

Université du Québec
INRS- Institut Armand-Frappier

**Évaluation de l'utilisation de la protéine M1 recombinante dans
le diagnostic sérologique de l'influenza porcine**

par
Annie Poirier

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Présidente du jury
et examinateur interne

Suzanne Lemieux INRS-
Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Ali Ahmad
Université de Montréal

Directeur de recherche

D.Jit.S. Arora, INRS
Institut Armand-Frappier

Résumé

L'influenza A est un des principaux agents impliqués dans les affections respiratoires touchant le porc. Au Québec, plusieurs variants d'influenza A dont la souche A/Sw/Québec/5393/91 (SwQc91), ont été associés à la pneumonie proliférative et nécrosante responsable d'un haut taux de mortalité chez les porcelets. Par conséquent, en industrie porcine, les pertes économiques associées à l'influenza sont considérables. Afin de connaître et de circonscrire rapidement les foyers d'infection virale plusieurs mesures prophylactiques ont été employées telles que les tests diagnostiques.

Cette étude propose un test permettant le diagnostic sérologique rapide de l'influenza A chez les porcs, par la mise en évidence des anticorps spécifiques à la protéine membranaire interne (M1). Le test développé utilise la protéine M1 recombinante (M1r) exprimée à l'aide d'un système procaryote. Ainsi, l'ARN viral codant la protéine M1 de la souche influenza porcine SwQc91 a été extrait et amplifié en ADN complémentaire (ADNc) par réaction de transcriptase inverse et de polymérisation en chaîne (RT-PCR). Le fragment d'ADN a été cloné dans le vecteur d'expression procaryote pET21a(+) et l'expression des protéines a été induite avec 0,5 mM d'isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) chez les bactéries BL21(DE3) à 37 °C pendant 8 heures. Par la technique d'immunobuvardage, il a été démontré que la protéine M1r est antigénique puisqu'elle réagit avec un sérum de porc convalescent. De plus, des anticorps sont produits contre la protéine M1r lorsqu'elle est administrée aux souris de façon intrapéritonéale.

Avec la protéine M1r purifiée, un test ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) indirect (ELISA-M1r) a été développé pour la détection d'IgG spécifiques à l'influenza de type A dans des sérums de porc. La sensibilité du test ELISA-M1r a été évaluée, à l'aide de sérums de porc et du test sérologique de référence, le test d'inhibition d'hémagglutination (IHA). Ainsi, des anticorps spécifiques à la protéine M1 ont été détectés chez 23 des 30 sérums de porc provenant d'une ferme. Pour fin de comparaison, le test IHA a détecté des anticorps spécifiques à l'hémagglutinine chez 18 des 30 sérums

testés. Les résultats du test ELISA-M1r sont convaincants, l'utilisation de la protéine M1r comme antigène permet la détection des anticorps spécifiques à l'influenza A chez les sérums de porc. Le test ELISA-M1r est rapide, facile à réaliser, peu dispendieux et les résultats suggèrent qu'il pourrait représenter un bon outil de dépistage dans les enquêtes sérologiques chez les populations porcines.

Table des matières

Résumé.....	ii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures	x
Liste des abréviations.....	xii
Liste des acides aminés (aa) et de leurs abréviations	xvi
Remerciements.....	xviii
Introduction.....	1
1 Revue bibliographique	4
1.1 Virus influenza.....	4
1.1.1 Classification.....	4
1.1.2 Organisation génomique	4
1.1.3 Protéines de l'enveloppe	5
1.1.3.1 Glycoprotéines	5
1.1.3.2 L'hémagglutinine	5
1.1.3.3 La neuraminidase	7
1.1.3.4 Protéine M2.....	8
1.1.4 Protéines internes	9
1.1.4.1 Les polymérase virales	10
1.1.4.2 La nucléoprotéine.....	10
1.1.4.3 La protéine M1	11
1.1.4.4 Les protéines NS1 et NS2	13
1.1.5 Cycle de réplication virale	16
1.1.5.1 Entrée du virus dans la cellule	16
1.1.5.2 Synthèse d'ARN messager et réplication de l'ARN viral.....	16
1.1.5.3 Régulation de l'expression des gènes viraux dans la cellule infectée.....	17

1.1.5.4	Assemblage et bourgeonnement viral	17
1.1.6	Mécanismes des variations antigéniques du virus influenza.....	19
1.1.6.1	Cassure antigénique	19
1.1.6.2	Glissement antigénique	19
1.1.6.3	Recombinaison entre les gènes	20
1.1.7	Déterminants moléculaires de l'infection et pathogenèse.....	20
1.2	Influenza et le porc.....	22
1.2.1	Épidémiologie	22
1.2.2	Le rôle du porc dans le réassortiment génétique.....	23
1.3	Pathogénie des infections associées à l'influenza porcin.....	24
1.3.1	Réponse immunitaire au virus influenza porcin.....	25
1.3.2	Prophylaxie	26
1.3.3	Tests diagnostiques de l'influenza porcin.....	27
1.3.3.1	Détection du virus, des protéines virales et des acides nucléiques	27
1.3.3.2	Détection des anticorps anti-influenza	28
1.4	Antigènes	31
1.4.1	Protéines virales	31
1.4.2	Protéines recombinantes	31
1.5	Objectifs du projet de recherche	33
2	MATERIEL ET MÉTHODES.....	35
2.1	Virus.....	35
2.1.1	Souches virales.....	35
2.1.2	Production et purification de la souche virale SwQc91	35
2.1.2.1	Production	35
2.1.2.2	Purification.....	36
2.1.2.3	Étape de concentration	36
2.1.2.4	Étape de purification	36
2.1.3	Titre hémagglutinant	37

