

Thèse de doctorat
de l'Université Sorbonne Paris Cité
Préparée à l'Université Paris Diderot
Ecole doctorale Bio SPC – Bio Sorbonne Paris Cité – ED 562
Unité de Génétique Moléculaire des Virus à ARN

Rôle de la protéine PB1 dans la fidélité du complexe polymérase des virus influenza

Florian Andrieux

Thèse de doctorat de Microbiologie – Option Virologie

Dirigée par Sylvie van der Werf

Présentée et soutenue publiquement à l'Institut Pasteur, le 5 septembre 2017

Président du jury : Pr. Pierre-Emmanuel Ceccaldi
Rapporteur : Dr. Mariette Ducatez
Rapporteur : Dr. Daniel Marc
Examineur : Dr. Marco Vignuzzi
Examineur : Pr. Bruno Lina
Directrice de thèse : Pr. Sylvie van der Werf
Membre invité : Dr. Cyril Barbezange



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

Cela semble toujours impossible, jusqu'à ce qu'on le fasse.

Nelson Mandela

Résumé

Titre : Rôle de la protéine PB1 dans la fidélité du complexe polymérase des virus influenza

Résumé :

Les virus influenza de type A (IAV) appartiennent à la famille des Orthomyxoviridae. Ces virus enveloppés présentent un génome composé de 8 segments d'ARN simple brin, de polarité négative. Chaque segment est encapsidé par les nucléoprotéines (NP) et associé au complexe polymérase viral, hétérotrimère composé des sous-unité PB1, PB2 et PA, pour former la ribonucléoprotéine virale (RNPv). La protéine PB1 est la sous-unité catalytique responsable de l'activité ARN polymérase ARN-dépendante du complexe viral. La RNPv représente ainsi l'unité minimale de transcription et réplication du génome viral.

En raison de la faible fidélité de la polymérase virale et l'absence d'activité de relecture, les IAV présentent un taux de mutation élevé, responsable du développement rapide de populations virales d'une grande diversité génétique, appelées quasi-espèces. Des études récentes ont permis d'identifier des mutants présentant une fidélité de réplication augmentée, due à des mutations uniques dans la sous-unité PB1. Comme décrit pour d'autres virus à ARN, différentes mutations peuvent avoir un effet similaire sur l'activité de la polymérase virale. Afin d'approfondir la caractérisation de la protéine PB1 nous avons recherché d'autres positions pouvant avoir un rôle dans la fidélité de la polymérase, la sélectivité des nucléotides ou la processivité du complexe.

Pour cela, des banques de séquences PB1 mutées ont été générées par mutagenèse aléatoire pour deux sous-types de virus influenza A, H3N2 et H1N1pdm09, circulant actuellement chez l'homme. A partir de ces banques, des expériences de reconstitution transitoire de RNPv fonctionnelles (minigénome) en présence de ribavirine, un analogue nucléosidique mutagène, ont permis d'évaluer l'activité de la polymérase et de sélectionner, après subdivisions successives des banques, des mutations conférant une résistance au composé mutagène supérieure à celle de la polymérase sauvage. Les mutations ainsi identifiées dans différentes régions du segment PB1 ont ensuite été réintroduites de manière spécifique, par mutagenèse dirigée, dans la séquence du gène PB1. L'impact de ces mutations sur l'activité de la polymérase a été évalué par des expériences de minigénome en présence et absence de ribavirine. Les mutations pour lesquelles la résistance à la ribavirine a été confirmée ont alors été introduites par génétique inverse dans le contexte du génome viral complet. La majorité des mutations s'est avérée viable et a permis l'obtention de virus mutants infectieux. La capacité de multiplication des virus mutants a été évaluée en cellules MDCK et comparée à celle des virus sauvages correspondants, en absence et en présence de ribavirine. Ainsi, deux mutants porteurs de deux mutations différentes, localisées dans des régions distinctes de la protéine PB1, présentent une capacité à résister à la ribavirine supérieure à celle du virus sauvage. L'analyse de la diversité des populations virales, évaluée par séquençage à haut-débit, en utilisant la technologie Illumina, permettra de confirmer si cette résistance à la ribavirine est bien liée à une augmentation de la fidélité de la polymérase virale. Cette étude a ainsi permis de préciser les éléments de la protéine PB1 impliqués dans l'activité et potentiellement la fidélité de la réplication virale pour deux sous-types de virus influenza A.

Mots clés : Virus influenza de type A, polymérase virale, fidélité de réplication, protéine PB1, mutagène, ribavirine, virus ARN, mutagenèse aléatoire, génétique inverse

Title : Role of the PB1 protein in the influenza virus polymerase complex fidelity**Abstract :**

Influenza type A viruses (IAVs) belong to the Orthomyxoviridae family. The genome of these enveloped viruses consists of 8 single-stranded RNA segments of negative polarity. Each segment is encapsidated by oligomers of the nucleoprotein (NP) and associated with the viral polymerase complex, a heterotrimer composed of the PB1, PB2 and PA subunits to form the viral ribonucleoproteins (vRNPs). The PB1 protein is the catalytic subunit of the polymerase complex, harboring the RNA-dependent RNA polymerase activity. The vRNP represents the minimal functional unit for transcription and replication of the viral genome.

Given the low fidelity and lack of proofreading activity of their polymerase, IAVs have a high mutation rate leading to the rapid development of viral populations with high genetic diversity, called quasispecies. Recent studies identified mutants with increased replication fidelity, due to single mutations in the PB1 subunit. As described with other RNA viruses, different mutations could have similar effects on the activity of the viral polymerase. To improve the characterization of the PB1 protein, we searched for other positions that may have a role on polymerase fidelity, nucleotide selectivity or complex processivity.

For this purpose, random mutagenesis was used to generate libraries of mutated PB1 from influenza A virus subtypes H3N2 and H1N1pdm09, currently circulating in humans. From these libraries, transient reconstitution of functional vRNPs (minigenome) experiments were performed with ribavirin, a mutagenic nucleoside analog, to evaluate the polymerase activity. Upon selection based on the polymerase activity of successively subdivided libraries, PB1 mutations with increased polymerase activity in the presence of ribavirin relative to wild-type were identified in several regions of PB1. These mutations were specifically re-introduced in PB1 by directed mutagenesis. Their impact on polymerase activity was evaluated by minigenome experiments with and without ribavirin. Mutations with confirmed resistance against ribavirin were then introduced in the context of infectious virus by reverse genetics. Most corresponding mutant viruses could be rescued. Their growth characteristics were analysed in MDCK cells and compared to the corresponding wild-type viruses, in the presence or absence of ribavirin. Two mutants carrying two different mutations, located in distinct regions of the PB1 protein, displayed an improved capacity to resist ribavirin relative to the wild-type virus. Viral populations genetic diversity analysis by next-generation sequencing, using Illumina technology, will confirm whether the observed resistance against ribavirin is linked to an increase of the viral polymerase fidelity. This study provides insights into the PB1 domains involved in the activity and potentially the viral replication fidelity of two influenza A virus subtypes.

Keywords : Influenza virus type A, viral polymerase, replication fidelity, PB1 protein, mutagen, ribavirin, RNA virus, random mutagenesis, reverse genetics

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci aux Dr. Mariette Ducatez et au Dr. Daniel Marc d'avoir accepté la responsabilité d'être mes rapporteurs et d'avoir revu mon manuscrit de thèse durant l'été. Merci au Pr. Bruno Lina et au Dr. Marco Vignuzzi d'avoir accepté la tâche d'être mes examinateurs lors de ma soutenance.

Je remercie le Pr. Pierre-Emmanuel Ceccaldi d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je vous remercie également, ainsi que le Pr. Noël Tordo pour votre écoute et votre soutien depuis le M2 de Virologie.

Un grand merci au LabEX IBEID et à la Fondation pour la Recherche Médicale d'avoir financé mes recherches et de m'avoir permis de réaliser ce projet de thèse.

Je remercie tout particulièrement le Pr. Sylvie van der Werf de m'avoir accueilli au sein de son unité et d'avoir été ma directrice de thèse. Merci de tout ce temps que tu m'as accordé. Merci pour ta présence, ta bienveillance et ton soutien à chaque instant, sans lesquels je n'aurais pas pu réaliser tout cela. Merci également au Dr. Cyril Barbezange de m'avoir encadré au cours de ce projet, ainsi que pour tous ses conseils.

Je remercie Marion Declercq d'avoir pris la suite du projet, ainsi que le Dr. Marco Vignuzzi et le Dr. Gonzalo Moratorio d'avoir accepté de collaborer et de partager avec nous leur expertise pour les études *in vivo* et de séquençage à haut-débit.

Merci à tous les membres passés et présents du laboratoire que j'ai pu rencontré au cours de ces années : Mégane Babiak, Elise Biquand, Bernadette Crescenzo, Caroline Demeret, Anne-Marie Filodeau, Guillaume Fournier, Lisa Fourniol, Jean-Michel Héraud, Louis Jones, Yves Jacob, Sonia Keddani, Annette Martin, Sandie Munier, Nadia Naffakh, Isabelle Poste, Camille Roquin et Catherine Isel. J'adresse également une pensée toute particulière à Noémie Ammeux, qui nous a quitté bien trop tôt.

A mes camarades de thèse, Elise Biquand et Marion Declercq, je vous souhaite le meilleur pour la fin de votre de thèse, mais également pour la suite.

To the foreign people in the lab : Usama Ashraf, Amrish Baidjoe, Kuang-yu Chen, Marwah Karim and Jingshu Zhang (Tami). It's a pleasure to know you. I really enjoyed our discussions and the time spent with you.

Un grand merci à toute l'équipe du CNR, au membres passés aussi bien que présents : Andreea Alexandru, Marion Barbet, Sylvie Behilil, Mathilde Benassaya, Solenne Brun,

Vincent Enouf, Marie Lazzerini, Stéphane Léandri et Clio Socratous. Merci pour votre gentillesse, vos sourires et vos rires.

A Christine Detchepare, merci pour ton franc parlé, ta bonne humeur et ta gentillesse. A Patricia Cassonnet, un grand merci pour ton encadrement, le temps que tu m'as accordé pour me transmettre ton savoir faire ainsi que pour toutes nos discussions à propos de films et des jeux vidéo, c'était un grand plaisir ! A Mélanie Dos Santos, un simple merci n'est pas suffisant. Ta gentillesse, ton rire et ta personnalité si avenante et bienveillante sont un vrai bonheur. Beaucoup devraient prendre exemple sur toi...

A toutes les personnes qui m'entoure... A vous, mes bienveillants... Sans vous, rien n'aurait la même saveur... Je me sens vraiment chanceux de vous avoir rencontré et je suis honoré de cette amitié que nous avons construit. De simples remerciements sont bien peu de choses pour vous exprimer ma gratitude. Angélique, depuis les bancs de la fac nous nous suivons et grandissons ensemble... Anne-Laure, beaucoup de points de communs nous ont permis de nous rencontrer et c'est un grand plaisir d'avoir une binôme témoin telle que toi... Jonathan et Nicolas heureusement que vous êtes là, parce que Disney ça va un moment mais il faut bien redevenir sérieux quand même et parler de Comics ! Daphnée, la fac nous a rapproché et même la distance ne peut le changer. Que ce soit plus tôt à la fac avec Mohamed, ou bien lors de M2 de Virologie, l'humour à la limite du raisonnable aussi bien que les happy hours nous ont permis de nous rencontrer et de nous rapprocher Christopher, Grégory, Julie, Léa, Marie-Claire (Pikachu !), Sébastien, et depuis... rien ça n'a changé ! Du grand n'importe quoi !

A vous Nicolas, Coralie, Richard, Aline, Pauline, Thomas, Julien... Beaucoup de place pour vous... Je ne m'exprime que trop peu mais soyez en sûr si la vie est faite de choix, sans hésiter je referais chacun de ceux qui m'ont amené à vous...

Un grand merci à ma mère et mon père, à ma famille, qui m'ont toujours poussé à faire de mon mieux, qui m'ont soutenu dans mes choix et m'ont permis d'être celui que je suis aujourd'hui...

Enfin, il y a toi, Elodie... Mon soutien de tous les instants... Cette année nous nous sommes mariés, un pas de plus dans le monde des grands. Il y aura eu beaucoup d'émotions cette année... Mais rien n'aurait été possible sans toi...

Table des matières

RESUME	3
REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES.....	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS	10
TABLE DES ABREVIATIONS	12
INTRODUCTION	14
I. GENERALITES SUR LES VIRUS INFLUENZA	14
<i>I.1. Classification et nomenclature.....</i>	<i>14</i>
<i>I.2. Particule virale.....</i>	<i>15</i>
<i>I.3. Expression des protéines virales.....</i>	<i>17</i>
II. EPIDEMIOLOGIE	19
<i>II.1. Ecologie, environnement, réservoir.....</i>	<i>19</i>
<i>II.2. Evolution et stratégies évolutives.....</i>	<i>25</i>
III. REPLICATION VIRALE.....	27
<i>III.1. Cycle viral.....</i>	<i>27</i>
<i>III.2. Ribonucléoprotéine virale</i>	<i>30</i>
III.2.1. Structure, composition et fonctions des différents éléments des RNPv	30
III.2.2. Transcription et réplication virale.....	36
III.2.3. Déterminisme du spectre d’hôte	43
III.2.4. RNPv et adaptation à un hôte	47
IV. DIVERSITE GENETIQUE VIRALE	50
<i>IV.1. Les quasiespèces virales.....</i>	<i>50</i>
IV.1.1. Origine de la théorie des quasiespèces	50
IV.1.2. Application aux virus à ARN	51
<i>IV.2. Notion de vitalité virale</i>	<i>52</i>
IV.2.1. Définitions	52
IV.2.2. Espace de séquence et vitalité	54
IV.2.3. Interactions au sein de la population virale	60
<i>IV.3. Taux de mutation et fidélité de la polymérase.....</i>	<i>62</i>
IV.3.1. Taux de mutation	62
IV.3.2. Modulation de la diversité génétique – Facteurs intrinsèques.....	64
IV.3.3. Modulation de la diversité génétique – Facteurs extrinsèques	65
IV.3.4. Optimisation et sélection du taux de mutation	66
IV.3.5. Taux de mutation et seuil d’erreur.....	67
<i>IV.4. Mutagénèse et évolution des populations virales.....</i>	<i>68</i>
IV.4.1. Principe de la mutagénèse létale.....	68

IV.4.2. Mécanisme d'action des composés mutagènes	69
IV.4.3. Résistance aux composés mutagènes	71
V. MUTANTS DE FIDELITE DE LA POLYMERASE	72
<i>V.1. Mutants de fidélité des virus à ARN.....</i>	<i>73</i>
<i>V.2. Virus influenza et mutants de fidélité</i>	<i>75</i>
MATERIEL & METHODES	77
I. CELLULES, VIRUS ET PLASMIDES	77
<i>I.1. Cellules.....</i>	<i>77</i>
<i>I.2. Virus</i>	<i>77</i>
<i>I.3. Plasmides.....</i>	<i>77</i>
II. MUTAGENESE DIRIGEE	78
III. MUTAGENESE ALEATOIRE ET GENERATION DE BANQUES DE SEQUENCES MUTEES	79
<i>III.1. Mutagénèse aléatoire.....</i>	<i>79</i>
<i>III.2. Génération de banques de séquences mutées.....</i>	<i>80</i>
IV. EVALUATION DE L'ACTIVITE DE LA POLYMERASE VIRALE PAR RECONSTITUTION TRANSITOIRE DE RNP_v.....	80
V. GENETIQUE INVERSE	81
VI. AMPLIFICATION, TITRAGE ET CINETIQUES DE MULTIPLICATION VIRALE.....	82
<i>VI.1. Amplification des stocks viraux.....</i>	<i>82</i>
<i>VI.2. Titrage viral par la méthode des plages de lyse.....</i>	<i>82</i>
<i>VI.3. Cinétique de multiplication virale</i>	<i>82</i>
VII. TEST DE VIABILITE CELLULAIRE.....	83
VIII. ANALYSE DES ARN VIRAUX	83
<i>VIII.1. Détermination du nombre de copies d'ARN viral par RT-qPCR.....</i>	<i>83</i>
<i>VIII.2. Validation des séquences virales</i>	<i>84</i>
<i>VIII.3. Analyse des séquences virales par NGS.....</i>	<i>84</i>
RESULTATS.....	85
I. DEVELOPPEMENT DE BANQUES DE SEQUENCES PB1 MUTEES ALEATOIREMENT	85
II. SELECTION DE MUTANTS DE PB1 CONFERANT UNE RESISTANCE A LA RIBAVIRINE.....	88
III. DIVERSITE DES SEQUENCES PB1 DES SOUS-GROUPES SELECTIONNES	97
IV. IMPACT DES MUTATIONS SUR L'ACTIVITE DE LA POLYMERASE VIRALE.....	99
<i>IV.1. Impact des mutations sur l'activité polymérase H3N2.....</i>	<i>99</i>
<i>IV.2. Impact des mutations sur l'activité polymérase H1N1p.....</i>	<i>100</i>
V. IMPACT DES MUTATIONS SUR LA SENSIBILITE DE LA POLYMERASE A LA RIBAVIRINE	102
<i>V.1. Sensibilité à la ribavirine de la polymérase mutée en contexte H3N2</i>	<i>102</i>

<i>V.2. Sensibilité à la ribavirine de la polymérase mutée en contexte H1N1p</i>	<i>106</i>
VI. CARACTERISTIQUES DES VIRUS PORTEURS DES MUTATIONS.....	112
<i>VI.1. Production par génétique inverse et analyse des virus mutants.....</i>	<i>112</i>
<i>VI.2. Vitalité des virus mutants en absence et en présence de ribavirine</i>	<i>117</i>
<i>VI.3. Diversité des populations virales des mutants de PB1.....</i>	<i>125</i>
DISCUSSION & PERSPECTIVES	126
I. DISCUSSION	126
<i>I.1. Caractéristiques des banques de séquences PB1 mutées aléatoirement.....</i>	<i>127</i>
<i>I.2. Impact des mutations sur l'activité polymérase des RNPv.....</i>	<i>127</i>
<i>I.3. Sensibilité à la ribavirine de l'activité polymérase des RNPv mutées.....</i>	<i>131</i>
<i>I.4. Viabilité et vitalité des virus mutants</i>	<i>134</i>
<i>I.5. Sensibilité à la ribavirine des virus mutants.....</i>	<i>136</i>
<i>I.6. Relation des mutations avec la structure de la polymérase.....</i>	<i>138</i>
<i>I.7. Relation entre sensibilité aux mutagènes et fidélité</i>	<i>141</i>
<i>I.8. Implications des variations d'activité et de fidélité de la polymérase</i>	<i>143</i>
II. PERSPECTIVES	146
BIBLIOGRAPHIE.....	149

Table des illustrations

FIGURE 1 - PARTICULE VIRALE DES VIRUS INFLUENZA A.....	16
FIGURE 2 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PRINCIPALES SEQUENCES CODANTES PORTEES PAR LE GENOME VIRAL.	18
FIGURE 3 - SPECTRE D'HOTES DES IAV.....	20
FIGURE 4 - CIRCULATION DES IAV AU SEIN DE LA POPULATION HUMAINE DEPUIS 1918.	23
FIGURE 5 - CYCLE VIRAL DES IAV.	29
FIGURE 6 - STRUCTURE DES ARNV, DES RNPV ET PROCESSUS DE TRANSCRIPTION ET REPLICATION.....	32
FIGURE 7 - STRUCTURE DE LA POLYMERASE DES IAV.....	35
FIGURE 8 - MODELISATION DU PROCESSUS DE TRANSCRIPTION COIFFE-DEPENDANT.	39
FIGURE 9 - PAYSAGE DE VITALITE DES QUASIESPECES.	53
FIGURE 10 -REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA FORMATION D'UNE QUASIESPECE VIRALE.	55
FIGURE 11 -TAUX DE MUTATION ET SURVIE DU PLUS PLAT.....	57
FIGURE 12 -REPRESENTATION D'UN GOULOT D'ETRANGLEMENT GENETIQUE.	59
FIGURE 13 -SELECTION DE POPULATIONS VIRALES DANS LE CAS D'UN GOULOT D'ETRANGLEMENT ETROIT.	59
FIGURE 14 -TAUX DE MUTATION DES GENOMES VIRAUX.	63
FIGURE 15 -PRINCIPE DE LA MUTAGENESE ALEATOIRE DU GENE PB1.....	86
FIGURE 16 -REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES EXPERIENCES DE RECONSTITUTION TRANSITOIRE DE COMPLEXES DE TRANSCRIPTION/REPLICATION FONCTIONNELS.	89
FIGURE 17 -ACTIVITES POLYMERASE DES RNPV DE SOUS-TYPE H3N2 LORS DES ETAPES DE SELECTIONS 1 ET 5.....	92
FIGURE 18 -ACTIVITES POLYMERASE DES RNPV DE SOUS-TYPE H1N1P LORS DES ETAPES DE SELECTION 1 ET 5.	93
FIGURE 19 -FACTEURS COMPARATIFS DE PERTE D'ACTIVITE DES RNPV EN PRESENCE DE RIBAVIRINE LORS DES ETAPES DE SELECTION 1 ET 5.	96
FIGURE 20 -DISTRIBUTION SUR LA SEQUENCE DE PB1 DES MUTATIONS DE REDUCTION DE LA SENSIBILITE A LA RIBAVIRINE DES RNPV.	98
FIGURE 21 -ACTIVITE POLYMERASE ET SENSIBILITE A LA RIBAVIRINE DES RNPV DE SOUS-TYPE H3N2 PORTANT LES MUTATIONS DANS PB1 SELECTIONNEES.....	105
FIGURE 22 -ACTIVITE POLYMERASE ET SENSIBILITE A LA RIBAVIRINE DES RNPV DE SOUS-TYPE H1N1P PORTANT LES MUTATIONS DANS PB1 SELECTIONNEES.....	111
FIGURE 23 -CINETIQUE DE MULTIPLICATION DES MUTANTS DE PB1 DE SOUS-TYPE H3N2.....	118
FIGURE 24 -CINETIQUE DE MULTIPLICATION DES MUTANTS DE PB1 DE SOUS-TYPE H3N2 EN ABSENCE ET EN PRESENCE DE RIBAVIRINE.	120
FIGURE 25 -CINETIQUE DE MULTIPLICATION DES MUTANTS DE SOUS-TYPE H1N1P EN ABSENCE ET EN PRESENCE DE RIBAVIRINE.....	122
FIGURE 26 -COMPARAISON DES TITRES VIRAUX DES MUTANTS DE PB1 EN ABSENCE ET EN PRESENCE DE RIBAVIRINE.	124
FIGURE 27 -BILAN DES ETAPES REALISEES AU COURS DU PROJET.	126
FIGURE 28 -REPARTITION ET EFFETS DES MUTATIONS ETUDIEES SUR LA STRUCTURE LINEAIRE DE LA PROTEINE PB1.....	130

FIGURE 29 - EVALUATION DE LA CORRELATION ENTRE L'ACTIVITE POLYMERASE INTRINSEQUE DES RNPV ETUDIEES ET LE FACTEUR DE RESISTANCE A LA RIBAVIRINE EVALUE PAR TEST MINIGENOME.	133
FIGURE 30 - LOCALISATION DES MUTATIONS DE RESISTANCE A LA RIBAVIRINE IDENTIFIEES AU SEIN DE LA STRUCTURE DU COMPLEXE POLYMERASE DES VIRUS INFLUENZA DE TYPE A.	139
TABLEAU 1 -TAUX DE MUTATION OBSERVE LORS DES EXPERIENCES DE MUTAGENESE ALEATOIRE SELON LA QUANTITE DE MATRICE ET LE NOMBRE DE CYCLES DE PCR.	87
TABLEAU 2 -CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES PB1 MUTEES ISSUES DES BANQUES RETENUES.	87
TABLEAU 3 -EVOLUTION DES CARACTERISTIQUES DES BANQUES DE SEQUENCES PB1 MUTEES DE SOUS-TYPE H3N2 LORS DES 5 CYCLES DE SELECTION EN PRESENCE DE RIBAVIRINE.	94
TABLEAU 4 - EVOLUTION DES CARACTERISTIQUES DES BANQUES DE SEQUENCES PB1 MUTEES DE SOUS-TYPE H1N1P LORS DES 5 CYCLES DE SELECTION EN PRESENCE DE RIBAVIRINE.	95
TABLEAU 5 -CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES PB1 MUTEES ISSUES DES SOUS-GROUPES SELECTIONNES ET SEQUENCES A L'ISSUE DES EXPERIENCES DE MINIGENOMES EN ABSENCE ET EN PRESENCE DE RIBAVIRINE.	97
TABLEAU 6 -BILAN DES RESULTATS OBTENUS POUR LES MUTANTS DE PB1 DE SOUS-TYPE H3N2 LORS DES EXPERIENCES DE MINIGENOME ET DE GENETIQUE INVERSE.	114
TABLEAU 7 -BILAN DES RESULTATS OBTENUS POUR LES MUTANTS DE PB1 DE SOUS-TYPE H1N1P LORS DES EXPERIENCES DE MINIGENOME ET DE GENETIQUE INVERSE.	115
TABLEAU 8 -ANALYSE DES SEQUENCES DU GENOME COMPLET DES VIRUS MUTANTS.....	116

Table des abréviations

ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ARNc	Acide Ribonucléique complémentaire
ARNv	Acide Ribonucléique viral
CTD	Carboxy-Terminal Domain (Domaine Carboxy-Terminal)
C-terminal	Carboxy-terminal
H1N1pdm09	Virus A(H1N1) pandémique de 2009
H3N2	Virus A(H3N2)
HA	Hémagglutinine
HEK-293T	Human Embryonic Kidney 293T (Cellules embryonnaires rénales humaines transformées par la protéine E1A de l'adénovirus et par l'antigène T de SV40)
hpi	Heure post-infection
IAV	Virus Influenza de type A
kDa	kilo-Dalton
M1	Protéine de Matrice 1
M2	Protéine de Matrice 2
m⁷GTP	7'-méthyl-guanosine triphosphate
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney (Cellules rénales de chien)
MOI	Multiplicité d'infection, pour « multiplicity of infection »
NA	Neuraminidase
NP	Nucléoprotéine
nt	Nucléotide
NS1	« Non Structural protein 1 »
NS2/NEP	« Non Structural protein 2 / Nuclear export Protein »
NTD	N-Terminal Domain (Domaine Amino-terminal)
N-terminal	Amino-terminal
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PA	Protéine Acide
PB1	Protéine Basique 1
PB2	Protéine Basique 2
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampon phosphate salin)
PFU	Plaque Forming Unit (Unité formant plaque)
Pol I	ARN polymérase ADN-dépendante I cellulaire
Pol II	ARN polymérase ADN-dépendante II cellulaire
Pré-ARNm	Acide Ribonucléique messenger précurseur
RNP	Ribonucléoprotéine
RNPc	Ribonucléoprotéine complémentaire
RNPv	Ribonucléoprotéine virale
RdRp	ARN-polymérase ARN-dépendante
RT-PCR	Rétro-Transcription / Réaction de Polymérisation en Chaîne
SVF	Sérum de Veau Fœtal
T705	Favipiravir

Virus

CoV	Coronavirus
CHIKV	Virus chikungunya
CVB3	Virus Coxsackie B3
DENV	Virus de la dengue
FMDV	Virus de la fièvre aphteuse
H1N1p	A/Bretagne/7608/2009(H1N1)pdm09
H3N2	A/Centre/1003/2012(H3N2)
LCMV	Lymphocytic Choriomeningitis Virus (virus de la chorioméningite lymphocytaire)
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VRS	Virus Respiratoire Syncytial
VSV	Virus de la stomatite vésiculaire
WNV	Virus West-Nile
WT	Wild-Type (Sauvage)

Introduction

I. Généralités sur les virus influenza

I.1. Classification et nomenclature

Les virus influenza sont des virus enveloppés qui appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae*. Le génome viral est composé de 7 ou 8 segments d'ARN monocaténaire, de polarité négative (ARNv). Quatre types de virus influenza sont décrits (A, B, C et D) selon l'antigénicité de la nucléoprotéine (NP) et de la protéine M1 (Fields *et al.* 2013). Les virus influenza de types B et C infectent presque exclusivement les humains, tandis que les virus de type D, découverts en 2013, ont été décrits comme n'infectant que les *bovidae* et différentes espèces de *suidae* (Hause *et al.* 2013 ; Ducatez *et al.* 2015).

Au contraire, les virus influenza de type A (IAV) sont capables d'infecter un grand nombre d'espèces d'oiseaux et de mammifères, et notamment les humains (Taubenberger *et al.* 2010). Dans ce mémoire, seule la biologie des virus influenza de type A sera dorénavant abordée. Ils sont la principale cause des épidémies de grippe saisonnières et leur potentiel zoonotique peut entraîner occasionnellement l'apparition d'épidémies de plus grande ampleur, appelées pandémies. Les IAV sont classés en sous-types définis selon les propriétés antigéniques des deux protéines de surfaces : l'hémagglutinine (HA, H1-H16) et la neuraminidase (NA, N1-N9). Les oiseaux aquatiques sauvages sont considérés comme le réservoir principal des IAV (Webster *et al.* 1992 ; Munster *et al.* 2007). Néanmoins, deux nouveaux sous-types viraux H17N10 et H18N11 ont été décrits chez la chauve-souris (Mehle 2014).

Jusqu'à présent, seuls des virus de sous-type H1N1, H2N2 et H3N2 ont régulièrement circulé au sein de la population humaine depuis 1918. Selon la nomenclature actuelle, une souche virale est nommée selon i) son type ; ii) l'espèce hôte dans laquelle le virus a été isolé, non spécifiée s'il s'agit d'un humain ; iii) le lieu d'isolement ; iv) le numéro d'isolat ; v) l'année d'isolement ; vi) et le sous-type, dans le cas d'un virus de type A. Ainsi, le virus A/Bretagne/7608/2009(H1N1)pdm09 correspond au virus influenza de type A et de sous-type H1N1 de l'échantillon humain n°7608 récolté en 2009 en Bretagne (France).

I.2. Particule virale

Les virus influenza sont des virus enveloppés pouvant présenter des morphologies variables, formes sphériques ou filamenteuses (Fig.1), d'un diamètre d'environ 100nm (Fields *et al.* 2013). L'enveloppe virale est constituée d'une bicouche lipidique, dérivant de la membrane plasmique cellulaire de l'hôte infecté, dans laquelle sont incorporées trois protéines virales : les glycoprotéines HA et NA, ainsi que la protéine M2. L'enveloppe du virion contient également de nombreuses protéines issues de l'hôte, mais dont les fonctions sont généralement inconnues (Shaw *et al.* 2008). Les protéines HA, associées sous forme de trimères, sont impliquées dans l'attachement du virus aux récepteurs cellulaires et, la fusion des enveloppes virales et cellulaires. Les protéines NA, associées sous forme de tétramères, présentent une activité sialidase qui contribue à la libération des virions néoformés dans le milieu extra-cellulaire. Des tétramères de protéines M2 forment des canaux ioniques transmembranaires jouant un rôle dans l'entrée virale. La protéine M1 s'oligomérisse pour former une couche de matrice continue sous la membrane virale, et joue un rôle dans l'assemblage des particules virales et leur bourgeonnement.

Au cœur de la particule virale se trouve le génome viral, composé de 8 segments d'ARN simple brin de polarité négative (ARNv) et de longueurs variables. Chaque segment est encapsidé par des oligomères de nucléoprotéine (NP) et associé à une polymérase virale composée de trois protéines virales PB1, PB2 et PA, formant ainsi une ribonucléoprotéine virale (RNPv). Au sein de la particule virale, les RNPv sont disposées selon un agencement de type 7+1, où 1 segment central est entouré des 7 autres segments (Noda *et al.* 2006).

Dans de plus faibles proportions, les protéines virales dites « non-structurales » NS1 et NS2/NEP (« Non Structural Protein 2 / Nuclear Export Protein ») sont également retrouvées dans les virions (Hutchinson *et al.* 2012). De même, certaines protéines de l'hôte ayant un rôle dans la multiplication virale semblent être également empaquetées dans les particules virales (Banerjee *et al.* 2014).

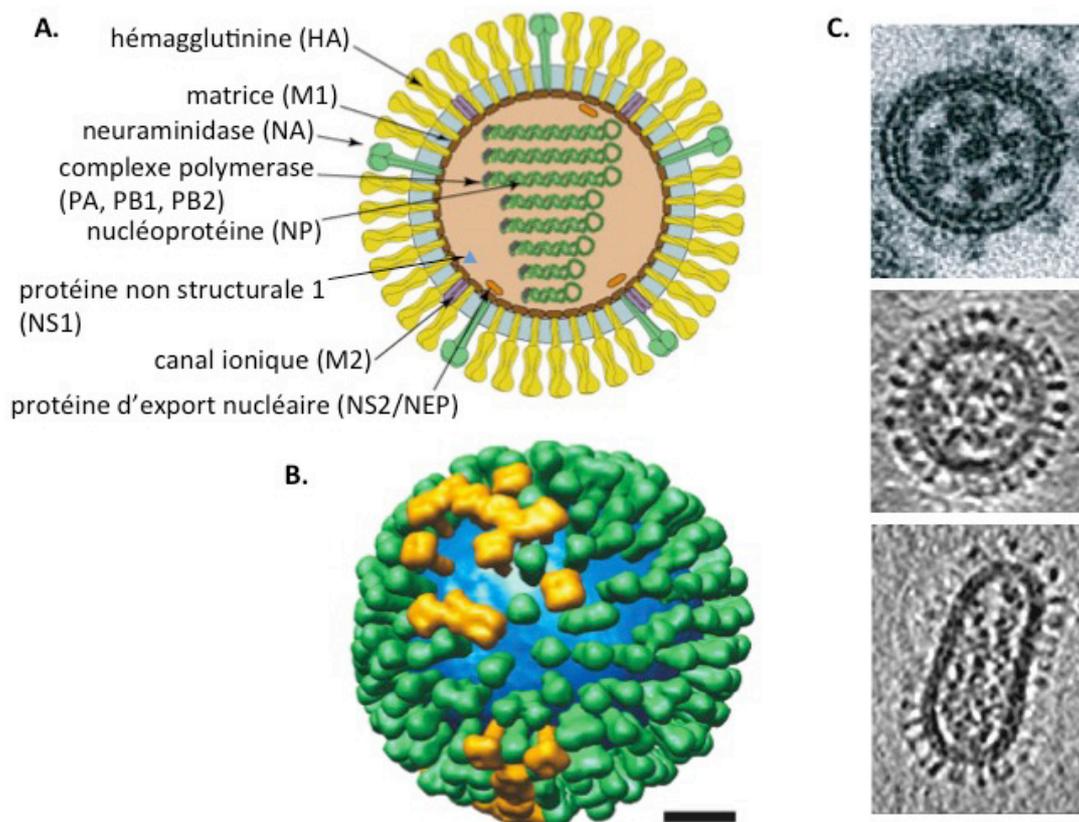


Figure 1 - Particule virale des virus influenza A.

A) Représentation schématique. L'enveloppe comporte les glycoprotéines de surface, l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA), ainsi que le canal à protons M2. La protéine de matrice M1 soutient l'enveloppe virale et interagit avec les protéines de surface, les RNPv et NEP. Les RNPv sont composées d'un segment d'ARNv simple brin, de polarité négative, encapsidé par la protéine NP et associé au complexe polymérase (PB2, PB1, PA). Adapté de (ViralZone 2016). B) Modèle de la distribution des glycoprotéines HA (vert) et NA (jaune) à la surface d'un virion. En bleu, la bicouche lipidique (barre d'échelle, 20nm) (Harris *et al.* 2006). C) Coupe transversale de virions, observés par microscopie électronique (Harris *et al.* 2006 ; Noda *et al.* 2006).

I.3. Expression des protéines virales

Les IAV possèdent un génome qui permet d'exprimer jusqu'à 18 protéines différentes (Fig.2). La majorité des ARN messagers (ARNm) viraux ne possèdent pas d'introns, cependant différentes stratégies sont utilisées par les IAV afin d'accroître le protéome viral (voir (Vasin *et al.* 2014) pour revue).

Un changement de cadre de lecture en cours de traduction (« ribosome-switch ») permet l'expression de la protéine PA-X à partir de l'ARNm codant pour la protéine PA (Jagger *et al.* 2012). PA-X permet de moduler la réponse immunitaire innée de l'hôte ainsi que la virulence du virus. PA joue un rôle dans l'extinction de la synthèse des protéines de l'hôte, du fait de son activité endonucléase sur les pré-ARNm, liée au complexe polymérase.

L'épissage alternatif des ARNm viraux codant pour les protéines M1 et NS1 permet de produire les ARNm codant respectivement pour les protéines M2 et NEP, essentielles à la multiplication virale (Dubois *et al.* 2014). De plus, il a également été observé pour certains virus un épissage supplémentaire des ARNm de PB2, M1 et NS1, permettant ainsi d'obtenir des ARNm codant respectivement pour les protéines PB2-S1, M3 et M4, et NS3 (Selman *et al.* 2012 ; Wise *et al.* 2012 ; Yamayoshi *et al.* 2015).

Enfin, les protéines PB1-F2 et PB1-N40, dérivant des ARNm codant pour PB1 (Chen *et al.* 2001 ; Wise *et al.* 2009), et PA-N155 et PA-N182, dérivant des ARNm codant pour PA (Muramoto *et al.* 2013), sont des protéines tronquées obtenues par un mécanisme d'initiation alternative de la traduction, commençant à partir de différents codons AUG sur les ARNm.

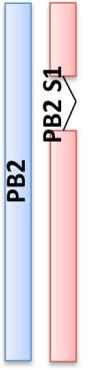
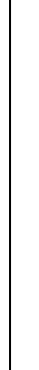
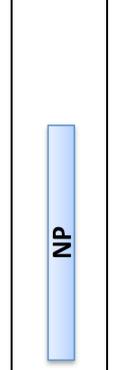
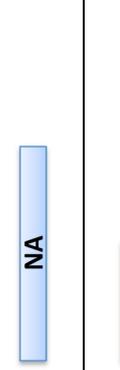
Segment	Représentation schématique de la séquence codante	Taille de la protéine	Fonction principale
1 – PB2 2341 nt		PB2 : 759 aa (86 kDa) PB2-S1 : 121 aa (55 kDa)	PB2 : Sous-unité de la polymérase virale Liaison à la coiffe des ARNm cellulaires PB2-S1 : Fonction inconnue
2 – PB1 2341 nt		PB1 : 757 aa (87 kDa) PB1-F2 : 87 aa (10 kDa) PB1-N40 : 718 aa (82 kDa)	PB1 : Sous-unité de la polymérase virale ARN polymérase ARN-dépendante PB1-F2 : Apoptose Régulation de l'activité polymérase PB1-N40 : Fonction inconnue
3 – PA 2233 nt		PA : 716 aa (84 kDa) PA-X : 251 aa (29 kDa) PA-N155 : 561 aa (62 kDa) PA-N182 : 534 aa (60 kDa)	PA : Sous-unité de la polymérase virale Activité exonucléase liée au processus de vol de coiffe PA-X : Inhibition de l'expression des gènes de l'hôte PA-N155 : Fonction inconnue PA-N182 : Fonction inconnue
4 – HA 1778 nt		HA : 550 aa (61 kDa)	Glycoprotéine de surface Liaison au récepteur cellulaire Fusion des membranes virales et endosomales
5 – NP 1565 nt		NP : 498 aa (56 kDa)	Composant de la RNPv Encapsidation de l'ARNv Trafic nucléocytoplasmique des RNPv
6 – NA 1413 nt		NA : 454 aa (50 kDa)	Glycoprotéine de surface Activité sialidase nécessaire au relargage des particules virales néoformées dans le milieu extracellulaire
7 – M 1027 nt		M1 : 252 aa (28 kDa) M2 : 97 aa (11 kDa) M42 : 99 aa (11 kDa)	M1 : Protéine de matrice Export nucléaire des RNPv Bourgeoisement des particules virales néoformées M2 : Canal à protons Libération des RNPv dans le milieu cellulaire M42 : Fonction semblable à M2
8 – NS 890 nt		NS1 : 237 aa (27 kDa) NEP : 121 aa (14 kDa) NS3 : 194 aa (20 kDa)	NS1 : Inhibition de l'immunité innée Inhibition de l'expression des gènes de l'hôte Régulation de l'activité polymérase NS2/NEP : Export nucléaire des RNPv néoformées NS3 : Adaptation à l'hôte

Figure 2 - Représentation schématique des principales séquences codantes portées par le génome viral.

Les séquences codantes principales sans introns ou non épissées sont représentées en bleu. Les séquences principales épissées sont représentées en rouge. En vert, les séquences minoritaires. Adapté de (Fields *et al.* 2013 ; Rivaille *et al.* 2013 ; Vasin *et al.* 2014 ; Yamayoshi *et al.* 2015).

II. Epidémiologie

II.1. Ecologie, environnement, réservoir

De nombreuses espèces animales sont susceptibles d'être infectées par des virus influenza de type A (Fig.3). Les oiseaux aquatiques sauvages, de l'ordre des *Anseriformes* (canard, cygnes, oies) et des *Charadriiformes* (mouettes, goélands) (Munster *et al.* 2007), sont considérés comme le réservoir naturel des IAV (Webster *et al.* 1992 ; Prager *et al.* 2016). C'est au sein de ces espèces d'oiseaux que la plus grande diversité de virus et la majorité des sous-types connus (H1-H16 ; N1-N9) a été observée. L'infection par un IAV est souvent asymptomatique. Le virus se multiplie principalement dans le tractus digestif de l'animal, ainsi que dans le tractus respiratoire dans une moindre mesure chez les canards, et sera transmis entre individus par voie féco-orale (Munster *et al.* 2009). Les événements de réassortiments étant fréquents lors de co-infections, il a été proposé, sur la base d'analyses phylogénétiques, que les oiseaux aquatiques sauvages jouent le rôle d'un réservoir de segments génomiques fonctionnellement équivalents et interchangeableables. Ainsi, des constellations transitoires de segments se formeraient continuellement sans qu'aucune pression de sélection ne soit suffisamment forte pour les maintenir (Dugan *et al.* 2008). Ces oiseaux jouent donc un rôle important dans le brassage génétique et la diversification des IAV. Ils permettent également leur dissémination mondiale, tout au long des voies utilisées par les oiseaux lors des périodes de migration sur les continents américain ou eurasiatique (Krauss *et al.* 2007). Ainsi, les IAV issus de leur réservoir aviaire sauvage peuvent occasionnellement franchir la barrière d'hôte et s'adapter à de nouvelles espèces animales, et notamment à l'homme (Taubenberger *et al.* 2010).

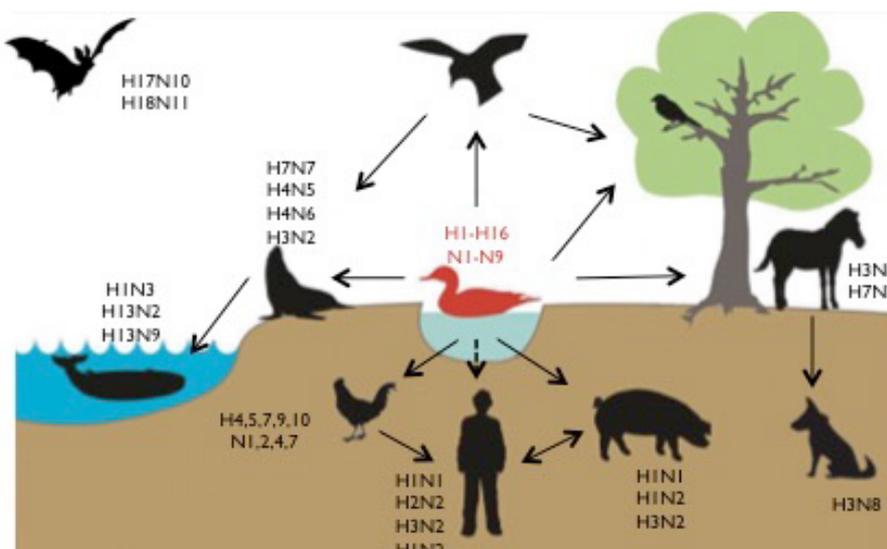


Figure 3 - Spectre d'hôtes des IAV.

Les oiseaux aquatiques sauvages représentent le réservoir des IAV, en rouge. Ces virus peuvent être transmis à un large spectre d'hôtes, oiseaux et mammifères, en noir. Les flèches représentent les types de transmissions inter-espèces. Les principaux sous-types ayant circulé chez les volailles, mammifères et chauves-souris sont indiqués. Adapté de (Fields *et al.* 2013).

Les élevages de volailles domestiques et de porcs jouent un rôle important dans les échanges génétiques et l'évolution des virus influenza zoonotiques ainsi qu'en tant qu'hôtes intermédiaires, lors de leur adaptation à l'Homme.

Au sein des élevages de volailles domestiques, les IAV peuvent, selon les souches, présenter une pathogénicité relativement faible ou bien très élevée. Les virus faiblement pathogènes ont un tropisme intestinal et respiratoire, entraînant des signes cliniques tels que des atteintes respiratoires et des chutes de ponte. Les virus hautement pathogènes aboutissent à des signes cliniques généralisés graves, un taux de mortalité de 100% pouvant être observé en seulement 48h, ainsi qu'à une dissémination très rapide au sein des élevages (Watanabe *et al.* 2012). Cette virulence élevée est notamment déterminée par la présence caractéristique d'un site de clivage multi-basique au niveau de la HA, considéré comme un déterminant majeur (Fields *et al.* 2013).

Les virus hautement pathogènes de sous-types H5 ou H7 sont les principales causes des derniers épisodes épidémiologiques majeurs qui se sont déclarés au sein d'élevages de volailles, à l'exception d'un cas où ce fut un virus H9N2, faiblement pathogène (voir (Taubenberger *et al.* 2010 ; OIE 2017) pour revue).

Au sein des élevages de porc, les signes cliniques observés lors d'infections par des IAV sont des écoulements nasaux, de la toux, des difficultés respiratoires ainsi que des conjonctivites. Les virus infectant le porc ont une affinité pour les cellules épithéliales du tractus respiratoire. Certains sous-types viraux sont à l'origine de foyers épizootiques ponctuels au sein d'élevages tandis que d'autres sont devenus enzootiques. Le porc peut être infecté par des IAV d'origines diverses, aviaires, équine, porcine mais également humaine. Les virus porcins peuvent quant à eux être transmis à des espèces aviaires, domestiques ou sauvages, ainsi qu'à l'Homme, ce qui illustre bien la complexité et les possibilités nombreuses d'échanges pouvant exister dans la nature. En effet, les trois principaux lignages circulant actuellement chez le porc sont d'origine aviaire et/ou humaine (Simon 2010 ; Rivaille *et al.* 2013).

Le lignage H1N1 contemporain porcin, dit classique, circulant au sein des élevages nord américains, a commencé à circuler en 1918 et est apparenté au lignage des virus saisonniers H1N1 humain qui ont circulé avant 2009 (Shope 1931) (Fig.4). Le lignage porcin eurasiatique H1N1 existe depuis 1979, lorsqu'un virus aviaire est devenu enzootique dans les élevages en Europe et en Asie (Pensaert *et al.* 1981). Depuis 1998, de nombreux événements de réassortiments se sont produits entre les virus de lignage H1N1 américain, le virus saisonnier humain H3N2 ainsi qu'un virus aviaire (Zhou *et al.* 1999). Ces virus, triple-réassortants, sont de sous-types variables, H1N1, H1N2 ou H3N2, et possèdent tous une cassette originale de gènes internes, appelée TRIG (Triple Reassortant Internal Genes). Leur segment PB1 est d'origine humaine, les segments PB2 et PA sont d'origine aviaire tandis que les segments NP, M et NS sont d'origine porcine. En circulant dans les élevages porcins américains, ces virus ont pu se diversifier et produire de nouveaux réassortiments lors de co-infections avec des virus humains (Simon 2010 ; Lindstrom *et al.* 2012 ; Rivaille *et al.* 2013).

Dans la population humaine, les IAV sont responsables d'épidémies saisonnières. Ces virus ont un impact économique très fort. Ils infectent chaque année 5% à 10% de la population mondiale, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (Turner *et al.* 2003 ; WHO 2016), causant 250 000 à 500 000 décès par an (Molinari *et al.* 2007 ; Prager *et al.* 2016). Ces virus sont transmis par aérosols et manu-portage. Classiquement, les symptômes apparaissent après 2 jours d'incubation, de manière brutale : atteintes respiratoires avec toux et congestion nasale, courbatures, fièvre mais ceux-ci ne sont pas nécessairement spécifiques. Les personnes infectées deviennent contagieuses 1 jour environ avant l'apparition des symptômes

et peuvent l'être encore jusqu'à 6 jours après. De manière générale, la grippe est considérée comme une infection bénigne pour la plupart des individus, cependant les conséquences peuvent être plus graves voire fatales chez les populations à risque que sont les enfants de moins de 2 ans, les adultes de plus de 65 ans ou bien les individus présentant d'autres facteurs de risques tels que des maladies respiratoires chroniques (WHO 2016).

Les IAV de sous-types H1N1, H1N2, H2N2 et H3N2 sont les seuls à avoir entraîné des épidémies saisonnières depuis 1918. Actuellement, et ceci depuis 1977, deux sous-types viraux co-circulent dans la population humaine, les IAV H3N2 et H1N1, H1N1s avant 2009 et H1N1pdm09 (H1N1p) depuis 2009 (Fig.4). Le sous-type H3N2 s'est établi en tant que virus saisonnier depuis 1968, après avoir supplanté le virus H2N2. Le virus H3N2 provient d'un réassortiment entre un virus aviaire, apportant les segments PB1 et HA, et le virus H2N2 humain saisonnier circulant à cette époque (Kilbourne 2006 ; Taubenberger *et al.* 2010). Le virus de sous-type H1N1p est devenu saisonnier après la pandémie de 2009 en supplantant le virus H1N1 saisonnier (H1N1s) circulant précédemment. Ce virus H1N1p est le résultat de nombreux réassortiments (Fig.4). En effet, il dérive d'une souche H1N1 porcine de lignage eurasiatique, apportant les segments NA et M, ainsi que d'un virus H1N2 triple réassortant (Neumann *et al.* 2009 ; Taubenberger *et al.* 2010). En dépit d'une immunité pré-existante dans la population, la survenue des épidémies de grippe chaque année peut être expliquée par le phénomène de dérive antigénique lié à l'accumulation de mutations notamment au niveau des deux glycoprotéines de surface et par de fréquents événements de réassortiments entre virus de différents lignages génétiques de même sous-type voire entre virus de sous-types différents (Medina *et al.* 2011). L'apparition de nouvelles souches saisonnières suit un modèle « source-puits » sans persistance dans l'environnement (Rambaut *et al.* 2008). Selon ce modèle, du fait de la circulation continue de différentes populations virales, soumises à de fortes pressions de sélection antigénique dans la population humaine, l'Asie du Sud-Est aurait un rôle de réservoir de virus saisonniers et les variants sélectionnés seraient ensuite exportés vers le reste du monde, tout d'abord dans l'hémisphère Nord puis le Sud.

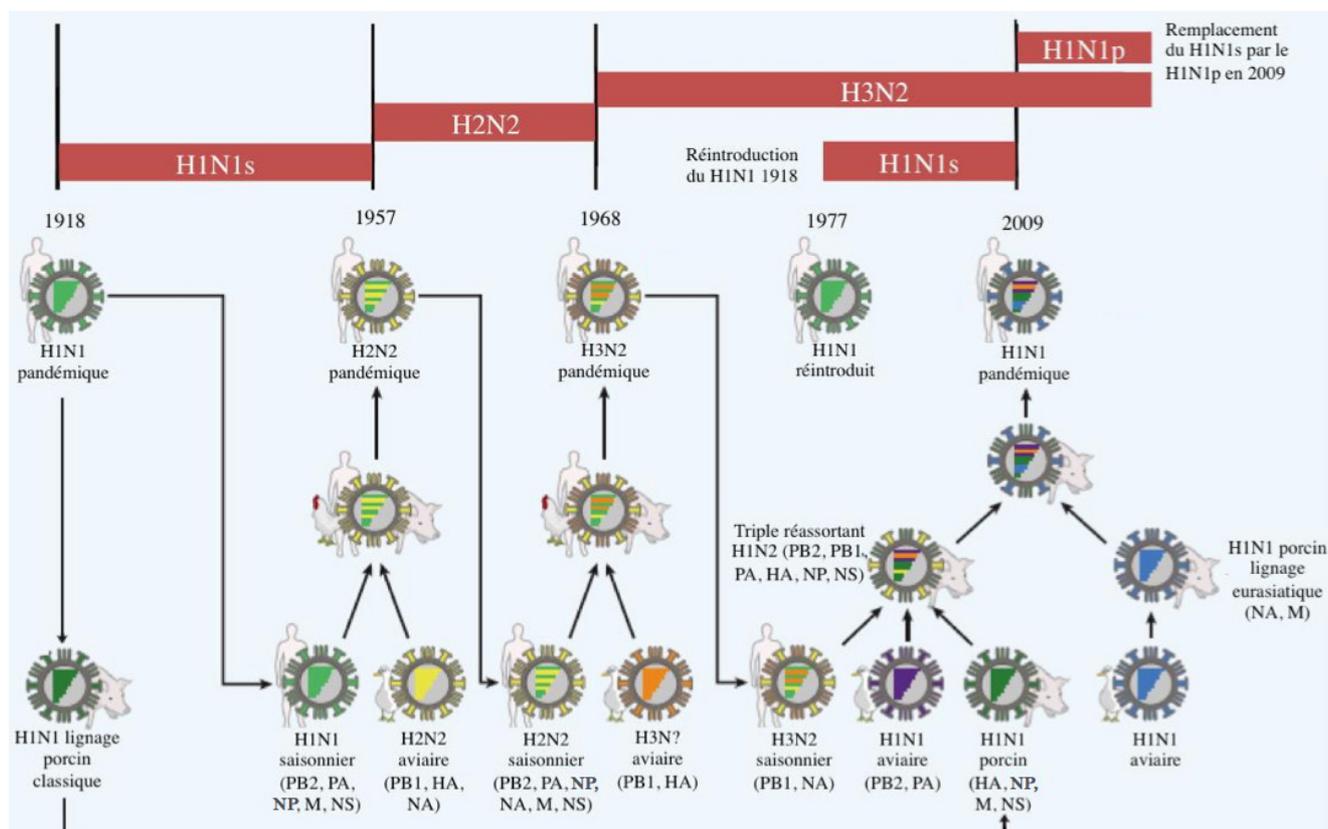


Figure 4 - Circulation des IAV au sein de la population humaine depuis 1918.

Les virus issus du virus H1N1 responsable de la grippe espagnole de 1918 ont circulé dans la population jusqu'en 1957. Réintroduits chez l'homme en 1977, les virus de ce lignage ont ensuite circulé dans la population jusqu'en 2009. En 1957, l'émergence d'un virus H2N2 ayant acquis des segments d'origine aviaire fut responsable de la pandémie de grippe asiatique. En 1968, un réassortiment entre le virus H2N2 et un virus aviaire a permis l'émergence d'un virus H3N2, responsable de la pandémie de grippe de Hong Kong. Les virus issus de ce virus circulent encore de nos jours chez l'homme. En 2009, un nouveau virus H1N1 a émergé suite au réassortiment d'un virus H1N2 porcine triple réassortant et d'un virus H1N1 porcine du lignage eurasiatique. Ce virus H1N1 pandémique (H1N1p) a remplacé les virus H1N1s descendant du virus de 1918 circulant jusqu'alors. Les silhouettes d'homme, de porc ou de canard indiquent l'hôte chez lequel le virus ayant participé au réassortiment circulait. Les silhouettes associées indiquent les hôtes potentiels chez lesquels ont eu lieu les événements de réassortiment. Adapté de (Wendel *et al.* 2015).

Le fait que les volailles et les porcs jouent un rôle majeur dans les réassortiments génétiques et l'évolution des virus influenza et que des cas d'infections chez l'homme par des IAV d'origine aviaire ou porcine soient régulièrement décrits depuis plusieurs années met en lumière le potentiel zoonotique de ces virus en circulation chez ces animaux. En effet, depuis 2003 de nombreux cas humains d'infection par le virus aviaire hautement pathogène H5N1 ont été observés (WHO 2017), ainsi que par le virus aviaire H7N9 depuis 2013 (WHO 2017). Ceci souligne le risque pour la santé publique mondiale que peuvent poser ces IAV et leur adaptation à l'homme par l'intermédiaire des hôtes aviaires ou porcins.

En cas d'introduction d'un nouveau sous-type d'IAV vis-à-vis duquel la population humaine est immunologiquement naïve, si celui-ci présente une capacité de transmission interhumaine alors il pourra se répandre facilement au sein de la population, localement d'abord, puis s'étendre de manière rapide et massive au reste de la population mondiale, donnant lieu à une pandémie. Il est cependant important de noter que le terme de pandémie ne dépend pas de la sévérité de l'infection. Le virus influenza fut isolé pour la première fois en 1933 et considéré comme l'agent étiologique de la grippe. Jusqu'à cette époque, les symptômes n'étant pas spécifiques de ce virus, les données sur la grippe sont difficiles à comparer et à interpréter. Cependant, d'après les données épidémiologiques, on estime que la population humaine a dû faire face à 13 pandémies depuis le XVI^{ème} siècle (Taubenberger *et al.* 2009). Au cours du XX^{ème} siècle, 4 pandémies ont eu lieu. Il s'agit tout d'abord de la pandémie de « grippe espagnole » en 1918, causée par un virus H1N1, puis en 1957 la pandémie de « grippe asiatique » fut causée par un virus H2N2, et en 1968, ce fut un virus H3N2 qui entraîna la pandémie de « Hong-Kong ». En 1977, un virus H1N1 génétiquement proche des virus circulant dans les années 1950 et dérivant du virus de 1918 (Nakajima *et al.* 1978), a été responsable de la « grippe russe ». Ce virus a probablement été réintroduit dans la population à partir d'un site de production de vaccin. Les souches responsables des pandémies de 1918, 1957 et 1968 ont chacune leur tour supplanté le sous-type circulant déjà dans la population au moment de chaque pandémie, pour devenir les souches saisonnières. Probablement du fait d'une immunité pré-existante chez les personnes âgées, la souche H1N1 de « grippe russe » n'a pas remplacé le virus H3N2 circulant à cette époque mais est tout de même devenue saisonnière. En 2009, une nouvelle souche virale H1N1 fut à l'origine d'une nouvelle pandémie mondiale, celle-ci fut renommée H1N1pdm09 et supplanta la précédente souche H1N1 après l'épisode pandémique. La nomenclature H1N1pdm09 est actuellement conservée malgré son caractère saisonnier afin de maintenir la distinction avec la souche saisonnière précédente (WHO 2011).

La pandémie due au virus H1N1 de 1918 fut la plus meurtrière, en causant le décès de 20 à 50 millions de personnes, souvent associée à des co-infections bactériennes (Johnson *et al.* 2002). Les pandémies survenues ensuite furent moins mortelles (Simonsen 1999 ; Dawood *et al.* 2012 ; Fields *et al.* 2013). L'analyse épidémiologique de la mortalité en fonction de l'âge lors de la pandémie de 1918 permet d'observer une courbe particulière et inhabituelle en forme de W, représentative d'un pic de mortalité chez les jeunes adultes, comparativement à

une courbe en forme de U observée typiquement lors des épidémies de grippe saisonnières (Taubenberger *et al.* 2006).

L'analyse phylogénétique de ces virus pandémiques a permis de déterminer une origine zoonotique pour chacun de ces IAV (Morens *et al.* 2009 ; Taubenberger *et al.* 2010 ; Sorrell *et al.* 2011). La capacité à passer de l'animal à l'homme, à se multiplier efficacement au sein du nouvel hôte humain et à être transmis d'homme à homme sont donc les étapes nécessaires à l'établissement d'un nouveau lignage viral au sein de la population humaine. Les espèces domestiques dites intermédiaires comme les porcs ou volailles, sensibles aux différents IAV, permettent une amplification des populations virales et augmentent l'exposition de l'être humain aux virus animaux. Plus particulièrement, le porc, pouvant être infecté aussi bien par les virus aviaires que ceux d'origine humaine, servirait de creuset de mélange pour la génération de nouveaux virus réassortants pouvant présenter un potentiel pandémique (Ito *et al.* 1998). Il est à noter que la capacité d'une nouvelle souche virale à se multiplier dans un environnement donné, sa vitalité, joue un rôle important face à celle des IAV déjà établis dans la population humaine, et vis-à-vis d'une immunité pré-existante permettant de limiter la multiplication virale dans l'organisme infecté. De ce fait, les infections humaines par des virus zoonotiques restent généralement sans suite et la propagation de l'un d'eux au sein de la population reste un événement rare.

II.2. Evolution et stratégies évolutives

De par la nature de leur génome, avec une information génétique segmentée et portée par de l'ARN, les IAV sont soumis à deux types de forces évolutives : la dérive génétique d'une part, correspondant à l'accumulation de mutations au fil des cycles de réplication, ainsi que les réassortiments ou cassure génétique d'autre part, liés aux échanges de segments entre différents virus (Fields *et al.* 2013). Parmi les nombreux virus qui peuvent ainsi être obtenus, seuls seront sélectionnés ceux qui portent des mutations viables, présentant une vitalité ou « fitness » en adéquation avec leur environnement (Memoli *et al.* 2009) et la capacité à échapper au système immunitaire de l'hôte (Thangavel *et al.* 2011).

L'ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp) des virus influenza de type A ne présente pas d'activité de relecture. De ce fait, la polymérase des IAV, ainsi que celles des virus à ARN en général, est peu fidèle. Elle présente un taux de mutation de l'ordre de 10^{-4} substitutions/site/cycle, soit la mutation d'un nucléotide par génome à chaque cycle de

réplication (Drake 1993 ; Drake 1999). La population virale, observée lors de l'infection d'un individu donné, est donc hétérogène et forme alors un ensemble complexe de sous-populations de variants, appelé quasispèce. La pression de sélection exercée par le système immunitaire, additionnée à l'accumulation de mutations sur les protéines de surfaces HA et NA entraîne une modification de l'antigénicité virale, appelée dérive antigénique. Ce phénomène permet aux IAV de persister au sein d'une population (Holmes 2009).

Lors d'événements de co-infection d'un même hôte par deux IAV de souches différentes, il peut arriver que leur matériel génétique soit mélangé, du fait de la nature segmentée de leur génome (Steel *et al.* 2014). Ces phénomènes de réassortiments, qu'ils se produisent entre virus de sous-types différents ou entre virus de même sous-type, ont un rôle important dans l'évolution des virus aussi bien au sein d'une espèce donnée (Holmes *et al.* 2005 ; Dugan *et al.* 2008 ; Nelson *et al.* 2008 ; Lu *et al.* 2014), que pour l'introduction dans une nouvelle espèce hôte ou bien l'émergence de nouveaux variants (Smith *et al.* 2009 ; Taubenberger *et al.* 2010). Dans le cas de l'émergence de nouveaux variants réassortants, si ceux-ci présentent un sous-type antigénique vis-à-vis duquel la population hôte est immunologiquement naïve, alors cette émergence est appelée cassure antigénique et peut entraîner une pandémie grippale. Lors de la multiplication virale, il y a peu de preuve de recombinaison homologue au sein des IAV (Boni *et al.* 2012), cependant des événements de recombinaison par changement de matrice sont observés. La recombinaison par changement de matrice amène à la production de virus présentant des délétions ou des insertions dans leur génome, impactant leur vitalité et/ou leur virulence (Fields *et al.* 2013).

III. Réplication virale

III.1. Cycle viral

La liaison des protéines HA aux acides sialiques, récepteurs cellulaires des IAV liés aux glycoprotéines et glycolipides des membranes plasmiques, représente la première étape du cycle viral (Fields *et al.* 2013 ; de Graaf *et al.* 2014) (Fig.5). Cet attachement déclenche l'endocytose de la particule virale selon une voie médiée par la clathrine (Matlin *et al.* 1981), ou bien en suivant une voie clathrine indépendante (Sieczkarski *et al.* 2002 ; de Vries *et al.* 2011). L'acidification de l'endosome va alors induire différents événements. D'une part, l'acidification permet un changement de conformation de la protéine HA qui expose alors son peptide de fusion et permet la fusion des membranes virale et endosomale (Fontana *et al.* 2013 ; Fontana *et al.* 2015). D'autre part, la diminution de pH permet l'ouverture du canal à protons M2 (Schnell *et al.* 2008), ce qui entraîne une acidification de l'intérieur de la particule virale, une déstabilisation des interactions au cœur de la particule, entre M1 et les RNPv, et aboutit au relargage des RNPv dans le cytoplasme (Helenius 1992). Celles-ci sont alors acheminées au noyau où se dérouleront la transcription des ARNm viraux et la réplication du génome viral (O'Neill *et al.* 1995 ; Cros *et al.* 2005). Les ARNm viraux primaires sont transcrits par l'ARN polymérase virale ARN-dépendante (RdRp), associée à des éléments de machinerie cellulaire (York *et al.* 2013). Les transcrits sont ensuite exportés dans le cytoplasme où ils seront traduits par la machinerie cellulaire. Les protéines d'enveloppe HA, NA et M2 synthétisées sont adressées à la membrane plasmique via la voie de sécrétion du réseau trans-Golgi. Les protéines virales nécessaires à la transcription secondaire, à la réplication du génome viral et à l'assemblage des RNPv sont quant à elles importées dans le noyau. Les RNPv nouvellement formées interagissent avec la protéine de matrice M1, qui interagit elle-même avec la Protéine d'Export Nucléaire (NEP) afin d'assurer l'export des RNPv vers le cytoplasme médié par l'exportine CRM1 (Paterson *et al.* 2012). Dans le compartiment cytoplasmique, les RNPv sont en interaction avec la protéine Rab11-GTPase, responsable de leur ancrage aux endosomes de recyclage qui assurent leur acheminement à la membrane plasmique, au niveau des sites d'assemblage et de bourgeonnement des particules virales (Hutchinson *et al.* 2013). Chaque virion incorpore un exemplaire de chacun des 8 segments génomiques selon un mécanisme encore mal défini. Selon le modèle actuel les 8 RNPv s'assemblent via des interactions ARNv-ARNv avant leur incorporation dans les particules virales produites par bourgeonnement à la membrane plasmique (Chou *et al.* 2012 ;

Fournier *et al.* 2012 ; Noda *et al.* 2012 ; Gerber *et al.* 2014). En clivant les acides sialiques présents à la surface de la cellule et des nouveaux virions produits par bourgeonnement, la protéine NA permet le relargage des particules virales dans le milieu extracellulaire et évite leur agrégation (Air 2012). Après libération des virions dans le milieu, les protéases extracellulaires de type trypsine clivent leurs protéines de surfaces HA en deux domaines, HA1 et HA2, au niveau des muqueuses respiratoires et intestinales de l'hôte. Ces deux domaines restent liés ensemble de manière covalente, par un pont disulfure. Ce clivage de la protéine HA est une étape essentielle pour que le peptide de fusion puisse être ensuite exposé et permettre l'entrée du virus dans une nouvelle cellule. Il est à noter que la HA des virus aviaires hautement pathogènes, de sous-types H5 ou H7, présente un site de clivage multi-basique, clivé avant le bourgeonnement, au niveau du réseau trans-Golgi, par la furine et/ou PC6, protéases ubiquitaires conférant ainsi à ces virus un très large tropisme (Medina *et al.* 2011 ; Garten *et al.* 2015).

