycosylation à la fin de la sous-unité HA1 influence également le clivage de HA en protégeant son clivage contre les protéases de type furine. Ainsi, un VIA peut avoir un SC compatible avec un virus IAHP et avoir un phénotype FP (52).

Le nombre d'acides aminés basiques au niveau du SCPB jouerait également un rôle dans la pathogénicité du virus. En effet, l'insertion de plus de deux acides aminés au SC est corrélée à une augmentation de la pathogénicité (53).

En analysant les phénomènes d'émergence, d'autres mutations ont été retrouvées dans le génome viral accompagnant le passage d'un virus IAFP en IAHP et permettant d'améliorer sa réplication ainsi que sa transmission. Chez les virus IAHP, des mutations sur HA ont été retrouvées, ailleurs qu'au niveau du SC. D'autres ont été retrouvées sur NS1, sur les gènes de la polymérase virale (particulièrement PA), et des délétions de la queue de NA ont également été observées. Tous ces changements contribuent à augmenter la pathogénicité des virus (28,48,51). Cependant, on ne sait toujours pas si ces changements ont constitué une condition préalable à la sélection de virus IAHP émergents chez les volailles hôtes, ou s'ils ont été consécutifs à l'émergence et ont permis une adaptation de ces virus afin de favoriser une infection systémique (53).

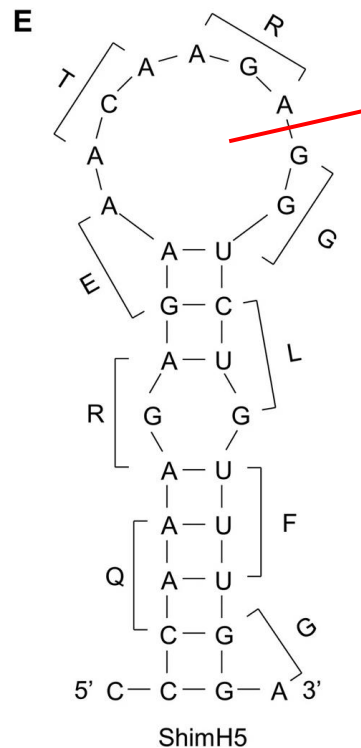


Figure 7 : Structure secondaire prédite par bio-informatique de la séquence d'ARN entourant le site de clivage du gène codant pour la protéine HA du virus A/whistling swan/Shimane/499/83, H5N3.

Légende : Les acides aminés correspondant à chaque codon sont représentés par leur lettre. Le site de clivage est représenté par le trait rouge. Figure tirée de (50).

#### 1.3.4.2 Facteurs liés à l'hôte et à l'environnement

L'espèce hôte joue un rôle dans l'émergence des virus IAHP. En effet, tous les virus IAHP responsables des épidémies recensées ont été isolés chez des espèces d'oiseaux domestiques sauf dans un unique cas en 1961 où un virus IAHP H5N3 a été observé chez une espèce de Sterne (54). Sur les 42 épidémies causées par des virus IAHP, recensées entre 1959 et 2016, un virus FP précurseur a été identifié dans seulement 10 cas. Les espèces considérées comme ayant abrité l'évolution de ces virus IAHP en IAHP sont les poulets, les dindes et les autruches. Dans les rares cas où le virus IAHP précurseur est connu et circule dans les élevages de volailles, la durée avant l'émergence du virus HP est très variable, entre 10 jours et 3 ans (53)(Tableau 1).

Les oiseaux sauvages jouent un rôle majeur dans l'introduction de virus IAHP chez les oiseaux domestiques. Leur rôle au cours des épidémies de virus IAHP reste souvent inconnu. Cependant, en 1996, lors de l'épidémie causée par le virus H5N1 de la lignée asiatique, il

semblerait que les oiseaux sauvages aient permis de transmettre le virus sur de longues distances (55).

L'âge ne semble pas jouer un rôle dans l'émergence des virus IAHP (53). La taille des élevages ainsi que la densité de volaille n'influencent pas non plus l'émergence de ces virus. En revanche, la densité d'élevage de volaille joue un rôle majeur dans la transmission du virus après son émergence (56).

## 1.4 Enjeux

L'influenza aviaire est une maladie réglementée. Les virus IAHP et les virus IAFP H5 et H7 sont soumis à une déclaration obligatoire. Ils étaient anciennement classés comme dangers sanitaires de 1<sup>ère</sup> catégorie (DS1), définis par la Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt (DRAAF) comme « dangers de nature à porter une atteinte grave à la santé publique ou à la santé des végétaux et des animaux, ou à mettre gravement en cause les capacités de production, et qui requièrent pour l'intérêt général des mesures de prévention, de surveillance et de luttés obligatoires ». Ils sont actuellement classés dans deux catégories différentes suite au nouveau règlement européen rentré en vigueur le 21 avril 2021 (règlement 2016/429). Les virus IAHP appartiennent aux catégories A, D et E et les virus IAFP H5 et H7 aux catégories D et E. Cela signifie que ces virus nécessitent une surveillance sur le territoire et que des restrictions de mouvements entre les pays peuvent être appliquées en cas de circulation de ces virus. De plus, pour les virus IAHP, des mesures d'éradication immédiate avec un plan d'urgence doivent être mises en œuvre dès leur détection. Ces mesures nécessitent un abattage sanitaire d'urgence de tous les élevages infectés (57).

Ces virus représentent un enjeu économique majeur. Ils engendrent des pertes économiques directes. Celles-ci sont liées au fort taux de morbidité et de mortalité dans les élevages pour les virus IAHP mais également aux mesures de surveillance et de lutte mises en œuvre stopper la circulation de ces virus. Ils engendrent également des pertes indirectes importantes, avec notamment des restrictions d'échanges commerciaux dans les pays qualifiés de non-indemnes. Ces pertes économiques sont considérables (58). Par exemple, l'épidémie de 1999 en Italie, causée par un virus IAHP H7N1, a entraîné la mort de 13 millions d'oiseaux, morts ou abattus, et a représenté un coût de plus de 700 millions d'euros. Le virus H5N1 HP de la lignée asiatique ayant causé l'épidémie de 2003 et étant toujours endémique dans certaines régions d'Asie et d'Afrique, a entraîné la mort de plus de 300 millions d'oiseaux et un coût de plus de 17 milliards d'euros (58).

Les virus IAHP représentent une menace pour la santé animale. Chez les oiseaux domestiques, espèces les plus sensibles, ils engendrent un fort taux de morbidité et un taux de mortalité pouvant atteindre 100% dans certains élevages en 3 à 5 jours (58). De plus, ils se répandent très rapidement au sein des élevages, des régions et parfois même à travers le globe comme ce fut le cas avec le virus H5N1 HP en 2003 (59). Ils touchent également les oiseaux sauvages et d'autres espèces comme des mammifères, ainsi que l'homme, avec un taux de morbidité et de mortalité variable.

Du fait de la barrière d'espèce, le potentiel zoonotique des virus IAHP est faible. Cependant, ils représentent tout de même une grave menace pour la santé humaine. Certaines souches peuvent infecter l'homme, de manière rare et sporadique, et principalement des personnes en contact étroit avec des oiseaux infectés (58). Il existe deux virus aviaires qui ont principalement touché l'homme : la souche H5N1 HP de la lignée asiatique qui a contaminé plus de 850 personnes et entraîné plus de 450 décès depuis 2003, et la souche H7N9, d'abord FP puis HP, qui a contaminé plus de 1600 personnes et entraîné plus de 600 décès (58). Cependant, l'absence de transmission interhumaine limite l'impact de ces contaminations (11).

La constante évolution des VIAs représente également un risque pour l'homme. La dérive antigénique ainsi que des réassortiments entre des virus IAHP aviaires et des virus humains, pourraient conduire à l'acquisition de nouveaux facteurs de virulence permettant à des virus aviaires de se propager davantage chez l'homme. Ces virus auraient un pouvoir zoonotique accru et pourraient conduire à une nouvelle pandémie, comme cela a déjà été le cas dans le passé. Par exemple, le VIA H1N1 responsable de la grippe espagnole, ayant causée plus de 40 millions de morts entre 1918 et 1919, semble être un virus aviaire qui se serait adapté à l'homme (60). Les virus à l'origine des gripes asiatique et de Hong Kong constituent d'autres exemples apparus suite à des réassortiments (voir partie 1.3.3.2).

La compréhension des mécanismes et des facteurs de l'émergence des virus IAHP représente donc un triple enjeu, à la fois économique et pour la santé animale et humaine.

## 2 Partie expérimentale

Les mécanismes d'évolution des virus IAFP en IAHP sont encore mal connus. Actuellement, nous sommes incapables de prévoir si un virus IAFP H5 ou H7 va évoluer ou non en virus IAHP. Or, cette connaissance représente un enjeu majeur pour la santé animale et humaine, et pour la filière avicole.

L'objectif de ce travail est de réaliser un système, sans pression de sélection, permettant d'observer *in vitro*, des insertions sur un gène d'un VIA codant pour la protéine HA. Le but est de rechercher s'il existe des sites préférentiels, notamment au niveau du SC, pour l'insertion de nucléotides (nt) et si la séquence d'ARN joue un rôle dans la fréquence d'apparition de ces dernières. Dans la nature, la dérive antigénique entraîne la sélection de certains virus tandis que d'autres qui ne sont pas viables disparaissent. Un acide aminé étant codé par trois nucléotides, l'insertion ou la délétion d'un ou deux nucléotides entraîne un décalage du cadre de lecture modifiant ainsi toute la séquence d'acides aminés de la protéine. Quand l'insertion ou la délétion concerne un multiple de trois nucléotides, le cadre de lecture est conservé et un acide aminé est inséré ou supprimé de la séquence protéique. Cependant, cet acide aminé peut modifier la structure de la protéine et la rendre non fonctionnelle. Dans ce système sans pression de sélection, le gène codant pour la protéine HA ne sera pas traduit en protéine. Ainsi, toutes les mutations qui apparaîtront seront conservées au cours du temps puisqu'il n'y aura pas de sélection basée sur la viabilité de la protéine HA étudiée.

Ce système consiste à insérer la séquence d'ARNv codant pour la HA à étudier (HA\_X) derrière un segment du virus A/turkey/Italy/977/1999, H7N1 (H7N1(977)). Ce segment jouera le rôle de transporteur pour le transgène qui ne sera pas traduit en protéine mais qui pourra acquérir des mutations lors de la réplication virale. Une étude a montré qu'il était possible d'insérer une séquence d'environ 700 nt à la suite du segment PA d'un virus et de produire un virus viable avec une capacité de réplication proche de la souche sauvage (61). Une autre étude a montré qu'il était possible d'insérer un transgène à la suite d'un segment NS modifié et également de produire un virus capable de se répliquer *in vitro* (62). Dans un premier temps et grâce à ces deux études, deux systèmes vont être étudiés, un avec la séquence de HA insérée à la suite du segment PA et un autre où elle sera insérée à la suite du segment NS. Ces deux systèmes, H7N1(977)-PA-HA\_X et H7N1(977)-NS-HA\_X, vont être étudiés avec des séquences de HA de 600 nt et des séquences complètes d'environ 1700 nt. Enfin le système le plus performant sera sélectionné.

Les virus H7N1(977) recombinants (H7N1-HA\_X), possédant la séquence d'ARNv de HA\_X derrière le segment PA ou NS, seront produits grâce à un protocole de génétique inverse décrit par Hoffman *et al* en 2000. Celui-ci consiste à la co-transfection dans des cellules de 8 plasmides phw2000 contenant les séquences d'acide désoxyribonucléique (ADN) double brin des 8 gènes d'un VIA (63). La première étape consiste à créer par clonage des plasmides phw2000 contenant les séquences d'ADN double brin de PA et NS ainsi que la séquence d'ADN double brin du transgène à étudier. Puis, ces plasmides seront utilisés en génétique inverse pour produire les virus H7N1(977)-HA\_X. Une fois produits, les virus seront inoculés à des cellules pour qu'ils puissent se répliquer. Après plusieurs passages cellulaires, les séquences d'ARNv codant pour HA\_X, contenues dans les virus, seront séquencées afin d'étudier les mutations apparues.

## 2.1 Construction des plasmides phw2000-PA(977)-HA\_X et phw2000-NS(977)-HA\_X

Le plasmide phw2000 est constitué de deux brins d'ADN complémentaires. Il est utilisé comme vecteur de clonage pour les séquences d'ADN codantes pour les segments des VIAs en génétique inverse. Il contient :

- Un promoteur humain Pol I (Pol I) et un terminateur murin (Tm), qui permettent à la polymérase humaine de produire un ARNv négatif à partir du brin d'ADN complémentaire (ADNc).
- Un promoteur Pol II (Pol II) originaire d'un Cytomégalovirus humain, qui permet à la polymérase II de produire un ARNm à partir du brin d'ADN matrice.
- Un site de polyadénylation (polyA) qui permet l'ajout d'une queue polyA à l'ARNm.
- Un gène de résistance à l'ampicilline, le gène  $\beta$ -lactamase, qui permet la sélection de bactéries lors de transformations bactériennes.

Les séquences d'ADN double brin codantes pour les segments des VIAs sont insérées dans les plasmides phw2000 entre Pol I et Tm. Chaque insert contient la séquence codante (SCD) d'un segment viral, qui sera transcrite puis traduite en protéine, et une séquence non codante, la « non coding region » (NCR), à chaque extrémité 3' et 5'. Huit plasmides différents appelés « phw2000-X », où X représente le segment du VIA, sont ainsi obtenus. Pour ce travail, des plasmides phw2000-X(977) contenant les gènes du virus H7N1(977) ont été utilisés (Figure 8).

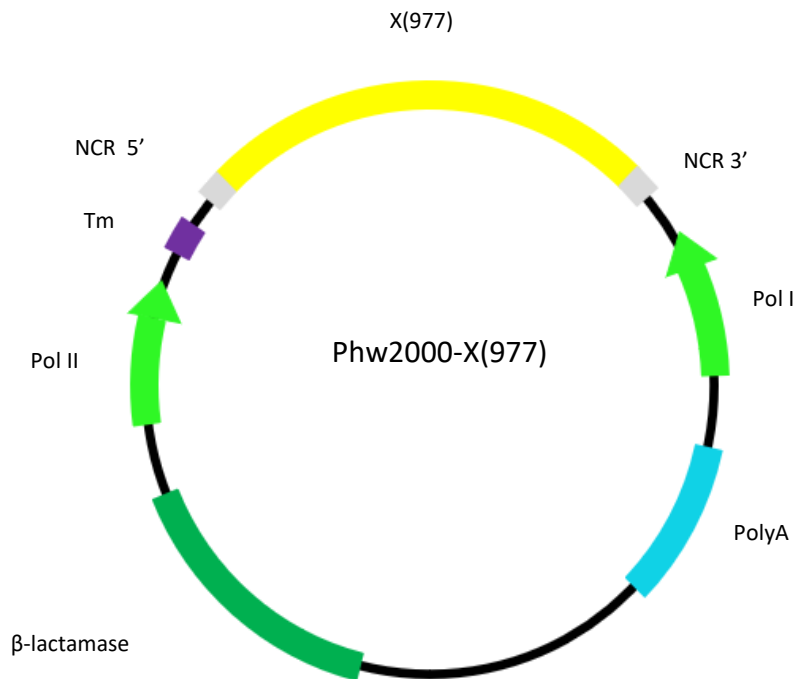


Figure 8 : Schéma d'un plasmide phw2000-X(977)

Lors de la réplication virale des VIAs, pour qu'un segment d'ARNv soit correctement intégré dans la nouvelle particule virale, ce dernier doit posséder des séquences d'emballage qui sont spécifiques de chaque segment. Ces séquences d'emballage incluent les NCR 5' et 3', ainsi qu'une partie de la SCD à chaque extrémité du gène et à proximité de ces NCR. Pour le segment PA, cette SCD correspond à 66 nt en 3' et 40 nt en 5' de l'ARNv (64) et pour le segment NS, celle-ci correspond à 30 nt en 3' et 5' (65). Ainsi, dans les constructions phw2000-PA(977)-HA\_X et phw2000-NS(977)-HA\_X, la séquence d'ADN codante pour le transgène HA\_X doit être insérée à la suite de celle codante pour PA ou NS et les segments PA-HA\_X et NS-HA\_X doivent être entourés respectivement des séquences d'emballage de PA et NS (Figure 9).



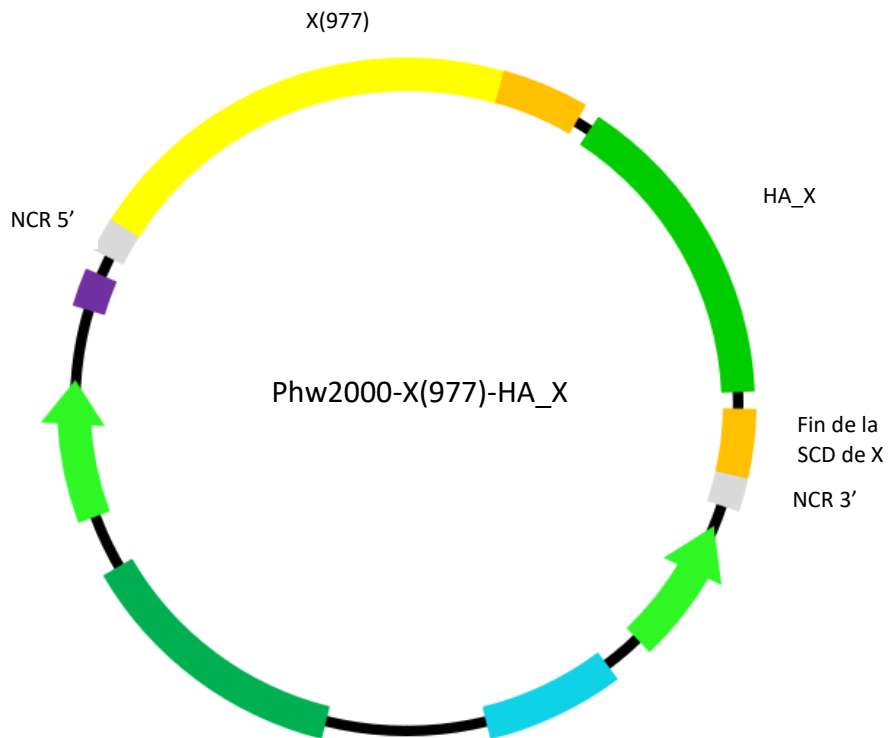
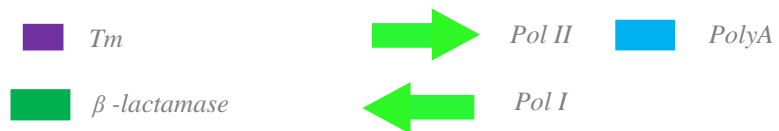


Figure 9 : Schéma représentant la construction finale phw2000-X(977)-HA\_X.

Légende : X(977) représente le gène PA(977) ou NS(977).

Le code couleur des séquences d'ADN du plasmide est conservé par rapport à la figure 8. Ainsi, les légendes suivantes n'ont pas été renotées sur cette figure :



La Figure 10 décrit le protocole utilisé pour la construction des plasmides phw2000-PA(977)-HA\_X et phw2000-NS(977)-HA\_X.