2.1.4	Dosage protéique.....	37
2.1.5	Analyse par SDS-PAGE de la souche virale SwQc91.....	38
2.2	Purification de la protéine M1 virale	39
2.2.1	Électrophorèse et conditions électrophorétiques.....	39
2.2.2	Électroélution	40
2.2.3	Dialyse	40
2.3	Extraction des acides ribonucléiques viraux	41
2.4	Synthèse et amplification de l'ADNc codant la protéine M1 (gène M)	42
2.4.1	Amorces oligonucléotidiques.....	42
2.4.2	Synthèse de l'ADNc simple brin.....	42
2.4.3	Amplification de l'ADNc.....	43
2.5	Clonage et séquençage du gène M dans le vecteur pCR2.1.....	44
2.5.1	Clonage du gène M dans le vecteur pCR2.1	44
2.5.1.1	Purification des produits d'amplification.....	44
2.5.1.2	Ligation	45
2.5.1.3	Transformation des bactéries Top 10.....	45
2.5.1.4	Sélection des clones positifs	47
2.5.2	Séquençage.....	48
2.6	Sous-clonage du gène M dans le vecteur d'expression pET21a(+).....	49
2.6.1	Préparation du vecteur d'expression et du gène M.....	49
2.6.2	Clonage du gène M dans le vecteur pET21a(+).....	51
2.6.3	Transformation des bactéries <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	51
2.7	Expression de la protéine M1 recombinante.....	52
2.7.1	Criblage des colonies exprimant la protéine M1 recombinante.....	52
2.7.2	Analyse des niveaux d'expression de la protéine M1 recombinante	53
2.7.3	Analyse de la solubilisation de la protéine M1 recombinante	54
2.7.4	Production de la protéine M1 recombinante	54
2.7.5	Purification de la protéine M1 recombinante.....	55

2.8	Évaluation de l'antigénicité de la protéine M1 recombinante	55
2.8.1	Transfert électrophorétique	55
2.8.2	Immunobuvardage	57
2.9	Évaluation de l'immunogénicité de la protéine M1 recombinante	58
2.9.1	Immunsation	58
2.9.2	Test ELISA indirect	58
2.10	Utilisation de la protéine M1 recombinante dans un test sérologique diagnostique de l'influenza porcin	60
2.10.1	Sérums de porcs	60
2.10.2	Test ELISA indirect avec la protéine M1 recombinante (ELISA-M1r)	60
2.10.3	Test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA)	62
2.10.3.1	Inactivation des inhibiteurs non spécifiques des sérums	62
2.10.3.2	Description du test d'inhibition de l'hémagglutination	62
2.10.4	Test ELISA avec la protéine M1 virale	63
3	Résultats	64
3.1	Souche virale SwQc91	64
3.1.1	Purification de la souche virale	64
3.1.1.1	Analyse par SDS-PAGE de la suspension virale purifiée	64
3.2	Analyse de la pureté de la protéine M1 virale	64
3.3	Extraction de l'ARN viral, transcription inverse et amplification par polymérisation en chaîne de l'ADNc	66
3.4	Clonage du gène M dans le vecteur pCR 2.1	66
3.5	Comparaison des séquences en nucléotides et en acides aminés	70
3.6	Sélection des colonies exprimant la protéine M1 recombinante	76
3.7	Étude des niveaux d'expression de la protéine M1 recombinante	76
3.8	Solubilisation de la protéine M1 recombinante	81
3.9	Production et purification de la protéine M1 recombinante	81

3.10 Réactivité antigénique de la protéine M1 recombinante avec un sérum de porc immun.	84
3.11 Évaluation de l'immunogénicité de la protéine M1 recombinante	84
3.12 Test ELISA indirect avec la protéine M1 recombinante.....	87
3.12.1 Comparaison du test ELISA-M1r avec le test IHA pour la détection d'anticorps spécifiques à l'influenza A.....	87
3.12.2 Réactivité des sérums de porcs avec la protéine M1 virale	90
4 Discussion	92
Conclusion	100
Bibliographie.....	102
Appendice	I
Appendice I. Préparation des tampons et des solutions.....	I
Appendice II. Méthodes de quantification.....	XIII

Liste des tableaux

Tableau 1 Détection des anticorps anti-influenza dans des sérums de porc par les tests IHA et ELISA-M1r	88
Tableau 2 Analyse comparée de la réactivité des sérums de porcs dans les tests ELISA utilisant comme antigène la protéine M1 recombinante ou M1 virale.....	91