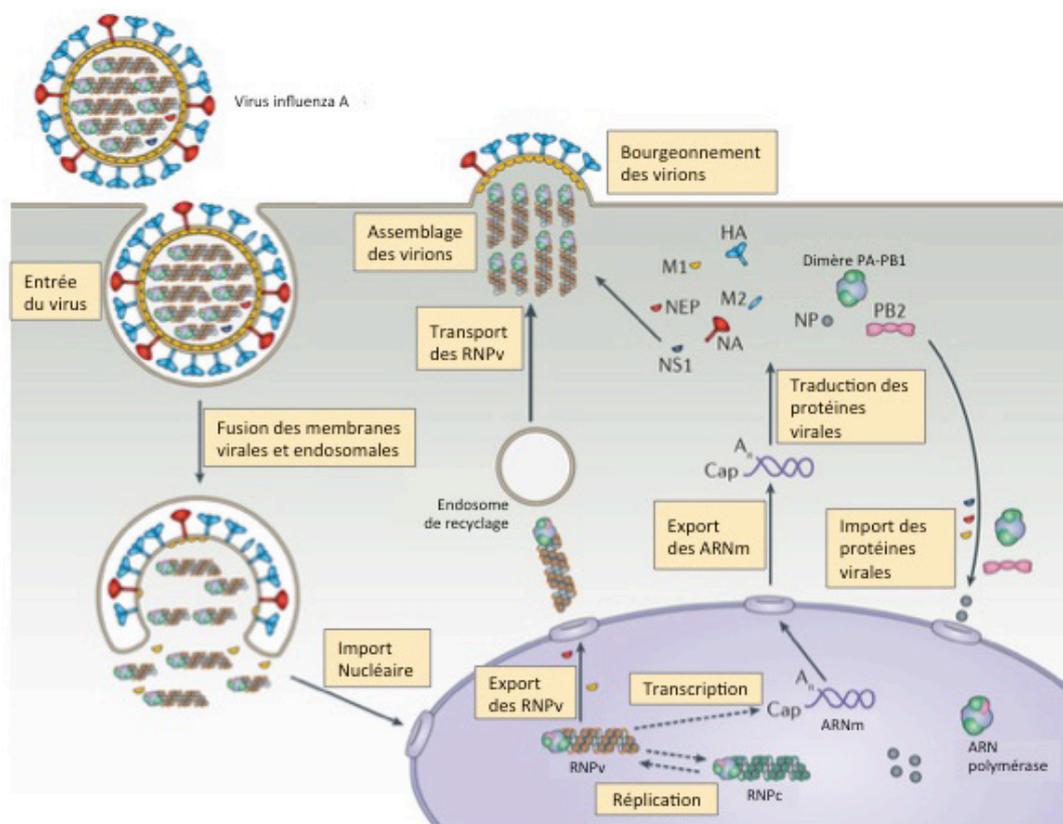


Figure 5 - Cycle viral des IAV.

Les différentes étapes du cycle viral des IAV. sont représentées de façon schématique. Elles comportent l'attachement des virions à leur récepteur et l'internalisation par la voie des endosomes, la libération des RNPv après fusion de l'enveloppe virale et de la membrane des endosomes, l'import des RNPv dans le noyau où ont lieu la transcription des mARN viraux et secondairement la réplication des segments viraux, l'export et la traduction des mARN ; les protéines du complexe polymérase (PB2, PB1, PA) sont importées dans le noyau pour servir à la formation des RNP et à la transcription/ réplication alors que les protéines de l'enveloppe virale (HA, NA, M2) transitent via le réticulum endoplasmique et le Golgi vers les sites d'assemblage des virions à la membrane plasmique ; les RNPv néoformées sont exportées du noyau et gagnent les sites d'assemblage des virions qui sont produits par bourgeonnement (Te Velthuis *et al.* 2016).

Lors de l'infection, le virus doit être capable d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (Garcia-Sastre 2011 ; Khapersky *et al.* 2015 ; Killip *et al.* 2015) tout en maintenant une interaction étroite avec certains cofacteurs cellulaires qui lui sont indispensables pour réaliser et mener à son terme le cycle viral. Le développement des études à l'échelle des génomes entiers, permises par les différentes technologies d'« Omiques », a permis d'approfondir la compréhension des interactions virus-hôte. De nombreux cofacteurs potentiels identifiés restent encore à caractériser. Cependant ces études ont déjà permis de mieux comprendre le cycle de multiplication des IAV (Watanabe *et al.* 2010). En effet, certaines voies cellulaires, telles que les voies de signalisation impliquant des kinases, celles de la maturation des pre-ARNm ainsi que le transport nucléocytoplasmique, semblent être fortement impliquées (Tripathi *et al.* 2015).

III.2. Ribonucléoprotéine virale

III.2.1. Structure, composition et fonctions des différents éléments des RNP_v

III.2.1.a) L'ARN_v

Les segments d'ARN_v génomiques de polarité négative présentent tous la même organisation avec deux régions non codantes (RNC) encadrant la région centrale qui code en orientation anti-sens pour au moins une protéine (Fields *et al.* 2013) (Fig.6.A). Les RNC, en 5' et 3' du segment, sont divisées en 2 parties : la partie distale, la plus éloignée de la région codante, et la partie proximale, accolée à la région codante de l'ARN_v. La partie distale, correspond aux 13 premiers et 12 derniers nucléotides du segment aux extrémités 5' (U13) et 3' (U12) respectivement. Ces séquences sont très conservées entre segments génomiques et entre les IAV. Les parties proximales des RNC sont de longueurs variables et leur séquence est spécifique de chaque segment d'ARN_v.

Les séquences U13 et U12 sont partiellement complémentaires et peuvent ainsi s'apparier. Cet appariement forme une structure partiellement double-brin qui permet la pseudo-circularisation de l'ARN_v, sa liaison à la polymérase virale et joue également le rôle de promoteur viral dans les processus de transcription et de réplication (Fodor 2013) (Fig.6.C). En 2014, une étude par la technique de FRET (transfert d'énergie par résonance de type Förster) en molécule unique a permis d'observer la structure formée par le promoteur viral, lié à la polymérase virale, et ainsi de valider le modèle envisagé jusqu'alors sur la base d'études fonctionnelles, d'un appariement en « demi tire-bouchon » mais cette structure ne serait vraisemblablement pas figée (Pflug *et al.* 2014 ; Tomescu *et al.* 2014).

Il est à noter que la sous unité PB1 présente une affinité plus forte pour l'extrémité 5' de l'ARN_v que pour son extrémité 3' (Gonzalez *et al.* 1999) et que le domaine C-terminal de la sous-unité PB2 s'associe également avec une grande affinité à l'extrémité 5' de l'ARN_v (Kuzuhara *et al.* 2009).

III.2.1.b) *Structure des RNPv*

Les ribonucléoprotéines représentent le cœur de la particule virale. Les différents segments génomiques sont encapsidés, chacun indépendamment des autres, avec des oligomères de nucléoprotéines NP et associés aux extrémités 5' et 3' à un complexe polymérase, constitué des 3 protéines virales PB2, PB1 et PA. Cet ensemble constitue la RNPv, l'unité minimale fonctionnelle de la transcription et de la réplication des ARN viraux (Pleschka *et al.* 1996).

La RNPv se présente sous la forme d'un filament simple brin flexible, replié sur lui-même, qui adopte ainsi une structure caractéristique avec une boucle terminale, une partie hélicoïdale antiparallèle en son centre, avec un sillon majeur et un sillon mineur (Fig.6.B). Le complexe polymérase viral permet de maintenir la structure close en se liant aux extrémités 5' et 3' de l'ARNv partiellement appariées (Klumpp *et al.* 1997 ; Resa-Infante *et al.* 2011). Cet ensemble mesure environ 13nm de diamètre et peut faire 30 à 110 nm de longueur, en fonction de la taille du segment (Compans *et al.* 1972). L'observation par microscopie cryo-électronique de RNPv purifiées, permet de visualiser un oligomère simple brin de NP associé à l'ARN structuré en double hélice, comptant 12 NP par tour (Martin-Benito *et al.* 2001 ; Coloma *et al.* 2009 ; Moeller *et al.* 2012). Il est également observé que 2 monomères de NP, non liés entre eux sont en contact avec la polymérase virale (Arranz *et al.* 2012 ; Zheng *et al.* 2013).

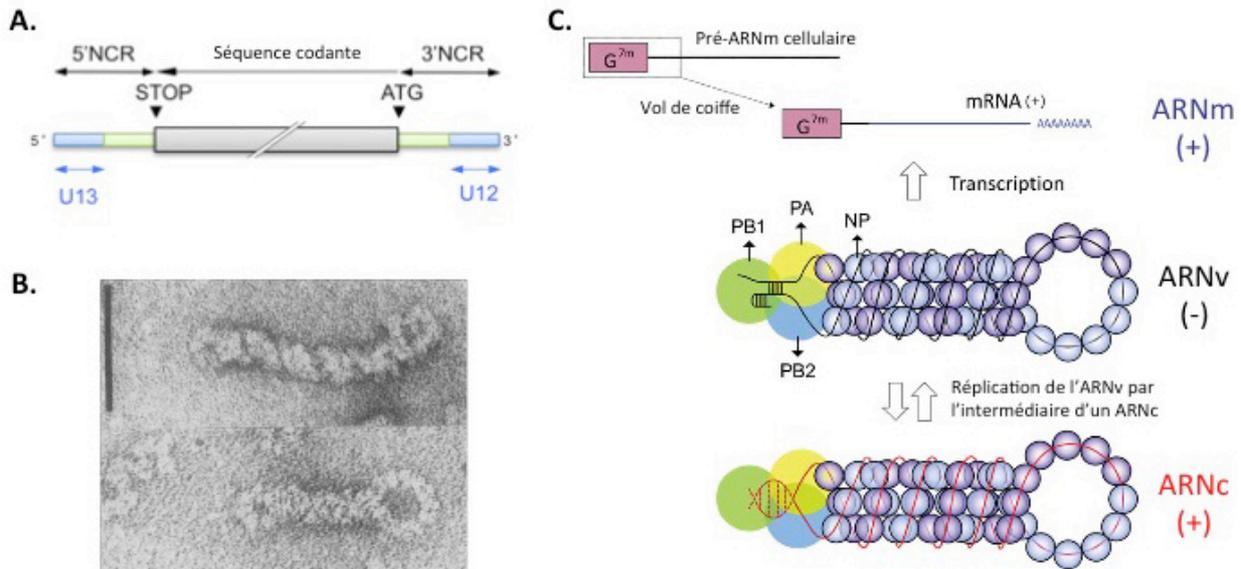


Figure 6 - Structure des ARNv, des RNPv et processus de transcription et répliation.

A) Représentation d'un ARNv linéaire. La séquence antisens codante, en gris, est encadrée par les séquences non-codantes. Celles-ci sont divisées en deux parties. La partie proximale, en vert, est spécifique du segment. La partie distale, en bleu, est commune à l'ensemble des segments et d'une longueur fixe de 12 et 13 nucléotides (U12, U13) en 3' et 5', respectivement. B) RNPv observée en microscopie électronique (Jennings *et al.* 1983) (barre d'échelle, 50nm). C) La transcription de l'ARNv en ARNm débute par une étape de vol de coiffe, au cours de laquelle la protéine PB2 (bleu) se lie à un pré-ARNm cellulaire coiffé. Les 10 à 15 premiers nucléotides sont ensuite clivés par la protéine du complexe polymérase PA (jaune), et seront utilisés comme amorce pour la synthèse des ARNm viraux. La terminaison et la polyadénylation ont lieu au niveau d'une répétition de cinq à sept résidus U proches de l'extrémité 5' de l'ARNv. La répliation de l'ARNv est un processus réalisé à partir d'un ARN intermédiaire complémentaire de la totalité de l'ARNv (ARNc), assemblé sous la forme d'une RNPc. Pour les processus de transcription et de répliation, l'élongation de l'ARN est réalisé par la sous-unité PB1 (vert). Le promoteur de l'ARNv est modélisé comme il est observé lorsqu'il est cristallisé associé à la polymérase, l'extrémité 5' formant une structure en crochet. Le promoteur de l'ARNc est représenté en pointillés, sa conformation n'ayant pas été déterminée. Adapté de (Stevaert *et al.* 2016).

III.2.1.c) La Nucléoprotéine

La nucléoprotéine NP est le composant majeur et majoritaire des RNPv et présente la particularité de s'oligomériser de manière spontanée (Ruigrok *et al.* 1995 ; Elton *et al.* 1999). Riche en arginine, la NP a une charge globale positive, en rapport avec sa fonction au sein de la RNPv qui est d'encapsider l'ARNv. La NP se lie à l'ARNv sans spécificité de séquence, avec une forte affinité (Yamanaka *et al.* 1990 ; Baudin *et al.* 1994) et un pas de 24 nucléotides par NP (Compans *et al.* 1972 ; Ortega *et al.* 2000 ; Martin-Benito *et al.* 2001 ; Resa-Infante *et al.* 2010). Dans la RNPv, l'ARNv est enroulé autour de la NP via son squelette de phosphates, laissant les bases exposées à l'extérieur, accessibles au complexe polymérase sans avoir besoin de déstructurer la RNPv lors des événements de transcription et de répliation (Baudin *et al.* 1994). La NP est donc nécessaire au maintien de la RNPv dans une forme fonctionnelle.

Les structures de la NP de deux sous-types viraux, H1N1 (Ye *et al.* 2006) et H5N1 (Ng *et al.* 2008), ont pu être déterminées. La structure de la protéine présente trois domaines distincts, formés par des séquences non-contiguës : la tête, le corps ainsi qu'une boucle terminale, considérée comme la queue de la NP. La tête et le corps forment un sillon chargé positivement, qui constitue le site de liaison à l'ARNv. La boucle terminale de la NP est, quant à elle, responsable de la formation des oligomères en s'insérant profondément dans le corps de la protéine NP voisine.

Actuellement, la structure d'un complexe RdRp-NP n'a pas encore été décrite. Cependant, plusieurs études permettent de penser que la NP interagit avec la polymérase virale, et plus particulièrement avec les sous-unités PB1 et PB2 (Biswas *et al.* 1998 ; Medcalf *et al.* 1999 ; Poole *et al.* 2004 ; Labadie *et al.* 2007 ; Marklund *et al.* 2012).

III.2.1.d) *Le complexe polymérase viral*

L'ARN polymérase ARN-dépendante des virus influenza est un complexe enzymatique hétéro-trimérique, composé de deux protéines basiques, PB1 et PB2, et d'une protéine acide, PA (Fig.7). Ces trois sous-unités sont chacune impliquées dans les processus de transcription et réplication du génome viral (Resa-Infante *et al.* 2011 ; Fodor 2013 ; Te Velthuis *et al.* 2016).

L'activité ARN polymérase ARN-dépendante est portée par la protéine PB1 qui intervient à la fois dans la transcription et la réplication du génome viral. La protéine PB1 présente, dans son domaine central, les motifs pré-A et A à E, très conservés au sein des RdRp virales (Poch *et al.* 1989 ; Biswas *et al.* 1994 ; te Velthuis 2014) (Fig.7.A). Le motif E est caractéristique des polymérases de virus à ARN segmenté de polarité négative (Ruigrok *et al.* 2010). Les sous-unités PB2 et PA sont, elles, impliquées dans l'initiation de la transcription des ARNm viraux. Le domaine central de PB2 présente une activité de liaison à la coiffe des précurseurs d'ARNm cellulaires (pré-ARNm) (Guilligay *et al.* 2008), tandis que le domaine N-terminal (NTD) de PA porte une activité endonucléase qui lui permet de cliver ces pré-ARNm au niveau de la coiffe liée par PB2 (Dias *et al.* 2009 ; Yuan *et al.* 2009). Actuellement, la fonction précise du domaine C-terminal (CTD) de la sous-unité PA reste encore en grande partie méconnue. Récemment, il a été décrit que PA interagit avec le CTD de l'ARN PolIII cellulaire (Lukarska *et al.* 2017). Le CTD de la protéine PB2 est lui impliqué dans les interactions avec les facteurs cellulaires de l'hôte. Il peut être subdivisé en deux sous-domaines, l'un centré autour du résidu 627, connu pour son rôle important dans la spécificité

d'hôte, et le second contenant un signal de localisation nucléaire (NLS) bipartite (Tarendeau *et al.* 2007 ; Tarendeau *et al.* 2008).

Les structures de nombreux sous-domaines de la RdRp ont déjà été déterminées de manières indépendantes, mais le manque d'une structure à haute résolution du complexe polymérase dans son ensemble, très compliquée à obtenir, a pendant longtemps gêné la compréhension de l'organisation de la polymérase dans sa globalité (Ruigrok *et al.* 2010). Ce n'est que récemment, en 2014, que la première structure tridimensionnelle à haute résolution du complexe polymérase viral a enfin été obtenue, par co-cristallisation d'un ARN synthétique mimant le promoteur ARNv avec les polymérases d'un IAV de chauve-souris et d'un virus influenza de type B (Pflug *et al.* 2014 ; Reich *et al.* 2014) (Fig.7). Les deux complexes présentent des structures similaires. L'ensemble des trois sous-unités forme une structure en U. En effet, du fait d'interactions étroites entre les sous-unités, il est observé une structure centrale compacte d'où émergent deux « bras », correspondant au domaine N-terminal de PA ainsi qu'au domaine de liaison à la coiffe des pré-ARNm de PB2. Au sein de ce cœur compact, un feuillet β flexible est exposé au milieu. Celui-ci fait partie de la sous-unité PB1 et porte son NLS, sous forme bipartite. La protéine PB1 présente, dans son domaine central, une structure caractéristique des polymérases à ARN (O'Reilly *et al.* 1998), organisée comme une main droite avec des domaines correspondant aux doigts, aux extrémités des doigts, à la paume et au pouce. Le domaine du pouce porte une boucle formée de feuillets β anti-parallèles, appelée boucle d'initiation et impliquée dans la réplication virale *de novo*, ne nécessitant pas d'amorce. Le CTD de la sous-unité PA et son domaine endonucléase sont positionnés sur des côtés opposés de PB1 et reliés entre eux par un domaine de liaison qui recouvre la face externe des domaines doigts et paume de PB1. La face externe opposée de PB1 est quant à elle recouverte par le NTD de PB2. Le CTD de PB2, comprenant le NLS, le domaine contenant le résidu 627, ainsi que le domaine de liaison à la coiffe, forment un arc sur le côté du cœur du complexe polymérase, correspondant à l'un des bras du U, le domaine de liaison à la coiffe de PB2 faisant face au domaine endonucléase de PA. La structure centrale de la polymérase possède deux tunnels reliant ses cavités internes à l'extérieur, bordés de résidus conservés. Le premier, bordé de résidus chargés positivement provenant de PB1, correspondrait au canal d'entrée des NTPs. Le second, qui correspondrait au canal d'entrée de la matrice, est bordé de résidus provenant des trois sous-unités.

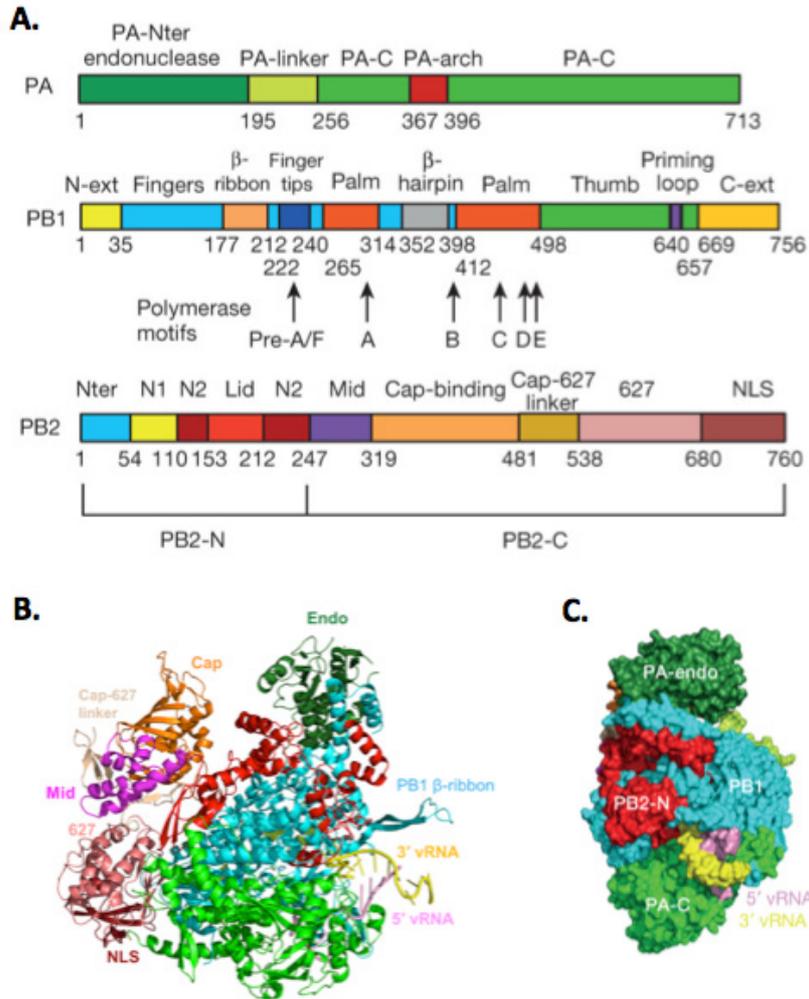


Figure 7 - Structure de la polymérase des IAV.

A) Structure des domaines au sein des sous-unités du complexe polymérase ; les noms des sous-domaines et la localisation des motifs polymérase fonctionnels conservés dans PB1 sont indiqués. PB1 interagit à la fois avec PA par son extrémité N-terminale et avec PB2 par son extrémité C-terminale. B) Représentation en ruban de la structure de la polymérase virale liée aux extrémités 5' (rose) et 3' (jaune) de l'ARNv, (Thierry *et al.* 2016) selon le code couleur des domaines indiqué en « A », à l'exception de PA-C, PB1 et PB2-N de couleur uniforme vert, cyan et rouge respectivement.. C) Vue de coté selon une représentation des espaces occupés montrant l'émergence du duplex d'ARNv à l'interface des trois sous-unités (Pflug *et al.* 2014).

Les structures de la polymérase d'un virus influenza de type C en absence d'ARN (Hengrung *et al.* 2015) et de celle d'un virus influenza de type B liée à l'extrémité 5' d'un ARNc (Thierry *et al.* 2016) ont récemment été obtenues. Ces nouvelles données permettent d'observer que l'agencement de la sous-unité PB1 est très conservé, contrairement à celui des protéines PA et PB2. Ainsi par exemple, il peut être noté qu'au sein du complexe polymérase de type B, la région de PB2 contenant le CTD ainsi que le domaine d'attachement à la coiffe, présente une rotation de 70° par rapport à la région correspondante de PB2 au sein du

complexe polymérase de type A. Ceci a pour conséquence de déplacer le domaine de PB2 contenant le résidu 627, face au domaine endonucléase de la sous-unité PA. Les différentes structures du complexe polymérase des virus influenza, récemment obtenues, permettent d'observer que différentes conformations de la polymérase sont possibles et de conclure que la flexibilité de la structure joue un rôle important dans la réalisation des processus de transcription et réplication. L'obtention de ces structures complètes à haute résolution a donc permis de faire de nombreux progrès dans la compréhension de l'agencement de la polymérase des virus influenza et permettra par la suite d'approfondir notre connaissance des mécanismes impliqués dans l'expression et la réplication du génome viral.

III.2.2. Transcription et réplication virale

Lors de l'infection de la cellule, après endocytose de la particule virale puis libération des RNPv dans le cytosol, celles-ci vont atteindre le noyau cellulaire, compartiment où ces unités fonctionnelles vont réaliser la transcription et la réplication du génome viral (Eisfeld *et al.* 2015 ; Te Velthuis *et al.* 2016) (Fig.6.C). Chaque segment d'ARNv sera utilisé à la fois pour la synthèse des ARNm viraux coiffés et polyadénylés, et pour la synthèse d'ARN viraux complémentaires (ARNc), antigénomiques. Les ARNc, éléments intermédiaires dans le processus de réplication des ARNv, sont encapsidés par des oligomères de NP et liés à un complexe polymérase, formant ainsi des RNP complémentaires (RNPC). Les RNPC sont utilisées comme matrice pour la synthèse de nouveaux ARNv génomiques, utilisés dans le noyau pour la synthèse d'ARNm ou incorporés dans de nouveaux virions, au niveau de la membrane plasmique.

III.2.2.a) *La transcription virale*

Le processus de transcription des IAV est un mécanisme dépendant de la présence d'une amorce d'ARN (Fig.6.C). L'amorce utilisée par la polymérase virale est dérivée par clivage de l'extrémité des pré-ARNm de la cellule hôte synthétisés par l'ARN polymérase ADN-dépendante II cellulaire (Pol II) et coiffés à leur extrémité 5' (Guilligay *et al.* 2008). Ce mécanisme de capture de coiffe permet la synthèse d'ARNm viraux coiffés par la polymérase virale (Fields *et al.* 2013).

La première étape de la transcription virale est l'interaction de la polymérase virale avec la Pol II cellulaire (Lukarska *et al.* 2017). Plus précisément, la RdRp interagit avec le domaine

C-terminal de la protéine RBP1, la plus grosse sous-unité de la Pol II (Engelhardt *et al.* 2005 ; Engelhardt *et al.* 2006 ; Martinez-Alonso *et al.* 2016). Ce domaine comporte un motif spécifique en acides aminés, YSPTSPS, répété 52 fois et très conservé au cours de l'évolution (Palancade *et al.* 2003). Les différents états de phosphorylation de ce domaine sont directement liés aux différents processus de maturation des pré-ARNm cellulaires (Phatnani *et al.* 2006 ; Topisirovic *et al.* 2011). Cette interaction entre la RdRp et Pol II, sous sa forme responsable de l'initiation de la transcription cellulaire phosphorylée sur les sérines 5 du CTD, permet d'accéder à la coiffe méthylée (7-méthylguanosine) des ARNm cellulaires en formation, alors reconnus et liés par la sous-unité PB2. La sous-unité PA, grâce à son activité endonucléase (Dias *et al.* 2009 ; Yuan *et al.* 2009), clive ensuite l'ARNm 10 à 13 nucléotides après son extrémité 5', avec une spécificité de séquence (Datta *et al.* 2013) (Fig.8.A). Il semble également que la capture de coiffe se fasse préférentiellement avec des ARN non codants (Gu *et al.* 2015 ; Koppstein *et al.* 2015). De manière concomitante, l'extrémité 3' de l'ARNv doit être déplacé de son domaine de liaison à la polymérase, proche de sa surface, vers le site actif de celle-ci via le canal d'entrée de matrice. Le court fragment d'ARNm coiffé obtenu est alors utilisé pour amorcer la transcription (Fig.8.B), catalysée par la sous-unité PB1 (Fields *et al.* 2013). Cette amorce reste liée à PB2 pendant l'addition des premiers nucléotides (Fig.8.C), jusqu'à ce que l'ARNm viral synthétisé émerge du canal d'export. Ce nouvel ARNm viral semble rester lié à la RdRp jusqu'à sa prise en charge par la machinerie cellulaire traitant les pré-ARNm (Bier *et al.* 2011).

L'élongation du brin d'ARNm se fait par déplacement du brin d'ARNv matrice dans le site actif de la polymérase, de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5'. L'extrémité 5' de ce brin matrice reste accroché à son site de liaison sur la polymérase tout au long de la transcription. Ainsi, la polymérase virale se retrouve bloquée par encombrement stérique, 16 nucléotides avant l'extrémité 5' de l'ARNv. Une répétition de 5 à 7 uridines se situe à ce niveau et est alors transcrite plusieurs fois par bégaiement de la polymérase (Fig.8.D). Ceci permet la génération d'une queue polyadénylée à la fin de l'ARNm viral (Poon *et al.* 1998 ; Fields *et al.* 2013 ; Fodor 2013 ; Te Velthuis *et al.* 2016). De ce fait, bien qu'ils ne soient pas synthétisés selon les mêmes mécanismes, les ARNm viraux obtenus présentent une structure similaire à celle des ARNm cellulaire. Cela leur permet ainsi d'être pris en charge par la machinerie cellulaire pour leur épissage éventuel, leur export hors du noyau, et leur traduction en protéines virales.

En effet, les ARNm issus de la transcription des segments génomiques codant pour PB2, M1 et NS1 peuvent être épissés pour produire plusieurs protéines virales (Will *et al.* 2011 ; Muller-McNicoll *et al.* 2013 ; Dubois *et al.* 2014 ; Lee *et al.* 2015 ; Yamayoshi *et al.* 2015). L'ARNm pour la protéine M2, issu de l'épissage de l'ARNm codant pour la protéine M1, ainsi que l'ARNm pour NEP, obtenu à partir de l'ARNm de NS1, sont les deux ARNm épissés majoritairement exprimés lors de l'infection. Cependant, selon les souches virales d'autres ARNm peuvent être obtenus par épissage, tels que PB2-S1 à partir de l'ARNm PB2, M3 et M42, à partir de celui codant pour M1, ainsi que NS3 et NS4 obtenus par épissage de l'ARNm NS1 (Dubois *et al.* 2014 ; Yamayoshi *et al.* 2015). Cette production d'ARNm viraux épissés est très régulée, à la fois par des signaux viraux ainsi que par des co-facteurs cellulaires, ce qui se traduit par une expression des ARNm non épissés majoritaire et une expression des ARNm épissés minoritaire (Dubois *et al.* 2014). L'épissage de l'ARNm codant pour M1 est modulé par la protéine virale NS1 (Robb *et al.* 2012), tandis que la régulation de l'épissage de l'ARNm de NS1 par NS1 elle-même ne semble pas clairement établie (Garaigorta *et al.* 2007 ; Robb *et al.* 2010).

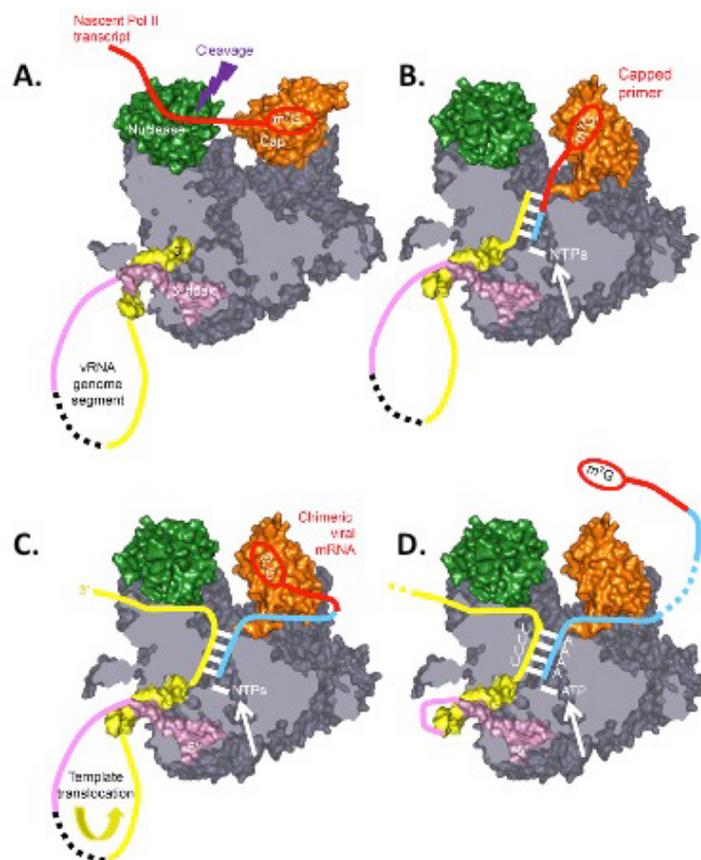


Figure 8 - Modélisation du processus de transcription coiffe-dépendant.

A) Les extrémités 5' (rose) et 3' (jaune) de l'ARNv matricier sont liées par les domaines de fixation portés par la sous-unité catalytique PB1. Le domaine de liaison à la coiffe de PB2 (orange) se lie au méthyl-7-guanosine du pré-ARNm cellulaire en formation (rouge), ce qui permet son clivage par le domaine endonucléase de la protéine PA (vert). B) L'oligomère de 10 à 15 nucléotides coiffé obtenu permet d'initier la synthèse de l'ARNm viral (jaune) servant de matricier (jaune) par PB1 (gris) qui porte l'activité ARN polymérase ARN-dépendante. C) L'ARNm viral coiffé reste lié à la protéine PB2 lors de l'étape d'élongation. D) La protéine PB1 réalise la polyadénylation de l'ARNm par bégaïement au niveau d'une répétition de résidu U située à 16 nucléotides de l'extrémité 5' de l'ARNv matricier qui reste fixée à PB1 pendant tout le processus (Pflug *et al.* 2017).

III.2.2.b) La réplication virale

Bien qu'elle soit réalisée par les mêmes protéines virales, la réplication du génome viral est un mécanisme bien différent de la transcription virale. L'initiation de ce processus se fait de manière indépendante d'une amorce, appelée initiation *de novo* et la synthèse de l'ARN n'est pas terminée précocement par la formation d'une queue polyadénylée. Contrairement à l'ARNm, les ARN formés au cours de la réplication virale, ARNc et ARNv, ne sont ni coiffés, ni polyadénylés mais sont encapsidés par des protéines NP et liés chacun à un complexe polymérase pour former une RNPc ou RNPv, selon l'ARN encapsidé (Fodor 2013 ; Te Velthuis *et al.* 2016).

L'initiation de la synthèse de l'ARNc et de l'ARNv suivent deux modèles différents (Fodor 2013 ; Te Velthuis *et al.* 2016). La synthèse de l'ARNc antigénomique, élément intermédiaire dans le processus de réplication du génome viral, est initiée à partir des deux premiers nucléotides de l'extrémité 3' de l'ARNv, à l'aide de la boucle d'amorçage portée par PB1 dans le site actif de la polymérase dont la structure est comparable à celle de la polymérase du bactériophage phi-6. Cette boucle sert de plateforme pour stabiliser le premier nucléotide de l'ARNc (Butcher *et al.* 2001 ; Te Velthuis *et al.* 2016). L'initiation de la synthèse de l'ARNv est médiée par la synthèse d'un dinucléotide, pppApG, dirigée par les positions 4 et 5 de l'extrémité 3' de l'ARNc. Ce dinucléotide est ensuite réaligné sur les résidus 1 et 2 terminaux de l'extrémité 3' de l'ARNc afin de débiter l'élongation du nouvel ARNv (Deng *et al.* 2006).

III.2.2.c) *Balance entre la transcription et la réplication virale*

Les processus de transcription et réplication virales sont de mieux en mieux compris. Cependant, le mécanisme permettant d'alterner entre la synthèse d'un ARNm et la synthèse d'un ARNc est, quant à lui, encore mal défini. Il a été démontré que la protéine virale NP permet de stabiliser les ARNc grâce à son activité de liaison à l'ARN (Vreede *et al.* 2011), et qu'elle joue également un rôle de facteur d'élongation pour l'ARN polymérase virale (Turrell *et al.* 2013). Il a été observé que la protéine virale NEP stimule la synthèse d'ARNc d'une part, et réprime la transcription virale d'autre part (Robb *et al.* 2009 ; Paterson *et al.* 2012).

Des études par trans-complémentation (Jorba *et al.* 2009) ainsi que par caractérisation de RNPC isolées (York *et al.* 2013), ont récemment permis de développer deux modèles. Ceux-ci s'appuient tous deux sur le rôle central qu'occupent les polymérases virales non incorporées dans les RNPv, appelées polymérases non-résidentes. Le modèle soutenu par Jorba et ses collaborateurs, propose qu'une polymérase non-résidente interagisse en *trans* avec la RNPC afin de synthétiser l'ARNv (Jorba *et al.* 2009), ce qui serait en accord avec les structures de RNP ramifiées observées en cryo-microscopie électronique (Moeller *et al.* 2012). Ce modèle est à opposer à celui proposé par York et ses collaborateurs, qui ont observé que la synthèse d'ARNv peut être stimulée en *trans* par une RdRp mutante rendue déficiente pour la synthèse d'ARN (York *et al.* 2013). La polymérase virale non-résidente favorise alors la synthèse d'ARNv par induction ou stabilisation d'une conformation spécifique de la polymérase résidente dans la RNPC, ce qui est appuyé par l'oligomérisation du complexe polymérase (Jorba *et al.* 2008 ; Jorba *et al.* 2009 ; Chang *et al.* 2015). De plus, une polymérase non-

résidente est nécessairement recrutée pour être associée aux nouveaux ARNc et ARNv formés au cours de la réplication. Il a également été envisagé que les petits ARN viraux accumulés dans le noyau de la cellule au cours de l'infection, qui correspondent à l'extrémité 5' d'ARNv avortés, jouent le rôle d'amorces pour les polymérases virales nouvellement assemblées pour initier la réplication virale par modulation allostérique de l'activité polymérase (Perez *et al.* 2010 ; Perez *et al.* 2012).

Parallèlement à ces interactions entre différents facteurs viraux, de nombreux facteurs cellulaires interviennent dans la régulation de la synthèse des ARN viraux.

III.2.2.d) *Facteurs cellulaires impliqués dans la transcription et la réplication virale*

Dans le compartiment nucléaire des cellules infectées, les RNPv sont retrouvées dans la matrice nucléaire insoluble, lieu où est réalisée la transcription cellulaire (Jackson *et al.* 1982 ; Lopez-Turiso *et al.* 1990 ; Mortillaro *et al.* 1996 ; Takizawa *et al.* 2006). Le recrutement des RNPv à ce niveau se fait par l'intermédiaire d'interactions entre les RNPv et les histones (Garcia-Robles *et al.* 2005), et d'autres facteurs cellulaires associés à la chromatine et son architecture (Mayer *et al.* 2007 ; Alfonso *et al.* 2011 ; Chase *et al.* 2011 ; Moisy *et al.* 2012 ; Marcos-Villar *et al.* 2016). En effet, la forte réduction de l'activité de la polymérase virale à la suite de la déplétion de certains de ces facteurs, tels que HMGB1, CHD6 ou bien Ku70/86, souligne bien leur importance vis-à-vis de l'efficacité de fonctionnement de la RdRp (Alfonso *et al.* 2011 ; Bortz *et al.* 2011 ; Moisy *et al.* 2012). La protéine nucléolaire RRP1B, relocalisée lors de l'infection dans le nucléoplasme, est également un facteur cellulaire important dont dépend la polymérase virale car elle intervient dans la liaison de la polymérase aux pré-ARNm cellulaires coiffées (Su *et al.* 2015).

La machinerie cellulaire d'épissage des ARNm est un élément indispensable dans le processus de transcription cellulaire mais dont dépend également le cycle viral. Effectivement, plusieurs cribles à haut-débit sur génome cellulaire complet ont permis d'identifier 47 gènes humains liés à l'épissage des pré-ARNm et potentiellement importants pour la transcription virale, huit de ces gènes ont été retrouvés dans plus d'un crible (Dubois *et al.* 2014). Certains facteurs cellulaires ont, de plus, été décrits comme spécifiques de l'épissage des ARNm de M1 (Shih *et al.* 1996 ; Tsai *et al.* 2013) ou bien de NS1 (Fournier *et al.* 2014). De même, certains facteurs cellulaires liés à la machinerie d'épissage, tels que NXP2/MORC3 et SPFQ/PSF, sont décrits comme des facteurs essentiels à la transcription, en

favorisant la production d'ARNm viraux ou leur polyadénylation, sans pour autant être impliqués dans la réplication du virus (Landeras-Bueno *et al.* 2011 ; Ver *et al.* 2015).

Des facteurs cellulaires avec une activité de protéine chaperonne ont également été décrits comme régulateurs positifs de la réplication. Le complexe hélicase MCM, impliqué dans la réplication de l'ADN, favorise *in vitro* l'élongation du brin d'ARNc (Kawaguchi *et al.* 2007). La protéine d'épissage TAT-SF1 ainsi que l'hélicase DDX39B/UAP56 favorisent l'association de l'ARN aux protéines virales NP (Momose *et al.* 2001 ; Naito *et al.* 2007 ; Kawaguchi *et al.* 2011). Une autre hélicase, la RHA, a elle été décrite comme stimulant la réplication ainsi que la transcription *in vitro* (Lin *et al.* 2012). La phosphatase PP6 interagit directement avec les protéines PB1 et PB2 du complexe polymérase et est décrite comme régulant de manière positive l'activité de la polymérase lors de la réplication, sans influencer sur la transcription primaire (York *et al.* 2014).

D'autres facteurs cellulaires, impliqués dans la réponse antivirale de l'hôte inhibent l'activité de la polymérase virale. En effet, les protéines Ebp1, NF90 et DDX21 par exemple, inhibent la transcription/réplication des IAV en se liant à la NP ou à la polymérase (Honda *et al.* 2007 ; Wang *et al.* 2009 ; Chen *et al.* 2014). Cependant, il a été observé que l'activité antivirale de la protéine DDX21 est contrée par la protéine virale NS1 (Chen *et al.* 2014).

Il est intéressant de noter que certains facteurs cellulaires, selon leur interaction avec la polymérase virale, peuvent être impliqués dans la restriction d'hôte. La protéine cellulaire ANP32A notamment est un facteur nécessaire au cycle viral, qui interagit avec la polymérase virale (Bradel-Tretheway *et al.* 2011 ; York *et al.* 2014) et favorise la synthèse des ARNv à partir des ARNc (Watanabe *et al.* 2014 ; Sugiyama *et al.* 2015). Cependant, ANP32A a également été décrite comme facteur de spécificité d'espèce faisant intervenir le résidu 627 de la sous-unité virale PB2 (Manz *et al.* 2012). En effet, un virus aviaire infectant une cellule de mammifère présente une activité diminuée comparativement à son activité en cellule aviaire (Long *et al.* 2016), mais si la cellule de mammifère exprime la protéine ANP32A d'origine aviaire ou bien si la protéine mammifère est modifiée, par insertion d'une séquence de 33 acides aminés, pour correspondre à la protéine aviaire, alors la polymérase virale aviaire présente une activité similaire à celle observée en cellule aviaire. Ainsi, ANP32A est considéré comme un facteur de spécificité d'hôte, selon un mécanisme encore mal compris. L'hélicase DDX17 est également un exemple pouvant illustrer l'implication de certains facteurs cellulaires dans la spécificité d'espèce hôte (Bortz *et al.* 2011), au même titre que les importines- α (Resa-Infante *et al.* 2008 ; Gabriel *et al.* 2014).

III.2.3. Déterminisme du spectre d'hôte

III.2.3.a) *Lignages viraux et spécificité d'hôte*

Les virus influenza de type A peuvent infecter un large spectre d'hôte, ce qui implique qu'ils doivent faire face à de nombreuses physiologies différentes et qu'ils sont donc soumis à différentes pressions de sélections selon les espèces. Ces différences de pressions de sélection se traduisent par un regroupement phylogénétique des souches virales dépendant de l'espèce infectée (Smith *et al.* 2009 ; Smith *et al.* 2009). Les séquences génomiques d'IAV d'origine aviaire présentent, par exemple, un taux en GC supérieur à celui des souches virales infectant l'homme (Greenbaum *et al.* 2008). Cette spécificité de lignages en fonction des espèces hôtes n'est cependant pas synonyme d'un arrêt de l'évolution de ces virus qui serait lié à un état d'adaptation optimale à l'espèce, pour lequel tous les résidus du génome seraient alors fixés. En effet, il a été montré que les virus issus du réservoir aviaire, sauvage ou domestique, présentent une dynamique évolutive similaire aux virus saisonniers humains, avec un taux de mutations de 1,8 à $8,4 \cdot 10^{-3}$ substitutions/site/an selon les segments (Chen *et al.* 2006). Cette dynamique intrinsèque de mutations permet ainsi aux IAV de maintenir un état d'adaptation optimal à un hôte donné tout en restant capable de s'adapter rapidement à un nouvel environnement. Le passage régulier des oiseaux aquatiques à d'autres espèces d'oiseaux au cours du cycle de leur évolution en est un exemple. Les segments génomiques viraux codant pour les glycoprotéines de surfaces, HA et NA, ainsi que pour la protéine NS1 présentent toutefois un taux de substitutions non synonymes / substitutions synonymes (d_N/d_S) supérieurs à ceux codant pour les protéines composant les RNPv (Chen *et al.* 2006 ; Rambaut *et al.* 2008). Au sein de la RNPv, il a été démontré que la séquence codante pour la protéine NP présente une dynamique évolutive plus rapide que celles des protéines du complexe polymérase (Bhatt *et al.* 2011). Ces différences de dynamiques d'évolution peuvent être expliquées par le fait que les protéines de surfaces et NS1 sont soumises à des pressions de sélection très fortes de la part du système immunitaire de l'hôte comparativement aux RNPv, moins exposées mais également soumises à des contraintes structurales et fonctionnelles fortes. Ainsi, une mutation au sein d'une sous-unité de la polymérase virale peut être compensée par une seconde mutation dans le complexe (Mandler *et al.* 1991 ; Treanor *et al.* 1994 ; Octaviani *et al.* 2011), ce qui permet de penser que les sous-unités des RNPv co-évoluent. Lors d'évènements de réassortiments, la potentialité d'obtenir une souche virale viable est donc dépendante de la compatibilité des sous-unités pour s'assembler (Li *et al.* 2008 ; Rameix-Welti *et al.* 2009) et former des RNPv fonctionnelles (Octaviani *et al.* 2011 ;

Song *et al.* 2011), capables de stabiliser et replier les ARNv efficacement (Brower-Sinning *et al.* 2009) et compatibles lors de l’emballage (Noda *et al.* 2012 ; Gerber *et al.* 2014 ; McDonald *et al.* 2016).

L’émergence d’un virus d’origine animale et son établissement au sein de la population humaine sont médiés par des mécanismes complexes, encore mal connus. Plusieurs modèles ont été définis pour les expliquer. L’apparition de nouvelles mutations qui induiraient une diminution de la fidélité de la polymérase virale et ainsi la production d’un plus grand nombre de variants a été proposée comme explication au franchissement de la barrière d’espèce (Scholtissek *et al.* 1993). Celle-ci a été réfutée dans le cas de l’introduction chez le porc en 1979 d’un virus aviaire (Stech *et al.* 1999). Il est également envisagé que la souche virale soit préalablement adapté à l’homme (dos Reis *et al.* 2011). En effet, le génome du virus précurseur de la souche responsable de la pandémie de 2009 paraît être mieux adapté à l’humain que le génome d’autres virus aviaires. Cependant, le génome du précurseur du virus responsable de la pandémie de 1918 ne semble pas présenter de pré-adaptation spécifique, excepté pour les segments NA et NS1. Pour conclure, les mécanismes permettant l’émergence d’un virus au sein d’une nouvelle espèce semblent être multiples et liés à un ensemble d’interactions entre les propriétés du virus, de l’environnement et de l’hôte (Engering *et al.* 2013 ; Rahnama *et al.* 2013 ; Geoghegan *et al.* 2016 ; Stephens *et al.* 2016).

III.2.3.b) *Signature génétique et spécificité d’hôte*

Plusieurs études ont tenté d’identifier des signatures génétiques hôte-dépendantes au sein des génomes viraux qui permettraient d’identifier les acides aminés caractéristiques de l’origine, aviaire ou humaine, d’une souche virale. Que ce soit en se basant sur le changement de distribution de ces résidus dans le génome (Chen *et al.* 2006 ; Finkelstein *et al.* 2007 ; Miotto *et al.* 2008 ; Miotto *et al.* 2010), ou bien sur des changements de pressions de sélection (Tamuri *et al.* 2009), les différentes méthodologies mises en œuvre ont permis de conclure que les RNPv regroupent un grand nombre de ces signatures. De plus, celles-ci semblent être principalement portées par les protéines NP ainsi que PB2, et le domaine 627 particulièrement (Tamuri *et al.* 2009 ; Miotto *et al.* 2010).

Ces signatures ne doivent, cependant, pas être envisagées de manière isolée mais, au contraire, intégrées dans un ensemble composé des différents segments du génome. L’effet d’une mutation pouvant être modulé par l’ensemble du contexte génétique viral, les signatures génétiques doivent alors être considérées comme des combinaisons d’acides aminés

(Obenauer *et al.* 2006 ; Allen *et al.* 2009). Selon ce principe, il a pu être mis en évidence l'implication de la protéine virale NS1 dans la restriction du spectre d'hôte (Noronha *et al.* 2012).

Actuellement, l'évolution génétique des IAV peut être étudiée grâce aux technologies de séquençage à haut-débit (Iqbal *et al.* 2009 ; Hoelzer *et al.* 2010 ; Van Borm *et al.* 2010 ; Van den Hoecke *et al.* 2015). Ceci a permis, par exemple, d'évaluer la dynamique de développement de signatures génétiques sur la glycoprotéine HA d'un IAV, à l'échelle des populations virales, lors de la transmission du cheval au chien (Murcia *et al.* 2010).

III.2.3.c) *Multigénicité de la spécificité d'hôte*

Le développement de systèmes de génétique inverse (Fodor *et al.* 1999 ; Naffakh *et al.* 2006) a permis de faire le lien entre les diverses signatures génétiques dépendantes de l'hôte identifiées et leur réel impact du point de vue fonctionnel, c'est-à-dire en contexte infectieux chez l'hôte, qu'il soit aviaire ou bien mammifère. Il est ainsi plus facile d'évaluer l'importance d'acides aminés spécifiques, ou de différents segments génomiques, vis-à-vis du spectre d'hôte. En effet, ce système permet de produire divers virus mutants, réassortants, chimériques humain-aviaire et ainsi d'évaluer leur capacité à se répliquer, *in vitro* aussi bien qu'*in vivo*, et à se transmettre d'un hôte à l'autre. *In vivo*, le passage successif d'un hôte à un autre permet également d'adapter expérimentalement une souche virale à ce nouvel hôte. Cependant, les nombreuses mutations observées lors de diverses études de ce type ne se recoupent que très peu (Brown 1990 ; Brown *et al.* 2001 ; Gabriel *et al.* 2005 ; Shinya *et al.* 2007 ; Naffakh *et al.* 2008 ; Li *et al.* 2009 ; Rolling *et al.* 2009 ; Song *et al.* 2009 ; Wu *et al.* 2009 ; Ilyushina *et al.* 2010 ; Ping *et al.* 2010 ; Ping *et al.* 2011 ; Sakabe *et al.* 2011 ; Zhang *et al.* 2011 ; Zhou *et al.* 2011 ; Herfst *et al.* 2012 ; Seyer *et al.* 2012 ; Wang *et al.* 2012 ; Zhu *et al.* 2012 ; Mok *et al.* 2014 ; Li *et al.* 2015 ; Yu *et al.* 2015 ; Wu *et al.* 2016 ; Choi *et al.* 2017) (pour revue, voir (Belser *et al.* 2009 ; Kamal *et al.* 2014)). Ceci souligne que l'adaptation à un nouvel hôte est un processus multigénique. Ce processus repose sur des signatures génétiques complexes et multifactorielles, dépendantes du contexte génétique de la souche virale mais également de l'hôte.

Certaines régions du génome semblent néanmoins être particulièrement impliquées et soumises à une fréquence de mutations élevée. Ces régions concernent notamment les glycoprotéines virales de surface, capables de s'associer préférentiellement aux acides sialiques liés en α 2-3 au galactose sous-jacent (AS α 2-3Gal) et majoritaires sur les cellules

épithéliales du tractus intestinal des espèces aviaires, ou aux A α 2-6Gal, majoritaires dans le tractus respiratoire humain. Certains domaines portés par les sous-unités du complexe polymérase sont également concernés. Le domaine endonucléase de la protéine PA ainsi que les domaines NLS et 627 de PB2 apparaissent comme des éléments majeurs (Gabriel *et al.* 2014 ; Neumann *et al.* 2015 ; Rodriguez-Frandsen *et al.* 2015).

III.2.3.d) RNPv et spécificité d'hôte

La signature génétique hôte-dépendante la plus connue correspond au résidu 627 de la protéine virale PB2. Décrite expérimentalement depuis 1993 (Subbarao *et al.* 1993), l'importance de cette position et du phénotype qu'elle induit est remarquable. Cependant, cette signature n'est pas unique. En effet, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence d'autres positions d'importance plus ou moins avérée. La sous-unité PB2 semble avoir un rôle primordial dans le cadre de l'adaptation à l'hôte, avec notamment les positions 271, le polymorphisme des positions 590 et 591, appelé polymorphisme SR, ainsi que la position 701. Toutefois, PB2 fait partie d'un complexe. Il s'est avéré, au fil des différentes études, que chaque sous-unité de la RNPv est impliquée dans la restriction d'hôte : PB2, PA, NP ainsi que PB1, longtemps envisagée comme extérieure à ce processus. Les nombreuses signatures ainsi observées peuvent avoir plusieurs fonctions et avoir un impact sur l'activité de la polymérase, la multiplication virale, la virulence ou bien la transmission par aérosols (Cauldwell *et al.* 2014 ; Gabriel *et al.* 2014 ; Schrauwen *et al.* 2014 ; Neumann *et al.* 2015 ; Rodriguez-Frandsen *et al.* 2015). De plus, dans le cadre de la surveillance des virus H5N1 hautement pathogènes, l'Organisation Mondiale de la Santé tient également un inventaire, segment par segment, des modifications génétiques décrites comme liées à l'adaptation aux mammifères ou bien à la résistance aux antiviraux (WHO 2017).

Il est important de noter que les mutations observées varient selon le virus étudié. Elles ne sont pas systématiquement majoritaires, ni même présentes obligatoirement, comme cela a été le cas lors de la pandémie de 2009, la souche H1N1p étant porteuse du résidu PB2-E627 et non K627, auparavant envisagé comme nécessaire à l'émergence d'un IAV chez l'homme. Ceci met en lumière que l'adaptation d'un IAV à l'homme n'est pas un processus unique et déterminé, mais plutôt que plusieurs protéines et de nombreux acides aminés sont impliqués et que ces constellations de signatures varient selon le contexte génétique viral étudié.

III.2.4. RNPv et adaptation à un hôte

III.2.4.a) *Activité de la polymérase virale*

Les nombreuses études de l'adaptation virale ont mis en évidence une corrélation entre ce phénomène et l'augmentation de l'activité de la polymérase, de la réplication et de la pathogénicité (Manz *et al.* 2013 ; Gabriel *et al.* 2014 ; Rodriguez-Frandsen *et al.* 2015). Il a été observé que les virus aviaires ont une activité polymérase plus faible que celle de virus humains en cellule de mammifères. Parmi les signatures d'adaptations décrites, la mutation E627K dans le segment PB2 aviaire entraîne notamment une forte augmentation de l'activité de la polymérase en cellules de mammifères *in vitro*, sans pour autant modifier son activité en cellules aviaires. Cette activité augmentée de la polymérase permet alors d'accroître la réplication virale, la production de nouveaux virus, et ainsi de mieux échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (Grimm *et al.* 2007). De plus, l'augmentation de la production de nouveaux virions permet de couvrir un plus large spectre en terme de diversité génétique. Parmi ces variants, les virus porteurs de mutations conférant une meilleure adaptation à l'environnement rencontré sont notamment sélectionnés (Memoli *et al.* 2009 ; Thangavel *et al.* 2011 ; Wong *et al.* 2011 ; Sanjuan *et al.* 2016).

La température corporelle de l'hôte infecté est également un facteur important à considérer dans le cadre de l'adaptation virale. En effet, les virus aviaires se multiplient dans le tractus intestinal des oiseaux, à une température d'environ 39°C, tandis que la réplication virale se situe au niveau du tractus respiratoire supérieur chez les humains, à environ 33°C. L'activité de la polymérase virale aviaire est dépendante de ce facteur (Cauldwell *et al.* 2014 ; Gabriel *et al.* 2014) et est fortement diminuée à 33°C (Massin *et al.* 2001 ; Aggarwal *et al.* 2010). Il a été observé que les mutations d'adaptation dans la protéine PB2 E627K ainsi que D701N permettent de lever cette restriction d'hôte et contribuent à la propagation du virus dans l'arbre respiratoire supérieur humain (Gabriel *et al.* 2005 ; Hatta *et al.* 2007 ; Le *et al.* 2009 ; Zhou *et al.* 2013). En plus de PB2, d'autres facteurs des RNPv (Cauldwell *et al.* 2014 ; Gabriel *et al.* 2014), tels que PA (Kashiwagi *et al.* 2010) ou le site de liaison de la polymérase au promoteur viral (Dalton *et al.* 2006), semblent également impliqués dans la sensibilité des IAV aviaires face à un abaissement de température.

Pour conclure, toutes ces observations mettent en lumière que durant le processus d'adaptation virale, les IAV aviaires peuvent acquérir différentes mutations qui permettront finalement à tous de se répliquer de manière effective dans les cellules de mammifères.

III.2.4.b) *Adaptation aux composants de la cellule hôte*

De par leur nature de parasites cellulaires obligatoires, les IAV se doivent d'être adaptés à l'hôte infecté. Ainsi, au cours de l'adaptation à un nouvel hôte, ce sont les mutations permettant d'établir des interactions optimales entre les éléments de la particule virale et le nouvel environnement cellulaire, à chaque étape du cycle viral, qui seront principalement sélectionnées (Watanabe *et al.* 2010 ; Manz *et al.* 2013 ; Resa-Infante *et al.* 2013 ; Watanabe *et al.* 2014 ; Short *et al.* 2015 ; To *et al.* 2015). Ceci s'applique notamment aux RNPv étant donné leurs nombreuses interactions, avec différents éléments cellulaires, au cours du cycle viral.

Au niveau de la structure de la polymérase virale, l'étude de la sous-unité PB2 et notamment du résidu 627 a permis de déterminer que cet acide aminé est situé à la surface du CTD de PB2. Cette disposition lui permet d'être exposé au solvant et ainsi d'interagir avec les composants de son environnement, viraux ou cellulaires (Tarendeau *et al.* 2008). La signature génétique, glutamate ou lysine, ne modifie pas la structure du domaine mais influe sur sa charge locale, ce qui pourrait avoir pour conséquence de modifier les interactions de PB2 avec ses partenaires cellulaires. Cet aspect de charge locale semble être un élément significatif. En effet le polymorphisme SR des résidus 590 et 591, proches de la position 627 (Yamada *et al.* 2010), permet de restaurer partiellement la charge positive du domaine et de compenser ainsi l'absence d'une lysine en position 627 de la protéine PB2, du virus H1N1p notamment (Mehle *et al.* 2009). La signature PB2-E627K semble également importante pour maintenir l'interaction entre PB2 et NP en cellules de mammifères (Labadie *et al.* 2007 ; Mehle *et al.* 2008 ; Rameix-Welti *et al.* 2009 ; Bogs *et al.* 2011 ; Ng *et al.* 2012 ; Manz *et al.* 2013), par l'intermédiaire d'un facteur cellulaire dépendant de la nature de l'acide aminé présent (Mehle *et al.* 2008 ; Moncorge *et al.* 2010 ; Cauldwell *et al.* 2014).

La protéine virale PB2 s'avère être impliquée dans plusieurs processus du cycle viral, notamment via le résidu 627. Par exemple, il a été observé que la mutation PB2-E627K améliore la diffusion de la RdRp dans le noyau des cellules humaines (Foeglein *et al.* 2011). Des cribles ont permis d'identifier différentes protéines humaines présentant plusieurs fonctions, telles que des hélicases, des protéines chaperonnes, des protéines de transport ou bien des protéines responsables de la maturation des ARN cellulaires, et interagissant avec les RNPv. Une modification de leur expression entraîne des conséquences différentes vis-à-vis de l'activité de la polymérase virale et dépendantes du résidu présent en position 627 (Shapira *et al.* 2009 ; Bortz *et al.* 2011).

Les importines cellulaires jouent également un rôle important dans la restriction d'hôte (Gabriel *et al.* 2008 ; Resa-Infante *et al.* 2008 ; Gabriel *et al.* 2014). Il a notamment été observé que les mutations d'adaptation PB2-D701N et NP-N319K permettent d'améliorer les interactions de ces protéines virales, PB2 et NP, avec l'importine $\alpha 1$ humaine, sans affecter l'interaction avec l'importine $\alpha 1$ aviaire (Gabriel *et al.* 2005 ; Gabriel *et al.* 2008). Elles entraînent également une augmentation de l'activité de la polymérase (Gabriel *et al.* 2007) ainsi que de la virulence du virus *in vivo* (Gabriel *et al.* 2005). L'efficacité de multiplication des virus aviaires dépend des importines d'isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 3$, comparativement aux virus adaptés aux mammifères, porteurs de la signature génétique PB2-K627, dont la multiplication virale est dépendante du niveau d'expression des importines humaines $\alpha 1$ et $\alpha 7$ (Gabriel *et al.* 2011). Pour les virus H1N1p, la multiplication virale dépend des trois isoformes et n'est pas affectée par le niveau d'expression des importines $\alpha 1$ et $\alpha 7$ (Hudjetz *et al.* 2012). Cette différence peut être expliquée par une modification de l'affinité de la position PB2-627 pour ces importines, plus forte dans un contexte PB2-K627. Les signatures d'adaptation majeures PB2-E627K et PB2-D701N sont ainsi impliquées dans des processus séparés. Cependant l'adaptation à un nouvel hôte ne peut être réduite à ces deux seules positions. Comme l'a prouvé l'émergence du virus H1N1p, qui ne possède aucune de ces deux mutations, ce processus implique de nombreux acides aminés, d'autres protéines virales et des signatures génétiques complexes (Gabriel *et al.* 2014 ; Schrauwen *et al.* 2014 ; Neumann *et al.* 2015 ; Rodriguez-Frandsen *et al.* 2015).

Il est important de noter que toutes les interactions entre protéines virales et protéines cellulaires ne sont pas déterminantes en terme de restriction d'hôte. Dans le cas des importines, par exemple, l'origine de la protéine PB1, qu'elle soit aviaire ou humaine, n'influence pas l'interaction avec la protéine RanBP5 (Hutchinson *et al.* 2011). De plus, la liaison des protéines virales aux protéines d'import nucléaire doit être très régulée. Une trop forte affinité entraînerait une séquestration de ces éléments dans le compartiment nucléaire et n'aurait aucun bénéfice quant à l'efficacité de l'activité polymérase virale (Hutchinson *et al.* 2012 ; Resa-Infante *et al.* 2013).

IV. Diversité génétique virale

IV.1. Les quasiespèces virales

IV.1.1. Origine de la théorie des quasiespèces

Actuellement, les quasiespèces virales sont considérées comme un ensemble de génomes viraux reliés génétiquement autour d'une séquence consensus, où chaque génome ne diffère d'un autre que par une ou deux bases. Cet ensemble est soumis à un processus continu de variation génétique, de compétition entre les variants générés et de sélection des plus adaptés à un environnement donné (Domingo *et al.* 2012 ; Andino *et al.* 2015 ; Domingo *et al.* 2016).

Les fondements de la théorie des quasiespèces sont donnés par Eigen en 1971 (Eigen 1971). A cette époque, ses travaux représentent la première approche mathématique d'un système de réplication d'une molécule matrice, qui introduit régulièrement des erreurs lors de la copie. Ce modèle regroupe la théorie de l'information, qui correspond à la cinétique de réplication des molécules, et la théorie de l'évolution de Darwin. Le but de ce modèle est de proposer une théorie sur l'origine de la vie, basée sur l'auto-organisation des macromolécules, leur réplication et leur adaptabilité au sein de ce qui aurait pu être un monde primitif, basé sur l'ARN (Eigen 1971). En se basant sur ces travaux, Eigen et Schuster énoncent alors le concept de quasiespèces en 1977 (Eigen *et al.* 1977). Lors de la réplication infinie d'une molécule matrice, les erreurs de copies inhérentes au processus ont pour conséquences de développer une collection de variants différents les uns des autres mais également liés génétiquement (Biebricher *et al.* 2006 ; Ojosnegros *et al.* 2011 ; Domingo *et al.* 2016). L'ensemble des mutations et de leurs combinaisons possibles peut être modélisé par un paysage multidimensionnel non défini, appelé « espace de séquences ». La génération de cet espace est soumise à deux paramètres, le taux de réplication et de mutation ainsi que les forces de sélections s'appliquant au système. Ce sont alors ces pressions de sélection qui maintiennent en équilibre les différentes populations de molécules ou quasiespèces au sein du système (Eigen 1996 ; Domingo *et al.* 2012 ; Andino *et al.* 2015).

Parallèlement aux travaux mathématiques de Eigen, les travaux expérimentaux au sein du laboratoire dirigé par Weissmann sur le bactériophage Q β démontraient que les virus à ARN forment des populations génétiquement hétérogènes, où le génome de chaque phage diffère par une à deux mutations du génome sauvage de référence (Batschelet *et al.* 1976 ; Domingo *et al.* 1978). Ces observations leur permettent de conclure que le génome du phage Q β , virus à

ARN, ne peut être décrit comme unique et défini mais plutôt comme la moyenne d'un ensemble de séquences différentes individuellement (Domingo *et al.* 1978 ; Domingo *et al.* 2016). Ces expériences ont alors permis d'évaluer expérimentalement et de confirmer la théorie des quasiespèces développée par Eigen. De plus, ce système *in vitro* permet de réaliser de multiples cycles d'amplification de l'ARN génomique Q β et ainsi d'explorer les conséquences de l'application de diverses pressions de sélection lors de la synthèse d'ARN, sur l'évolution du génome (Mills *et al.* 1967 ; Billeter *et al.* 1969 ; Flavell *et al.* 1974 ; Biebricher *et al.* 1983).

IV.1.2. Application aux virus à ARN

Un génome de petite taille, un cycle de réplication court et réalisé par une polymérase qui présente un taux de mutation élevé (Drake 1993 ; Drake *et al.* 1999 ; Duffy *et al.* 2008 ; Sanjuan *et al.* 2010 ; Sanjuan *et al.* 2016), lié à sa faible fidélité, sont les critères qui permettent aux virus à ARN de développer rapidement une grande population de génomes liés génétiquement mais différents les uns des autres, en adéquation avec le modèle mathématique des quasiespèces. En effet, une approche déterministe permet d'appliquer le concept de quasiespèces à une population finie, en état de non équilibre toujours remis en question par l'environnement, notamment par la réponse immunitaire de l'hôte (Eigen 1996 ; Domingo *et al.* 1997 ; Eigen 2000 ; Wilke 2005 ; Andino *et al.* 2015).