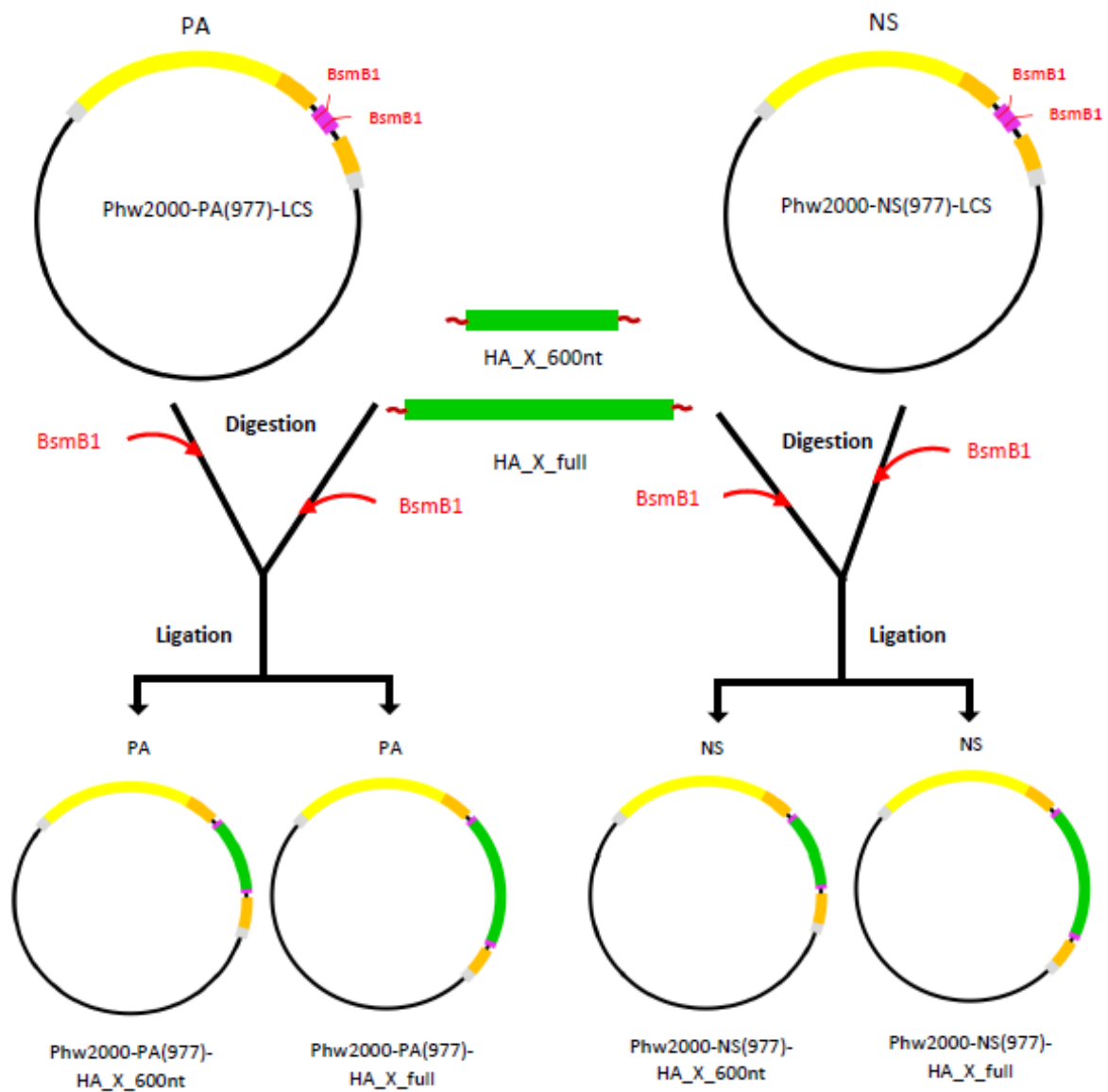


Figure 10 : Schéma représentant le protocole réalisé pour la construction des plasmides phw2000-PA(977)-HA\_X et phw2000-NS(977)-HA\_X

Légende : Les barres verticales rouges représentent les sites de restriction BsmB1

■ NCR    ■ Fin de la SCD de PA ou    ■ LCS

## 2.1.1 Matériel et méthode

### 2.1.1.1 Construction des plasmides *phw2000-PA(977)-LCS* et *phw2000-NS(977)-LCS*

La Figure 11 décrit le protocole utilisé pour la construction des plasmides *phw2000-PA(977)-LCS* et *phw2000-NS(977)-LCS*.

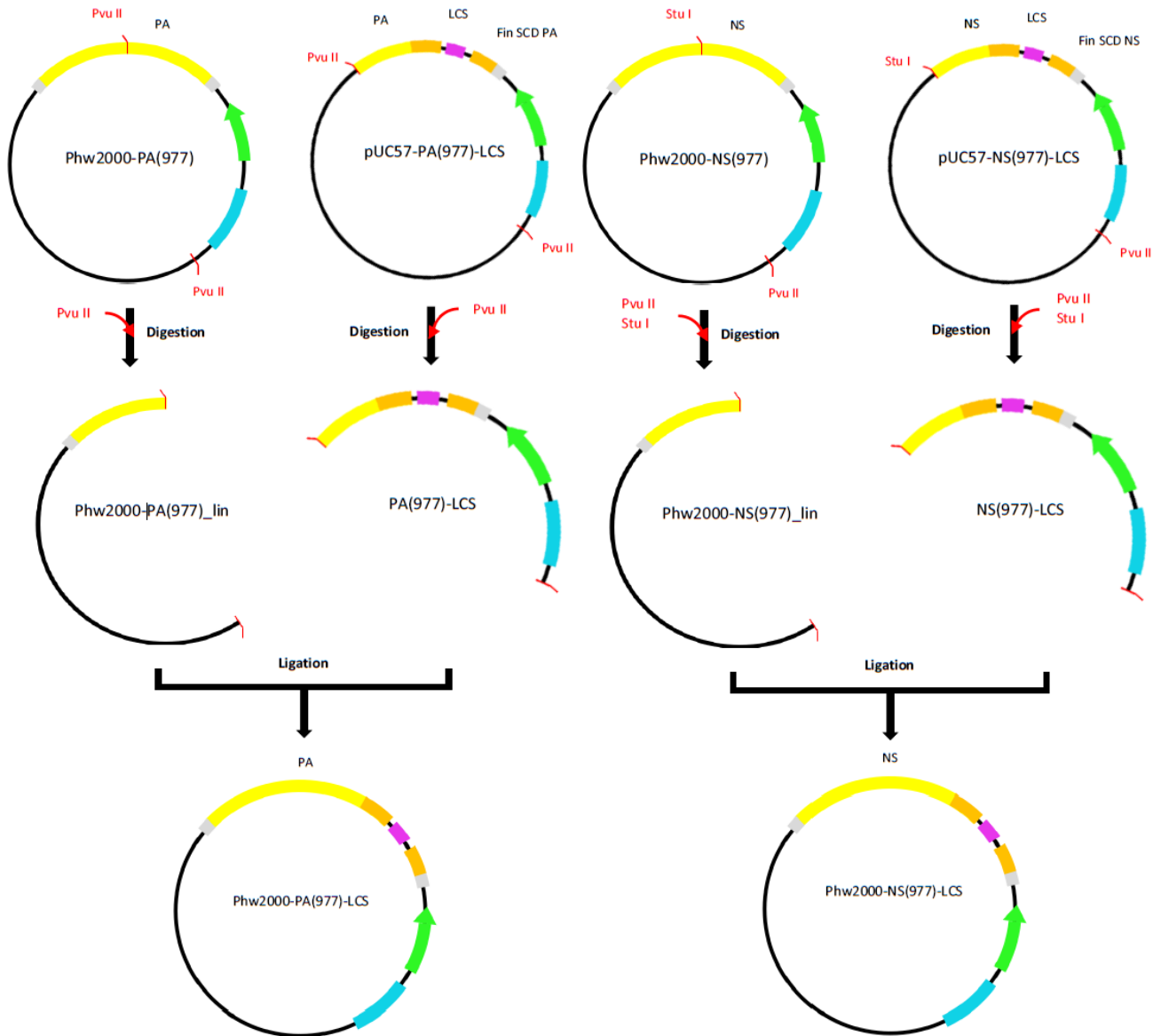


Figure 11 : Schéma représentant le protocole utilisé pour la construction des plasmides *phw2000-PA(977)-LCS* et *phw2000-NS(977)-LCS*

Légende : Les barres verticales rouges représentent les sites de restriction des endonucléases.

■ NCR   ← *Pol* I   ■ PolyA

### 2.1.1.1.1 Préparation des plasmides phw2000-PA(977) et phw2000-NS(977) linéarisés

Le plasmide phw2000-PA(977) a été digéré par l'enzyme de restriction Pvu II (Pvu II). Il s'agit d'une endonucléase qui digère l'ADN double brin et crée des extrémités dites « franches ». Cela signifie que les deux brins d'ADN sont clivés de manière symétrique. Ces extrémités franches permettent des recombinaisons entre segments de manière non spécifique. Le plasmide phw2000-PA(977) possède deux sites de restriction Pvu II. La digestion par Pvu II permet théoriquement l'obtention de deux fragments d'ADN : le fragment d'intérêt, le plasmide phw2000-PA(977) linéarisé (phw2000-PA(977)\_lin), mesurant 4393 nt et contenant le gène de résistance à l'ampicilline, le NCR 5' et le début de la SCD de PA, et un autre fragment de 715 nt contenant la fin de la SCD de PA, le NCR 3', Pol I et polyA. Le produit de la digestion a ensuite été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%. Le gel obtenu est présenté dans la Figure 12.

Cette digestion a bien permis l'obtention de deux fragments d'ADN linéarisés, d'environ 4500 nt et 800 nt. Le fragment de 4500 nt, concordant avec la taille de phw2000-PA(977)\_lin, a ensuite été purifié sur gel avec le protocole du kit Macherey Nagel « NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up ».

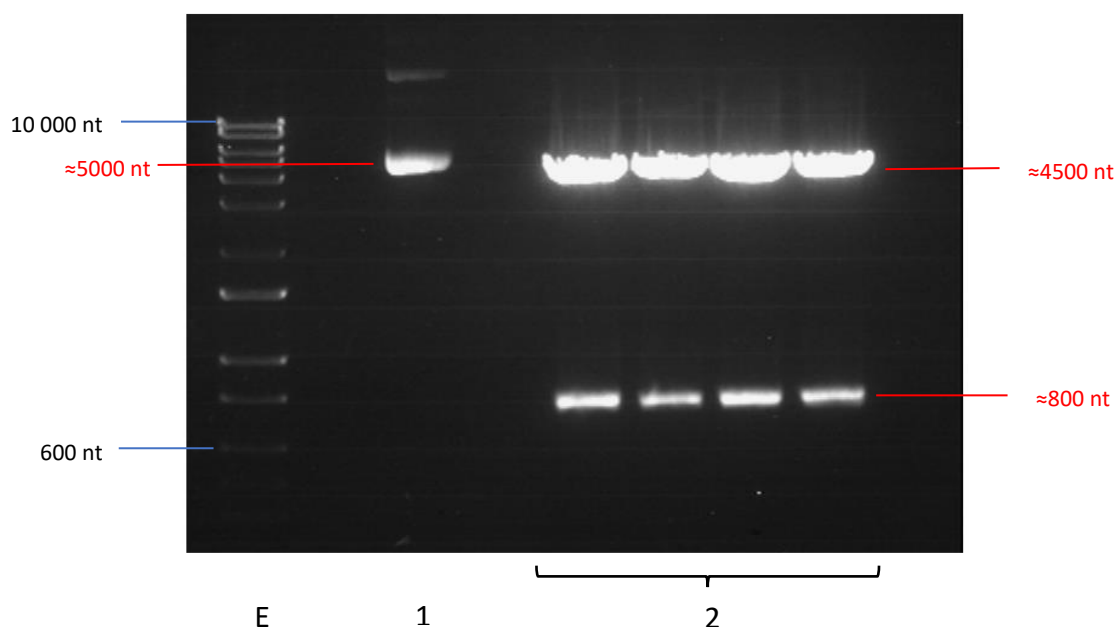


Figure 12 : Gel d'électrophorèse obtenu après migration du plasmide phw2000-PA(977) ayant été ou non digéré par Pvu II.

*Légende* : E = échelle d'ADN allant de 10 000 nt à 100 nt (échelle 2 log) ; 1 = pwh2000-PA(977) non digéré (contrôle négatif), 2 = pwh2000-PA(977) digéré par Pvu II

Le plasmide phw2000-NS(977) a subi une digestion par les enzymes de restriction PvuII et Stu I (Stu I). Stu I est une autre endonucléase créant également des extrémités franches. Cette digestion permet théoriquement l'obtention de deux fragments d'ADN : le fragment d'intérêt, phw2000-NS(977)\_lin, mesurant 2818 nt, contenant le gène de résistance à l'ampicilline, le NCR 5' et le début de la SCD de NS, et un autre fragment de 1035 nt contenant la fin de la SCD de NS, le NCR 3', Pol I et polyA. Le produit de la digestion a ensuite été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%. Le gel obtenu est présenté dans la Figure 13.

Au lieu des deux fragments attendus, la digestion a permis d'obtenir quatre fragments d'environ 2800 nt, 2000 nt, 1000 nt et 900 nt. La digestion a de nouveau été réalisée en changeant de stock de plasmides et d'enzymes. Malgré cela, les résultats obtenus étaient similaires. Le fragment d'environ 2800 nt, concordant avec la taille de phw2000-NS(977)\_lin, a été purifié sur gel avec le protocole du kit Macherey Nagel « NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up ».

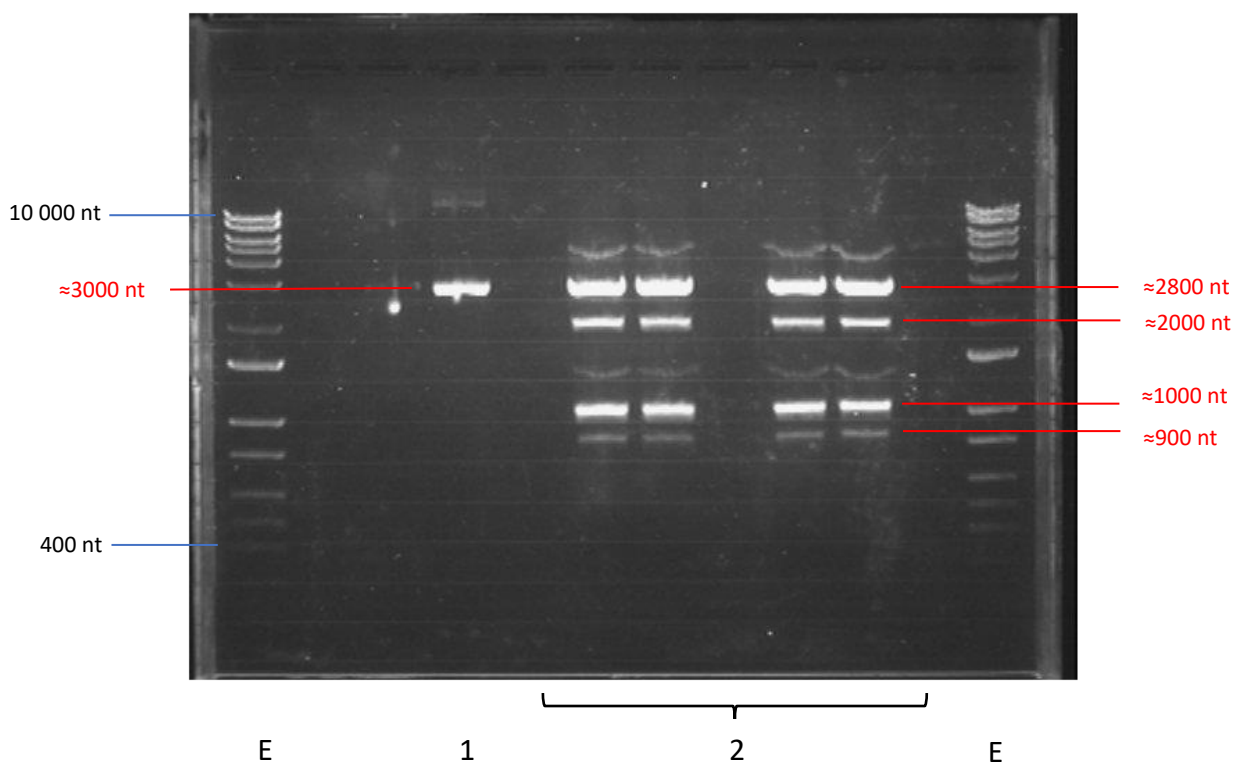


Figure 13 : Gel d'électrophorèse obtenu après migration du plasmide phw2000-NS(977) ayant été ou non digéré par Pvu II et Stu I.

Légende : E = échelle 2 log ; 1 = pwh2000-NS(977) non digéré (contrôle négatif) ; 2 = pwh2000-NS(977) digéré par Pvu II et Stu I.

Dans le but de garder les plasmides phw2000-PA(977)\_lin et phw2000-NS(977)\_lin sous leur forme linéarisée et d'éviter le repliement de leurs extrémités franches, une étape de déphosphorylation avec une phosphatase alcaline de crevette a été nécessaire.

#### 2.1.1.1.2 Construction des séquences PA(977)-LCS et NS(977)-LCS

Les séquences d'ADN PA(977)-LCS et NS(977)-LCS, insérées dans les plasmides phw2000-PA(977)\_lin et phw2000-NS(977)\_lin ont été construites dans le but d'insérer dans ces plasmides un site de liaison, le « Linker Cloning Site » (LCS). Ce LCS contient deux sites de restriction pour l'enzyme BsmB1 (BsmB1) qui permettront le clonage des séquences HA\_X. A la fin des SCD de PA et NS, un codon stop est présent et doit empêcher la traduction des séquences HA\_X qui seront insérées derrière celles de PA et NS. De plus, les séquences PA(977)-LCS et NS(977)-LCS ont été construites afin que la séquence HA\_X soit insérée dans un autre cadre de lecture que celui des séquences PA et NS et ne soit donc pas traduite.

Les séquences PA(977)-LCS et NS(977)-LCS ont été construites grâce au logiciel Geneious Prime® de la manière suivante (Figure 14) :

- 173 nt de la fin de la SCD de PA / 500 nt de la fin de la SCD de NS
- Le LCS
- Les 60 derniers nucléotides de la SCD de PA / NS, répétés pour être à proximité du NCR 3'
- Le NCR 3' de PA / NS
- Pol I
- PolyA
- Des sites de restriction Pvu II à chaque extrémité pour PA(977)-LCS / un site de restriction Stu I à l'extrémité 5' et un site de restriction Pvu II à l'extrémité 3' pour NS(977)-LCS

Les séquences PA(977)-LCS et NS(977)-LCS mesurent respectivement 829 nt et 1121 nt. Celles-ci ont été produites par l'entreprise GenScript® et insérées dans des plasmides pUC57. Deux plasmides ont ainsi été obtenus : pUC57-PA(977)-LCS et pUC57-NS(977)-LCS.

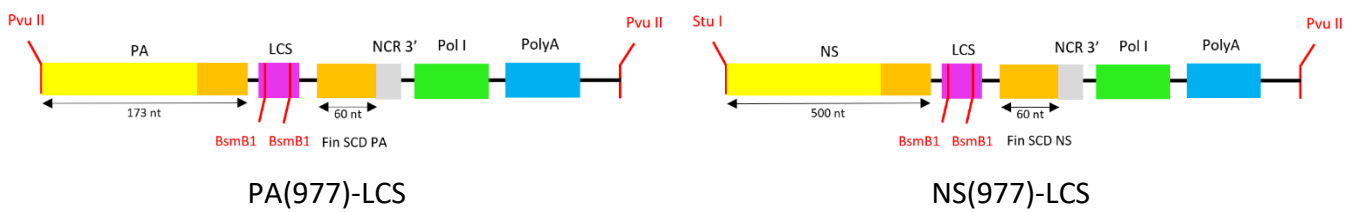


Figure 14 : Schéma des constructions PA(977)-LCS et NS(977)-LCS

*Légende* : Les barres rouges verticales représentent les sites de restriction des endonucléases.