Liste des figures

Figure 1 Représentation schématique de la structure du virus influenza A. Adapté de Lamb et Krug (1996).....	6
Figure 2 Clonage du gène M de la souche influenza SwQc91 dans le plasmide pCR2.1. D'après la représentation schématique de la compagnie Invitrogen (2002).....	46
Figure 3 Sous-clonage du gène M de la souche influenza SwQc91 dans le vecteur d'expression pET21a(+). D'après la représentation schématique de la compagnie Novagen (2002).....	50
Figure 4 Analyse par SDS-PAGE du profil polypeptidique de la souche virale SwQc91 purifiée.	65
Figure 5 Analyse par SDS-PAGE de la pureté de la protéine M1 virale.....	67
Figure 6 Électrophorèse en gel d'agarose du fragment d'ADNc correspondant au gène de la matrice de la souche virale porcine SwQc91 produit par RT-PCR	68
Figure 7 Électrophorèse en gel d'agarose des plasmides recombinants pCR2.1-M extraits de colonies recombinantes Top 10 après digestion avec l'enzyme de restriction EcoR1. 69	
Figure 8 Comparaison de la séquence nucléotidique de l'insertion d'ADNc du gène M de la souche virale SwQc91 extrait d'une colonie recombinante avec la séquence de référence.....	71
Figure 9 Comparaison de la séquence en aa de la protéine M1 de la souche virale SwQc91 obtenue, avec la séquence de référence.....	74
Figure 10 Profil électrophorétique de lysats de bactéries compétentes BL21(DE3) transformée avec le plasmide pET21(a+)-M exprimant la protéine M1 recombinante 77	
Figure 11 Effet des variations de la température, du temps d'incubation et de la concentration d'IPTG sur l'expression de la protéine M1 recombinante par des bactéries compétentes BL21(DE3).	78
Figure 12 Effet de la sonication de lysats de bactéries BL21(DE3) exprimant la protéine M1 recombinante.....	82
Figure 13 Analyse par SDS-PAGE de la pureté de la protéine M1 recombinante.	83

Figure 14 Réactivité antigénique de la protéine M1 recombinante avec un sérum de porc polyclonal anti-SwQc91.....	85
Figure 15 Courbe d'absorbance de la réactivité des sérums immuns de souris contre la protéine M1 de la souche SwQc91.	86

Liste des abréviations

α	Alpha
A	Base déoxyadénosine
Å	Angström
aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNc	Acide ribonucléique complémentaire
ARNds	Acide ribonucléique double brin
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNv	Acide ribonucléique viral
ATP	Adénosine triphosphate
β	Bêta
BCA	Acide bicinchoninique
BSA	Albumine sérique bovine
C	Base déoxycytosine
°C	Degré Celcius
C7	Colonie bactérienne no 7
cc	Centimètre cube
cm	Centimètre
DEPC	Diéthyl pyrocarbonate
dNTP	Déoxynucléotides triphosphate
DO	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acide éthylène diaminetétraacétique

ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ELISA-M1r	Test ELISA réalisé avec la protéine M1r comme antigène
G	Base déoxyguanidine
g	Gramme
x g	Force gravitationnelle
HA	Hémagglutinine
H ₂ O	Eau
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
IgG	Immunoglobuline gamma
IHA	Inhibition d'hémagglutination
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramme
LB	Milieu de culture Luria-Bertani composé de 1,0 % tryptone, 0,5 % extrait de levure et 1,0 % NaCl pH 7,0
Lbs/po2	Livre par pouce carré
M	Molaire
M1	Protéine de la matrice interne
M1r	Protéine M1 recombinante
M2	Protéine de la matrice externe
mg	Milligramme
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
Mr	Masse moléculaire
NA	Neuraminidase

ng	Nanogramme
NI	Inhibition de la neuraminidase
nm	Nanomètre
NP	Nucléoprotéine
NS	Protéine non-structurale
OPD	Hypochlorure d'orthophénylène diamine
PA	Polymérase acide
pb	Taille du fragment nucléique en paire de base
PB1	Polymérase basique 1
PB2	Polymérase basique 2
PBS	Solution saline phosphatée
PCR	Réaction en chaîne de la polymérase
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride
pmol	Picomole
PPN	Pneumonie proliférative et nécrosante
p/p	Poids par poids
p/v	Poids par volume
Rf	Mobilité relative
RDE	Enzyme destructeur de récepteurs
RNPv	Ribonucléoprotéine virale
RPM	Rotation par minute
RT	Transcription inverse
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
SOC	Milieu de culture 2 % tryptone, 0,5 % extrait de levure, 0,05 % NaCl, 10mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , et 20 mM glucose
STET	Solution 8 % sucrose, 5 % Triton X-100, 50mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

SwQc81	A/Swine/Québec/192/81
SwQc91	A/Swine/Québec/5393/91
T	Base déoxythymidine
TP	Température de la pièce (22°C)
TAE	Solution 0,04M Tris-acétate, 1mM EDTA, pH 8,0
TBS	Tampon 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5
TNF	Tumor necrosis factor
U	Unité
UHA/ml	Unité hémagglutinante par millilitre
µg	Microgramme
µl	Microlitre
µM	Micromolaire
UV	Ultraviolet
V	Volt
v/v	Volume par volume
X-Gal	Bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside
4CN	Substrat 4-chloro-1-naphtol

Liste des acides aminés (aa) et de leurs abréviations

Acides aminés	Abréviations	
Alanine	Ala	A
Cystéine	Cys	C
Acide aspartique	Asp	D
Acide glutamique	Glu	E
Phénylalanine	Phe	F
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Lysine	Lys	K
Leucine	Leu	L
Méthionine	Met	M
Asparagine	Asn	N
Proline	Pro	P
Glutamine	Gln	Q
Arginine	Arg	R
Serine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Valine	Val	V
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y

À mes parents

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, le docteur Jit Arora de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir conseillée tout au long de ce projet de maîtrise. J'aimerais également adresser mes remerciements au CORPAQ pour le soutien financier apporté au cours des mes travaux de maîtrise. De plus, je remercie particulièrement Hugues Langlois, mes parents, mon frère ainsi que ma collègue Fabienne Bellessort qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de mes études graduées.