Cette convergence entre la théorie des quasiespèces et le modèle évolutif des virus à ARN a ainsi permis d'approfondir le développement de cette théorie d'une part (Eigen *et al.* 1977 ; Domingo *et al.* 1978 ; Holland *et al.* 1982 ; Perales *et al.* 2010), et de faire progresser la compréhension des mécanismes impliqués dans l'évolution des populations virales d'autre part. Ainsi, la séquence sauvage ou consensus est considérée comme la moyenne de l'ensemble des génomes constituant la population virale. Celle-ci n'est donc pas la séquence la plus fréquemment observée, ni la plus adaptée à l'environnement et peut même ne pas exister en tant que réel génome au sein de la population virale. Les pressions de sélection environnementales ne s'exercent donc pas sur un génome unique, mais au contraire, sur l'ensemble des variants qui représentent alors une unique unité de sélection (Biebricher *et al.* 2005 ; Domingo *et al.* 2012).

Suite aux expériences réalisées avec le bactériophage Q β , d'autres modèles viraux ont été utilisés afin de valider la théorie des quasiespèces (Holmes *et al.* 2002). Notamment, après

plusieurs centaines de passages successifs du virus de la stomatite vésiculaire (VSV), le séquençage de clones individuels a permis d'observer une population hétérogène, bien que la séquence consensus de la population soit restée inchangée (Schubert *et al.* 1984 ; Steinhauer *et al.* 1989 ; Steinhauer *et al.* 1989). De plus, il a été observé que la modification des pressions de sélection au cours de passages successifs du VSV était rapidement suivie d'une évolution de la séquence consensus virale ainsi que d'une modification de la diversité au sein de la population (Steinhauer *et al.* 1989). Il a également été prouvé que le variant se répliquant le plus rapidement n'était pas nécessairement le variant majoritaire au sein de la population. La séquence consensus ainsi que la distribution des mutants dans la population dépendent donc également des interactions des variants entre eux (de la Torre *et al.* 1990). Des études réalisées notamment avec le virus FMDV, ou virus pieds-mains-bouche (Domingo *et al.* 1980 ; Sobrino *et al.* 1983), ainsi qu'avec le virus de l'immunodéficience humaine, le HIV (Goodenow *et al.* 1989 ; Wain-Hobson 1989 ; Nowak *et al.* 1990) ont aussi contribué à généraliser l'application du concept de quasiespèces aux virus à ARN, qu'ils infectent les humains, les animaux ou bien les plantes (Roossinck *et al.* 2006 ; Novella *et al.* 2014).

IV.2. Notion de vitalité virale

IV.2.1. Définitions

L'espace de séquences défini précédemment dépend de la capacité de reproduction de chaque génome, c'est-à-dire la production de nouveaux virions capables de réaliser un cycle viral complet, ainsi qu'à leur capacité de survie dans un environnement donné. Ces deux critères permettent ainsi de délimiter un paysage de vitalité. Ce paysage peut être défini selon un axe horizontal, représentant la localisation du génome au sein de l'espace de séquences, et un axe vertical, représentant la vitalité du génome considéré. Selon cette représentation, ce paysage est alors composé de pics, synonymes de vitalités fortes, et de vallées, dues à de faibles vitalités. La vitalité de chaque génome étant dépendante de l'environnement, ce paysage de vitalité (Fig.9), ainsi que la distribution des mutants, sont remodelés à chaque variation des pressions de sélection (Biebricher *et al.* 2005 ; Biebricher *et al.* 2006 ; Andino *et al.* 2015 ; Schuster 2016). Il a été observé, en effet, que même les modifications d'environnement les plus minimales entraînent une modification de ce paysage (Rohde *et al.* 1995). Ceci confirme l'importance de considérer la population virale comme une unité de

sélection, où ce sont les interactions entre chaque membre qui façonnent le paysage de vitalité propre à l'ensemble formant la population. C'est donc le groupe qui est sélectionné et non l'individu seul. Lors de changements drastiques d'environnement, tel qu'un changement d'hôte, l'évolution de la population virale se traduit par une nouvelle distribution de variants au sein de nouvelles régions dans l'espace de séquence et une topologie de son paysage de vitalité redessinée (Biebricher *et al.* 2006 ; Borderia *et al.* 2011 ; Domingo *et al.* 2012 ; Andino *et al.* 2015 ; Schuster 2016).

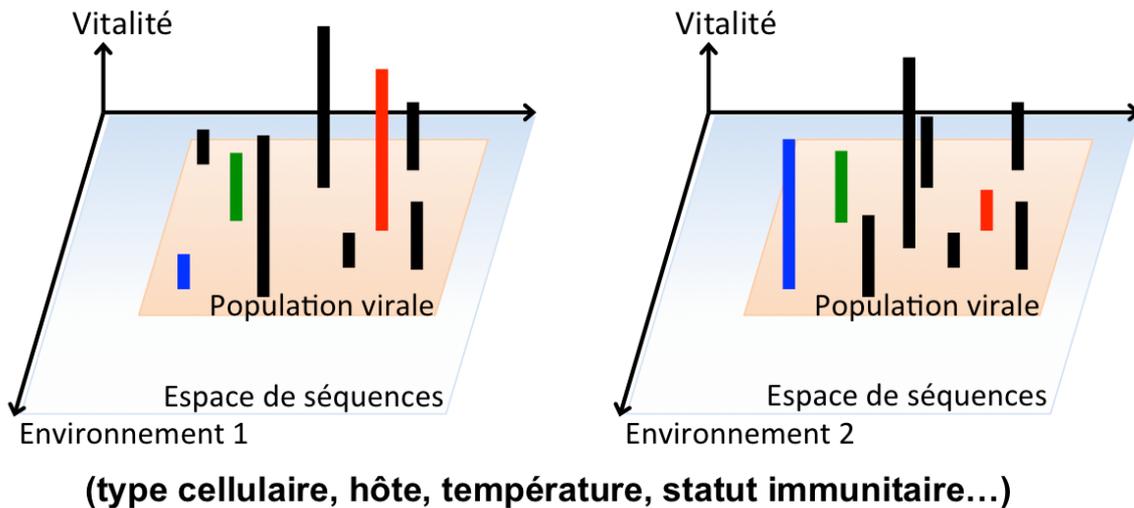


Figure 9 - Paysage de vitalité des quasiespèces.

Paysage de vitalité modélisé en trois dimensions correspondant, horizontalement, à un espace de séquences génotypiques et verticalement, la vitalité de chaque séquence ou génotype selon l'environnement. La nature en quasiespèces d'une souche virale joue un rôle majeur dans l'évolution, l'adaptation et la pathogénicité de celle-ci. Une population diversifiée, avec des variants possédant des vitalités différentes selon l'environnement, pourra explorer différents environnements et rapidement s'adapter aux changements de conditions (nouvel hôte ou réponse immune). A partir de (Fields *et al.* 2013).

Une population virale peut également être représentée par la fréquence d'apparition de chacun des variants la constituant. De la même manière que pour le paysage de vitalité, l'axe horizontal représente le positionnement du variant au sein de l'espace de séquences, tandis que l'axe vertical correspond, dans ce cas, à la fréquence d'observation du génome. Cette représentation, appelée paysage de population, et le paysage de vitalité sont deux représentations différentes de la population virale, le génome présentant la plus haute vitalité n'étant pas systématiquement le plus représenté au sein de la population. En effet, ce paysage de population est modulé par le taux de mutation au cours du processus de réplication mais

également par la sélection due aux pressions de l'environnement, elle-même dépendante du paysage de vitalité (Domingo *et al.* 1997 ; Biebricher *et al.* 2005 ; Ojosnegros *et al.* 2011). La théorie des quasiespèces n'est ainsi pas en conflit avec la formulation de Wright-Fisher, appelée également concept d'équilibre mutation-sélection. Ce concept établit que les fréquences d'apparition de chaque variant au sein de la population sont maintenues à un équilibre, régulé par l'opposition entre le taux de mutation et le mécanisme de sélection (Wilke 2005 ; Musso 2012 ; Seifert *et al.* 2016).

Cependant, dans le cadre d'un système comme celui des virus à ARN, le taux de mutation élevé doit être particulièrement régulé afin de pouvoir maintenir l'information génétique de manière stable. Le taux de mutation à ne pas dépasser est appelé seuil d'erreur. Ce seuil correspond au taux de mutation pour lequel la fréquence de la séquence dominante, qui présente la plus forte vitalité, devient trop faible pour être maintenue, le paysage de population devenant alors plat (Swetina *et al.* 1982). Le dépassement du seuil d'erreur entraîne alors le phénomène « d'erreur catastrophique » caractérisé par une instabilité de la transmission de l'information génétique virale, menant à la dissolution et donc l'extinction de la population virale (Eigen *et al.* 1977 ; Perales *et al.* 2010 ; Domingo *et al.* 2012).

IV.2.2. Espace de séquence et vitalité

Au cours des nombreux passages viraux, dans une condition donnée, la séquence consensus et la répartition des différents variants présentent une grande stabilité malgré le taux de mutation élevé des virus à ARN qui leur permet pourtant de développer des populations virales d'une grande diversité (Domingo *et al.* 1978). L'ensemble des génomes possibles est représenté par l'espace de séquences, défini par Eigen et caractérisé par un nombre de possibilités, 4^n , dépendant de la taille du génome considéré, n étant le nombre de bases (Biebricher *et al.* 2006 ; Domingo *et al.* 2016 ; Schuster 2016). Chaque cycle de réplication permet de produire de nouveaux génomes, génétiquement liés les uns aux autres qui diffèrent du génome parental par une ou deux bases (Fig.10). Ces nouveaux génomes serviront ensuite eux-mêmes de matrice de réplication lors du cycle suivant. Lors de ce nouveau cycle, les nouveaux génomes produits sur la base des premiers variants porteront les mutations de la première génération additionnées de nouvelles. C'est ainsi que des groupes de génomes appelés sous-populations, définies en fonction de leurs parentés, vont se développer au sein de l'espace de séquences.

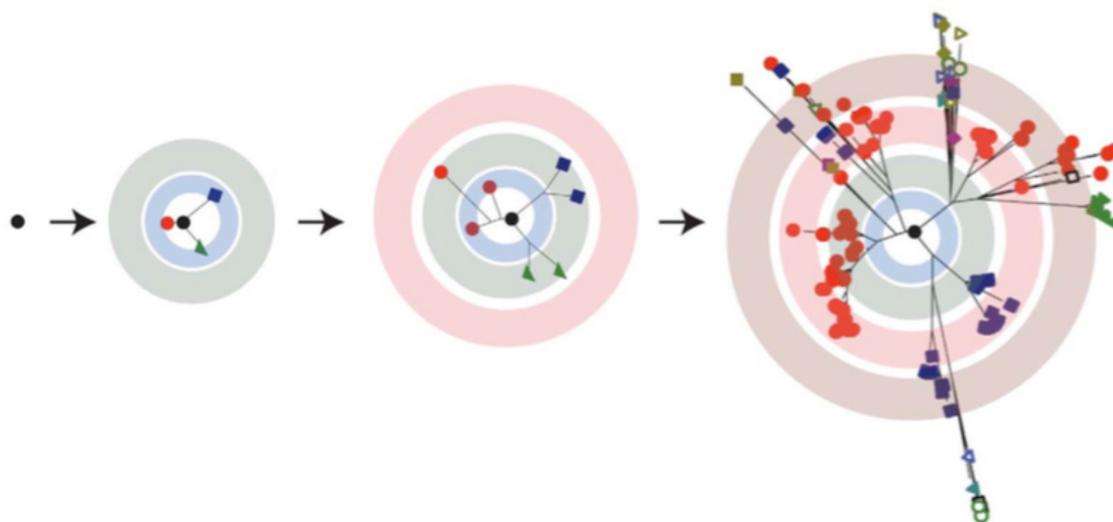


Figure 10 - Représentation schématique de la formation d'une quasiespèce virale.

Un virus se répliquant avec un taux de mutation élevé génère un ensemble de mutants divers en peu de générations. Dans ces arbres, chaque branche indique deux variants liés par une mutation ponctuelle. Les cercles concentriques représentent des cycles de réplication en série. La distribution résultante est souvent représentée sous la forme d'un nuage, centré autour d'une séquence principale, la séquence consensus. Ce schéma bidimensionnel est une simplification de la connectivité au sein d'une population virale. Dans les formulations mathématiques de la théorie des quasiespèces, l'espace de séquences est multidimensionnel, avec de nombreuses branches entre les variantes (Lauring *et al.* 2010).

La stabilité de la séquence consensus et de la répartition des mutants au sein de la population virale est expliquée par la vitalité des variants au sein de l'espace de séquences, face aux pressions de sélection exercée par l'environnement, en accord avec le modèle développé par Eigen à partir des travaux de Wright (Wright 1931). Selon ce modèle, les positions au sein de l'espace de séquence ne sont donc pas toutes équivalentes. Une mutation représente un coût en terme de vitalité, modélisée par un axe vertical par rapport à l'espace de séquence afin de pouvoir visualiser l'effet positif ou négatif d'une mutation sur la vitalité du génome. En fonction de l'environnement rencontré, seule une partie de l'espace de séquence est réellement occupée par la population virale car la plupart des mutations ont un effet délétère sur la vitalité du virus (Duarte *et al.* 1994 ; Sanjuan *et al.* 2004 ; Ciota *et al.* 2012 ; Andino *et al.* 2015). Ainsi, les mutations conservées dans la population virale sont principalement des mutations neutres vis-à-vis de la vitalité. Généralement, les mutations non synonymes présentent les conséquences les plus négatives sur la survie de la population (Duarte *et al.* 1994 ; Holmes 2003 ; Sanjuan *et al.* 2004 ; Sanjuan 2010), mais il est important de noter que même des mutations silencieuses peuvent influencer la vitalité du variant,

notamment lorsque cela touche des régions importantes telles que les régions non-codantes, les régions portant divers signaux ou bien celles impliquées dans des structures secondaires (Hertz *et al.* 1995 ; Chen *et al.* 2013 ; Crescenzo-Chaigne *et al.* 2013 ; Bernet *et al.* 2015 ; Garcia-Moreno *et al.* 2016).

Finalement, qu'elles soient silencieuses ou non synonymes, les mutations délétères sont éliminées en fonction des pressions de sélections. C'est ainsi que l'on peut parler d'un paysage de vitalité au sein de l'espace de séquences. En effet, les chutes de vitalité dues à des mutations délétères ou létales peuvent être modélisées par des escarpements, les mutations neutres par des plaines, tandis que les mutations bénéfiques sont représentées par des pics. Ces pics sont représentés de hauteurs différentes selon le bénéfice de la mutation, le plus haut pic étant la séquence dominante. Les pics peuvent également être de surface différente, en fonction de la capacité des génomes qui compose la sous-population à accepter de nouvelles mutations sans que leur vitalité en soit affectée (Fig.11). Les différents pics au sein du paysage de vitalité ne représentent pas les séquences les plus fréquemment rencontrées ni même la séquence consensus, mais les génomes les plus adaptés à l'environnement rencontré. Bien que séparées les unes des autres, les différentes sous-populations formant ces pics sont capables d'interagir entre-elles et même d'être en compétition les unes par rapport aux autres selon l'environnement (Domingo *et al.* 1997 ; Biebricher *et al.* 2006 ; Ojosnegros *et al.* 2011 ; Andino *et al.* 2015). Le paysage de vitalité est donc dessiné par l'environnement, c'est-à-dire par les pressions de sélection qui le composent. Ainsi, un génome peut être très bien adapté à un environnement donné et cependant présenter une vitalité faible face à tout autre pression de sélection. Cette modification du spectre des variants peut être observée dans de nombreux cas. Par exemple, lors de l'adaptation à un nouveau type cellulaire (Manrubia *et al.* 2005 ; Holtz *et al.* 2013 ; Sanjuan *et al.* 2016), ou bien lors de l'infection d'un hôte lorsque plusieurs organes sont infectés, chacun entraînant le développement de populations virales différentes et spécifiques de l'organe (Pfeiffer *et al.* 2006 ; Forrester *et al.* 2012). Cette adaptabilité de la population virale permise par le taux de mutation élevé des génomes viraux répartis au sein du paysage de vitalité, et redessiné par les différentes pressions de sélections rencontrées (Domingo *et al.* 2012).

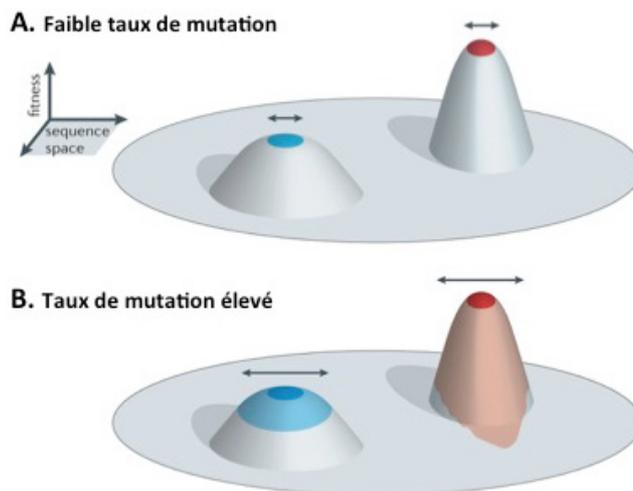


Figure 11 - Taux de mutation et survie du plus plat.

A) Lorsque le taux de mutation est bas, les populations sont génotypiquement stables et regroupées au sommet du pic de vitalité. Le variant qui présente la plus forte vitalité (rouge) surpasse tous les autres virus. B) Lorsque le taux de mutation est élevé, les variants se répartissent sur différents niveaux du pic. La population sur le pic le plus plat (bleu) reste proche de la vitalité optimale et présente une vitalité moyenne plus élevée que la population située sur le pic le plus élevé et plus abrupt (rouge). La population la plus plate est donc plus compétitive que la population sur le pic le plus haut (Lauring *et al.* 2013).

L'adaptabilité à un environnement dépend donc du taux de mutation des génomes, qui permet de modifier leur phénotype. Cependant la taille de la population est également un élément déterminant dans le processus d'adaptation de celle-ci face à de nouvelles pressions de sélection (Domingo *et al.* 1997 ; Domingo *et al.* 2006). En effet, il est important de maintenir la diversité des quasiespèces pour la vitalité et l'adaptabilité des populations virales mais la théorie du cliquet de Muller implique également qu'une population asexuée et présentant un taux de mutations élevé, telle que la population virale, subira une diminution de sa vitalité au cours du temps si celle-ci n'est pas d'une taille suffisante. Ce principe suppose qu'il n'y ait pas de mécanismes compensatoires qui empêchent l'accumulation irréversible de mutations délétères dans le génome, comme le permet la recombinaison génétique dans le cadre d'une reproduction sexuée (Muller 1964). Expérimentalement, ce principe a été démontré par des expériences de transfert de plage en série, avec le bactériophage $\Phi 6$, chaque transfert permettant de réduire la taille de la population virale par effet d'entonnoir. La forte dérive génétique, liée à l'accumulation de mutations, ainsi que la perte de vitalité de la population virale, du fait de leur impact délétère, ont ainsi permis de confirmer la théorie du cliquet de Muller (Chao 1990). La reproductibilité de ces résultats avec d'autres virus comme le VSV (Duarte *et al.* 1992), le FMDV (Escarmis *et al.* 1996) ou le HIV (Yuste *et al.* 1999), souligne l'importance de la taille de la population. D'autres études montrent que la vitalité de

la population virale est également dépendante de la vitalité initiale du clone sélectionné pour réaliser les différents passages (Novella *et al.* 1995 ; Elena *et al.* 1996 ; Burch *et al.* 2000 ; Moya *et al.* 2000). Ces observations confirment ainsi qu'une population virale est composée de variants dont la vitalité varie et, que ce sont les interactions entre ceux-ci qui permettent à la population de présenter une vitalité moyenne supérieure à la vitalité individuelle de chaque variant pris à part.

A l'inverse des expériences précédentes de réduction de taille de population, des expériences de passages de grandes populations, dans un environnement constant, ont permis d'observer un gain de vitalité exponentiel au cours des passages (Novella *et al.* 1995). De plus, des expériences de compétitions réalisées selon ce principe de passages en série de grandes populations, à partir de deux clones de VSV de vitalités initiales équivalentes, ont permis d'observer que les deux populations se développent et gagnent en vitalité, par rapport au clone initial, de manière similaire. Ce n'est qu'au hasard de l'apparition des mutations, certaines plus bénéfiques que d'autres, que l'une des populations peut prendre l'avantage sur l'autre (Clarke *et al.* 1994). Ceci illustre également le principe d'Exclusion compétitive (Hardin 1960) qui stipule que deux populations qui ont la même niche écologique, ne peuvent coexister dans un milieu stable et homogène, car la population la plus compétitive finira par surpasser et donc éliminera l'autre.

L'importance de la taille des populations virales est également mise en évidence par le fait qu'une population qui a subi une perte de vitalité, par accumulation de mutations délétères dues à l'effet du cliquet de Muller, peut retrouver un niveau de vitalité élevé par passages de grandes populations (Clarke *et al.* 1993 ; Chao *et al.* 1997 ; Burch *et al.* 1999 ; Escarmis *et al.* 1999 ; Novella *et al.* 2004). Pour retrouver ainsi des pics de vitalité au sein du paysage de vitalité, les virus peuvent utiliser différents mécanismes comme la réversion des mutations pour un retour à la séquence sauvage, des mutations compensatrices par effet d'épistasie, la recombinaison, le réassortiment ou bien encore d'autres mécanismes encore méconnus qui permettent alors d'augmenter la vitalité de la population malgré un génome atypique (Escarmis *et al.* 1999 ; Yuste *et al.* 2005 ; Borderia *et al.* 2010). Ces effets de réduction et d'expansion de la population virale sont très importants au cours du cycle viral et influencent l'évolution des virus. En effet, au cours de l'infection, la population virale doit faire face à de nombreux goulots d'étranglement tels que la transmission d'un hôte à un autre, par voie aérienne par exemple via des gouttelettes, la colonisation des différents organes cibles, la réponse immunitaire de l'hôte (Elena *et al.* 2001 ; Novella *et al.* 2005 ; Pfeiffer *et al.*

2006) ou bien encore lorsque le cycle viral nécessite un hôte intermédiaire (Forrester *et al.* 2012). Ceci explique que l'on observe des modifications des quasiespèces, des mutants composant les populations ou bien encore des séquences consensus, au cours du cycle viral (Cuevas *et al.* 2003). En effet, malgré les fortes pressions de sélection que ces événements appliquent aux populations virales, les variants qui réussissent à y résister vont se répliquer et développer à nouveau une population dont la vitalité sera la plus adaptée possible à l'environnement. La taille d'une population virale est donc un facteur primordial qui influence la formation, la composition et le comportement des quasiespèces, et donc leur évolution (Zwart *et al.* 2015) (Fig.12 et 13).

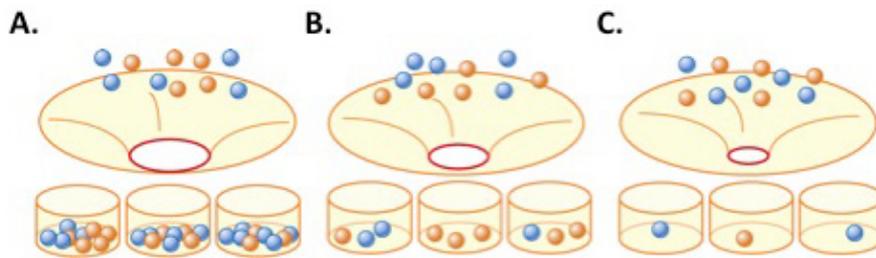


Figure 12 - Représentation d'un goulot d'étranglement génétique.

Une faible ouverture de l'entonnoir, représentant l'événement d'infection, limite le passage des billes de couleurs, schématisant les particules virales, dans le récipient qui symbolise l'hôte. Plus l'entonnoir sera resserré (A>B>C), moins les billes pourront traverser et plus les variations de fréquence d'apparition d'une bille bleue ou orange dans le récipient seront importantes (Zwart *et al.* 2015).

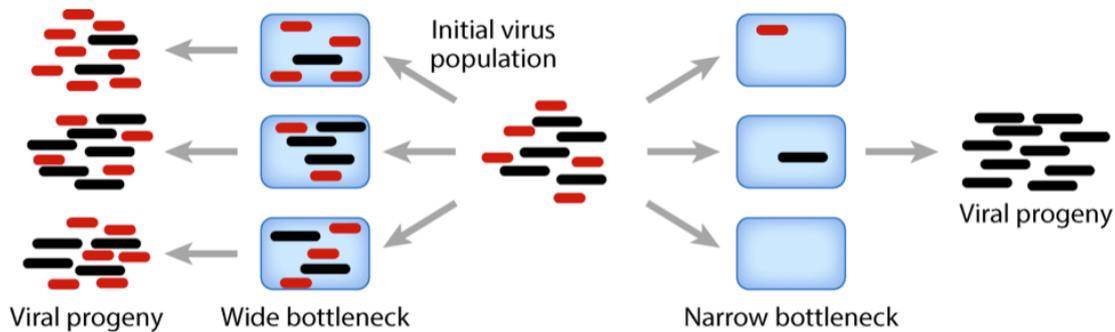


Figure 13 - Sélection de populations virales dans le cas d'un goulot d'étranglement étroit.

Les rectangles bleus représentent une cellule hôte, les traits noirs des virions complets et les rouges des virions défectifs. A gauche, l'entonnoir de sélection est large (forte MOI), les deux virus infectent donc toutes les cellules. Les deux génotypes sont alors amplifiés. Sur la droite, le goulot d'étranglement est étroit (faible MOI), chaque cellule est infectée uniquement par l'un des génotypes. Seuls les virus complets pourront alors se répliquer. Bien que ce modèle soit appliqué au particules déficientes interférentes, il peut être adapté plus généralement aux éléments viraux agissant en trans (Zwart *et al.* 2015).

IV.2.3. Interactions au sein de la population virale

La population virale représente l'unité de sélection face à l'environnement. Cependant, le génotype de chaque variant peut influencer la dynamique de l'ensemble de la population par ce qui est appelé l'effet de quasiespèces. La vitalité de la population virale ou bien la distribution des mutants ne peut donc pas être déduite à partir de la vitalité individuelle d'un variant. Initialement, les interactions internes entre variants de la population, qu'elles soient positives ou négatives, n'étaient pas prises en compte, mais la compréhension de leur importance a permis d'implémenter le modèle mathématique des quasiespèces (Wilke *et al.* 2003 ; Arbiza *et al.* 2010 ; Sardanyes *et al.* 2010 ; Villarreal *et al.* 2013).

Les interactions négatives ou interférences, peuvent être dues à des génomes non fonctionnels dont la présence diminue la vitalité générale de la population car ils sont en compétition avec les autres variants fonctionnels. Les particules défectives interférentes (DI), décrites pour la première fois en 1940 à la suite de l'observation de virus influenza incomplets, sont un très bon exemple (Marriott *et al.* 2010 ; Frensing 2015). Les DI sont en effet des particules virales, de virus influenza ou bien d'autres (Dimmock *et al.* 2014), auxquelles il manque une partie du génome. Celles-ci sont dites interférentes car elles sont en compétition avec les particules virales viables, puisqu'elles utilisent les mêmes voies et nécessitent les mêmes ressources au cours de l'infection d'un hôte. Lorsque ces particules interférentes ont un avantage sélectif, par exemple pour la réplication du fait d'une taille réduite de leur génome, elles peuvent conduire à l'extinction de la population virale.

Un phénomène d'interférence a également été observé au sein de populations virales pour limiter le développement de certains variants qui se répliqueraient trop rapidement, avec une vitalité trop forte, pour éviter qu'ils deviennent dominants au sein de la population. Cette dynamique a été documentée pour le VSV (de la Torre *et al.* 1990) ainsi que de nombreux autres virus à ARN (Andino *et al.* 2015) tels que le poliovirus par exemple (Chumakov *et al.* 1991 ; Crowder *et al.* 2005 ; Lancaster *et al.* 2011) ou le LCMV (Teng *et al.* 1996). Des études similaires ont également permis d'observer, notamment pour le FMDV, que des génomes hautement mutés pouvaient jouer le rôle de génomes défectifs (Gonzalez-Lopez *et al.* 2004 ; Perales *et al.* 2007 ; Ojosnegros *et al.* 2010 ; Perales *et al.* 2010 ; Tejero *et al.* 2016). Les phénomènes d'interférence semblent également jouer un rôle important dans la sélection des mutations, comme décrit pour le virus influenza dans le cas de certaines mutations non conservées bien qu'elles présentent un bénéfice en terme de vitalité (Illingworth *et al.* 2012). L'ensemble de ces données suggère que les variants impliqués dans

des mécanismes d'interférence influencent l'infectivité des populations virales, mais pas leur réplication (Mills *et al.* 1967 ; Grande-Perez *et al.* 2005 ; Manrubia *et al.* 2010 ; Schuster 2016).

Le mécanisme de complémentation permet de restaurer la fonction d'une protéine non fonctionnelle, issue d'un génome défectif, grâce à un autre génome codant pour une protéine fonctionnelle. Ce mécanisme permet ainsi de limiter l'effet d'interférence de certains génomes défectifs au sein d'une population virale. Plusieurs exemples de complémentation de mutations délétères ont été décrits pour de nombreux virus comme le VIH (Gelderblom *et al.* 2008), le virus de la dengue (DENV) (Aaskov *et al.* 2006) ou bien encore des virus de plantes (Moreno *et al.* 1997 ; Fraile *et al.* 2008). La complémentation permet de diversifier les génomes au sein de la population virale et de maintenir des mutations qui auraient pu être éliminées mais qui contribuent finalement à la vitalité de l'ensemble de manière positive.

Les deux phénomènes de complémentation et d'interférence peuvent également agir en synergie pour permettre la survie de la population virale, comme cela a été décrit pour le FMDV par exemple (Garcia-Arriaza *et al.* 2004 ; Garcia-Arriaza *et al.* 2005 ; Garcia-Arriaza *et al.* 2006). Dans ce cas, bien que la population soit dominée par des génomes défectifs, celle-ci est capable de survivre car chacun des génomes défectifs se complémentent (Garcia-Arriaza *et al.* 2005). D'autres études ont analysé les interactions entre différentes sous-populations, certaines très virulentes et d'autres moins virulentes mais se répliquant selon la même cinétique, pour tenter d'évaluer le rôle de chacune dans la virulence moyenne de la population considérée (Ojosnegros *et al.* 2010 ; Ojosnegros *et al.* 2012 ; Novella *et al.* 2014). Ces résultats confirment à nouveau ce qu'énonce la théorie des quasiespèces, à savoir que c'est la population virale dans son ensemble qui est soumise à la sélection en tant qu'unité et que c'est l'ensemble des interactions existantes entre les individus qui permet de définir son phénotype général, sa dynamique et son évolution.

IV.3. Taux de mutation et fidélité de la polymérase

IV.3.1. Taux de mutation

Le taux de mutation d'un organisme définit la probabilité de transmettre une modification de l'information génétique à la génération suivante. Pour les virus, une génération correspond à un cycle infectieux, qui débute par l'attachement de la particule virale à la surface de la cellule et se termine par la libération des virions néo-formés dans le milieu extra-cellulaire. Le taux de mutation ne doit pas être confondu avec la fréquence d'apparition d'une même mutation dans une population virale donnée, qui est dépendante de nombreux autres facteurs telle que la sélection naturelle par exemple (Sanjuan *et al.* 2016).

La diversité génétique peut être influencée par de nombreux facteurs. Cependant le taux de mutation représente la principale source de variabilité de l'information génétique portée par chacun des génomes composant la population virale. C'est donc également un paramètre indispensable à la compréhension de l'évolution virale. L'activité des ARN polymérases ARN-dépendantes virales et leur faible fidélité, source d'introduction d'erreurs au cours de la réplication du génome, confèrent aux virus à ARN un taux de mutation élevé donnant lieu à des populations constituées d'un ensemble de variants, auxquelles le modèle des quasiespèces peut s'appliquer (Domingo *et al.* 2016). Ces virus présentent le taux de mutation le plus élevé observé dans la nature, bien supérieur au taux observé pour la majorité des organismes qui utilisent l'ADN comme support de leur information génétique (Drake *et al.* 1999 ; Duffy *et al.* 2008 ; Sanjuan *et al.* 2010 ; Sanjuan *et al.* 2016) (Fig.14). Ceci est lié au fait que la réplication des génomes viraux à ARN, généralement d'une taille réduite allant de 3kb à 30kb, repose uniquement sur la RdRp qui ne présente ni activité exonucléase 3'-5' de relecture ni mécanismes de réparation de mésappariements. Ces mécanismes de relecture et de réparation sont généralement associés aux ADN polymérases d'organismes possédant un génome composé d'ADN. Cependant, les coronavirus, dont les génomes d'environ 32kb sont parmi les plus grands et les plus complexes parmi les virus à ARN, échappent à cette règle. En effet, il a pu être montré que la protéine nsp14, associée à leur ARN-polymérase, présente une activité de relecture (Minskaia *et al.* 2006 ; Eckerle *et al.* 2007 ; Eckerle *et al.* 2010 ; Sevajol *et al.* 2014 ; Snijder *et al.* 2016). Le développement de cette activité correctrice et la taille importante du génome sont probablement interdépendants.

Tout d'abord évalué chez des organismes modèles dont le génome est composé d'ADN, *Drosophila melanogaster* initialement (Muller 1928) puis plus tard *Escherichia coli*

(Newcombe 1948), le taux de mutation des virus à ARN a commencé à être évalué à partir de 1970, à l'aide du bactériophage T4 (Williams *et al.* 1977) et du virus FMDV (Maes *et al.* 1970). Il fut ensuite documenté pour de nombreux autres virus à ARN (Sanjuan *et al.* 2010) dont le poliovirus (Parvin *et al.* 1986), le virus du sarcome de Rous (Darlix *et al.* 1983), le virus Sindbis (Durbin *et al.* 1986), le virus influenza de type A (Parvin *et al.* 1986), le virus de la leucémie murine (Monk *et al.* 1992), le virus de l'hépatite C (Ogata *et al.* 1991) ou bien encore le VIH (Dougherty *et al.* 1988 ; Leider *et al.* 1988 ; Preston *et al.* 1988 ; Roberts *et al.* 1988 ; Nowak 1990). L'ensemble des études dans ce domaine en plein développement démontre ainsi le taux élevé de mutations des virus à ARN, allant de 10^{-4} à 10^{-6} substitutions par nucléotide par cellule infectée (s/n/c), comparativement aux virus à ADN qui présentent un taux de mutation entre 10^{-6} et 10^{-8} s/n/c (Sanjuan *et al.* 2010 ; Sanjuan *et al.* 2016) (Fig.14). Ces résultats valident également l'application du concept des quasiespèces d'Eigen aux virus à ARN. Ainsi, selon la taille du génome, la taille de la population virale et le taux de mutation, il a été évalué que 0,5 à 3,6 mutations par génome étaient nécessaires pour qu'une population virale puisse développer des effets de quasiespèces (Wilke 2001 ; Wilke *et al.* 2001 ; Holmes *et al.* 2002 ; Comas *et al.* 2005).

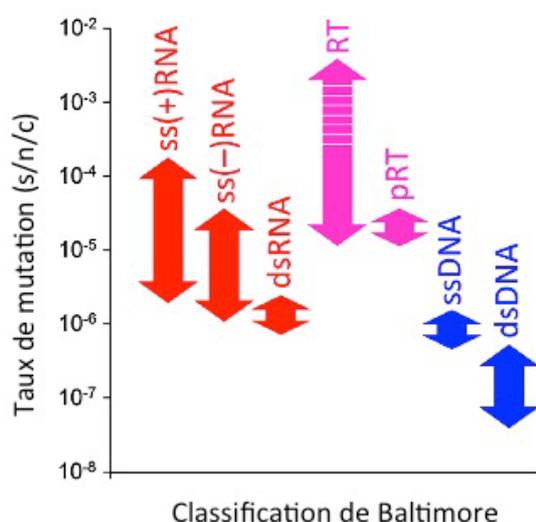


Figure 14 - Taux de mutation des génomes viraux.

Spectre des variations du taux de mutation des génomes viraux selon la classification de Baltimore (ss : simple brin, ds : double brin, +/- : polarité du génome, RT : rétrovirus, pRT : para-rétrovirus). D'après (Sanjuan *et al.* 2016).

IV.3.2. Modulation de la diversité génétique – Facteurs intrinsèques

A la faible fidélité de la polymérase virale s'ajoutent d'autres facteurs, intrinsèques au virus, tels que les phénomènes de réassortiment ou de recombinaison qui permettent d'augmenter encore la diversité génétique de la population virale mais qui peuvent également influencer sur l'évolution de la population, la restriction d'hôte ou même le potentiel épidémique d'une souche virale. Comme évoqué précédemment, les événements de réassortiment se produisent lors de la co-infection d'une cellule par des virus d'une même espèce dont le génome est segmenté, ce qui permet l'échange de segments entiers et l'obtention de nouveaux génotypes. Ces phénomènes de réassortiment sont fortement liés à l'émergence de nouvelles souches virales, plus ou moins pathogènes, ce qui explique que le réassortiment soit très étudié pour les IAV (Octaviani *et al.* 2011 ; Cui *et al.* 2014 ; Lu *et al.* 2014 ; Steel *et al.* 2014 ; McDonald *et al.* 2016 ; Zhu *et al.* 2016) mais aussi pour d'autres virus à génome segmenté comme les bunyavirus (Briese *et al.* 2013) et les rotavirus (Kirkwood 2010 ; Dennis *et al.* 2014 ; Than *et al.* 2014).

Les événements de recombinaison homologues ou non-homologues, étudiés pour de nombreux virus, sont également des moteurs importants de la diversité génétique des populations virales (Lai 1992 ; Roossinck 1997 ; Worobey *et al.* 1999 ; Simon-Loriere *et al.* 2011 ; Xiao *et al.* 2016). Le mécanisme de recombinaison présente de nombreux avantages (Simon-Loriere *et al.* 2011). Il permet l'introduction de nouvelles mutations bénéfiques pour le virus, permettant d'infecter de nouveaux hôtes (Miras *et al.* 2014) et donc le développement de nouvelles souches virales (Hahn *et al.* 1988 ; Weaver *et al.* 1997) ; l'élimination de mutations délétères ou la réparation des génomes défectifs (Weiss *et al.* 1991 ; Chao *et al.* 1997).

Au sein des complexes de réplication, les interactions entre chacune des protéines semblent aussi jouer un rôle dans la fidélité de la polymérase. Par exemple, la protéine non structurale nsp14 des coronavirus présente une activité de relecture dont la suppression entraîne une importante augmentation du taux de mutation (Smith *et al.* 2012 ; Smith *et al.* 2013). De plus, toujours au sein du complexe polymérase des coronavirus, la protéine non structurale nsp10, ne possède pas d'activité correctrice mais interagit avec nsp14 et favorise son activité exonucléase 3'-5' de relecture. Une perte d'interaction entre les deux protéines se traduit alors également par une forte diminution de la fidélité de la RdRp virale (Smith *et al.* 2015).

Le taux de mutation de la polymérase virale peut également être influencé par des protéines virales ne faisant pas partie du complexe polymérase. La protéine NS5A du virus de l'hépatite C, capable d'interagir avec la RdRp virale ainsi que plusieurs facteurs cellulaires, en est un exemple. En effet, après passages successifs des virus en milieu mutagène, des mutations responsables d'une augmentation de la fidélité virale ont pu être observées dans NS5A (Pfeiffer *et al.* 2005). D'autres exemples illustrent que la fidélité peut être modulée par des protéines virales autres que la polymérase. Des résultats similaires ont en effet été décrits avec la protéine 2C de l'entérovirus 71 (Sadeghipour *et al.* 2013) ou la protéine nsp2 du virus chikungunya (Pastorino *et al.* 2008 ; Coffey *et al.* 2011 ; Das *et al.* 2014 ; Stapleford *et al.* 2015).

IV.3.3. Modulation de la diversité génétique – Facteurs extrinsèques

La diversité génétique des génomes viraux peut également être modulée par des facteurs qui ne sont pas d'origine virale, mais appartiennent à l'hôte comme les protéines de la famille des APOBEC3, enzymes d'édition des ARNm de l'apolipoprotéine B, appartenant à la superfamille des cytidines déaminases (Smith *et al.* 2012 ; Harris *et al.* 2015 ; Salter *et al.* 2016). Les protéines APOBEC3 sont l'exemple de facteurs extrinsèques de modulation de la diversité virale le plus décrit. Leur fonction antivirale a été initialement décrite pour le VIH puis a été observée pour d'autres virus. Leur principale activité antivirale est due à leur activité d'édition de l'ADN simple-brin. La protéine encapsidée dans le virion va introduire des mutations G:A dans le brin d'ADN positif lors de l'étape de transcription inverse, par désamination des cytidines du brin matrice, en uraciles. Chaque APOBEC3 présente des affinités différentes et spécifiques de différents motifs.

Il est important de noter que malgré l'introduction de codons stop, dans certains cas l'activité mutagène des APOBEC3 peut devenir bénéfique pour le virus en favorisant la diversité de la population et perd alors son potentiel antiviral (Zhang *et al.* 2003 ; Bourara *et al.* 2007). Une situation similaire est observée avec l'activité du système immunitaire de l'hôte. En effet, la pression de sélection exercée sur la population virale entraîne alors une diversification de celle-ci et modifie la distribution des variants la constituant (Frost *et al.* 2005). Ainsi, plus le titre des anticorps de l'hôte est élevé, plus la diversité de la population virale est développée, ce qui maintient la valeur de la charge virale constante. Cette situation illustre l'hypothèse de la Reine Rouge résumée par la phrase « nous courons pour rester à la

même place » (Carroll 1871). Cela signifie que des espèces en compétition doivent évoluer continuellement pour survivre et maintenir leur capacité à se répliquer (van Valen 1973 ; Sole *et al.* 1999).

D'autres protéines issues de l'hôte ont également été décrites comme facteurs capables de moduler la diversité génétique de nombreuses populations virales. Les adénosines déaminases (ADAR), qui agissent sur de l'ARN double brin et introduisent des mutations A:I, sont un autre exemple de ce type de facteurs (Samuel 2011). Leur activité a notamment été décrite pour le virus de la rougeole mais également pour les virus des oreillons, de la fièvre de la Vallée du Rift, de l'hépatite C, le LCMV, le VRS, les virus parainfluenza humains ou bien encore les IAV (Samuel 2012 ; Tomaselli *et al.* 2015).

A ces exemples s'ajoutent les résultats d'études qui démontrent une modifications du taux de mutation et des fréquences de mutations en fonction du type cellulaire infecté (Combe *et al.* 2014 ; Rozen-Gagnon *et al.* 2014), ou même lors du passage en contexte animal (Graham *et al.* 2012), ce qui confirme la capacité de certains facteurs de l'hôte à moduler la fidélité et donc la diversité des populations virales.

Chez les bactéries un ajustement du taux de mutation en fonction de l'environnement a été observé (Sniegowski *et al.* 1997). En effet, la fidélité de réplication des variants évolue et est sélectionnée en fonction des pressions de sélection, au cours du processus de colonisation *in vivo* ou bien lors d'un appauvrissement en ressources de l'environnement par exemple (Denamur *et al.* 2006). Une modulation de la fidélité des virus à ARN selon ce principe pourrait également exister, cependant cela n'a pas encore pu être démontré.

IV.3.4. Optimisation et sélection du taux de mutation

Ainsi, plusieurs facteurs peuvent avoir une influence sur le taux mutation apparent des virus à ARN, notamment des facteurs issus de l'hôte. Cependant, la fidélité intrinsèque de la réplication virale est un caractère régulé et sélectionné selon les contraintes évolutives rencontrées au cours des infections. Par exemple, comme il en sera question plus loin, ce sont les variants présentant un taux de mutation plus faible qui seront sélectionnés dans un milieu mutagène. De plus, il a été observé, pour les IAV, qu'un clone viral isolé pouvait présenter une fréquence de mutation individuelle différente de celle déterminée pour la population virale dans son ensemble (Suarez *et al.* 1992). Ceci implique que les variants au sein d'une même population virale peuvent présenter différents niveaux de fidélité (Suarez *et al.* 1992 ;

Gnadig *et al.* 2012) et que, par conséquent, c'est la fidélité la plus en adéquation avec l'environnement rencontré qui sera sélectionnée. Cette adaptation rapide du taux de mutation à un nouvel environnement contribue grandement à la capacité des virus à ARN à infecter de nouveaux hôtes (Gabriel *et al.* 2005 ; Gabriel *et al.* 2007) et à s'y adapter de manière pérenne comme pour les IAV notamment (Wong *et al.* 2011). L'optimisation de la fidélité résultant soit de la sélection des variants dont la fidélité de la polymérase est la plus adaptée, soit de la modulation par des facteurs de l'hôte peut s'observer dans de nombreuses autres situations comme des changements de type cellulaire lors de l'infection de l'hôte *in vivo*. Lors de l'infection, la fidélité peut aussi s'adapter au cours du temps (Diamond *et al.* 2001) et semble également liée à l'évolution vers la chronicité de certaines pathologies (Farci *et al.* 2000 ; Bull *et al.* 2012 ; Raghvani *et al.* 2016).

IV.3.5. Taux de mutation et seuil d'erreur

Le taux de mutation représente donc un paramètre majeur pour la viabilité de la population virale, celui-ci ne pouvant dépasser une valeur limite appelée seuil d'erreur (Biebricher *et al.* 2005 ; Biebricher *et al.* 2006). Cette valeur représente le taux de mutation à partir duquel l'accumulation d'erreurs entraîne une distribution aléatoire des variants de la population au sein de l'espace de séquence. Cette phase «d'erreur catastrophique» se traduit alors par un aplatissement complet du paysage de vitalité puis l'effacement des limites du paysage définissant la population virale au sein de l'espace de séquence (Eigen 1971 ; Domingo *et al.* 2016 ; Perales *et al.* 2016 ; Tejero *et al.* 2016).

Développé sur la base du modèle des quasiespèces initial, son principe est aujourd'hui contesté (Eigen 2002 ; Wilke 2005). En effet, s'il est maintenant acquis que le paysage de vitalité d'une population virale est complexe et composé de multiples pics de hauteurs différentes, le modèle du seuil d'erreur a, quant à lui, été défini pour une population modélisée par un paysage ne présentant qu'un pic unique de vitalité (Swetina *et al.* 1982). Ce type de population particulière implique qu'aucune mutation n'est létale (Wagner *et al.* 1993) et qu'il n'y a qu'une séquence qui soit adaptée à l'environnement (Biebricher *et al.* 2005 ; Preslold *et al.* 2015 ; Schuster 2016), ce qui est donc en désaccord avec notre compréhension actuelle des populations virales (Sanjuan *et al.* 2004).

IV.4. Mutagenèse et évolution des populations virales

IV.4.1. Principe de la mutagenèse létale

L'idée d'une stratégie antivirale par mutagenèse létale a été développée à partir du concept de seuil d'erreur, bien que celui-ci soit sujet à controverse. L'objectif de la mutagenèse létale est d'augmenter le taux de mutation du génome viral afin de dépasser le seuil d'erreur et ainsi de pousser la population virale dans une situation d'erreur catastrophique (Tejero *et al.* 2016). Le modèle mathématique des quasiespèces développé initialement ne prévoit pas la possibilité de l'extinction d'une population par augmentation du taux de mutation et franchissement du seuil d'erreur (Wilke 2005). Cependant la stratégie de mutagenèse létale est maintenant décrite comme une approche antivirale efficace. En effet, la diminution de la fidélité répliquative entraîne une diminution de la vitalité de la population virale suivie, généralement, d'une diminution du nombre de variants la composant. L'effet délétère d'un taux de mutation élevé est amplifié au sein d'une population de taille réduite, ce qui réduit alors d'autant plus sa vitalité jusqu'à ce qu'elle soit finalement trop basse pour permettre la survie de la population. Ainsi, l'extinction de la population virale observée ne correspond pas au franchissement du seuil d'erreur tel qu'il est envisagé par le modèle des quasiespèces (Nowak *et al.* 1989 ; Gabriel *et al.* 1993 ; Lynch *et al.* 1993 ; Lynch *et al.* 1995 ; Bull *et al.* 2005), mais plutôt ce que l'on nomme une fusion mutationnelle, c'est-à-dire que l'ensemble des mutations est majoritairement délétère, que leurs effets ne peuvent plus être compensés et que, par conséquent, la population ne comprend plus aucun variant viable, capable de faire perdurer la souche virale.

L'atténuation d'un virus par accumulation de mutations est un principe compris depuis longtemps (Maes 1972). En effet, les premiers résultats de mutagenèses létales, réalisées sur des bactéries ainsi que certains virus modèles, ont été décrits à la fin des années 1960 (Halle 1968 ; Pringle 1970). Depuis, ces expériences ont été réalisées sur de nombreux autres virus tels que le poliovirus (Crotty *et al.* 2001 ; Graci *et al.* 2007), le VIH (Loeb *et al.* 1999 ; Dapp *et al.* 2009), LCMV (Ruiz-Jarabo *et al.* 2003 ; Grande-Perez *et al.* 2005), FMDV (Sierra *et al.* 2000 ; Perales *et al.* 2011), VSV (Lee *et al.* 1997), le virus Hantaan (Severson *et al.* 2003), le virus GB-B (Lanford *et al.* 2001) ou certains coronavirus.

La modélisation du mécanisme selon lequel l'augmentation du taux de mutation entraîne l'extinction d'une population virale repose sur deux paramètres (Bull *et al.* 2007). Le premier correspond à la probabilité d'obtenir une mutation présentant un effet négatif (Sanjuan *et al.*

2004 ; Eyre-Walker *et al.* 2007 ; Sanjuan 2010), tandis que le second représente la fécondité du génome (Bull *et al.* 2007). Ce paramètre correspond au nombre de nouvelles particules virales viables produites à partir des génomes parentaux infectant une cellule hôte, capables d'infecter de nouvelles cellules et de réaliser un nouveau cycle infectieux. Le modèle ainsi développé confirme l'importance du taux de mutation vis-à-vis de la survie de la population virale, tel que cela a pu être observé expérimentalement (Holland *et al.* 1990 ; Loeb *et al.* 1999 ; Sierra *et al.* 2000 ; Crotty *et al.* 2001 ; Grande-Perez *et al.* 2002). En effet, de manière exponentielle, la moindre modification du taux de mutation entraîne une forte modification de la taille de la population. Pour exemple, il a notamment été observé pour le VSV qu'une augmentation du taux de mutation d'un facteur 1,7 est responsable de la disparition de plus de 99% de sa population (Holland *et al.* 1990). La survie d'une population virale dépend donc d'un taux de mutation finement ajusté, un changement, même minime, pouvant alors être responsable de son extinction. Ceci permet de penser que les virus à ARN se répliquent en réalité à un taux de mutation proche du seuil d'erreur.

Cependant, il est important de noter que le modèle de mutagenèse létale ne fait pas de distinction entre mutagenèse délétère et létale (Bull *et al.* 2007). De plus, l'extinction d'une population virale dépend, en réalité, de nombreux autres facteurs tels que sa taille initiale, son adaptation au type cellulaire (Pariante *et al.* 2001 ; Domingo *et al.* 2005 ; Perales *et al.* 2011 ; Moreno *et al.* 2012 ; Tejero *et al.* 2016) ainsi que le hasard. L'influence du hasard peut être en effet observée au cours de passages en série d'une même souche virale en présence d'un composé mutagène, lorsque l'extinction n'est pas systématiquement observée pour toutes les populations virales (Sierra *et al.* 2000). On peut ajouter que l'augmentation du taux de mutation peut également développer les effets d'interférences au sein de la population virale, ce qui a pour conséquence également de précipiter son extinction (Gonzalez-Lopez *et al.* 2004 ; Grande-Perez *et al.* 2005 ; Iranzo *et al.* 2009 ; Perales *et al.* 2016). Néanmoins, la mutagenèse létale représente tout de même une approche antivirale intéressante (Perales *et al.* 2016 ; Tejero *et al.* 2016).

IV.4.2. Mécanisme d'action des composés mutagènes

Expérimentalement, les études de mutagenèse létale ont été réalisées en cultivant les organismes d'intérêts dans des milieux contenant des mutagènes, composés chimiques capables d'augmenter le nombre d'erreurs réalisées au cours de la réplication du génome,

selon différents procédés. L'influence de nombreux facteurs environnementaux sur la réplication des génomes, tels que la température ou les concentrations de ressources cellulaires, est étudiée depuis de nombreuses années (Haruna *et al.* 1965 ; Haruna *et al.* 1965 ; Mills *et al.* 1967 ; Sirover *et al.* 1976 ; Weymouth *et al.* 1978). Parallèlement, la diminution de la réplication, bactérienne ou virale, est également étudiée par utilisation de composés chimiques présentant des propriétés mutagènes (Fucik *et al.* 1966 ; Halle 1968 ; Pringle 1970). L'ensemble de ces études a permis de déterminer que les analogues nucléosidiques ainsi que les éléments capables de modifier les concentrations de cations dans les cellules représentent deux classes de molécules capables de modifier la fidélité de réplication de l'ARN.

Les cations intracellulaires, tels que le manganèse Mn^{2+} , sont connus comme cofacteurs des réplases, capables de modifier leur fidélité (Flury *et al.* 1976 ; Sirover *et al.* 1976 ; Kunkel *et al.* 1979 ; Arnold *et al.* 1999) de manière importante (Weymouth *et al.* 1978). Cependant les composés capables d'influer sur leur concentration ont été très peu utilisés dans le cadre d'expériences de mutagenèse létale. Les composés de la famille des amilorides (Kleyman *et al.* 1988) présentent ainsi une activité antivirale pour de nombreux virus comme le VHC (Premkumar *et al.* 2004), le VIH (Ewart *et al.* 2004), le DENV (Premkumar *et al.* 2005), les CoVs (Wilson *et al.* 2006), le LCMV (Iwasaki *et al.* 2014), le virus Coxsackie B3 (Gazina *et al.* 2011) ou bien encore les rhinovirus (Gazina *et al.* 2005). L'activité antivirale de ces composés est réalisée selon deux mécanismes, par inhibition de l'activité de la polymérase virale (Gazina *et al.* 2011) ainsi que par mutagenèse directe du génome viral (Levi *et al.* 2010). Les variants capables de résister à ces composés présentent alors soit une fidélité de réplication augmentée soit une polymérase capable de résister spécifiquement à leur activité inhibitrice de la synthèse d'ARN.

Décrits comme étant capables d'induire des erreurs de copie lors de la réplication du génome, les analogues nucléosidiques permettent ainsi d'augmenter le taux de mutation au sein de la population virale (Halle 1968 ; Pringle 1970). Ce sont les composés les plus utilisés pour la réalisation d'expériences de mutagenèse létale. Parmi ceux-ci, les analogues 5-fluorouracile (5-FU), 5-azacytidine (AZC) et la ribavirine sont les composés les plus utilisés pour ce type d'études (Anderson *et al.* 2004 ; Bonnac *et al.* 2013). Le 5-FU est un analogue pyrimidique qui entraîne majoritairement des mutations de type T→C, C→T et G→A, tandis que l'AZC, analogue de la cytidine, est responsable de mutations C→T, G→A et A→G (Sierra *et al.* 2000 ; Domingo *et al.* 2005 ; Pariente *et al.* 2005 ; Pauly *et al.* 2015). La

ribavirine, mutagène le plus couramment utilisé, est un analogue des purines, responsable de mutations A→G, G→A, C→T (Graci *et al.* 2006).

In vitro, la ribavirine présente une activité antivirale à spectre large (Beaucourt *et al.* 2014) et est utilisée comme traitement thérapeutique, seule ou associée aux interféron- α , pour des cas d'infections par le virus Lassa (McCormick *et al.* 1986), VRS (Krilov 2002) ou les virus des hépatites B ou C (Fried *et al.* 1994 ; Galban-Garcia *et al.* 2000 ; Hofmann *et al.* 2007). La ribavirine inhibe la réplication de l'ARN, en réalité, selon différents mécanismes (Oxford 1975 ; Wray *et al.* 1985 ; Crotty *et al.* 2000 ; Crotty *et al.* 2002 ; Todt *et al.* 2016). L'activité mutagène de ce composé comme mécanisme antiviral effectif a été observée pour de nombreux virus tels que le poliovirus (Crotty *et al.* 2000 ; Crotty *et al.* 2001), le virus West Nile (Day *et al.* 2005), le FMDV (de la Torre *et al.* 1987 ; Airaksinen *et al.* 2003), ou bien le LCMV (Ruiz-Jarabo *et al.* 2003). De plus, il est intéressant de noter que la fréquence de mutation induite semble différer selon les régions du génome viral (Contreras *et al.* 2002 ; Gonzalez-Lopez *et al.* 2004 ; Grande-Perez *et al.* 2005 ; Pariente *et al.* 2005 ; Ojosnegros *et al.* 2008 ; Cuevas *et al.* 2009). La ribavirine ne semble, cependant, pas interagir de la même manière avec les différentes polymérases virales. En effet pour le VIH (Fernandez-Larsson *et al.* 1990), le VSV (Toltzis *et al.* 1988 ; Fernandez-Larsson *et al.* 1989), ou bien le réovirus (Rankin *et al.* 1989), c'est la capacité du composé à inhiber directement l'activité de la polymérase qui semble responsable de son activité antivirale. Pour finir, il est important de souligner que les mécanismes d'inhibition de l'activité polymérase et de mutagénèse létale ne sont pas exclusifs, le virus de l'hépatite C (Maag *et al.* 2001 ; Contreras *et al.* 2002 ; Vo *et al.* 2003 ; Zhou *et al.* 2003 ; Cuevas *et al.* 2009) ou bien les IAV (Eriksson *et al.* 1977 ; Wray *et al.* 1985 ; Cheung *et al.* 2014 ; Pauly *et al.* 2015), sensibles aux deux mécanismes, en sont en effet l'exemple.

IV.4.3. Résistance aux composés mutagènes

Lors de l'utilisation de composés mutagènes au cours d'expériences de mutagénèse létale ou bien dans le cadre de protocoles thérapeutiques, l'émergence d'une résistance des populations virales à ces composés a pu être observée (Young *et al.* 2003 ; Cuevas *et al.* 2009 ; Pennings 2013). Cette résistance peut se développer selon plusieurs mécanismes, en raison des effets pléiotropes des analogues nucléosidiques mutagènes tels que la ribavirine (Scheidel *et al.* 1991 ; Hong *et al.* 2002 ; Sierra *et al.* 2007 ; Arias *et al.* 2008 ; Agudo *et al.* 2010 ;

Beaucourt *et al.* 2014 ; Pauly *et al.* 2015 ; Todt *et al.* 2016). L'augmentation de la fidélité de réplication virale constitue l'un de ces mécanismes. En effet, des mutants dont la polymérase présente une fidélité supérieure à celle de la polymérase virale sauvage, ont pu être isolés après plusieurs passages en série de la population virale en présence de mutagène (Pfeiffer *et al.* 2003 ; Arnold *et al.* 2005 ; Levi *et al.* 2010 ; Sadeghipour *et al.* 2013 ; Zeng *et al.* 2013 ; Zeng *et al.* 2014 ; Borderia *et al.* 2015). Ces mutations au sein de la RdRp permettent à celle-ci de limiter le nombre d'erreurs de copie au cours de la réplication du génome viral par rapport au virus parental. La découverte de ce type de mutants permet d'approfondir notre compréhension de la dynamique des populations virales.

V. Mutants de fidélité de la polymérase

La capacité de mutations à moduler la fidélité de réplication d'un organisme à ADN, qu'elle soit augmentée ou diminuée, a précédemment été étudiée avec *E.coli* ainsi que des levures (Flury *et al.* 1976 ; Gillin *et al.* 1976). Pour *E.coli*, le taux de mutation repose sur la fidélité intrinsèque de sa polymérase, son activité exonucléase de relecture et sa capacité de correction des mésappariements (Schaaper 1993). A l'époque de ces études, puisque les virus à ARN ne présentaient pas d'activité de relecture, il n'était pas envisagé que la fidélité de leur polymérase puisse être modulée.

Des observations similaires ont ensuite été décrites pour des virus à ADN, notamment à l'aide du bactériophage T4 (Muzyczka *et al.* 1972) ainsi que du virus herpes simplex (Hall *et al.* 1984). Les variants observés présentaient soit des mutations ponctuelles (Muzyczka *et al.* 1972), entraînant une modification du taux d'incorporation des nucléotides corrects au cours de la réplication, soit une perte de leur activité de relecture (Reha-Krantz *et al.* 1991). Les rétrovirus ont, ensuite, également été étudiés dans ce sens. En effet des mutations dans la transcriptase inverse, liées à une modification de la fidélité de l'ADN polymérase ARN-dépendante, ont également été décrites pour des souches de VIH résistantes à des composés analogues de bases (Bakhanashvili *et al.* 1996 ; Wainberg *et al.* 1996 ; Keulen *et al.* 1999 ; Mansky *et al.* 2000 ; Dapp *et al.* 2013 ; Sanjuan *et al.* 2016). L'ensemble de ces observations a permis de d'établir que même la fidélité intrinsèque de la polymérase peut être modulée. Ceci a donc ouvert la voie à de nouvelles études dans le but d'évaluer le rôle de la diversité génétique d'une population virale vis-à-vis de sa virulence, sa capacité d'adaptation ou son évolution, à l'aide de virus à ARN présentant une fidélité diminuée ou bien augmentée.

V.1. Mutants de fidélité des virus à ARN

Le premier virus à ARN présentant une fidélité de réplication augmentée a été isolé après passages successifs d'une souche de poliovirus en présence de ribavirine. La mutation G64S au sein de la polymérase virale, a ainsi été identifiée indépendamment par deux laboratoires (Pfeiffer *et al.* 2003 ; Vignuzzi *et al.* 2006). Cette mutation unique confère au virus une résistance à la ribavirine mais également à d'autres mutagènes, une capacité réduite à engendrer des mutants d'échappement vis-à-vis de certains antiviraux mais ne modifie pas sa capacité de réplication par rapport à la souche parentale (Pfeiffer *et al.* 2003 ; Vignuzzi *et al.* 2006). La fidélité de la polymérase G64S est ainsi décrite comme quatre fois supérieure à celle de la polymérase sauvage tandis que la diminution de la diversité de la population virale semble liée à une baisse de vitalité *in vivo* (Arnold *et al.* 2005 ; Pfeiffer *et al.* 2005 ; Vignuzzi *et al.* 2008). Ces résultats ont apporté la preuve que la fidélité intrinsèque de la polymérase des virus à ARN pouvait être modifiée, augmentée dans ce cas.

Selon ce protocole, de nombreux autres mutants de fidélité de la polymérase ont pu être isolés pour différents virus tels que le CVB3, l'entérovirus 71, le FMDV, le CHIKV ou le WNV (Sanjuan *et al.* 2016). L'ensemble des mutants présentant une variation de la fidélité de leur polymérase, qu'elle soit améliorée ou diminuée, a récemment été passé en revue par Borderia *et al.* (Borderia *et al.* 2015). Il a ainsi été déterminé que la majorité des mutations obtenues selon la stratégie de passage en série en présence de composés mutagènes, entraîne une résistance par variation de la fidélité de la RdRp (Zeng *et al.* 2014 ; Sanjuan *et al.* 2016). Des souches de VIH isolées à partir d'échantillons cliniques et présentant des mutations responsables d'une augmentation de leur fidélité ont également été observées, lors de cas de résistances aux traitements antiviraux (Borderia *et al.* 2015 ; Sanjuan *et al.* 2016).

A l'inverse de ces mutants, d'autres mutations capables de diminuer la fidélité de réplication ont également été décrites. Celles-ci ont été observées pour plusieurs virus comme le FMDV, le VIH, le poliovirus, le CVB3 ou bien le CHIKV (Borderia *et al.* 2015). Pour obtenir ces variants, plusieurs stratégies ont été employées, telles que la mutagenèse dirigée de résidus, proches de sites actifs ou à partir de prédictions basées sur la structure des polymérases, ou encore en supprimant l'activité exonucléase de relecture des coronavirus (Smith *et al.* 2014 ; Borderia *et al.* 2015).

L'étude de l'ensemble de ces mutants permet d'évaluer l'impact de la modification de la fidélité de réplication sur la dynamique des populations virales (Borderia *et al.* 2015). *In vitro*, il apparaît un compromis entre fidélité et cinétique de réplication, les polymérases ayant une

fidélité augmentée sont en effet plus lentes que la polymérase parentale, tandis que les polymérases dont la fidélité est diminuée présentent une cinétique plus rapide. En contexte infectieux en culture cellulaire, les mutants de haute ou basse fidélité semblent se multiplier essentiellement comme la souche sauvage, c'est-à-dire atteindre des titres similaires, mais présentent une vitalité réduite lorsqu'ils sont en compétition avec le virus parental. Les virus dont l'activité de relecture a pu être supprimée font exception à cette tendance. L'absence de cette capacité semble entraîner inévitablement une diminution de la capacité des populations virales à se développer, les titres atteints restants inférieurs à ceux des virus parentaux. *In vivo*, la séquence consensus des populations virales des mutants reste identique à celle de la population parentale, bien que les différents mutants génèrent plus ou moins de mutations. Contrairement à ce qui peut être observé en culture cellulaire, les mutants de fidélité en contexte animal sont généralement atténués. Ces mutants présentent ainsi une pathogénicité diminuée mais également une plus grande sensibilité aux traitements antiviraux ou encore une modification de leur tropisme, c'est-à-dire une incapacité à disséminer et coloniser certains organes habituellement ciblés. Ces observations mettent en lumière l'importance de la diversité au sein des populations virales et le rôle des quasiespèces et de leurs interactions, vis-à-vis de la virulence des virus, leur survie, leur tropisme ou bien encore la progression des pathologies. Certaines exceptions ont cependant été décrites pour des virus dont la fidélité de la polymérase est diminuée (Borderia *et al.* 2015). Ces virus ne présentent, en effet, pas d'atténuation lors de l'infection chez l'animal, mais ne présentent pas non plus une forte modification de leur taux de mutation, ce qui suggère qu'il existe un seuil en dessous duquel le taux de mutation n'affecte pas la virulence. Ce seuil semble vraisemblablement dépendant du virus et de sa capacité à supporter l'augmentation de mutations au sein de sa population.

V.2. Virus influenza et mutants de fidélité

Les virus cités précédemment et pour lesquels plusieurs mutants de fidélité ont été décrits sont tous des virus à ARN de polarité positive et la majorité de ces génomes est monocaténaire. A l'inverse, les virus influenza possèdent un génome de polarité négative segmenté, ce qui les rend bien plus sensibles à la mutagenèse létale que les autres virus (Grande-Perez *et al.* 2005), que ce soit avec la ribavirine, le 5-AZC ou le 5-FU (Pauly *et al.* 2015 ; Stevaert *et al.* 2016). En effet, l'extinction de la population virale peut être observée en très peu de passages, même en utilisant de faibles concentrations de mutagènes (Pauly *et al.* 2015). Cette sensibilité aux mutagènes, due au mode de réplication de ces virus, est également amplifiée par la génération de particules défectives interférentes. L'utilisation de ces composés augmente leur accumulation, ce qui diminue donc la probabilité d'apparition de mutations viables au sein de la population virale plutôt que dans les génomes défectifs (Pauly *et al.* 2015).