#### 2.1.1.1.3 Préparation des inserts PA(977)-LCS et NS(977)-LCS

Les plasmides pUC57-PA(977)-LCS et pUC57-NS(977)-LCS, ont été transformés dans des bactéries compétentes qui ont ensuite été mises en culture dans un milieu sélectif contenant de l'ampicilline. Un clone bactérien a été récupéré pour chaque plasmide et purifié avec le protocole du kit Macherey Nagel « NucleoBond® Xtra EF plasmid purification » permettant d'obtenir un stock de plasmides pUC57-PA(977)-LCS et pUC57-NS(977)-LCS.

Le plasmide pUC57-PA(977)-LCS a ensuite été digéré par Pvu II. Celui-ci possédant plusieurs sites de restriction Pvu II, la digestion a conduit à plusieurs fragments qui ont ensuite été séparés sur gel d'agarose 1%. Le plasmide pUC57-NS(977)-LCS a été digéré par Pvu II et Stu I conduisant également à plusieurs fragments. Les fragments ont également été séparés sur gel d'agarose 1%. Le gel obtenu après la migration des produits de ces deux digestions est présenté dans la Figure 15.

Les fragments concordant avec la taille des séquences PA(977)-LCS et NS(977)-LCS, soit 829 et 1121 nt, ont été purifiés sur gel avec le protocole du kit Macherey Nagel « NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up ».

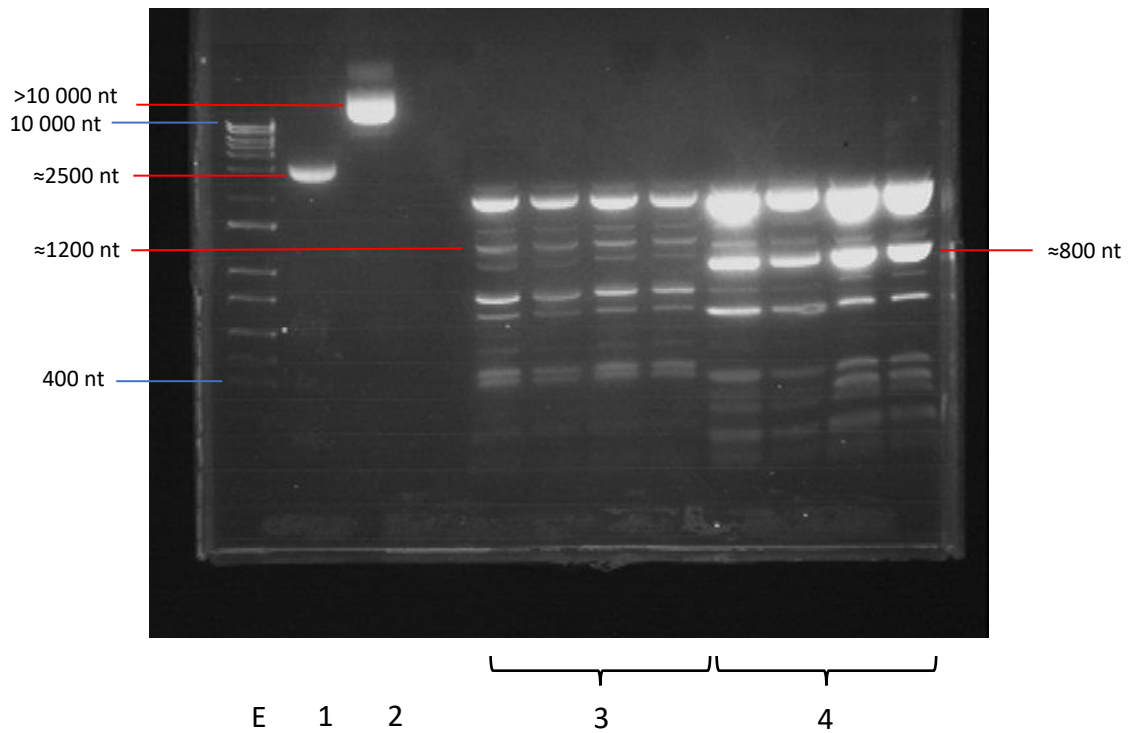


Figure 15 : Gel d'électrophorèse obtenu après migration des plasmides pUC57-PA(977)-LCS et pUC57-NS(977)-LCS ayant été ou non digérés

Légende : E = échelle 2 log ; 1 = pUC57-PA(977)-LCS non digéré (contrôle négatif) ; 2 = pUC57-NS(977)-LCS non digéré (contrôle négatif) ; 3 = pUC57-PA(977)-LCS digéré par Pvu II ; 4 = pUC57-NS(977)-LCS digéré par Stu I et Pvu II

#### 2.1.1.1.4 Ligation des deux fragments

Une ligation a été réalisée entre les plasmides phw2000-PA(977)\_lin et phw2000-NS(977)\_lin, et les séquences PA(977)-LCS et NS(977)-LCS, avec le protocole du kit « DNA Insert Ligation into Vector DNA ».

Les extrémités des fragments d'ADN étant franches, les deux fragments ne se lient pas de manière spécifique et les séquences PA(977)-LCS et NS(977)-LCS peuvent s'insérer dans les plasmides linéarisés dans le bon sens aussi bien que dans le sens inverse. Les produits de la ligation ont donc été transformés sur des bactéries compétentes sur un milieu contenant de l'ampicilline. Pour chacun des deux produits de ligation, dix clones bactériens ont été sélectionnés et purifiés avec le protocole du kit Macherey Nagel « NucleoBond® Xtra EF plasmid purification ». Les vingt clones obtenus ont ensuite été séquencés avec la méthode de Sanger afin de vérifier que la ligation a été réalisée dans le bon sens.

La Figure 16 présente le résultat de séquençage d'un clone de la construction phw2000-PA(977)-LCS. La séquence du clone est identique à la séquence théorique de la construction



phw2000-PA(977)-LCS sur toute la région séquencée. Il existe bien une continuité entre la SCD de PA et le début de la séquence de PA(977)-LCS, composée des 173 derniers nt de la SCD de PA, du LCS, des 60 nt répétés de la SCD de PA, du NCR 3' et d'une partie de Pol I. La séquence d'ADN de ce clone contient donc bien l'insert PA(977)-LCS et celui-ci est dans le bon sens. Ce clone a donc été sélectionné pour la construction phw2000-PA(977)-LCS. Pour la construction phw2000-NS(977)-LCS, le séquençage a également permis de sélectionner un clone où l'insert NS(977)-LCS était présent et inséré dans le bon sens.

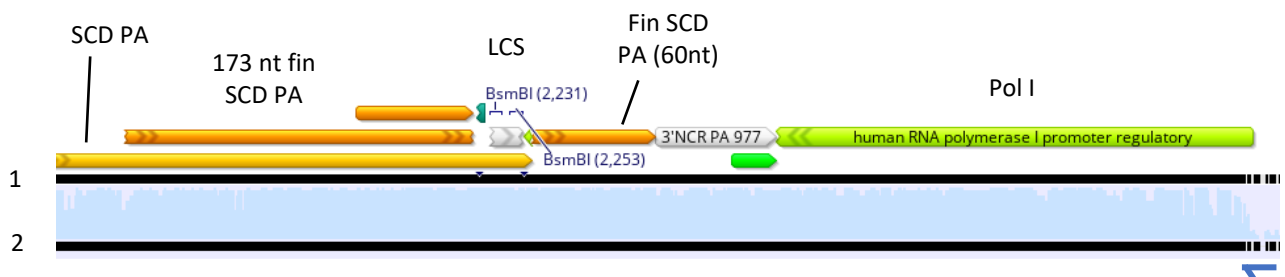


Figure 16 : Aligment entre la séquence d'ADN théorique du plasmide phw2000-PA(977)-LCS, et celle d'un clone de phw2000-PA(977)-LCS construit. .

Légende : 1 = séquence d'ADN théorique du plasmide phw2000-PA(977)-LCS ; 2 = séquence d'ADN d'un clone du plasmide phw2000-PA(977)-LCS construit ; ➔ zone de fixation de l'amorce permettant le séquençage.

Remarque : Lorsque les deux séquences d'ADN sont surlignées en noir, cela signifie qu'elles sont identiques. Les premiers nucléotides suivant la zone de fixation de l'amorce ne sont pas interprétables.

### 2.1.1.2 Préparation des transgènes HA\_X

La Figure 17 décrit le protocole utilisé pour extraire les séquences HA\_X des plasmides phw2000-HA\_X.

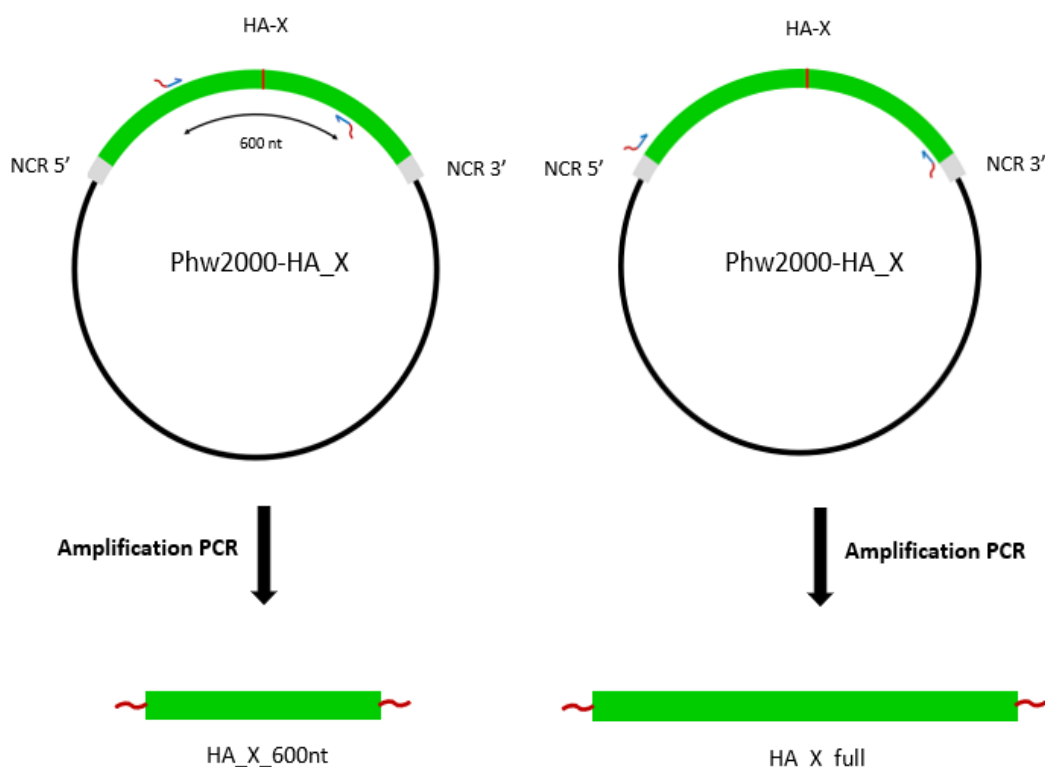


Figure 17 : Schéma représentant le protocole utilisé pour extraire les séquences HA\_X des plasmides phw2000-HA\_X

Légende : | Site de clivage      Amorces avec la « queue flottante » contenant le site de restriction BsmbI

#### 2.1.1.2.1 Choix des séquences HA\_X

Afin de tester les systèmes H7N1(977)-NS-HA\_X et H7N1(977)-PA-HA\_X, cinq séquences HA différentes ont été choisies pour être insérées dans les plasmides phw2000-PA(977)-LCS et phw2000-NS(977)-LCS. Ces séquences diffèrent par leur origine et par leur mutabilité au niveau de leur site de clivage. La séquence HA-ShimH5 provient du virus IAFP A/whistling swan/Shimane/499/83, H5N3. La séquence HA-ShimH5 24a2b diffère de HA-ShimH5 par deux points de mutation aux positions 1046 (G → A) et 1050 (C → A). Ces mutations conduisent à la création de 8 adénines consécutives élargissant la structure en boucle, et accélèrent la fréquence d'insertion de nucléotides (50). La séquence HA\_H5N8LP provient de la séquence HA du virus IAHP A/duck/France/161108h/2016, H5N8, qui a été modifiée par mutagenèse dirigée pour obtenir une séquence FP. Les séquences HA\_H5N8mut1 et

HA\_H5N8mut2 ont été construites, à partir de HA\_H5N8LP par les équipes de Romain Volmer au sein de l'UMR-IHAP dans le but d'étudier l'impact de la structure secondaire de l'ARN du segment HA dans la fréquence d'apparition des mutations au niveau du SC. La séquence HA\_H5N8mut1 diffère de HA\_H5N8LP par deux points de mutation aux positions 990 (G → T) et 996 (G → C). Ces mutations à proximité du site de clivage permettent d'obtenir une structure secondaire d'ARNv plus stable qui augmenterait la fréquence d'apparition des mutations. A l'inverse, la séquence HA\_H5N8mut2 diffère de HA\_H5N8LP par six points de mutations : 993 (T → A) ; 996 (G → A) ; 997 (C → T) ; 999 (C → A) ; 1011 (T → A) ; 1016 (G → A) qui entraînent une diminution de la stabilité de la structure secondaire de l'ARNv.

#### 2.1.1.2.2 Extraction des séquences HA\_X

A partir des cinq plasmides phw2000-HA\_X, les séquences HA\_X ont été extraites en les amplifiant par « Polymerase Chain Reaction » (PCR) avec le protocole du kit « Thermo Scientific Phusion High-Fidelity PCR ». Pour la PCR, les amorces ont été construites avec le logiciel Geneious Prime® puis produites par l'entreprise Eurogentec®. Ces amorces possèdent à leur extrémité une « queue flottante » contenant le site de restriction BsmB1 qui ne se fixera pas à l'ADN lors de la PCR mais qui encadrera les séquences HA\_X amplifiées et permettra leur clonage par la suite. Pour chaque plasmide phw2000-HA\_X, deux séquences ont été extraites : une de 600 nt centrée sur le site de clivage, HA\_X\_600nt, et une correspondant à la totalité de HA, HA\_X\_full. Les protocoles de ces PCR sont décrits dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Tableau présentant les protocoles des PCR réalisées sur les plasmides phw2000-HA\_X pour obtenir les fragments HA\_X\_600nt et HA\_X\_full, avec les amorces, la polymérase et le programme utilisés.

ADN matrice	Amorces + « queues flottantes »	Polymérase	Programme	Fragment obtenu
Phw2000-HA_H5N8LP	GDA 25 GDA 26	ADN polymérase Phusion	Dénaturation initiale : 98°C 30'' 1 x  Dénaturation : 98°C 5'' Hybridation des amorces : 60°C 30'' 20 x Extension : 72°C 18''	HA_H5N8LP_600nt
Phw2000-HA_H5N8mut1				HA_H5N8mut1_600nt
Phw2000-HA_H5N8mut2				HA_H5N8mut2_600nt
Phw2000-HA_ShimH5	GDA 27 GDA 28		Extension finale : 72°C 10' 1 x	HA_ShimH5_600nt
Phw2000-HA_ShimH5 24a2b			HA_ShimH5 24a2b_600nt	
Phw2000-HA_H5N8LP	TFA1 TFA2	ADN polymérase Phusion	Dénaturation initiale : 98°C 30'' 1 x  Dénaturation : 98°C 5'' Hybridation des amorces : 62°C 30'' 20 x Extension : 72°C 53''	HA_H5N8LP_full
Phw2000-HA_H5N8mut1				HA_H5N8mut1_full
Phw2000-HA_H5N8mut2				HA_H5N8mut2_full
Phw2000-HA_ShimH5			Extension finale : 72°C 10' 1 x	HA_ShimH5_full
Phw2000-HA_ShimH5 24a2b			HA_ShimH5 24a2b_full	

Les produits de PCR ont ensuite migré sur gel d'agarose 1,5% pour les séquences de 600 nt et 0,8% pour les séquences complètes. Les gels obtenus sont présentés dans les Figure 18 et Figure 19. Sur la Figure 18, les amplicons de 600 nt ont migré jusqu'au repère de 900 nt. Or les amorces ont été construites dans le but d'obtenir un fragment de 600 nt et la PCR a correctement fonctionné. Cette migration peut s'expliquer par une très grande quantité d'ADN, obtenue après la PCR et qui va perturber la migration des amplicons. Les fragments complets ainsi que ceux de 600 nt ont ensuite été purifiés sur gel avec le protocole du kit Macherey Nagel « NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up ».

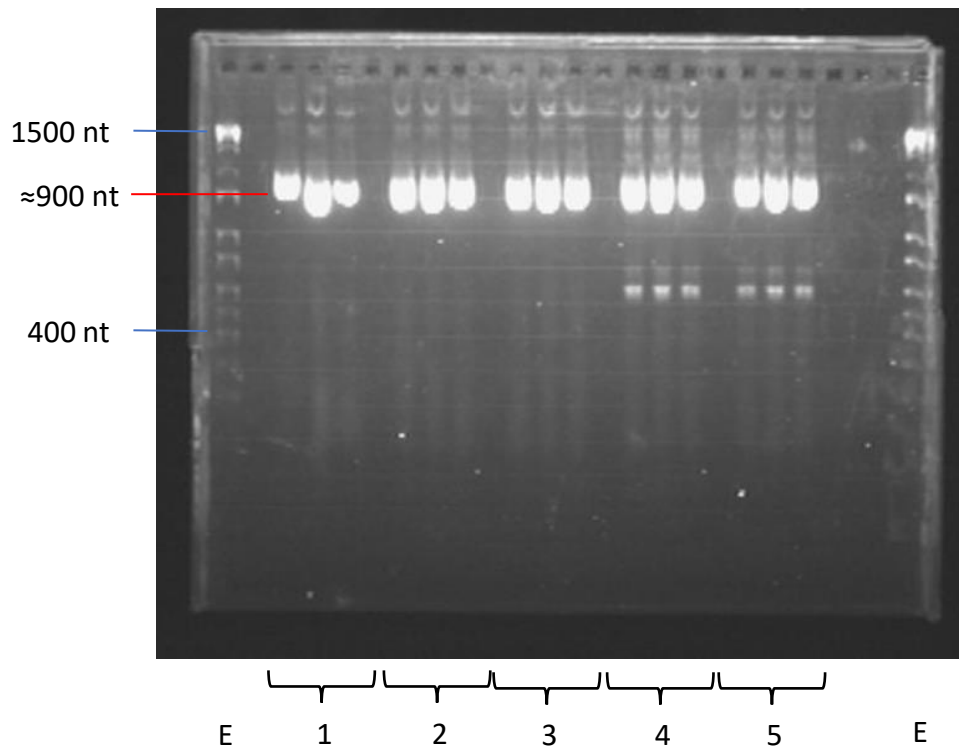


Figure 18 : Gel d'électrophorèse obtenu après migration des séquences HA\_X\_600nt

Légende : E = échelle d'ADN 100 pb plus ; 1 = HA\_H5N8LP\_600nt ; 2 = HA\_H5N8mut1\_600nt ; 3 = HA\_H5N8mut2\_600nt ; 4 = HA\_ShimH5\_600nt ; 5 = HA\_ShimH5 24a2b\_600nt