Introduction

Le virus influenza de type A responsable d'une maladie des voies respiratoires très contagieuse affecte notamment les hommes, les porcs et les espèces aviaires (Webster *et al.*, 1992). Ce virus est difficile à maîtriser en raison de sa grande variabilité antigénique qui lui permet d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Ces variations peuvent se traduire par des variations mineures de la séquence des protéines de surface (glissement antigénique) ou par des réassortiments génétiques entre les virus de même type (cassure antigénique) (Webster *et al.*, 1982; Kilbourne, 1987). La cassure antigénique souvent à l'origine des pandémies, survient généralement tous les 10 ou 20 ans.

En Amérique du Nord, les porcs sont affectés par les virus influenza A H1N1 et H3N2 (Hinshaw *et al.*, 1978; Bikour *et al.*, 1994, 1995). Le sous-type H1N1 est responsable d'épidémies sévères de grippe chez les porcs (Chambers *et al.*, 1991). La mortalité engendrée par la grippe est généralement faible, par contre le taux de morbidité peut atteindre 100 %. Par conséquent, l'infection par l'influenza A chez cette espèce est responsable de pertes de revenus considérables pour les producteurs de porc, occasionnées principalement par des retards de croissance et des coûts associés aux soins vétérinaires (Easterday, communication non-publiée).

Certains faits révèlent la présence d'autres variants et sous-types affectant le porc car celui-ci est reconnu comme un hôte intermédiaire permettant le réassortiment entre les virus influenza A d'origine humaine et aviaire (Scholtissek *et al.*, 1985; Scholtissek et Naylor, 1988; Webster *et al.*, 1992). Ces variants peuvent se transmettre à l'homme (Hinshaw *et al.*, 1978; Dacso *et al.*, 1984; Wentworth, Mc Gregor et Macklin, 1997) et dans certains cas peuvent causer la mort des personnes infectées (Eason et Sage, 1980; Patriarca *et al.*, 1984; Rota *et al.*, 1989; Wentworth *et al.*, 1994; Kimura, Adlakha et Simon, 1998). Il est à noter que la majorité des pandémies d'influenza chez l'homme ont été causées par des

virus issus d'un réassortiment entre des souches d'origine humaine et aviaire (Webster *et al.*, 1992).

Malgré le fait que plusieurs études ont démontré la grande stabilité antigénique du virus porcine H1N1 en Amérique du Nord (Sheerar, Easterday et Hinshaw, 1989; Luoh, McGregor et Hinshaw, 1992; Bikour *et al.*, 1995), la présence de variants antigéniques H1N1 a été mise en évidence, telle que la souche SwQc91 retrouvée au Québec. Cette souche, distincte des souches porcines classiques de références (Dea *et al.*, 1992b; Rekik, Arora et Dea, 1994; Arora, N'Diaye et Dea, 1997a; Arora *et al.*, 1997b), cause la pneumonie proliférative et nécrosante (PPN) (Morin, Girard et Elazhary, 1990; Dea *et al.*, 1992a; Girard, Morin et Elazhary, 1992). Cette maladie très contagieuse a des conséquences beaucoup plus sérieuses que la grippe car elle est responsable d'un haut taux de mortalité chez les porcelets.

Depuis l'isolement de la souche SwQc91, d'autres variants du virus influenza A H1N1 ont été retrouvés au Québec (Bikour *et al.*, 1995; Arora, N'Diaye et Dea, 1997a), de même qu'une souche de type H3N2 causant la PPN chez les porcs (Bikour *et al.*, 1994). Considérant l'apparition de nouveaux variants ayant des conséquences graves pour le cheptel porcine certaines mesures ont été prises. Dans le but de dépister le virus SwQc91 les travaux de N'Diaye (1995) et Retamal (1999) réalisés dans le laboratoire du Dr Arora ont permis respectivement la production d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'HA utilisé dans un test ELISA de compétition (Arora, N'Diaye et Dea, 1997a) et un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine NA. De plus, les laboratoires de dépistage des infections virales utilisent maintenant des souches influenza H1N1 typiques et atypiques afin de réaliser le test sérologique IHA. Par contre, le test IHA couramment utilisé en laboratoire, présente plusieurs désavantages. En effet, ce test nécessite la culture de virus dans les oeufs embryonnés de poulet, une méthode de culture laborieuse et coûteuse qui peut également affecter les propriétés biologiques et antigéniques de l'HA (Robertson *et al.*, 1987; Katz et Webster, 1989; Wood *et al.*, 1989). D'autre part, la purification du virus à

partir du liquide allantoïque infecté constitue une étape supplémentaire qui rend ce test davantage laborieux. De plus, le test IHA requiert une source continue d'érythrocytes et les sérums utilisés doivent être traités pour inactiver les inhibiteurs non-spécifiques de l'hémagglutination. Finalement, comme le test mesure les anticorps contre l'HA, une protéine hautement variable, les virus doivent être renouvelés fréquemment. En fait, il faut réaliser un test IHA pour chacun des sous-types de virus.