Un mutant présentant une résistance accrue à la ribavirine a cependant été obtenu, récemment, par passage en série en présence de ce composé (Cheung *et al.* 2014). La mutation V43I ainsi décrite est portée par la protéine PB1, est associée à une augmentation de la fidélité de la polymérase et est atténué *in vivo*.

A partir de segments PB1 mutés de manière aléatoire, la mutation D27N a aussi été décrite comme responsable d'une augmentation de la fidélité de la polymérase virale (Binh *et al.* 2014). La mutation D27N a également été obtenue par passages successifs en présence de ribavirine, dans une autre étude (Pauly *et al.* 2015). Il est intéressant de souligner que, dans cette dernière étude, les populations virales traitées avec différents mutagènes ne présentent qu'une simple augmentation de la fréquence des mutations déjà présentes dans les population produites en condition standard, sans mutagène. De plus, aucune des mutations présente à fréquence élevée ne confère de résistance générale aux différents composés. Ainsi, la mutation D27N n'est observée que dans une population sur trois en présence de mutagène, avec une fréquence de 2,5% seulement, tandis que la mutation V43I n'est pas du tout détectée. Ceci semble indiquer que la stratégie d'obtention de mutants de fidélité par passages en série en présence de composés mutagènes n'est sans doute pas la mieux adaptée pour les virus influenza.

Finalement, peu d'études se sont donc intéressées à la fidélité de réplication des virus à ARN de polarité négative ainsi qu'aux facteurs responsables de sa modulation. Seuls deux mutants de fidélité ont pu être décrits mais, ne semblent pas démontrer d'effets aussi marqués

que ceux observés pour des mutations modulant la fidélité de réplication pour d'autres virus. Les nombreux mutants décrits permettent d'observer que plusieurs mutations au sein d'une même polymérase virale peuvent aboutir à des variations du taux de mutation de leur génome. L'objectif de ce projet est donc d'approfondir la compréhension des facteurs permettant de moduler la fidélité de la polymérase des virus influenza de type A. Pour cela nous sommes notamment intéressés à la sous-unité catalytique PB1 du complexe polymérase, responsable de l'activité ARN polymérase ARN-dépendante. A partir de banques de segments codant pour la protéine PB1, mutés de manière aléatoire, nous avons cherché à identifier les résidus capables d'avoir une influence sur la fidélité de la réplication virale. Plus particulièrement, nous avons cherché à obtenir des mutants dont la fidélité est augmentée par rapport à la souche sauvage en les sélectionnant selon leur capacité à résister à la ribavirine. Les mutants ainsi isolés nous permettront d'améliorer la cartographie du segment PB1, d'identifier les résidus impliqués dans la régulation du taux de mutation mais également de disposer de nouveaux outils pour étudier la dynamique des populations d'IAV dont la fidélité de réplication est altérée.

Matériel & Méthodes

I. Cellules, virus et plasmides

I.1. Cellules

Les cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), dérivées d'un épithélium rénal de chien, sont cultivées en milieu minimum de Eagle (MEM), supplémenté par 5 % de sérum de veau fœtal (SVF).

Les cellules MDCK-SIAT, cellules MDCK transfectées de manière stable avec un ADNc humain codant pour la 2,6-sialyltransferase (SIAT1), surexpriment l'acide sialique α 2-6. Elles sont également cultivées en milieu MEM, supplémenté par 5 % de sérum de veau fœtal (SVF).

Les cellules HEK-293T (Human Embryonic Kidney 293T), dérivées de cellules rénales d'embryon humain et transformées par l'antigène T du virus SV40, sont cultivées en milieu minimum de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM), supplémenté par 10% de SVF.

De la pénicilline à 100 U/mL et de la streptomycine à 100 μ g/mL sont ajoutées aux milieux de culture. Les cellules sont incubées dans une étuve humide à 37°C et à 5% de CO₂.

I.2. Virus

Les virus A/Bretagne/7608/2009(H1N1)pdm09 pandémique et A/Centre/1003/2012(H3N2) ont été isolés par le Centre National de Référence France Nord. Les virus notés « H1N1p » et « H3N2 » par la suite ont été obtenus par génétique inverse à partir des cADN clonés des virus A/Bretagne/7608/2009(H1N1)pdm09 et A/Centre/1003/2012(H3N2) respectivement. Les virus issus de la génétique inverse sur co-culture de cellules MDCK et HEK-293T, ont été amplifiés en cellules MDCK (cf VI.1.).

I.3. Plasmides

Les plasmides pRF-X-H1N1p et pRF-X-H3N2 contiennent l'ADNc « X » de chacun des 8 segments génomiques (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS) des souches A/Bretagne/7608/2009(H1N1)pdm09 pandémique et A/Centre/1003/2012(H3N2), respectivement. Pour ce faire, les ARN viraux ont été extraits et ont subi une transcription

inverse, suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) à l'aide d'oligonucléotides spécifiques de chacun des 8 segments génomiques. Les produits de chaque amplification ont été sous-clonés dans le vecteur pRF483 (fourni par R. Fouchier, Erasmus Medical Center, Pays-Bas) pour obtenir des plasmides de génétique inverse dits bidirectionnels. En orientation sens, la séquence est sous la dépendance du promoteur du Cytomégalovirus (CMV) en 5' et du signal de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine en 3', permettant ainsi la synthèse d'ARNm et donc la production des protéines virales. En orientation anti-sens, la séquence est sous la dépendance du promoteur humain de l'ARN polymérase I en 5' et de la séquence ribozyme du virus de l'hépatite delta en 3', permettant ainsi une initiation et une terminaison exacte de la transcription des ARNv pour chaque segment.

Les plasmides pCI-neo-PB2-, -PA-, -NP-H1N1p/-H3N2 contiennent respectivement les ADNc codant pour les protéines PB2, PA et NP des virus H1N1p ou H3N2, clonés dans un vecteur d'expression pCI-neo (*Promega*), sous la dépendance du promoteur du CMV.

Le plasmide rapporteur pPR7-Firefly permet l'expression d'un ARN pseudo-viral contenant la séquence de la luciférase Firefly en orientation anti-sens, flanquée des séquences non-codantes du segment NS des virus influenza de type A, sous le contrôle du promoteur Poll.

Le plasmide rapporteur pCMV-Renilla contient la séquence de la luciférase Renilla en orientation sens, sous la dépendance du promoteur du CMV, permettant la synthèse de l'ARNm codant pour la synthèse de la luciférase Renilla.

II. Mutagénèse dirigée

Les mutations dans la séquence codant pour la protéine PB1 ont été introduites par mutagénèse dirigée réalisée sur les plasmides de génétique inverse pRF-PB1, contenant l'ADNc du segment PB1, à l'aide du kit Quick Change II (*Agilent Technologies*). Les amorces de PCR permettant d'introduire les mutations souhaitées sont dessinées selon les recommandations du fournisseur du kit. La matrice présente dans le milieu réactionnel de la PCR est spécifiquement hydrolysée 1h à 37°C par l'enzyme de restriction *DpnI*. Des bactéries supercompétentes XL1-Blue fournies dans le kit sont alors transformées par choc thermique, 45 sec à 42°C avec 1µl de produit de PCR traité préalablement avec l'enzyme *DpnI*. Après 1h d'incubation à 37°C sous agitation, dans du milieu SOC, les bactéries sont étalées sur milieu

de sélection Luria-Bertani (LB) gélosé, contenant 100µg/ml d'ampicilline, et incubées pendant la nuit à 37°C. Des colonies individuelles sont ensuite amplifiées en milieu LB liquide, contenant de l'ampicilline à 100µg/ml, à 37°C sous agitation durant la nuit. L'ADN plasmidique est finalement extrait à l'aide du kit Plasmid DNA purification (*Macherey-Nagel*). L'introduction des mutations souhaitées est vérifiée par séquençage selon la méthode de Sanger, grâce à des amorces spécifiques de la séquence PB1 (plateforme Eurofins, Institut Cochin, Paris).

III. Mutagenèse aléatoire et génération de banques de séquences mutées

III.1. Mutagenèse aléatoire

Les mutations dans la séquence du segment codant pour la protéine PB1, portée par le plasmide de génétique inverse pRF-PB1, ont été introduites de manière aléatoire à l'aide du kit GeneMorph II EZClone Domain Mutagenesis (*Agilent Technologies*), en utilisant des amorces externes spécifiques des extrémités 5' et 3' du segment PB1, 500ng de matrice pRF-PB1 et 20 cycles de PCR réalisés selon les indications du fabricant. L'enzyme utilisée pour cette étape est la Mutazyme II DNA polymerase qui présente une faible fidélité de réplication afin d'introduire des mutations aléatoires et réparties de manière uniforme sur la totalité du segment amplifié. Le produit de PCR obtenu est purifié après électrophorèse en gel d'agarose, à l'aide du kit NucleoSpin® Gel and PCR clean-up (*Macherey-Nagel*). Le produit purifié est ensuite utilisé comme amorce de PCR de mutagenèse dirigée sur le plasmide de génétique inverse contenant l'ADNc correspondant au segment PB1. La matrice utilisée pour la PCR est dégradée 2h à 37°C par l'enzyme de restriction *DpnI*. Des bactéries ultracompétentes XL10-Gold fournies dans le kit sont alors transformées par choc thermique selon la procédure décrite par le fabricant, 30 sec à 42°C avec 1,5µl de produit de PCR traité avec l'enzyme *DpnI*. Les bactéries transformées sont ensuite traitées selon la même procédure que pour la mutagenèse dirigée (cf. §II) : incubation en milieu SOC liquide, étalement sur milieu de sélection gélosé, amplification de colonies isolées et extraction de l'ADN plasmidique. Les mutations introduites sont analysées par séquençage selon la méthode de Sanger, en utilisant des amorces spécifiques de la séquence PB1 (plateforme Eurofins, Institut Cochin, Paris).

III.2. Génération de banques de séquences mutées

Les produits de PCR sélectionnés, traités préalablement avec l'enzyme *DpnI*, sont utilisés en totalité pour transformer des bactéries DH5 α rendues électrocompétentes, par lavages successifs à l'eau stérile afin d'éliminer toutes traces de sels. La transformation est réalisée par choc électrique, à 2000V pendant environ 2,5 millisecondes avec un appareil Easyject Optima. Après 1h d'incubation à 37°C sous agitation, dans du milieu SOC, les bactéries sont étalées sur milieu de sélection LB gélosé, contenant 100 μ g/ml d'ampicilline, et incubées pendant la nuit à 37°C. La totalité des colonies obtenues est ensuite récupérée par grattage de la surface des milieux de sélection afin de toutes les réunir. Enfin, les ADN plasmidiques sont extraits à l'aide du kit NucleoBond Xtra Maxi Plus (*Macherey-Nagel*).

IV. Evaluation de l'activité de la polymérase virale par reconstitution transitoire de RNPv

L'activité polymérase des complexes viraux est mesurée par co-transfection de cellules avec les plasmides d'expression pCI-neo-PB2, -PA, -NP, le plasmide de génétique inverse pRF-PB1 portant l'ADNc du segment PB1 sauvage ou muté, ainsi que les plasmides rapporteurs pPR7-Firefly et pCMV-Renilla. La mesure de l'activité de la luciférase Firefly dans le lysat cellulaire reflète l'efficacité de transcription et de réplication de l'ARN pseudo-viral. Celle-ci est normalisée par la mesure de l'activité de la luciférase Renilla, témoin de l'efficacité de la transfection.

Des cellules HEK-293T sontensemencées à 3.10⁴ cellules/puits dans des plaques blanches de 96 puits à fond plat, dans du milieu de culture DMEM (*Gibco*) sans rouge phénol ni antibiotiques, supplémenté par 10% de SVF. Les cellules sont transfectées avec un mélange contenant 25ng de chaque plasmide d'expression de PB1 (sauvage ou muté), PB2, PA, 50ng de plasmide exprimant la NP et 5ng de chacun des 2 plasmides rapporteurs, dilués dans de l'OptiMEM (*Gibco*). Ce mélange de plasmides est incubé pendant 20mn avec un mélange OptiMEM-Polyéthylèneimine (PEI, *Sigma*) avec un rapport PEI/ADN plasmidique égal à 3, dans un volume de transfection final de 20 μ l. Les mesures de l'activité luciférase sont réalisées 24h ou 48h post-transfection (h p.t.) pour les complexes polymérase de sous-type H3N2 et H1N1p respectivement, après incubation des cellules dans une étuve humide à 35°C et 5% de CO₂. Les activités luciférase Firefly puis Renilla sont mesurées selon le protocole du

kit Dual-Glo Luciferase Assay (*Promega*) avec un luminomètre Centro XS LB960 (*Berthold*). Dans chaque puits sont ajoutés 50µl du premier réactif, contenant un détergent doux, pour lyser les cellules, et un substrat de la luciférase Firefly. Après 10mn d'incubation à température ambiante, le signal de luminescence est enregistré pendant 1s par puits par le luminomètre. Ensuite, 50µl du second réactif contenant un inhibiteur de la luciférase Firefly et un substrat spécifique de la luciférase Renilla, sont ajoutés dans chaque puits. Pour s'assurer de la spécificité des signaux mesurés, des cellules sont co-transfectées selon le même protocole mais sans inclure le plasmide d'expression de PB1. Cette condition contrôle permet d'évaluer le bruit de fond de l'activité de la luciférase Firefly.

V. Génétique inverse

Des cellules HEK-293T et MDCK sont ensemencées en co-culture, respectivement à 4.10^5 et 3.10^5 cellules par puits, dans des plaques 6 puits. Le lendemain, les cellules sont transfectées avec un mélange contenant 10µl de transfectant FuGENE HD (*Promega*), 90µl d'OptiMEM (*Gibco*) et 0,5µg de chacun des 8 plasmides de génétique inverse pRF-X, correspondant à chacun des 8 segments viraux spécifiques de la souche virale étudiée. Les cellules sont incubées 24h, à 35°C et 5% de CO₂ dans une étuve humide. Le lendemain, les cellules sont rincées deux fois avec du DMEM puis incubées dans une étuve humide, à 35°C et 5% de CO₂, avec 2ml de DMEM contenant 0,5µg/ml de trypsine-TPCK (trypsine traitée avec le L-1-tosylamido-2-phényléthyl chlorométhyl cétone, *Coger*), nécessaire au clivage de la HA des virions nouvellement produits dans le milieu afin que ceux-ci puissent être infectieux. Après 48h, le milieu de culture est récolté et clarifié par centrifugation 5mn à 2000g pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant de culture, C0, est conservé à -80°C et la suspension virale est titrée par la méthode des plages de lyse.

VI. Amplification, titrage et cinétiques de multiplication virale

VI.1. Amplification des stocks viraux

Les virus issus de la génétique inverse ou les stocks viraux sont amplifiés en cellules MDCK, en milieu MEM supplémenté en trypsine-TPCK à 2µg/ml, à une multiplicité d'infection (multiplicity of infection, m.o.i.) contrôlée de 10^{-3} particules virales infectieuses par cellule. Après 48h d'incubation, à 35°C et en 5% de CO₂ dans une étuve humide, le surnageant de culture est collecté, clarifié par centrifugation, congelé à -80°C et titré.

VI.2. Titrage viral par la méthode des plages de lyse

Des cellules MDCK-SIAT sontensemencées à $5 \cdot 10^5$ cellules/puits en plaques 12 puits. Après 24h, les cellules sont rincées une fois avec du DMEM, puis inoculées avec 400µl de suspension virale diluée en série au $1/10^{\text{ème}}$, dans du milieu MEM. Après 1h d'adsorption à 35°C, 2ml d'un mélange volume à volume de MEM 2X pH7 et d'Avicel 2,4% (24mg/mL, *FMC BioPolymer*), additionné de 2µg/mL de trypsine-TPCK, sont ajoutés à chaque puits. Les cellules sont ensuite incubées 72h dans une étuve humide à 35°C et en 5% de CO₂. Les plages de lyse sont révélées par fixation et coloration du tapis cellulaire avec une solution de cristal violet (10%), formaldéhyde (10%) et éthanol (20%).

VI.3. Cinétique de multiplication virale

Des cellules MDCK sontensemencées en plaques 6 puits, à 10^6 cellules/puits. Le lendemain, les cellules sont rincées avec du DMEM puis inoculées avec 400µl de suspension virale, diluée dans du milieu MEM, à une m.o.i. de 10^{-3} . L'inoculum est retiré après 1h d'adsorption à 35°C, les cellules sont rincées avec du DMEM, puis 2,5ml de MEM, supplémenté en trypsine-TPCK à 2µg/ml sont ajoutés dans chaque puits. Les cellules sont alors incubées à 35°C et en 5% de CO₂.

Un partie du surnageant est prélevée à 0, 24, 48 et 72h post-infection (p.i.), en vue du titrage par la méthode des plages de lyse.

Si la cinétique de multiplication est réalisée en présence de mutagène, les cellules rincées avec du DMEM doivent d'abord être pré-incubées, avant inoculation, entre 2h et 3h à 37°C,

avec 2ml de MEM supplémenté en trypsine-TPCK à 2 μ g/ml contenant le composé mutagène à la concentration souhaitée. Après les étapes d'adsorption et de rinçage, les cellules sont incubées avec 2,5ml de MEM supplémenté en trypsine-TPCK à 2 μ g/ml contenant le composé mutagène à la concentration déterminée.

VII. Test de viabilité cellulaire

La viabilité des cellules en présence de différentes concentrations de mutagène est évaluée avec le kit CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (*Promega*). Le réactif contient un tampon permettant de lyser les cellules, la luciférase Ultra Glo Recombinant Luciferase ainsi que son substrat. L'activité enzymatique est dépendante de la concentration d'ATP, reflétant l'activité métabolique des cellules. Le signal luminescent est enregistré pendant 1s par puits au luminomètre Centro XS LB960 (*Berthold*).

VIII. Analyse des ARN viraux

VIII.1. Détermination du nombre de copies d'ARN viral par RT-qPCR

Les ARN viraux sont extraits des stocks viraux C2 à l'aide du kit QIAamp Viral RNA (*Qiagen*). En utilisant un couple d'amorces et une sonde, fournis par le Centre National de Référence (CNR) et spécifiques du segment viral M, ainsi que le kit Superscript III Platinum One-Step qRT-PCR (*Invitrogen*), les ARN viraux sont soumis à une transcription inverse suivie immédiatement par une PCR quantitative. Une partie des ARN extraits sont placés, en duplicat, dans un volume réactionnel final de 20 μ l comprenant 5 μ l d'ARN, les amorces et la sonde du CNR (0,5 μ M), un tampon de réaction optimisé par le fabricant, ainsi que la polymérase SuperScript III RT (2UI/ μ l), pour la synthèse de l'ADN complémentaire, et l'ADN polymérase Taq Platinum (2UI/ μ l), pour l'amplification. Les mélanges réactionnels sont placés dans un thermocycleur en temps réel (LightCycler 480, *Roche*) programmé ainsi : 15mn à 45°C pour la transcription inverse ; 3mn à 95°C pour l'étape de dénaturation ; l'amplification se déroule ensuite sur 50 cycles de 10s à 95°C, 10s à 55°C, 20s à 72°C, c'est pendant cette étape que les signaux émis par les sondes sont quantifiés. La procédure sera finalement terminée par 30s à 40°C. Pour chaque réaction, la quantification de la séquence

cible, exprimée en cycle seuil (CP), est comparée à celle d'une gamme de transcrits dont le nombre de copies est connu afin de déterminer le nombre de copies d'ARN présentes dans les échantillons testés.

VIII.2. Validation des séquences virales

Les ARN viraux sont extraits des stocks viraux C2 à l'aide du kit QIAamp Viral RNA (*Qiagen*) et rétro-transcrits à partir de l'amorce Uni1 complémentaire des 12 premiers nucléotides conservés à l'extrémité 3' des 8 segments, selon le protocole du kit Accuscript High Fidelity 1st Strand cDNA synthesis (*Agilent Technologies*). L'ADN complémentaire est amplifié par PCR à l'aide de l'enzyme Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (0,02 U/ μ l, *Thermo Scientific*) avec un couple d'amorces spécifique du sous-type et complémentaire des extrémités 5' et 3' de la région codante de la séquence PB1. Après amplification (30s à 98°C ; 35 cycles de 10s à 98°C, 20s à 64°C, 1mn20s à 72°C ; et 8mn à 72°C), la qualité du produit de PCR est contrôlée par analyse de 5 μ l du produit de PCR, par électrophorèse en gel d'agarose à 1% contenant du bromure d'éthidium (BET) à 0,5 μ g/ml. La totalité du produit de PCR obtenu est ensuite purifiée après électrophorèse en gel d'agarose 1%, selon la procédure du kit Nucleospin® Gel and PCR Clean-up (*Macherey-Nagel*). La séquence codante de PB1 est finalement contrôlée par séquençage selon la méthode Sanger, à l'aide d'amorces spécifiques de la séquence PB1 (plateforme Eurofins, Institut Cochin, Paris).

VIII.3. Analyse des séquences virales par NGS

L'analyse NGS des séquences virales a été réalisée par la plateforme Pibnet à l'Institut Pasteur qui utilise le kit de préparation Nextera XT DNA Library Preparation (Illumina), le système de séquençage NextSeq 500 (Illumina) et le logiciel CLC Genomics Workbench 9 (Qiagen) pour l'analyse informatique.

Résultats

I. Développement de banques de séquences PB1 mutées aléatoirement

Afin d'évaluer dans quelle mesure des variations génétiques du complexe polymérase permettent de moduler la fidélité de réplication des virus influenza de type A, l'ensemble des résidus de la sous-unité PB1 du complexe polymérase qui porte d'activité ARN polymérase ARN dépendante ont été mutés de manière aléatoire pour chacun des sous-types viraux H1N1p et H3N2.

Chaque séquence PB1 a d'abord été amplifiée par PCR à l'aide d'une polymérase ADN-dépendante de faible fidélité, afin d'introduire des mutations de manière aléatoire et homogène tout au long du segment. Les produits de PCR obtenus ont ensuite été purifiés et utilisés comme amorces de PCR afin de substituer les séquences PB1 sauvages par les séquences PB1 mutées dans des plasmides de génétique inverse bidirectionnels pRF-PB1, selon le principe de la mutagenèse dirigée décrit Figure 15. Pour évaluer le taux de mutations des banques de plasmides obtenues, une partie a été utilisée pour transformer des bactéries compétentes. Les séquences PB1, portées par les plasmides isolés et purifiés à partir de 20 colonies indépendantes pour chaque banque, ont alors été séquencées sur la totalité du gène afin d'évaluer la diversité des séquences codantes. Plusieurs conditions de mutagenèse aléatoire ont été testées, en modifiant deux facteurs : le nombre de cycles de PCR (20 ou 27 cycles) et la quantité initiale de matrice (100 ou 500 ng) avec pour objectif d'obtenir un taux de mutation compris entre 1 et 3 acides aminés mutés par séquences. Ce taux moyen correspond à un compromis entre d'une part, un taux de mutations trop élevé qui serait délétère, voire létal, et ne permettrait pas d'isoler des mutations spécifiquement impliquées dans la fidélité et, d'autre part, un taux de mutation trop faible qui ne permettrait pas d'obtenir une diversité de séquence suffisante pour évaluer l'implication de l'ensemble des résidus vis-à-vis de la fidélité de réplication de la polymérase. En effet, avec un taux de mutation trop faible, les séquences seraient majoritairement identiques à la séquence parentale et les séquences mutées trop minoritaires pour induire un effet détectable.

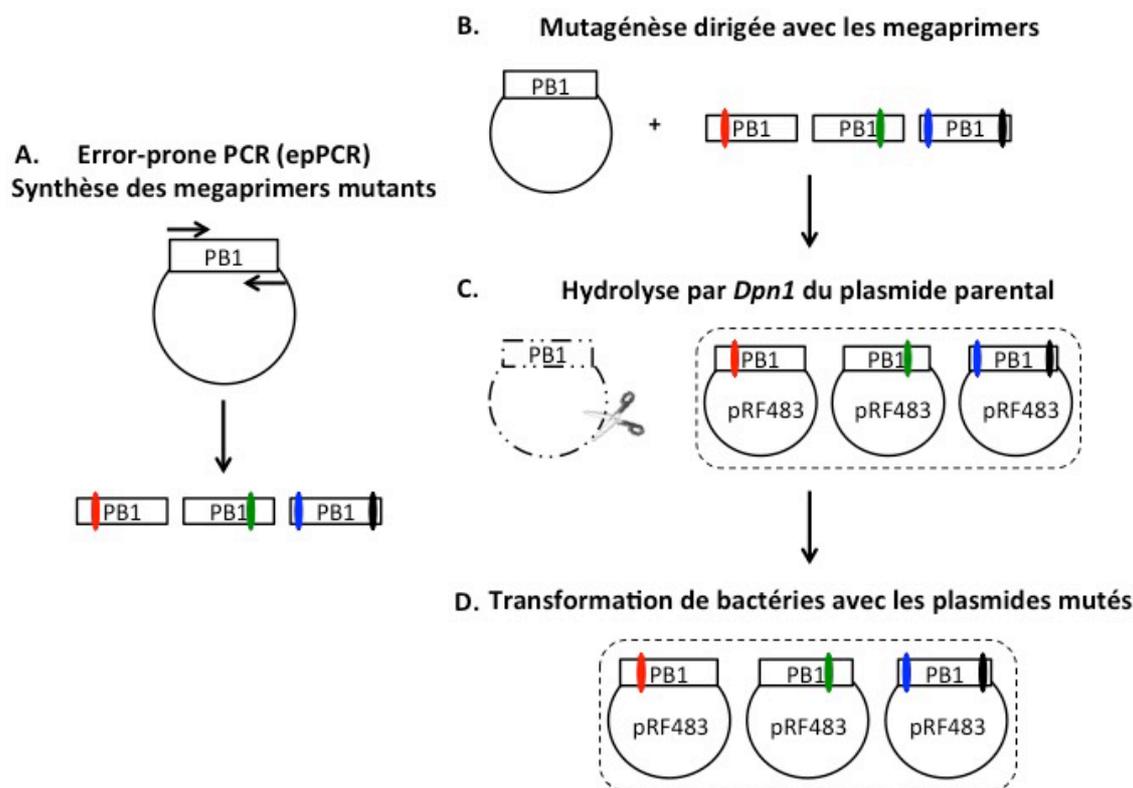


Figure 15 - Principe de la mutagenèse aléatoire du gène PB1.

A) Une PCR avec erreurs (epPCR) est d'abord réalisée avec une polymérase à basse fidélité sur la séquence de l'ADNc de PB1 clonée dans le plasmide pRF483 à l'aide d'amorces encadrant la séquence codante de PB1. Différents paramètres (quantité de matrice, nombre de cycles) sont ajustés selon le taux de mutations souhaité. B) Les produits de PCR purifiés sont eux-mêmes utilisés comme amorces (mégaprimers) dans une étape de mutagenèse dirigée pour réintroduire les séquences mutées aléatoirement dans un plasmide. Après traitement avec l'enzyme de restriction *Dpn1* afin d'éliminer les plasmides parentaux non mutés (C) et transformation de bactéries (D), une banque de séquences PB1 mutées est obtenue.

Avec 100ng de matrice et 27 cycles de PCR, selon les recommandations du fabricant, le taux moyen de mutations obtenu était de 8,6 substitutions d'acides aminés par séquence pour chacun des sous-types (Tableau 1), ce qui était bien trop éloigné de notre objectif. Une augmentation de la quantité de matrice à 500ng a permis de diminuer le taux de mutation moyen des séquences. Ainsi, avec 27 cycles de PCR, un taux de 3,5 et 4,2 substitutions par séquence a été obtenu, pour les sous-types H1N1p et H3N2, respectivement, tandis que 20 cycles ont permis d'obtenir un taux de 2,7 substitutions d'acides aminés par séquence pour les deux sous-types. Les banques de séquences H1N1p et H3N2 ainsi obtenues présentent par ailleurs un taux de 3,7 et 3,8 substitutions nucléotidiques par séquence, un faible taux d'insertions-délétions de 0,005 et 0,1 ainsi qu'un faible taux de codons d'arrêt de traduction de 0,15 par séquence (Tableau 2). L'ensemble des plasmides contenant les séquences PB1

mutées dans ces conditions a été utilisé pour transformer des bactéries DH5 α compétentes. Les colonies obtenues ont été regroupées et les plasmides purifiés pour constituer deux banques de plasmides contenant les séquences PB1 mutées de sous-type H1N1p et H3N2.

Tableau 1 - Taux de mutation observé lors des expériences de mutagenèse aléatoire selon la quantité de matrice et le nombre de cycles de PCR.

Sous-type	H1N1p			H3N2	
Quantité de matrice (ng)	100ng	500ng	500ng	500ng	500ng
Nombre de cycles de PCR	27	27	20	27	20
Taux de mutation (aa/séquence)*	8,6	4,2	2,7	3,5	2,7

* : taux de mutation évalué par séquençage Sanger d'un échantillon de chaque banque de séquences PB1.

Tableau 2 - Caractéristiques des séquences PB1 mutées issues des banques retenues.

Taux (modifications/séquence)*	H1N1p	H3N2
Substitutions (acides aminés)	2,7	2,7
Substitutions (nucléotides)	3,8	3,7
Insertions / Délétions	0,05	0,1
Codons STOP	0,15	0,15

* : taux évalués par séquençage Sanger d'un échantillon de chaque banque de séquences PB1.

II. Sélection de mutants de PB1 conférant une résistance à la ribavirine

Dans plusieurs modèles viraux (Binh *et al.* 2014 ; Cheung *et al.* 2014 ; Borderia *et al.* 2015 ; Sanjuan *et al.* 2016), une augmentation de la fidélité de réplication a pu être corrélée à une résistance plus efficace aux mutagènes. La comparaison de l'activité de la polymérase en absence ou en présence de ribavirine a donc été utilisée pour sélectionner des mutants présentant une résistance accrue au composé mutagène.

Pour les virus influenza, la protéine PB1 est la sous-unité catalytique du complexe polymérase viral associé à chacune des ribonucléoprotéines virales (RNPv). Des expériences de reconstitution transitoire de complexes de transcription/réplication fonctionnels, ou minigénomes, permettent d'étudier spécifiquement l'activité de ce complexe (Fig.16).

Les banques de séquences PB1 mutées de chaque sous-type ont été subdivisées en 10 sous-banques. Des expériences de minigénomes ont été réalisées avec chacune des banques de PB1 mutées en absence et en présence de ribavirine. Pour cela, des cellules HEK-293T ont été transfectées avec les plasmides d'expression codant pour l'ensemble des protéines nécessaires à la formation de RNPv, pCI-neo-PB2, -PA, -NP ainsi que les plasmides pRF-PB1 porteurs des séquences PB1 mutées ou sauvages. Deux plasmides rapporteurs ont également été transfectés. Le plasmide pPR7-Firefly qui dirige l'expression d'un ARN pseudo-viral comportant les séquences non-codantes du segment NS encadrant la séquence codante de la luciférase Firefly en antisens, permet d'acquérir un signal luciférase Firefly relatif à l'activité intrinsèque de transcription/réplication de la polymérase virale. Le plasmide pCMV-Renilla, permet d'acquérir un signal luciférase Renilla, et rend compte de la qualité de la transfection. Les concentrations de ribavirine utilisées pour ces expériences ont été déterminées pour diminuer l'activité des polymérases sauvages d'environ 90%. Ainsi, en présence de 50 μ M et 125 μ M de ribavirine, les complexes polymérases H3N2 et H1N1p possédant une sous-unité PB1 non mutée présentaient une activité résiduelle d'environ 10% de l'activité observée en absence de mutagène. Les mutations de PB1 décrites précédemment, D27N (Binh *et al.* 2014) et V43I (Cheung *et al.* 2014), qui diminuent la sensibilité du complexe polymérase à la ribavirine ont été utilisées comme témoins. Ces mutations ont été introduites par mutagenèse dirigée dans les séquences codant pour la protéine PB1 de chaque sous-type dans le plasmide de génétique inverse bidirectionnel pRF-PB1.

Lors des expériences de minigénome, les activités en absence et en présence de ribavirine des différentes RNPv comportant une PB1 mutée ont été comparées à l'activité des RNPv comportant la protéine PB1 non mutée.

Chaque expérience a été reproduite trois fois, de manière indépendante. L'acquisition des résultats de ces expériences se fait ensuite en deux temps, à l'aide d'un luminomètre. Le premier signal observé correspond à la luminescence émise par la luciférase Firefly et le second est émis par la luciférase Renilla. Le signal de luminescence émise par la luciférase Firefly, qui correspond à l'activité de la polymérase, a été normalisé par rapport au signal émis par la luciférase Renilla qui reflète la qualité de la transfection. Les activités normalisées ont été utilisées pour réaliser les analyses comparatives.

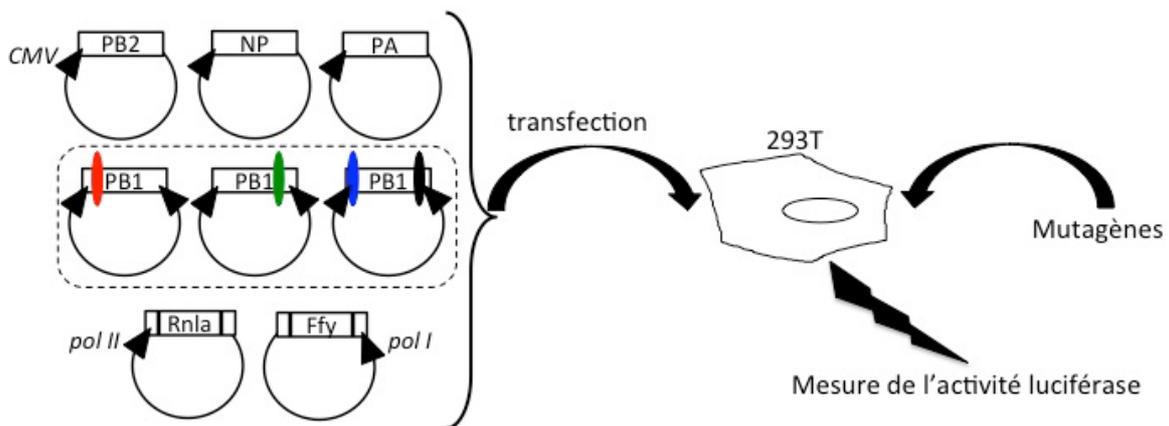


Figure 16 - Représentation schématique des expériences de reconstitution transitoire de complexes de transcription/réplication fonctionnels.

Des cellules 293T sont transfectées avec les plasmides d'expression des protéines virales PB1 (sauvages ou mutées), PB2, PA et NP, ainsi qu'avec un plasmide dirigeant l'expression sous contrôle du promoteur de l'ARN-polymérase I d'un segment génomique viral artificiel contenant le gène de la luciférase Firefly. L'ARNm codant la luciférase Firefly (Ffly) est transcrit de manière dépendante de l'ARN polymérase virale à partir des RNPv reconstituées. Un plasmide pour l'expression de la luciférase Renilla (Rnla) est utilisé comme témoin interne de transfection. En contrôle négatif, les cellules sont transfectées avec les mêmes plasmides sans le plasmide d'expression PB1. Les cellules transfectées sont incubées en absence ou en présence de ribavirine. Le niveau de transcription/réplication est évalué par mesure de l'activité de la luciférase Firefly, 24h post transfection pour la polymérase de sous-type H3N2 et 48h post transfection pour la polymérase de sous-type H1N1p.

Premièrement, les activités des différentes RNPv contenant une protéine PB1 mutée, enregistrées dans une condition donnée, ont été comparées à l'activité de la RNPv contenant la protéine PB1 sauvage obtenue dans la même condition. L'ensemble des données obtenues en condition sans mutagène a été comparé à l'activité de la RNPv sauvage en absence de

mutagène et les données obtenues en présence du composé mutagène ont été comparées à l'activité de la RNPv sauvage observée dans les mêmes conditions. Un second type d'analyse a été réalisé par comparaison de l'ensemble des activités, observées en absence et en présence de mutagène, vis-à-vis de l'activité de la RNPv contenant la protéine PB1 non mutée obtenue en condition standard. Un troisième type de comparaison a consisté à évaluer l'activité résiduelle de chaque RNPv en présence du composé mutagène, par rapport à sa propre activité observée en absence de mutagène.

Ces analyses comparatives ont été réalisées de manière indépendante pour chaque expérience de minigénome. Les résultats de ces comparaisons, exprimés en pourcentages, obtenus pour chacun des réplicats physiologiques ont ensuite été regroupés et une moyenne a été calculée à partir de ces différentes données, pour chaque RNPv. Finalement, les activités résiduelles moyennes des RNPv comportant une protéine PB1 mutée, ont été comparées à l'activité résiduelle moyenne de la RNPv sauvage selon un rapport de type : $\text{Activité résiduelle RNPv - PB1 mutée} / \text{Activité résiduelle RNPv - WT}$. Ainsi, un facteur égal à 1 correspond à une résistance au composé mutagène équivalente à la polymérase sauvage. Un facteur inférieur à 1 correspond à une résistance au composé diminuée, tandis qu'un facteur supérieur à 1 permet d'identifier une RNPv dont la capacité à résister à l'action du mutagène est supérieure à celle de la polymérase parentale. C'est sur la base de ces facteurs ainsi que des résultats des diverses analyses comparatives que les sous-banques qui présentaient une résistance plus efficace à la ribavirine par rapport aux RNPv sauvages ont été sélectionnées et subdivisées, chacune en cinq sous-groupes. Ceux-ci ont été utilisés pour d'autres expériences de minigénomes et les sous-groupes permettant d'observer une activité plus forte que celle des RNPv sauvages en présence de ribavirine ont à nouveau été divisés en cinq. Ce cycle de sélection a été répété cinq fois pour chaque banque. Suite à cet enrichissement par répétition des cycles de sélection, les deux sous-groupes qui présentaient la résistance à la ribavirine la plus importante ont été sélectionnés pour chaque sous-type.

Lors de la première étape du cycle de sélection, l'analyse des expériences de minigénome avec les dix sous-banques de PB1 mutées a montré que l'ensemble des RNPv reconstituées présentaient toutes des signaux détectables, mais des activités polymérases intrinsèques diminuées par rapport à la RNPv sauvage non mutée. Pour les complexes de sous-type H3N2, les niveaux d'activité en absence de mutagène correspondaient à des valeurs comprises entre 17% et 23% de l'activité de la polymérase sauvage (Fig.17), tandis que pour les complexes de

sous-type H1N1p, les activités polymérase étaient comprises entre 24% et 37% de celle de la polymérase sauvage (Fig.18). En présence de ribavirine une diminution générale de l'activité polymérase a été observée mais à des niveaux variables selon les différentes sous-banques de PB1 mutées. En contexte H1N1p, les facteurs de comparaison des activités résiduelles (ou facteurs de résistance à la ribavirine) des RNPv les plus élevés sont supérieurs à 2 (Fig.18), et sont compris entre 1 et 1,5 pour le sous-type H3N2 (Fig.17). Ainsi, six sous-groupes de séquences PB1 mutées de chaque sous-type ont été sélectionnés. Cette première sélection était volontairement large parmi les sous-groupes présentant les facteurs de résistance au composé mutagène les plus élevés pour tenter d'inclure au mieux toutes les mutations qui pourraient conférer une résistance à la ribavirine.

Pour le deuxième cycle de sélection, les sous-banques sélectionnées ont à leur tour été subdivisées en cinq sous-groupes et de nouvelles expériences de minigénomés ont été réalisées. Lors de ce second cycle de sélection, les rapports obtenus par comparaison des activités résiduelles des différentes RNPv vis-à-vis du complexe comportant la protéine PB1 sauvage étaient supérieurs à 1, pour l'ensemble des sous-groupes des deux sous-types, à l'exception de deux sous-groupes pour le sous-type H3N2. Pour chacun des sous-types, les trois sous-groupes qui présentaient les facteurs de résistance les plus élevés ainsi qu'une activité résiduelle en présence de ribavirine d'au minimum 20% ont été sélectionnés. Lors des cycles de sélection suivants, les facteurs de résistance des différents sous-groupes des deux sous-types étaient systématiquement supérieurs à 1 et les mêmes critères de sélection des trois sous-groupes (facteur de résistance les plus élevés et activité polymérase résiduelle $\geq 20\%$) ont été appliqués.

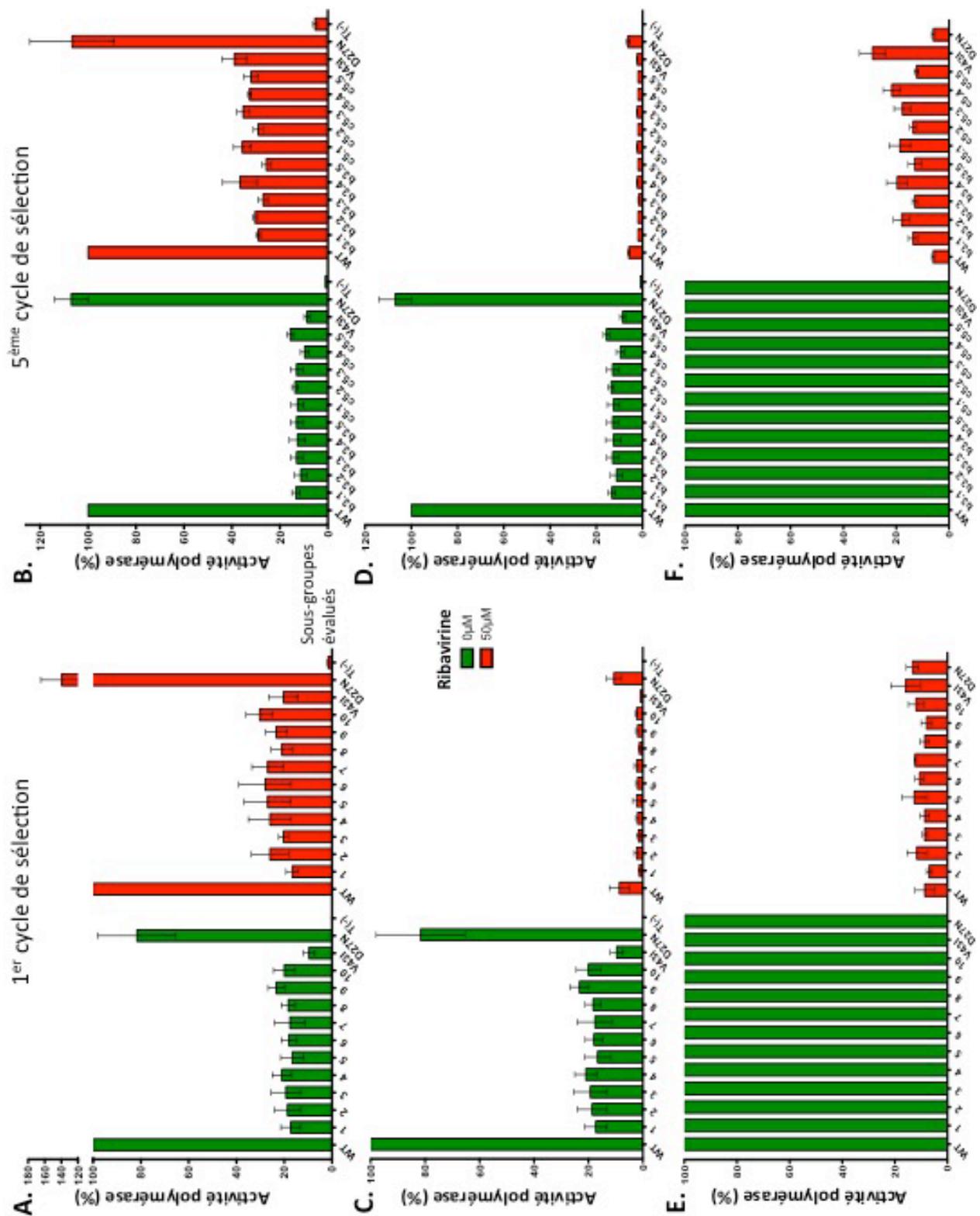


Figure 17 - Activités polymérase des RNPv de sous-type H3N2 lors des étapes de sélections 1 et 5.

L'activité de transcription/réplication des RNPv reconstituées avec les sous-banques de PB1 mutées indiquées a été déterminée comme décrit Figure 16. Les résultats en absence de ribavirine sont représentés en vert et ceux en présence de 50 μM de ribavirine sont représentés en rouge pour la première étape de sélection (A,C,E) et la 5^{ème} étape de sélection (B,D,F). Les résultats sont exprimés en pourcentages. A,B) L'activité en absence ou présence de ribavirine des RNPv portant les séquences PB1 mutées issues des différentes sous-banques est comparée à l'activité de la RNPv portant la protéine PB1 sauvage enregistrée dans la même condition. C,D) L'activité en absence ou présence de ribavirine des RNPv portant les séquences PB1 mutées issues des différentes sous-banques est comparée à l'activité de la RNPv sauvage en absence de ribavirine. E,F) L'activité résiduelle pour chaque RNPv en présence de ribavirine est comparée à l'activité de la RNPv correspondante évaluée en absence de mutagène. Les mutations V43I et D27N ont été utilisées comme témoins.

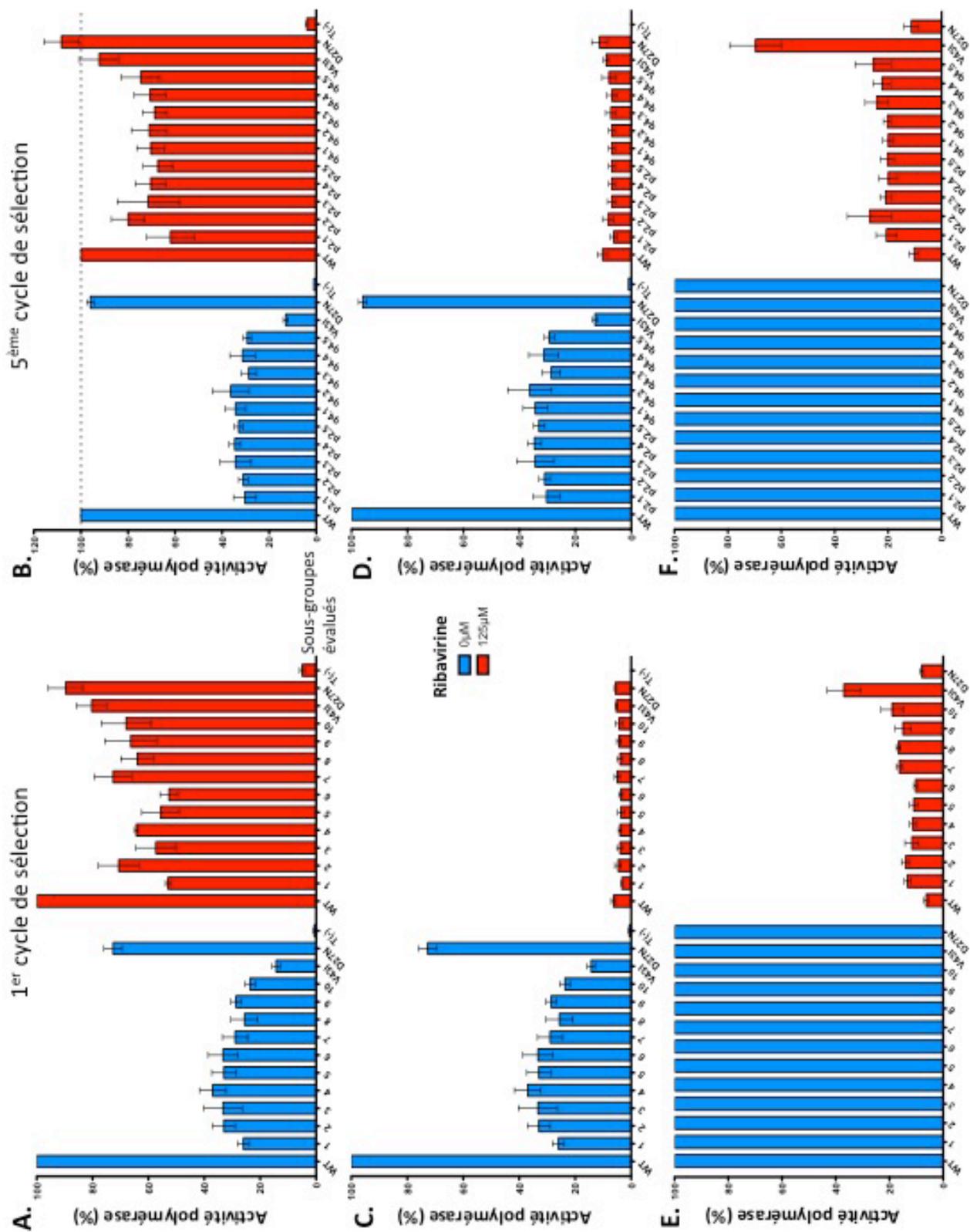


Figure 18 - Activités polymérase des RNPv de sous-type H1N1p lors des étapes de sélection 1 et 5.

L'activité de transcription/réplication des RNPv reconstituées avec les sous-banques de PB1 mutées indiquées a été déterminée comme décrit Figure 16. Les résultats en absence de ribavirine sont représentés en bleu et ceux en présence de 125µM de ribavirine sont représentés en rouge pour première étape des sélection (A,B,C) et la 5^{ème} étape de sélection (D, E, F). Les résultats sont exprimés en pourcentages. A,D) L'activité en absence ou présence de ribavirine des RNPv portant les séquences PB1 mutées issues des différentes sous-banques est comparée à l'activité de la RNPv portant la protéine PB1 sauvage enregistrée dans la même condition. B,E) L'activité en absence ou présence de ribavirine des RNPv portant les séquences PB1 mutées issues des différentes sous-banques est comparée à l'activité de la RNPv sauvage en absence de ribavirine. C,F) L'activité résiduelle pour chaque RNPv en présence de ribavirine est comparée à l'activité de la RNPv correspondante évaluée en absence de mutagène. Les mutations V43I et D27N sont utilisées comme témoins.

Pour le sous-type H3N2, les trois sous-groupes de séquences PB1 sélectionnés à l'issue du deuxième cycle de sélection présentaient des rapports d'activités résiduelles de 2,4, 2,5 et 1,9 en comparaison à la RNPv sauvage. Au fur et à mesure des cycles de sélection, ces facteurs ont progressivement augmenté pour atteindre les valeurs de 3,22 et 3,48 pour les deux sous-groupes de séquences mutées sélectionnés à l'issue du cinquième cycle de sélection (Tableau 3). Lors de ce dernier cycle, ces sous-groupes ont permis la reconstitution de RNPv dont le niveau d'activité intrinsèque en condition standard, sans ribavirine, correspond à environ 10% de l'activité enregistrée pour la polymérase sauvage. Comparativement, la mutation PB1-V43I entraîne également une activité polymérase de l'ordre de 10% en absence de mutagène et un facteur de résistance variant de 1,8 à 4,7 selon les expériences, tandis que la RNPv qui comporte la protéine PB1-D27N, présente une activité intrinsèque de 94-121% équivalente à celle la RNPv sauvage de référence et un facteur de résistance de 0,7 à 1,5.

Tableau 3 - Evolution des caractéristiques des banques de séquences PB1 mutées de sous-type H3N2 lors des 5 cycles de sélection en présence de ribavirine.

Cycles de sélection ^a	H3N2 – b3.4		H3N2 – c5.4		H3N2 – V43I		H3N2 – D27N	
	Activité intrinsèque (%WT) ^b	Facteur de résistance ^c	Activité intrinsèque (%WT) ^b	Facteur de résistance ^c	Activité intrinsèque (%WT) ^b	Facteur de résistance ^c	Activité intrinsèque (%WT) ^b	Facteur de résistance ^c
1	18%	1,42	18%	1,42	10%	1,8	82%	1,5
2	15%	1,87	15%	1,87	12%	3,14	121%	0,79
3	17%	1,78	15%	2,06	9%	3,92	113%	0,66
4	11%	2,54	11%	2,87	8%	4,11	94%	0,81
5	12%	3,22	10%	3,48	9%	4,69	107%	0,97

a - les cycles de sélection ont été réalisés en comparant l'activité de transcription/réplication transitoire de RNPv reconstituées en absence et en présence de ribavirine (50µM).

b - les activités intrinsèques en absence de ribavirine sont exprimées en pourcentage de l'activité pour la polymérase sauvage (WT)

c - le facteur de résistance correspond au rapport de la diminution de l'activité polymérase en présence de ribavirine pour la RNPv mutante et la RNPv sauvage.

Les mutations V43I et D27N sont utilisées comme témoins.

Pour le sous-type H1N1p, cinq groupes ont été sélectionnés lors du second cycle. Ceux-ci présentaient des rapports d'activités résiduelles de 1,7, 1,9, 2,0, 2,0 et 2,2 comparativement à la RNPv sauvage. Au cours des cycles de sélection suivants, ces facteurs ont progressivement augmenté et les deux sous-groupes de séquences finalement sélectionnés à l'issue du cinquième cycle de sélection présentaient des facteurs de résistance de 2,6 et 2,7 et des activités polymérase intrinsèques d'environ 30% de celle de la polymérase sauvage (Tableau 4). On peut remarquer que la progression des facteurs de résistance ainsi que leurs valeurs finales sont plus faibles que ce qui a été observé avec les séquences PB1 issues du sous-type H3N2. Lors du dernier cycle de sélection, les deux sous-groupes sélectionnés permettent la reconstitution de RNPv dont le niveau d'activité en condition standard correspond en moyenne à 30% de l'activité enregistrée avec la polymérase sauvage. Comparativement, la mutation PB1-V43I entraîne une activité polymérase de 13-18% en absence de mutagène et un facteur de résistance de 4,6 à 6,9 selon les expériences, tandis que la mutation PB1-D27N entraîne une activité intrinsèque de 72-130%, équivalente à celle de la RNPv sauvage de référence.

Tableau 4 - Evolution des caractéristiques des banques de séquences PB1 mutées de sous-type H1N1p lors des 5 cycles de sélection en présence de ribavirine.

Cycles de sélection ^a	H1N1p – p2.2		H1N1p – q4.5		H1N1p – V43I		H1N1p – D27N	
	Activité intrinsèque (%WT) ^b	Facteur de résistance ^c	Activité intrinsèque (%WT) ^b	Facteur de résistance ^c	Activité intrinsèque (%WT) ^b	Facteur de résistance ^c	Activité intrinsèque (%WT) ^b	Facteur de résistance ^c
1	29%	2,31	24%	2,93	14%	5,69	72%	1,22
2	49%	2,24	45%	2,05	16%	5,01	125%	1,03
3	38%	2,26	45%	2	18%	4,62	130%	1,29
4	27%	2,64	29%	2,34	16%	6,73	109%	1,23
5	31%	2,71	29%	2,57	13%	6,90	96%	1,14

a - les cycles de sélection ont été réalisés en comparant l'activité de transcription/réplication transitoire de RNPv reconstituées en absence et en présence de ribavirine (125µM).

b - les activités intrinsèques en absence de ribavirine sont exprimées en pourcentage de l'activité pour la polymérase sauvage (WT)

c - le facteur de résistance correspond au rapport de la diminution de l'activité polymérase en présence de ribavirine pour la RNPv mutante et la RNPv sauvage.

Les mutations V43I et D27N sont utilisées comme témoins.

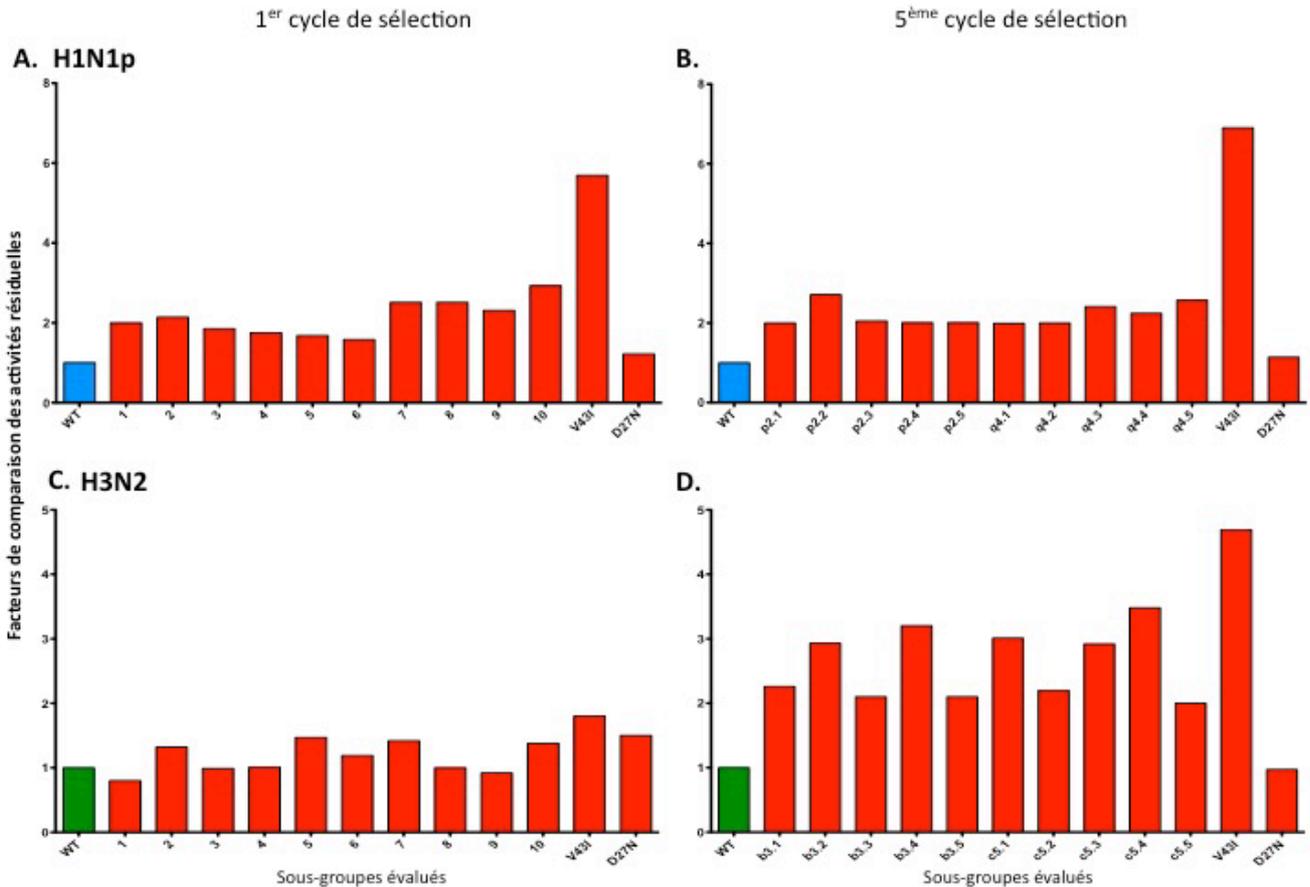


Figure 19 - Facteurs comparatifs de perte d'activité des RNPv en présence de ribavirine lors des étapes de sélection 1 et 5.

Les facteurs comparatifs de perte d'activité des RNPv reconstituées avec les PB1 sauvages ou mutées de sous-types H1N1p (A, B) ou H3N2 (C, D) pour la première étape de sélection (A, C) et la 5^{ème} étape de sélection (B, D) ont été calculés. Ils correspondent au rapport entre les activités résiduelles des RNPv test et de la RNPv sauvage du sous-type correspondant. Les facteurs de perte d'activité obtenus pour les RNPv sauvages de sous-type H1N1p (bleu) ou H3N2 (vert) et pour les RNPv reconstituées avec les sous-banques de PB1 mutées indiquées (rouge) sont représentés. Les mutations V43I et D27N ont été utilisées comme témoins.

Il est à noter que la mutation PB1-V43I confère une résistance à la ribavirine supérieure dans le contexte du sous-type H1N1p par rapport au contexte H3N2 alors même que l'activité intrinsèque des polymérase est comparable pour les deux sous-types. Pour la mutation PB1-D27N, l'activité intrinsèque ainsi que la sensibilité à la ribavirine de la polymérase est comparable à celles du sauvage.

III. Diversité des séquences PB1 des sous-groupes sélectionnés

Les quatre sous-banques sélectionnées ont été séquencées pour évaluer la diversité des séquences PB1. Après transformation de bactéries compétentes, une quarantaine de colonies indépendantes ont été prélevées pour chaque sous-banque et les plasmides isolés ont été séquencés sur la totalité de la séquence PB1. Le nombre de positions mutées ainsi que le nombre de mutations identifiées pour chacune des sous-banques sont présentés dans le tableau 5. Pour les séquences de sous-type H3N2, au total, 162 positions et 203 mutations ont été identifiées, réparties de manière homogène sur la totalité de la séquence (Fig.20). Cela correspond à 2,5 acides aminés mutés par séquence en moyenne, ce qui est cohérent avec le taux de mutation initialement évalué pour la banque.

Pour les séquences de sous-type H1N1p, 229 positions et 268 mutations ont été identifiées (Fig.20), soit environ 3 acides aminés mutés par séquence. Comme observé pour le sous-type H3N2, ces mutations suivent une répartition homogène le long de la séquence de PB1. Cependant le taux de mutation observé est légèrement plus élevé que celui déterminé pour la banque initiale.

Tableau 5 - Caractéristiques des séquences PB1 mutées issues des sous-groupes sélectionnés et séquencés à l'issue des expériences de minigénomes en absence et en présence de ribavirine.

Sous-groupes	H1N1p		H3N2	
	p2.2	q4.5	b3.4	c5.4
Nombre de positions mutées	126	123	84	92
<i>Total</i>	229		162	
Nombre de mutations (acides aminés)	135	133	96	107
<i>Total</i>	268		203	

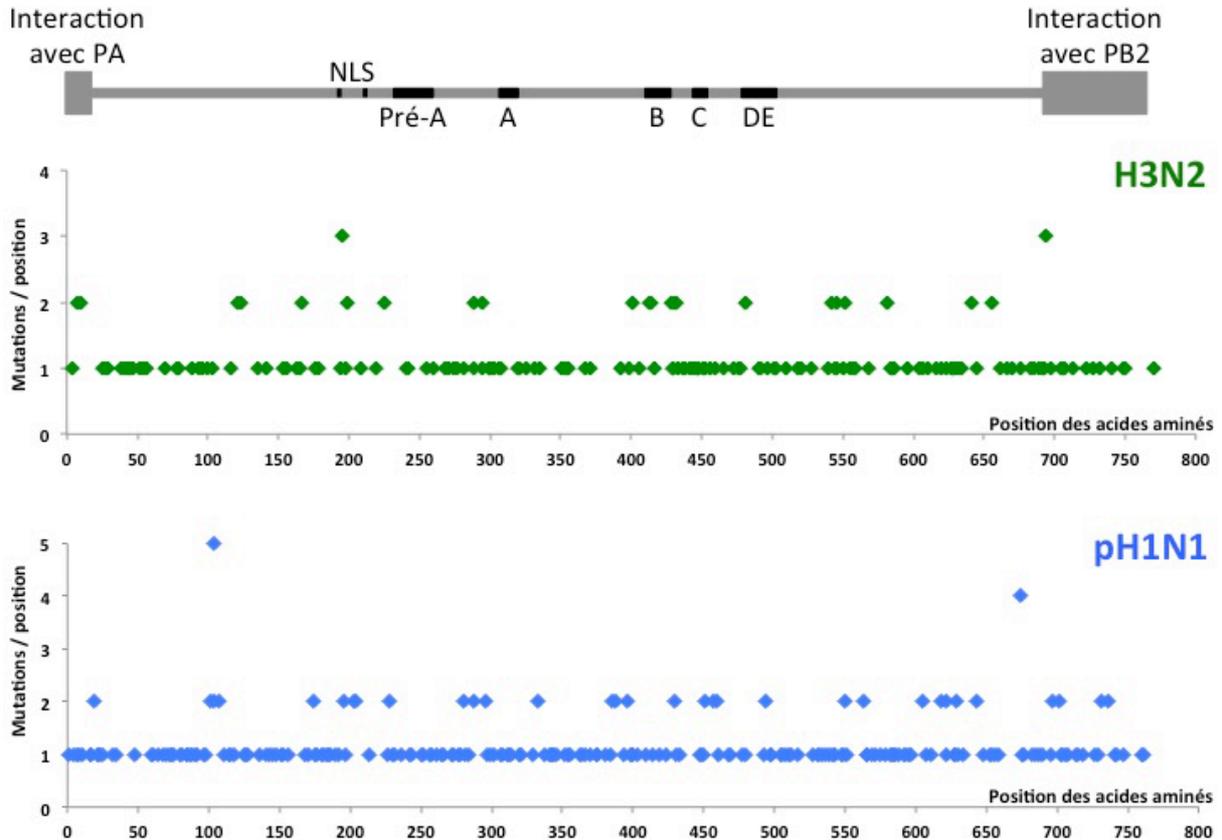


Figure 20 - Distribution sur la séquence de PB1 des mutations de réduction de la sensibilité à la ribavirine des RNPv.

Représentation du nombre de mutations en fonction de la position des acides aminés dans la séquence PB1 des sous-type H3N2 (vert) ou H1N1p (bleu). Les mutations ont été recensées à partir des résultats de séquençage d'un échantillon des sous-groupes de séquences PB1 sélectionnés pour une sensibilité réduite à la ribavirine des RNPv lors des expériences de transcription/réplication transitoire. Les principaux domaines fonctionnels de PB1 sont représentés en haut.

Parmi les mutations répertoriées, 23 et 31 mutations ont été sélectionnées (Figures 21 et 22), pour les sous-types H3N2 et H1N1p respectivement, pour évaluer leur rôle spécifique. La sélection a été basée sur la répétition d'apparition des mutations pour un même résidu, la localisation des mutations ainsi que les propriétés physico-chimiques des acides aminés. Pour étudier spécifiquement l'impact de chaque mutation, celles-ci ont été réintroduites par mutagenèse dirigée dans la séquence codante de la protéine PB1 du plasmide pRF-PB1 du sous-type correspondant.

IV. Impact des mutations sur l'activité de la polymérase virale

L'influence des mutations sélectionnées sur l'activité du complexe polymérase a été évaluée par des expériences de minigénomes.

L'évaluation de l'activité des complexes polymérase composés des protéines PB1 mutées spécifiquement, a permis d'observer différentes catégories de mutations : 1) des mutations pour lesquelles l'activité intrinsèque des RNPv est proche de celle de la RNPv sauvage (81-120%); 2) des mutations qui entraînent une diminution plus ou moins marquée, modérée (51-80%), importante (21-50%) ou drastique ($\leq 20\%$) de l'activité intrinsèque de la polymérase virale ; 3) des mutations qui se traduisent par une augmentation de l'activité ($> 120\%$) des RNPv par rapport à la RNPv sauvage (Figures 21 et 22).