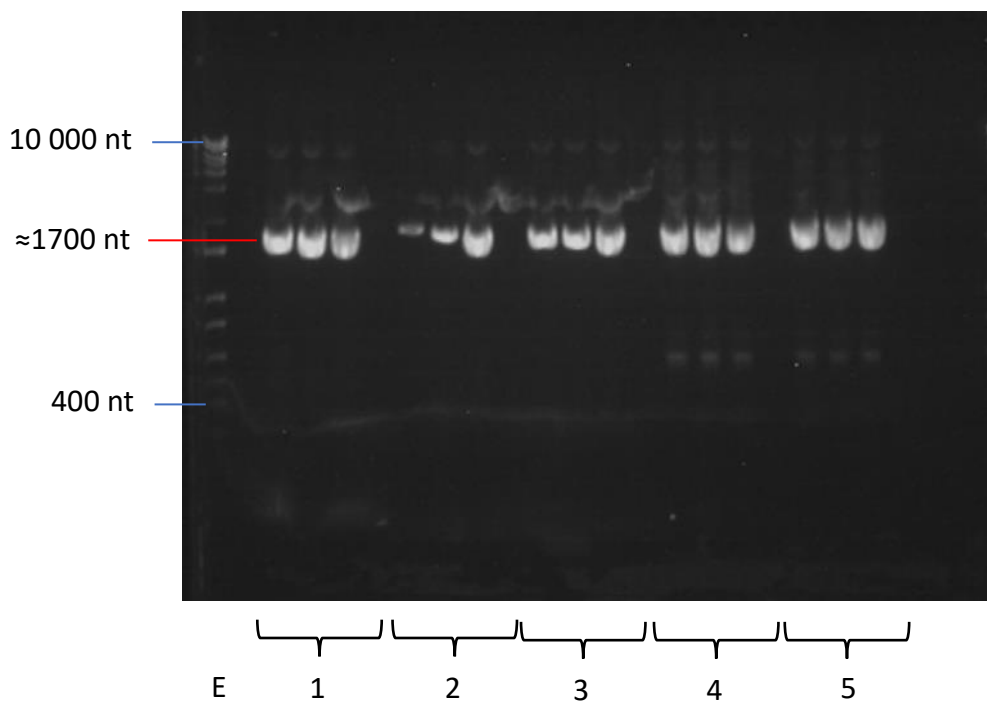


Figure 19 : Gel d'électrophorèse obtenu après migration des séquences HA\_X\_full

Légende: E = échelle 2 log ; 1 = HA\_H5N8LP\_full ; 2 = HA\_H5N8mut1\_full ; 3 = HA\_H5N8mut2\_full ; 4 = HA\_ShimH5\_full ; 5 = HA\_ShimH5 24a2b\_full

### *2.1.1.3 Ligation des séquences HA\_X dans les plasmides phw2000-PA(977)-LCS et phw2000-NS(977)-LCS*

Le plasmide phw2000-PA(977)-LCS ainsi que les cinq séquences HA\_X\_600nt et les cinq séquences HA\_X\_full ont été digérés par BsmB1 qui est une endonucléase créant des extrémités dites « cohésives », c'est-à-dire que les deux brins d'ADNc sont clivés de manière asymétrique. Ces extrémités cohésives ne permettent la recombinaison qu'avec d'autres séquences possédant des extrémités cohésives complémentaires. Une ligation a ensuite été réalisée entre le plasmide phw2000-PA(977)-LCS et les séquences HA\_X avec le protocole du kit « DNA Insert Ligation into Vector DNA ». Dix plasmides ont ainsi été obtenus : cinq plasmides phw2000-PA(977)-HA\_X\_600nt et cinq plasmides phw2000-PA(977)-HA\_X\_full.

Avec le même protocole, le plasmide phw2000-NS(977)-LCS ainsi que les dix séquences HA\_X ont été digérés par BsmB1 puis ligués entre eux. Dix plasmides ont été obtenus : cinq plasmides phw2000-NS(977)-HA\_X\_600nt et cinq plasmides phw2000-NS(977)-HA\_X\_full.

Les vingt plasmides obtenus ont ensuite été transformés dans des bactéries compétentes dans un milieu contenant de l'ampicilline. Pour chaque plasmide, 3 clones ont été sélectionnés puis purifiés avec le protocole du kit Macherey Nagel « NucleoBond® Xtra EF plasmid purification ».

Les clones obtenus ont ensuite été séquencés avec la méthode de Sanger afin de vérifier la présence du transgène HA\_X ainsi que sa séquence complète. Avec une amorce, il n'est possible de séquencer qu'une séquence d'environ 1000 nucléotides. Plusieurs amorces et séquençages ont été nécessaires pour certains phw2000-PA(977)-HA\_X et phw2000-NS(977)-HA\_X. Des amorces « forward », qui permettent un séquençage dans le sens 5' vers 3' du brin codant, et des amorces « reverse », qui permettent un séquençage dans le sens inverse, ont été construites grâce au logiciel Geneious Prime®, puis produite par l'entreprise Eurogentec®. Ces amorces se fixent soit sur une partie de la SCD de PA ou NS proche de l'insert HA\_X pour vérifier la continuité entre ces deux séquences et ainsi s'assurer de la présence de l'insert HA\_X dans le plasmide, soit directement sur la séquence HA\_X.

## 2.1.2 Résultats

Pour chaque construction phw2000-PA(977)-HA\_X et phw2000-NS(977)-HA\_X, un clone remplissant les conditions suivantes a été sélectionné : la séquence HA\_X est présente dans le plasmide et celle-ci ne présente pas de « single nucleotide polymorphism » (SNP).

La Figure 20 présente un résultat de séquençage en prenant pour exemple un clone du plasmide phw2000-NS(977)-HA\_ShimH5\_600nt. Cet alignement permet de comparer la séquence d'ADN du clone de phw2000-NS(977)\_HA\_ShimH5\_600nt produit avec la séquence d'ADN théorique du plasmide phw2000-NS(977)-HA\_ShimH5\_600nt. Ces deux séquences sont identiques sur la zone d'alignement qui s'étend de la fin de la SCD de NS jusqu'au NCR 3'. L'insert HA\_ShimH5\_600nt est donc bien présent dans le plasmide et sa séquence ne présente pas de SNP.

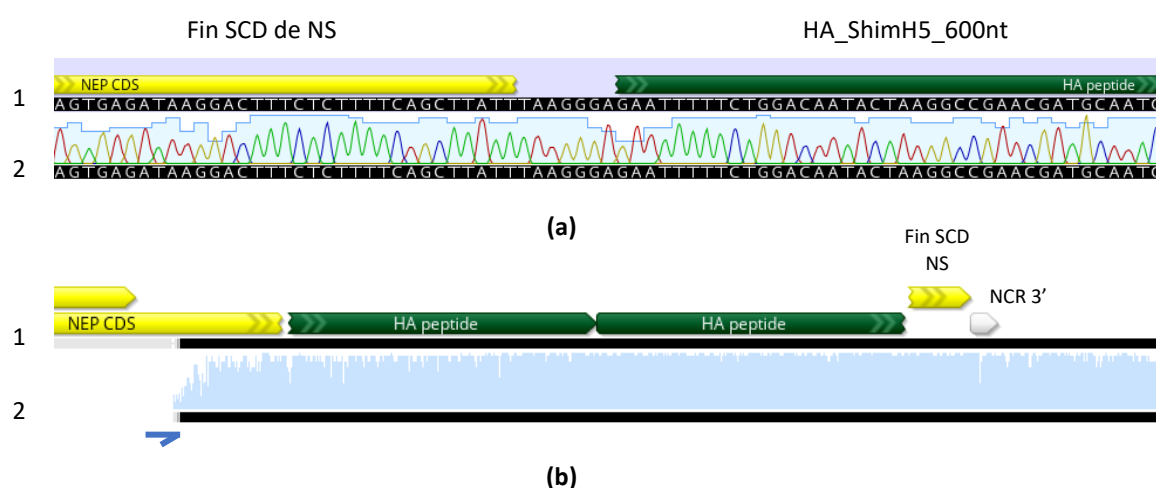


Figure 20 : Alignement entre la séquence d'ADN théorique du plasmide construit phw2000-NS(977)-HA\_ShimH5\_600nt et celle d'un clone de phw2000-NS(977)\_HA\_ShimH5\_600nt produit

### Légende :

(a) = alignement centré sur la fin de la SCD de NS et le début de celle de l'insert HA\_ShimH5\_600nt.

(b) = vue plus large de l'alignement prenant en compte la fin de la SCD de NS, la séquence complète de l'insert HA\_ShimH5\_600nt, les 60 nt répétés de la fin de la SCD de NS et le NCR 3'.

1 = séquence d'ADN théorique du plasmide phw2000-NS(977)-HA\_ShimH5\_600nt ; 2 = séquence d'ADN d'un clone du plasmide phw2000-NS(977)-HA\_ShimH5\_600nt produit ; ➔ zone de fixation de l'amorce permettant le séquençage.

Remarque : Lorsque les deux séquences d'ADN sont surlignées en noir, cela signifie qu'elles sont identiques. Les 40 premiers nucléotides suivant la zone de fixation de l'amorce ne sont pas interprétables.

## 2.2 Production des virus H7N1(977)-HA\_X avec un protocole de génétique inverse

En 2000, Hoffman *et al.* a développé un système de génétique inverse permettant d'obtenir des VIAs à partir de la co-transfection dans des cellules de huit plasmides phw2000-X contenant les séquences d'ADN double brin des huit gènes d'un VIA. Ces séquences sont entourées par deux promoteurs Pol I et Pol II orientés en sens inverse, permettant d'obtenir à la fois la synthèse d'ARNv par Pol I et la synthèse d'ARNm par Pol II, qui sera traduit en protéine. Dès que les protéines constituant le complexe de la polymérase virale (PB1, PB2, PA et NP) sont synthétisées, la réplication virale peut commencer et aboutit à la formation de particules virales infectieuses (63).

Ici, ce système a été utilisé avec les gènes du virus H7N1(977) en remplaçant les plasmides phw2000-PA(977) et phw2000-NS(977) par les constructions obtenues dans la partie 2.1 : phw2000-PA(977)-HA\_X et phw2000-NS(977)-HA\_X. Dans ce système, ces nouveaux plasmides permettront d'obtenir des ARNv contenant les séquences PA-HA\_X et NS-HA\_X, mais seules celles de PA et NS seront traduites en protéines. Ce système de génétique inverse est présenté dans la Figure 21.

Dans un premier temps, afin de vérifier que les plasmides phw2000-PA(977)-HA\_X et phw2000-NS(977)-HA\_X étaient fonctionnels et permettaient d'obtenir des virus en génétique inverse, seuls les quatre plasmides phw2000-PA(977)-HA\_ShimH5\_600nt ; phw2000-PA(977)-HA\_ShimH5\_full ; phw2000-NS(977)-HA\_ShimH5\_600nt et phw2000-NS(977)-HA\_ShimH5\_full ont été utilisés dans le but de produire les virus suivants : H7N1(977)-PA-HA\_ShimH5\_600nt ; H7N1(977)-PA-HA\_ShimH5\_full ; H7N1(977)-NS-HA\_ShimH5\_600nt et H7N1(977)-NS-HA\_ShimH5\_full.



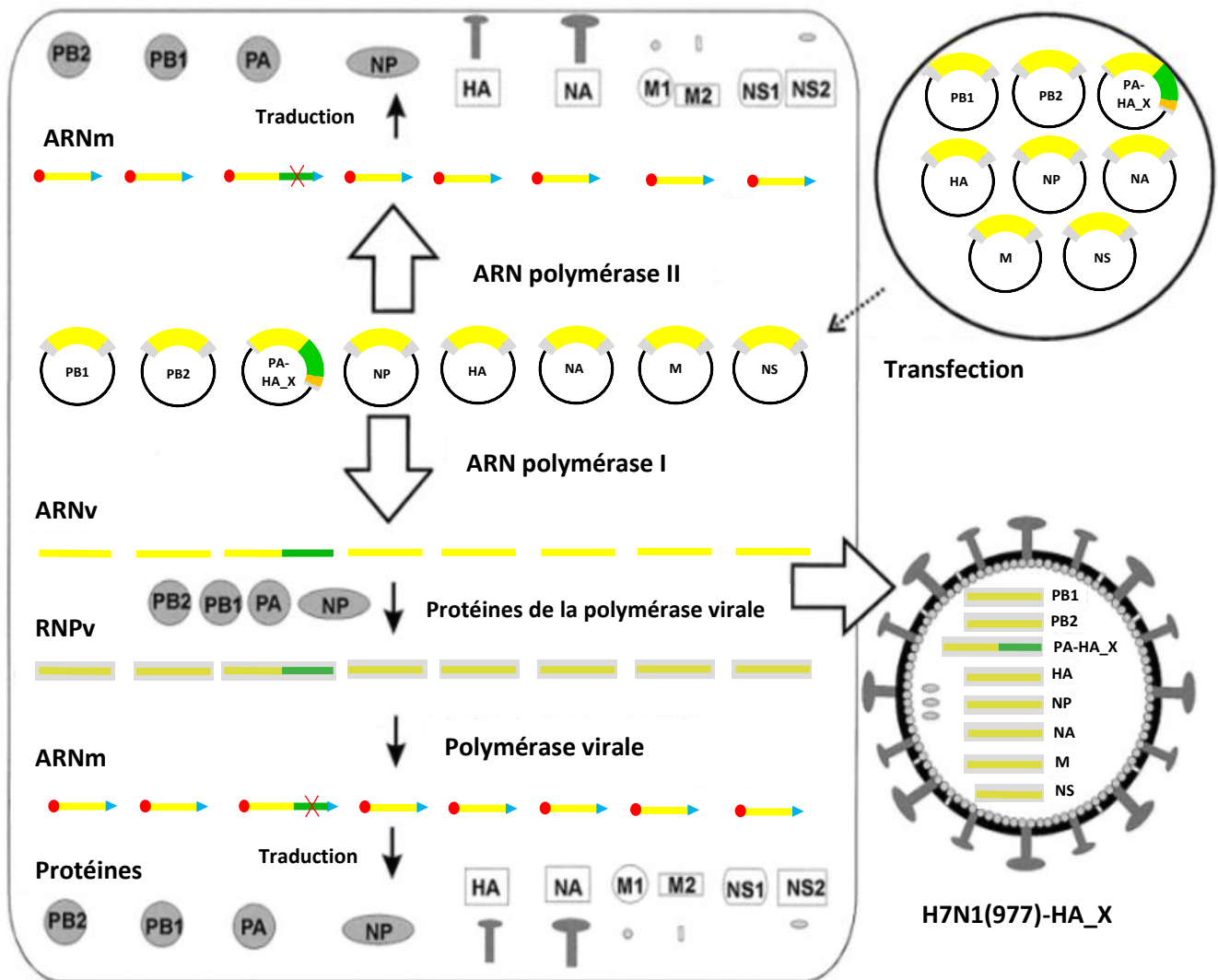
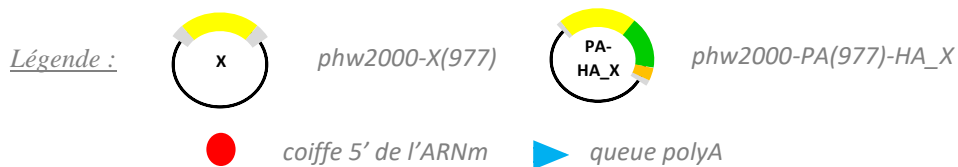


Figure 21 : Schéma représentant le protocole de génétique inverse utilisé pour produire des virus H7N1(977)-HA\_X en utilisant le système H7N1(977)-PA-HA\_X.



Le protocole de génétique inverse qui utilise le système H7N1(977)-NS-HA\_X est identique mis à part que la séquence HA\_X est présente sur le plasmide phw2000-NS(977)-HA\_X. Figure d'après (63)

## 2.2.1 Matériel et méthode

### 2.2.1.1 Co-transfection des plasmides

Dans ce protocole, six conditions ont été testées : quatre conditions correspondant aux virus H7N1(977)-HA\_X présentés ci-dessus, une condition correspondant au virus sauvage H7N1(977)wt qui sert de contrôle positif et une condition correspondant au virus sauvage sans le segment NS qui sert de contrôle négatif (Tableau 3).

Tableau 3 : Tableau présentant le protocole de co-transfection utilisé.

Condition	Plasmides (500 ng/plasmide)	Quantité d'Opti-MEM™ + réactif	Quantité d'Opti-MEM™ + LTX
<b>1</b> H7N1(977)-PA-HA_ShimH5_600nt	7 plasmides phw2000-X(977) phw2000-PA(977)- HA_ShimH5_600nt	125 µL + 4 µL	115 µL + 10 µL
<b>2</b> H7N1(977)-PA-HA_ShimH5_full	7 plasmides phw2000-X(977) phw2000-PA(977)-HA_ShimH5_full		
<b>3</b> H7N1(977)-NS-HA_ShimH5_600nt	7 plasmides phw2000-X(977) phw2000-NS(977)- HA_ShimH5_600nt		
<b>4</b> H7N1(977)-NS-HA_ShimH5_full	7 plasmides phw2000-X(977) phw2000-NS(977)-HA_ShimH5_full		
<b>5</b> H7N1(977)wt	8 plasmides phw2000-X(977)		
<b>6</b> H7N1(977)wt sans NS	7 plasmides phw2000-X(977) (sans phw2000-NS(977))	125 µL + 3,5 µL	

La transfection des plasmides a été réalisée avec le protocole du kit Invitrogen™ «Lipofectamine® LTX DNA Transfection Reagent Protocol». Pour chacune des six conditions, 500 ng de chaque plasmide et une quantité de réactif PLUS™ Reagent correspondante à (0,5 x le nombre de plasmide) µL ont été ajoutés dans 125 µL de milieu de culture Opti-MEM™. Un mélange de 115 µL de milieu de culture Opti-MEM™ et de 10 µL de réactif Lipofectamine® LTX Reagent (LTX) a ensuite été ajouté à chaque condition et le tout a été mis en incubation à température ambiante pendant 5 min.

Pour chaque condition, le volume total du mélange a ensuite été ajouté dans un puit d'une plaque P6. Chaque puit contenait une co-culture confluente de cellules humaines de rein

embryonnaire HEK 293T (293T) et de cellules canines de rein Madin-Darby Canine Kidney (MDCK), ainsi que 2 mL de milieu de culture Opti-MEM™, auxquels ont été ajoutés de la pénicilline et de la streptomycine pour une concentration de 1mg/mL. Les cellules 293T ont été utilisées car elles sont très fortement transfectables. Cependant, celles-ci ne permettent pas la réplication du virus et supportent mal l'étape de trypsination qui sera réalisée par la suite pour la maturation des HA. Ainsi, une co-culture a été réalisée avec des cellules MDCK qui sont des cellules moins fragiles, qui permettent la réplication virale et qui résistent à l'étape de trypsination. Les plaques P6 ont ensuite été mises en incubation à 37°C.

A 20h post-transfection, un mélange de 250 µL de milieu de culture Opti-MEM™ et de trypsine-TPCK, concentrée à 10 µg/mL, a été ajouté dans les six puits de la plaque P6, pour une concentration finale en trypsine-TPCK de 1 µg/mL.

A 72h post-transfection, les surnageants des six puits ont été récoltés puis clarifiés par centrifugation.

#### *2.2.1.2 Amplification des virus produits*

Les virus produits en génétique inverse ont ensuite été amplifiés. Pour chacune des six conditions, 1 mL de surnageant récupéré à 72h post-transfection a été ajouté dans une flasque Falcon® F25 (F25) contenant des cellules MDCK à confluence. Les six F25 ont ensuite été mises en incubation à 37°C pendant 1h. Les surnageants des F25 ont ensuite été retirés et 2 mL de milieu de croissance viral contenant du milieu de culture Opti-MEM™, de la pénicilline et de la streptomycine à la concentration de 1 mg/mL et de la trypsine-TPCK à la concentration de 1 µg/mL, ont été ajoutés dans chaque F25. Celles-ci ont ensuite été mises en incubation à 37°C pendant 72h. Puis, les surnageants des six puits ont été récoltés puis clarifiés par centrifugation.