Les tests ELISA qui mesurent des anticorps spécifiques à l'influenza sont généralement plus sensibles que le test IHA (Turner *et al.*, 1982; Madore, Reichman et Dolin, 1983; Julkunen, Pyhala et Hovi, 1985). D'autre part, des protéines recombinantes ont été utilisées avec succès comme antigène dans les tests ELISA servant à détecter les anticorps anti-influenza (Harmon *et al.*, 1989; Rota *et al.*, 1990; Havlickova *et al.*, 1992; Voeten *et al.*, 1998; Welman, 1999). Dans l'intention de faciliter le dépistage des anticorps anti-influenza la présente étude propose un test rapide, sensible, spécifique pour le sérotype A, peu coûteux, facile à exécuter et dont l'antigène est simple à produire. Un test ELISA utilisant la protéine M1r comme antigène pour la détection d'IgG spécifiques à l'influenza de type A chez des sérums de porc. Un test qui permet de détecter simultanément les différents sous-types d'influenza A grâce à l'utilisation de la protéine M1 qui est hautement conservée (Lamb, 1989).

Les objectifs de cette étude étaient : 1) De produire la protéine M1r de la souche influenza porcine SwQc91 à l'aide d'un système d'expression procaryote et de procéder à sa purification ; 2) D'évaluer l'immunogénicité et l'antigénicité de la protéine M1r ; 3) De mettre au point un test ELISA utilisant la protéine M1r comme antigène pour détecter les anticorps anti-influenza A chez les porcs.

1 Revue bibliographique

1.1 Virus influenza

1.1.1 Classification

L'influenza est un virus enveloppé à ARN simple brin membre de la famille des *Orthomyxoviridae*. Il en existe trois types : A, B et C, classés selon la nature de la nucléoprotéine (NP) et de la protéine de la matrice (M1) (Murphy et Webster, 1996). Selon les types de virus, le génome viral diffère. Les virus influenza de type A et B contiennent 8 différents segments d'ARN, alors que l'influenza de type C en contient 7. Ces 3 sérotypes codent des protéines virales similaires par des mécanismes distincts et certaines différences morphologiques permettent de distinguer l'influenza A et B de l'influenza C. Parmi ces types de virus, seul l'influenza de type A est divisé en sous-types selon les variations antigéniques de l'hémagglutinine (HA) et de la neuraminidase (NA), conséquence soit d'une cassure ou d'un glissement antigénique. En plus d'infecter le porc, l'influenza A est retrouvé chez plusieurs espèces aviaires et mammifères incluant l'homme et le cheval. Le porc est également infecté par le sérotype C en Asie (Guo *et al.*, 1983; Yamaoka *et al.*, 1991; Yuanji et Desselberger, 1984).

1.1.2 Organisation génomique

Les virus influenza de type A sont des particules enveloppées et pléomorphes variant entre 80 à 120 nm de diamètre. Ce type de virus contient 8 segments d'ARN simple brin de polarité négative (Figure 1). Les trois premiers segments codent respectivement les polymérase basiques 1 et 2 (PB1, PB2) et la polymérase acide (PA). Le segment 4 code l'HA, le segment 5 code la NP et le segment 6 code la NA. Le segment 7 code 2 protéines ; les protéines M1 et M2 alors que le segment 8 code la protéine non-structurale NS1 et la protéine NS2.

L'ensemble formé des segments d'ARN, de la NP ainsi que des polymérase ARN-dépendantes (PB1, PB2 et PA) se nomme complexe ribonucléoprotéique (RNPv). Le RNPv, la NS2 et la protéine M1 se situent à l'intérieur de l'enveloppe lipidique qui supporte un canal protéique nommé M2, ainsi que 2 glycoprotéines; l'HA et la NA qui forme des spicules de 10-14 nm de diamètre (environ 500 par virion) (Figure 1).

1.1.3 Protéines de l'enveloppe

1.1.3.1 Glycoprotéines

Les glycoprotéines HA et NA permettent de classer l'influenza A en sous-types. Jusqu'à maintenant on a identifié 15 sous-types de HA et 9 sous-types de NA (Colman, 1989, Lamb, 1989). La présence des différents sous-types s'explique par des variations qui se produisent fréquemment au niveau des sites antigéniques de l'HA et de la NA permettant au virus d'échapper au système immunitaire de l'hôte (Wiley et Skehel, 1987). À cause de leur localisation à la surface du virus, l'HA et la NA sont ciblées par le système immunitaire qui induit la production d'anticorps neutralisants dans le cas de l'HA (Wilson et Cox, 1990).

1.1.3.2 L'hémagglutinine

La protéine HA composée de 562 à 566 aa est présente à la surface du virus sous forme de trimère, de 225 kDa composé de trois monomères liés de façon non-covalente, formés chacun de deux segments polypeptidiques, désignés HA₁ et HA₂ (Wiley et Skehel, 1977; Wilson, Skehel et Wiley, 1981). La sous-unité HA₁ est responsable de l'attachement du virus à la cellule par sa liaison aux résidus d'acides sialiques des récepteurs cellulaires via un site localisé à son extrémité distale (Sauter *et al.*, 1998). Ce site de liaison formé de la séquence Tyr-98, Trp-153, His-183, Glu-190, Leu-194 est conservé parmi les différents sous-types (Wilson, Skehel et Wiley, 1981; Wharton *et al.*, 1989; Skehel et Wiley, 2000).