IV.1. Impact des mutations sur l'activité polymérase H3N2

En contexte H3N2, les mutations qui n'affectent pas ou peu l'activité de la polymérase en absence de ribavirine sont les mutations N641Y et E656D pour lesquelles l'activité des RNPv de 107% et 91% respectivement, était légèrement supérieure ou inférieure à celle de la RNPv sauvage. La majorité des mutations a entraîné une diminution de l'activité polymérase avec une diminution modérée pour les RNPv Q294H, et Q582L dont les activités sont de 44% et 58% respectivement, ou une diminution plus importante pour les RNPv L7Q, K121R, F166Y, M195K, Q294R, T432S, T432A, N694Y et N694K dont les activités sont comprises entre 18% et 35% de l'activité de la RNPv sauvage. L'effet des mutations F166I, N225S, N225K, A401V, A401T, A542V, A542T et N694I s'est avéré plus drastique avec des activités comprises entre 1% et 18% de l'activité de la RNPv sauvage. Pour les RNPv portant les mutations K121N et N641S, une augmentation modérée de l'activité intrinsèque de la polymérase a été observée avec des activités de 137% et 128% respectivement, par rapport à la RNPv sauvage.

Pour ce qui concerne les mutations témoin, la mutation V43I diminue l'activité intrinsèque de la polymérase de façon drastique à 9%, tandis que la mutation D27N réduit l'activité de façon modérée à 78% de l'activité basale de la RNPv sauvage.

De façon remarquable, alors que pour les positions 225, 401, 432 et 542 les substitutions se traduisent par les mêmes effets pour les différents résidus testés, pour les positions 121, 166, 294, 641 et 694, l'effet des mutations sur l'activité des RNPv dépend de la nature de l'acide aminé introduit. Ainsi, la mutation K121N augmente l'activité intrinsèque de la polymérase à 137% alors que la mutation K121R se traduit par une diminution importante de l'activité à 29% par rapport à la RNPv sauvage ; les mutations F166Y et F166I diminuent l'activité de façon importante ou drastique, respectivement à 51% et 5% de l'activité de la RNPv sauvage; les mutations Q294H et Q294R diminuent l'activité des RNPv de façon modérée (58%) ou plus marquée (31%) ; la mutation N641Y n'a pas d'effet notable avec une activité de 107% alors que la mutation N641S augmente l'activité à 128% de celle de la RNPv sauvage ; les mutations N694K et N694Y n'ont qu'un impact modéré avec des activités de 35% et 44% des RNPv correspondantes respectivement, alors que la mutation N694I réduit l'activité des RNPv de façon drastique à 2% de l'activité de la RNPv sauvage.

IV.2. Impact des mutations sur l'activité polymérase H1N1p

En contexte H1N1p, les RNPv portant les mutations C107S, K388N, K388R, ou T400S présentent des activités comparables à l'activité de la RNPv sauvage avec des niveaux d'activité de 82%, 99,6%, 85% et 110% de celle du sauvage. Comme en contexte H3N2, La majorité des mutations a entraîné une diminution modérée de l'activité polymérase avec pour les RNPv L7Q, T204A, T204S, T228S, T296A et K430I des activités comprises entre 51% et 71%, ou une diminution plus importante avec pour les RNPv F103L, M195L, M195T, L550V, G622A, et G622E des activités comprises entre 22% et 49% de l'activité de la RNPv sauvage. Un effet plus drastique a été observé pour les mutations F103S, R203I, L396Q, M414A, V451A, V451E, S494N, A542V, A542T, S702I et S702N dont les activités sont comprises entre 1% et 17% de celle de la RNPv sauvage. Avec la mutation A643G l'activité de 191% était presque deux fois plus élevée que celle du sauvage et de façon remarquable, pour les mutations I674L, I674M et I674F une très forte augmentation de l'activité des RNPv a été observée avec des activités respectivement à 579%, 853% et 1446% par rapport au sauvage.

Pour ce qui concerne les mutations témoin, la mutation V43I diminue l'activité intrinsèque de la polymérase de façon drastique à 15%, tandis que la mutation D27N n'a pas

d'impact notable avec une activité de 121% légèrement supérieure à celle de la RNPv sauvage.

Pour les positions 195, 204, 451, 542, 622, 674, et 702, aucune différence notable n'a été observée selon la nature des substitutions contrairement à ce qui a été observé pour le sous-type H3N2.

Au total, l'analyse de l'effet des mutations sur l'activité des RNPv, a permis pour les deux sous-types viraux, d'identifier des positions clé pour l'activité polymérase, avec des effets plus ou moins marqués selon la nature des résidus substitués, voire même des effets opposés comme dans le cas des mutations K121N et K121R en contexte H3N2 qui respectivement se traduisent par une augmentation ou une diminution de l'activité des RNPv correspondantes.

Par ailleurs, il est à noter que les substitutions aux mêmes positions ont soit le même effet dans le contexte H3N2 et H1N1p comme pour les mutations A542V et A542T qui diminuent l'activité de façon drastique ou les mutations en position 195 qui diminuent l'activité de façon importante quel que soit le contexte, soit des effets dépendant du sous-type viral comme pour la mutation L7Q qui a un impact modéré sur l'activité dans le contexte H1N1p et plus important dans le contexte H3N2.

V. Impact des mutations sur la sensibilité de la polymérase à la ribavirine

L'influence des mutations sélectionnées sur la sensibilité de l'activité du complexe polymérase à la ribavirine a été évaluée comme précédemment par des expériences de minigénomés par comparaison des activités des RNPv reconstituées en présence et en absence de ribavirine. L'évaluation de l'impact des mutations sur la sensibilité de l'activité polymérase à la ribavirine a permis de classer les mutations en différentes catégories en fonction de leur activité en présence de ribavirine comparée à l'activité des RNPv sauvages en présence de ribavirine ainsi qu'en fonction des facteurs de résistance correspondant au rapport des activités résiduelles du mutant par rapport au sauvage.

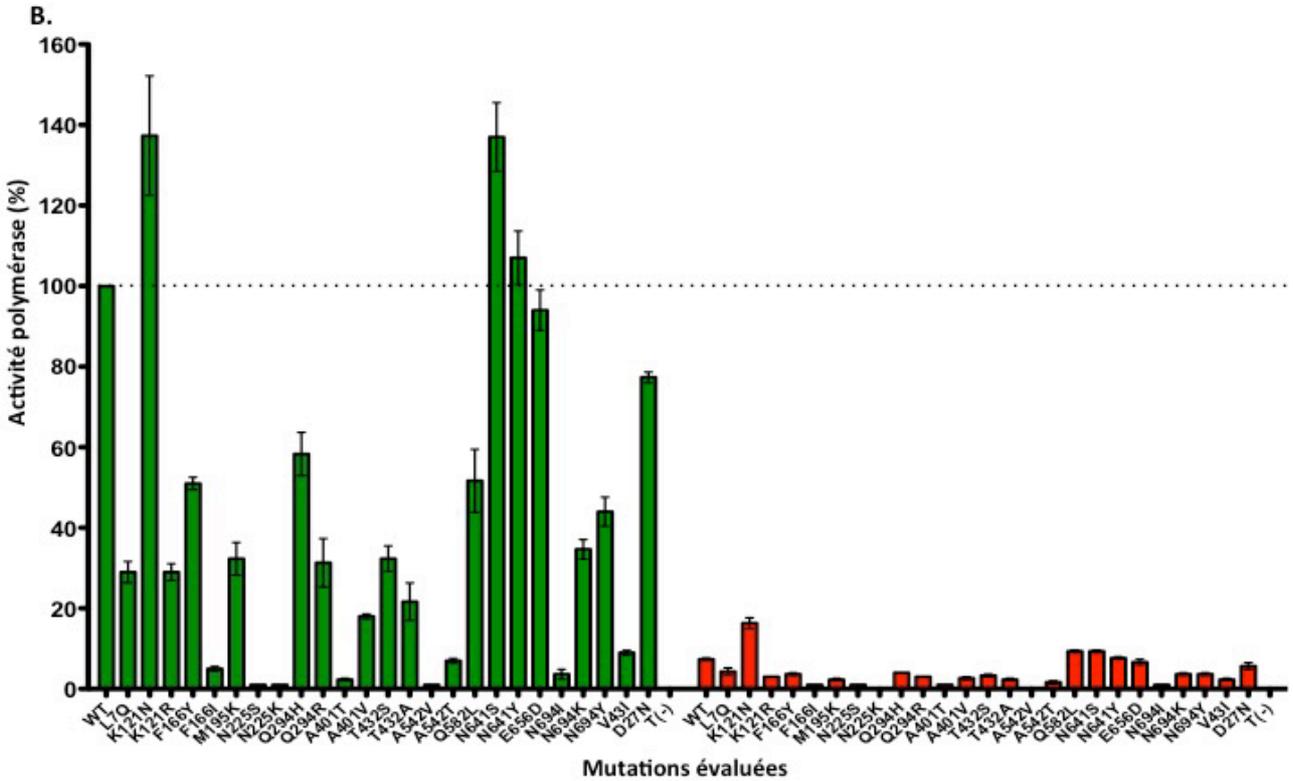
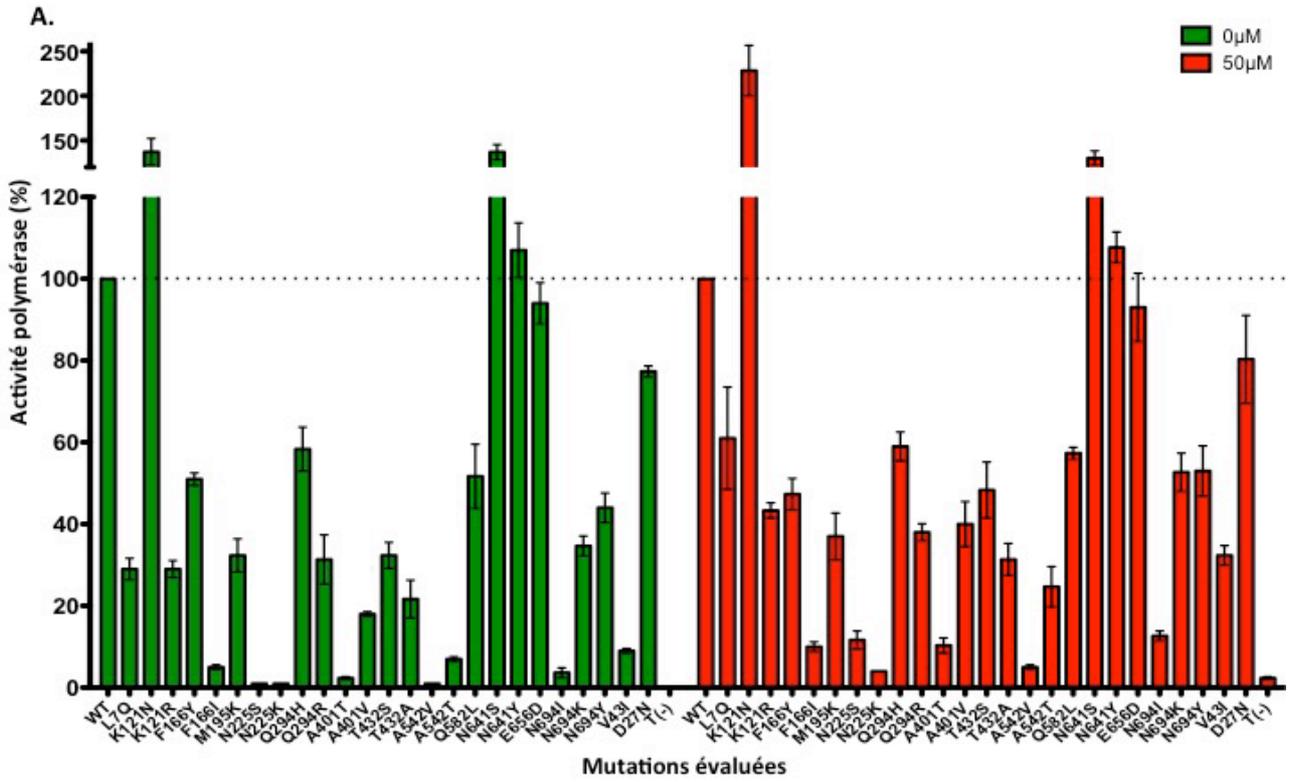
V.1. Sensibilité à la ribavirine de la polymérase mutée en contexte H3N2

Pour les RNPv de sous-type H3N2, les expériences ont été réalisées en présence de ribavirine 50 μ M. Pour l'ensemble des polymérases une forte diminution de l'activité a été observée en présence de ribavirine par rapport à l'activité du virus sauvage en absence de ribavirine (Fig.21.B). Ainsi, l'activité de la RNPv sauvage était de 7%, tandis que les RNPv V43I et D27N présentaient des activités de 2% et 6% par rapport à l'activité initiale du complexe sauvage. Leurs activités par rapport à celle de la RNPv sauvage en présence de ribavirine était de 32% et 80%, respectivement (Fig.21.A). Vis-à-vis de leur propre activité initiale, les RNPv V43I et D27N présentaient des activités en présence de ribavirine de 26% et 7%, respectivement, correspondant à des facteurs de résistance à la ribavirine de 3,6 et 1,0 (Fig.21.C).

Les mutations K121N, N641S, N641Y et E656D sont les seules pour lesquelles, comme pour la mutation D27N, l'activité polymérase en présence de ribavirine est supérieure ou d'un niveau comparable à l'activité de la RNPv sauvage dans les mêmes conditions. L'activité en présence de ribavirine par rapport à l'activité de la RNPv sauvage de référence en absence de ribavirine est toutefois très diminuée (16%, 9%, 8%, 7% pour les mutations K121N, N641S, N641Y et E656D respectivement). Les autres mutations évaluées, comme la mutation témoin V43I, présentent en effet une activité en présence de ribavirine inférieure (voire très inférieure) à celle observée pour la RNPv sauvage. Cependant, la comparaison de l'activité

résiduelle de chaque RNPv en présence de ribavirine avec sa propre activité intrinsèque en condition standard, permet de mettre en évidence des différences de résistance à la ribavirine. Les facteurs de résistance obtenus pour les différentes mutations étudiées par comparaison à l'activité résiduelle de la polymérase sauvage sont compris entre 0,9, pour la mutation F166Y, et 11,0, pour la mutation N225S. Bien que pour une majorité de mutations les facteurs de résistance observés soient compris entre 1 et 2, plusieurs RNPv présentent des valeurs supérieures. Notamment, pour les mutations L7Q, F166I, A401V et A542T, des facteurs de résistance de 2,1, 2,1, 2,2 et 3,4 ont été obtenus respectivement, ces facteurs restant inférieurs à la valeur de 3,6 obtenue pour la mutation témoin V43I. Pour les mutations N694I, A401T, A542V, N225K et N225S des facteurs de 4,0, 5,5, 6,5, 7,0 et 11,0 respectivement, ont été obtenus, supérieurs ou très supérieurs à la valeur obtenue avec la mutation témoin V43I. Il est à noter que l'activité en présence de ribavirine par rapport à celle de la RNPv sauvage en présence de ribavirine est diminuée de façon modérée (51-80%) pour la mutation L7Q, de façon importante (21-50%) pour les mutations A401V et A542T et de façon drastique ($\leq 20\%$) pour les autres mutations pour lesquelles le facteur de résistance à la ribavirine est supérieur ou égal à 2. Il est également remarquable que différentes substitutions pour une même position dans PB1 se traduisent par des facteurs de résistance à la ribavirine supérieurs ou égaux à 2 comme pour les positions 225, 401, ou 542 ou supérieurs à 1 pour la position 694.

H3N2



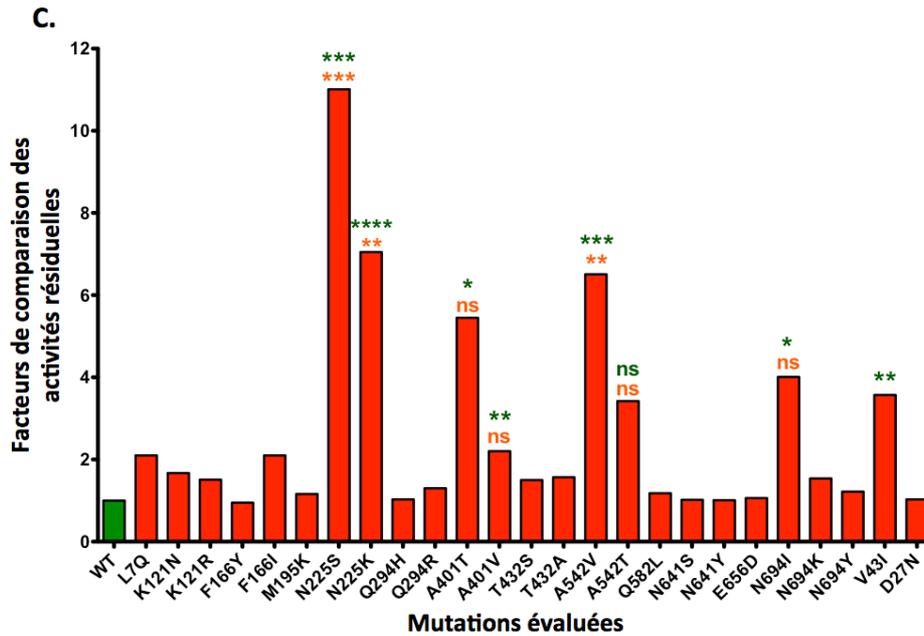


Figure 21 - Activité polymérase et sensibilité à la ribavirine des RNPv de sous-type H3N2 portant les mutations dans PB1 sélectionnées.

L'activité de transcription/réplication des RNPv reconstituées avec les protéines PB1 portant les mutations indiquées a été déterminée comme décrit Figure 16. Les mutations V43I et D27N ont été utilisées comme témoins. A,B) Les résultats en absence de ribavirine sont représentés en vert et ceux en présence de 50 μ M de ribavirine sont représentés en rouge. A) Activités, en absence ou présence de ribavirine, des RNPv portant les PB1 mutées exprimées en pourcentage de l'activité de la RNPv sauvage dans les mêmes conditions. B) Activités, en absence ou présence de ribavirine, des RNPv portant les PB1 mutées exprimées en pourcentage de l'activité de la RNPv sauvage en absence de ribavirine. C) Facteurs comparatifs de perte d'activité en présence de ribavirine déterminés par comparaison des activités résiduelles des RNPv portant les PB1 mutées par rapport à l'activité résiduelle de la RNPv sauvage. Le résultat pour la RNPv sauvage de référence est en bleu et ceux pour les RNPv portant une PB1 mutée en rouge. (Comparaison deux à deux par t-test, par rapport à WT en vert et par rapport à V43I en orange. ns = non significatif. p -value > 0.05 : * = 0.05 > p -value > 0.01, ** = 0.01 > p -value > 0.001, *** = 0.001 > p -value > 0.0001, **** = p -value < 0.0001)

V.2. Sensibilité à la ribavirine de la polymérase mutée en contexte H1N1p

Pour les RNPv de sous-type H1N1p, les expériences ont été réalisées en présence de ribavirine 125 μ M.

Comme pour les RNPv de sous-type H3N2, pour l'ensemble des polymérases une forte diminution de l'activité a été observée en présence de ribavirine par rapport à l'activité en absence de ribavirine (Fig.22.B). L'activité de la RNPv sauvage était de 19%, tandis que les RNPv V43I et D27N présentaient des activités de 14% et 26% par rapport à l'activité initiale du complexe sauvage. Leurs activités par rapport à celle de la RNPv sauvage en présence de ribavirine étaient de 74% et 135%, respectivement (Fig.22.A). Vis-à-vis de leur propre activité initiale, les RNPv V43I et D27N présentaient des activités en présence de ribavirine de 93% et 22%, respectivement, correspondant à des facteurs de résistance à la ribavirine de 4,9 et 1,2 (Fig.22.C).

Parmi les mutations sélectionnées, les mutations L7Q, M195L, T228S, K388N, K388R, G622A, G622E, A643G, I674L, I674M et I674F sont les seules pour lesquelles, comme pour la mutation D27N, l'activité polymérase en présence de ribavirine est supérieure ou d'un niveau comparable à l'activité de la RNPv sauvage dans les mêmes conditions. L'activité en présence de ribavirine par rapport à l'activité de la RNPv sauvage de référence en absence de ribavirine est toutefois diminuée de façon plus ou moins importante pour les mutations L7Q, M195L, T228S, K388N, K388R, G622A, G622E avec des activités de 16 à 28% ou de façon modérée pour les mutations 643G, 674L, 674M avec des activités de 57 à 71% alors que l'activité en présence de ribavirine pour la mutation 674F reste comparable à celle de la RNPv sauvage en absence de ribavirine. Les autres mutations évaluées, comme la mutation témoin V43I, présentent une activité en présence de ribavirine inférieure (voire très inférieure) à celle observée pour la RNPv sauvage. Lorsque l'on compare les activités résiduelles de chaque RNPv en présence de ribavirine par rapport à leur propre activité intrinsèque en condition standard, des différences de résistance à la ribavirine sont révélées. Les facteurs de résistance obtenus pour les différentes mutations étudiées par comparaison à l'activité résiduelle de la polymérase sauvage sont compris entre 0,5, pour la mutation I674F, et 5,1, pour la mutation A542V. Parmi les différentes mutations, nombreuses sont celles pour lesquelles les valeurs des facteurs de résistance sont comprises entre 1 et 2 mais plusieurs RNPv mutées présentent également des valeurs supérieures. Seule la mutation A542V permet d'obtenir un facteur de

résistance de 5,1 supérieur à la valeur de 4,9 obtenue pour le mutant témoin V43I. Un facteur de résistance de 4,7 d'une valeur proche a été obtenu pour la mutation V451A. Plusieurs mutations confèrent des facteurs de résistance d'une valeur supérieure à 3 (G622E, A542T, S702N) ou d'une valeur supérieure ou proche de 2 (F103S, R203I, T228S, G622A, L396Q, M414A, V451E, S494N, L550V, A643G, S702I) et pour le mutant M195L un facteur de résistance de 1,4 a été obtenu. Pour ces mutations, l'activité en présence de ribavirine est d'un niveau supérieur (G622E, A643G) ou équivalent (M195L, T228S, G222A) à l'activité de la RNPv sauvage en présence de ribavirine. Plus généralement l'activité par rapport à celle de la RNPv sauvage est diminuée à des degrés divers, de façon modérée (51-80%) pour les mutations M414A, V451A, A542T et L550V, de façon plus importante (21-50%) pour les mutations F103S et S702T ou de façon drastique ($\leq 20\%$) pour les autres mutations. Comme dans le contexte H3N2, différentes substitutions pour une même position se traduisent par des facteurs de résistance supérieurs à 2 comme pour les positions 451, 542, 702, ou 622. A la position 103, des facteurs de résistance de 2,6 et 1,8 sont observés pour les mutations F103S et F103L, respectivement.

Au total, l'étude de l'activité des RNPv en présence de ribavirine a permis d'identifier des positions clé sur la polymérase PB1 qui confèrent une résistance à la ribavirine avec des effets plus ou moins marqués selon la nature des résidus et des facteurs de résistance supérieurs ou équivalents à ceux décrits pour la mutation V43I dans le contexte H1N1p ou très supérieurs dans le contexte H3N2. De façon remarquable, les mêmes substitutions en position 542 (A542V et A542T) confèrent un niveau de résistance élevé ($>3,4$) dans le contexte des deux sous-types. Dans la majorité des cas l'acquisition de la résistance se traduit par une forte voire très forte diminution de l'activité polymérase en présence de ribavirine. Ceci est plus particulièrement le cas des complexes de sous-type H3N2, alors que pour les complexes de sous-type H1N1p, la diminution de l'activité est moins marquée et que des mutations qui confèrent une résistance à la ribavirine mais conservent une activité polymérase en présence de ribavirine équivalente ou supérieure au sauvage ont été identifiées, notamment aux positions 228, 622 et 643.

Ainsi, la sélection des mutations d'intérêt pour l'étude dans le contexte de virus infectieux a pris en compte un ensemble de critères, à savoir les facteurs de comparaison des activités résiduelles des RNPv mais également l'activité en condition standard et en présence de ribavirine de la RNPv d'intérêt par rapport à celle de référence, ainsi que son activité

résiduelle même. Ce sont donc 7 mutations avec des facteurs de résistance de 2,2 à 11 qui ont été retenues pour la polymérase H3N2 et 11 mutations avec des facteurs de résistance de 1,9 à 4,7 pour la polymérase H1N1p (Tableaux 6 et 7). En contexte H1N1p, les mutations I674L et I674F ont également été sélectionnées malgré un facteur de 0,5 pour évaluer l'influence de l'activité polymérase intrinsèque très élevée sur la multiplication virale.

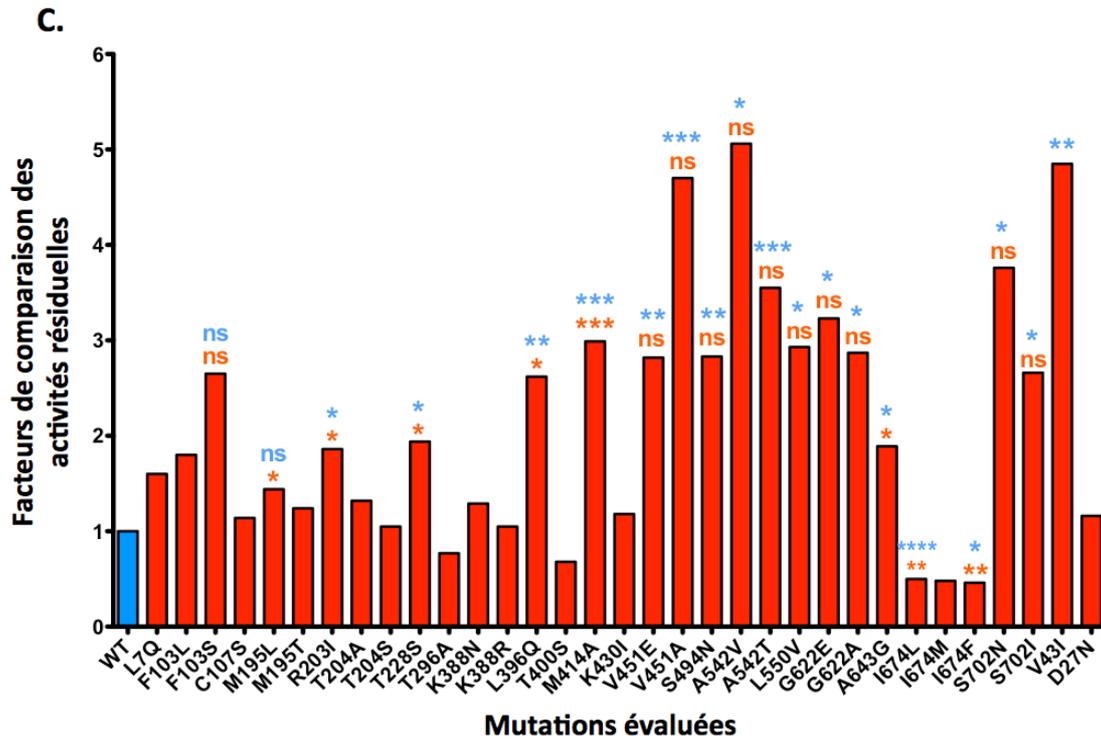


Figure 22 - Activité polymérase et sensibilité à la ribavirine des RNPv de sous-type H1N1p portant les mutations dans PB1 sélectionnées.

L'activité de transcription/réplication des RNPv reconstituées avec les protéines PB1 portant les mutations indiquées a été déterminée comme décrit Figure 16. Les mutations V43I et D27N ont été utilisées comme témoins. A,B) Les résultats en absence de ribavirine sont représentés en bleu et ceux en présence de 125 µM de ribavirine sont représentés en rouge. A) Activités, en absence ou présence de ribavirine, des RNPv portant les PB1 mutées exprimées en pourcentage de l'activité de la RNPv sauvage dans les mêmes conditions. B) Activités, en absence ou présence de ribavirine, des RNPv portant les PB1 mutées exprimées en pourcentage de l'activité de la RNPv sauvage en absence de ribavirine. C) Facteurs comparatifs de perte d'activité en présence de ribavirine déterminés par comparaison des activités résiduelles des RNPv portant les PB1 mutées par rapport à l'activité résiduelle de la RNPv sauvage. Le résultat pour la RNPv sauvage de référence est en bleu et ceux pour les RNPv portant une PB1 mutée en rouge. (Comparaison deux à deux par t-test, par rapport à WT en bleu et par rapport à V43I en orange. ns = non significatif. p-value>0.05 : * = 0.05>p-value>0.01, ** = 0.01>p-value>0.001, *** = 0.001>p-value>0.0001, **** = p-value<0.0001)

VI. Caractéristiques des virus porteurs des mutations

Des virus comportant les segments PB1 avec les mutations sélectionnées ont été produits par génétique inverse pour chacun des deux sous-types viraux. Parallèlement, les virus sauvages ainsi que les virus porteurs des mutations témoin PB1-V43I et PB1-D27N ont été produits par génétique inverse pour chacun des deux sous-types H3N2 et H1N1p et leurs caractéristiques ont été analysées en parallèle.

VI.1. Production par génétique inverse et analyse des virus mutants

Les cinq séquences PB1 de sous-type H3N2 mutées ainsi que les douze séquences de sous-type H1N1p, ont été utilisées pour produire des virus par génétique inverse selon la méthodologie décrite dans le matériel et méthodes et la présence de particules virales infectieuses dans le surnageant a été évaluée par titrage selon la méthode des plages de lyse. Les virus H3N2 et H1N1p sauvages présentaient un titre de $2 \cdot 10^6$ PFU/ml et $6 \cdot 10^5$ PFU/ml respectivement. Les mutants témoin V43I et D27N ont été produits à des titres réduits de un à deux log par rapport aux virus sauvages (Tableaux 6 et 7).

Pour les virus de sous-type H3N2, le mutant A401V présentait un titre de 10^6 PFU/ml très proche de celui obtenu pour le virus parental de référence. Les virus porteurs des mutations N694I et A401T présentaient des titres réduits de $2,5 \cdot 10^5$ et $7,5 \cdot 10^5$ PFU/ml, du même ordre de grandeur que pour les virus témoin V43I et D27N. En revanche, les mutations en position 542 semblent avoir un impact important sur la viabilité du virus. En effet, le mutant A542V n'a pas pu être obtenu par génétique inverse et le mutant A542T présentait un titre très faible de $4 \cdot 10^2$ PFU/ml. De même, la mutation N225K n'a pas permis d'obtenir un virus viable et le mutant N225S présentait un titre faible de $1,5 \cdot 10^4$ PFU/ml (Tableau 6).

Pour les virus de sous-type H1N1p, les mutants M195L et I674L présentaient des titres de $9 \cdot 10^5$ et $4,5 \cdot 10^5$ PFU/ml, du même ordre de grandeur que pour le virus sauvage. Les mutants G622E, A643G et S702I présentaient des titres réduits comparables à ceux des virus témoins V43I et D27N. Pour les mutants R203I, T228S et I674F, une réduction plus importante des titres de l'ordre de 2 \log_{10} a été observée. Les mutations M414A, A542T, L550V semblent avoir un effet encore plus marqué sur la viabilité virale avec des réductions du titre des virus mutés produits par génétique inverse réduits de 3 à 4 \log_{10} . Enfin, les

mutations F103S et V451A sont apparues non viables, aucun virus n'ayant été obtenu par génétique inverse (Tableau 7).

L'ensemble des virus viables produits par génétique inverse a été amplifié deux fois par passage en cellules MDCK à une MOI de 10^{-3} PFU par cellule. Pour les virus mutants non viables qui n'ont pu être détectés à l'issue de la génétique inverse, un premier passage à l'aveugle en cellules MDCK a été réalisé par inoculation de 400 μ l du surnageant de culture issu de l'expérience de génétique inverse. Seul le mutant V451A dans le contexte H1N1p a ainsi pu être produit.

Pour le virus H3N2 sauvage de référence un titre de 6.10^7 PFU/ml a été obtenu pour le stock viral après 2 passages en cellules MDCK. Les titres pour les deux virus témoins V43I et D27N ainsi que pour la plupart des mutants étaient comparables à celui du virus sauvage. Le virus mutant N225S présentait un titre réduit de $2,5.10^5$ PFU/ml, témoin d'une vitalité inférieure à celle observée pour le virus sauvage (Tableau 6).

Le virus porteur de la mutation A542T constitue un cas particulier car après deux passages sur cellules à MOI 10^{-3} , le titre obtenu était de $2,5.10^1$ PFU/ml, témoin d'une amplification virale très réduite ou inexistante. Ainsi, cette mutation apparaît délétère pour l'amplification virale. Ce type d'évolution du titre viral vers l'extinction de la population est caractéristique d'une forte production de particules défectives. Cette hypothèse a été évaluée en déterminant le ratio d'infectivité par comparaison de la quantité de particules physiques et de la quantité de particules infectieuses. Le nombre de particules physiques a été estimé par la quantification du nombre de copies du segment M d'ARN viral par RT-qPCR, à partir de l'ARNv extrait d'une suspension virale de titre défini. Ainsi, pour le virus sauvage un rapport d'infectivité de 4.10^3 copies/PFU a été obtenu. Les virus mutants D27N, V43I, N694I et A401T présentaient des rapports du même ordre de grandeur $2,5.10^3$, $4,6.10^3$, $4,7.10^3$ et $6,6.10^3$ copies/PFU respectivement. Les rapports obtenus pour les mutants A401V et N225S, respectivement de $2,1.10^4$ et $3,7.10^4$ copies/PFU, étaient légèrement supérieurs au rapport observé pour le virus sauvage. En revanche, le mutant A542T présentait un rapport de $1,3.10^8$ copies/PFU, très largement supérieur à celui du virus sauvage de référence. Ce résultat traduit la présence d'une très forte proportion de particules défectives, confirmant ainsi notre hypothèse initiale. Afin de tenter de réduire la proportion de particules défectives, une nouvelle amplification du mutant A542T a été réalisée à partir du surnageant de génétique

inverse obtenu initialement toujours en cellules MDCK mais à une MOI plus faible de 10^{-5} PFU par cellule. Une suspension virale à un titre de 6.10^4 PFU/ml a été obtenu mais n'a pas permis d'obtenir un stock viral avec un titre satisfaisant après un deuxième passage en cellules MDCK à une MOI de 10^{-5} . Lors des expériences suivantes, pour ce mutant, nous avons donc utilisé le stock viral issu d'un seul passage en cellules MDCK à MOI 10^{-5} .

Tableau 6 - Bilan des résultats obtenus pour les mutants de PB1 de sous-type H3N2 lors des expériences de minigénome et de génétique inverse.

H3N2	Minigénome				Contexte infectieux	
PB1	Activité intrinsèque (%WT) ^a	Activité + Ribavirine (%WT + ribavirine) ^b	Activité + Ribavirine (%WT) ^c	Facteur de résistance ^d	Titre C0 (PFU/ml) ^e	Titre C2 (PFU/ml) ^f
1003-WT	100%	100%	7%	1	2.10^6	6.10^7
N225S	1%	12%	0,8%	11	$1,5.10^4$	$2,5.10^5$
N225K	1%	4%	0,3%	7,1	<i>N.D.</i> ^g	- ^h
A401T	2%	11%	1%	5,5	$7,5.10^5$	2.10^7
A401V	18%	40%	3%	2,2	1.10^6	8.10^7
A542V	1%	5%	0,3%	6,5	<i>N.D.</i>	-
A542T	7%	23%	2%	3,5	4.10^2	6.10^{41}
N694I	4%	13%	1%	4	$2,5.10^5$	7.10^7
V43I	9%	32%	2%	3,6	$3,3.10^5$	4.10^7
D27N	78%	80%	6%	1	$1,3.10^5$	2.10^7

a - les activités intrinsèques en absence de ribavirine sont exprimées en pourcentage de l'activité pour la polymérase sauvage (WT)

b - les activités résiduelles en présence de ribavirine 50 μ M sont exprimées en pourcentage de l'activité pour la polymérase sauvage (WT) en présence de ribavirine 50 μ M

c - les activités résiduelles en présence de ribavirine 50 μ M sont exprimées en pourcentage de l'activité pour la polymérase sauvage (WT) en absence de ribavirine

d - le facteur de résistance correspond au rapport de la diminution de l'activité polymérase en présence de ribavirine pour la RNPv mutante et la RNPv sauvage.

e - titre du surnageant de génétique inverse (C0) exprimé en PFU/ml

f - titre du surnageant de culture C2 après deux passages des surnageants de culture de génétique inverse en cellules MDCK à une MOI de 10^{-3} .

g - ND : non détectable

h : « - » : non réalisé

i : titre du surnageant de culture C1 après un seul passage du surnageant de génétique inverse en cellules MDCK à MOI de 10^{-5}

Pour le virus H1N1p sauvage de référence un titre de $1,5.10^7$ PFU/ml a été obtenu pour le stock viral après 2 passages en cellules MDCK. Les titres pour les deux virus témoins V43I et D27N ainsi que pour la plupart des mutants étaient comparables à celui du virus sauvage et à des valeurs basses pour les mutants L550V et S702I. Toutefois, les titres obtenus étaient légèrement plus faibles que celui du virus sauvage pour les mutants R203I et A542T. Les

titres étaient réduits de façon encore plus significative pour le mutant M414A avec un titre de $2,5.10^5$ PFU/ml et pour le mutant V451A qui n'avait pas été détecté à l'issue de la génétique inverse mais a pu être amplifié avec un titre de $5,0.10^5$ PFU/ml (Tableau 7). Il est intéressant de noter que le mutant A542T présentait un titre de $1,5.10^6$ PFU/ml après deux passages en cellules MDCK, indiquant l'absence de production anormale de particules défectives dans le contexte du sous-type H1N1p contrairement à ce qui a été observé en contexte H3N2.

Tableau 7 - Bilan des résultats obtenus pour les mutants de PB1 de sous-type H1N1p lors des expériences de minigénome et de génétique inverse.

H1N1p	Minigénome				Contexte infectieux	
PB1	Activité intrinsèque (%WT) ^a	Activité + Ribavirine (%WT + ribavirine) ^b	Activité + Ribavirine (%WT) ^c	Facteur de résistance ^d	Titre C0 (PFU/ml) ^e	Titre C2 (PFU/ml) ^f
7608-WT	100%	100%	19%	1	6.10^5	$1,5.10^7$
F103S	14%	32%	6%	2,7	<i>N.D.</i> ^g	- ^h
M195L	66%	86%	17%	1,4	9.10^5	$3,5.10^7$
R203I	8%	14%	3%	1,9	$2,5.10^3$	$3,5.10^6$
T228S	55%	103%	20%	1,9	9.10^3	$1,7.10^7$
M414A	17%	54%	11%	3,2	5.10^1	$2,5.10^5$
V451A	13%	59%	11%	4,7	<i>N.D.</i>	5.10^5
A542T	16%	55%	11%	3,6	$7,5.10^1$	$1,5.10^6$
L550V	22%	65%	12%	2,9	$2,8.10^2$	5.10^6
G622E	48%	148%	28%	3,2	$5,5.10^4$	$1,1.10^7$
A643G	191%	359%	69%	1,9	$8,8.10^4$	$2,8.10^7$
I674L	579%	292%	57%	0,5	$4,5.10^5$	$1,3.10^7$
I674F	1446%	540%	105%	0,5	5.10^3	1.10^7
S702I	17%	48%	9%	2,7	$1,1.10^4$	$5,3.10^6$
V43I	15%	74%	14%	4,8	1.10^4	$2,5.10^7$
D27N	121%	135%	26%	1,2	$1,3.10^5$	1.10^7

a - les activités intrinsèques en absence de ribavirine sont exprimées en pourcentage de l'activité pour la polymérase sauvage (WT)

b - les activités résiduelles en présence de ribavirine 125 μ M sont exprimées en pourcentage de l'activité pour la polymérase sauvage (WT) en présence de ribavirine 125 μ M

c - les activités résiduelles en présence de ribavirine 125 μ M sont exprimées en pourcentage de l'activité pour la polymérase sauvage (WT) en absence de ribavirine

d - le facteur de résistance correspond au rapport de la diminution de l'activité polymérase en présence de ribavirine pour la RNPv mutante et la RNPv sauvage.

e - titre du surnageant de génétique inverse (C0) exprimé en PFU/ml

f - titre du surnageant de culture C2 après deux passages des surnageants de culture de génétique inverse en cellules MDCK à une MOI de 10^{-3} .

g - ND : non détectable

h : « - » : non réalisé

Dans le but de vérifier la présence des mutations introduites, l'ARN de l'ensemble des stocks viraux après amplification en cellules MDCK a été extrait et le segment PB1 a été

séquence. L'analyse des séquences a permis d'observer que chaque mutation introduite a été maintenue dans la séquence codante de la protéine PB1, mais également qu'il n'est pas apparu de mutations additionnelles dans la séquence PB1. Par ailleurs, le séquençage haut débit selon la technique Illumina du génome complet a été réalisé sur la plateforme P2M de PIB-Net. L'analyse des séquences consensus pour les 8 segments viraux a confirmé qu'il n'est pas apparu de mutations additionnelles dans la séquence PB1, ni dans aucune autre des séquences codantes des protéines du complexe polymérase viral, PB2, PA ou NP. Toutefois, des substitutions additionnelles présentes dans au moins 30% de la population virale ont été détectées. Pour les virus H1N1p, il s'agit de mutations additionnelles dans les séquences codant pour la HA des virus M195L, R203I, T228S, L550V, A643G, I674F, V43I et D27N et d'un changement nucléotidique synonyme dans la séquence codant pour PA du virus D27N. Pour les virus H3N2, il s'agit de mutations additionnelles dans les séquences codant pour la HA du virus A542T et dans la séquence de la NA du virus A401V (Tableau 8).

Tableau 8 - Analyse des séquences du génome complet des virus mutants.

Virus	Mutant	PB2	PB1	PA	HA	M	NA	NP	NS
H3N2	<i>WT</i>								
	N225S		N225S ^a						
	A401T		A401T				T148I(98%)		
	A401V		A401V						
	A542T		A542T		I347V(54%)				
	N694I		N694I						
	<i>V43I</i>		V43I						
	<i>D27N</i>		D27N						
H1N1p	<i>WT</i>								
	M195L		M195L		K147I(38%)				
	R203I		R203I		K171E(49%) N394S(38%)				
	T228S		T228S		K170E(51%)				
	M414A		M414A						
	V451A		V451A						
	A542T		A542T						
	L550V		L550V		E418G(37%)				
	G222E		G222E						
	A643G		A643G		A232E(65%)				
	I674L		I674L						
	I674F		I674F		Y223C(36%)				
	S702I		S702I						
	<i>V43I</i>		V43I		K136N(42%) R269N(53%) V466I(55%)				
<i>D27N</i>		D27N	nt1053 A>G(43%) ^b	A232V(55%)					

a - Les changements d'acides aminés sont indiqués pour les mutations détectées par rapport à la séquence du virus de référence sauvage ; la fréquence au sein de la population virale est notée entre parenthèses en cas d'hétérogénéité de la séquence.

b - mutation synonyme : position et changement nucléotidique ; la fréquence au sein de la population virale est notée entre parenthèses

VI.2. Vitalité des virus mutants en absence et en présence de ribavirine

Afin d'évaluer l'impact de chaque mutation sur la multiplication virale ainsi que leur capacité à induire une résistance à la ribavirine, des cinétiques de multiplication virale ont été réalisées avec chacun des mutants viables, en absence et en présence de ribavirine. Deux concentrations de composé mutagène ont été utilisées pour ces expériences, 40 μ M et 70 μ M de ribavirine, pour évaluer si la sensibilité à la ribavirine était dépendante de la concentration. Les infections ont été réalisées à une MOI de 10^{-3} et les titres viraux dans le surnageant de culture déterminés par plages de lyse à 0, 24, 48 et 72h après infection. Chaque expérience a été réalisée trois fois, de manière indépendante.

Pour le sous-type H3N2, le virus sauvage en absence de ribavirine, atteint à 48 heures post-infection (hpi) un titre de l'ordre de 8.10^7 PFU/ml, valeur plateau à partir de laquelle le titre n'a que faiblement varié avec une valeur de l'ordre de 1.10^8 PFU/ml à 72hpi (Fig.23). La plupart des virus mutants H3N2 étudiés présentait le même profil en absence de ribavirine, à savoir une forte augmentation du titre viral jusqu'à 48hpi suivi d'une faible modification de celui-ci jusqu'à 72hpi. Les titres finaux à 72hpi des mutants témoins V43I et D27N ainsi que des mutants A401T, N694I étaient comparables au titre obtenu pour le virus sauvage avec des valeurs à 72hpi de l'ordre de 7.10^8 PFU/ml pour le virus D27N à $1,5.10^8$ PFU/ml pour le virus A401T. En revanche, pour le virus A401V la cinétique de multiplication apparaît plus rapide que pour le virus sauvage avec un titre à 24hpi supérieur d'environ $2 \log_{10}$ par rapport au virus sauvage, encore légèrement supérieur de $0,5 \log_{10}$ à 48h et comparable au virus sauvage à 72hpi. A l'inverse, les virus mutants N225S et A542T présentaient une cinétique retardée par rapport au virus sauvage avec des titres réduits de un et deux \log_{10} respectivement par rapport au virus de référence à 72hpi (Fig.23).

Pour le sous-type H1N1p, en absence de ribavirine, le virus sauvage, présente un profil de multiplication similaire à celui observé pour le virus H3N2 et atteint à 48hpi un titre de $8,1.10^7$ PFU/ml, valeur plateau à partir de laquelle le titre n'a que peu varié avec une valeur de 7.10^7 PFU/ml à 72hpi (Fig.25). Les deux virus témoins V43I et D27N ainsi que les mutants A643G et I674L étudiés présentaient également le même profil avec des titres à 72hpi comparables à ceux du virus sauvage de $2,8.10^7$ et $1,3.10^7$ PFU/ml respectivement. Pour les autres virus H1N1p mutants, seul le titre à 72hpi a été déterminé pour la comparaison des titres en absence et en présence de ribavirine (voir ci-dessous).

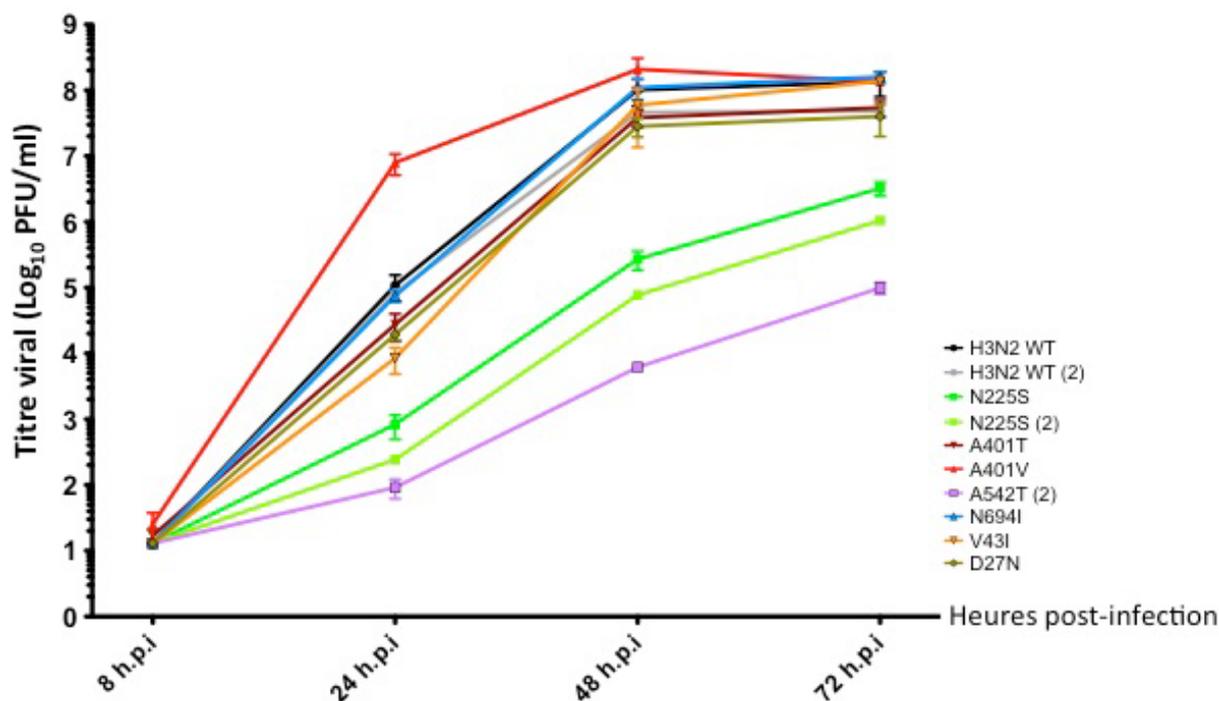


Figure 23 - Cinétique de multiplication des mutants de PB1 de sous-type H3N2.

Des cellules MDCK ont été infectées à une MOI de 10^{-3} PFU/cellule avec les différents virus indiqués. Les surnageants de culture ont été prélevés à 8, 24, 48 et 72h après infection et le titre viral exprimé en PFU/ml a été déterminé par la technique des plages de lyse sur cellules MDCK. (2) Titres évalués lors d'une seconde expérience avec les mutants A542T et N225S ainsi que le virus sauvage. Virus sauvage (noir), Virus sauvage (2, gris) ; virus témoins porteurs des mutations PB1-V43I (orange) et PB1-D27N (kaki) ; virus porteurs des mutations de PB1 sélectionnées : N225S (vert), N225S (2, vert clair), A401T (rouge bordeaux), A401V (rouge), A542T (2, violet), N694I (bleu).

En présence de ribavirine, la cinétique de multiplication des virus est plus lente et les titres diminués selon un profil dose-dépendant. En effet, les titres observés à 48hpi pour les virus sauvages étaient plus faibles en présence de 40 ou 70 μ M de ribavirine et continuaient à augmenter jusqu'à 72hpi, sans atteindre de valeur plateau avant la fin de l'expérience (Figures 24 et 25).

Pour le sous-type H3N2, en présence de 40 μ M de ribavirine, le virus sauvage de référence présentait un titre de $4,3 \cdot 10^5$ PFU/ml à 48hpi qui augmentait à $1,8 \cdot 10^7$ PFU/ml à 72hpi, soit 1 \log_{10} de moins comparativement au titre obtenu sans ribavirine pour le même temps d'incubation. En présence de 70 μ M de ribavirine, les titres à 48hpi et 72hpi étaient respectivement de $1,8 \cdot 10^3$ et $8,5 \cdot 10^3$ PFU/ml, ce qui représente une diminution du titre de plus de 4 \log_{10} par rapport à la condition en absence de ribavirine (Fig.24).

Les virus porteurs des mutations témoin V43I et D27N ainsi que les mutants A401T et N694I suivent des cinétiques comparables au virus sauvage en présence de 40 μ M et 70 μ M de ribavirine avec pour le témoin D27N et le mutant A401T un titre légèrement plus faible à 48hpi mais comparable au sauvage à 72h. En revanche, les virus porteurs des mutations N225S et A542T ont présenté des titres très diminués par rapport au virus sauvage en présence du composé mutagène, avec des titres finaux, à 40 μ M et 72hpi, de $7,4 \cdot 10^3$ PFU/ml et $1,3 \cdot 10^3$ PFU/ml respectivement. A 70 μ M, le virus N225S présentait un titre, très faible, de $9,2 \cdot 10^1$ tandis que le virus A542T semblait proche de l'extinction, deux des réplicats sur les trois réalisés n'étant plus détectables par titrage en plages de lyse, le troisième présentant un titre de $2,5 \cdot 10^1$ PFU/ml. Inversement, le virus porteur de la mutation A401V apparaît bien moins sensible à l'effet de la ribavirine que le virus sauvage. En effet, ce virus présente une cinétique de multiplication plus rapide, et des titres supérieurs d'environ $2 \log_{10}$ à 48hpi par rapport au virus sauvage en présence de 40 μ M ou 70 μ M de ribavirine. A 72hpi, le titre est comparable à celui du virus sauvage à 40 μ M de ribavirine, mais supérieur de plus de $3 \log_{10}$ par rapport au virus sauvage à 70 μ M de ribavine. La mutation A401V au sein de la sous-unité catalytique PB1 semble donc conférer au virus de sous-type H3N2 une meilleure capacité de multiplication ainsi qu'une meilleure résistance à la ribavirine par rapport au virus sauvage.

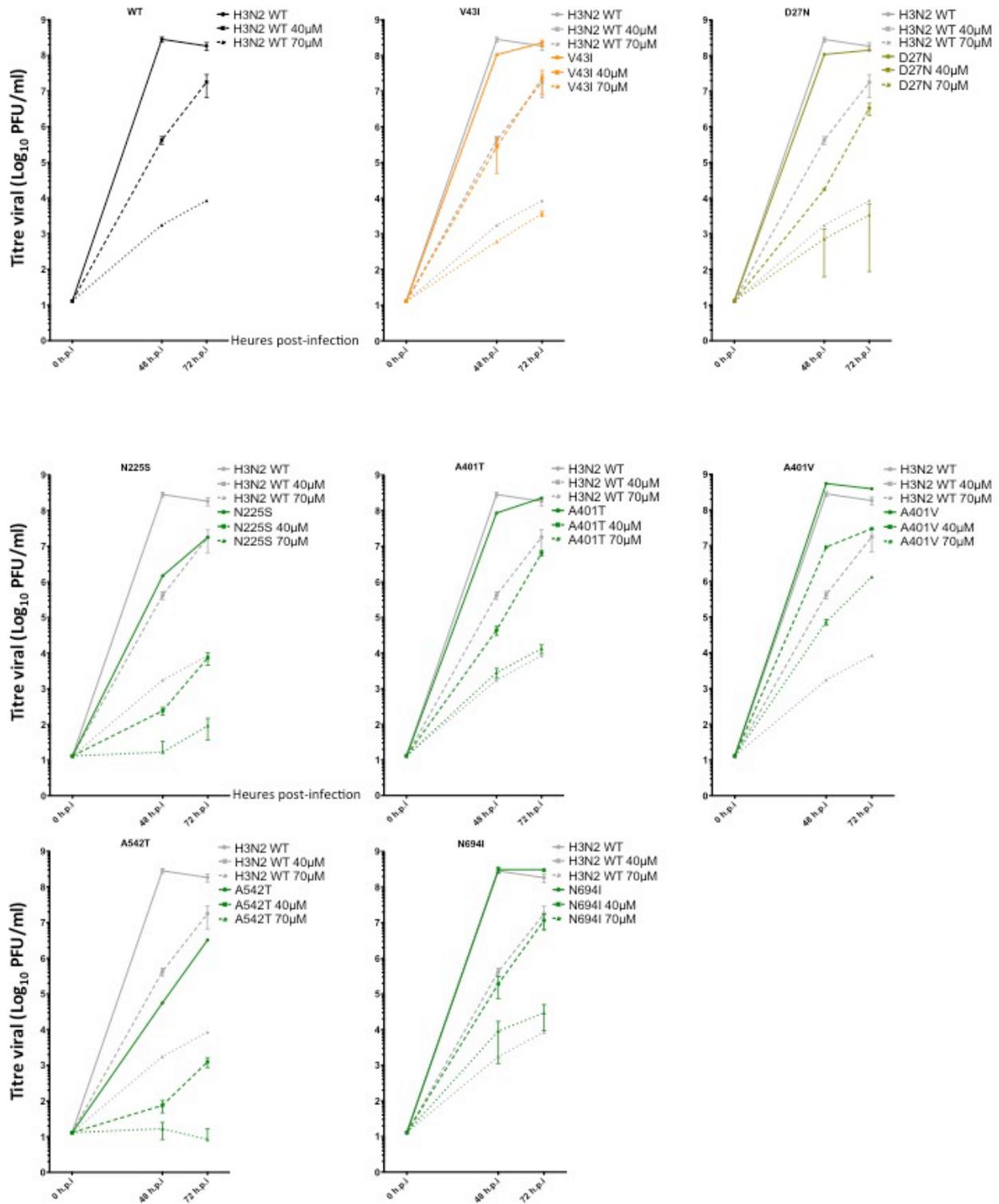


Figure 24 - Cinétique de multiplication des mutants de PB1 de sous-type H3N2 en absence et en présence de ribavirine.

Des cellules MDCK ont été infectées à une MOI de 10^{-3} PFU/cellule en absence (courbe en trait plein) ou en présence de 40 μ M (courbe en tirets) ou 70 μ M (courbe en pointillés) avec les différents virus indiqués. Les surnageants de culture ont été prélevés à 0, 48 et 72h après infection et le titre viral exprimé en PFU/ml a été déterminé par la technique des plages de lyse sur cellules MDCK. Virus sauvage (gris) ; virus témoins porteurs des mutations PB1-V43I (orange) et PB1-D27N (kaki) ; virus porteurs des mutations de PB1 sélectionnées (vert).

Pour le sous-type H1N1p, en présence de 40µM de ribavirine, le virus sauvage de référence présentait un titre de $1,2 \cdot 10^4$ PFU/ml à 48hpi qui augmentait à $1,2 \cdot 10^5$ PFU/ml à 72hpi, soit un peu plus de 2 \log_{10} de moins que le titre obtenu sans ribavirine pour le même temps d'incubation. En présence de 70µM de ribavirine, les titres à 48hpi et 72hpi étaient respectivement de $1,5 \cdot 10^2$ PFU/ml et $2,7 \cdot 10^2$ PFU/ml, ce qui représente une diminution du titre de plus de 5 \log_{10} par rapport à la condition en absence de ribavirine (Fig.25).

Pour le virus témoin D27N et le virus mutant I674L, les cinétiques de multiplication en présence de 40µM et 70µM de ribavirine suivent un profil similaire au virus sauvage. Le virus témoin V43I suit un profil similaire au virus sauvage à 70µM de ribavirine, mais apparaît nettement plus sensible que le virus sauvage à la ribavirine 40µM avec des titres réduits d'environ un \log_{10} à 48hpi et 72hpi. A l'inverse, le virus porteur de la mutation A643G apparaît légèrement moins sensible à la ribavirine que le virus sauvage aux deux concentrations de ribavirine, avec des titres toujours supérieurs à 48hpi et 72hpi (Fig.25).

La sensibilité à la ribavirine a été évaluée pour l'ensemble des virus H1N1p mutants à 72hpi (Fig.26.B). En présence de 40µM de ribavirine, la majorité des mutants avait des titres réduits de un à deux \log_{10} (R203I, T228S, M414A, L550V, G622E, I674F, V43I) ou plus (V451A, A542T, S702I) par rapport au virus sauvage. Les virus M195L, I674L et D27N avaient des titres comparables au virus sauvage, alors que le mutant A643G avait un titre supérieur d'un \log_{10} . Ces tendances sont globalement retrouvées en présence de 70µM de ribavirine, bien que les mutants G222E et V43I apparaissent comparativement moins sensibles à l'augmentation de la concentration de ribavirine avec une réduction de titre moins marquée et les virus R203I, T228S comparativement plus sensibles avec une réduction de titre plus marquée par rapport au virus sauvage. Le mutant V451A n'était quant à lui plus détectable à 70µM de ribavirine (Fig.26.B).

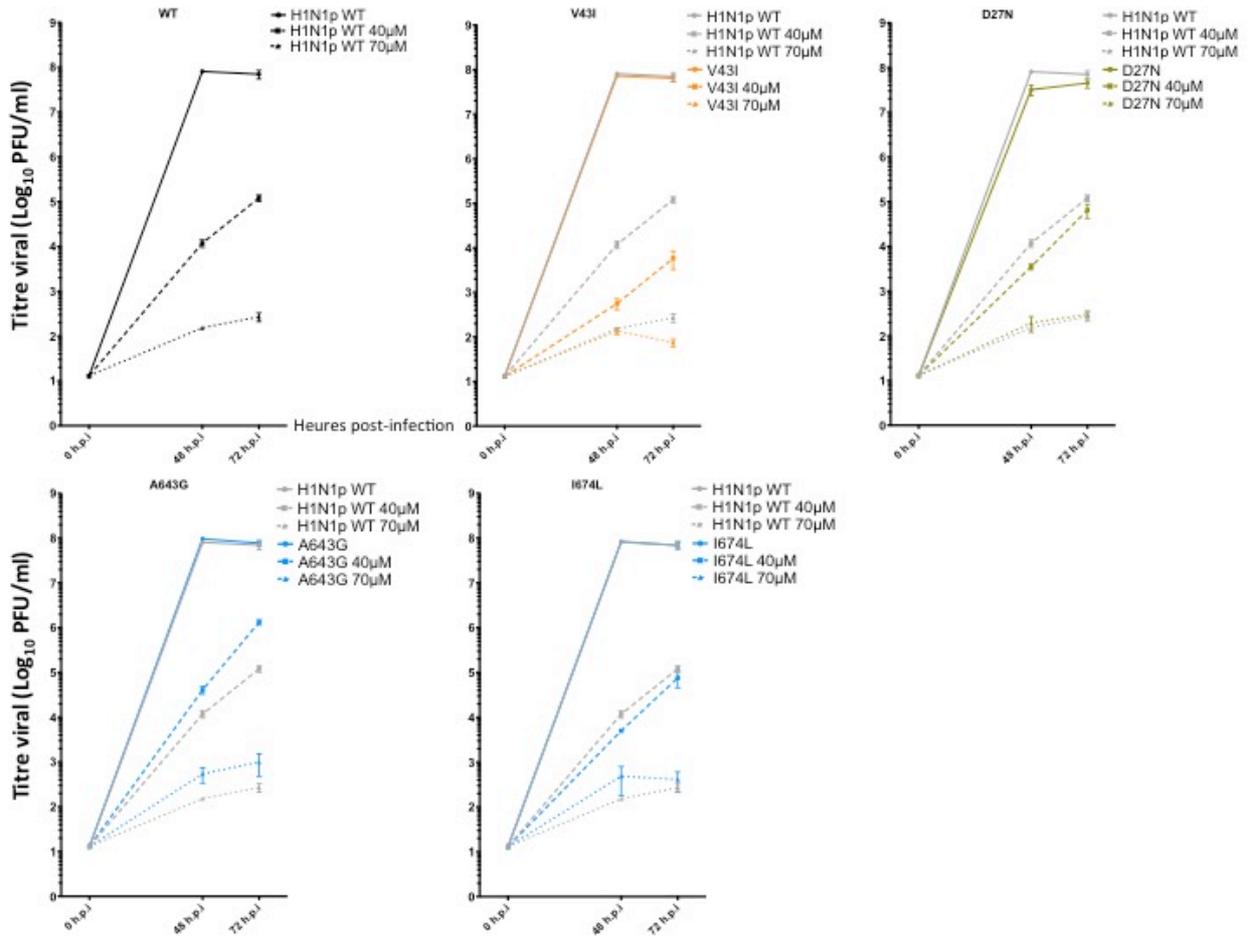


Figure 25 - Cinétique de multiplication des mutants de sous-type H1N1p en absence et en présence de ribavirine.

Des cellules MDCK ont été infectées à une MOI de 10^{-3} PFU/cellule en absence (courbe en trait plein) ou en présence de 40μM (courbe en tirets) ou 70μM (courbe en pointillés) avec les différents virus indiqués. Les surnageants de culture ont été prélevés à 0, 48 et 72h après infection et le titre viral exprimé en PFU/ml a été déterminé par la technique des plages de lyse sur cellules MDCK. Virus sauvage (gris) ; virus témoins porteurs des mutations PB1-V43I (orange) et PB1-D27N (kaki) ; virus porteurs des mutations de PB1 sélectionnées (bleu).

Au total, l'étude de la vitalité des mutants de PB1 en présence de 40μM et 70μM de ribavirine souligne l'importance du contexte du sous-type viral. En particulier, la sensibilité à la ribavirine des deux mutants témoins V43I et D27N varie selon le sous-type, le virus H3N2 D27N apparaissant plus sensible à la ribavirine que son homologue H1N1p D27N alors que l'inverse est observé pour le mutant V43I. Toutefois, cette étude a permis d'identifier dans le contexte H3N2, le mutant A401V pour lequel la sensibilité est significativement réduite par rapport au virus sauvage en présence de 70μM de ribavirine. De plus, on retiendra les mutants A401V et N694I, dont la sensibilité à la ribavirine est comparable à celle du virus sauvage et

du virus témoin V43I en présence de 40 μ M de ribavirine mais la sensibilité est diminuée, notamment pour le virus A401V, à 70 μ M de ribavirine. En contexte H1N1p, le mutant A643G présente une sensibilité à la ribavirine significativement diminuée par rapport au virus sauvage aux deux concentrations de ribavirine. Par ailleurs, les mutants M195L et I674L montrent une sensibilité comparable à celle du virus sauvage et du virus témoin D27N aux deux concentrations de ribavirine. Ces mutants, et plus particulièrement les mutants H3N2 A401V et H1N1p A643G apparaissent donc comme de bons candidats susceptibles de correspondre aux mutants de fidélité recherchés (Fig.26).

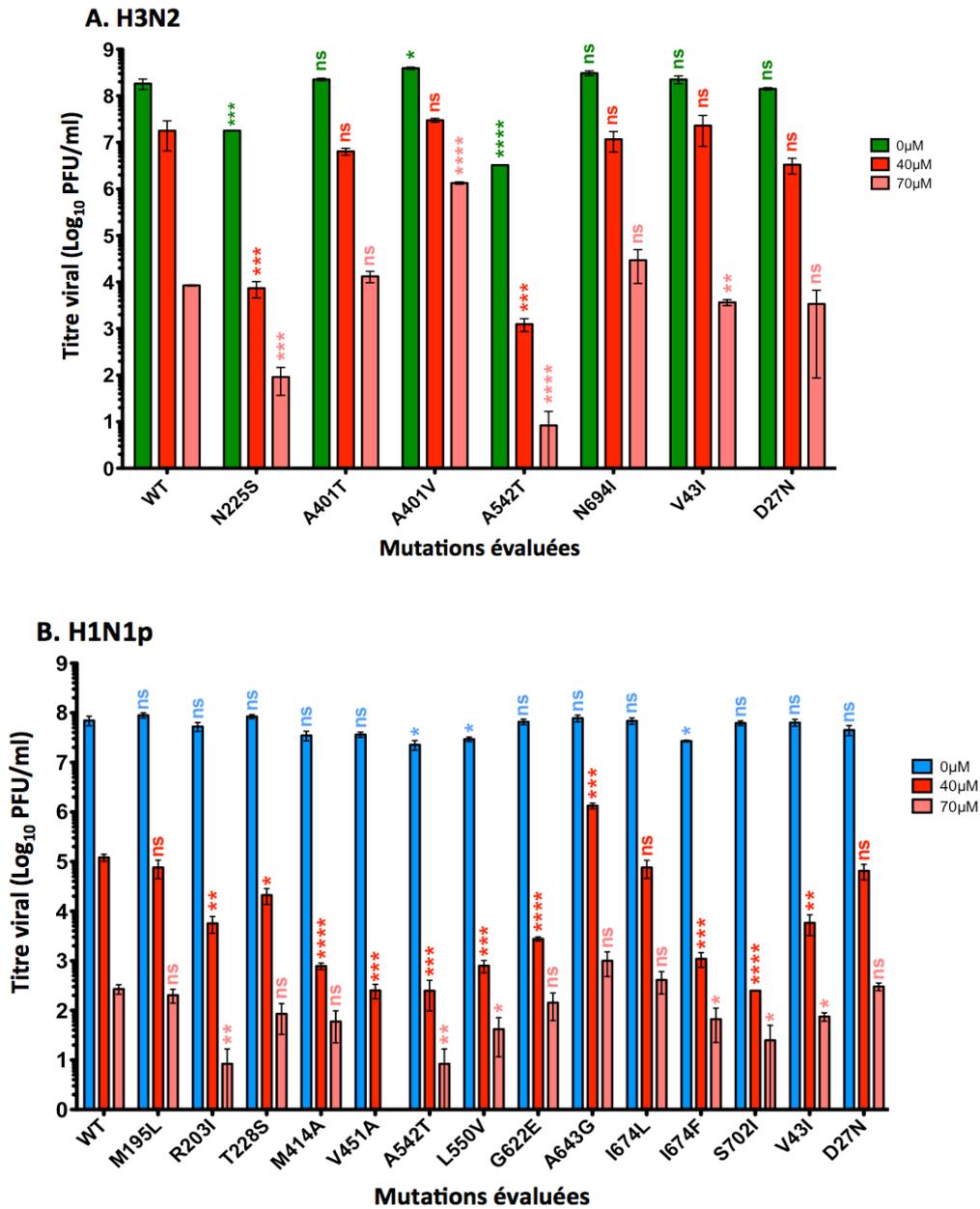


Figure 26 - Comparaison des titres viraux des mutants de PB1 en absence et en présence de ribavirine.