#### *2.2.1.3 Test d'hémagglutination*

Un test d'hémagglutination a été réalisé sur les surnageants des conditions 1 à 6, récoltés après 72h d'amplification, afin de vérifier la présence de particules virales. Les érythrocytes aviaires contiennent à leur surface des acides sialiques sur lesquels la HA peut se fixer. Ainsi, lorsque des érythrocytes aviaires sont mélangés avec une concentration suffisante de VIAs, une réaction d'agglutination apparaît et conduit à la formation d'un maillage diffus.

Dans un premier temps, du sang de poulet mélangé à un anticoagulant a été centrifugé puis lavé plusieurs fois avec du « phosphate-buffered saline » (PBS). Après un dernier lavage et une ultime centrifugation, le surnageant a été retiré et le volume de globules rouges restant a été suspendu dans du PBS pour obtenir une dilution finale des globules rouges de 1/100.

Les puits de six colonnes d'une plaque P96 ont ensuite été remplis avec 50 µL de PBS sauf ceux de la première ligne. Un volume de 100 µL des surnageants à tester a ensuite été ajouté dans les puits de la première ligne et chaque colonne correspondait à une condition. Un volume de 50 µL de surnageant contenu dans les puits de la première ligne a ensuite été prélevé et ajouté dans les puits de la deuxième ligne. Puis, 50 µL du volume de ces puits ont été prélevés et ajoutés dans les puits de la troisième ligne et ainsi de suite jusqu'à la dernière ligne. Les 50 µL prélevés dans la dernière ligne ont été jetés. Ainsi, le taux de dilution entre une ligne et la suivante est de 1/2. Un puit a été rempli avec 25µL de PBS et 25µL de virus H7N1(977), servant ainsi de contrôle positif, et un autre puit a été rempli avec 50 µL de PBS pour servir de contrôle négatif. Enfin, 50 µL de la solution de sang diluée à 1/100 a été ajoutée dans chaque puit. La lecture a été faite après 30 minutes.

L'interprétation des résultats se fait directement à l'œil nu. Un résultat négatif se traduit par un dépôt d'érythrocytes non agglutinés au fond du puit. Un résultat positif se traduit par une absence de dépôt au fond du puit. Il existe également des résultats intermédiaires, considérés comme positifs, lorsque la concentration en HA n'est pas suffisante. Ceux-ci peuvent se traduire par un dépôt partiel d'érythrocytes au fond du puit ou par un retard lors de la réalisation du test de la larme. Ce test est réalisé en plaçant la P96 à la verticale et en l'inclinant de 45°, ce qui entraîne une coulée du dépôt d'érythrocytes formant ainsi une larme (66) (Figure 22).

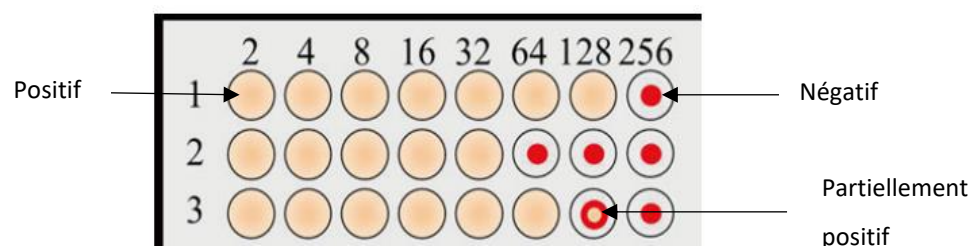


Figure 22 : Figure illustrant les résultats d'un test d'hémagglutination. Figure tirée de (64)

### 2.2.2 Résultats

Le test d'hémagglutination était positif pour les conditions 1 à 5 et négatif pour la condition 6. Les puits des conditions 1 à 5 présentaient une hémagglutination jusqu'à la dernière dilution : 1/128 (Figure 23). Ce protocole de génétique inverse a donc conduit à la production de VIAs pour les conditions 1 à 5.

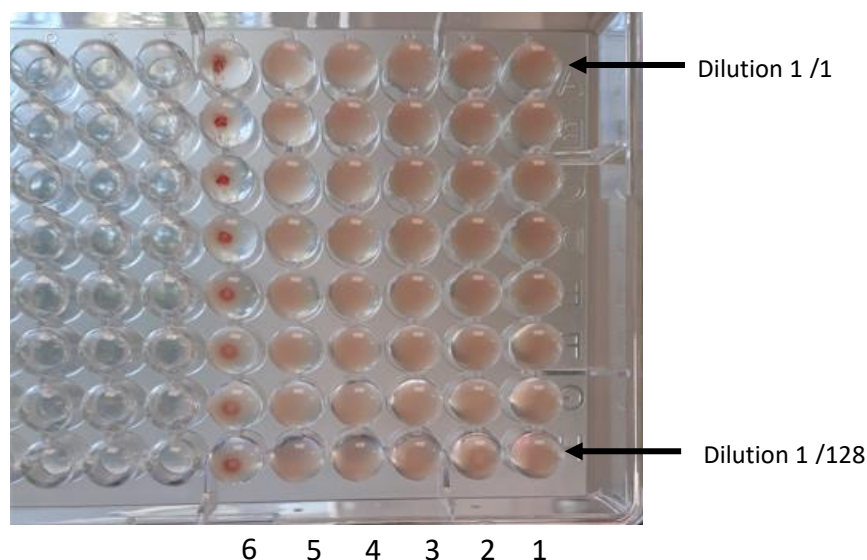


Figure 23 : Photographie présentant les résultats du test d'hémagglutination réalisé sur les surnageants des conditions 1 à 6 récoltés après 72h d'amplification

#### Légendes :

Les chiffres 1 à 6 représentent respectivement les conditions 1 à 6.

Les contrôles, non représentés sur cette photographie, présentaient bien une hémagglutination pour le contrôle positif, et un dépôt de globules rouges au fond du puit pour le contrôle négatif.

Après avoir vérifié que les plasmides phw2000-PA(977)-HA\_ShimH5\_600nt, phw2000-PA(977)-HA\_ShimH5\_full, phw2000-NS(977)-HA\_ShimH5\_600nt et phw2000-NS(977)-HA\_ShimH5\_full permettaient bien d'obtenir des virus en génétique inverse, le reste des virus des systèmes H7N1(977)-PA-HA\_X et H7N1(977)-NS-HA\_X ont été produits puis amplifiés avec le même protocole de génétique inverse. Au total, pour chaque système, dix virus ont été obtenus : cinq virus H7N1(977)-HA\_X\_600nt et cinq virus H7N1(977)-HA\_X\_full.

## 2.3 Caractérisation des systèmes H7N1(977)-PA-HA\_X et H7N1(977)-NS-HA\_X

Les deux systèmes H7N1(977)-PA-HA\_X et H7N1(977)-NS-HA\_X ont été comparés afin de sélectionner le plus performant. Dans un premier temps, leurs cinétiques de réplication ont été comparées. Puis, après un premier passage cellulaire sur des cellules MDCK, la présence des transgènes HA\_X au sein des génomes des virus H7N1(977)-PA-HA\_X et H7N1(977)-NS-HA\_X a été vérifiée.

### 2.3.1 Cinétique de réplication des systèmes H7N1(977)-PA-HA\_X et H7N1(977)-NS-HA\_X

Pour comparer les cinétiques de réplication des systèmes H7N1(977)-PA-HA\_X et H7N1(977)-NS-HA\_X, deux virus par système ont été sélectionnés : un contenant une séquence HA\_X\_600nt et un autre contenant une séquence HA\_X\_full. Les quatre virus sélectionnés sont les quatre premiers virus produits en génétique inverse dans la partie 2.1 : H7N1(977)-PA-HA\_ShimH5\_600nt, H7N1(977)-PA-HA\_ShimH5\_full, H7N1(977)-NS-HA\_ShimH5\_600nt et H7N1(977)-NS-HA\_ShimH5\_full.

#### 2.3.1.1 Matériel et méthode

##### 2.3.1.1.1 Titrage des virus

Dans un premier temps, les titres viraux des virus produits en génétique inverse après une amplification de 72h ont dû être déterminés.

##### 2.3.1.1.1.1 Méthode de dosage TCID50

Après l'amplification virale, la détermination des titres viraux des virus produits correspondant aux conditions 1 à 5 a été réalisée en utilisant la méthode de dosage « 50% tissue culture infectious dose » (TCID50). Cette méthode permet de déterminer la dilution du virus à titrer pour laquelle 50% des cellules sont infectées. Le principe est le suivant : le virus à titrer est ajouté dans les puits de la première colonne sur plusieurs lignes d'une plaque P96 à fond plat contenant des cellules MDCK permettant ainsi d'obtenir, pour chaque virus, plusieurs puits par dilution. Des dilutions en séries sont réalisées entre chaque colonne. Après un certain temps d'incubation, un test d'hémagglutination est réalisé sur les surnageants de tous les puits. Des

calculs sont ensuite utilisés pour déterminer le pourcentage de cellules infectées à chaque dilution. La dilution pour laquelle 50 % des puits sont infectés est déterminée. Cette dilution permet le calcul du TCID<sub>50</sub>/mL avec la méthode de Spearman et Kärber (67–69).

#### 2.3.1.1.1.2 Protocole

Les virus des conditions 1 à 5 produits en génétique inverse, ainsi que le virus humain A/Puerto Rico/8/1934, H1N1 (PR8), le contrôle positif, ont d'abord été dilués à 1/100 dans un milieu de croissance virale contenant du milieu de culture Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), de la pénicilline et de la streptomycine à la concentration de 1mg/mL, 0,2% de « Bovine Serum Albumin » (BSA) et de la trypsine-TPCK à la concentration de 1 µg/mL. Sur une plaque P96 à fond plat contenant dans chaque puit des cellules MDCK confluentes, 120 µL du milieu de croissance viral ont été ajoutés dans tous les puits des colonnes deux à douze. Pour chaque virus à titrer, 150 µL de la solution de virus diluée à 1/100 ont été ajoutés dans les puits de la première colonne, sur quatre lignes. Puis, des dilutions en série au 1/5 ont été réalisées en transférant 30 µL des puits de la première colonne dans la deuxième et ainsi de suite jusqu'à la onzième colonne. La dernière colonne correspond au contrôle négatif. Les P96 ont ensuite été mises en incubation à 37°C pendant 72h. Enfin, un test d'hémagglutination a été réalisé avec 50 µL de surnageant de chaque puit. Les TCID<sub>50</sub>/mL ont ensuite été calculés.

Les résultats des tests d'hémagglutination sont présentés dans la Figure 24. Pour chacun des virus titrés, sur les quatre puits de chaque dilution, le nombre de puits positifs à l'hémagglutination a été relevé. Par exemple, pour la condition 1 présentée dans la Figure 24, les quatre puits sont positifs de la première à la cinquième dilution, deux le sont à la sixième, un l'est à la septième, puis aucun ne l'est jusqu'à la onzième dilution. En connaissant les dilutions de chaque colonne ainsi que le nombre de puits positif par colonne, la méthode de Spearman et Kärber permet de calculer les TCID<sub>50</sub>/mL. Les TCID<sub>50</sub>/mL des virus titrés sont rapportés dans le Tableau 4.



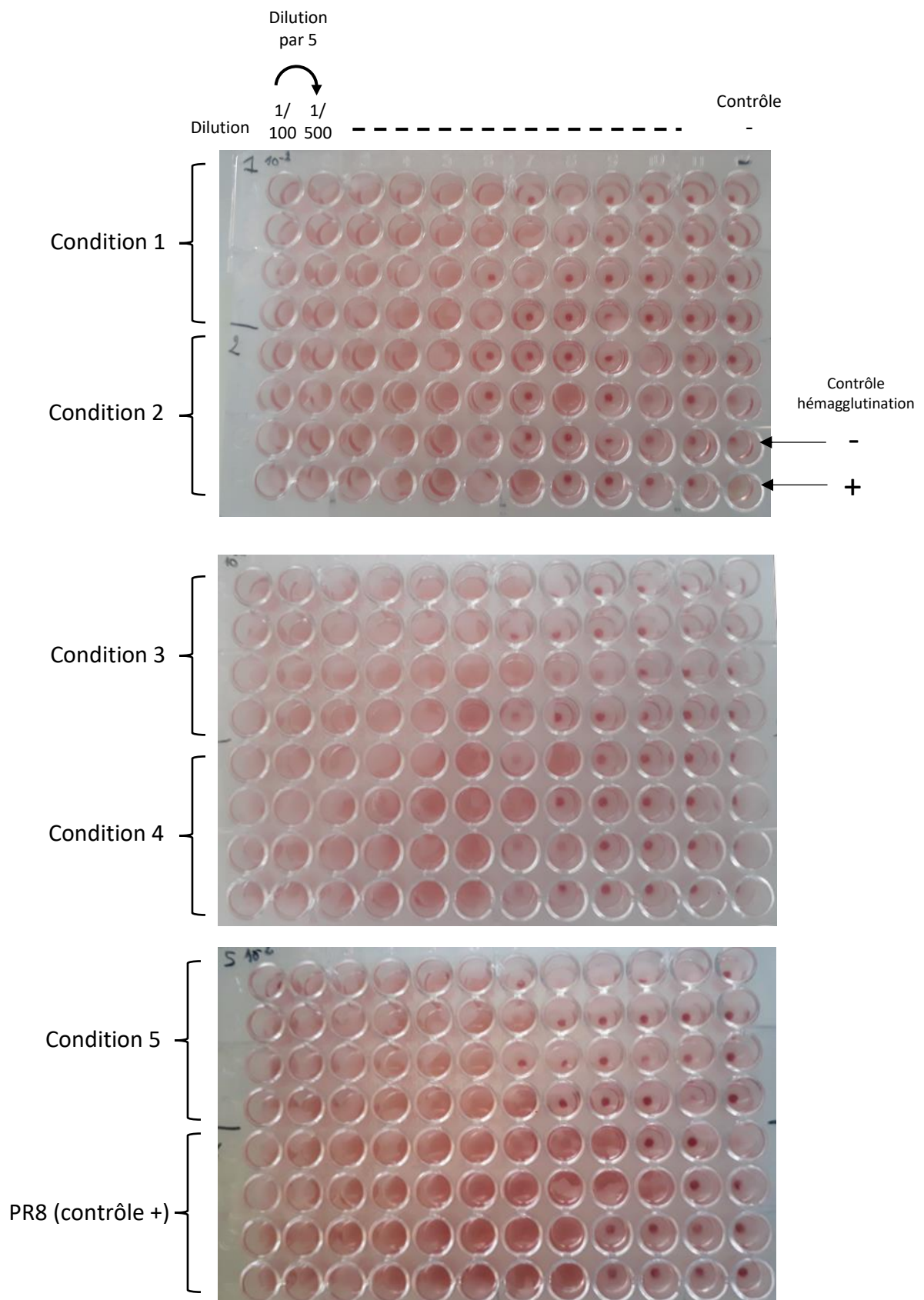


Figure 24 : Photographie présentant les résultats des titrages, par la méthode de dosage TCID<sub>50</sub>, des virus des conditions 1 à 5 et du virus PR8.



Tableau 4 : Tableau présentant les résultats du titrage des virus par la méthode de dosage TCID50, avec pour chaque virus, le nombre de puits positifs par colonne et son TCID50/mL calculé.

Virus à titrer	Nombre de puits positifs dans chaque colonne de la plaque P96												TCID50/mL	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Ctrl -		
Condition 1	4	4	4	4	4	2	1	0	0	0	0	0	0	<b>3,93E+06</b>
Condition 2	4	4	4	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>1,18E+06</b>
Condition 3	4	4	4	4	4	4	2	0	0	0	0	0	0	<b>1,29E+07</b>
Condition 4	4	4	4	4	4	4	1	0	0	0	0	0	0	<b>8,61E+06</b>
Condition 5	4	4	4	4	4	4	2	0	0	0	0	0	0	<b>1,29E+07</b>
PR8	4	4	4	4	4	4	4	4	2	1	0	0	0	<b>4,84E+08</b>

### 2.3.1.1.2 Cinétique de réplication

La cinétique de réplication a été réalisée pour les quatre virus recombinants H7N1(977)-PA-HA\_ShimH5\_600nt, H7N1(977)-PA-HA\_ShimH5\_full, H7N1(977)-NS-HA\_ShimH5\_600nt, H7N1(977)-NS-HA\_ShimH5\_full, et pour la souche sauvage H7N1(977)wt, produits en génétique inverse.

Les TCID50/mL ont permis de calculer, pour chaque condition la quantité de surnageant à mélanger avec 500 µL de milieu Opti-MEM™ dans le but d'obtenir, pour l'infection virale, une « multiplicity of infection » (MOI) de 10<sup>-3</sup>. Cela signifie qu'en proportion, 1 particule virale est ajoutée pour 1000 cellules. Pour chaque condition, ces 500 µL ont été ajoutés dans un puit d'une plaque P6 contenant des cellules MDCK confluentes, dont le nombre a été déterminé au préalable. Les cinq virus ont été répartis sur deux plaques P6. Celles-ci ont ensuite été mises en incubation à 37°C pendant une heure.

Pour chaque puit, le surnageant a ensuite été retiré et les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS. Enfin, dans chaque puit, 2 mL de milieu Opti-MEM™ ont été ajoutés et du surnageant a été prélevé à t = 0h pour réaliser un titrage avec la méthode de dosage TCID50 décrite dans la partie 2.3.1.1.1. Les plaques P6 ont ensuite été mises en incubation à 37°C pendant trois jours. Pour chaque condition, du surnageant a été prélevé à 8, 24, 48 et 72h afin de réaliser des titrages. Ce protocole a été réalisé deux fois et la moyenne des valeurs a permis de tracer la cinétique de réplication de chaque virus.

### 2.3.1.2 Résultats

Les résultats de la cinétique de réplication sont présentés dans la Figure 25. Les virus H7N1(977)-NS-HA\_ShimH5\_600nt et H7N1(977)-NS-HA\_ShimH5\_full ont une cinétique de réplication et des titres viraux identiques à ceux du virus sauvage H7N1(977)wt. Le virus H7N1(977)-PA-HA\_ShimH5\_600nt possède également une cinétique de réplication semblable à celle du virus H7N1(977)wt mais des titres viraux dix à cent fois moins élevés que le virus sauvage. Le virus H7N1(977)-PA-HA\_ShimH5\_full possède une cinétique de réplication différente de celle du virus sauvage, avec une croissance beaucoup moins importante au cours des deux premiers jours et une décroissance ensuite, contrairement au virus sauvage qui atteint un plateau après 24h. De plus, le virus H7N1(977)-PA-HA\_ShimH5\_full possède des titres viraux cent à six cents fois moins élevés que ceux du virus H7N1(977)wt.

Ces résultats suggèrent que les virus H7N1(977)-NS-HA\_ShimH5\_600nt et H7N1(977)-NS-HA\_ShimH5\_full se répliquent mieux, et de manière identique au virus sauvage, que les virus H7N1(977)-PA-HA\_ShimH5\_600nt et H7N1(977)-PA-HA\_ShimH5\_full.