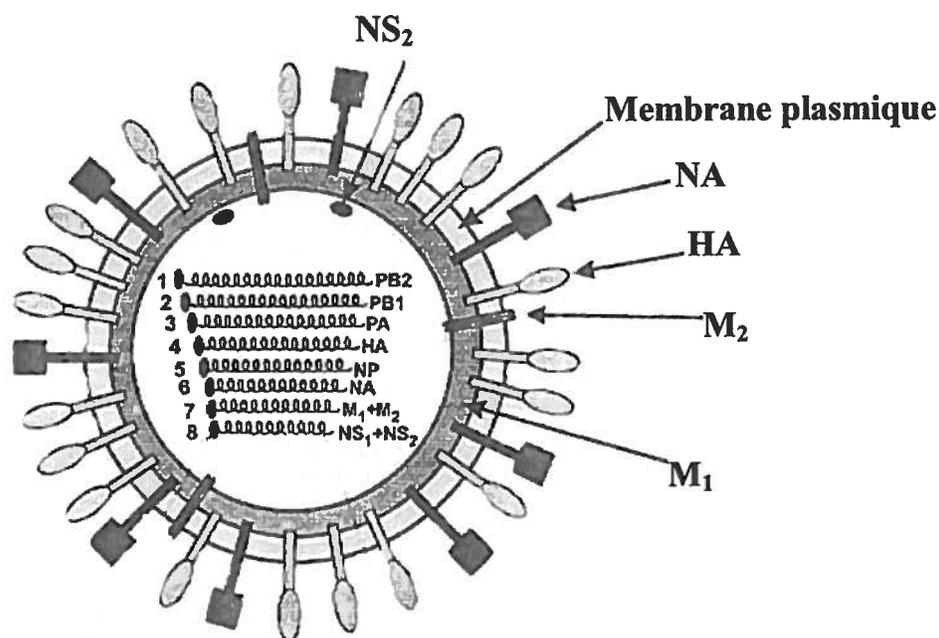


Figure 1 Représentation schématique de la structure du virus influenza A. Adapté de Lamb et Krug (1996).

Le virus influenza est composé de huit segments d'ARN de polarité négative qui forment le complexe ribonucléoprotéique (RNPv), lorsqu'ils sont associés à la nucléoprotéine (NP) et aux polymérases ARN-dépendantes (PB1, PB2 et PA). À la surface du virus sont retrouvées trois types de protéines membranaires soit l'hémagglutinine (HA), la neuraminidase (NA) et la protéine M₂. Sous la membrane lipidique se trouve la protéine M₁. La protéine non-structurale NS1 n'est retrouvée que dans la cellule infectée alors que la protéine NS2 autrefois qualifiée de protéine non-structurale, est présente à l'intérieur du virus.

La protéine HA joue un rôle critique dans l'entrée du virus dans la cellule hôte, à cause de son attachement à la membrane cellulaire mais également (Stegmann et Helenius, 1993) parce qu'elle est responsable de fusion des membranes virales et endosomales (Martin *et al.*, 1981). Le pH acide (5,0-6,0) de la membrane endosomale, induit un changement conformationnel irréversible dans la sous-unité HA₂ qui expose une séquence conservée de 20 acides aminés (peptide de fusion) à son extrémité amino-terminale qui facilite la fusion membranaire (Gething *et al.*, 1986; Durrer *et al.*, 1996). Ceci implique que le clivage du précurseur HA₀ en deux sous-unités (HA₁, HA₂) est nécessaire pour l'infection des cellules (Lamb, 1983).

Par sa propriété à agglutiner les globules rouges dans un test d'inhibition d'hémagglutination (Hirst, 1942), l'HA permet de différencier les 15 sous-types et de classer les virus influenza A en sous-types. Chez le porc, une inhibition d'hémagglutination avec un titre de 1/40 est suffisante pour empêcher une réplication du virus influenza de type H1N1 (Haesebrouck et Pensaert, 1986).

1.1.3.3 La neuraminidase

La neuraminidase (NA), une glycoprotéine de surface du virus est composée de 453 aa. Cette protéine est formée d'une queue cytoplasmique de 6 aa, un domaine transmembranaire et une tige dont l'extrémité supérieure est active enzymatiquement (Air et Laver, 1989). La NA est ancrée dans la membrane sous forme d'un homotétramère d'une masse de 220 kDa. Plusieurs hypothèses ont été proposées concernant le rôle de la NA dans le cycle de réplication virale. Certaines études ont démontré qu'elle permettrait de libérer les virions de la cellule hôte et préviendrait l'agrégation de ceux-ci à la surface cellulaire (Compans, Dimmock et Meier-Ewert, 1969; Palese *et al.*, 1974; Griffin, Basak, et Compans 1983; Liu *et al.*, 1995), par le clivage du lien α -cétosidique entre l'acide sialique terminal et le D-galactose ou D-galactosamine adjacents (Gottschalk, 1957). Également, la protéine

NA abaisserait la viscosité du mucus de la trachée respiratoire afin de permettre aux virus d'atteindre plus facilement les cellules cibles épithéliales (Huang *et al.*, 1980a). De plus, cette glycoprotéine aurait une activité hémagglutinante. En effet, certaines études ont démontré que chez les NA aviaires (N1-3, N5-9) un site de liaison provoque l'hémagglutination, par contre le rôle de ce récepteur est peu défini (Laver *et al.*, 1984; Hausmann *et al.*, 1995; Kobasa *et al.*, 1997). D'autre part, il semble qu'elle serait aussi nécessaire à la fusion membranaire (Huang *et al.*, 1980b). Finalement, malgré le fait que les anticorps produits contre la NA ne sont pas neutralisants, l'addition d'anticorps monoclonaux anti-NA au milieu de culture a pour effet de réduire les plages de lyse qui se forment lors d'une répllication virale dans les cellules (Kilbourne *et al.*, 1968).