Pour les différents virus H3N2 (A) ou H1N1p (B) porteurs des mutations indiquées dans PB1, les titres viraux obtenus 72h après infection de cellules MDCK (MOI 10⁻³ PFU/cellule) en absence de ribavirine (bleu pour H1N1p ; vert pour H3N2) ou en présence de ribavirine 40µM (rouge) ou 70µM (rouge clair) sont représentés. (Moyenne ± SEM, comparaison deux à deux par t-test, par rapport à WT sans ribavirine en bleu et par rapport à WT en présence de 40µM et 70µM de ribavirine en rouge et rouge clair. ns = non significatif. p-value>0.05 : * = 0.05>p-value>0.01, ** = 0.01>p-value>0.001, *** = 0.001>p-value>0.0001, **** = p-value<0.0001)

VI.3. Diversité des populations virales des mutants de PB1

Pour déterminer si les mutations de PB1 qui confèrent une sensibilité réduite à la ribavirine ont un impact sur la fidélité de la polymérase, une analyse de la diversité des séquences des populations virales a été entreprise par séquençage haut débit selon la technique Illumina en collaboration avec l'équipe de Marco Vignuzzi, pour le virus sauvage et les virus témoins V43I et D27N des deux sous-types viraux, ainsi que pour les virus H3N2 mutants A401T, A401V et N694I et les virus H1N1p mutants M195L, A643G, I674L et I674F. Le mutant I674F a été inclus bien qu'il ne présente pas de réduction de sensibilité à la ribavirine en raison de son activité polymérase particulièrement élevée. Les séquençages ont été réalisés sur les virus produits en absence de ribavirine ou en présence de ribavirine 40 μ M ou 70 μ M. Les données de séquence sont en cours d'analyse.

Discussion & Perspectives

I. Discussion

Lors de cette étude la production de deux banques de séquences PB1 de sous-types H3N2 et H1N1p, mutées de manière aléatoire, a permis d'identifier de nombreuses mutations après plusieurs étapes de sélection par test de l'activité de transcription/réplication de minigénomes en présence de ribavirine. Parmi les mutations identifiées, 23 et 31 ont été spécifiquement réintroduites dans les séquences PB1 de sous-type H3N2 et H1N1p respectivement. A la suite d'expériences de minigénomes en présence de ribavirine, les mutations induisant la plus forte résistance ont été réintroduites dans le contexte de virus infectieux par génétique inverse. Finalement, l'évaluation de la vitalité des virus obtenus en présence de ribavirine a permis d'identifier deux mutants de fidélité potentiels, un pour chaque sous-type, capables de résister plus efficacement au mutagène que le virus sauvage (Fig.27).

Mutagenèse aléatoire 2,7 substitutions par séquences

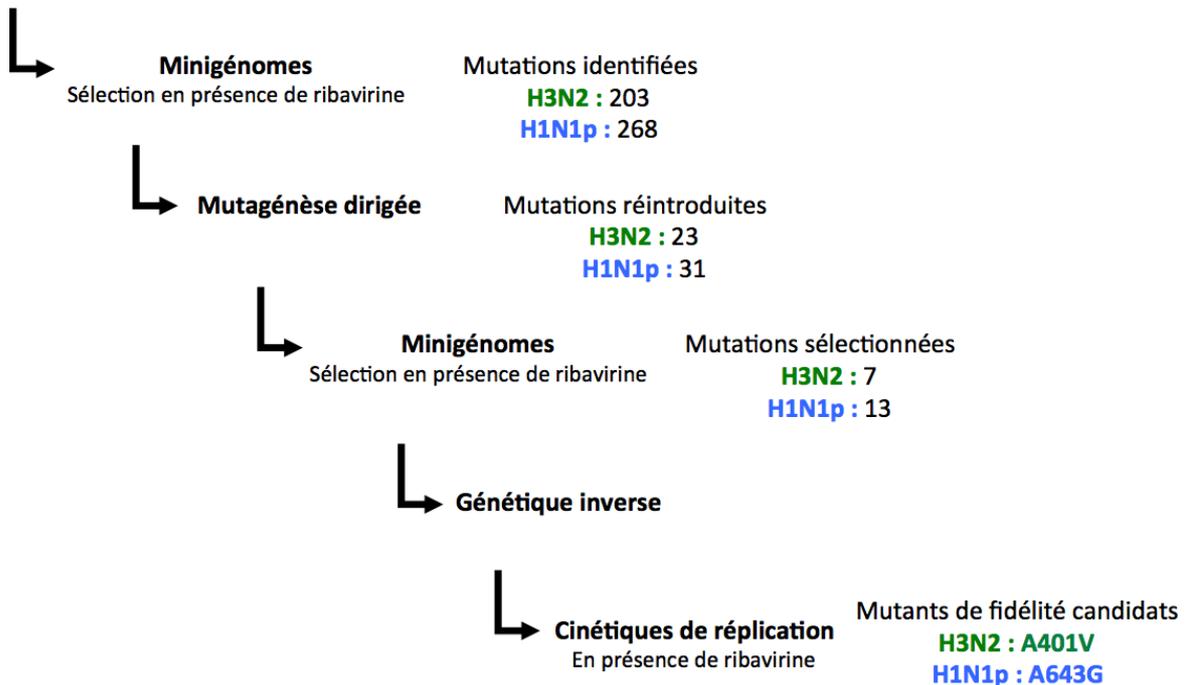


Figure 27 - Bilan des étapes réalisées au cours du projet.

I.1. Caractéristiques des banques de séquences PB1 mutées aléatoirement

Pour produire les banques de séquences PB1 mutées, nous avons utilisé une approche de mutagenèse aléatoire par epPCR. Les conditions optimisées selon la quantité de matrice et le nombre de cycles de PCR ont permis d'obtenir des banques de séquences PB1 mutées pour chacun des sous-types viraux dont les caractéristiques sont très comparables en termes de nombre de substitutions nucléotidiques ou d'acides aminés, avec un faible nombre de délétions/insertions et de codons d'arrêt de la traduction. La répartition homogène des mutations le long de la séquence de PB1 a permis d'analyser l'ensemble de la séquence de PB1. Cette homogénéité de la répartition des mutations a été retrouvée pour les sous-banques sélectionnées à l'issue des cycles de sélection.

Ainsi, cette approche de mutagenèse aléatoire devrait pouvoir s'appliquer aisément à la séquence d'autres gènes et notamment aux séquences des autres protéines du complexe polymérase. Par ailleurs, ces banques de séquences PB1 mutées pourraient s'avérer utiles pour d'autres études comme par exemple la recherche de mutants de perte d'interaction avec les protéines du complexe polymérase à condition de disposer de moyens de sélection appropriés.

I.2. Impact des mutations sur l'activité polymérase des RNPv

L'impact des mutations a été évalué par reconstitution de RNPv fonctionnelles comportant une polymérase PB1 mutée. La présence des mutations dans la banque initiale s'est traduite d'emblée par une diminution de 63 à 83% de l'activité intrinsèque du complexe polymérase pour les deux sous-types. Celle-ci a globalement diminué au cours des étapes de sélection, notamment pour le sous-type H3N2 bien que le niveau d'activité polymérase ait été pris en compte à chaque étape dans la sélection des sous-banques. Ceci traduit le fait que la résistance à la ribavirine s'accompagne généralement d'une diminution de l'activité polymérase comme observé lors de l'analyse spécifique des mutations d'intérêt (Fig.28.A).

En effet, pour le sous-type H3N2, parmi les 25 mutations à 15 positions analysées, 9 mutations à 6 positions parmi lesquelles la mutation témoin V43I réduisent l'activité polymérase de façon drastique, 12 mutations à 8 positions réduisent l'activité de façon importante ou modérée dont la mutation témoin D27N, 2 mutations à 2 positions n'ont pas ou

peu d'effet sur l'activité polymérase et 2 mutations à 2 positions augmentent l'activité polymérase par rapport à celle du virus sauvage.

Pour le sous-type H1N1p, parmi les 33 mutations à 23 positions analysées, 12 mutations à 9 positions parmi lesquelles la mutation témoin V43I réduisent l'activité polymérase de façon drastique, 12 mutations à 9 positions réduisent l'activité de façon importante ou modérée, 5 mutations à 4 positions dont la mutation témoin D27N n'ont pas ou peu d'effet sur l'activité polymérase et 4 mutations à 2 positions augmentent l'activité polymérase par rapport à celle du virus sauvage. On note donc une proportion comparable pour les deux sous-types de mutations et positions qui ont un effet drastique sur l'activité polymérase ainsi que de mutations et positions qui n'ont pas ou peu d'effet sur l'activité polymérase ou qui l'augmentent.

Les mutations qui ont un effet drastique sur l'activité polymérase, ont été identifiées aux positions 43, 225, 401, 542 et 694 pour le sous-type H3N2 et 43, 103, 203, 396, 414, 451, 494, 542 et 702 pour le sous-type H1N1p. Elles sont pour la plupart localisées dans la région dite centrale (résidus 21-669) de la protéine PB1 (Pflug *et al.* 2014). Elles sont plus particulièrement concentrées d'une part, au niveau du domaine des doigts (résidus 35-177), des extrémités des doigts (résidus 212-265) et du feuillet β qui les connecte également proche du motif pre-A/K de la polymérase (résidus 222-240), et d'autre part dans le domaine des doigts résidus 398-412 et le domaine en épingle à cheveux β qui le précède ainsi que dans le domaine C-terminal de la paume (résidus 398-498) à proximité des motifs B, C, D et E de la polymérase, et enfin au niveau du domaine du pouce (résidus 498-657). Les mutations en positions 694 et 702 sont elles localisées dans le domaine C-terminal de PB1 qui interagit avec le domaine N-terminal de la sous-unité PB2. Ces mutations qui diminuent l'activité polymérase de façon drastique ont ainsi toutes été identifiées au niveau d'éléments essentiels pour l'activité de transcription et de réplication du complexe polymérase. De façon similaire, Cheung *et al.* (Cheung *et al.* 2014) ont montré un effet drastique des mutations A661T et S678N dans la région C-terminale de PB1. Les mutations qui augmentent l'activité polymérase ont été identifiées en positions 121 et 641 pour le sous-type H3N2 et en positions 643 et 674 pour le sous-type H1N1p. Elles sont localisées d'une part dans le domaine des doigts (résidus 35-177) et d'autre part, dans la partie C-terminale du domaine du pouce (résidus 498-657) à proximité immédiate de la boucle d'amorçage (résidu 640) et dans l'extrémité C-terminale qui interagit avec PB2. A nouveau, ces mutations ont été identifiées au niveau d'éléments essentiels pour l'activité de transcription et de réplication du complexe

polymérase. L'évaluation de l'activité polymérase par test de minigénome reflète l'activité globale de transcription/réplication des RNPv fonctionnelles reconstituées. Il serait intéressant de déterminer de façon plus spécifique quel est l'impact de ces mutations sur la transcription, notamment pour les mutations localisées au niveau de la région C-terminale qui interagit avec PB2, ou sur chacune des étapes de réplication, de synthèse du cARN à partir du vARN puis du vARN à partir du cARN.

Pour certaines positions, des effets plus ou moins marqués ont été observés, voire des effets opposés comme pour les mutations K121N et K121R en contexte H3N2 qui respectivement augmentent ou diminuent l'activité polymérase. Une analyse systématique au niveau de ces positions de l'impact de différentes substitutions, selon la nature de l'acide aminé et en relation avec une analyse structurale permettrait d'apporter des éléments pour une meilleure compréhension du fonctionnement du complexe polymérase.

Par ailleurs, des effets différents peuvent être observés pour une même substitution selon le sous-type, soulignant l'importance du contexte de la protéine PB1 elle-même et plus largement des protéines du complexe polymérase. Ainsi, des variations sont observées pour la mutation L7Q, qui a un impact modéré sur l'activité dans le contexte H1N1p et plus important dans le contexte H3N2 et pour la mutation témoin D27N qui a un impact modéré dans le contexte H3N2 mais n'a pas d'effet notable sur l'activité polymérase dans le contexte H1N1p. Il est à noter que ces deux mutations sont localisées dans la région N-terminale de PB1 qui interagit avec l'extrémité C-terminale de PA au sein du complexe. La mutation D27N a été initialement décrite dans le contexte de la souche virale A/WSN/33 de sous-type H1N1 (Binh *et al.* 2014). Il a été montré que dans ce contexte l'activité polymérase de RNPv D27N est similaire à celle du sauvage comme ce que nous avons observé dans le contexte H1N1p. Pour la mutation témoin V43I, pour laquelle nous avons observé un impact drastique sur l'activité polymérase des deux sous-types H3N2 et H1N1p, Cheung *et al.* (Cheung *et al.* 2014) ont montré qu'elle entraîne une diminution modérée de l'activité de la polymérase H3N2 mais n'a pas d'effet sur l'activité de la polymérase de sous-type H5N1. Ces observations soulignent à nouveau l'importance du contexte de la polymérase sur l'effet des mutations, la différence d'effet dans le contexte H3N2 pouvant être attribué à la différence de souches dont PB1 est dérivée, la souche A/Wuhan/359/95 dans les expériences de Cheung *et al.* et A/Centre/1003/2012 dans nos expériences.

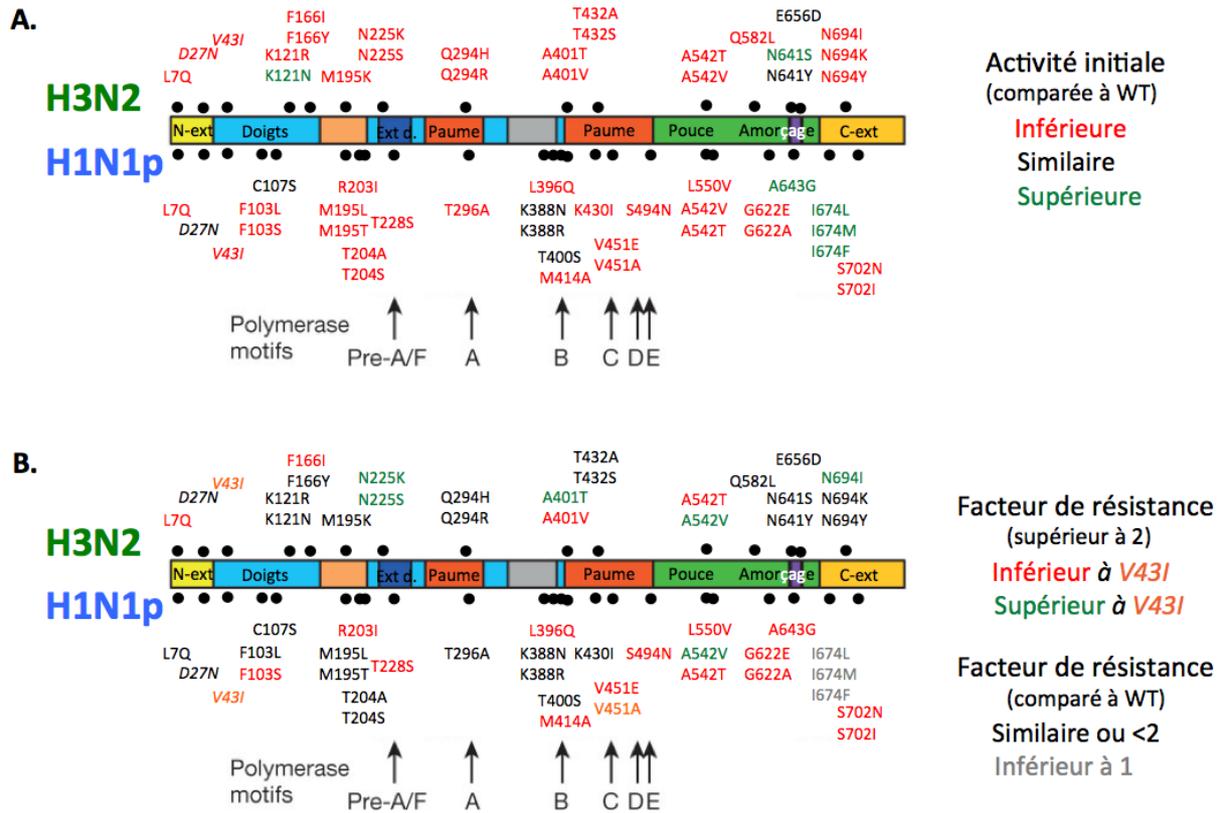


Figure 28 - Répartition et effets des mutations étudiées sur la structure linéaire de la protéine PB1.

Les noms des sous-domaines et la localisation des motifs polymérase fonctionnels conservés dans PB1 sont indiqués. Les mutations identifiées en contexte H3N2 ou en contexte H1N1p sont positionnées respectivement au-dessus et en dessous de la représentation linéaire de PB1. A) Effets des mutations sur l'activité intrinsèque de la polymérase par rapport à l'activité de la polymérase sauvage de chaque sous-type. Les mutations ne modifiant pas l'activité de la polymérase sont indiquées en noir. Les mutations responsables d'une augmentation ou d'une diminution de l'activité intrinsèque de la polymérase sont respectivement indiquées en vert ou en rouge. B) Effets des mutations sur la capacité de la polymérase à résister à la ribavirine. Les mutations n'induisant pas de modification du facteur de résistance par rapport à la polymérase sauvage ou un facteur inférieur à 2 sont représentées en noir. Les mutations induisant une plus grande sensibilité à la ribavirine sont indiquées en gris. Les mutations liées à un facteur de résistance supérieur à 2 sont comparées par rapport à l'effet de la mutation V43I (orange). Les mutations induisant un facteur de résistance supérieur à celui obtenu avec la mutation V43I sont indiquées en vert. Les mutations induisant un facteur de résistance inférieur à celui de la mutation V43I sont indiquées en rouge. Pour un facteur similaire à celui obtenu avec la mutation V43I, les mutations sont indiquées en orange. Adapté de (Pflug *et al.* 2014).

I.3. Sensibilité à la ribavirine de l'activité polymérase des RNPv mutées

L'étude de la sensibilité à la ribavirine par reconstitution de RNPv fonctionnelles a été réalisée en présence de ribavirine 50 μ M et 125 μ M pour les sous-types H3N2 et H1N1p respectivement de façon à réduire l'activité polymérase de plus de 90%. Au cours des cycles de sélection, la résistance à la ribavirine a augmenté au fur et à mesure et de façon plus marquée pour les sous-banques H3N2, peut-être du fait d'une plus grande sensibilité initiale à la ribavirine du complexe polymérase de ce sous-type.

Lors de l'étude des mutations spécifiques, pour les deux sous-types, un facteur de résistance à la ribavirine supérieur ou égal à 2 a été observé pour près de la moitié des mutations et positions analysées (Fig.28.B). Pour le sous-type H3N2, la résistance à la ribavirine s'accompagne également d'une réduction drastique de l'activité polymérase dans la majorité des cas, alors que pour le sous-type H1N1p, la diminution de l'activité polymérase associée à la résistance est moins fréquente et moins marquée. De plus, pour ce sous-type, des mutations qui confèrent une résistance à la ribavirine mais conservent une activité polymérase en présence de ribavirine équivalente ou supérieure au sauvage ont été identifiées, notamment aux positions 228, 622 et 643. L'importance du sous-type est également illustrée par le fait que le niveau de résistance de la RNPv avec la mutation V43I semble supérieur en contexte H3N2 par rapport au contexte H5N1 (Cheung *et al.* 2014). Dans nos expériences, un niveau de résistance élevé associé à un impact sur l'activité polymérase en présence de ribavirine modéré en contexte H1N1p ou plus important en contexte H3N2 a été observé. Pour la mutation D27N, une résistance modérée à la ribavirine a été décrite dans le contexte de RNPv dérivées du virus A/WSN/33 (H1N1) avec des IC₅₀ de 18 μ M et 10 μ M pour la RNPv D27N et la RNPv sauvage, respectivement (Binh *et al.* 2014). Au cours de nos expériences, pour les RNPv de sous-types H3N2 et H1N1p, à 50 μ M ou 125 μ M de ribavirine, nous n'avons pas observé de résistance pour la mutation D27N. Les activités polymérase enregistrées étaient similaires à celles obtenues avec les RNPv sauvages et les facteurs de résistance proches de 1.

Ainsi, comme pour l'activité intrinsèque de la polymérase, l'effet des mutations sur la sensibilité à la ribavirine est modulé par le contexte dans lequel elles sont introduites. Néanmoins, des effets indépendants du contexte ont été observés pour les mutations en position 542 qui présentent un niveau de résistance élevé pour différents résidus en contexte H3N2 et H1N1p. Dans quelle mesure le même niveau de résistance serait observé dans le contexte de RNPv dérivées d'autres souches virales ou sous-types reste à déterminer.

Cependant, des valeurs élevées du facteur de résistance pour certaines mutations pourraient être biaisées du fait de la faible activité initiale des polymérases correspondantes. Parmi les mutations avec un facteur de résistance à la ribavirine supérieur ou égal à 2, seules les mutations L7Q, N694K et N694Y pour le sous-type H3N2 et les mutations L550V, T228S, G222A et G222E pour le sous-type H1N1p ont révélé une activité polymérase intrinsèque qui n'est pas diminuée de façon drastique. Ces mutations sont localisées dans la région N-terminale de PB1 (résidus 1-35) qui interagit avec PA, au niveau ou au voisinage du motif Pre-A/F (résidu 222) dans la région des extrémités des doigts (résidus 212-240), dans la région du pouce (résidus 498-669) et la région C-terminale (résidus 669-756) qui interagit avec PB2 (Figures 7 et 20 haut). L'existence d'un biais potentiel dans l'évaluation de la résistance à la ribavirine en fonction du niveau d'activité intrinsèque de la polymérase a été étudié en analysant la corrélation entre l'activité intrinsèque des différentes polymérases étudiées et les facteurs de résistance à la ribavirine déterminés par test en minigénome. Le coefficient de corrélation obtenu pour les mutants en contexte H3N2 et H1N1p est respectivement de 0,33 et de 0,2 (Fig.29). Ce coefficient indique donc qu'il n'y a pas de corrélation significative entre l'activité initiale de la polymérase et les facteurs de résistance déterminés d'après cette analyse. Cependant d'autres analyses doivent être réalisées pour confirmer ce résultat.

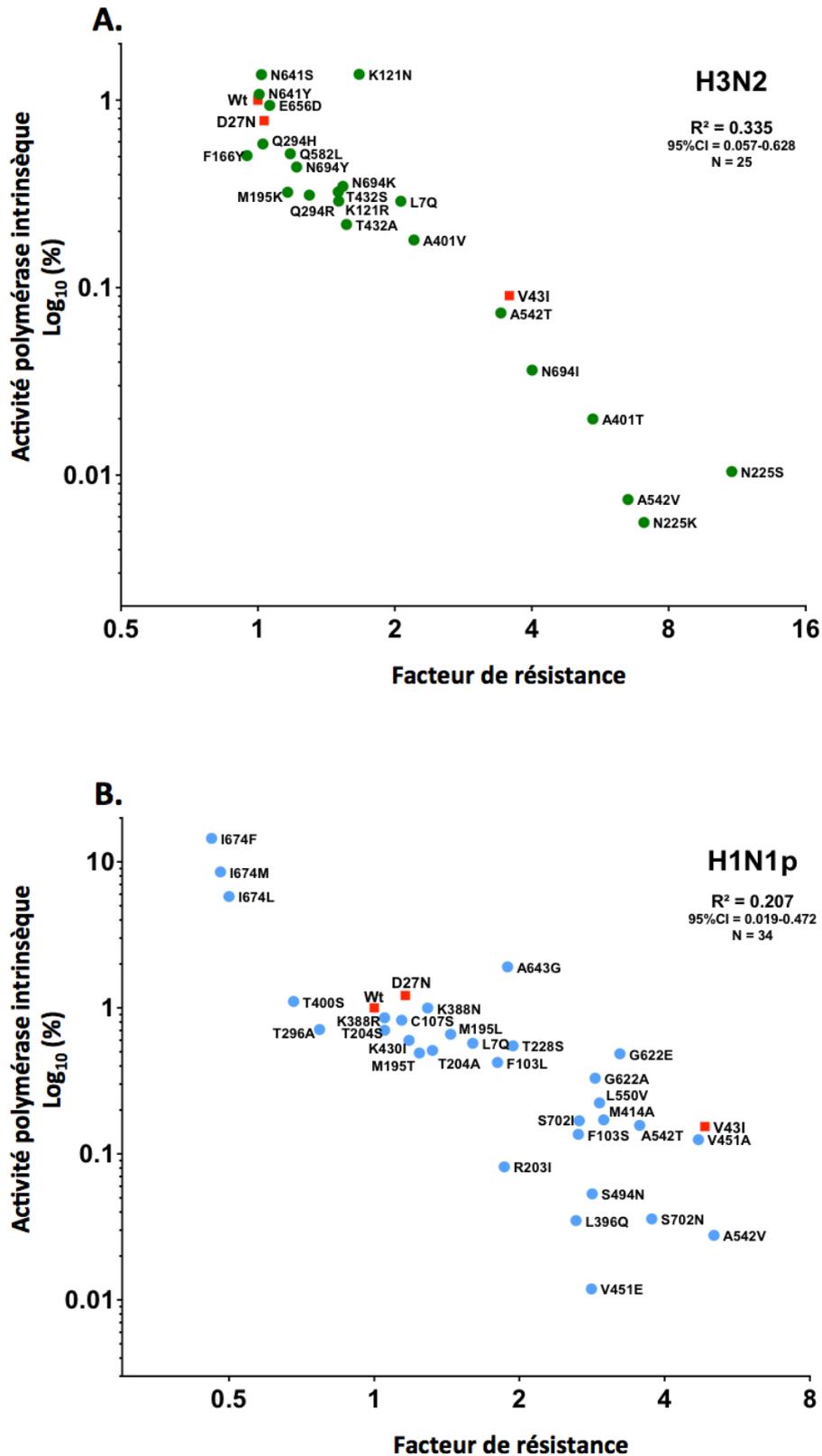


Figure 29 - Evaluation de la corrélation entre l'activité polymérase intrinsèque des RNPv étudiées et le facteur de résistance à la ribavirine évalué par test minigénome.

Résultats obtenus pour les polymérases de sous-types H3N2 (A) et H1N1p (B). Les RNPv portant les protéines PB1 sauvages ou avec les mutations contrôles D27N et V43I sont représentées en rouge pour les deux sous-types. Les résultats obtenus pour les RNPv avec les différentes mutations étudiées sont représentés en vert pour le sous-type H3N2 et en bleu pour le sous-type H1N1p.

I.4. Viabilité et vitalité des virus mutants

Parmi les mutations sélectionnées pour être introduites par génétique inverse dans le contexte de virus infectieux, 3 mutations se sont avérées létales. Il s'agit des mutations N225K et A542V, en contexte H3N2, et F103S, en contexte H1N1p pour lesquelles aucun virus n'a pu être obtenu. Le virus H1N1p avec la mutation V451A n'a été obtenu qu'après un passage à l'aveugle et les mutations N225S et A542T en contexte H3N2 ainsi que les mutations M414A, A542T et L550V en contexte H1N1p ont donné des virus avec des titres très faibles à l'issue de la génétique inverse et qui se multiplient à des titres nettement inférieurs au virus sauvage après passage en cellules MDCK (Tableaux 6 et 7). Pour toutes ces mutations l'activité polymérase intrinsèque des RNPv était très faible par rapport à l'activité de la RNPv sauvage correspondante. Cependant, les virus mutants A401T, N694I et V43I en contexte H3N2 et S702I et V43I en contexte H1N1p, dont les activités polymérase intrinsèques sont également très faibles ont été produits et se multiplient de façon comparable au virus sauvage, suggérant que l'absence de viabilité ne s'explique pas uniquement par le très faible niveau d'activité polymérase des mutants. La viabilité des virus mutés ainsi que leur capacité de multiplication dépendent également de la nature du résidu à une position donnée comme pour les positions 225, 401 et 542 dans le contexte H3N2 et semble dans ce cas en relation avec le niveau d'activité intrinsèque de la polymérase (Tableau 6). Il serait ainsi intéressant de déterminer dans le contexte H1N1p si la substitution F103L dont l'activité polymérase est nettement supérieure à celle observée pour la substitution F103S permet d'obtenir un virus viable muté à cette position.

Pour les mutations qui se traduisent par des activités polymérase des RNPv supérieures (A643G, D27N) ou très supérieures (I674L, I674F) à celles de la RNPv H1N1p sauvage, les virus mutés correspondants ont tous été obtenus et ont une capacité de multiplication comparable à celle du virus H1N1p sauvage.

Globalement, les virus de sous-type H1N1p semblent plus sensibles au niveau d'activité de la polymérase que les virus H3N2. Pour les virus H1N1p, l'absence de viabilité est observée pour des activités polymérase intrinsèques de 13% et 14% de celle du sauvage, alors que pour les virus H3N2, seules les mutations pour lesquelles l'activité polymérase intrinsèque était inférieure à 2% se sont avérées létales. Cela est probablement dû à l'activité intrinsèque des polymérases sauvages, plus élevée pour le virus H3N2 que pour le virus H1N1p dont l'activité intrinsèque plus faible pourrait le rendre plus sensible à l'effet des mutations.

Au total, les positions 225 et 542 dans la séquence protéique de PB1 et pour H3N2 ainsi que la position 103 et dans une moindre mesure les positions 414, 451 et 542 pour H1N1p semblent jouer un rôle important non seulement dans l'activité intrinsèque de la polymérase mais également dans la viabilité et la vitalité du virus, même si pour les virus mutants H1N1p obtenus, les titres finaux après passages étaient proches du titre du virus sauvage. L'effet plus marqué sur la vitalité virale de la mutation A542T dans le contexte H3N2 par rapport au contexte H1N1p peut être attribué à la production très importante de particules défectives interférentes observée en contexte H3N2 uniquement et qui aboutit rapidement à l'extinction de la population virale lors des passages. La position 542 est localisée au sein du domaine du pouce de la polymérase PB1, à proximité de la boucle d'amorçage de la synthèse d'ARN. Il est donc possible qu'un amorçage défectueux lié au remplacement de l'alanine, résidu aliphatique hydrophobe, par une thréonine, résidu polaire neutre donc hydrophile, contribue à la synthèse d'ARN défectifs.

Les virus témoins V43I et D27N ont été produits dans les deux contextes H3N2 et H1N1p. Leur capacité de multiplication est comparable à celle des virus sauvages correspondants bien que l'activité intrinsèque de la polymérase V43I soit drastiquement réduite dans les deux contextes. Nos résultats complètent ainsi l'étude de Binh et al (Binh *et al.* 2014) qui n'avaient pas étudié la mutation D27N dans le contexte de virus infectieux. Nos résultats sont en accord et étendent les résultats de Cheung *et al.* (Cheung *et al.* 2014) qui n'avaient pas non plus observé d'impact de la mutation V43I sur la vitalité virale en contexte H3N2 comme en contexte H5N1.

I.5. Sensibilité à la ribavirine des virus mutants

La plupart des virus mutants étudiés ont présenté une résistance à la ribavirine similaire voire diminuée par rapport à la souche parentale. Lors des expériences de minigénomes, ces mutations induisaient pourtant une résistance au mutagène supérieure à ce qui était observé avec la polymérase sauvage avec des facteurs de résistance élevés. Cette différence entre les résultats observés dans le contexte des RNPv et du virus infectieux sont sans doute liées à une très faible activité intrinsèque de la polymérase des mutants et aux biais induits dans l'évaluation de la sensibilité à la ribavirine des RNPv. L'activité polymérase initiale des RNPv apparaît donc comme un facteur à prendre en compte pour identifier les mutations susceptibles de conférer une résistance au mutagène dans le contexte du virus infectieux à partir de leur effet sur la sensibilité de l'activité des RNPv. Pour la mutation D27N, dont l'activité polymérase intrinsèque est proche de celle de la polymérase sauvage pour les deux sous-types, la sensibilité à la ribavirine par rapport au sauvage semble plus marquée pour les virus mutés que pour les RNPv. D'autres facteurs dans le contexte de la multiplication virale pourraient ainsi compenser les effets liés au complexe polymérase lui-même.

Par ailleurs, nos résultats soulignent l'importance du contexte du sous-type viral puisque le virus H3N2 D27N apparaît plus sensible à la ribavirine que son homologue H1N1p D27N alors que l'inverse a été observé pour le mutant V43I avec une sensibilité comparable au virus sauvage en contexte H3N2 et une sensibilité augmentée par rapport au sauvage en contexte H1N1p. Ceci contraste avec les résultats décrits par Cheung *et al.* (Cheung *et al.* 2014) qui montrent une diminution de la sensibilité à la ribavirine dans le contexte de virus de sous-types H3N2 et H5N1. La discordance entre nos résultats et ceux de Cheung *et al.* pour le virus V43I-H3N2 pourrait être liée à la différence de souche virale utilisée.

Néanmoins, notre étude a permis d'identifier les mutants H3N2 A401V et H1N1p A643G pour lesquels la sensibilité à la ribavirine est clairement réduite par rapport au virus sauvage comme potentiels mutants de fidélité. Les mutants H3N2 A401T et N694I et H1N1p I674L pourraient également être légèrement plus résistants que le sauvage à une concentration de ribavirine de 70 μ M. Ces mutants n'étaient pas ceux pour lesquels les facteurs de résistance mesurés dans le contexte des RNPv étaient les plus élevés, mais l'activité polymérase intrinsèque des RNPv correspondantes était nettement plus élevée que celle des mutants avec des facteurs de résistance supérieurs (Tableaux 6 et 7). Une activité polymérase intrinsèque suffisante pourrait ainsi être nécessaire à l'expression d'une résistance au mutagène.

Cependant à l'inverse, une activité polymérase d'un niveau excessif comme dans le cas du mutant I674F pourrait ne pas non plus être propice à l'expression de la résistance. L'importance de l'équilibre entre activité polymérase et facteur de résistance des RNPv et résistance du virus muté pourrait être explorée par une analyse de l'effet de différents résidus aux positions pour lesquelles une résistance a été observée.

La représentation dans la nature des mutations de résistance à la ribavirine observées dans cette étude a été évaluée à partir de la base de données FluServer.

Les mutations de sous-type H3N2, A401V et N694I, ont été comparées à 5438 séquences et n'ont jamais été décrites pour les virus humains circulant. En position 401, deux autres types de mutations ont cependant été répertoriées pour cinq séquences. En position 694, trois autres types de mutations sont répertoriées pour quatorze séquences.

Les mutations A643G et I674L, de sous-type H1N1p, ont été comparées à 7328 séquences. La mutation I674L n'a jamais été identifiée. Trois autres types de mutations sont décrites pour neuf séquences à cette position. Concernant la position 643, celle-ci est plus susceptible d'être mutée dans la nature. Quatre types de mutations sont répertoriées pour 37 séquences, parmi lesquelles la mutation A643G observée une fois pour le virus A/Keelung/0025/2016 et les mutations A643S observée 4 fois et A643T observée une fois. Il serait intéressant de comparer la sensibilité à la ribavirine de cette souche, isolée dans la nature avec celle de notre virus mutant A643G produit par génétique inverse. Il serait également intéressant d'étudier la sensibilité à la ribavirine conférée par les autres mutations identifiées à cette position.

Il est important de noter cependant que les séquences PB1 ne sont pas toujours disponibles pour de nombreux isolats et échantillons cliniques, les informations obtenues apparaissent donc limitées aux séquences référencées car elles ne reflètent pas la totalité de la variabilité existante dans la nature. De plus nous nous sommes limités dans cette analyse aux virus H3N2 et H1N1 circulant chez l'homme. Il serait important de rechercher également si les mutations identifiées sont retrouvées dans les séquences PB1 de virus animaux et d'autres sous-types.

I.6. Relation des mutations avec la structure de la polymérase

L'ensemble des mutations identifiées dans notre étude apparaissent groupées au cœur du complexe polymérase d'après la structure tridimensionnelle et également proches de la mutation témoin V43I, alors que la mutation témoin D27N pour lequel aucun effet n'a été mis en évidence dans le contexte du virus infectieux apparaît plus excentrée (Fig.30).

La mutation A401V est située à l'extrémité d'un domaine des doigts (fingers domain) qui fait suite à une structure en épingle à cheveux à feuillet β (β -hairpin), composée des feuillet β 12 et β 13, formés par les résidus 352 à 360. Au sein du complexe polymérase, cette structure est insérée dans la sous-unité PA via une boucle, appelée arche. Ces deux structures constituent l'une des deux parties du site de liaison à l'extrémité 5' de l'ARN viral (Pflug *et al.* 2014). Le résidu 401 est également le premier résidu du motif fonctionnel B de la polymérase (401-422) (Pflug *et al.* 2014). Ce motif, très conservé au sein des ARN polymérase virales ARN-dépendantes, présente une boucle riche en méthionine caractéristique et est probablement impliqué dans la stabilisation de l'appariement des bases entre l'ARN matrice et les NTP entrants, utilisés pour la production d'un nouvel ARN. Cette position au sein de la protéine PB1 apparaît être à l'intérieur de la poche catalytique dans la structure du complexe polymérase et est donc inaccessible au solvant. Ceci permet sans doute d'expliquer que la mutation du résidu Alanine, aliphatique hydrophobe, en un résidu Valine, également aliphatique hydrophobe, présente un effet plus marqué qu'avec un résidu Thréonine, neutre mais hydrophile. Ainsi, on peut imaginer que l'introduction d'une Valine permette une meilleure stabilisation des appariements matrice-NTP entrant, ce qui induirait peut-être une meilleure sélectivité des nucléotides et donc probablement une augmentation de la fidélité de transcription/réplication du complexe polymérase. De plus, cette amélioration de la stabilisation des interactions pourrait aussi expliquer la diminution de l'activité intrinsèque de la polymérase mutée, par rapport au complexe non muté, celle-ci nécessitant peut-être un ralentissement de son activité pour améliorer cette étape de stabilisation et donc sa fidélité (Korneeva *et al.* 2007 ; Campagnola *et al.* 2015).

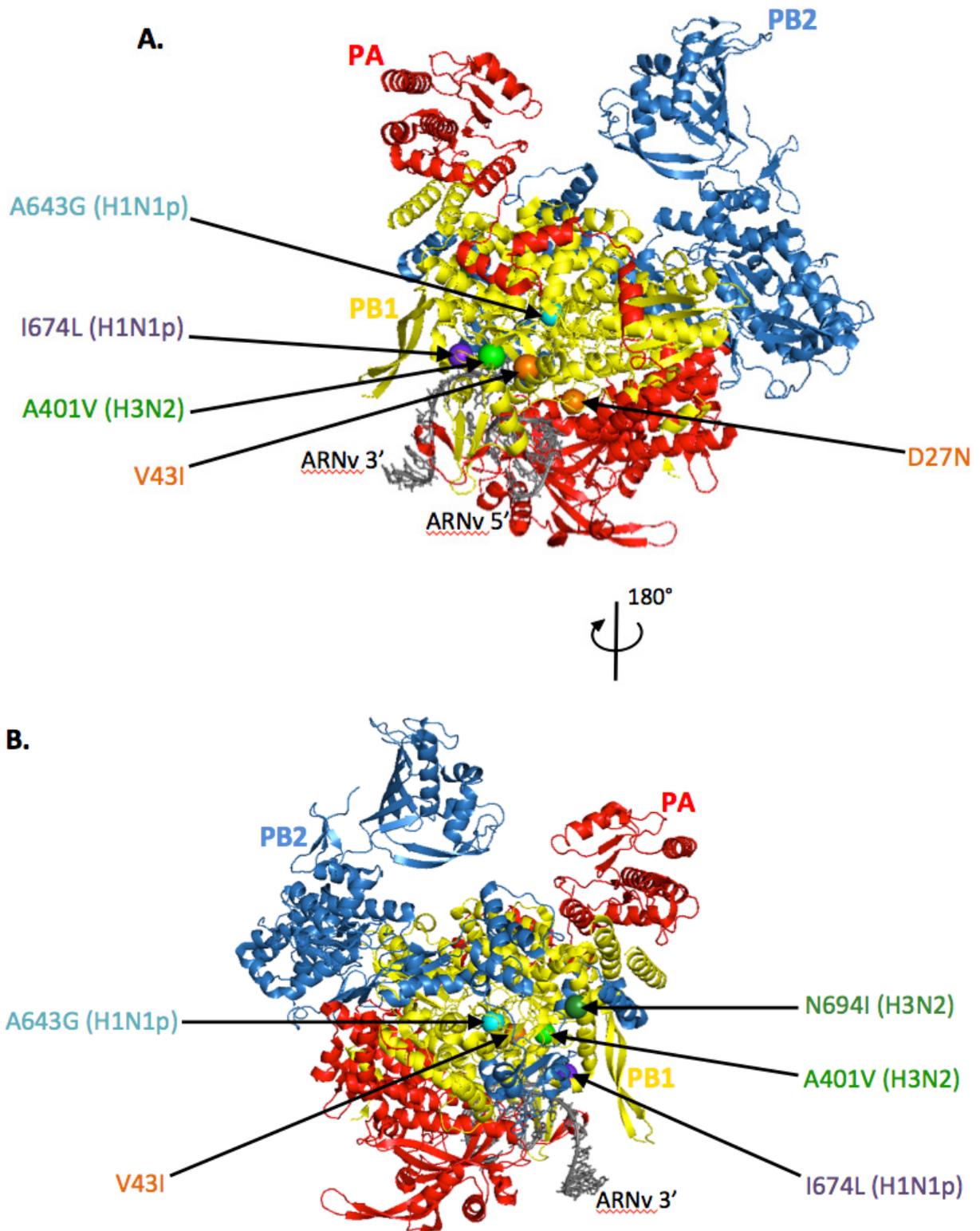


Figure 30 - Localisation des mutations de résistance à la ribavirine identifiées au sein de la structure du complexe polymérase des virus influenza de type A.

Polymérase d'un virus influenza A de chauve-souris associée à des extrémités 5' + 3' d'un ARNv (noir) ; numéro d'accèsion PDB : pdb 4WSB (Pflug *et al.* 2014). La sous-unité PA est colorée en rouge, PB2 en bleu et PB1 en jaune. Les mutations témoins PB1-V43I et PB1 D27N sont colorées en orange. Les mutations observées dans la sous-unité PB1 pour le sous-type H3N2 sont colorées en vert clair (A401V) et vert foncé (N694I). Les mutations observées dans la sous-unité PB1 pour le sous-type H1N1p sont colorées en bleu clair (A643G) et violet (I674L). La structure du complexe polymérase est représentée selon deux orientations afin de pouvoir observer l'ensemble des positions mutées. Une rotation de 180° de la figure A permet d'observer la figure B. La prédiction de structure a été réalisée avec le logiciel PyMOL.

La mutation A643G, évaluée en contexte H1N1p, est également située dans la région centrale de la protéine PB1 (résidus 21-669). Ce résidu n'est cependant pas situé dans un domaine catalytique de la polymérase. La position 643 est située dans le domaine du pouce (thumb), proche de l'extrémité C-terminale de la protéine, dans la boucle d'amorçage. Cette structure est formée par les résidus 641 à 657, qui forment des feuillettes β antiparallèles agencés selon la forme d'une boucle structurellement analogue à la boucle d'amorçage du virus de l'Hépatite C (Pflug *et al.* 2014 ; Reich *et al.* 2014). Cette région serait impliquée dans le processus d'initiation indépendant d'amorce de la réplication du génome viral. Dans la structure de la polymérase, la boucle d'amorçage serait située au bout du tunnel putatif d'entrée des NTP dans la cavité catalytique interne du complexe. La position 643, au bout d'un tunnel, apparaît accessible au solvant. La substitution de l'Alanine par une Glycine, également aliphatique, n'entraîne pas de modification des propriétés physico-chimiques du résidu. Cependant, l'introduction de cette mutation semble induire une augmentation de l'activité de la polymérase virale ainsi qu'une résistance à la ribavirine. On peut supposer que cette mutation A643G, introduite dans la protéine PB1, induise une modification de la structure en boucle, la déstabilisant par exemple, ce qui permettrait d'augmenter le rendement de l'étape d'amorçage et donc de produire un plus grand nombre de brins d'ARN. La résistance à la ribavirine pourrait alors être expliquée par un phénomène de compensation, l'augmentation de la quantité d'ARN permettant de contre-balancer l'effet du mutagène. Cette hypothèse permettrait également d'expliquer le fait que cette mutation présente un effet moins prononcé que ce qui est observé avec la mutation A401V. Cette dernière permettant réellement de moduler la fidélité de la polymérase. De manière similaire, le poliovirus mutant décrit, résistant à la ribavirine, porte une mutation dans un domaine de la polymérase virale, hors du site actif catalytique (Pfeiffer *et al.* 2003).

Les mutations I674L, pour le sous-type H1N1p, et N694I, de sous-type H3N2, semblent induire un potentiel effet de résistance à la ribavirine en contexte infectieux, bien que très faible. Ces deux positions sont situées dans la région C terminale de la protéine PB1 (Pflug *et al.* 2014). Le résidu 674, au début de cette région, est positionné dans un domaine très conservé (résidus 671-676) impliqué directement dans la liaison à l'extrémité 3' de l'ARN matrice. Ce domaine, exposé au solvant, permet de diriger l'ARN vers le tunnel d'entrée de la matrice de la polymérase. La mutation de ce résidu semble entraîner une très forte augmentation de l'activité de la polymérase selon ce qui a été observé dans les expériences de minigénome. De plus, cette augmentation d'activité semble dépendre de l'acide aminé et donc

de ses caractéristiques physico-chimiques, bien que ceux évalués soient tous les trois apolaires. L'introduction d'un résidu aromatique phenyl-alanine entraîne un effet maximal sur cette activité, le résidu méthionine a un effet intermédiaire, et la leucine, présente l'effet le moins fort. En contexte infectieux, la mutation de la position 674 ne semble pas affecter la multiplication virale en absence de ribavirine, mais modifie celle-ci en présence du mutagène. La mutation I674F entraîne une plus grande sensibilité à la ribavirine que la mutation I674L qui présente une résistance légèrement supérieure à celle du virus sauvage, à 70 μ M de ribavirine qu'il faudrait confirmer. La mutation avec un effet intermédiaire sur l'activité de la polymérase, I674M, n'a pas été évaluée en contexte infectieux, il serait donc intéressant de comparer son effet à ce qui a été observé pour les deux autres virus mutants. La modification du résidu en position 674 pourrait ainsi améliorer le rendement de production de nouveaux ARN par la polymérase, ce qui permettrait de contre balancer, en contexte infectieux, les effets néfastes pour le virus de la ribavirine.

La mutation N694I, est située dans le domaine d'interaction de la protéine PB1 avec le domaine N-terminal de la protéine PB2 (Chenavas *et al.* 2013 ; Pflug *et al.* 2014). La position apparaît exposée au solvant au sein de la polymérase. Cette mutation se traduit par une diminution drastique de l'activité polymérase des RNPv mais n'affecte pas la capacité de multiplication virale et confère une résistance à la ribavirine très légèrement supérieure à celle du virus sauvage qu'il faudrait confirmer. Dans le cas où une meilleure résistance à la ribavirine serait avérée pour cette mutation, le mécanisme responsable de ce phénotype resterait à déterminer.

I.7. Relation entre sensibilité aux mutagènes et fidélité

Pour les mutants qui présentent une résistance à la ribavirine que nous avons identifiés, il nous reste à établir formellement si ils correspondent à des mutants de fidélité en déterminant leur impact sur la diversité des populations virales correspondantes. Les données du séquençage à haut débit pour l'établissement de la séquence consensus du génome complet des virus mutants ne permettent pas de conclure, car elles n'ont pas la profondeur de séquençage requise. Alors que pour la majorité des virus mutants analysés aucune mutation additionnelle n'a été observée, parmi les virus mutants candidats qui présentent une résistance à la ribavirine, des mutations additionnelles ont été observées dans la HA pour le mutant A643G et dans la NA pour le mutant A401V. Toutefois, des mutations additionnelles

principalement dans la HA ont également été observées pour différents mutants qui ne présentent pas de résistance marquée à la ribavirine comme pour les mutants témoins V43I et D27N. Une nouvelle étude par séquençage à haut débit, dont les données sont en cours d'analyse, permettra d'étudier les populations virales de façon plus approfondie.

Pour différents virus, les mutants de fidélité de la polymérase ont été sélectionnés par passages successifs en présence de ribavirine (Borderia *et al.* 2015). Cette approche a également permis de sélectionner le mutant V43I dans le cas des virus influenza (Cheung *et al.* 2014). Dans notre cas cette approche a également été tentée avec les virus de notre étude par passages successifs en présence de ribavirine à 40 ou 70 μ M ainsi qu'en présence de T705 à 20 ou 40 μ M. Toutefois, dans tous les cas, après 3 passages en présence du composé mutagène nous avons observé l'extinction de la population virale, les virus n'étant plus détectables. Un nombre de passages plus conséquent en présence à des concentrations plus faible de composés mutagènes aurait peut-être permis d'isoler des mutants de fidélité. La diversité des populations virales initiales ou la nature de la souche virale sont peut-être également à l'origine de l'incapacité à isoler des virus résistants à la ribavirine pour les virus influenza. En règle générale, les mutants de fidélité sont non seulement résistants à la ribavirine mais également à d'autres mutagènes. Pour les mutants candidats sélectionnés dans notre étude, une analyse de la multiplication virale en présence de Favipiravir (T705) à 10 μ M et 20 μ M n'a pas montré de différence par rapport au virus sauvage pour les virus H3N2 N694I et V43I et H1N1p A643G, I674L et V43I. La sensibilité des virus mutants V43I contraste avec la résistance au T705 décrite par Cheung *et al.* (Cheung *et al.* 2014) pour le sous-type H3N2 mais pas pour le sous-type H5N1, mais est en rapport avec l'absence de résistance à la ribavirine que nous avons observée dans le contexte de notre souche de virus H3N2. Seul le virus mutant A401V semble présenter une sensibilité au T705 légèrement diminuée par rapport au sauvage. Il sera nécessaire de confirmer ce résultat et intéressant par la suite d'étudier la sensibilité de ce mutant vis à vis d'autres mutagènes comme le 5-fluorouracil (5-FU) ou le 5-azacytidine (5-AZC). Cela permettra de déterminer si la résistance à la ribavirine observée est spécifique du composé ou bien si celle-ci est liée à une augmentation de la sélectivité de la polymérase, lui permettant de limiter l'insertion d'analogues, et donc de mutations, dans les ARN en cours de synthèse, traduisant ainsi une augmentation de la fidélité de la polymérase.

I.8. Implications des variations d'activité et de fidélité de la polymérase

Des variations de l'activité et de la fidélité de la polymérase peuvent potentiellement se traduire par des variations des caractéristiques de la progénie virale en termes de charge virale et de diversité de la population virale. Celles-ci sont susceptibles d'avoir des répercussions sur la capacité de transmission, notamment en cas de transmission inter-espèces ainsi que sur la pathogénèse virale. Toutefois, comme observé dans notre étude, des variations importantes de l'activité de la polymérase ne se traduisent pas nécessairement par des variations de la vitalité du virus en culture cellulaire. De même, pour les virus qui présentent une résistance à la ribavirine susceptibles de correspondre à des mutants avec une fidélité accrue, nous n'avons pas observé de réduction de la vitalité *in vitro*. Des études *in vivo* sont donc nécessaires pour apprécier pleinement l'effet des mutations. Une première série d'expériences a été entreprise dans un modèle murin chez des souris balb/c âgées de 4 semaines. D'après les résultats de ces premières expériences, il apparaît que les virus de sous-type H3N2 ne permettent pas de réaliser une infection des souris utilisées. Pour des expériences en contexte animal, il est de ce fait envisagé de changer de modèle et d'utiliser des furets (Belser *et al.* 2009 ; Belser *et al.* 2011). Des infections ont cependant pu être réalisées avec les virus de sous-type H1N1p sauvage et porteurs des mutations A643G, I674L, V43I. Le virus V43I, utilisé comme témoin, apparaît très atténué par rapport au virus sauvage, alors qu'il se comportait comme le virus sauvage *in vitro*. Cette observation est néanmoins en cohérence avec ce qui a été décrit par Cheung *et al.* (Cheung *et al.* 2014) qui ont également observé une forte atténuation dans le modèle souris pour leur virus H3N2 V43I. De plus, les travaux de Cheung *et al.* ont montré que le virus H5N1 porteur de la mutation V43I, qui se comporte comme le virus sauvage *in vitro* est également fortement atténué *in vivo* en termes de multiplication virale dans les poumons. Ce virus est aussi dix fois moins létal que le virus sauvage, et une diminution de la pathogénicité et du neurotropisme sont également observées. Dans nos expériences, les mutants A643G et I674L sont apparus atténués par les mutations. Ces virus présentaient des titres inférieurs à ceux obtenus avec la souche sauvage mais supérieurs à ceux observés pour le mutant V43I, contrairement à ce qui a été observé *in vitro* sans ribavirine. Concernant le mutant I674L, la forte augmentation de l'activité intrinsèque de la polymérase virale ne semble donc pas permettre au virus de se multiplier plus que le virus sauvage au sein de l'animal. Une analyse de la diversité des populations virales produites *in vivo* pourra être réalisée par séquençage à haut débit pour évaluer si cette augmentation d'activité modifie la

composition en quasi-espèces de la population virale par rapport à celle issue de la souche sauvage. Il sera ensuite intéressant de réaliser des expériences de compétition entre le virus sauvage et les virus mutants afin d'évaluer pleinement leur capacité de multiplication et leur vitalité par rapport à celle de la souche parentale *in vivo*.

Des variations de la diversité de la population virale résultant soit d'une augmentation de l'activité polymérase, soit de variations de la fidélité de la polymérase peuvent également avoir des conséquences en termes de résistance aux traitements antiviraux. Les antiviraux actuellement utilisés chez l'homme sont les inhibiteurs de neuraminidase tels que l'Oseltamivir, le Zanamivir et le Peramivir, ainsi que le Favipiravir (T705). Dans le cas des inhibiteurs de neuraminidase, notamment pour l'oseltamivir, le développement d'une résistance est susceptible de survenir en cours de traitement, notamment chez les patients immunodéprimés chez lesquels une excrétion virale prolongée est observée. Une augmentation de la diversité de la population virale soit du fait d'une activité polymérase plus élevée, soit du fait d'une fidélité réduite de la polymérase pourrait ainsi favoriser l'apparition de mutants de résistance qui seront ensuite sélectionnés en présence de l'antiviral. Néanmoins, l'atténuation habituellement observée pour les mutants à fidélité réduite (Borderia *et al.* 2015) et le fait que les mutations qui confèrent une activité polymérase augmentée n'aient été que retrouvées que de façon très sporadique parmi les souches circulant chez l'homme suggère que ces virus n'ont pas une vitalité suffisante pour être compétitifs et se maintenir par rapport aux virus avec une polymérase sauvage. Concernant le traitement par le Favipiravir (T705), il a été démontré qu'il s'agit d'un composé mutagène pour le génome des IAV (Baranovich *et al.* 2013) bien qu'il pourrait également agir comme terminateur de chaîne (Jin *et al.* 2013 ; Sangawa *et al.* 2013). Cependant, aucune résistance vis-à-vis de cet antiviral n'a encore été documentée pour les virus influenza. Au plan théorique, une fidélité diminuée de la polymérase devrait se traduire par une sensibilité accrue au T705 alors qu'une fidélité accrue pourrait se traduire par une résistance. Par ailleurs, selon le mécanisme d'action du T705, si celui-ci agit bien comme mutagène, l'utilisation combinée du T705 et d'inhibiteurs de neuraminidase pourrait aboutir à une augmentation de l'émergence de mutants résistants aux anti-neuraminidase.

Du fait de leur atténuation, les virus possédant une polymérase de haute fidélité pourraient servir de base au développement de vaccins vivants atténués. En effet, une

réplication hautement fidèle doit permettre de réduire la fréquence de réversions génétiques vers un phénotype sauvage pathogène et la diminution de la diversité génétique également d'atténuer la souche virale (Vignuzzi *et al.* 2008 ; Weeks *et al.* 2012).

Récemment, le potentiel comme vaccin vivant atténué d'un virus H1N1p, basé sur le virus PR8 à forte réplication virale et présentant la mutation V43I dans le segment codant PB1 a été exploré (Naito *et al.* 2017). Le virus de haute fidélité ainsi produit est apparu génétiquement stable après plusieurs passages sur œufs avec un taux de mutation diminué par rapport au virus non muté mais un taux de multiplication inchangé. La génération de virus présentant une polymérase dont la fidélité est augmentée est utile au développement de nouveaux vaccins.

Une application immédiate d'une souche possédant une polymérase de haute fidélité pourrait également être le développement d'un vaccin vivant atténué dont le potentiel de réversion est diminué pour les virus saisonniers ou ceux ayant un potentiel pandémique (Jin *et al.* 2014 ; Jin *et al.* 2015) ou en cas d'émergence d'un virus pandémique. En effet, les virus vivants atténués induisent une forte réponse immunitaire et permettraient donc l'utilisation de faibles doses. Des vaccins candidats en cours de développement à base de mutants thermosensibles ont été testés notamment vis-à-vis des virus H5N1 *in vivo* avec plusieurs modèles animaux ou bien chez l'homme lors d'essais cliniques (Hai *et al.* 2011 ; Matsuoka *et al.* 2014 ; Baz *et al.* 2015 ; Shi *et al.* 2016). Une protection croisée a pu être observée entre divers clades de virus H5N1 ainsi qu'une forte protection contre des virus homologues ou de sous-types différents. Cependant, l'utilisation de virus vivants présente un risque d'apparition de mutants de réversion et d'émergence de souches plus virulentes. Ainsi, pour la production d'un vaccin vivant, l'utilisation d'un virus présentant une fidélité augmentée est envisagée comme moyen de limiter ce risque, pour rendre l'utilisation de ce type de vaccins plus sûre.

II. Perspectives

Tout d'abord, l'identification de mutations qui réduisent ou augmentent l'activité intrinsèque du complexe polymérase offre des perspectives pour une meilleure compréhension du fonctionnement de ce complexe polymérase et des éléments qui modulent son activité.

Pour les positions pour lesquelles des mutations qui réduisent de façon drastique ou au contraire augmentent de façon significative l'activité polymérase des RNPv, une étude détaillée permettant d'évaluer l'impact sur les différents types d'activités de la polymérase, à savoir la synthèse d'ARNm, la synthèse d'ARNc et la synthèse d'ARNv devra être réalisée. Il serait ensuite intéressant d'évaluer pour une position donnée l'effet de différentes substitutions selon la nature physico-chimique des acides aminés et en relation avec l'analyse structurale. Une telle analyse pourrait également être complétée par des études *in vitro* avec le complexe polymérase purifié afin d'évaluer également la processivité de la polymérase.

Pour les positions les plus intéressantes, il conviendra également de compléter l'analyse par une étude des mutations dans le contexte du virus infectieux, afin de déterminer l'effet sur la vitalité virale. Pour les mutations non létales qui réduisent la vitalité virale de façon drastique la réalisation de passages en série du virus à faible MOI devrait potentiellement permettre de sélectionner des mutations compensatrices qui restaurent le phénotype sauvage. La localisation de telles mutations compensatrices au sein de PB1, mais peut-être également au sein des autres protéines qui composent les RNPv, devrait apporter des informations sur les interactions clé mises en jeu au sein du complexe polymérase. Une étude approfondie par séquençage haut débit de la diversité des populations virales pour les différents virus mutants ainsi qu'au cours des passages successifs devrait aussi permettre d'apprécier la relation entre le niveau d'activité de la polymérase et l'espace de séquence couvert par la population virale. Enfin, l'étude des mêmes virus mutés *in vivo* dans un modèle animal comme la souris ou le furet permettra d'évaluer le niveau de virulence ou d'atténuation des virus mutés en relation avec l'activité intrinsèque de leur polymérase et de la diversité des populations virale inoculées et retrouvées dans différents organes. Pour les virus mutés qui présentent la vitalité la plus élevée, des expériences de compétition avec le virus sauvage pourront s'avérer nécessaires pour mettre en évidence des différences de vitalité plus ténues.

Deuxièmement, l'identification lors de nos travaux de mutations qui réduisent ou au contraire augmentent la sensibilité à la ribavirine permet de disposer d'outils pour une

meilleure compréhension de la sélectivité du complexe polymérase en étudiant la sensibilité de ces mutants à d'autres analogues nucléosidiques comme le 5-FU, le 5-AZC ou le T705. des substitutions systématiques couplées à des études *in vitro*, avec le complexe polymérase purifié, et dans le contexte de virus infectieux comme décrit ci-dessus devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent la résistance à ces composés et les interrelations complexes entre activité du complexe polymérase, sensibilité aux mutagènes et vitalité virale. Elles pourraient également déboucher sur l'identification de nouveaux mutants de fidélité augmentée ou au contraire de fidélité réduite dont la virulence ou l'atténuation *in vivo* devra être évaluée.

L'observation d'effets différents d'une même mutation sur l'activité du complexe polymérase et la sensibilité à la ribavirine, selon le sous-type pose la question des facteurs modulateurs des caractéristiques du complexe polymérase en termes d'activité, de sensibilité aux mutagènes voire de fidélité. L'analyse des mutations dans le contexte de différents sous-types constitue une première approche. L'impact des protéines PA, PB2 ou NP de sous-types hétérologues pourra également être étudié pour des complexes hétéro sous-typiques dans le contexte de RNPv reconstituées ou du virus infectieux produits par génétique inverse. On pourra ainsi se focaliser plus particulièrement sur les positions qui diffèrent entre les deux sous-types viraux analysés. Une approche à plus large échelle pourrait également faire appel à la mutagenèse aléatoire des séquences de PB2, PA ou NP comme réalisé pour PB1 dans notre étude.

Des facteurs viraux autres que la RdRp qui modulent la fidélité de la réplication virale ont été mis en évidence pour d'autres virus comme dans le cas du virus Chikungunya pour lequel l'hélicase nsp2 virale permet de réguler l'activité de la polymérase en milieu mutagène et déplété en nucléotides, ce qui permet d'améliorer la sélectivité de la polymérase et de rendre la réplication plus efficace même lorsque la concentration de nucléotides est faible (Stapleford *et al.* 2015) ; ou encore dans le cas du SARS-CoV dont la protéine nsp14 qui possède une activité 3'-5' exonucléase de la famille des DEDD exonucléases permet d'augmenter la fidélité de la réplication pour ce virus. Pour les virus influenza A, des données obtenues au laboratoire par Declercq *et al.* (non publié) montrent que des motifs de type DxE correspondant au motif I des DEDD sont retrouvés au sein de la nucleoprotéine en un nombre d'exemplaires variable selon les sous-types viraux et des données préliminaires suggèrent qu'ils pourraient moduler la fidélité de la polymérase.

Au delà des facteurs viraux, nous pouvons également faire l'hypothèse que des facteurs cellulaires tels que des exonucléases cellulaires qui interagissent avec le complexe polymérase pourraient également moduler son activité et/ou sa fidélité selon la nature de l'environnement cellulaire et notamment selon l'hôte. A cet effet, la recherche d'interacteurs cellulaires correspondant à des facteurs cellulaires de type exonucléase, ou hélicase, ou encore des facteurs impliqués dans la maturation des ARN a été entreprise.

Bibliographie

1. Aaskov, J., K. Buzacott, H. M. Thu, K. Lowry and E. C. Holmes (2006). "Long-term transmission of defective RNA viruses in humans and *Aedes* mosquitoes." *Science* **311**(5758): 236-238.
2. Aggarwal, S., B. Bradel-Tretheway, T. Takimoto, S. Dewhurst and B. Kim (2010). "Biochemical characterization of enzyme fidelity of influenza A virus RNA polymerase complex." *PLoS One* **5**(4): e10372.
3. Agudo, R., C. Ferrer-Orta, A. Arias, I. de la Higuera, C. Perales, R. Perez-Luque, N. Verdaguier and E. Domingo (2010). "A multi-step process of viral adaptation to a mutagenic nucleoside analogue by modulation of transition types leads to extinction-escape." *PLoS Pathog* **6**(8): e1001072.
4. Air, G. M. (2012). "Influenza neuraminidase." *Influenza Other Respir Viruses* **6**(4): 245-256.
5. Airaksinen, A., N. Pariente, L. Menendez-Arias and E. Domingo (2003). "Curing of foot-and-mouth disease virus from persistently infected cells by ribavirin involves enhanced mutagenesis." *Virology* **311**(2): 339-349.
6. Alfonso, R., T. Lutz, A. Rodriguez, J. P. Chavez, P. Rodriguez, S. Gutierrez and A. Nieto (2011). "CHD6 chromatin remodeler is a negative modulator of influenza virus replication that relocates to inactive chromatin upon infection." *Cell Microbiol* **13**(12): 1894-1906.
7. Allen, J. E., S. N. Gardner, E. A. Vitalis and T. R. Slezak (2009). "Conserved amino acid markers from past influenza pandemic strains." *BMC Microbiol* **9**: 77.
8. Anderson, J. P., R. Daifuku and L. A. Loeb (2004). "Viral error catastrophe by mutagenic nucleosides." *Annu Rev Microbiol* **58**: 183-205.
9. Andino, R. and E. Domingo (2015). "Viral quasispecies." *Virology* **479-480**: 46-51.
10. Arbiza, J., S. Mirazo and H. Fort (2010). "Viral quasispecies profiles as the result of the interplay of competition and cooperation." *BMC Evol Biol* **10**: 137.
11. Arias, A., J. J. Arnold, M. Sierra, E. D. Smidansky, E. Domingo and C. E. Cameron (2008). "Determinants of RNA-dependent RNA polymerase (in)fidelity revealed by kinetic analysis of the polymerase encoded by a foot-and-mouth disease virus mutant with reduced sensitivity to ribavirin." *J Virol* **82**(24): 12346-12355.
12. Arnold, J. J., S. K. Ghosh and C. E. Cameron (1999). "Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3D(pol)). Divalent cation modulation of primer, template, and nucleotide selection." *J Biol Chem* **274**(52): 37060-37069.
13. Arnold, J. J., M. Vignuzzi, J. K. Stone, R. Andino and C. E. Cameron (2005). "Remote site control of an active site fidelity checkpoint in a viral RNA-dependent RNA polymerase." *J Biol Chem* **280**(27): 25706-25716.
14. Arranz, R., R. Coloma, F. J. Chichon, J. J. Conesa, J. L. Carrascosa, J. M. Valpuesta, J. Ortin and J. Martin-Benito (2012). "The structure of native influenza virion ribonucleoproteins." *Science* **338**(6114): 1634-1637.
15. Bakhanashvili, M., O. Avidan and A. Hizi (1996). "Mutational studies of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: the involvement of residues 183 and 184 in the fidelity of DNA synthesis." *FEBS Lett* **391**(3): 257-262.
16. Banerjee, I., Y. Miyake, S. P. Nobs, C. Schneider, P. Horvath, M. Kopf, P. Matthias, A. Helenius and Y. Yamauchi (2014). "Influenza A virus uses the aggresome processing machinery for host cell entry." *Science* **346**(6208): 473-477.
17. Baranovich, T., S. S. Wong, J. Armstrong, H. Marjuki, R. J. Webby, R. G. Webster and E. A. Govorkova (2013). "T-705 (favipiravir) induces lethal mutagenesis in influenza A H1N1 viruses in vitro." *J Virol* **87**(7): 3741-3751.
18. Batschelet, E., E. Domingo and C. Weissmann (1976). "The proportion of revertant and mutant phage in a growing population, as a function of mutation and growth rate." *Gene* **1**(1): 27-32.