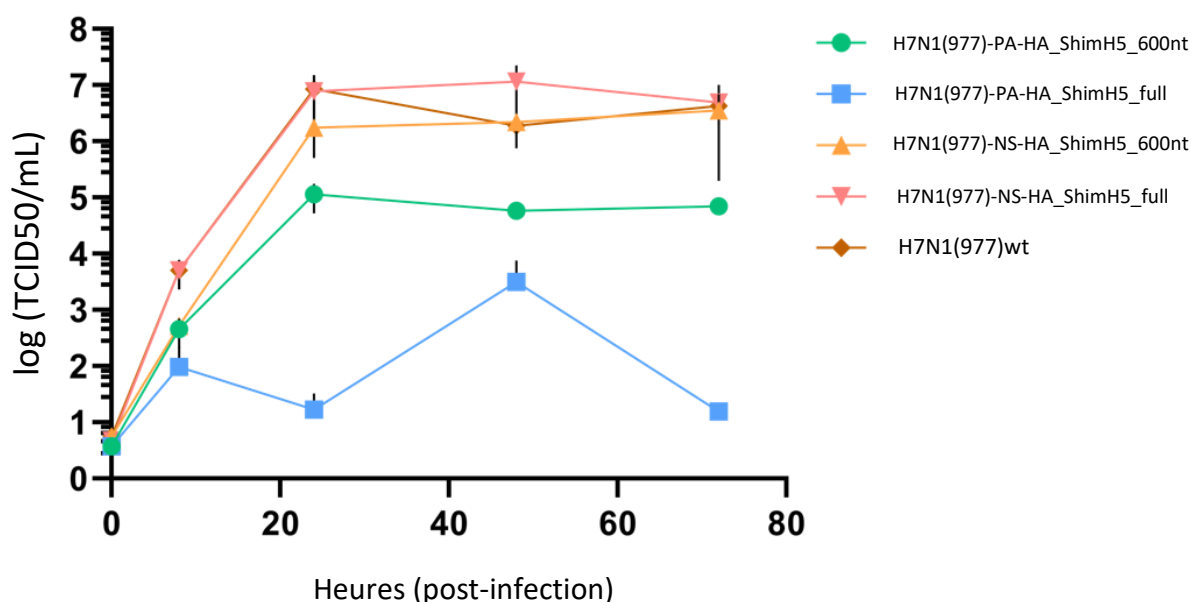


Figure 25 : Graphique présentant les résultats de la cinétique de réplication des virus des conditions 1 à 5 avec le titre des virus, exprimé en log (TCID50/mL), en fonction du temps.

## 2.3.2 Vérification de la présence des transgènes HA\_X dans le génome des virus recombinants H7N1(977)-NS-HA\_X et H7N1(977)-PA-HA\_X

### 2.3.2.1 Protocole

A partir des surnageants recueillis après 72h d'amplification, l'ARNv des vingt virus recombinants a été extrait avec le protocole du Kit Macherey Nagel « NucleospinRNA virus ».

Des couples d'amorces ont ensuite été construits avec le logiciel Geneious Prime® puis produit par l'entreprise Eurogentec® afin d'amplifier plusieurs séquences des génomes viraux :

- Une séquence de 198 nt de la SCD de NS (séqNS)
- Une séquence de 170 nt de la SCD de PA (séqPA)
- Une séquence de 167 nt commune à HA\_ShimH5 et HA\_ShimH5 24a2b (séqHA\_ShimH5)
- Une séquence de 177 nt commune à HA\_H5N8LP, HA\_H5N8mut1 et HA\_H5N8mut2 (séqHA\_H5N8)

Un protocole de RT (transcription inverse)-qPCR (PCR quantitative) avec le kit « iTaq® Universal SYBR® Green One-Step » a ensuite été réalisé sur les ARNv extraits. Cette réaction avait pour but d'amplifier une partie des séquences HA\_X, afin de s'assurer de leur présence, et une partie des SCD de NS ou PA afin de déterminer la proportion de segments NS ou PA possédant les transgènes HA\_X.

Pour les virus H7N1(977)-NS-HA\_X, les 96 puits d'une plaque de qPCR ont été remplis avec les ARNv extraits des dix virus H7N1(977)-NS\_HA\_X. Pour chaque virus, l'ARNv a été ajouté dans deux puits afin d'amplifier dans l'un séqNS, et dans l'autre séqHA\_ShimH5 ou séqHA\_H5N8. Dans trois colonnes de la plaque P96, des gammes d'ADN ont été ajoutées dans les puits des sept premières lignes avec des concentrations allant de  $10^2$  à  $10^8$  copies : la gamme de phw2000-NS(977)-HA\_ShimH5\_full mélangée avec des amorces permettant d'amplifier séqNS ; la gamme de phw2000-NS(977)-HA\_ShimH5\_full mélangée avec des amorces permettant d'amplifier séqHA\_ShimH5 ; la gamme de phw2000-NS(977)-HA\_H5N8LP\_full mélangée avec des amorces permettant d'amplifier séqHA\_H5N8. Trois puits ont été remplis avec le virus H7N1(977)wt, possédant le segment NS sauvage. Un puit a été mélangé avec les amorces permettant d'amplifier séqNS, servant ainsi de contrôle positif. Les deux autres puits servaient de contrôle négatif où l'un a été mélangé avec les amorces permettant d'amplifier séqHA\_ShimH5 et l'autre avec les amorces permettant d'amplifier séqHA\_H5N8. Le remplissage de la plaque P96 pour ce protocole est schématisé dans la Figure 26.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NS-1	NS-1		NS-5	NS-5			10 <sup>2</sup> copies		10 <sup>2</sup> copies		10 <sup>2</sup> copies
B	NS-2	NS-2		NS-6	NS-6							
C	NS-3	NS-3		NS-7	NS-7							
D	NS-4	NS-4		NS-8	NS-8							
E				NS-9	NS-9							
Contrôle + F	H7N1(977)wt			NS-10	NS-10							
Contrôle - G	H7N1(977)wt							10 <sup>8</sup> copies		10 <sup>8</sup> copies		10 <sup>8</sup> copies
Contrôle - H	H7N1(977)wt											
								I		II		III

Figure 26 : Schéma représentant la plaque P96 du protocole de RT-qPCR permettant l'amplification des séquences du génome des virus H7N1(977)-NS-HA\_X

*Légende: I = gamme de phw2000-NS(977)-HA\_ShimH5\_full ; II = phw2000-NS(977)-HA\_ShimH5\_full ; III = phw2000-NS(977)-HA\_H5N8LP\_full*

Les abréviations NS-1, NS-2, ..., jusque NS-10, correspondent aux dix virus H7N1(977)-NS-HA\_X.

Mix de réaction permettant l'amplification de seqNS
  Mix de réaction permettant l'amplification de seqHA\_ShimH5
  Mix de réaction permettant l'amplification de seqHA\_H5N8

Pour les dix virus H7N1(977)-PA-HA\_X, la plaque a été remplie de la même manière mis à part quelques changements :

- Les amorces se fixant sur seqNS ont été remplacées par des amorces se fixant sur seqPA.
- La gamme de phw2000-NS(977)-HA\_ShimH5\_full a été remplacée par la gamme de phw2000-PA(977)-HA\_H5N8LP\_full et mélangée avec des amorces se fixant sur seqPA.
- La gamme de phw2000-NS(977)-HA\_H5N8LP\_full a été remplacée par la gamme de phw2000-PA(977)-HA\_H5N8LP\_full et mélangée avec des amorces se fixant sur seqHA\_H5N8.

Le programme de RT-qPCR utilisé est commun aux deux protocoles ci-dessus :

<u>Pré-incubation :</u>	1 X	{	Réaction de transcription inverse	: 50°C	10'
			Activation de la polymérase + dénaturation initiale de l'ADN	: 95°C	1'
<u>Amplification :</u>	40 X	{	Dénaturation	: 95°C	15''
			Hybridation des amorces + extension	: 55°C	30''
<u>Fusion :</u>		{	95°C	10''	
			65°C	1'	
			97°C	1''	

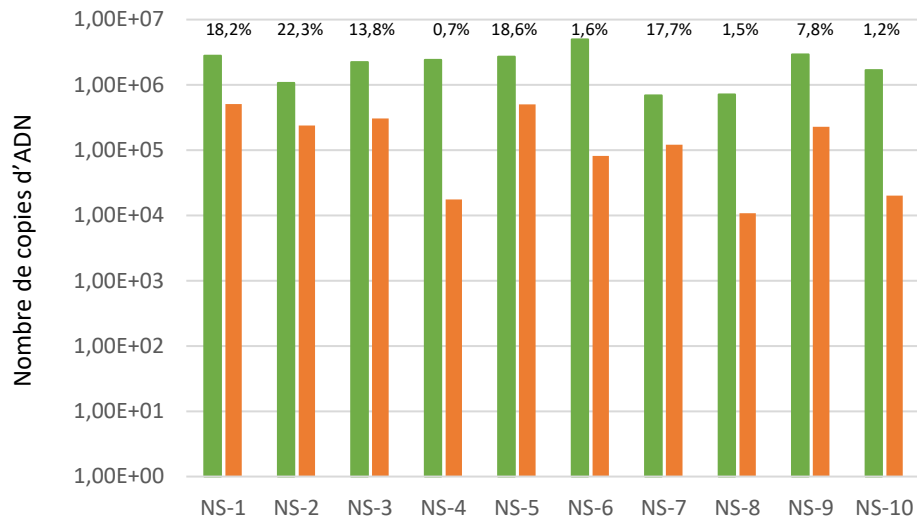
### 2.3.2.1.1 Résultats

Les résultats des réactions de RT-qPCR sont présentés dans la Figure 27 : (a) pour les virus H7N1(977)-NS-HA\_X et (b) pour les virus H7N1(977)-PA-HA\_X.

Chez les virus H7N1(977)-NS-HA\_X\_600nt, il y a entre cinq à dix fois moins de séquences séqHA\_ShimH5 ou séqHA\_H5N8 que de séquences séqNS. Cela suggère que le transgène HA\_X n'est présent que chez 10 à 20% des virus H7N1(977)-NS-HA\_X\_600nt. Chez les virus H7N1(977)-NS-HA\_X\_full le transgène est présent en plus faible quantité encore. Mis à part les virus H7N1(977)-NS-HA\_ShimH5\_full, où environ 20% d'entre eux possèdent toujours la séquence HA\_ShimH5\_full dans leur génome, seulement 1% des autres virus H7N1(977)-NS-HA\_X\_full, possèdent toujours le transgène.

En comparaison avec les virus H7N1(977)-NS-HA\_X, l'insert HA\_X est présent en plus grande proportion chez les virus H7N1(977)-PA-HA\_X. Environ 50% des virus H7N1(977)-PA-HA\_ShimH5\_600nt et H7N1(977)-PA-HA\_ShimH5\_24a2b\_600nt possèdent toujours la séquence HA\_X dans leur génome. De plus, contrairement aux virus H7N1(977)-NS-HA\_X\_full, les virus H7N1(977)-PA-HA\_ShimH5\_full et H7N1(977)-PA-HA\_ShimH5\_24a2b\_full contiennent en proportion, plus de transgène que les virus H7N1(977)-PA-HA\_ShimH5\_600nt et H7N1(977)-PA-HA\_ShimH5\_24a2b\_600nt. En effet, 75 à 85% de ces virus possèdent le transgène dans leur génome.

Chez les six autres virus : H7N1(977)-PA-HA\_H5N8LP\_600nt et full, H7N1(977)-PA-HA\_H5N8mut1\_600nt et full, H7N1(977)-PA-HA\_H5N8mut2\_600nt et full, la séquence HA\_X est trois à cinq fois plus présente que la séquence PA. Or, en réalité, la séquence HA\_X n'est censée être présente qu'à la suite de la SCD de PA. Il ne peut donc pas y avoir plus de transgène que de séquence de PA. Cependant, au vu de ces résultats, l'hypothèse qu'une grande proportion de ces six virus possèdent le transgène HA\_X peut être formulée.



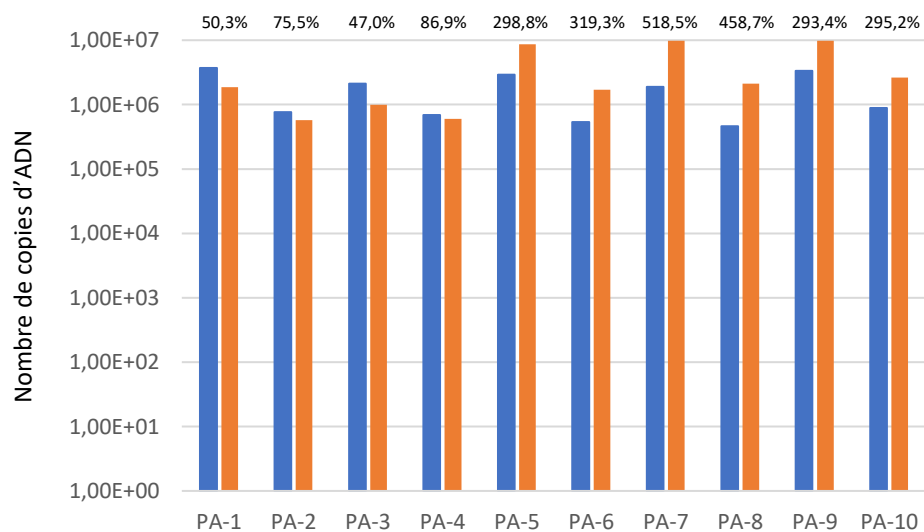
(a) Résultats de la RT-qPCR réalisée sur les virus H7N1(977)-NS-HA\_X

Légende:

**NS-1** = H7N1(977)-NS-HA\_ShimH5\_600nt; **NS-2** = ...-NS-HA\_ShimH5\_full; **NS-3** = ...-NS-HA\_ShimH5\_24a2b\_600nt; **NS-4** = ...-NS-HA\_ShimH5\_24a2b\_full; **NS-5** = ...-NS-HA\_H5N8LP\_600nt; **NS-6** = ...-NS-HA\_H5N8LP\_full; **NS-7** = ...-NS-HA\_H5N8mut1\_600nt; **NS-8** = ...-NS-HA\_H5N8mut1\_full; **NS-9** = ...-NS-HA\_H5N8mut2\_600nt; **NS-10** = ...-NS-HA\_H5N8mut2\_full

Les pourcentages au-dessus des barres correspondent à la proportion de virus possédant le transgène.

■ Amplification de séqNS    ■ Amplification de séqHA\_X



(b) Résultats de la RT-qPCR réalisée sur les virus H7N1(977)-PA-HA\_X

Légende:

**PA-1** = H7N1(977)-PA-HA\_ShimH5\_600nt; **PA-2** = ...-PA-HA\_ShimH5\_full; **PA-3** = ...-PA-HA\_ShimH5\_24a2b\_600nt; **PA-4** = ...-PA-HA\_ShimH5\_24a2b\_full; **PA-5** = ...-PA-HA\_H5N8LP\_600nt; **PA-6** = ...-PA-HA\_H5N8LP\_full; **PA-7** = ...-PA-HA\_H5N8mut1\_600nt; **PA-8** = ...-PA-HA\_H5N8mut1\_full; **PA-9** = ...-PA-HA\_H5N8mut2\_600nt; **PA-10** = ...-PA-HA\_H5N8mut2\_full

Les pourcentages au-dessus des barres correspondent à la proportion de virus possédant le transgène.

■ Amplification de séqPA    ■ Amplification de séqHA\_X

Figure 27 : Graphiques présentant les résultats des RT-qPCR réalisées sur les surnageants des virus H7N1(977)-NS-HA\_X et H7N1(977)-PA-HA\_X obtenues après un premier passage cellulaire sur des cellules MDCK

### 2.3.3 Choix du système

Suite à la caractérisation des virus H7N1(977)-NS-HA\_X et H7N1(977)-PA-HA\_X, le système H7N1(977)-PA-HA\_X a été sélectionné. En effet, même si les virus de ce système se répliquent moins bien que les virus du système H7N1(977)-NS-HA\_X, ils conservent davantage les transgènes HA\_X dans leur génome. Or cette dernière caractéristique est la plus importante pour pouvoir étudier le taux de mutation des séquences insérées dans ce système.

## 2.4 Extraction des séquences HA\_X des virus H7N1(977)-PA-HA\_X

Une fois les virus H7N1(977)-HA\_X produits, l'étape suivante a consisté, après différents passages cellulaires sur des cellules MDCK, à extraire les séquences HA\_X du génome de ces virus. Une fois extraites, ces séquences pourront être envoyées au séquençage afin de déterminer leur séquence nucléotidique et détecter les éventuelles mutations.

### 2.4.1 Protocole

L'ARNv des virus H7N1(977)-HA\_X a été extrait à partir des surnageants, recueillis après un premier passage cellulaire sur des cellules MDCK, avec le protocole du Kit Macherey Nagel « NucleospinRNA virus ».

Ensuite, un protocole de RT-PCR a été réalisé afin d'amplifier les séquences HA\_X. La réaction de RT a été réalisée avec le protocole du kit « Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase ». L'amorce utilisée pour cette réaction, l'amorce UNI12\_spéPA, se fixe sur la séquence d'ARNv du NCR 5' spécifique au segment PA, permettant d'obtenir la séquence d'ADN du segment PA-HA\_X. Ainsi, cette unique amorce peut être utilisée pour les réactions de RT des dix virus H7N1(977)-PA-HA\_X. Le protocole de cette réaction de RT est présenté dans le Tableau 5.

Puis, une PCR a été réalisée sur le produit de la réaction de RT avec le protocole du kit « Thermo Scientific Phusion High-Fidelity PCR ». Un unique couple d'amorce a été utilisé pour amplifier toutes les séquences d'ADN PA-HA\_X : une amorce « forward », BPA7, qui se fixe sur la SCD d'ADN de PA, environ 400 nt avant la séquence HA\_X, et une amorce « reverse », GDA53, qui se fixe sur la partie du NCR 3' spécifique au segment PA, situé à la suite de la séquence PA-HA\_X. Ces amorces ont été construites avec le logiciel Geneious

Prime® puis produites par l'entreprise Eurogentec®. Le protocole de cette PCR est présenté dans le Tableau 6.

La PCR devait théoriquement conduire à l'amplification de séquences d'ADN, contenant environ 400 nt de la séquence de PA et le transgène HA\_X. Celles-ci correspondent donc à des amplicons d'environ 2100 nt pour les séquences HA\_full et environ 1000 nt pour les séquences HA\_600nt. Les produits de PCR ont ensuite migré sur gel d'agarose 1%. Les fragments d'intérêt, d'environ 2000 et 1000 nt, ont ensuite été purifiés sur gel avec le protocole du kit Macherey Nagel « NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up » puis séquencés par la méthode Sanger afin de vérifier que ces séquences correspondaient bien aux séquences HA\_X.

Tableau 5 : Tableau présentant le protocole de la RT réalisée sur les ARNv des H7N1(977)-HA\_X pour obtenir les séquences d'ADN PA-HA\_X\_600nt et PA-HA\_X\_full, avec l'amorce, la transcriptase inverse et le programme utilisés.

ARN matrice	Amorce	Transcriptase inverse	Programme	Séquence d'ADN obtenu
H7N1(977)-HA_H5N8LP_600nt	UNI12_spéPA	Transcriptase inverse RevertAid	Pré-incubation ARN + amorce : 65°C 5' Incubation : 42°C 60' Chauffage final : 72°C 10'	PA-HA_H5N8LP_600nt
H7N1(977)-HA_H5N8LP_full				PA-HA_H5N8LP_full
H7N1(977)-HA_H5N8mut1_600nt				PA-HA_H5N8mut1_600nt
H7N1(977)-HA_H5N8mut1_full				PA-HA_H5N8mut1_full
H7N1(977)-HA_H5N8mut2_600nt				PA-HA_H5N8mut2_600nt
H7N1(977)-HA_H5N8mut2_full				PA-HA_H5N8mut2_full
H7N1(977)-HA_ShimH5_600nt				PA-HA_ShimH5_600nt
H7N1(977)-HA_ShimH5_full				PA-HA_ShimH5_full
H7N1(977)-HA_ShimH5 24a2b_600nt				PA-HA_ShimH5 24a2b_600nt
H7N1(977)-HA_ShimH5 24a2b_full				PA-HA_ShimH5 24a2b_full



Tableau 6 : Tableau présentant le protocole de la PCR réalisée sur les séquences PA-HA\_X obtenues après une réaction de RT sur les virus H7N1(977)-HA\_X, pour obtenir les fragments HA\_X\_600nt et HA\_X\_full, avec les amorces, la polymérase et le programme utilisés.