1.1.3.4 Protéine M2

La protéine M2 est codée par le segment 7 suite à un épissage, elle est constituée de 97 aa et présente une masse de 14 kDa. Cette protéine fait partie intégrante de la membrane lipidique du virus (Lamb, Zebedee et Richardson, 1985; Zebedee, Richardson et Lamb, 1985; Zebedee et Lamb, 1988). Elle est ancrée dans la membrane sous forme d'un homotétramère composé de deux dimères liés par des ponts disulfures associés par des interactions non-covalentes (Holsinger et lamb, 1991; Sugrue et Hay, 1991; Sakaguchi *et al.*, 1997; Bauer *et al.*, 1999). La séquence et la longueur de la queue cytoplasmique ainsi que la partie extracellulaire de la protéine M2 sont hautement conservées parmi les virus influenza A, (Zebedee et Lamb, 1989; Ito *et al.*, 1991). D'autre part, trois sites antigéniques reconnus par les anticorps ont été identifiés dans la protéine M2 (Slepuskin *et al.*, 1995).

Les études les plus récentes lui attribuent une activité de canal ionique activé par l'environnement acide des endosomes après l'entrée du virus dans la cellule (Hay, 1992; Pinto, Holsinger et Lamb, 1992). Ce canal est hautement spécifique pour l'entrée d'ions H⁺ à l'intérieur du virus, permettant sa décapsidation. Cette étape est essentielle à l'entrée du génome à l'intérieur du noyau de la cellule hôte (Martin et Helenius, 1991b; Bron *et al.*,

1993; Chizhnikov *et al.*, 1996; Mould *et al.*, 2000). De plus, l'acidification causée par l'activité du canal M2 entraîne la dissociation des interactions protéines-protéines telles que celle du RNPv avec le polypeptide M1 (Hay, 1992; Helenius, 1992; Lamb, Holsinger et Pinto, 1994), ce qui permet la libération de ce complexe dans le cytoplasme (Matlin *et al.*, 1982). La modulation des pH par la protéine M2, permet de protéger l'hémagglutinine de la dénaturation durant le transport des glycoprotéines dans la cellule hôte avant l'assemblage viral (Takeuchi *et al.*, 1994).

La protéine M2 aurait également un rôle important dans la réplication virale, car les anticorps anti-M2 restreignent la dissémination du virus (Zebedee et Lamb, 1988) et inhibe sa réplication (Treanor *et al.*, 1990). D'autre part, des travaux récents ont démontré que la protéine M2 peut engendrer une immunité humorale. En effet, une immunité protectrice de longue durée chez la souris a été obtenue suite à l'injection de sa partie extracellulaire alors que l'injection la partie transmembranaire de la protéine M2 a permis de diminuer rapidement la charge virale (Frace *et al.*, 1999; Neiryneck *et al.*, 1999). De plus, une immunité protectrice contre l'influenza A induite par l'immunisation avec un plasmide contenant le gène M qui codent les protéines M1 et M2, chez la souris a été récemment démontrée (Okuda *et al.*, 2001). Considérant son importance dans l'infection virale, M2 est ciblée par certains médicaments anti-influenza tels que la rimantadine et l'amantadine (Hay, 1992; Lamb, Holsinger et Pinto, 1994; Chizhnikov *et al.*, 1996; Shimbo *et al.*, 1996).

1.1.4 Protéines internes

Contrairement aux protéines de l'enveloppe, les protéines internes semblent antigéniquement stables. En effet, les anticorps produits contre ces protéines ne sont pas neutralisants par conséquent, elles ne subissent pas de pression immunologique. Les deux protéines internes les plus importantes sont NP et M1 qui permettent de différencier les sérotypes A, B et C (De Boer, Black et Osterhaus, 1990; Murphy et Webster, 1996).

1.1.4.1 Les polymérases virales

Les segments 1, 2 et 3 codent respectivement les polymérases virales PB1 (M_r 96 kDa), PB2 (M_r 87 kDa) et PA (M_r 85 kDa) (Inglis *et al.*, 1976; Lamb et Choppin, 1976). Les segments 1 et 2 codent des protéines de 759 (PB2) et 757 acides aminés (aa) (PB1) alors que le segment 3 code une protéine de 716 aa, la protéine PA. Ces protéines forment un hétérotrimère qui présentent plusieurs rôles dans le cycle viral.