19. Baudin, F., C. Bach, S. Cusack and R. W. Ruigrok (1994). "Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent." *Embo j* **13**(13): 3158-3165.
20. Baz, M., K. Boonnak, M. Paskel, C. Santos, T. Powell, A. Townsend and K. Subbarao (2015). "Nonreplicating influenza A virus vaccines confer broad protection against lethal challenge." *MBio* **6**(5): e01487-01415.
21. Beaucourt, S. and M. Vignuzzi (2014). "Ribavirin: a drug active against many viruses with multiple effects on virus replication and propagation. Molecular basis of ribavirin resistance." *Curr Opin Virol* **8**: 10-15.
22. Belser, J. A., J. M. Katz and T. M. Tumpey (2011). "The ferret as a model organism to study influenza A virus infection." *Dis Model Mech* **4**(5): 575-579.
23. Belser, J. A., K. J. Szretter, J. M. Katz and T. M. Tumpey (2009). "Use of animal models to understand the pandemic potential of highly pathogenic avian influenza viruses." *Adv Virus Res* **73**: 55-97.
24. Bernet, G. P. and S. F. Elena (2015). "Distribution of mutational fitness effects and of epistasis in the 5' untranslated region of a plant RNA virus." *BMC Evol Biol* **15**: 274.
25. Bhatt, S., E. C. Holmes and O. G. Pybus (2011). "The genomic rate of molecular adaptation of the human influenza A virus." *Mol Biol Evol* **28**(9): 2443-2451.
26. Biebricher, C. K. and M. Eigen (2005). "The error threshold." *Virus Res* **107**(2): 117-127.
27. Biebricher, C. K. and M. Eigen (2006). "What is a quasispecies?" *Curr Top Microbiol Immunol* **299**: 1-31.
28. Biebricher, C. K., M. Eigen and W. C. Gardiner, Jr. (1983). "Kinetics of RNA replication." *Biochemistry* **22**(10): 2544-2559.
29. Bier, K., A. York and E. Fodor (2011). "Cellular cap-binding proteins associate with influenza virus mRNAs." *J Gen Virol* **92**(Pt 7): 1627-1634.
30. Billeter, M. A., J. E. Dahlberg, H. M. Goodman, J. Hindley and C. Weissmann (1969). "Sequence of the first 175 nucleotides from the 5' terminus of Qbeta RNA synthesized in vitro." *Nature* **224**(5224): 1083-1086.
31. Binh, N. T., C. Wakai, A. Kawaguchi and K. Nagata (2014). "Involvement of the N-terminal portion of influenza virus RNA polymerase subunit PB1 in nucleotide recognition." *Biochem Biophys Res Commun* **443**(3): 975-979.
32. Biswas, S. K., P. L. Boutz and D. P. Nayak (1998). "Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins." *J Virol* **72**(7): 5493-5501.
33. Biswas, S. K. and D. P. Nayak (1994). "Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1." *J Virol* **68**(3): 1819-1826.
34. Bogs, J., D. Kalthoff, J. Veits, S. Pavlova, M. Schwemmler, B. Manz, T. C. Mettenleiter and J. Stech (2011). "Reversion of PB2-627E to -627K during replication of an H5N1 Clade 2.2 virus in mammalian hosts depends on the origin of the nucleoprotein." *J Virol* **85**(20): 10691-10698.
35. Boni, M. F., G. J. Smith, E. C. Holmes and D. Vijaykrishna (2012). "No evidence for intra-segment recombination of 2009 H1N1 influenza virus in swine." *Gene* **494**(2): 242-245.
36. Bonnac, L. F., L. M. Mansky and S. E. Patterson (2013). "Structure-activity relationships and design of viral mutagens and application to lethal mutagenesis." *J Med Chem* **56**(23): 9403-9414.
37. Borderia, A. V., R. Lorenzo-Redondo, M. Pernas, C. Casado, T. Alvaro, E. Domingo and C. Lopez-Galindez (2010). "Initial fitness recovery of HIV-1 is associated with quasispecies heterogeneity and can occur without modifications in the consensus sequence." *PLoS One* **5**(4): e10319.
38. Borderia, A. V., K. Rozen-Gagnon and M. Vignuzzi (2015). "Fidelity Variants and RNA Quasispecies." *Curr Top Microbiol Immunol*.
39. Borderia, A. V., K. A. Stapleford and M. Vignuzzi (2011). "RNA virus population diversity: implications for inter-species transmission." *Curr Opin Virol* **1**(6): 643-648.
40. Bortz, E., L. Westera, J. Maamary, J. Steel, R. A. Albrecht, B. Manicassamy, G. Chase, L. Martinez-Sobrido, M. Schwemmler and A. Garcia-Sastre (2011). "Host- and strain-specific regulation of influenza virus polymerase activity by interacting cellular proteins." *MBio* **2**(4).

41. Bourara, K., T. J. Liegler and R. M. Grant (2007). "Target cell APOBEC3C can induce limited G-to-A mutation in HIV-1." *PLoS Pathog* **3**(10): 1477-1485.
42. Bradel-Tretheway, B. G., J. L. Mattiaccio, A. Krasnoselsky, C. Stevenson, D. Purdy, S. Dewhurst and M. G. Katze (2011). "Comprehensive proteomic analysis of influenza virus polymerase complex reveals a novel association with mitochondrial proteins and RNA polymerase accessory factors." *J Virol* **85**(17): 8569-8581.
43. Briese, T., C. H. Calisher and S. Higgs (2013). "Viruses of the family Bunyaviridae: are all available isolates reassortants?" *Virology* **446**(1-2): 207-216.
44. Brower-Sinning, R., D. M. Carter, C. J. Crevar, E. Ghedin, T. M. Ross and P. V. Benos (2009). "The role of RNA folding free energy in the evolution of the polymerase genes of the influenza A virus." *Genome Biol* **10**(2): R18.
45. Brown, E. G. (1990). "Increased virulence of a mouse-adapted variant of influenza A/FM/1/47 virus is controlled by mutations in genome segments 4, 5, 7, and 8." *J Virol* **64**(9): 4523-4533.
46. Brown, E. G., H. Liu, L. C. Kit, S. Baird and M. Nesrallah (2001). "Pattern of mutation in the genome of influenza A virus on adaptation to increased virulence in the mouse lung: identification of functional themes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(12): 6883-6888.
47. Bull, J. J., L. A. Meyers and M. Lachmann (2005). "Quasispecies made simple." *PLoS Comput Biol* **1**(6): e61.
48. Bull, J. J., R. Sanjuan and C. O. Wilke (2007). "Theory of lethal mutagenesis for viruses." *J Virol* **81**(6): 2930-2939.
49. Bull, R. A., J. S. Eden, F. Luciani, K. McElroy, W. D. Rawlinson and P. A. White (2012). "Contribution of intra- and interhost dynamics to norovirus evolution." *J Virol* **86**(6): 3219-3229.
50. Burch, C. L. and L. Chao (1999). "Evolution by small steps and rugged landscapes in the RNA virus phi6." *Genetics* **151**(3): 921-927.
51. Burch, C. L. and L. Chao (2000). "Evolvability of an RNA virus is determined by its mutational neighbourhood." *Nature* **406**(6796): 625-628.
52. Butcher, S. J., J. M. Grimes, E. V. Makeyev, D. H. Bamford and D. I. Stuart (2001). "A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization." *Nature* **410**(6825): 235-240.
53. Campagnola, G., S. McDonald, S. Beaucourt, M. Vignuzzi and O. B. Peersen (2015). "Structure-function relationships underlying the replication fidelity of viral RNA-dependent RNA polymerases." *J Virol* **89**(1): 275-286.
54. Carroll, L. (1871). *Through the Looking-Glass, and What Alice Found There*, Macmillan & Co.
55. Cauldwell, A. V., J. S. Long, O. Moncorge and W. S. Barclay (2014). "Viral determinants of influenza A virus host range." *J Gen Virol* **95**(Pt 6): 1193-1210.
56. Chang, S., D. Sun, H. Liang, J. Wang, J. Li, L. Guo, X. Wang, C. Guan, B. M. Boruah, L. Yuan, F. Feng, M. Yang, L. Wang, Y. Wang, J. Wojdyla, L. Li, J. Wang, M. Wang, G. Cheng, H. W. Wang and Y. Liu (2015). "Cryo-EM structure of influenza virus RNA polymerase complex at 4.3 Å resolution." *Mol Cell* **57**(5): 925-935.
57. Chao, L. (1990). "Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet." *Nature* **348**(6300): 454-455.
58. Chao, L., T. T. Tran and T. T. Tran (1997). "The advantage of sex in the RNA virus phi6." *Genetics* **147**(3): 953-959.
59. Chase, G. P., M. A. Rameix-Welti, A. Zvirbliene, G. Zvirblis, V. Gotz, T. Wolff, N. Naffakh and M. Schwemmler (2011). "Influenza virus ribonucleoprotein complexes gain preferential access to cellular export machinery through chromatin targeting." *PLoS Pathog* **7**(9): e1002187.
60. Chen, G., C. H. Liu, L. Zhou and R. M. Krug (2014). "Cellular DDX21 RNA helicase inhibits influenza A virus replication but is counteracted by the viral NS1 protein." *Cell Host Microbe* **15**(4): 484-493.
61. Chen, G. W., S. C. Chang, C. K. Mok, Y. L. Lo, Y. N. Kung, J. H. Huang, Y. H. Shih, J. Y. Wang, C. Chiang, C. J. Chen and S. R. Shih (2006). "Genomic signatures of human versus avian influenza A viruses." *Emerg Infect Dis* **12**(9): 1353-1360.
62. Chen, R. and E. C. Holmes (2006). "Avian influenza virus exhibits rapid evolutionary dynamics." *Mol Biol Evol* **23**(12): 2336-2341.

63. Chen, R., E. Wang, K. A. Tsetsarkin and S. C. Weaver (2013). "Chikungunya virus 3' untranslated region: adaptation to mosquitoes and a population bottleneck as major evolutionary forces." *PLoS Pathog* **9**(8): e1003591.
64. Chen, W., P. A. Calvo, D. Malide, J. Gibbs, U. Schubert, I. Bacik, S. Basta, R. O'Neill, J. Schickli, P. Palese, P. Henklein, J. R. Bennink and J. W. Yewdell (2001). "A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death." *Nat Med* **7**(12): 1306-1312.
65. Chenavas, S., A. Monod, R. W. H. Ruigrok and T. Crépin (2013). "Le complexe de transcription et de réplication des virus influenza, une cible pour de nouvelles molécules antivirales." *Virologie* **17**(1): 6-16.
66. Cheung, P. P., S. J. Watson, K. T. Choy, S. Fun Sia, D. D. Wong, L. L. Poon, P. Kellam, Y. Guan, J. S. Malik Peiris and H. L. Yen (2014). "Generation and characterization of influenza A viruses with altered polymerase fidelity." *Nat Commun* **5**: 4794.
67. Choi, W. S., Y. H. Baek, J. J. Kwon, J. H. Jeong, S. J. Park, Y. I. Kim, S. W. Yoon, J. Hwang, M. H. Kim, C. J. Kim, R. J. Webby, Y. K. Choi and M. S. Song (2017). "Rapid acquisition of polymorphic virulence markers during adaptation of highly pathogenic avian influenza H5N8 virus in the mouse." *Sci Rep* **7**: 40667.
68. Chou, Y. Y., R. Vafabakhsh, S. Doganay, Q. Gao, T. Ha and P. Palese (2012). "One influenza virus particle packages eight unique viral RNAs as shown by FISH analysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(23): 9101-9106.
69. Chumakov, K. M., L. B. Powers, K. E. Noonan, I. B. Roninson and I. S. Levenbook (1991). "Correlation between amount of virus with altered nucleotide sequence and the monkey test for acceptability of oral poliovirus vaccine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(1): 199-203.
70. Ciota, A. T., D. J. Ehrbar, G. A. Van Slyke, G. G. Willsey and L. D. Kramer (2012). "Cooperative interactions in the West Nile virus mutant swarm." *BMC Evol Biol* **12**: 58.
71. Clarke, D. K., E. A. Duarte, S. F. Elena, A. Moya, E. Domingo and J. Holland (1994). "The red queen reigns in the kingdom of RNA viruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(11): 4821-4824.
72. Clarke, D. K., E. A. Duarte, A. Moya, S. F. Elena, E. Domingo and J. Holland (1993). "Genetic bottlenecks and population passages cause profound fitness differences in RNA viruses." *J Virol* **67**(1): 222-228.
73. Coffey, L. L., Y. Beeharry, A. V. Borderia, H. Blanc and M. Vignuzzi (2011). "Arbovirus high fidelity variant loses fitness in mosquitoes and mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(38): 16038-16043.
74. Coloma, R., J. M. Valpuesta, R. Arranz, J. L. Carrascosa, J. Ortin and J. Martin-Benito (2009). "The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex." *PLoS Pathog* **5**(6): e1000491.
75. Comas, I., A. Moya and F. Gonzalez-Candelas (2005). "Validating viral quasispecies with digital organisms: a re-examination of the critical mutation rate." *BMC Evol Biol* **5**: 5.
76. Combe, M. and R. Sanjuan (2014). "Variation in RNA virus mutation rates across host cells." *PLoS Pathog* **10**(1): e1003855.
77. Compans, R. W., J. Content and P. H. Duesberg (1972). "Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus." *J Virol* **10**(4): 795-800.
78. Contreras, A. M., Y. Hiasa, W. He, A. Terella, E. V. Schmidt and R. T. Chung (2002). "Viral RNA mutations are region specific and increased by ribavirin in a full-length hepatitis C virus replication system." *J Virol* **76**(17): 8505-8517.
79. Crescenzo-Chaigne, B., C. Barbezange and S. van der Werf (2013). "The Panhandle formed by influenza A and C virus NS non-coding regions determines NS segment expression." *PLoS One* **8**(11): e81550.
80. Cros, J. F., A. Garcia-Sastre and P. Palese (2005). "An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein." *Traffic* **6**(3): 205-213.
81. Crotty, S., C. Cameron and R. Andino (2002). "Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis?" *J Mol Med (Berl)* **80**(2): 86-95.
82. Crotty, S., C. E. Cameron and R. Andino (2001). "RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(12): 6895-6900.

- 83.** Crotty, S., D. Maag, J. J. Arnold, W. Zhong, J. Y. Lau, Z. Hong, R. Andino and C. E. Cameron (2000). "The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen." *Nat Med* **6**(12): 1375-1379.
- 84.** Crowder, S. and K. Kirkegaard (2005). "Trans-dominant inhibition of RNA viral replication can slow growth of drug-resistant viruses." *Nat Genet* **37**(7): 701-709.
- 85.** Cuevas, J. M., F. Gonzalez-Candelas, A. Moya and R. Sanjuan (2009). "Effect of ribavirin on the mutation rate and spectrum of hepatitis C virus in vivo." *J Virol* **83**(11): 5760-5764.
- 86.** Cuevas, J. M., A. Moya and S. F. Elena (2003). "Evolution of RNA virus in spatially structured heterogeneous environments." *J Evol Biol* **16**(3): 456-466.
- 87.** Cuevas, J. M., M. Torres-Puente, N. Jimenez-Hernandez, M. A. Bracho, I. Garcia-Robles, F. Carnicer, J. D. Olmo, E. Ortega, F. Gonzalez-Candelas and A. Moya (2009). "Combined therapy of interferon plus ribavirin promotes multiple adaptive solutions in hepatitis C virus." *J Med Virol* **81**(4): 650-656.
- 88.** Cui, L., D. Liu, W. Shi, J. Pan, X. Qi, X. Li, X. Guo, M. Zhou, W. Li, J. Li, J. Haywood, H. Xiao, X. Yu, X. Pu, Y. Wu, H. Yu, K. Zhao, Y. Zhu, B. Wu, T. Jin, Z. Shi, F. Tang, F. Zhu, Q. Sun, L. Wu, R. Yang, J. Yan, F. Lei, B. Zhu, W. Liu, J. Ma, H. Wang and G. F. Gao (2014). "Dynamic reassortments and genetic heterogeneity of the human-infecting influenza A (H7N9) virus." *Nat Commun* **5**: 3142.
- 89.** Dalton, R. M., A. E. Mullin, M. J. Amorim, E. Medcalf, L. S. Tiley and P. Digard (2006). "Temperature sensitive influenza A virus genome replication results from low thermal stability of polymerase-cRNA complexes." *Virol J* **3**: 58.
- 90.** Dapp, M. J., C. L. Clouser, S. Patterson and L. M. Mansky (2009). "5-Azacytidine can induce lethal mutagenesis in human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **83**(22): 11950-11958.
- 91.** Dapp, M. J., R. H. Heineman and L. M. Mansky (2013). "Interrelationship between HIV-1 fitness and mutation rate." *J Mol Biol* **425**(1): 41-53.
- 92.** Darlix, J. L. and P. F. Spahr (1983). "High spontaneous mutation rate of Rous sarcoma virus demonstrated by direct sequencing of the RNA genome." *Nucleic Acids Res* **11**(17): 5953-5967.
- 93.** Das, P. K., A. Merits and A. Lulla (2014). "Functional cross-talk between distant domains of chikungunya virus non-structural protein 2 is decisive for its RNA-modulating activity." *J Biol Chem* **289**(9): 5635-5653.
- 94.** Datta, K., A. Wolkerstorfer, O. H. Szolar, S. Cusack and K. Klumpp (2013). "Characterization of PA-N terminal domain of Influenza A polymerase reveals sequence specific RNA cleavage." *Nucleic Acids Res* **41**(17): 8289-8299.
- 95.** Dawood, F. S., A. D. Iuliano, C. Reed, M. I. Meltzer, D. K. Shay, P. Y. Cheng, D. Bandaranayake, R. F. Breiman, W. A. Brooks, P. Buchy, D. R. Feikin, K. B. Fowler, A. Gordon, N. T. Hien, P. Horby, Q. S. Huang, M. A. Katz, A. Krishnan, R. Lal, J. M. Montgomery, K. Molbak, R. Pebody, A. M. Presanis, H. Razuri, A. Steens, Y. O. Tinoco, J. Wallinga, H. Yu, S. Vong, J. Bresee and M. A. Widdowson (2012). "Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study." *Lancet Infect Dis* **12**(9): 687-695.
- 96.** Day, C. W., D. F. Smee, J. G. Julander, V. F. Yamshchikov, R. W. Sidwell and J. D. Morrey (2005). "Error-prone replication of West Nile virus caused by ribavirin." *Antiviral Res* **67**(1): 38-45.
- 97.** de Graaf, M. and R. A. Fouchier (2014). "Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis." *Embo j* **33**(8): 823-841.
- 98.** de la Torre, J. C., B. Alarcon, E. Martinez-Salas, L. Carrasco and E. Domingo (1987). "Ribavirin cures cells of a persistent infection with foot-and-mouth disease virus in vitro." *J Virol* **61**(1): 233-235.
- 99.** de la Torre, J. C. and J. J. Holland (1990). "RNA virus quasispecies populations can suppress vastly superior mutant progeny." *J Virol* **64**(12): 6278-6281.
- 100.** de Vries, E., D. M. Tscherne, M. J. Wienholts, V. Cobos-Jimenez, F. Scholte, A. Garcia-Sastre, P. J. Rottier and C. A. de Haan (2011). "Dissection of the influenza A virus endocytic routes reveals macropinocytosis as an alternative entry pathway." *PLoS Pathog* **7**(3): e1001329.
- 101.** Denamur, E. and I. Matic (2006). "Evolution of mutation rates in bacteria." *Mol Microbiol* **60**(4): 820-827.

- 102.** Deng, T., F. T. Vreede and G. G. Brownlee (2006). "Different de novo initiation strategies are used by influenza virus RNA polymerase on its cRNA and viral RNA promoters during viral RNA replication." *J Virol* **80**(5): 2337-2348.
- 103.** Dennis, A. F., S. M. McDonald, D. C. Payne, S. Mijatovic-Rustempasic, M. D. Esona, K. M. Edwards, J. D. Chappell and J. T. Patton (2014). "Molecular epidemiology of contemporary G2P[4] human rotaviruses cocirculating in a single U.S. community: footprints of a globally transitioning genotype." *J Virol* **88**(7): 3789-3801.
- 104.** Diamond, T. L., J. Kimata and B. Kim (2001). "Identification of a simian immunodeficiency virus reverse transcriptase variant with enhanced replicational fidelity in the late stage of viral infection." *J Biol Chem* **276**(26): 23624-23631.
- 105.** Dias, A., D. Bouvier, T. Crepin, A. A. McCarthy, D. J. Hart, F. Baudin, S. Cusack and R. W. Ruigrok (2009). "The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit." *Nature* **458**(7240): 914-918.
- 106.** Dimmock, N. J. and A. J. Easton (2014). "Defective interfering influenza virus RNAs: time to reevaluate their clinical potential as broad-spectrum antivirals?" *J Virol* **88**(10): 5217-5227.
- 107.** Domingo, E., M. Davila and J. Ortin (1980). "Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus." *Gene* **11**(3-4): 333-346.
- 108.** Domingo, E., C. Escarmis, E. Lazaro and S. C. Manrubia (2005). "Quasispecies dynamics and RNA virus extinction." *Virus Res* **107**(2): 129-139.
- 109.** Domingo, E. and J. J. Holland (1997). "RNA virus mutations and fitness for survival." *Annu Rev Microbiol* **51**: 151-178.
- 110.** Domingo, E., V. Martin, C. Perales, A. Grande-Perez, J. Garcia-Arriaza and A. Arias (2006). "Viruses as quasispecies: biological implications." *Curr Top Microbiol Immunol* **299**: 51-82.
- 111.** Domingo, E., D. Sabo, T. Taniguchi and C. Weissmann (1978). "Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population." *Cell* **13**(4): 735-744.
- 112.** Domingo, E. and P. Schuster (2016). "What Is a Quasispecies? Historical Origins and Current Scope." *Curr Top Microbiol Immunol* **392**: 1-22.
- 113.** Domingo, E., J. Sheldon and C. Perales (2012). "Viral quasispecies evolution." *Microbiol Mol Biol Rev* **76**(2): 159-216.
- 114.** dos Reis, M., A. U. Tamuri, A. J. Hay and R. A. Goldstein (2011). "Charting the host adaptation of influenza viruses." *Mol Biol Evol* **28**(6): 1755-1767.
- 115.** Dougherty, J. P. and H. M. Temin (1988). "Determination of the rate of base-pair substitution and insertion mutations in retrovirus replication." *J Virol* **62**(8): 2817-2822.
- 116.** Drake, J. W. (1993). "Rates of spontaneous mutation among RNA viruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(9): 4171-4175.
- 117.** Drake, J. W. (1999). "The distribution of rates of spontaneous mutation over viruses, prokaryotes, and eukaryotes." *Ann N Y Acad Sci* **870**: 100-107.
- 118.** Drake, J. W. and J. J. Holland (1999). "Mutation rates among RNA viruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(24): 13910-13913.
- 119.** Duarte, E., D. Clarke, A. Moya, E. Domingo and J. Holland (1992). "Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller's ratchet." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(13): 6015-6019.
- 120.** Duarte, E. A., I. S. Novella, S. Ledesma, D. K. Clarke, A. Moya, S. F. Elena, E. Domingo and J. J. Holland (1994). "Subclonal components of consensus fitness in an RNA virus clone." *J Virol* **68**(7): 4295-4301.
- 121.** Dubois, J., O. Terrier and M. Rosa-Calatrava (2014). "Influenza viruses and mRNA splicing: doing more with less." *MBio* **5**(3): e00070-00014.
- 122.** Ducatez, M. F., C. Pelletier and G. Meyer (2015). "Influenza D virus in cattle, France, 2011-2014." *Emerg Infect Dis* **21**(2): 368-371.
- 123.** Duffy, S., L. A. Shackelton and E. C. Holmes (2008). "Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants." *Nat Rev Genet* **9**(4): 267-276.
- 124.** Dugan, V. G., R. Chen, D. J. Spiro, N. Sengamalay, J. Zaborsky, E. Ghedin, J. Nolting, D. E. Swayne, J. A. Runstadler, G. M. Happ, D. A. Senne, R. Wang, R. D. Slemons, E. C. Holmes and J. K. Taubenberger (2008). "The evolutionary genetics and emergence of avian influenza viruses in wild birds." *PLoS Pathog* **4**(5): e1000076.

125. Durbin, R. K. and V. Stollar (1986). "Sequence analysis of the E2 gene of a hyperglycosylated, host restricted mutant of Sindbis virus and estimation of mutation rate from frequency of revertants." *Virology* **154**(1): 135-143.
126. Eckerle, L. D., M. M. Becker, R. A. Halpin, K. Li, E. Venter, X. Lu, S. Scherbakova, R. L. Graham, R. S. Baric, T. B. Stockwell, D. J. Spiro and M. R. Denison (2010). "Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing." *PLoS Pathog* **6**(5): e1000896.
127. Eckerle, L. D., X. Lu, S. M. Sperry, L. Choi and M. R. Denison (2007). "High fidelity of murine hepatitis virus replication is decreased in nsp14 exonuclease mutants." *J Virol* **81**(22): 12135-12144.
128. Eigen, M. (1971). "Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules." *Naturwissenschaften* **58**(10): 465-523.
129. Eigen, M. (1996). "On the nature of virus quasispecies." *Trends Microbiol* **4**(6): 216-218.
130. Eigen, M. (2000). "Natural selection: a phase transition?" *Biophys Chem* **85**(2-3): 101-123.
131. Eigen, M. (2002). "Error catastrophe and antiviral strategy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(21): 13374-13376.
132. Eigen, M. and P. Schuster (1977). "The hypercycle. A principle of natural self-organization. Part A: Emergence of the hypercycle." *Naturwissenschaften* **64**(11): 541-565.
133. Eisfeld, A. J., G. Neumann and Y. Kawaoka (2015). "At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins." *Nat Rev Microbiol* **13**(1): 28-41.
134. Elena, S. F., F. Gonzalez-Candelas, I. S. Novella, E. A. Duarte, D. K. Clarke, E. Domingo, J. J. Holland and A. Moya (1996). "Evolution of fitness in experimental populations of vesicular stomatitis virus." *Genetics* **142**(3): 673-679.
135. Elena, S. F., R. Sanjuan, A. V. Borderia and P. E. Turner (2001). "Transmission bottlenecks and the evolution of fitness in rapidly evolving RNA viruses." *Infect Genet Evol* **1**(1): 41-48.
136. Elton, D., E. Medcalf, K. Bishop and P. Digard (1999). "Oligomerization of the influenza virus nucleoprotein: identification of positive and negative sequence elements." *Virology* **260**(1): 190-200.
137. Engelhardt, O. G. and E. Fodor (2006). "Functional association between viral and cellular transcription during influenza virus infection." *Rev Med Virol* **16**(5): 329-345.
138. Engelhardt, O. G., M. Smith and E. Fodor (2005). "Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II." *J Virol* **79**(9): 5812-5818.
139. Engering, A., L. Hogerwerf and J. Slingenbergh (2013). "Pathogen-host-environment interplay and disease emergence." *Emerg Microbes Infect* **2**(2): e5.
140. Eriksson, B., E. Helgstrand, N. G. Johansson, A. Larsson, A. Misiorny, J. O. Noren, L. Philipson, K. Stenberg, G. Stening, S. Stridh and B. Oberg (1977). "Inhibition of influenza virus ribonucleic acid polymerase by ribavirin triphosphate." *Antimicrob Agents Chemother* **11**(6): 946-951.
141. Escarmis, C., M. Davila, N. Charpentier, A. Bracho, A. Moya and E. Domingo (1996). "Genetic lesions associated with Muller's ratchet in an RNA virus." *J Mol Biol* **264**(2): 255-267.
142. Escarmis, C., M. Davila and E. Domingo (1999). "Multiple molecular pathways for fitness recovery of an RNA virus debilitated by operation of Muller's ratchet." *J Mol Biol* **285**(2): 495-505.
143. Ewart, G. D., N. Nasr, H. Naif, G. B. Cox, A. L. Cunningham and P. W. Gage (2004). "Potential new anti-human immunodeficiency virus type 1 compounds depress virus replication in cultured human macrophages." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(6): 2325-2330.
144. Eyre-Walker, A. and P. D. Keightley (2007). "The distribution of fitness effects of new mutations." *Nat Rev Genet* **8**(8): 610-618.
145. Farci, P., A. Shimoda, A. Coiana, G. Diaz, G. Peddis, J. C. Melpolder, A. Strazzer, D. Y. Chien, S. J. Munoz, A. Balestrieri, R. H. Purcell and H. J. Alter (2000). "The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies." *Science* **288**(5464): 339-344.
146. Fernandez-Larsson, R., K. O'Connell, E. Koumans and J. L. Patterson (1989). "Molecular analysis of the inhibitory effect of phosphorylated ribavirin on the vesicular stomatitis virus in vitro polymerase reaction." *Antimicrob Agents Chemother* **33**(10): 1668-1673.

147. Fernandez-Larsson, R. and J. L. Patterson (1990). "Ribavirin is an inhibitor of human immunodeficiency virus reverse transcriptase." *Mol Pharmacol* **38**(6): 766-770.
148. Fields, B. N., D. M. Knipe and P. M. Howley (2013). *Fields Virology*, Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, c2013.
149. Finkelstein, D. B., S. Mukatira, P. K. Mehta, J. C. Obenauer, X. Su, R. G. Webster and C. W. Naeve (2007). "Persistent host markers in pandemic and H5N1 influenza viruses." *J Virol* **81**(19): 10292-10299.
150. Flavell, R. A., D. L. Sabo, E. F. Bandle and C. Weissmann (1974). "Site-directed mutagenesis: generation of an extracistronic mutation in bacteriophage Q beta RNA." *J Mol Biol* **89**(2): 255-272.
151. Flury, F., R. C. von Borstel and D. H. Williamson (1976). "Mutator activity of petite strains of *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **83**(4): 645-653.
152. Fodor, E. (2013). "The RNA polymerase of influenza A virus: mechanisms of viral transcription and replication." *Acta Virol* **57**(2): 113-122.
153. Fodor, E., L. Devenish, O. G. Engelhardt, P. Palese, G. G. Brownlee and A. Garcia-Sastre (1999). "Rescue of influenza A virus from recombinant DNA." *J Virol* **73**(11): 9679-9682.
154. Foeglein, A., E. M. Loucaides, M. Mura, H. M. Wise, W. S. Barclay and P. Digard (2011). "Influence of PB2 host-range determinants on the intranuclear mobility of the influenza A virus polymerase." *J Gen Virol* **92**(Pt 7): 1650-1661.
155. Fontana, J. and A. C. Steven (2013). "At low pH, influenza virus matrix protein M1 undergoes a conformational change prior to dissociating from the membrane." *J Virol* **87**(10): 5621-5628.
156. Fontana, J. and A. C. Steven (2015). "Influenza virus-mediated membrane fusion: Structural insights from electron microscopy." *Arch Biochem Biophys* **581**: 86-97.
157. Forrester, N. L., M. Guerbois, R. L. Seymour, H. Spratt and S. C. Weaver (2012). "Vector-borne transmission imposes a severe bottleneck on an RNA virus population." *PLoS Pathog* **8**(9): e1002897.
158. Fournier, E., V. Moules, B. Essere, J. C. Paillart, J. D. Sirbat, C. Isel, A. Cavalier, J. P. Rolland, D. Thomas, B. Lina and R. Marquet (2012). "A supramolecular assembly formed by influenza A virus genomic RNA segments." *Nucleic Acids Res* **40**(5): 2197-2209.
159. Fournier, G., C. Chiang, S. Munier, A. Tomoiu, C. Demeret, P. O. Vidalain, Y. Jacob and N. Naffakh (2014). "Recruitment of RED-SMU1 complex by Influenza A Virus RNA polymerase to control Viral mRNA splicing." *PLoS Pathog* **10**(6): e1004164.
160. Fraile, A., S. Sacristán and F. García-Arenal (2008). "A quantitative analysis of complementation of deleterious mutants in plant virus populations." *Spanish Journal of Agricultural Research* **6**: 195-200.
161. Frensing, T. (2015). "Defective interfering viruses and their impact on vaccines and viral vectors." *Biotechnol J* **10**(5): 681-689.
162. Fried, M. W., T. L. Fong, M. G. Swain, Y. Park, M. P. Beames, S. M. Banks, J. H. Hoofnagle and A. M. Di Bisceglie (1994). "Therapy of chronic hepatitis B with a 6-month course of ribavirin." *J Hepatol* **21**(2): 145-150.
163. Frost, S. D., T. Wrin, D. M. Smith, S. L. Kosakovsky Pond, Y. Liu, E. Paxinos, C. Chappay, J. Galovich, J. Beauchaine, C. J. Petropoulos, S. J. Little and D. D. Richman (2005). "Neutralizing antibody responses drive the evolution of human immunodeficiency virus type 1 envelope during recent HIV infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(51): 18514-18519.
164. Fucik, V., S. Zadrazil and Z. Sormova (1966). "The influence of thymine and 5-bromouracil on the sensitivity of *Escherichia coli* to alkylation, UV and x-irradiation." *Folia Microbiol (Praha)* **11**(4): 271-276.
165. Gabriel, G., M. Abram, B. Keiner, R. Wagner, H. D. Klenk and J. Stech (2007). "Differential polymerase activity in avian and mammalian cells determines host range of influenza virus." *J Virol* **81**(17): 9601-9604.
166. Gabriel, G., B. Dauber, T. Wolff, O. Planz, H. D. Klenk and J. Stech (2005). "The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(51): 18590-18595.
167. Gabriel, G. and E. Fodor (2014). "Molecular determinants of pathogenicity in the polymerase complex." *Curr Top Microbiol Immunol* **385**: 35-60.

- 168.** Gabriel, G., A. Herwig and H. D. Klenk (2008). "Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus." *PLoS Pathog* **4**(2): e11.
- 169.** Gabriel, G., K. Klingel, A. Otte, S. Thiele, B. Hudjetz, G. Arman-Kalcek, M. Sauter, T. Schmidt, F. Rother, S. Baumgarte, B. Keiner, E. Hartmann, M. Bader, G. G. Brownlee, E. Fodor and H. D. Klenk (2011). "Differential use of importin-alpha isoforms governs cell tropism and host adaptation of influenza virus." *Nat Commun* **2**: 156.
- 170.** Gabriel, W., M. Lynch and R. Burger (1993). "Muller's Ratchet and Mutational Meltdowns." *Evolution* **47**(6): 1744-1757.
- 171.** Galban-Garcia, E., H. Vega-Sanchez, B. Gra-Oramas, J. L. Jorge-Riano, M. Soneiras-Perez, D. Haedo-Castro, F. Rolo-Gomez, I. Lorenzo-Morejon and V. Ramos-Sanchez (2000). "Efficacy of ribavirin in patients with chronic hepatitis B." *J Gastroenterol* **35**(5): 347-352.
- 172.** Garaigorta, U. and J. Ortin (2007). "Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleo-cytoplasmic transport of its own viral mRNA." *Nucleic Acids Res* **35**(14): 4573-4582.
- 173.** Garcia-Arriaza, J., E. Domingo and C. Escarmis (2005). "A segmented form of foot-and-mouth disease virus interferes with standard virus: a link between interference and competitive fitness." *Virology* **335**(2): 155-164.
- 174.** Garcia-Arriaza, J., S. C. Manrubia, M. Toja, E. Domingo and C. Escarmis (2004). "Evolutionary transition toward defective RNAs that are infectious by complementation." *J Virol* **78**(21): 11678-11685.
- 175.** Garcia-Arriaza, J., S. Ojosnegros, M. Davila, E. Domingo and C. Escarmis (2006). "Dynamics of mutation and recombination in a replicating population of complementing, defective viral genomes." *J Mol Biol* **360**(3): 558-572.
- 176.** Garcia-Moreno, M., M. A. Sanz and L. Carrasco (2016). "A Viral mRNA Motif at the 3'-Untranslated Region that Confers Translatability in a Cell-Specific Manner. Implications for Virus Evolution." *Sci Rep* **6**: 19217.
- 177.** Garcia-Robles, I., H. Akarsu, C. W. Muller, R. W. Ruigrok and F. Baudin (2005). "Interaction of influenza virus proteins with nucleosomes." *Virology* **332**(1): 329-336.
- 178.** Garcia-Sastre, A. (2011). "Induction and evasion of type I interferon responses by influenza viruses." *Virus Res* **162**(1-2): 12-18.
- 179.** Garten, W., C. Braden, A. Arendt, C. Peitsch, J. Baron, Y. Lu, K. Pawletko, K. Hardses, T. Steinmetzer and E. Bottcher-Friebertshausen (2015). "Influenza virus activating host proteases: Identification, localization and inhibitors as potential therapeutics." *Eur J Cell Biol* **94**(7-9): 375-383.
- 180.** Gazina, E. V., D. N. Harrison, M. Jefferies, H. Tan, D. Williams, D. A. Anderson and S. Petrou (2005). "Ion transport blockers inhibit human rhinovirus 2 release." *Antiviral Res* **67**(2): 98-106.
- 181.** Gazina, E. V., E. D. Smidansky, J. K. Holien, D. N. Harrison, B. A. Cromer, J. J. Arnold, M. W. Parker, C. E. Cameron and S. Petrou (2011). "Amiloride is a competitive inhibitor of coxsackievirus B3 RNA polymerase." *J Virol* **85**(19): 10364-10374.
- 182.** Gelderblom, H. C., D. N. Vatakis, S. A. Burke, S. D. Lawrie, G. C. Bristol and D. N. Levy (2008). "Viral complementation allows HIV-1 replication without integration." *Retrovirology* **5**: 60.
- 183.** Geoghegan, J. L., A. M. Senior and E. C. Holmes (2016). "Pathogen population bottlenecks and adaptive landscapes: overcoming the barriers to disease emergence." *Proc Biol Sci* **283**(1837).
- 184.** Gerber, M., C. Isel, V. Moules and R. Marquet (2014). "Selective packaging of the influenza A genome and consequences for genetic reassortment." *Trends Microbiol* **22**(8): 446-455.
- 185.** Gillin, F. D. and N. G. Nossal (1976). "Control of mutation frequency by bacteriophage T4 DNA polymerase. I. The CB120 antimutator DNA polymerase is defective in strand displacement." *J Biol Chem* **251**(17): 5219-5224.
- 186.** Gnadig, N. F., S. Beaucourt, G. Campagnola, A. V. Borderia, M. Sanz-Ramos, P. Gong, H. Blanc, O. B. Peersen and M. Vignuzzi (2012). "Coxsackievirus B3 mutator strains are attenuated in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(34): E2294-2303.
- 187.** Gonzalez, S. and J. Ortin (1999). "Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates." *Embo j* **18**(13): 3767-3775.

- 188.** Gonzalez-Lopez, C., A. Arias, N. Pariente, G. Gomez-Mariano and E. Domingo (2004). "Preextinction viral RNA can interfere with infectivity." *J Virol* **78**(7): 3319-3324.
- 189.** Goodenow, M., T. Huet, W. Saurin, S. Kwok, J. Sninsky and S. Wain-Hobson (1989). "HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies: evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitutions." *J Acquir Immune Defic Syndr* **2**(4): 344-352.
- 190.** Graci, J. D. and C. E. Cameron (2006). "Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses." *Rev Med Virol* **16**(1): 37-48.
- 191.** Graci, J. D., D. A. Harki, V. S. Korneeva, J. P. Edathil, K. Too, D. Franco, E. D. Smidansky, A. V. Paul, B. R. Peterson, D. M. Brown, D. Loakes and C. E. Cameron (2007). "Lethal mutagenesis of poliovirus mediated by a mutagenic pyrimidine analogue." *J Virol* **81**(20): 11256-11266.
- 192.** Graham, R. L., M. M. Becker, L. D. Eckerle, M. Bolles, M. R. Denison and R. S. Baric (2012). "A live, impaired-fidelity coronavirus vaccine protects in an aged, immunocompromised mouse model of lethal disease." *Nat Med* **18**(12): 1820-1826.
- 193.** Grande-Perez, A., G. Gomez-Mariano, P. R. Lowenstein and E. Domingo (2005). "Mutagenesis-induced, large fitness variations with an invariant arenavirus consensus genomic nucleotide sequence." *J Virol* **79**(16): 10451-10459.
- 194.** Grande-Perez, A., E. Lazaro, P. Lowenstein, E. Domingo and S. C. Manrubia (2005). "Suppression of viral infectivity through lethal defection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(12): 4448-4452.
- 195.** Grande-Perez, A., S. Sierra, M. G. Castro, E. Domingo and P. R. Lowenstein (2002). "Molecular indetermination in the transition to error catastrophe: systematic elimination of lymphocytic choriomeningitis virus through mutagenesis does not correlate linearly with large increases in mutant spectrum complexity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(20): 12938-12943.
- 196.** Greenbaum, B. D., A. J. Levine, G. Bhanot and R. Rabadan (2008). "Patterns of evolution and host gene mimicry in influenza and other RNA viruses." *PLoS Pathog* **4**(6): e1000079.
- 197.** Grimm, D., P. Staeheli, M. Hufbauer, I. Koerner, L. Martinez-Sobrido, A. Solorzano, A. Garcia-Sastre, O. Haller and G. Kochs (2007). "Replication fitness determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional Mx1 resistance gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(16): 6806-6811.
- 198.** Gu, W., G. R. Gallagher, W. Dai, P. Liu, R. Li, M. I. Trombly, D. B. Gammon, C. C. Mello, J. P. Wang and R. W. Finberg (2015). "Influenza A virus preferentially snatches noncoding RNA caps." *Rna* **21**(12): 2067-2075.
- 199.** Guilligay, D., F. Tarendeau, P. Resa-Infante, R. Coloma, T. Crepin, P. Sehr, J. Lewis, R. W. Ruigrok, J. Ortin, D. J. Hart and S. Cusack (2008). "The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2." *Nat Struct Mol Biol* **15**(5): 500-506.
- 200.** Hahn, C. S., S. Lustig, E. G. Strauss and J. H. Strauss (1988). "Western equine encephalitis virus is a recombinant virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(16): 5997-6001.
- 201.** Hai, R., A. Garcia-Sastre, D. E. Swayne and P. Palese (2011). "A reassortment-incompetent live attenuated influenza virus vaccine for protection against pandemic virus strains." *J Virol* **85**(14): 6832-6843.
- 202.** Hall, J. D., D. M. Coen, B. L. Fisher, M. Weisslitz, S. Randall, R. E. Almy, P. T. Gelep and P. A. Schaffer (1984). "Generation of genetic diversity in herpes simplex virus: an antimutator phenotype maps to the DNA polymerase locus." *Virology* **132**(1): 26-37.
- 203.** Halle, S. (1968). "5-Azacytidine as a mutagen for arboviruses." *J Virol* **2**(10): 1228-1229.
- 204.** Hardin, G. (1960). "The competitive exclusion principle." *Science* **131**(3409): 1292-1297.
- 205.** Harris, A., G. Cardone, D. C. Winkler, J. B. Heymann, M. Brecher, J. M. White and A. C. Steven (2006). "Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(50): 19123-19127.
- 206.** Harris, R. S. and J. P. Dudley (2015). "APOBECs and virus restriction." *Virology* **479-480**: 131-145.
- 207.** Haruna, I. and S. Spiegelman (1965). "Recognition of size and sequence by an RNA replicase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**(4): 1189-1193.
- 208.** Haruna, I. and S. Spiegelman (1965). "Specific template requirements of RNA replicases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**(2): 579-587.

- 209.** Hatta, M., Y. Hatta, J. H. Kim, S. Watanabe, K. Shinya, T. Nguyen, P. S. Lien, Q. M. Le and Y. Kawaoka (2007). "Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice." *PLoS Pathog* **3**(10): 1374-1379.
- 210.** Hause, B. M., M. Ducatez, E. A. Collin, Z. Ran, R. Liu, Z. Sheng, A. Armien, B. Kaplan, S. Chakravarty, A. D. Hoppe, R. J. Webby, R. R. Simonson and F. Li (2013). "Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses." *PLoS Pathog* **9**(2): e1003176.
- 211.** Helenius, A. (1992). "Unpacking the incoming influenza virus." *Cell* **69**(4): 577-578.
- 212.** Hengrung, N., K. El Omari, I. Serna Martin, F. T. Vreede, S. Cusack, R. P. Rambo, C. Vonrhein, G. Bricogne, D. I. Stuart, J. M. Grimes and E. Fodor (2015). "Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from influenza C virus." *Nature* **527**(7576): 114-117.
- 213.** Herfst, S., E. J. Schrauwen, M. Linster, S. Chutinimitkul, E. de Wit, V. J. Munster, E. M. Sorrell, T. M. Bestebroer, D. F. Burke, D. J. Smith, G. F. Rimmelzwaan, A. D. Osterhaus and R. A. Fouchier (2012). "Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets." *Science* **336**(6088): 1534-1541.
- 214.** Hertz, J. M. and H. V. Huang (1995). "Host-dependent evolution of the Sindbis virus promoter for subgenomic mRNA synthesis." *J Virol* **69**(12): 7775-7781.
- 215.** Hoelzer, K., P. R. Murcia, G. J. Baillie, J. L. Wood, S. M. Metzger, N. Osterrieder, E. J. Dubovi, E. C. Holmes and C. R. Parrish (2010). "Intrahost evolutionary dynamics of canine influenza virus in naive and partially immune dogs." *J Virol* **84**(10): 5329-5335.
- 216.** Hofmann, W. P., A. Polta, E. Herrmann, U. Mihm, B. Kronenberger, T. Sonntag, V. Lohmann, B. Schonberger, S. Zeuzem and C. Sarrazin (2007). "Mutagenic effect of ribavirin on hepatitis C nonstructural 5B quasispecies in vitro and during antiviral therapy." *Gastroenterology* **132**(3): 921-930.
- 217.** Holland, J., K. Spindler, F. Horodyski, E. Grabau, S. Nichol and S. VandePol (1982). "Rapid evolution of RNA genomes." *Science* **215**(4540): 1577-1585.
- 218.** Holland, J. J., E. Domingo, J. C. de la Torre and D. A. Steinhauer (1990). "Mutation frequencies at defined single codon sites in vesicular stomatitis virus and poliovirus can be increased only slightly by chemical mutagenesis." *J Virol* **64**(8): 3960-3962.
- 219.** Holmes, E. C. (2003). "Patterns of intra- and interhost nonsynonymous variation reveal strong purifying selection in dengue virus." *J Virol* **77**(20): 11296-11298.
- 220.** Holmes, E. C. (2009). "RNA virus genomics: a world of possibilities." *J Clin Invest* **119**(9): 2488-2495.
- 221.** Holmes, E. C., E. Ghedin, N. Miller, J. Taylor, Y. Bao, K. St George, B. T. Grenfell, S. L. Salzberg, C. M. Fraser, D. J. Lipman and J. K. Taubenberger (2005). "Whole-genome analysis of human influenza A virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses." *PLoS Biol* **3**(9): e300.
- 222.** Holmes, E. C. and A. Moya (2002). "Is the quasispecies concept relevant to RNA viruses?" *J Virol* **76**(1): 460-465.
- 223.** Holtz, C. M. and L. M. Mansky (2013). "Variation of HIV-1 mutation spectra among cell types." *J Virol* **87**(9): 5296-5299.
- 224.** Honda, A., T. Okamoto and A. Ishihama (2007). "Host factor Ebp1: selective inhibitor of influenza virus transcriptase." *Genes Cells* **12**(2): 133-142.
- 225.** Hong, Z. and C. E. Cameron (2002). "Pleiotropic mechanisms of ribavirin antiviral activities." *Prog Drug Res* **59**: 41-69.
- 226.** Hudjetz, B. and G. Gabriel (2012). "Human-like PB2 627K influenza virus polymerase activity is regulated by importin-alpha1 and -alpha7." *PLoS Pathog* **8**(1): e1002488.
- 227.** Hutchinson, E. C., E. M. Denham, B. Thomas, D. C. Trudgian, S. S. Hester, G. Ridlova, A. York, L. Turell and E. Fodor (2012). "Mapping the phosphoproteome of influenza A and B viruses by mass spectrometry." *PLoS Pathog* **8**(11): e1002993.
- 228.** Hutchinson, E. C. and E. Fodor (2012). "Nuclear import of the influenza A virus transcriptional machinery." *Vaccine* **30**(51): 7353-7358.
- 229.** Hutchinson, E. C. and E. Fodor (2013). "Transport of the influenza virus genome from nucleus to nucleus." *Viruses* **5**(10): 2424-2446.

- 230.** Hutchinson, E. C., O. E. Orr, S. Man Liu, O. G. Engelhardt and E. Fodor (2011). "Characterization of the interaction between the influenza A virus polymerase subunit PB1 and the host nuclear import factor Ran-binding protein 5." *J Gen Virol* **92**(Pt 8): 1859-1869.
- 231.** Illingworth, C. J. and V. Mustonen (2012). "Components of selection in the evolution of the influenza virus: linkage effects beat inherent selection." *PLoS Pathog* **8**(12): e1003091.
- 232.** Ilyushina, N. A., A. M. Khalkov, J. P. Seiler, H. L. Forrest, N. V. Bovin, H. Marjuki, S. Barman, R. G. Webster and R. J. Webby (2010). "Adaptation of pandemic H1N1 influenza viruses in mice." *J Virol* **84**(17): 8607-8616.
- 233.** Iqbal, M., H. Xiao, G. Baillie, A. Warry, S. C. Essen, B. Londt, S. M. Brookes, I. H. Brown and J. W. McCauley (2009). "Within-host variation of avian influenza viruses." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**(1530): 2739-2747.
- 234.** Iranzo, J. and S. Manrubia (2009). "Stochastic extinction of viral infectivity through the action of defectors." *EPL* **85**(18001).
- 235.** Ito, T., J. N. Couceiro, S. Kelm, L. G. Baum, S. Krauss, M. R. Castrucci, I. Donatelli, H. Kida, J. C. Paulson, R. G. Webster and Y. Kawaoka (1998). "Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential." *J Virol* **72**(9): 7367-7373.
- 236.** Iwasaki, M., N. Ngo and J. C. de la Torre (2014). "Sodium hydrogen exchangers contribute to arenavirus cell entry." *J Virol* **88**(1): 643-654.
- 237.** Jackson, D. A., A. J. Caton, S. J. McCready and P. R. Cook (1982). "Influenza virus RNA is synthesized at fixed sites in the nucleus." *Nature* **296**(5855): 366-368.
- 238.** Jagger, B. W., H. M. Wise, J. C. Kash, K. A. Walters, N. M. Wills, Y. L. Xiao, R. L. Dunfee, L. M. Schwartzman, A. Ozinsky, G. L. Bell, R. M. Dalton, A. Lo, S. Efstathiou, J. F. Atkins, A. E. Firth, J. K. Taubenberger and P. Digard (2012). "An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response." *Science* **337**(6091): 199-204.
- 239.** Jennings, P. A., J. T. Finch, G. Winter and J. S. Robertson (1983). "Does the higher order structure of the influenza virus ribonucleoprotein guide sequence rearrangements in influenza viral RNA?" *Cell* **34**(2): 619-627.
- 240.** Jin, H. and Z. Chen (2014). "Production of live attenuated influenza vaccines against seasonal and potential pandemic influenza viruses." *Curr Opin Virol* **6**: 34-39.
- 241.** Jin, H. and K. Subbarao (2015). "Live attenuated influenza vaccine." *Curr Top Microbiol Immunol* **386**: 181-204.
- 242.** Jin, Z., L. K. Smith, V. K. Rajwansi, B. Kim and J. Deval (2013). "The ambiguous base-pairing and high substrate efficiency of T-705 (Favipiravir) Ribofuranosyl 5'-triphosphate towards influenza A virus polymerase." *PLoS One* **8**(7): e68347.
- 243.** Johnson, N. P. and J. Mueller (2002). "Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic." *Bull Hist Med* **76**(1): 105-115.
- 244.** Jorba, N., E. Area and J. Ortin (2008). "Oligomerization of the influenza virus polymerase complex in vivo." *J Gen Virol* **89**(Pt 2): 520-524.
- 245.** Jorba, N., R. Coloma and J. Ortin (2009). "Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication." *PLoS Pathog* **5**(5): e1000462.
- 246.** Kamal, R. P., J. M. Katz and I. A. York (2014). "Molecular determinants of influenza virus pathogenesis in mice." *Curr Top Microbiol Immunol* **385**: 243-274.
- 247.** Kashiwagi, T., K. Hara, Y. Nakazono, N. Hamada and H. Watanabe (2010). "Artificial hybrids of influenza A virus RNA polymerase reveal PA subunit modulates its thermal sensitivity." *PLoS One* **5**(12): e15140.
- 248.** Kawaguchi, A., F. Momose and K. Nagata (2011). "Replication-coupled and host factor-mediated encapsidation of the influenza virus genome by viral nucleoprotein." *J Virol* **85**(13): 6197-6204.
- 249.** Kawaguchi, A. and K. Nagata (2007). "De novo replication of the influenza virus RNA genome is regulated by DNA replicative helicase, MCM." *Embo j* **26**(21): 4566-4575.
- 250.** Keulen, W., A. van Wijk, R. Schuurman, B. Berkhout and C. A. Boucher (1999). "Increased polymerase fidelity of lamivudine-resistant HIV-1 variants does not limit their evolutionary potential." *Aids* **13**(11): 1343-1349.

- 251.** Khaperskyy, D. A. and C. McCormick (2015). "Timing Is Everything: Coordinated Control of Host Shutoff by Influenza A Virus NS1 and PA-X Proteins." *J Virol* **89**(13): 6528-6531.
- 252.** Kilbourne, E. D. (2006). "Influenza pandemics of the 20th century." *Emerg Infect Dis* **12**(1): 9-14.
- 253.** Killip, M. J., E. Fodor and R. E. Randall (2015). "Influenza virus activation of the interferon system." *Virus Res* **209**: 11-22.
- 254.** Kirkwood, C. D. (2010). "Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on vaccination programs." *J Infect Dis* **202 Suppl**: S43-48.
- 255.** Kleyman, T. R. and E. J. Cragoe, Jr. (1988). "Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport." *J Membr Biol* **105**(1): 1-21.
- 256.** Klumpp, K., R. W. Ruigrok and F. Baudin (1997). "Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure." *Embo j* **16**(6): 1248-1257.
- 257.** Koppstein, D., J. Ashour and D. P. Bartel (2015). "Sequencing the cap-snatching repertoire of H1N1 influenza provides insight into the mechanism of viral transcription initiation." *Nucleic Acids Res* **43**(10): 5052-5064.
- 258.** Korneeva, V. S. and C. E. Cameron (2007). "Structure-function relationships of the viral RNA-dependent RNA polymerase: fidelity, replication speed, and initiation mechanism determined by a residue in the ribose-binding pocket." *J Biol Chem* **282**(22): 16135-16145.
- 259.** Krauss, S., C. A. Obert, J. Franks, D. Walker, K. Jones, P. Seiler, L. Niles, S. P. Pryor, J. C. Obenauer, C. W. Naeve, L. Widjaja, R. J. Webby and R. G. Webster (2007). "Influenza in migratory birds and evidence of limited intercontinental virus exchange." *PLoS Pathog* **3**(11): e167.
- 260.** Krilov, L. R. (2002). "Safety issues related to the administration of ribavirin." *Pediatr Infect Dis J* **21**(5): 479-481.
- 261.** Kunkel, T. A. and L. A. Loeb (1979). "On the fidelity of DNA replication. Effect of divalent metal ion activators and deoxyribose nucleoside triphosphate pools on in vitro mutagenesis." *J Biol Chem* **254**(13): 5718-5725.
- 262.** Kuzuhara, T., D. Kise, H. Yoshida, T. Horita, Y. Murazaki, A. Nishimura, N. Echigo, H. Utsunomiya and H. Tsuge (2009). "Structural basis of the influenza A virus RNA polymerase PB2 RNA-binding domain containing the pathogenicity-determinant lysine 627 residue." *J Biol Chem* **284**(11): 6855-6860.
- 263.** Labadie, K., E. Dos Santos Afonso, M. A. Rameix-Welti, S. van der Werf and N. Naffakh (2007). "Host-range determinants on the PB2 protein of influenza A viruses control the interaction between the viral polymerase and nucleoprotein in human cells." *Virology* **362**(2): 271-282.
- 264.** Lai, M. M. (1992). "RNA recombination in animal and plant viruses." *Microbiol Rev* **56**(1): 61-79.
- 265.** Lancaster, K. Z. and J. K. Pfeiffer (2011). "Mechanisms controlling virulence thresholds of mixed viral populations." *J Virol* **85**(19): 9778-9788.
- 266.** Landeras-Bueno, S., N. Jorba, M. Perez-Cidoncha and J. Ortin (2011). "The splicing factor proline-glutamine rich (SFPQ/PSF) is involved in influenza virus transcription." *PLoS Pathog* **7**(11): e1002397.
- 267.** Lanford, R. E., D. Chavez, B. Guerra, J. Y. Lau, Z. Hong, K. M. Brasky and B. Beames (2001). "Ribavirin induces error-prone replication of GB virus B in primary tamarin hepatocytes." *J Virol* **75**(17): 8074-8081.
- 268.** Lauring, A. S. and R. Andino (2010). "Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses." *PLoS Pathog* **6**(7): e1001005.
- 269.** Lauring, A. S., J. Frydman and R. Andino (2013). "The role of mutational robustness in RNA virus evolution." *Nat Rev Microbiol* **11**(5): 327-336.
- 270.** Le, Q. M., Y. Sakai-Tagawa, M. Ozawa, M. Ito and Y. Kawaoka (2009). "Selection of H5N1 influenza virus PB2 during replication in humans." *J Virol* **83**(10): 5278-5281.
- 271.** Lee, C. H., D. L. Gilbertson, I. S. Novella, R. Huerta, E. Domingo and J. J. Holland (1997). "Negative effects of chemical mutagenesis on the adaptive behavior of vesicular stomatitis virus." *J Virol* **71**(5): 3636-3640.
- 272.** Lee, Y. and D. C. Rio (2015). "Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing." *Annu Rev Biochem* **84**: 291-323.

- 273.** Leider, J. M., P. Palese and F. I. Smith (1988). "Determination of the mutation rate of a retrovirus." *J Virol* **62**(9): 3084-3091.
- 274.** Levi, L. I., N. F. Gnadig, S. Beaucourt, M. J. McPherson, B. Baron, J. J. Arnold and M. Vignuzzi (2010). "Fidelity variants of RNA dependent RNA polymerases uncover an indirect, mutagenic activity of amiloride compounds." *PLoS Pathog* **6**(10): e1001163.
- 275.** Li, C., M. Hatta, S. Watanabe, G. Neumann and Y. Kawaoka (2008). "Compatibility among polymerase subunit proteins is a restricting factor in reassortment between equine H7N7 and human H3N2 influenza viruses." *J Virol* **82**(23): 11880-11888.
- 276.** Li, J., M. Ishaq, M. Prudence, X. Xi, T. Hu, Q. Liu and D. Guo (2009). "Single mutation at the amino acid position 627 of PB2 that leads to increased virulence of an H5N1 avian influenza virus during adaptation in mice can be compensated by multiple mutations at other sites of PB2." *Virus Res* **144**(1-2): 123-129.
- 277.** Li, Q., X. Wang, Z. Sun, J. Hu, Z. Gao, X. Hao, J. Li, H. Liu, X. Wang, M. Gu, X. Xu, X. Liu and X. Liu (2015). "Adaptive mutations in PB2 gene contribute to the high virulence of a natural reassortant H5N2 avian influenza virus in mice." *Virus Res* **210**: 255-263.
- 278.** Lin, L., Y. Li, H. M. Pyo, X. Lu, S. N. Raman, Q. Liu, E. G. Brown and Y. Zhou (2012). "Identification of RNA helicase A as a cellular factor that interacts with influenza A virus NS1 protein and its role in the virus life cycle." *J Virol* **86**(4): 1942-1954.
- 279.** Lindstrom, S., R. Garten, A. Balish, B. Shu, S. Emery, L. Berman, N. Barnes, K. Sleeman, L. Gubareva, J. Villanueva and A. Klimov (2012). "Human infections with novel reassortant influenza A(H3N2)v viruses, United States, 2011." *Emerg Infect Dis* **18**(5): 834-837.
- 280.** Loeb, L. A., J. M. Essigmann, F. Kazazi, J. Zhang, K. D. Rose and J. I. Mullins (1999). "Lethal mutagenesis of HIV with mutagenic nucleoside analogs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(4): 1492-1497.
- 281.** Long, J. S., E. S. Giotis, O. Moncorge, R. Frise, B. Mistry, J. James, M. Morisson, M. Iqbal, A. Vignal, M. A. Skinner and W. S. Barclay (2016). "Species difference in ANP32A underlies influenza A virus polymerase host restriction." *Nature* **529**(7584): 101-104.
- 282.** Lopez-Turiso, J. A., C. Martinez, T. Tanaka and J. Ortin (1990). "The synthesis of influenza virus negative-strand RNA takes place in insoluble complexes present in the nuclear matrix fraction." *Virus Res* **16**(3): 325-337.
- 283.** Lu, L., S. J. Lycett and A. J. Leigh Brown (2014). "Reassortment patterns of avian influenza virus internal segments among different subtypes." *BMC Evol Biol* **14**: 16.
- 284.** Lukarska, M., G. Fournier, A. Pflug, P. Resa-Infante, S. Reich, N. Naffakh and S. Cusack (2017). "Structural basis of an essential interaction between influenza polymerase and Pol II CTD." *Nature* **541**(7635): 117-121.
- 285.** Lynch, M., R. Burger, D. Butcher and W. Gabriel (1993). "The mutational meltdown in asexual populations." *J Hered* **84**(5): 339-344.
- 286.** Lynch, M., J. Conery and R. Burger (1995). "Mutation Accumulation and the Extinction of Small Populations." *The American Naturalist* **146**(4): 489-518.
- 287.** Maag, D., C. Castro, Z. Hong and C. E. Cameron (2001). "Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin." *J Biol Chem* **276**(49): 46094-46098.
- 288.** Maes, R. and J. Mesquita (1970). "High mutation rate of foot-and-mouth disease virus treated with hydroxylamine." *Arch Gesamte Virusforsch* **29**(1): 77-82.
- 289.** Maes, R. F. (1972). "Investigations of the attenuation induced in foot-and-mouth disease virus by a chemical mutagen." *Arch Gesamte Virusforsch* **37**(1): 19-33.
- 290.** Mandler, J., K. Muller and C. Scholtissek (1991). "Mutants and revertants of an avian influenza A virus with temperature-sensitive defects in the nucleoprotein and PB2." *Virology* **181**(2): 512-519.
- 291.** Manrubia, S. C., E. Domingo and E. Lazaro (2010). "Pathways to extinction: beyond the error threshold." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**(1548): 1943-1952.
- 292.** Manrubia, S. C., C. Escarmis, E. Domingo and E. Lazaro (2005). "High mutation rates, bottlenecks, and robustness of RNA viral quasispecies." *Gene* **347**(2): 273-282.

- 293.** Mansky, L. M. and L. C. Bernard (2000). "3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT) and AZT-resistant reverse transcriptase can increase the in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **74**(20): 9532-9539.
- 294.** Manz, B., L. Brunotte, P. Reuther and M. Schwemmle (2012). "Adaptive mutations in NEP compensate for defective H5N1 RNA replication in cultured human cells." *Nat Commun* **3**: 802.
- 295.** Manz, B., M. Schwemmle and L. Brunotte (2013). "Adaptation of avian influenza A virus polymerase in mammals to overcome the host species barrier." *J Virol* **87**(13): 7200-7209.
- 296.** Marcos-Villar, L., A. Pazo and A. Nieto (2016). "Influenza Virus and Chromatin: Role of the CHD1 Chromatin Remodeler in the Virus Life Cycle." *J Virol* **90**(7): 3694-3707.
- 297.** Marklund, J. K., Q. Ye, J. Dong, Y. J. Tao and R. M. Krug (2012). "Sequence in the influenza A virus nucleoprotein required for viral polymerase binding and RNA synthesis." *J Virol* **86**(13): 7292-7297.
- 298.** Marriott, A. C. and N. J. Dimmock (2010). "Defective interfering viruses and their potential as antiviral agents." *Rev Med Virol* **20**(1): 51-62.
- 299.** Martin-Benito, J., E. Area, J. Ortega, O. Llorca, J. M. Valpuesta, J. L. Carrascosa and J. Ortin (2001). "Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle." *EMBO Rep* **2**(4): 313-317.
- 300.** Martinez-Alonso, M., N. Hengrung and E. Fodor (2016). "RNA-Free and Ribonucleoprotein-Associated Influenza Virus Polymerases Directly Bind the Serine-5-Phosphorylated Carboxyl-Terminal Domain of Host RNA Polymerase II." *J Virol* **90**(13): 6014-6021.
- 301.** Massin, P., S. van der Werf and N. Naffakh (2001). "Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses." *J Virol* **75**(11): 5398-5404.
- 302.** Matlin, K. S., H. Reggio, A. Helenius and K. Simons (1981). "Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line." *J Cell Biol* **91**(3 Pt 1): 601-613.
- 303.** Matsuoka, Y., A. Suguitan, Jr., M. Orandle, M. Paskel, K. Boonnak, D. J. Gardner, F. Feldmann, H. Feldmann, M. Marino, H. Jin, G. Kemble and K. Subbarao (2014). "African green monkeys recapitulate the clinical experience with replication of live attenuated pandemic influenza virus vaccine candidates." *J Virol* **88**(14): 8139-8152.
- 304.** Mayer, D., K. Molawi, L. Martinez-Sobrido, A. Ghanem, S. Thomas, S. Baginsky, J. Grossmann, A. Garcia-Sastre and M. Schwemmle (2007). "Identification of cellular interaction partners of the influenza virus ribonucleoprotein complex and polymerase complex using proteomic-based approaches." *J Proteome Res* **6**(2): 672-682.
- 305.** McCormick, J. B., I. J. King, P. A. Webb, C. L. Scribner, R. B. Craven, K. M. Johnson, L. H. Elliott and R. Belmont-Williams (1986). "Lassa fever. Effective therapy with ribavirin." *N Engl J Med* **314**(1): 20-26.
- 306.** McDonald, S. M., M. I. Nelson, P. E. Turner and J. T. Patton (2016). "Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes." *Nat Rev Microbiol* **14**(7): 448-460.
- 307.** Medcalf, L., E. Poole, D. Elton and P. Digard (1999). "Temperature-sensitive lesions in two influenza A viruses defective for replicative transcription disrupt RNA binding by the nucleoprotein." *J Virol* **73**(9): 7349-7356.
- 308.** Medina, R. A. and A. Garcia-Sastre (2011). "Influenza A viruses: new research developments." *Nat Rev Microbiol* **9**(8): 590-603.
- 309.** Mehle, A. (2014). "Unusual influenza A viruses in bats." *Viruses* **6**(9): 3438-3449.
- 310.** Mehle, A. and J. A. Doudna (2008). "An inhibitory activity in human cells restricts the function of an avian-like influenza virus polymerase." *Cell Host Microbe* **4**(2): 111-122.
- 311.** Mehle, A. and J. A. Doudna (2009). "Adaptive strategies of the influenza virus polymerase for replication in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(50): 21312-21316.
- 312.** Memoli, M. J., B. W. Jagger, V. G. Dugan, L. Qi, J. P. Jackson and J. K. Taubenberger (2009). "Recent human influenza A/H3N2 virus evolution driven by novel selection factors in addition to antigenic drift." *J Infect Dis* **200**(8): 1232-1241.
- 313.** Mills, D. R., R. L. Peterson and S. Spiegelman (1967). "An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule." *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**(1): 217-224.