ADN matrice	Amorces	Polymérase	Programme	Fragment obtenu
PA-HA_H5N8LP_600nt	BPA 7 GDA 53	ADN polymérase Phusion	Dénaturation initiale : 98°C 30'' 1 x  Dénaturation : 98°C 10'' Hybridation des amorces : 55°C 30'' Extension : 72°C 40''  Extension finale : 72°C 10' 1 x	HA_H5N8LP_600nt
PA-HA_H5N8LP_full				HA_H5N8LP_full
PA-HA_H5N8mut1_600nt				HA_H5N8mut1_600nt
PA-HA_H5N8mut1_full				HA_H5N8mut1_full
PA-HA_H5N8mut2_600nt				HA_H5N8mut2_600nt
PA-HA_H5N8mut2_full				HA_H5N8mut2_full
PA-HA_ShimH5_600nt				HA_ShimH5_600nt
PA-HA_ShimH5_full				HA_ShimH5_full
PA-HA_ShimH5 24a2b_600nt				HA_ShimH5 24a2b_600nt
PA-HA_ShimH5 24a2b_full				HA_ShimH5 24a2b_full

## 2.4.2 Résultats

Le gel obtenu après la migration des produits de la PCR, ayant permis l'amplification des séquences HA\_X est présenté dans la Figure 28. Les fragments d'intérêt sont observés : les fragments d'environ 2000 nt pour les HA\_X\_full et les fragments d'environ 1000 nt pour les HA\_X\_600nt.

Cependant, l'amplification des séquences HA\_X issues des virus H7N1(977)-HA\_H5N8mut1\_full et H7N1(977)-HA\_ShimH5\_full, n'a conduit qu'à peu de matériel. D'après les résultats de la réaction de RT-qPCR présentés dans la partie 2.3.2.1.1, après un premier passage cellulaire, les dix virus H7N1(977)-PA-HA\_X possédaient une quantité de transgène relativement proche. La faible quantité de matériel obtenue pour les virus H7N1(977)-HA\_H5N8mut1\_full et H7N1(977)-HA\_ShimH5\_full pourrait s'expliquer par un dysfonctionnement de la RT-PCR.

La réaction de RT-PCR sur le virus H7N1(977) sauvage a conduit à la migration sur gel d'un fragment d'environ 400 nt. Ce fragment correspond à l'amplification par PCR des 400 derniers nucléotides de la séquence de PA car ce virus ne possède pas de séquence HA\_X.

Pour chaque virus H7N1(977)-HA\_X, la réaction de RT-PCR a conduit à l'obtention de nombreux fragments de taille très variable en plus du fragment d'intérêt. Les amorces utilisées pour la réaction de RT-PCR ne peuvent amplifier que des séquences des segments PA-HA\_X.

Ces sous-produits correspondent donc à des séquences PA-HA\_X. La présence de la séquence HA\_X dans le génome des virus est assurée au vu des résultats de la partie 2.3.2.1.1. Ces fragments correspondent donc à des séquences PA-HA\_X possédant une taille modifiée par rapport aux séquences PA-HA\_X attendues.

Le séquençage des fragments d'intérêts a confirmé qu'il s'agissait bien des séquences HA\_X attendues.

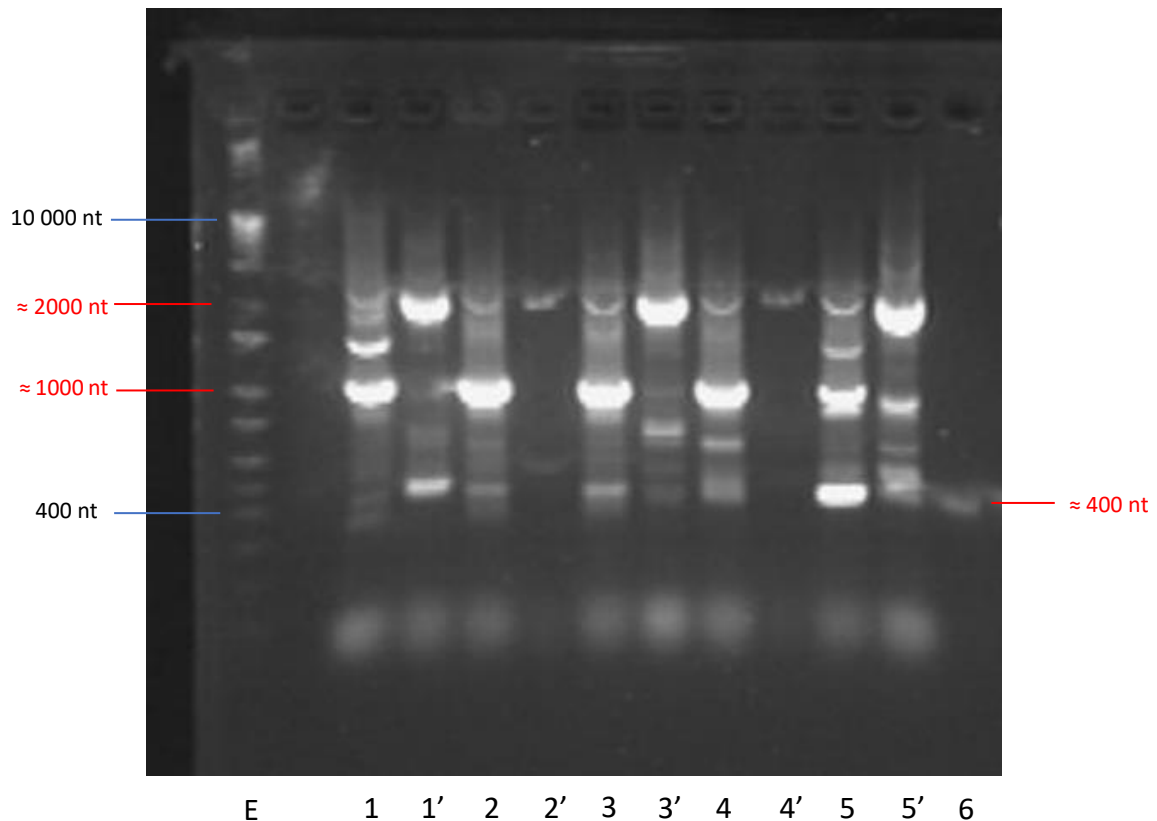


Figure 28 : Gel obtenu après migration des produits de la PCR ayant permis l'amplification des séquences HA\_X des virus H7N1(977)-HA\_X

*Légende* : E = échelle 2log ; 1 = HA\_H5N8LP\_600nt ; 1' = HA\_H5N8LP\_full ; 2 = HA\_H5N8mut1\_600nt ; 2' = HA\_H5N8mut1\_full ; 3 = HA\_H5N8mut2\_600nt ; 3' = HA\_H5N8mut2\_full ; 4 = HA\_ShimH5\_600nt ; 4' = HA\_ShimH5\_full ; 5 = HA\_ShimH5\_24a2b\_600nt ; 5' = HA\_ShimH5\_24a2b\_full ; 6 = H7N1(977)wt (contrôle négatif).

## Discussion

Ce travail a consisté à établir un système permettant d'étudier le taux de mutation de la séquence HA des VIAs. Il a abouti à la construction d'un plasmide contenant la séquence d'ADN codante pour le segment PA du virus H7N1(977) et dans lequel une séquence HA peut être insérée grâce à un site de liaison, le LCS. Ce plasmide est utilisable en génétique inverse pour produire des virus H7N1(977) recombinants, possédant dans leur génome le transgène HA qui ne sera pas traduit en protéine. Ce virus sert donc de transporteur pour la séquence HA à étudier et sa réplication entraîne l'accumulation de mutations sur ce transgène. Cette séquence HA n'étant pas traduite, aucune sélection n'est réalisée sur les mutations qui peuvent apparaître. Ce travail a également abouti à la création d'un protocole unique permettant d'extraire le transgène du génome de ces virus, basé sur une réaction de RT-PCR, permettant ainsi de séquencer ces transgènes après réalisation de plusieurs passages cellulaires.

Pour la construction du plasmide permettant l'insertion du transgène HA\_X, les plasmides phw2000-PA(977) et phw2000-NS(977) contenant les séquences des segments PA et NS du virus H7N1(977) ont été utilisés et testés. Ces deux segments ont été choisis sur la base d'études ultérieures qui ont utilisé des plasmides contenant la séquence d'ADN de ces segments pour y insérer des transgènes et les intégrer dans le génome d'un VIA après un protocole de génétique inverse.

En 2015, *Tran et al.*, a produit en génétique inverse un virus recombinant, issu de la souche A/WSN/1933, H1N1 (WSN) et possédant un segment PA contenant la séquence complète de PA et à la suite, une séquence transgène de 723 nt au maximum. Ce segment a été construit de sorte à contenir dans l'ordre, la SCD complète de PA, celle du transgène puis la séquence d'empaquetage de PA contenant 50 nt de la fin de la SCD de PA et le NCR 3' (61). La construction du plasmide phw2000-PA(977)-HA\_X a été inspirée de cette construction à la différence que, pour la séquence d'empaquetage, 60 nt de la fin de la SCD de PA ont été répétés après la séquence HA\_X. Dans notre travail, nous avons inséré dans ce plasmide et produit en génétique inverse, des virus H7N1(977)-PA-HA\_X contenant dans leur génome des séquences HA\_X de 600 nt, de taille relativement proche des transgènes de l'étude de *Tran et al.*, mais aussi des séquences d'environ 1700 nt.

En 2018, *Hou et al.*, a produit en génétique inverse, un virus recombinant, issu de la souche PR8, avec un segment NS contenant un transgène de 978 nt. Ce transgène a été inséré dans le segment NS entre la SCD de NS1 tronquée, mesurant environ 300 nt, et la SCD de NEP suivi du NCR 3' (62). Cette étude a montré que le segment NS des virus produits en génétique inverse supportait lui aussi l'insertion de transgènes de taille importante. Dans ce travail, un plasmide phw2000-NS(977)-HA\_X a été construit de la même manière que le plasmide phw2000-PA(977)-HA\_X. La séquence HA\_X a été insérée, non pas entre la SCD de NS1 et NEP comme *Hou et al.*, mais à la suite de la SCD de NEP. Ce plasmide a permis lui aussi de produire des virus H7N1(977)-NS-HA\_X contenant des séquences HA\_X de 600 nt mais également de près de 1700 nt. Avant ce travail, aucun transgène aussi grand n'avait été inséré dans le génome d'un VIA à la suite des segments PA ou NS.

Pour sélectionner le modèle le plus performant parmi les systèmes H7N1(977)-PA-HA\_X et H7N1(977)-NS-HA\_X, ces derniers ont été comparés sur la base de leur cinétique de réplication et de la présence de l'insert HA\_X dans leur génome après leur production en génétique inverse et un passage cellulaire sur des cellules MDCK.

Les virus H7N1(977)-PA-HA\_X\_600nt possèdent une cinétique de réplication identique à celle de la souche sauvage H7N1(977)wt mais plus lente, avec des titres dix à cent fois moins élevés que ceux du virus sauvage. Ces résultats sont en partie comparables à ceux observés par *Tran et al.*, bien qu'il ait réussi à produire un virus recombinant WSN, avec un segment PA possédant un transgène de 678 nt, se répliquant aussi bien que le virus sauvage WSN (61). Cependant, les virus H7N1(977)-PA-HA\_X\_full possèdent une cinétique de réplication différente avec une croissance plus faible et des titres viraux cent à six cents fois moins élevés que ceux du virus H7N1(977)wt. Ces derniers résultats ne peuvent être comparés à d'autres références bibliographiques puisqu'aucune étude n'a été réalisée sur la cinétique de réplication d'un virus recombinant possédant un transgène aussi grand sur le segment PA. Cependant, dans l'étude menée par *Tran et al.* en 2015, il a été remarqué que plus le transgène est grand, plus la cinétique de réplication est lente et les titres viraux sont faibles par rapport au virus sauvage (61). Les résultats de la cinétique de réplication des virus H7N1(977)-PA-HA\_X\_full sont probablement dus à la longueur des transgènes HA\_X, d'environ 1700 nt, qui pourraient ainsi interférer davantage lors de la réplication virale.

Les virus H7N1(977)-NS-HA\_X possédant des inserts de 600 nt ou de 1700 nt, ont une cinétique de réplication identique à celle de la souche sauvage H7N1(977)wt. Dans l'étude de *Hou et al.*, le virus PR8 recombinant possédant un transgène de presque 1000 nt sur son segment NS présentait également une cinétique de réplication similaire à celle du virus sauvage PR8, bien qu'il se répliquait plus lentement avec des titres viraux dix à cent fois moins importants que ceux du virus sauvage (62). Cependant, au vu des résultats obtenus sur la présence de l'insert HA\_X dans le génome des virus H7N1(977)-NS-HA\_X, ces résultats de cinétique de réplication sont à nuancer. En effet, seulement 1 à 10% des virus H7N1(977)-NS-HA\_X possédaient toujours le transgène HA\_X dans leur génome après un passage cellulaire sur des cellules MDCK. Le fait que la grande majorité des virus ne possèdent plus ce transgène pourrait expliquer qu'ils se répliquent similairement au virus H7N1(977)wt et avec des titres identiques. Pour confirmer cette hypothèse, il aurait fallu réaliser un protocole d'extraction d'ARN et de RT-qPCR pour établir la proportion de virus H7N1(977)-NS-HA\_X possédant toujours le transgène HA\_X, sur les virus présents dans les surnageants récoltés lors de la cinétique de réplication.

Un protocole de RT-qPCR a ensuite été réalisé sur les surnageants contenant les virus H7N1(977)-PA-HA\_X et H7N1(977)-NS-HA\_X afin d'amplifier pour chaque virus, à la fois une partie de la SCD de PA ou NS et une partie de l'insert HA\_X. Les résultats montrent que les virus H7N1(977)-PA-HA\_X conservent mieux le transgène HA\_X au sein de leur génome par rapport aux virus H7N1(977)-NS-HA\_X. En effet, les résultats montrent qu'il y a au minimum 50% de virus H7N1(977)-PA-HA\_X qui possèdent toujours la séquence HA\_X dans leur génome. Pour les virus H7N1(977)-NS-HA\_X, seulement 1 à 10% d'entre eux possèdent le transgène. Les virus ayant le plus perdu ce transgène sont les virus H7N1(977)-NS-HA\_X\_full. En effet, mis à part les virus H7N1(977)-NS-HA\_ShimH5\_full, 99% des virus H7N1(977)-NS-HA\_X\_full ne possédaient plus la séquence HA\_X dans leur génome après un premier passage cellulaire. Dans son étude, *Manicassamy et al.* a produit un VIA recombinant possédant sept segments du virus PR8 et un segment NS contenant un transgène d'environ 700 nt entre la SCD de NS1 et NEP. Il a été noté qu'après une infection *in vivo* sur des souris, 5 à 30% des virus présentaient des délétions de la séquence de leur transgène. Ces virus possédant ces délétions pourraient avoir été sélectionnés positivement de par leur segment NS devenu plus court (70) et cela serait propre aux virus segmentés. En effet, il est reconnu que les virus à ARN non segmentés maintiennent dans leur génome des transgènes de manière plus stable (71). Ces hypothèses pourraient expliquer que dans ce travail, les virus H7N1(977)-NS-HA\_X perdent

en grande partie les séquences HA\_X et d'autant plus les séquences complètes d'environ 1700 nt, qui occupent plus de place dans le génome.

La réaction de RT-qPCR sur les virus H7N1(977)-PA-HA\_X contenant les séquences de 600 nt et les séquences complètes de HA\_H5N8LP,mut1 et mut2 a conduit à l'amplification de trois à cinq fois plus de séquences de transgène que de séquences de la SCD de PA. Or, en réalité, il ne peut y avoir qu'au maximum autant de transgène que de séquences de PA. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que la polymérase utilisée pour la réaction de RT-qPCR ait plus d'affinité pour la séquence du transgène à amplifier, seqHA\_H5N8, que pour la séquence à amplifier sur la SCD de PA. Cette affinité plus élevée donnerait un léger avantage pour l'amplification de ces séquences ce qui, après plusieurs cycles de PCR, aboutirait aux résultats observés. Cependant, ces résultats suggèrent tout de même que ces virus possèdent en grande proportion le transgène dans leur génome.

Après un certain nombre de passages cellulaires sur des cellules MDCK, une réaction de RT-PCR sur les virus H7N1(977)-PA-HA\_X a permis l'amplification et l'extraction des séquences HA\_X. Cependant, cette réaction a également conduit à l'amplification de nombreux sous-produits de tailles variables. Les amorces utilisées pour la réaction de RT-PCR n'ont permis d'amplifier que des séquences du segment PA des virus H7N1(977)-PA-HA\_X. De plus, les résultats de la réaction de RT-qPCR sur les virus H7N1(977)-PA-HA\_X ont confirmé la présence d'une séquence de HA\_X d'environ 200 nt. Ces sous-produits correspondent donc à des séquences PA-HA\_X avec une taille modifiée. Ces séquences pourraient contenir une séquence HA\_X rognée du côté 5', 3' ou des deux côtés. Des résultats similaires ont été constatés dans de précédentes études, au cours desquelles des VIAs recombinants possédant un transgène sur l'un de leur segment ont été créés. Certains de ces virus étaient instables génétiquement et pouvaient perdre leur transgène au cours de répllication virale. Une des hypothèses formulées était que cette instabilité génétique était due à la répétition de la partie de la SCD du segment faisant partie du signal d'empaquetage, conduisant à un transgène entouré de deux séquences identiques (72). Pour vérifier cette hypothèse, *Tran et al.*, a construit un segment PA contenant dans le sens 5' vers 3' de l'ARN complémentaire, la SCD de PA de la souche WSN, la séquence du transgène, une répétition des 50 derniers nt de la SCD de PA et le NCR 3'. Pour éviter que le transgène soit entouré de deux séquences identiques, des mutations silencieuses ont été introduites dans la fin de la SCD de PA. Un virus WSN recombinant contenant ce segment a ensuite été produit en génétique inverse. De la même manière que dans ce travail, une réaction de RT-PCR a été réalisée et les résultats montrent que les séquences du

segment PA amplifiées contenaient toutes le transgène complet. Aucun sous-produit n'était observable. Ces résultats suggèrent que ce segment PA est plus stable génétiquement et permet de conserver la totalité du transgène (72).

Le système H7N1(977)-PA-HA\_X pourrait permettre d'obtenir un segment PA-HA\_X plus stable génétiquement en insérant des mutations silencieuses à la fin de la SCD de PA. Un plus grand nombre de séquences HA\_X pourraient ainsi être extraites, augmentant ainsi la taille de l'échantillon pour étudier le taux de mutation de ces séquences.

Ce système combiné à la technologie du séquençage haut débit représente un outil majeur dans l'étude de l'apparition des mutations sur la séquence HA des VIAs. Pour séquencer les transgènes étudiés grâce au système H7N1(977)-PA-HA\_X, il est prévu d'utiliser une technologie de séquençage à haut débit, la technologie Illumina®. Cette technologie permet le séquençage par synthèse de plusieurs millions de courtes séquences d'ADN simultanément. Le séquençage par la technologie Illumina® se déroule en trois étapes. La première étape consiste à préparer des banques. Celles-ci sont constituées des séquences d'ADN à analyser entourées de deux petites séquences, appelées adaptateurs. La deuxième étape consiste à amplifier ces banques. Les adaptateurs jouent un double rôle en permettant la fixation des fragments sur une plaque et en servant d'amorces pour l'amplification qui est dite « en pont ». Cette étape aboutit à la création de cluster qui correspondent, pour chaque fragment, à un ensemble de milliers de clones, permettant une bonne visualisation lors du séquençage. La troisième étape est le séquençage. Celui-ci commence par la fixation d'une amorce sur chaque clone de chaque fragment, puis à chaque cycle, un seul nucléotide marqué est incorporé. Ce nucléotide est ensuite déterminé par fluorescence, puis au bout d'un certain nombre de cycle la séquence de tous les fragments est déterminée. La méthode dite en « pair-end » permet de réaliser une étape de relecture. Cette méthode consiste à réaliser le séquençage du même brin d'ADN dans un sens puis dans l'autre et de comparer ces deux résultats afin de diminuer les erreurs de séquençage.