- 314.** Minskaia, E., T. Hertzog, A. E. Gorbalenya, V. Campanacci, C. Cambillau, B. Canard and J. Ziebuhr (2006). "Discovery of an RNA virus 3'→5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(13): 5108-5113.
- 315.** Miotto, O., A. Heiny, T. W. Tan, J. T. August and V. Brusic (2008). "Identification of human-to-human transmissibility factors in PB2 proteins of influenza A by large-scale mutual information analysis." *BMC Bioinformatics* **9 Suppl 1**: S18.
- 316.** Miotto, O., A. T. Heiny, R. Albrecht, A. Garcia-Sastre, T. W. Tan, J. T. August and V. Brusic (2010). "Complete-proteome mapping of human influenza A adaptive mutations: implications for human transmissibility of zoonotic strains." *PLoS One* **5**(2): e9025.
- 317.** Miras, M., R. N. Sempere, J. J. Kraft, W. A. Miller, M. A. Aranda and V. Truniger (2014). "Interfamilial recombination between viruses led to acquisition of a novel translation-enhancing RNA element that allows resistance breaking." *New Phytol* **202**(1): 233-246.
- 318.** Moeller, A., R. N. Kirchdoerfer, C. S. Potter, B. Carragher and I. A. Wilson (2012). "Organization of the influenza virus replication machinery." *Science* **338**(6114): 1631-1634.
- 319.** Moisy, D., S. V. Avilov, Y. Jacob, B. M. Laoide, X. Ge, F. Baudin, N. Naffakh and J. L. Jestin (2012). "HMGB1 protein binds to influenza virus nucleoprotein and promotes viral replication." *J Virol* **86**(17): 9122-9133.
- 320.** Mok, C. K., H. H. Lee, M. Lestra, J. M. Nicholls, M. C. Chan, S. F. Sia, H. Zhu, L. L. Poon, Y. Guan and J. S. Peiris (2014). "Amino acid substitutions in polymerase basic protein 2 gene contribute to the pathogenicity of the novel A/H7N9 influenza virus in mammalian hosts." *J Virol* **88**(6): 3568-3576.
- 321.** Molinari, N. A., I. R. Ortega-Sanchez, M. L. Messonnier, W. W. Thompson, P. M. Wortley, E. Weintraub and C. B. Bridges (2007). "The annual impact of seasonal influenza in the US: measuring disease burden and costs." *Vaccine* **25**(27): 5086-5096.
- 322.** Momose, F., C. F. Basler, R. E. O'Neill, A. Iwamatsu, P. Palese and K. Nagata (2001). "Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis." *J Virol* **75**(4): 1899-1908.
- 323.** Moncorge, O., M. Mura and W. S. Barclay (2010). "Evidence for avian and human host cell factors that affect the activity of influenza virus polymerase." *J Virol* **84**(19): 9978-9986.
- 324.** Monk, R. J., F. G. Malik, D. Stokesberry and L. H. Evans (1992). "Direct determination of the point mutation rate of a murine retrovirus." *J Virol* **66**(6): 3683-3689.
- 325.** Moreno, H., H. Tejero, J. C. de la Torre, E. Domingo and V. Martin (2012). "Mutagenesis-mediated virus extinction: virus-dependent effect of viral load on sensitivity to lethal defection." *PLoS One* **7**(3): e32550.
- 326.** Moreno, I. M., J. M. Malpica, E. Rodriguez-Cerezo and F. Garcia-Arenal (1997). "A mutation in tomato aspermy cucumovirus that abolishes cell-to-cell movement is maintained to high levels in the viral RNA population by complementation." *J Virol* **71**(12): 9157-9162.
- 327.** Morens, D. M., J. K. Taubenberger and A. S. Fauci (2009). "The persistent legacy of the 1918 influenza virus." *N Engl J Med* **361**(3): 225-229.
- 328.** Mortillaro, M. J., B. J. Blencowe, X. Wei, H. Nakayasu, L. Du, S. L. Warren, P. A. Sharp and R. Berezney (1996). "A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(16): 8253-8257.
- 329.** Moya, A., S. F. Elena, A. Bracho, R. Miralles and E. Barrio (2000). "The evolution of RNA viruses: A population genetics view." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(13): 6967-6973.
- 330.** Muller, H. J. (1928). "The Measurement of Gene Mutation Rate in *Drosophila*, Its High Variability, and Its Dependence upon Temperature." *Genetics* **13**(4): 279-357.
- 331.** Muller, H. J. (1964). "THE RELATION OF RECOMBINATION TO MUTATIONAL ADVANCE." *Mutat Res* **106**: 2-9.
- 332.** Muller-McNicoll, M. and K. M. Neugebauer (2013). "How cells get the message: dynamic assembly and function of mRNA-protein complexes." *Nat Rev Genet* **14**(4): 275-287.
- 333.** Munster, V. J., C. Baas, P. Lexmond, J. Waldenstrom, A. Wallensten, T. Fransson, G. F. Rimmelzwaan, W. E. Beyer, M. Schutten, B. Olsen, A. D. Osterhaus and R. A. Fouchier (2007).

"Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds." *PLoS Pathog* **3**(5): e61.

334. Munster, V. J. and R. A. Fouchier (2009). "Avian influenza virus: of virus and bird ecology." *Vaccine* **27**(45): 6340-6344.

335. Muramoto, Y., T. Noda, E. Kawakami, R. Akkina and Y. Kawaoka (2013). "Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA." *J Virol* **87**(5): 2455-2462.

336. Murcia, P. R., G. J. Baillie, J. Daly, D. Elton, C. Jervis, J. A. Mumford, R. Newton, C. R. Parrish, K. Hoelzer, G. Dougan, J. Parkhill, N. Lennard, D. Ormond, S. Moule, A. Whitwham, J. W. McCauley, T. J. McKinley, E. C. Holmes, B. T. Grenfell and J. L. Wood (2010). "Intra- and interhost evolutionary dynamics of equine influenza virus." *J Virol* **84**(14): 6943-6954.

337. Musso, F. (2012). "On the relation between the Eigen model and the asexual Wright-Fisher model." *Bull Math Biol* **74**(1): 103-115.

338. Muzyczka, N., R. L. Poland and M. J. Bessman (1972). "Studies on the biochemical basis of spontaneous mutation. I. A comparison of the deoxyribonucleic acid polymerases of mutator, antimutator, and wild type strains of bacteriophage T4." *J Biol Chem* **247**(22): 7116-7122.

339. Naffakh, N., D. Santos, E. A., Escriou, N., v. d. Werf and S. (2006). "Développement et applications de la génétique inverse des virus grippaux." *Virologie* **10**(1): 13.

340. Naffakh, N., A. Tomoiu, M. A. Rameix-Welti and S. van der Werf (2008). "Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins." *Annu Rev Microbiol* **62**: 403-424.

341. Naito, T., Y. Kiyasu, K. Sugiyama, A. Kimura, R. Nakano, A. Matsukage and K. Nagata (2007). "An influenza virus replicon system in yeast identified Tat-SF1 as a stimulatory host factor for viral RNA synthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(46): 18235-18240.

342. Naito, T., K. Mori, H. Ushirogawa, N. Takizawa, E. Nobusawa, T. Odagiri, M. Tashiro, R. L. Ohniwa, K. Nagata and M. Saito (2017). "Generation of a Genetically Stable High-Fidelity Influenza Vaccine Strain." *J Virol* **91**(6).

343. Nakajima, K., U. Desselberger and P. Palese (1978). "Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950." *Nature* **274**(5669): 334-339.

344. Nelson, M. I., C. Viboud, L. Simonsen, R. T. Bennett, S. B. Griesemer, K. St George, J. Taylor, D. J. Spiro, N. A. Sengamalay, E. Ghedin, J. K. Taubenberger and E. C. Holmes (2008). "Multiple reassortment events in the evolutionary history of H1N1 influenza A virus since 1918." *PLoS Pathog* **4**(2): e1000012.

345. Neumann, G. and Y. Kawaoka (2015). "Transmission of influenza A viruses." *Virology* **479-480**: 234-246.

346. Neumann, G., T. Noda and Y. Kawaoka (2009). "Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus." *Nature* **459**(7249): 931-939.

347. Newcombe, H. B. (1948). "Spontaneous mutation rate in *Escherichia coli*." *Genetics* **33**(1): 118.

348. Ng, A. K., W. H. Chan, S. T. Choi, M. K. Lam, K. F. Lau, P. K. Chan, S. W. Au, E. Fodor and P. C. Shaw (2012). "Influenza polymerase activity correlates with the strength of interaction between nucleoprotein and PB2 through the host-specific residue K/E627." *PLoS One* **7**(5): e36415.

349. Ng, A. K., H. Zhang, K. Tan, Z. Li, J. H. Liu, P. K. Chan, S. M. Li, W. Y. Chan, S. W. Au, A. Joachimiak, T. Walz, J. H. Wang and P. C. Shaw (2008). "Structure of the influenza virus A H5N1 nucleoprotein: implications for RNA binding, oligomerization, and vaccine design." *Faseb j* **22**(10): 3638-3647.

350. Noda, T., H. Sagara, A. Yen, A. Takada, H. Kida, R. H. Cheng and Y. Kawaoka (2006). "Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles." *Nature* **439**(7075): 490-492.

351. Noda, T., Y. Sugita, K. Aoyama, A. Hirase, E. Kawakami, A. Miyazawa, H. Sagara and Y. Kawaoka (2012). "Three-dimensional analysis of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus." *Nat Commun* **3**: 639.

352. Noronha, J. M., M. Liu, R. B. Squires, B. E. Pickett, B. G. Hale, G. M. Air, S. E. Galloway, T. Takimoto, M. Schmolke, V. Hunt, E. Klem, A. Garcia-Sastre, M. McGee and R. H. Scheuermann (2012). "Influenza virus sequence feature variant type analysis: evidence of a role for NS1 in influenza virus host range restriction." *J Virol* **86**(10): 5857-5866.

- 353.** Novella, I. S., E. A. Duarte, S. F. Elena, A. Moya, E. Domingo and J. J. Holland (1995). "Exponential increases of RNA virus fitness during large population transmissions." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(13): 5841-5844.
- 354.** Novella, I. S. and B. E. Ebendick-Corpus (2004). "Molecular basis of fitness loss and fitness recovery in vesicular stomatitis virus." J Mol Biol **342**(5): 1423-1430.
- 355.** Novella, I. S., S. F. Elena, A. Moya, E. Domingo and J. J. Holland (1995). "Size of genetic bottlenecks leading to virus fitness loss is determined by mean initial population fitness." J Virol **69**(5): 2869-2872.
- 356.** Novella, I. S., D. L. Gilbertson, B. Borrego, E. Domingo and J. J. Holland (2005). "Adaptability costs in immune escape variants of vesicular stomatitis virus." Virus Res **107**(1): 27-34.
- 357.** Novella, I. S., J. B. Presloid and R. T. Taylor (2014). "RNA replication errors and the evolution of virus pathogenicity and virulence." Curr Opin Virol **9**: 143-147.
- 358.** Nowak, M. (1990). "HIV mutation rate." Nature **347**(6293): 522.
- 359.** Nowak, M. and P. Schuster (1989). "Error thresholds of replication in finite populations mutation frequencies and the onset of Muller's ratchet." J Theor Biol **137**(4): 375-395.
- 360.** Nowak, M. A., R. M. May and R. M. Anderson (1990). "The evolutionary dynamics of HIV-1 quasispecies and the development of immunodeficiency disease." Aids **4**(11): 1095-1103.
- 361.** O'Neill, R. E., R. Jaskunas, G. Blobel, P. Palese and J. Moroiianu (1995). "Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import." J Biol Chem **270**(39): 22701-22704.
- 362.** O'Reilly, E. K. and C. C. Kao (1998). "Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure." Virology **252**(2): 287-303.
- 363.** Obenauer, J. C., J. Denson, P. K. Mehta, X. Su, S. Mukatira, D. B. Finkelstein, X. Xu, J. Wang, J. Ma, Y. Fan, K. M. Rakestraw, R. G. Webster, E. Hoffmann, S. Krauss, J. Zheng, Z. Zhang and C. W. Naeve (2006). "Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates." Science **311**(5767): 1576-1580.
- 364.** Octaviani, C. P., H. Goto and Y. Kawaoka (2011). "Reassortment between seasonal H1N1 and pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses is restricted by limited compatibility among polymerase subunits." J Virol **85**(16): 8449-8452.
- 365.** Ogata, N., H. J. Alter, R. H. Miller and R. H. Purcell (1991). "Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(8): 3392-3396.
- 366.** OIE. (2017). "Portail sur l'Influenza Aviaire - Point sur la situation de l'influenza aviaire hautement pathogène chez les animaux (type H5 et H7)." Retrieved 02/2017, from <http://www.oie.int/fr/sante-animale-dans-le-monde/mise-a-jour-sur-linfluenza-aviaire/2017/>.
- 367.** Ojosnegros, S., R. Agudo, M. Sierra, C. Briones, S. Sierra, C. Gonzalez-Lopez, E. Domingo and J. Cristina (2008). "Topology of evolving, mutagenized viral populations: quasispecies expansion, compression, and operation of negative selection." BMC Evol Biol **8**: 207.
- 368.** Ojosnegros, S., N. Beerenwinkel, T. Antal, M. A. Nowak, C. Escarmis and E. Domingo (2010). "Competition-colonization dynamics in an RNA virus." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(5): 2108-2112.
- 369.** Ojosnegros, S., E. Delgado-Eckert and N. Beerenwinkel (2012). "Competition-colonization trade-off promotes coexistence of low-virulence viral strains." J R Soc Interface **9**(74): 2244-2254.
- 370.** Ojosnegros, S., C. Perales, A. Mas and E. Domingo (2011). "Quasispecies as a matter of fact: viruses and beyond." Virus Res **162**(1-2): 203-215.
- 371.** Ortega, J., J. Martin-Benito, T. Zurcher, J. M. Valpuesta, J. L. Carrascosa and J. Ortin (2000). "Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification." J Virol **74**(1): 156-163.
- 372.** Oxford, J. S. (1975). "Inhibition of the replication of influenza A and B viruses by a nucleoside analogue (ribavirin)." J Gen Virol **28**(3): 409-414.
- 373.** Palancade, B. and O. Bensaude (2003). "Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation." Eur J Biochem **270**(19): 3859-3870.
- 374.** Pariente, N., S. Sierra and A. Airaksinen (2005). "Action of mutagenic agents and antiviral inhibitors on foot-and-mouth disease virus." Virus Res **107**(2): 183-193.

- 375.** Pariente, N., S. Sierra, P. R. Lowenstein and E. Domingo (2001). "Efficient virus extinction by combinations of a mutagen and antiviral inhibitors." *J Virol* **75**(20): 9723-9730.
- 376.** Parvin, J. D., A. Moscona, W. T. Pan, J. M. Leider and P. Palese (1986). "Measurement of the mutation rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1." *J Virol* **59**(2): 377-383.
- 377.** Pastorino, B. A., C. N. Peyrefitte, L. Almeras, M. Grandadam, D. Rolland, H. J. Tolou and M. Bessaud (2008). "Expression and biochemical characterization of nsP2 cysteine protease of Chikungunya virus." *Virus Res* **131**(2): 293-298.
- 378.** Paterson, D. and E. Fodor (2012). "Emerging roles for the influenza A virus nuclear export protein (NEP)." *PLoS Pathog* **8**(12): e1003019.
- 379.** Pauly, M. D. and A. S. Lauring (2015). "Effective lethal mutagenesis of influenza virus by three nucleoside analogs." *J Virol* **89**(7): 3584-3597.
- 380.** Pennings, P. S. (2013). "HIV Drug Resistance: Problems and Perspectives." *Infect Dis Rep* **5**(Suppl 1): e5.
- 381.** Pensaert, M., K. Ottis, J. Vandeputte, M. M. Kaplan and P. A. Bachmann (1981). "Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducts to swine and its potential importance for man." *Bull World Health Organ* **59**(1): 75-78.
- 382.** Perales, C., R. Agudo, S. C. Manrubia and E. Domingo (2011). "Influence of mutagenesis and viral load on the sustained low-level replication of an RNA virus." *J Mol Biol* **407**(1): 60-78.
- 383.** Perales, C. and E. Domingo (2016). "Antiviral Strategies Based on Lethal Mutagenesis and Error Threshold." *Curr Top Microbiol Immunol* **392**: 323-339.
- 384.** Perales, C., M. Henry, E. Domingo, S. Wain-Hobson and J. P. Vartanian (2011). "Lethal mutagenesis of foot-and-mouth disease virus involves shifts in sequence space." *J Virol* **85**(23): 12227-12240.
- 385.** Perales, C., R. Lorenzo-Redondo, C. Lopez-Galindez, M. A. Martinez and E. Domingo (2010). "Mutant spectra in virus behavior." *Future Virology* **5**(6): 679-698.
- 386.** Perales, C., R. Mateo, M. G. Mateu and E. Domingo (2007). "Insights into RNA virus mutant spectrum and lethal mutagenesis events: replicative interference and complementation by multiple point mutants." *J Mol Biol* **369**(4): 985-1000.
- 387.** Perez, J. T., A. Varble, R. Sachidanandam, I. Zlatev, M. Manoharan, A. Garcia-Sastre and B. R. tenOever (2010). "Influenza A virus-generated small RNAs regulate the switch from transcription to replication." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(25): 11525-11530.
- 388.** Perez, J. T., I. Zlatev, S. Aggarwal, S. Subramanian, R. Sachidanandam, B. Kim, M. Manoharan and B. R. tenOever (2012). "A small-RNA enhancer of viral polymerase activity." *J Virol* **86**(24): 13475-13485.
- 389.** Pfeiffer, J. K. and K. Kirkegaard (2003). "A single mutation in poliovirus RNA-dependent RNA polymerase confers resistance to mutagenic nucleotide analogs via increased fidelity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(12): 7289-7294.
- 390.** Pfeiffer, J. K. and K. Kirkegaard (2005). "Increased fidelity reduces poliovirus fitness and virulence under selective pressure in mice." *PLoS Pathog* **1**(2): e11.
- 391.** Pfeiffer, J. K. and K. Kirkegaard (2005). "Ribavirin resistance in hepatitis C virus replicon-containing cell lines conferred by changes in the cell line or mutations in the replicon RNA." *J Virol* **79**(4): 2346-2355.
- 392.** Pfeiffer, J. K. and K. Kirkegaard (2006). "Bottleneck-mediated quasispecies restriction during spread of an RNA virus from inoculation site to brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(14): 5520-5525.
- 393.** Pflug, A., D. Guilligay, S. Reich and S. Cusack (2014). "Structure of influenza A polymerase bound to the viral RNA promoter." *Nature* **516**(7531): 355-360.
- 394.** Pflug, A., M. Lukarska, P. Resa-Infante, S. Reich and S. Cusack (2017). "Structural insights into RNA synthesis by the influenza virus transcription-replication machine." *Virus Res*.
- 395.** Phatnani, H. P. and A. L. Greenleaf (2006). "Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD." *Genes Dev* **20**(21): 2922-2936.
- 396.** Ping, J., S. K. Dankar, N. E. Forbes, L. Keleta, Y. Zhou, S. Tyler and E. G. Brown (2010). "PB2 and hemagglutinin mutations are major determinants of host range and virulence in mouse-adapted influenza A virus." *J Virol* **84**(20): 10606-10618.

- 397.** Ping, J., L. Keleta, N. E. Forbes, S. Dankar, W. Stecho, S. Tyler, Y. Zhou, L. Babiuk, H. Weingartl, R. A. Halpin, A. Boyne, J. Bera, J. Hostetler, N. B. Fedorova, K. Proudfoot, D. A. Katzell, T. B. Stockwell, E. Ghedin, D. J. Spiro and E. G. Brown (2011). "Genomic and protein structural maps of adaptive evolution of human influenza A virus to increased virulence in the mouse." *PLoS One* **6**(6): e21740.
- 398.** Pleschka, S., R. Jaskunas, O. G. Engelhardt, T. Zurcher, P. Palese and A. Garcia-Sastre (1996). "A plasmid-based reverse genetics system for influenza A virus." *J Virol* **70**(6): 4188-4192.
- 399.** Poch, O., I. Sauvaget, M. Delarue and N. Tordo (1989). "Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements." *Embo j* **8**(12): 3867-3874.
- 400.** Poole, E., D. Elton, L. Medcalf and P. Digard (2004). "Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites." *Virology* **321**(1): 120-133.
- 401.** Poon, L. L., D. C. Pritlove, J. Sharps and G. G. Brownlee (1998). "The RNA polymerase of influenza virus, bound to the 5' end of virion RNA, acts in cis to polyadenylate mRNA." *J Virol* **72**(10): 8214-8219.
- 402.** Prager, F., D. Wei and A. Rose (2016). "Total Economic Consequences of an Influenza Outbreak in the United States." *Risk Anal.*
- 403.** Premkumar, A., C. R. Horan and P. W. Gage (2005). "Dengue virus M protein C-terminal peptide (DVM-C) forms ion channels." *J Membr Biol* **204**(1): 33-38.
- 404.** Premkumar, A., L. Wilson, G. D. Ewart and P. W. Gage (2004). "Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride." *FEBS Lett* **557**(1-3): 99-103.
- 405.** Presloid, J. B. and I. S. Novella (2015). "RNA Viruses and RNAi: Quasispecies Implications for Viral Escape." *Viruses* **7**(6): 3226-3240.
- 406.** Preston, B. D., B. J. Poiesz and L. A. Loeb (1988). "Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase." *Science* **242**(4882): 1168-1171.
- 407.** Pringle, C. R. (1970). "Genetic characteristics of conditional lethal mutants of vesicular stomatitis virus induced by 5-fluorouracil, 5-azacytidine, and ethyl methane sulfonate." *J Virol* **5**(5): 559-567.
- 408.** Raghwani, J., R. Rose, I. Sheridan, P. Lemey, M. A. Suchard, T. Santantonio, P. Farci, P. Klenerman and O. G. Pybus (2016). "Exceptional Heterogeneity in Viral Evolutionary Dynamics Characterises Chronic Hepatitis C Virus Infection." *PLoS Pathog* **12**(9): e1005894.
- 409.** Rahnema, L. and S. Aris-Brosou (2013). "Phylodynamics of the emergence of influenza viruses after cross-species transmission." *PLoS One* **8**(12): e82486.
- 410.** Rambaut, A., O. G. Pybus, M. I. Nelson, C. Viboud, J. K. Taubenberger and E. C. Holmes (2008). "The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus." *Nature* **453**(7195): 615-619.
- 411.** Rameix-Welti, M. A., A. Tomoiu, E. Dos Santos Afonso, S. van der Werf and N. Naffakh (2009). "Avian Influenza A virus polymerase association with nucleoprotein, but not polymerase assembly, is impaired in human cells during the course of infection." *J Virol* **83**(3): 1320-1331.
- 412.** Rankin, J. T., Jr., S. B. Eppes, J. B. Antczak and W. K. Joklik (1989). "Studies on the mechanism of the antiviral activity of ribavirin against reovirus." *Virology* **168**(1): 147-158.
- 413.** Reha-Krantz, L. J., S. Stocki, R. L. Nonay, E. Dimayuga, L. D. Goodrich, W. H. Konigsberg and E. K. Spicer (1991). "DNA polymerization in the absence of exonucleolytic proofreading: in vivo and in vitro studies." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(6): 2417-2421.
- 414.** Reich, S., D. Guilligay, A. Pflug, H. Malet, I. Berger, T. Crepin, D. Hart, T. Lunardi, M. Nanao, R. W. Ruigrok and S. Cusack (2014). "Structural insight into cap-snatching and RNA synthesis by influenza polymerase." *Nature* **516**(7531): 361-366.
- 415.** Resa-Infante, P. and G. Gabriel (2013). "The nuclear import machinery is a determinant of influenza virus host adaptation." *Bioessays* **35**(1): 23-27.
- 416.** Resa-Infante, P., N. Jorba, R. Coloma and J. Ortin (2011). "The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function." *RNA Biol* **8**(2): 207-215.
- 417.** Resa-Infante, P., N. Jorba, N. Zamarreno, Y. Fernandez, S. Juarez and J. Ortin (2008). "The host-dependent interaction of alpha-importins with influenza PB2 polymerase subunit is required for virus RNA replication." *PLoS One* **3**(12): e3904.

- 418.** Resa-Infante, P., M. A. Recuero-Checa, N. Zamarreno, O. Llorca and J. Ortin (2010). "Structural and functional characterization of an influenza virus RNA polymerase-genomic RNA complex." *J Virol* **84**(20): 10477-10487.
- 419.** Rivailler, P., D. Moisy and N. Naffakh (2013). "Hôtes multiples et brassage génétique des virus influenza de type A " *Virologie* **17**(6): 387-400.
- 420.** Robb, N. C. and E. Fodor (2012). "The accumulation of influenza A virus segment 7 spliced mRNAs is regulated by the NS1 protein." *J Gen Virol* **93**(Pt 1): 113-118.
- 421.** Robb, N. C., D. Jackson, F. T. Vreede and E. Fodor (2010). "Splicing of influenza A virus NS1 mRNA is independent of the viral NS1 protein." *J Gen Virol* **91**(Pt 9): 2331-2340.
- 422.** Robb, N. C., M. Smith, F. T. Vreede and E. Fodor (2009). "NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome." *J Gen Virol* **90**(Pt 6): 1398-1407.
- 423.** Roberts, J. D., K. Bebenek and T. A. Kunkel (1988). "The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1." *Science* **242**(4882): 1171-1173.
- 424.** Rodriguez-Frandsen, A., R. Alfonso and A. Nieto (2015). "Influenza virus polymerase: Functions on host range, inhibition of cellular response to infection and pathogenicity." *Virus Res* **209**: 23-38.
- 425.** Rohde, N., H. Daum and C. K. Biebricher (1995). "The mutant distribution of an RNA species replicated by Q beta replicase." *J Mol Biol* **249**(4): 754-762.
- 426.** Rolling, T., I. Koerner, P. Zimmermann, K. Holz, O. Haller, P. Staeheli and G. Kochs (2009). "Adaptive mutations resulting in enhanced polymerase activity contribute to high virulence of influenza A virus in mice." *J Virol* **83**(13): 6673-6680.
- 427.** Roossinck, M. J. (1997). "Mechanisms of plant virus evolution." *Annu Rev Phytopathol* **35**: 191-209.
- 428.** Roossinck, M. J. and W. L. Schneider (2006). "Mutant clouds and occupation of sequence space in plant RNA viruses." *Curr Top Microbiol Immunol* **299**: 337-348.
- 429.** Rozen-Gagnon, K., K. A. Stapleford, V. Mongelli, H. Blanc, A. B. Failloux, M. C. Saleh and M. Vignuzzi (2014). "Alphavirus mutator variants present host-specific defects and attenuation in mammalian and insect models." *PLoS Pathog* **10**(1): e1003877.
- 430.** Ruigrok, R. W. and F. Baudin (1995). "Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that are indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles." *J Gen Virol* **76** (Pt 4): 1009-1014.
- 431.** Ruigrok, R. W., T. Crepin, D. J. Hart and S. Cusack (2010). "Towards an atomic resolution understanding of the influenza virus replication machinery." *Curr Opin Struct Biol* **20**(1): 104-113.
- 432.** Ruiz-Jarabo, C. M., C. Ly, E. Domingo and J. C. de la Torre (2003). "Lethal mutagenesis of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)." *Virology* **308**(1): 37-47.
- 433.** Sadeghipour, S., E. J. Bek and P. C. McMinn (2013). "Ribavirin-resistant mutants of human enterovirus 71 express a high replication fidelity phenotype during growth in cell culture." *J Virol* **87**(3): 1759-1769.
- 434.** Sakabe, S., M. Ozawa, R. Takano, K. Iwastuki-Horimoto and Y. Kawaoka (2011). "Mutations in PA, NP, and HA of a pandemic (H1N1) 2009 influenza virus contribute to its adaptation to mice." *Virus Res* **158**(1-2): 124-129.
- 435.** Salter, J. D., R. P. Bennett and H. C. Smith (2016). "The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function." *Trends Biochem Sci* **41**(7): 578-594.
- 436.** Samuel, C. E. (2011). "Adenosine deaminases acting on RNA (ADARs) are both antiviral and proviral." *Virology* **411**(2): 180-193.
- 437.** Samuel, C. E. (2012). "ADARs: viruses and innate immunity." *Curr Top Microbiol Immunol* **353**: 163-195.
- 438.** Sangawa, H., T. Komeno, H. Nishikawa, A. Yoshida, K. Takahashi, N. Nomura and Y. Furuta (2013). "Mechanism of action of T-705 ribosyl triphosphate against influenza virus RNA polymerase." *Antimicrob Agents Chemother* **57**(11): 5202-5208.
- 439.** Sanjuan, R. (2010). "Mutational fitness effects in RNA and single-stranded DNA viruses: common patterns revealed by site-directed mutagenesis studies." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**(1548): 1975-1982.

440. Sanjuan, R. and P. Domingo-Calap (2016). "Mechanisms of viral mutation." *Cell Mol Life Sci* **73**(23): 4433-4448.
441. Sanjuan, R., A. Moya and S. F. Elena (2004). "The distribution of fitness effects caused by single-nucleotide substitutions in an RNA virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(22): 8396-8401.
442. Sanjuan, R., M. R. Nebot, N. Chirico, L. M. Mansky and R. Belshaw (2010). "Viral mutation rates." *J Virol* **84**(19): 9733-9748.
443. Sardanyes, J. and S. F. Elena (2010). "Error threshold in RNA quasispecies models with complementation." *J Theor Biol* **265**(3): 278-286.
444. Schaaper, R. M. (1993). "Base selection, proofreading, and mismatch repair during DNA replication in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **268**(32): 23762-23765.
445. Scheidel, L. M. and V. Stollar (1991). "Mutations that confer resistance to mycophenolic acid and ribavirin on Sindbis virus map to the nonstructural protein nsP1." *Virology* **181**(2): 490-499.
446. Schnell, J. R. and J. J. Chou (2008). "Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus." *Nature* **451**(7178): 591-595.
447. Scholtissek, C., S. Ludwig and W. M. Fitch (1993). "Analysis of influenza A virus nucleoproteins for the assessment of molecular genetic mechanisms leading to new phylogenetic virus lineages." *Arch Virol* **131**(3-4): 237-250.
448. Schrauwen, E. J., M. de Graaf, S. Herfst, G. F. Rimmelzwaan, A. D. Osterhaus and R. A. Fouchier (2014). "Determinants of virulence of influenza A virus." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **33**(4): 479-490.
449. Schubert, M., G. G. Harmison and E. Meier (1984). "Primary structure of the vesicular stomatitis virus polymerase (L) gene: evidence for a high frequency of mutations." *J Virol* **51**(2): 505-514.
450. Schuster, P. (2016). "Quasispecies on Fitness Landscapes." *Curr Top Microbiol Immunol* **392**: 61-120.
451. Seifert, D. and N. Beerenwinkel (2016). "Estimating Fitness of Viral Quasispecies from Next-Generation Sequencing Data." *Curr Top Microbiol Immunol* **392**: 181-200.
452. Selman, M., S. K. Dankar, N. E. Forbes, J. J. Jia and E. G. Brown (2012). "Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing." *Emerg Microbes Infect* **1**(11): e42.
453. Sevajol, M., L. Subissi, E. Decroly, B. Canard and I. Imbert (2014). "Insights into RNA synthesis, capping, and proofreading mechanisms of SARS-coronavirus." *Virus Res* **194**: 90-99.
454. Severson, W. E., C. S. Schmaljohn, A. Javadian and C. B. Jonsson (2003). "Ribavirin causes error catastrophe during Hantaan virus replication." *J Virol* **77**(1): 481-488.
455. Seyer, R., E. R. Hrincius, D. Ritzel, M. Abt, A. Mellmann, H. Marjuki, J. Kuhn, T. Wolff, S. Ludwig and C. Ehrhardt (2012). "Synergistic adaptive mutations in the hemagglutinin and polymerase acidic protein lead to increased virulence of pandemic 2009 H1N1 influenza A virus in mice." *J Infect Dis* **205**(2): 262-271.
456. Shapira, S. D., I. Gat-Viks, B. O. Shum, A. Dricot, M. M. de Grace, L. Wu, P. B. Gupta, T. Hao, S. J. Silver, D. E. Root, D. E. Hill, A. Regev and N. Hacohen (2009). "A physical and regulatory map of host-influenza interactions reveals pathways in H1N1 infection." *Cell* **139**(7): 1255-1267.
457. Shaw, M. L., K. L. Stone, C. M. Colangelo, E. E. Gulcicek and P. Palese (2008). "Cellular proteins in influenza virus particles." *PLoS Pathog* **4**(6): e1000085.
458. Shi, S., S. Chen, W. Han, B. Wu, X. Zhang, Y. Tang, X. Wang, Y. Zhu, D. Peng and X. Liu (2016). "Cross-clade protective immune responses of NS1-truncated live attenuated H5N1 avian influenza vaccines." *Vaccine* **34**(3): 350-357.
459. Shih, S. R. and R. M. Krug (1996). "Novel exploitation of a nuclear function by influenza virus: the cellular SF2/ASF splicing factor controls the amount of the essential viral M2 ion channel protein in infected cells." *Embo j* **15**(19): 5415-5427.
460. Shinya, K., S. Watanabe, T. Ito, N. Kasai and Y. Kawaoka (2007). "Adaptation of an H7N7 equine influenza A virus in mice." *J Gen Virol* **88**(Pt 2): 547-553.
461. Shope, R. E. (1931). "THE ETIOLOGY OF SWINE INFLUENZA." *Science* **73**(1886): 214-215.

- 462.** Short, K. R., M. Richard, J. H. Verhagen, D. van Riel, E. J. Schrauwen, J. M. van den Brand, B. Manz, R. Bodewes and S. Herfst (2015). "One health, multiple challenges: The inter-species transmission of influenza A virus." *One Health* **1**: 1-13.
- 463.** Sieczkarski, S. B. and G. R. Whittaker (2002). "Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis." *J Virol* **76**(20): 10455-10464.
- 464.** Sierra, M., A. Airaksinen, C. Gonzalez-Lopez, R. Agudo, A. Arias and E. Domingo (2007). "Foot-and-mouth disease virus mutant with decreased sensitivity to ribavirin: implications for error catastrophe." *J Virol* **81**(4): 2012-2024.
- 465.** Sierra, S., M. Davila, P. R. Lowenstein and E. Domingo (2000). "Response of foot-and-mouth disease virus to increased mutagenesis: influence of viral load and fitness in loss of infectivity." *J Virol* **74**(18): 8316-8323.
- 466.** Simon, G. (2010). "Le porc, hôte intermédiaire pour l'apparition de virus influenza réassortants à potentiel zoonotique." *Virologie* **14**(6): 407-422.
- 467.** Simon-Loriere, E. and E. C. Holmes (2011). "Why do RNA viruses recombine?" *Nat Rev Microbiol* **9**(8): 617-626.
- 468.** Simonsen, L. (1999). "The global impact of influenza on morbidity and mortality." *Vaccine* **17 Suppl 1**: S3-10.
- 469.** Sirover, M. A. and L. A. Loeb (1976). "Metal-induced infidelity during DNA synthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(7): 2331-2335.
- 470.** Smith, E. C., H. Blanc, M. C. Surdel, M. Vignuzzi and M. R. Denison (2013). "Coronaviruses lacking exoribonuclease activity are susceptible to lethal mutagenesis: evidence for proofreading and potential therapeutics." *PLoS Pathog* **9**(8): e1003565.
- 471.** Smith, E. C., J. B. Case, H. Blanc, O. Isakov, N. Shomron, M. Vignuzzi and M. R. Denison (2015). "Mutations in coronavirus nonstructural protein 10 decrease virus replication fidelity." *J Virol* **89**(12): 6418-6426.
- 472.** Smith, E. C. and M. R. Denison (2012). "Implications of altered replication fidelity on the evolution and pathogenesis of coronaviruses." *Curr Opin Virol* **2**(5): 519-524.
- 473.** Smith, E. C., N. R. Sexton and M. R. Denison (2014). "Thinking Outside the Triangle: Replication Fidelity of the Largest RNA Viruses." *Annu Rev Virol* **1**(1): 111-132.
- 474.** Smith, G. J., J. Bahl, D. Vijaykrishna, J. Zhang, L. L. Poon, H. Chen, R. G. Webster, J. S. Peiris and Y. Guan (2009). "Dating the emergence of pandemic influenza viruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(28): 11709-11712.
- 475.** Smith, G. J., D. Vijaykrishna, J. Bahl, S. J. Lycett, M. Worobey, O. G. Pybus, S. K. Ma, C. L. Cheung, J. Raghvani, S. Bhatt, J. S. Peiris, Y. Guan and A. Rambaut (2009). "Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic." *Nature* **459**(7250): 1122-1125.
- 476.** Smith, H. C., R. P. Bennett, A. Kizilyer, W. M. McDougall and K. M. Prohaska (2012). "Functions and regulation of the APOBEC family of proteins." *Semin Cell Dev Biol* **23**(3): 258-268.
- 477.** Sniegowski, P. D., P. J. Gerrish and R. E. Lenski (1997). "Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*." *Nature* **387**(6634): 703-705.
- 478.** Snijder, E. J., E. Decroly and J. Ziebuhr (2016). "The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing." *Adv Virus Res* **96**: 59-126.
- 479.** Sobrino, F., M. Davila, J. Ortin and E. Domingo (1983). "Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture." *Virology* **128**(2): 310-318.
- 480.** Sole, R. V., R. Ferrer, I. Gonzalez-Garcia, J. Quer and E. Domingo (1999). "Red queen dynamics, competition and critical points in a model of RNA virus quasispecies." *J Theor Biol* **198**(1): 47-59.
- 481.** Song, M. S., P. N. Pascua, J. H. Lee, Y. H. Baek, O. J. Lee, C. J. Kim, H. Kim, R. J. Webby, R. G. Webster and Y. K. Choi (2009). "The polymerase acidic protein gene of influenza A virus contributes to pathogenicity in a mouse model." *J Virol* **83**(23): 12325-12335.
- 482.** Song, M. S., P. N. Pascua, J. H. Lee, Y. H. Baek, K. J. Park, H. I. Kwon, S. J. Park, C. J. Kim, H. Kim, R. J. Webby, R. G. Webster and Y. K. Choi (2011). "Virulence and genetic compatibility of polymerase reassortant viruses derived from the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus and circulating influenza A viruses." *J Virol* **85**(13): 6275-6286.

- 483.** Sorrell, E. M., E. J. Schrauwen, M. Linster, M. De Graaf, S. Herfst and R. A. Fouchier (2011). "Predicting 'airborne' influenza viruses: (trans-) mission impossible?" *Curr Opin Virol* **1**(6): 635-642.
- 484.** Stapleford, K. A., K. Rozen-Gagnon, P. K. Das, S. Saul, E. Z. Poirier, H. Blanc, P. O. Vidalain, A. Merits and M. Vignuzzi (2015). "Viral Polymerase-Helicase Complexes Regulate Replication Fidelity To Overcome Intracellular Nucleotide Depletion." *J Virol* **89**(22): 11233-11244.
- 485.** Stech, J., X. Xiong, C. Scholtissek and R. G. Webster (1999). "Independence of evolutionary and mutational rates after transmission of avian influenza viruses to swine." *J Virol* **73**(3): 1878-1884.
- 486.** Steel, J. and A. C. Lowen (2014). "Influenza A virus reassortment." *Curr Top Microbiol Immunol* **385**: 377-401.
- 487.** Steinhauer, D. A., J. C. de la Torre and J. J. Holland (1989). "High nucleotide substitution error frequencies in clonal pools of vesicular stomatitis virus." *J Virol* **63**(5): 2063-2071.
- 488.** Steinhauer, D. A., J. C. de la Torre, E. Meier and J. J. Holland (1989). "Extreme heterogeneity in populations of vesicular stomatitis virus." *J Virol* **63**(5): 2072-2080.
- 489.** Stephens, P. R., S. Altizer, K. F. Smith, A. Alonso Aguirre, J. H. Brown, S. A. Budischak, J. E. Byers, T. A. Dallas, T. Jonathan Davies, J. M. Drake, V. O. Ezenwa, M. J. Farrell, J. L. Gittleman, B. A. Han, S. Huang, R. A. Hutchinson, P. Johnson, C. L. Nunn, D. Onstad, A. Park, G. M. Vazquez-Prokopec, J. P. Schmidt and R. Poulin (2016). "The macroecology of infectious diseases: a new perspective on global-scale drivers of pathogen distributions and impacts." *Ecol Lett* **19**(9): 1159-1171.
- 490.** Stevaert, A. and L. Naesens (2016). "The Influenza Virus Polymerase Complex: An Update on Its Structure, Functions, and Significance for Antiviral Drug Design." *Med Res Rev* **36**(6): 1127-1173.
- 491.** Su, W. C., S. F. Hsu, Y. Y. Lee, K. S. Jeng and M. M. Lai (2015). "A Nucleolar Protein, Ribosomal RNA Processing 1 Homolog B (RRP1B), Enhances the Recruitment of Cellular mRNA in Influenza Virus Transcription." *J Virol* **89**(22): 11245-11255.
- 492.** Suarez, P., J. Valcarcel and J. Ortin (1992). "Heterogeneity of the mutation rates of influenza A viruses: isolation of mutator mutants." *J Virol* **66**(4): 2491-2494.
- 493.** Subbarao, E. K., W. London and B. R. Murphy (1993). "A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range." *J Virol* **67**(4): 1761-1764.
- 494.** Sugiyama, K., A. Kawaguchi, M. Okuwaki and K. Nagata (2015). "pp32 and APRIL are host cell-derived regulators of influenza virus RNA synthesis from cRNA." *Elife* **4**.
- 495.** Swetina, J. and P. Schuster (1982). "Self-replication with errors. A model for polynucleotide replication." *Biophys Chem* **16**(4): 329-345.
- 496.** Takizawa, N., K. Watanabe, K. Nouno, N. Kobayashi and K. Nagata (2006). "Association of functional influenza viral proteins and RNAs with nuclear chromatin and sub-chromatin structure." *Microbes Infect* **8**(3): 823-833.
- 497.** Tamuri, A. U., M. Dos Reis, A. J. Hay and R. A. Goldstein (2009). "Identifying changes in selective constraints: host shifts in influenza." *PLoS Comput Biol* **5**(11): e1000564.
- 498.** Tarendeau, F., J. Boudet, D. Guilligay, P. J. Mas, C. M. Bougault, S. Boulo, F. Baudin, R. W. Ruigrok, N. Daigle, J. Ellenberg, S. Cusack, J. P. Simorre and D. J. Hart (2007). "Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit." *Nat Struct Mol Biol* **14**(3): 229-233.
- 499.** Tarendeau, F., T. Crepin, D. Guilligay, R. W. Ruigrok, S. Cusack and D. J. Hart (2008). "Host determinant residue lysine 627 lies on the surface of a discrete, folded domain of influenza virus polymerase PB2 subunit." *PLoS Pathog* **4**(8): e1000136.
- 500.** Taubenberger, J. K. and J. C. Kash (2010). "Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation." *Cell Host Microbe* **7**(6): 440-451.
- 501.** Taubenberger, J. K. and D. M. Morens (2006). "1918 Influenza: the mother of all pandemics." *Emerg Infect Dis* **12**(1): 15-22.
- 502.** Taubenberger, J. K. and D. M. Morens (2009). "Pandemic influenza--including a risk assessment of H5N1." *Rev Sci Tech* **28**(1): 187-202.
- 503.** te Velthuis, A. J. (2014). "Common and unique features of viral RNA-dependent polymerases." *Cell Mol Life Sci* **71**(22): 4403-4420.
- 504.** Te Velthuis, A. J. and E. Fodor (2016). "Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis." *Nat Rev Microbiol* **14**(8): 479-493.

- 505.** Te Velthuis, A. J., N. C. Robb, A. N. Kapanidis and E. Fodor (2016). "The role of the priming loop in Influenza A virus RNA synthesis." *Nat Microbiol* **1**(5).
- 506.** Tejero, H., F. Montero and J. C. Nuno (2016). "Theories of Lethal Mutagenesis: From Error Catastrophe to Lethal Defection." *Curr Top Microbiol Immunol* **392**: 161-179.
- 507.** Teng, M. N., M. B. Oldstone and J. C. de la Torre (1996). "Suppression of lymphocytic choriomeningitis virus--induced growth hormone deficiency syndrome by disease-negative virus variants." *Virology* **223**(1): 113-119.
- 508.** Than, V. T., S. Jeong and W. Kim (2014). "A systematic review of genetic diversity of human rotavirus circulating in South Korea." *Infect Genet Evol* **28**: 462-469.
- 509.** Thangavel, R. R., A. Reed, E. W. Norcross, S. N. Dixon, M. E. Marquart and S. J. Stray (2011). "'Boom' and 'Bust' cycles in virus growth suggest multiple selective forces in influenza a evolution." *Virology* **8**: 180.
- 510.** Thierry, E., D. Guilligay, J. Kosinski, T. Bock, S. Gaudon, A. Round, A. Pflug, N. Hengrung, K. El Omari, F. Baudin, D. J. Hart, M. Beck and S. Cusack (2016). "Influenza Polymerase Can Adopt an Alternative Configuration Involving a Radical Repacking of PB2 Domains." *Mol Cell* **61**(1): 125-137.
- 511.** To, K. K., J. Zhou, J. F. Chan and K. Y. Yuen (2015). "Host genes and influenza pathogenesis in humans: an emerging paradigm." *Curr Opin Virol* **14**: 7-15.
- 512.** Todt, D., S. Walter, R. J. Brown and E. Steinmann (2016). "Mutagenic Effects of Ribavirin on Hepatitis E Virus-Viral Extinction versus Selection of Fitness-Enhancing Mutations." *Viruses* **8**(10).
- 513.** Toltzis, P., K. O'Connell and J. L. Patterson (1988). "Effect of phosphorylated ribavirin on vesicular stomatitis virus transcription." *Antimicrob Agents Chemother* **32**(4): 492-497.
- 514.** Tomaselli, S., F. Galeano, F. Locatelli and A. Gallo (2015). "ADARs and the Balance Game between Virus Infection and Innate Immune Cell Response." *Curr Issues Mol Biol* **17**: 37-51.
- 515.** Tomescu, A. I., N. C. Robb, N. Hengrung, E. Fodor and A. N. Kapanidis (2014). "Single-molecule FRET reveals a corkscrew RNA structure for the polymerase-bound influenza virus promoter." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(32): E3335-3342.
- 516.** Topisirovic, I., Y. V. Svitkin, N. Sonenberg and A. J. Shatkin (2011). "Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression." *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**(2): 277-298.
- 517.** Treanor, J., M. Perkins, R. Battaglia and B. R. Murphy (1994). "Evaluation of the genetic stability of the temperature-sensitive PB2 gene mutation of the influenza A/Ann Arbor/6/60 cold-adapted vaccine virus." *J Virol* **68**(12): 7684-7688.
- 518.** Tripathi, S., M. O. Pohl, Y. Zhou, A. Rodriguez-Frandsen, G. Wang, D. A. Stein, H. M. Moulton, P. DeJesus, J. Che, L. C. Mulder, E. Yanguez, D. Andenmatten, L. Pache, B. Manicassamy, R. A. Albrecht, M. G. Gonzalez, Q. Nguyen, A. Brass, S. Elledge, M. White, S. Shapira, N. Hacohen, A. Karlas, T. F. Meyer, M. Shales, A. Gatorano, J. R. Johnson, G. Jang, T. Johnson, E. Verschuere, D. Sanders, N. Krogan, M. Shaw, R. Konig, S. Stertz, A. Garcia-Sastre and S. K. Chanda (2015). "Meta- and Orthogonal Integration of Influenza "OMICS" Data Defines a Role for UBR4 in Virus Budding." *Cell Host Microbe* **18**(6): 723-735.
- 519.** Tsai, P. L., N. T. Chiou, S. Kuss, A. Garcia-Sastre, K. W. Lynch and B. M. Fontoura (2013). "Cellular RNA binding proteins NS1-BP and hnRNP K regulate influenza A virus RNA splicing." *PLoS Pathog* **9**(6): e1003460.
- 520.** Turner, D., A. Wailoo, K. Nicholson, N. Cooper, A. Sutton and K. Abrams (2003). "Systematic review and economic decision modelling for the prevention and treatment of influenza A and B." *Health Technol Assess* **7**(35): iii-iv, xi-xiii, 1-170.
- 521.** Turrell, L., J. W. Lyall, L. S. Tiley, E. Fodor and F. T. Vreede (2013). "The role and assembly mechanism of nucleoprotein in influenza A virus ribonucleoprotein complexes." *Nat Commun* **4**: 1591.
- 522.** Van Borm, S., H. L. Ferreira and T. van den Berg (2010). "Fine quantification of avian influenza H5N1 escape mutant quasispecies populations using mutation-specific real-time PCR." *Avian Dis* **54**(1 Suppl): 558-564.
- 523.** Van den Hoecke, S., J. Verhelst, M. Vuylsteke and X. Saelens (2015). "Analysis of the genetic diversity of influenza A viruses using next-generation DNA sequencing." *BMC Genomics* **16**: 79.
- 524.** van Valen, L. (1973). A new evolutionary law.

- 525.** Vasin, A. V., O. A. Temkina, V. V. Egorov, S. A. Klotchenko, M. A. Plotnikova and O. I. Kiselev (2014). "Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins." *Virus Res* **185**: 53-63.
- 526.** Ver, L. S., L. Marcos-Villar, S. Landeras-Bueno, A. Nieto and J. Ortin (2015). "The Cellular Factor NXP2/MORC3 Is a Positive Regulator of Influenza Virus Multiplication." *J Virol* **89**(19): 10023-10030.
- 527.** Vignuzzi, M., J. K. Stone, J. J. Arnold, C. E. Cameron and R. Andino (2006). "Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population." *Nature* **439**(7074): 344-348.
- 528.** Vignuzzi, M., E. Wendt and R. Andino (2008). "Engineering attenuated virus vaccines by controlling replication fidelity." *Nat Med* **14**(2): 154-161.
- 529.** Villarreal, L. P. and G. Witzany (2013). "Rethinking quasispecies theory: From fittest type to cooperative consortia." *World J Biol Chem* **4**(4): 79-90.
- 530.** ViralZone. (2016). "Influenzavirus A." from http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/6.html.
- 531.** Vo, N. V., K. C. Young and M. M. Lai (2003). "Mutagenic and inhibitory effects of ribavirin on hepatitis C virus RNA polymerase." *Biochemistry* **42**(35): 10462-10471.
- 532.** Vreede, F. T., A. K. Ng, P. C. Shaw and E. Fodor (2011). "Stabilization of influenza virus replication intermediates is dependent on the RNA-binding but not the homo-oligomerization activity of the viral nucleoprotein." *J Virol* **85**(22): 12073-12078.
- 533.** Wagner, G. P. and P. Krall (1993). What is the difference between models of error thresholds and Muller's ratchet?
- 534.** Wain-Hobson, S. (1989). "HIV genome variability in vivo." *Aids* **3 Suppl 1**: S13-18.
- 535.** Wainberg, M. A., W. C. Drosopoulos, H. Salomon, M. Hsu, G. Borkow, M. Parniak, Z. Gu, Q. Song, J. Manne, S. Islam, G. Castriota and V. R. Prasad (1996). "Enhanced fidelity of 3TC-selected mutant HIV-1 reverse transcriptase." *Science* **271**(5253): 1282-1285.
- 536.** Wang, J., Y. Sun, Q. Xu, Y. Tan, J. Pu, H. Yang, E. G. Brown and J. Liu (2012). "Mouse-adapted H9N2 influenza A virus PB2 protein M147L and E627K mutations are critical for high virulence." *PLoS One* **7**(7): e40752.
- 537.** Wang, P., W. Song, B. W. Mok, P. Zhao, K. Qin, A. Lai, G. J. Smith, J. Zhang, T. Lin, Y. Guan and H. Chen (2009). "Nuclear factor 90 negatively regulates influenza virus replication by interacting with viral nucleoprotein." *J Virol* **83**(16): 7850-7861.
- 538.** Watanabe, T., E. Kawakami, J. E. Shoemaker, T. J. Lopes, Y. Matsuoka, Y. Tomita, H. Kozuka-Hata, T. Gorai, T. Kuwahara, E. Takeda, A. Nagata, R. Takano, M. Kiso, M. Yamashita, Y. Sakai-Tagawa, H. Katsura, N. Nonaka, H. Fujii, K. Fujii, Y. Sugita, T. Noda, H. Goto, S. Fukuyama, S. Watanabe, G. Neumann, M. Oyama, H. Kitano and Y. Kawaoka (2014). "Influenza virus-host interactome screen as a platform for antiviral drug development." *Cell Host Microbe* **16**(6): 795-805.
- 539.** Watanabe, T., S. Watanabe and Y. Kawaoka (2010). "Cellular networks involved in the influenza virus life cycle." *Cell Host Microbe* **7**(6): 427-439.
- 540.** Watanabe, Y., M. S. Ibrahim, Y. Suzuki and K. Ikuta (2012). "The changing nature of avian influenza A virus (H5N1)." *Trends Microbiol* **20**(1): 11-20.
- 541.** Weaver, S. C., W. Kang, Y. Shirako, T. Rumenapf, E. G. Strauss and J. H. Strauss (1997). "Recombinational history and molecular evolution of western equine encephalomyelitis complex alphaviruses." *J Virol* **71**(1): 613-623.
- 542.** Webster, R. G., W. J. Bean, O. T. Gorman, T. M. Chambers and Y. Kawaoka (1992). "Evolution and ecology of influenza A viruses." *Microbiol Rev* **56**(1): 152-179.
- 543.** Weeks, S. A., C. A. Lee, Y. Zhao, E. D. Smidansky, A. August, J. J. Arnold and C. E. Cameron (2012). "A Polymerase mechanism-based strategy for viral attenuation and vaccine development." *J Biol Chem* **287**(38): 31618-31622.
- 544.** Weiss, B. G. and S. Schlesinger (1991). "Recombination between Sindbis virus RNAs." *J Virol* **65**(8): 4017-4025.
- 545.** Wendel, I., M. Matrosovich and H. D. Klenk (2015). "SnapShot: Evolution of human influenza A viruses." *Cell Host Microbe* **17**(3): 416.e411.

546. Weymouth, L. A. and L. A. Loeb (1978). "Mutagenesis during in vitro DNA synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(4): 1924-1928.
547. WHO. (2011). "World Health Organization : Standardization of terminology of the pandemic A(H1N1)2009 virus." from http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/terminology_ah1n1pdm09/en/.
548. WHO. (2016). "World Health Organization : Influenza (Seasonal)." from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>.
549. WHO. (2017). "World Health Organization : Avian influenza A(H7N9) virus." 2017, from http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/influenza_h7n9/en/.
550. WHO. (2017). "World Health Organization : H5N1 research issues." 2017, from http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/avian_influenza/h5n1_research/en/.
551. WHO. (2017). "World Health Organization : HPAI H5N1 Genetic Changes Inventory - A Tool for Influenza Surveillance and Preparedness." from http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/h5n1_genetic_changes_inventory/en/.
552. Wilke, C. O. (2001). "Adaptive evolution on neutral networks." Bull Math Biol **63**(4): 715-730.
553. Wilke, C. O. (2005). "Quasispecies theory in the context of population genetics." BMC Evol Biol **5**: 44.
554. Wilke, C. O. and I. S. Novella (2003). "Phenotypic mixing and hiding may contribute to memory in viral quasispecies." BMC Microbiol **3**: 11.
555. Wilke, C. O., J. L. Wang, C. Ofria, R. E. Lenski and C. Adami (2001). "Evolution of digital organisms at high mutation rates leads to survival of the flattest." Nature **412**(6844): 331-333.
556. Will, C. L. and R. Luhrmann (2011). "Spliceosome structure and function." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(7).
557. Williams, W. E. and J. W. Drake (1977). "Mutator mutations in bacteriophage T4 gene 42 (dHMC hydroxymethylase)." Genetics **86**(3): 501-511.
558. Wilson, L., P. Gage and G. Ewart (2006). "Hexamethylene amiloride blocks E protein ion channels and inhibits coronavirus replication." Virology **353**(2): 294-306.
559. Wise, H. M., A. Foeglein, J. Sun, R. M. Dalton, S. Patel, W. Howard, E. C. Anderson, W. S. Barclay and P. Digard (2009). "A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA." J Virol **83**(16): 8021-8031.
560. Wise, H. M., E. C. Hutchinson, B. W. Jagger, A. D. Stuart, Z. H. Kang, N. Robb, L. M. Schwartzman, J. C. Kash, E. Fodor, A. E. Firth, J. R. Gog, J. K. Taubenberger and P. Digard (2012). "Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain." PLoS Pathog **8**(11): e1002998.
561. Wong, K. K., R. A. Bull, S. Rockman, G. Scott, S. Stelzer-Braid and W. Rawlinson (2011). "Correlation of polymerase replication fidelity with genetic evolution of influenza A/Fujian/411/02(H3N2) viruses." J Med Virol **83**(3): 510-516.
562. Worobey, M. and E. C. Holmes (1999). "Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses." J Gen Virol **80** (Pt 10): 2535-2543.
563. Wray, S. K., B. E. Gilbert and V. Knight (1985). "Effect of ribavirin triphosphate on primer generation and elongation during influenza virus transcription in vitro." Antiviral Res **5**(1): 39-48.
564. Wray, S. K., B. E. Gilbert, M. W. Noall and V. Knight (1985). "Mode of action of ribavirin: effect of nucleotide pool alterations on influenza virus ribonucleoprotein synthesis." Antiviral Res **5**(1): 29-37.
565. Wright, S. (1931). "Evolution in Mendelian Populations." Genetics **16**(2): 97-159.
566. Wu, H., X. Peng, X. Peng and N. Wu (2016). "Amino acid substitutions involved in the adaptation of a novel highly pathogenic H5N2 avian influenza virus in mice." Virology **13**(1): 159.
567. Wu, R., H. Zhang, K. Yang, W. Liang, Z. Xiong, Z. Liu, X. Yang, H. Shao, X. Zheng, M. Chen and D. Xu (2009). "Multiple amino acid substitutions are involved in the adaptation of H9N2 avian influenza virus to mice." Vet Microbiol **138**(1-2): 85-91.
568. Xiao, Y., I. M. Rouzine, S. Bianco, A. Acevedo, E. F. Goldstein, M. Farkov, L. Brodsky and R. Andino (2016). "RNA Recombination Enhances Adaptability and Is Required for Virus Spread and Virulence." Cell Host Microbe **19**(4): 493-503.

- 569.** Yamada, S., M. Hatta, B. L. Staker, S. Watanabe, M. Imai, K. Shinya, Y. Sakai-Tagawa, M. Ito, M. Ozawa, T. Watanabe, S. Sakabe, C. Li, J. H. Kim, P. J. Myler, I. Phan, A. Raymond, E. Smith, R. Stacy, C. A. Nidom, S. M. Lank, R. W. Wiseman, B. N. Bimber, D. H. O'Connor, G. Neumann, L. J. Stewart and Y. Kawaoka (2010). "Biological and structural characterization of a host-adapting amino acid in influenza virus." *PLoS Pathog* **6**(8): e1001034.
- 570.** Yamanaka, K., A. Ishihama and K. Nagata (1990). "Reconstitution of influenza virus RNA-nucleoprotein complexes structurally resembling native viral ribonucleoprotein cores." *J Biol Chem* **265**(19): 11151-11155.
- 571.** Yamayoshi, S., M. Watanabe, H. Goto and Y. Kawaoka (2015). "Identification of a Novel Viral Protein Expressed from the PB2 Segment of Influenza A Virus." *J Virol* **90**(1): 444-456.
- 572.** Ye, Q., R. M. Krug and Y. J. Tao (2006). "The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA." *Nature* **444**(7122): 1078-1082.
- 573.** York, A. and E. Fodor (2013). "Biogenesis, assembly, and export of viral messenger ribonucleoproteins in the influenza A virus infected cell." *RNA Biol* **10**(8): 1274-1282.
- 574.** York, A., N. Hengrung, F. T. Vreede, J. T. Huiskonen and E. Fodor (2013). "Isolation and characterization of the positive-sense replicative intermediate of a negative-strand RNA virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(45): E4238-4245.
- 575.** York, A., E. C. Hutchinson and E. Fodor (2014). "Interactome analysis of the influenza a virus transcription/replication machinery identifies protein phosphatase 6 as a cellular factor required for efficient virus replication." *J Virol* **88**(22): 13284-13299.
- 576.** Young, K. C., K. L. Lindsay, K. J. Lee, W. C. Liu, J. W. He, S. L. Milstein and M. M. Lai (2003). "Identification of a ribavirin-resistant NS5B mutation of hepatitis C virus during ribavirin monotherapy." *Hepatology* **38**(4): 869-878.
- 577.** Yu, Z., K. Cheng, W. Sun, X. Zhang, Y. Li, T. Wang, H. Wang, Q. Zhang, Y. Xin, L. Xue, K. Zhang, J. Huang, S. Yang, C. Qin, P. R. Wilker, D. Yue, H. Chen, Y. Gao and X. Xia (2015). "A PB1 T296R substitution enhance polymerase activity and confer a virulent phenotype to a 2009 pandemic H1N1 influenza virus in mice." *Virology* **486**: 180-186.
- 578.** Yuan, P., M. Bartlam, Z. Lou, S. Chen, J. Zhou, X. He, Z. Lv, R. Ge, X. Li, T. Deng, E. Fodor, Z. Rao and Y. Liu (2009). "Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site." *Nature* **458**(7240): 909-913.
- 579.** Yuste, E., A. V. Borderia, E. Domingo and C. Lopez-Galindez (2005). "Few mutations in the 5' leader region mediate fitness recovery of debilitated human immunodeficiency type 1 viruses." *J Virol* **79**(9): 5421-5427.
- 580.** Yuste, E., S. Sanchez-Palomino, C. Casado, E. Domingo and C. Lopez-Galindez (1999). "Drastic fitness loss in human immunodeficiency virus type 1 upon serial bottleneck events." *J Virol* **73**(4): 2745-2751.
- 581.** Zeng, J., H. Wang, X. Xie, C. Li, G. Zhou, D. Yang and L. Yu (2014). "Ribavirin-resistant variants of foot-and-mouth disease virus: the effect of restricted quasispecies diversity on viral virulence." *J Virol* **88**(8): 4008-4020.
- 582.** Zeng, J., H. Wang, X. Xie, D. Yang, G. Zhou and L. Yu (2013). "An increased replication fidelity mutant of foot-and-mouth disease virus retains fitness in vitro and virulence in vivo." *Antiviral Res* **100**(1): 1-7.
- 583.** Zhang, H., B. Yang, R. J. Pomerantz, C. Zhang, S. C. Arunachalam and L. Gao (2003). "The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA." *Nature* **424**(6944): 94-98.
- 584.** Zhang, Z., S. Hu, Z. Li, X. Wang, M. Liu, Z. Guo, S. Li, Y. Xiao, D. Bi and H. Jin (2011). "Multiple amino acid substitutions involved in enhanced pathogenicity of LPAI H9N2 in mice." *Infect Genet Evol* **11**(7): 1790-1797.
- 585.** Zheng, W. and Y. J. Tao (2013). "Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex." *FEBS Lett* **587**(8): 1206-1214.
- 586.** Zhou, B., Y. Li, R. Halpin, E. Hine, D. J. Spiro and D. E. Wentworth (2011). "PB2 residue 158 is a pathogenic determinant of pandemic H1N1 and H5 influenza a viruses in mice." *J Virol* **85**(1): 357-365.

- 587.** Zhou, B., M. B. Pearce, Y. Li, J. Wang, R. J. Mason, T. M. Tumpey and D. E. Wentworth (2013). "Asparagine substitution at PB2 residue 701 enhances the replication, pathogenicity, and transmission of the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus." *PLoS One* **8**(6): e67616.
- 588.** Zhou, N. N., D. A. Senne, J. S. Landgraf, S. L. Swenson, G. Erickson, K. Rossow, L. Liu, K. Yoon, S. Krauss and R. G. Webster (1999). "Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs." *J Virol* **73**(10): 8851-8856.
- 589.** Zhou, S., R. Liu, B. M. Baroudy, B. A. Malcolm and G. R. Reyes (2003). "The effect of ribavirin and IMPDH inhibitors on hepatitis C virus subgenomic replicon RNA." *Virology* **310**(2): 333-342.
- 590.** Zhu, H., T. T. Lam, D. K. Smith and Y. Guan (2016). "Emergence and development of H7N9 influenza viruses in China." *Curr Opin Virol* **16**: 106-113.
- 591.** Zhu, W., Y. Zhu, K. Qin, Z. Yu, R. Gao, H. Yu, J. Zhou and Y. Shu (2012). "Mutations in polymerase genes enhanced the virulence of 2009 pandemic H1N1 influenza virus in mice." *PLoS One* **7**(3): e33383.
- 592.** Zwart, M. P. and S. F. Elena (2015). "Matters of Size: Genetic Bottlenecks in Virus Infection and Their Potential Impact on Evolution." *Annu Rev Virol* **2**(1): 161-179.