Cependant, l'analyse du taux de mutation de séquence de HA nécessite un séquençage précis et le protocole standard du séquençage par la technologie Illumina® ne l'est pas suffisamment. Il a donc été prévu de modifier ce protocole en rajoutant une deuxième étape de relecture permettant d'augmenter la fiabilité du séquençage, comme cela a été fait par *Doud et al.* en 2016. Cette correction consiste à réaliser une première PCR en amont de celle permettant l'ajout des adaptateurs. Cette PCR est réalisée en utilisant une très faible quantité d'ADN

matrice, ainsi que des amorces se fixant sur la séquence à amplifier, possédant une queue flottante de 8 nt aléatoire rendant ainsi chaque amorce unique. La faible quantité d'ADN matrice permet de s'assurer que chaque amplicon sera amplifié avec un couple d'amorce unique permettant d'obtenir, pour chaque séquence à amplifier, une famille de plusieurs clones reconnaissable par les 16 nt uniques à leurs extrémités. Le produit de cette PCR est ensuite envoyé à séquencer suivant le protocole standard décrit ci-dessus. Cela conduit donc, pour chaque séquence initiale, au séquençage de plusieurs clones de cette séquence permettant d'obtenir une séquence consensus de cette séquence initiale. Par exemple, si une mutation est retrouvée chez tous les clones de la même famille alors cette mutation existe réellement. Au contraire, si cette mutation n'est retrouvée que chez certains clones d'une famille alors elle est considérée comme une erreur de séquençage (73).

Cet outil offre de nombreuses applications pour l'étude des HA des VIAs. Pour tester ce système, des séquences HA de sous-types H5 ont été utilisées. Cependant, il semble possible d'utiliser des séquences HA d'autres sous-types comme par exemple des sous-types HA1 et HA3 qui sont retrouvés chez des VIAs humains. Cela permettrait ainsi d'étudier le taux de mutation de ces séquences de sorte à prévoir l'évolution antigénique des VIAs circulant dans les populations et d'adapter les vaccins le plus rapidement possible.

Contrairement à la taille de l'insert HA inséré dans ce système, sa séquence nucléotidique ne devrait pas interférer avec la réplication du virus. Ainsi, ce système peut être utilisé pour comparer l'évolution génétique de plusieurs séquences HA de même taille, dans de mêmes conditions et avec un même taux de réplication.

L'absence de pression de sélection sur les transgènes offre également l'avantage de pouvoir insérer n'importe quelle séquence nucléotidique. Ainsi, des mutations peuvent être insérées à n'importe quel endroit sur les séquences à étudier. Cela permettrait, en les insérant par génie, de vérifier si des motifs ou des séquences nucléotidiques, ont un impact sur l'apparition de mutations et sur leur fréquence.



## Conclusion

Les VIAs et surtout les virus IAHP représentent un enjeu majeur à la fois économique ainsi que pour la santé animale et humaine. Cet enjeu est d'autant plus important qu'à l'heure actuelle, nous sommes incapables de prédire l'émergence et l'impact d'un nouveau virus IAHP. Il est donc nécessaire d'essayer de comprendre pourquoi et par quels mécanismes des virus IAHP deviennent HP et notamment, comment ils acquièrent un SCPB. Ce travail s'inscrit dans cette dynamique de recherche. Il a permis de créer un système sans pression de sélection et permettant d'étudier *in vitro* le taux de mutation de la séquence HA des VIAs. Ce système consiste à insérer dans un plasmide de génétique inverse contenant la séquence d'ADN double brin du segment PA du virus H7N1(977), la séquence HA à étudier. Ce plasmide peut ensuite être utilisé en génétique inverse pour produire des virus recombinants H7N1(977) transportant dans leur génome la séquence HA à analyser, qui n'est pas traduite. Après un certain nombre de passages cellulaires au cours desquels ces séquences ont pu accumuler des mutations, celles-ci sont extraites dans le but d'être séquencées afin de pouvoir analyser ces mutations. Ce système représente donc un outil majeur dans l'analyse du taux de mutation des séquences de HA des VIAs. Il permet d'étudier l'évolution des séquences HA et notamment d'étudier l'impact de la structure secondaire et de la séquence nucléotidique des HA dans l'apparition de mutation, notamment dans la région du SC qui est une zone clef dans l'émergence des virus IAHP.



**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'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de PASCOLO Baptiste intitulée « DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE D'ANALYSE DU TAUX DE MUTATION DE L'HEMAGGLUTININE DES VIRUS INFLUENZA » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 19/11/2021  
Enseignant-chercheur de l'École Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Docteur Romain VOLMER



Vu :  
Le Directeur de l'École Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Monsieur Pierre SANS



Vu :  
Le Président du jury  
Professeur Christophe PASQUIER



Vu et autorisation de l'impression :  
Le Président de l'Université Paul  
Sabatier  
Monsieur Jean-Marc BROTO  
Par délégation, le Doyen de la faculté de  
Médecine de Toulouse-Rangueil  
Monsieur Elie SERRANO



M. PASCOLO Baptiste  
a été admis(e) sur concours en : 2016  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le: 06/07/2020  
a validé son année d'approfondissement le: 18/11/2021  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.



## **Bibliographie**

1. Lefkowitz EJ, Dempsey DM, Hendrickson RC, Orton RJ, Siddell SG, Smith DB. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res.* 4 janv 2018;46(D1):D708-17.
2. Huang SSH, Banner D, Paquette SG, Leon AJ, Kelvin AA, Kelvin DJ. Pathogenic influenza B virus in the ferret model establishes lower respiratory tract infection. *J Gen Virol.* oct 2014;95(Pt 10):2127-39.
3. Matsuzaki Y, Katsushima N, Nagai Y, Shoji M, Itagaki T, Sakamoto M, et al. Clinical Features of Influenza C Virus Infection in Children. *J Infect Dis.* 1 mai 2006;193(9):1229-35.
4. Matsuzaki Y, Mizuta K, Kimura H, Sugawara K, Tsuchiya E, Suzuki H, et al. Characterization of antigenically unique influenza C virus strains isolated in Yamagata and Sendai cities, Japan, during 1992-1993. *J Gen Virol.* juin 2000;81(Pt 6):1447-52.
5. Su S, Fu X, Li G, Kerlin F, Veit M. Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence.* 17 nov 2017;8(8):1580-91.
6. Leahy MB, Dessens JT, Weber F, Kochs G, Nuttall PA. The fourth genus in the Orthomyxoviridae: sequence analyses of two Thogoto virus polymerase proteins and comparison with influenza viruses. *Virus Res.* août 1997;50(2):215-24.
7. Plarre H, Nylund A, Karlsen M, Brevik Ø, Sæther PA, Vike S. Evolution of infectious salmon anaemia virus (ISA virus). *Arch Virol.* déc 2012;157(12):2309-26.
8. Adams MJ, King AMQ, Carstens EB. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013). *Arch Virol.* 1 sept 2013;158(9):2023-30.
9. Sameroff S, Tokarz R, Jain K, Oleynik A, Carrington CVF, Lipkin WI, et al. Novel quaranjavirus and other viral sequences identified from ticks parasitizing hunted wildlife in Trinidad and Tobago. *Ticks Tick-Borne Dis.* 1 juill 2021;12(4):101730.
10. Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine.* 12 sept 2008;26 Suppl 4:D49-53.
11. Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, et al. Influenza. *Nat Rev Dis Primer.* 28 juin 2018;4(1):1-21.
12. 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.
13. Bullough PA, Hughson FM, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature.* 1 sept 1994;371(6492):37-43.

14. Wharton SA, Belshe RB, Skehel JJ, Hay AJ. Role of virion M2 protein in influenza virus uncoating: specific reduction in the rate of membrane fusion between virus and liposomes by amantadine. *J Gen Virol.* avr 1994;75 ( Pt 4):945-8.
15. Li X, Palese P. Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA. *J Virol.* févr 1994;68(2):1245-9.
16. Krug RM. Priming of influenza viral RNA transcription by capped heterologous RNAs. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1981;93:125-49.
17. Cros JF, Palese P. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res.* sept 2003;95(1-2):3-12.
18. Gao Q, Palese P. Rewiring the RNAs of influenza virus to prevent reassortment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 sept 2009;106(37):15891-6.
19. Gottschalk A. Neuraminidase: the specific enzyme of influenza virus and *Vibrio cholerae*. *Biochim Biophys Acta.* mars 1957;23(3):645-6.
20. Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature.* 29 janv 1981;289(5796):366-73.
21. Air GM, Laver WG, Webster RG. Antigenic variation in influenza viruses. *Contrib Microbiol Immunol.* 1987;8:20-59.
22. Steinhauer DA. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology.* 25 mai 1999;258(1):1-20.
23. Couceiro JN, Paulson JC, Baum LG. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res.* août 1993;29(2):155-65.
24. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk H-D. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30 mars 2004;101(13):4620-4.
25. Dou D, Revol R, Östbye H, Wang H, Daniels R. Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front Immunol.* 2018;9:1581.
26. Stallknecht DE. Ecology and Epidemiology of Avian Influenza Viruses in Wild Bird Populations: Waterfowl, Shorebirds, Pelicans, Cormorants, Etc. *Avian Dis.* 2003;47:61-9.
27. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. The persistent legacy of the 1918 influenza virus. *N Engl J Med.* 16 juill 2009;361(3):225-9.
28. Rota PA, Wallis TR, Harmon MW, Rota JS, Kendal AP, Nerome K. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology.* mars 1990;175(1):59-68.
29. Lee D-H, Criado MF, Swayne DE. Pathobiological Origins and Evolutionary History of Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1 févr 2021;11(2):a038679.

30. Veldhuis Kroeze EJB, Kuiken T. Sporadic influenza A virus infections of miscellaneous mammal species. In: *Animal Influenza*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2016. p. 557-93.
31. Easterday BC, Hinshaw VS, Halvorson DA. Influenza. In: *Diseases of Poultry*. Tenth edition. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 1997. p. 583-605.
32. Alexander DJ. Orthomyxovirus infections. In: *Virus Infections of Birds*. London: Elsevier Science; 1993. p. 287-316.
33. Gambotto A, Barratt-Boyes SM, de Jong MD, Neumann G, Kawaoka Y. Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus. *Lancet Lond Engl*. 26 avr 2008;371(9622):1464-75.
34. 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.
35. Wahlgren J. Influenza A viruses: an ecology review. *Infect Ecol Epidemiol*. 11 févr 2011;1:10.3402/iee.v1i0.6004.
36. OIE, manuel terrestre 2021, chapitre 3.3.4 : Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses) [Internet]. [cité 27 sept 2021]. Disponible sur : [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.03.04\\_AI.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf)
37. Garten W, Klenk HD. Characterization of the carboxypeptidase involved in the proteolytic cleavage of the influenza haemagglutinin. *J Gen Virol*. oct 1983;64 (Pt 10):2127-37.
38. Stieneke-Gröber A, Vey M, Angliker H, Shaw E, Thomas G, Roberts C, et al. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J*. juill 1992;11(7):2407-14.
39. Pauly MD, Procaro MC, Lauring AS. A novel twelve class fluctuation test reveals higher than expected mutation rates for influenza A viruses. *eLife*. 9 juin 2017;6:e26437.
40. Bedford T, Suchard MA, Lemey P, Dudas G, Gregory V, Hay AJ, et al. Integrating influenza antigenic dynamics with molecular evolution. *eLife*. 2014;3:e01914.
41. Koel BF, van der Vliet S, Burke DF, Bestebroer TM, Bharoto EE, Yasa IWW, et al. Antigenic variation of clade 2.1 H5N1 virus is determined by a few amino acid substitutions immediately adjacent to the receptor binding site. *mBio*. 10 juin 2014;5(3):e01070-01014.
42. Tumpey TM, Maines TR, Van Hoeven N, Glaser L, Solórzano A, Pappas C, et al. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science*. 2 févr 2007;315(5812):655-9.
43. Swayne DE, Suarez DL, Sims LD. Influenza. In: *Diseases of Poultry*. Thirteenth edition. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; 2013.
44. Webster RG, Sharp GB, Claas EC. Interspecies transmission of influenza viruses. *Am J Respir Crit Care Med*. oct 1995;152(4 Pt 2):S25-30.

45. Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol.* nov 1989;63(11):4603-8.
  46. 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.
  47. 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.* 25 juin 2009;459(7250):1122-5.
  48. Abolnik C. Evolution of H5 highly pathogenic avian influenza: sequence data indicate stepwise changes in the cleavage site. *Arch Virol.* août 2017;162(8):2219-30.
  49. Stech O, Veits J, Weber S, Deckers D, Schröer D, Vahlenkamp TW, et al. Acquisition of a Polybasic Hemagglutinin Cleavage Site by a Low-Pathogenic Avian Influenza Virus Is Not Sufficient for Immediate Transformation into a Highly Pathogenic Strain. *J Virol.* juin 2009;83(11):5864-8.
  50. 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 févr 2017;8(1):e02298-16.
  51. Laleye AT, Abolnik C. Emergence of highly pathogenic H5N2 and H7N1 influenza A viruses from low pathogenic precursors by serial passage in ovo. *PloS One.* 2020;15(10):e0240290.
  52. Graves IL. Influenza viruses in birds of the Atlantic flyway. *Avian Dis.* mars 1992;36(1):1-10.
  53. Centre (NL) EM, Venezie (IT) IZS delle, Richard M, Fouchier R, Monne I, Kuiken T. Mechanisms and risk factors for mutation from low to highly pathogenic avian influenza virus. *EFSA Support Publ.* 2017;14(10):1287E.
  54. Becker WB. The isolation and classification of Tern virus: influenza A-Tern South Africa--1961. *J Hyg (Lond).* sept 1966;64(3):309-20.
  55. 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.
  56. Capua I, Marangon S. The avian influenza epidemic in Italy, 1999-2000: a review. *Avian Pathol J WVPA.* août 2000;29(4).
  57. DRAAF. La nouvelle catégorisation des maladies animales et ses impacts [Internet]. [cité 3 août 2021].
- Disponible sur: <https://draaf.occitanie.agriculture.gouv.fr/01-La-nouvelle-categorisation-des>
58. Swayne DE, éditeur. *Diseases of poultry 2020.* Fourteenth edition. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2020. 1 p.



59. Animal Production and Health Division. Approaches to controlling, preventing and eliminating H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza in endemic countries [Internet]. Rome, Italy: FAO; 2011 [cité 7 oct 2021]. 102 p. (FAO Animal Production and Health Paper).

Disponible sur: <http://www.fao.org/documents/card/en/c/b624592e-d327-531f-a545-b0c5c2331dc2/>

60. Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature*. 6 oct 2005;437(7060):889-93.

61. Tran V, Poole DS, Jeffery JJ, Sheahan TP, Creech D, Yevtodiyenko A, et al. Multi-Modal Imaging with a Toolbox of Influenza A Reporter Viruses. *Viruses*. 13 oct 2015;7(10):5319-27.

62. Hou G, Li J, Wang Y, Wang S, Peng C, Yu X, et al. Influenza viral vectors expressing two kinds of HA proteins for bivalent vaccines against clade 2.3.4.4 and clade 2.3.2.1 H5 HP AIVs. *Sci Rep*. 19 juin 2018;8(1):9327.

63. 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*. 23 mai 2000;97(11):6108-13.

64. Liang Y, Hong Y, Parslow T. cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments. *J Virol*. août 2005;79(16).

65. Fujii K, Fujii Y, Noda T, Muramoto Y, Watanabe T, Takada A, et al. Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J Virol*. mars 2005;79(6):3766-74.

66. Killian ML. Hemagglutination assay for influenza virus. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2014;1161:3-9.

67. Hierholzer JC, Killington RA. Virus isolation and quantitation. *Virol Methods Man*. 1996;25-46.

68. Karakus U, Crameri M, Lanz C, Yángüez E. Propagation and Titration of Influenza Viruses. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2018;1836.

69. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance [Internet]. 2002 [cité 8 nov 2021].

Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/68026>

70. Manicassamy B, Manicassamy S, Belicha-Villanueva A, Pisanelli G, Pulendran B, García-Sastre A. Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22 juin 2010;107(25):11531-6.

71. Billeter MA, Naim HY, Udem SA. Reverse genetics of measles virus and resulting multivalent recombinant vaccines: applications of recombinant measles viruses. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;329:129-62.

72. Tran V, Moser LA, Poole DS, Mehle A. Highly sensitive real-time in vivo imaging of an influenza reporter virus reveals dynamics of replication and spread. *J Virol.* déc 2013;87(24):13321-9.
73. Doud MB, Bloom JD. Accurate Measurement of the Effects of All Amino-Acid Mutations on Influenza Hemagglutinin. *Viruses.* 3 juin 2016;8(6):E155.

**NOM Prénom :** PASCOLO Baptiste

## DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE D'ANALYSE DU TAUX DE MUTATION DE L'HEMAGGLUTININE DES VIRUS INFLUENZA

### **Résumé :**

Les virus influenza aviaires hautement pathogènes représentent un enjeu majeur à la fois économique ainsi que pour la santé animale et humaine. Actuellement, nous sommes incapables de prédire l'émergence de ces virus. Il est donc nécessaire de comprendre comment ces virus émergent et notamment comment leur hémagglutinine acquière un site de clivage polybasique. Dans ce travail, nous avons construit un plasmide permettant l'insertion d'une séquence d'hémagglutinine, à la suite de celle codante pour le gène de la protéine acide PA d'un virus influenza H7N1. Ce plasmide peut ensuite être utilisé en génétique inverse pour produire des virus possédant ce transgène, qui ne sera pas traduit et pourra donc accumuler toutes les mutations lors de la réplication virale, même celles habituellement délétères pour l'hémagglutinine. Ce système représente un outil important pour l'étude de l'impact de la séquence nucléotidique de l'hémagglutinine sur son taux de mutation ainsi que celui de sa structure secondaire, notamment dans la région du site de clivage.

**Mots clefs :** virus, Influenza aviaire, hémagglutinine, mutations, méthode, génétique inverse

---

## DEVELOPMENT OF A METHOD TO ANALYZE THE HEMAGGLUTININ MUTATION RATE OF INFLUENZA VIRUSES

### **Abstract :**

Highly pathogenicity influenza viruses represent a major economic, animal and human health issue. We are currently unable to predict the emergence of these viruses. That's why it's necessary to better understand how these viruses emerge and more particularly how their hemagglutinin acquires a polybasic cleavage site. In this study, we constructed a plasmid allowing the insertion of a hemagglutinin sequence following the one of the acid protein gene PA of an H7N1 influenza virus. This plasmid can be used in a reverse genetic protocol to produce viruses containing this transgene. The transgene will not be translated in protein and will be able to accumulate all the mutations during viral replication even those that are usually deleterious to hemagglutinin. This system represents an important tool to study the impact of the nucleotide sequence of the hemagglutinin as well as its secondary structure on its mutation rate, especially in the cleavage site region.

**Key words :** virus, avian Influenza, hemagglutinin, mutations, method, reverse genetic