La protéine PB1 aurait un rôle de polymérase, car elle présente plusieurs motifs essentiels à la synthèse d'ARNv (Biswas et Nayak, 1994). De plus, il a été démontré que la protéine PB1 est requise dans les étapes d'initiation de la transcription et d'élongation de la chaîne de nucléotides (Braam, Ulmanen et Krug, 1983), ainsi que pour la réplication de l'ARNc ou l'ARNv. La protéine PB2 reconnaît et lie la coiffe à l'extrémité 5' des ARN messagers (ARNm) cellulaires (Ulmanen *et al.*, 1981; Blaas, Patzelt et Keuchler, 1982) et elle serait responsable du clivage des coiffes par une activité endonucléolytique, pour la synthèse des ARNm viraux (Licheng *et al.*, 1995; Blok *et al.*, 1996). Par contre, le rôle de PB2 dans la réplication de l'ARNc et l'ARNv n'est pas clairement établi (Nakagawa *et al.*, 1995; Perales et Ortin, 1997). Des observations génétiques suggèrent que la polymérase PA est impliquée dans la synthèse de l'ARNv (Mahy, 1983), mais son rôle dans ce processus est inconnu. Récemment, on a démontré un lien entre la réplication et l'induction de la protéolyse attribuable à la protéine PA (Perales *et al.*, 2000).

1.1.4.2 La nucléoprotéine

Le segment 5 code la nucléoprotéine (NP), une protéine de 498 aa (M_r 56 kDa), phosphorylée *in vivo* (Privalsky et Penhoet., 1978; Kistner *et al.*, 1985; Arrese et Portela., 1996). Elle est une des protéines les plus abondantes du virus influenza (Lamb, 1989) et elle supporte le RNPv (Pons *et al.*, 1969 ; Kingsbury *et al.*, 1987; Ruigrok et Baudin, 1995). L'extrémité amino-terminale de la protéine NP présente un domaine de liaison à l'ARN, divisé en deux régions situées au niveau des aa 1 à 77 et 79 à 180 (Kobayashi *et al.*,

1994; Albo, Valencia et Portela, 1995). Les liaisons de la NP à l'ARNv sont stimulées par des associations NP-NP et d'autres interactions NP-ARN (Yamanaka, Ishihama et Nagata, 1990). En plus de lier l'ARN, la NP est une protéine multifonctionnelle qui lie une variété de protéines virales et cellulaires, incluant elle-même (Pons *et al.*, 1969), les polymérases virales (Biswas, Boutz et Nayak, 1998), les importines cellulaires (O'Neill et Palese, 1995) et les filaments d'actine (Digard *et al.*, 1999).

Dans la cellule infectée, les protéines NP nouvellement synthétisées se dirigent au noyau via deux signaux de localisation nucléaire présents dans les régions des aa 1 à 38 (Neumann, Castrucci et Kawaoka, 1997; Wang, Palese et O'Neill, 1997) et 198 à 216 (Weber *et al.*, 1998). La région des aa 327 à 345 constituait jusqu'à tout récemment un 3^e signal de localisation nucléaire (Davey, Dimmock et Colman, 1985), mais selon Digard *et al.* (1999) elle serait un signal de rétention cytoplasmique. Dans le noyau, la protéine NP serait impliquée dans la synthèse de l'ARNv (Beaton et Krug, 1986), dans l'assemblage du complexe ribonucléoprotéique (Davey, Dimmock et Colman, 1985 ; Honda *et al.*, 1988 ; Krug *et al.*, 1989) et comme facteur d'antiterminaison lors de la synthèse d'ARNc (Shapiro et Krug, 1988). Finalement, cette protéine est une cible majeure des lymphocytes T cytotoxiques impliqués dans les réactions croisées (Yewdell et Hackett, 1989).

1.1.4.3 La protéine M1

La protéine M1 est l'une des protéines de structure les plus importantes du virus influenza (Bucher *et al.*, 1987). Elle est codée tout comme la protéine M2 par le segment 7 (gène M) (Allen *et al.*, 1980; Winter et Fields, 1980; Lamb et Lai, 1981; Hiebert, Williams et Lamb, 1986). Cette protéine formée de 252 aa (M_r 28 kDa) est un monomère (Arzt *et al.*, 2001) qui se présente sous forme d'un réseau de bâtonnets de 60 Å alignés dont une des deux extrémités prend contact avec la membrane (Wrigley, 1979 ; Ruigrok, Calder et Wharton, 1989; Ruigrok *et al.*, 2000). Une étude récente a démontré *in vitro*, que l'extrémité carboxy-terminale de la protéine M1 lie le RNPv (Baudin *et al.*, 2001). De plus,

la protéine M1 présente un signal de localisation nucléaire (Ye, Robinson et Wagner, 1995) et un motif en doigt de zinc (Wakefield et Brownlee, 1989).

La protéine M1 aurait un rôle indispensable dans le processus d'assemblage et de bourgeonnement viral. En effet, elle interagirait avec HA, NA et M2 ce qui permettrait un recrutement massif de ces protéines dans les particules virales, favorisant l'assemblage et le bourgeonnement du virus (Zhang et Lamb, 1996; Ali *et al.*, 2000; Latham et Galarza, 2001). D'ailleurs des études récentes, révèlent que l'expression de M1 entraîne le bourgeonnement et l'assemblage des virions (Gomez-Puertas *et al.*, 2000). Plusieurs observations permettent de croire que la protéine M1 participe à l'exportation du RNPv du noyau vers le cytosol. En effet, certains auteurs ont démontré que le RNPv n'est pas exporté lorsque la protéine M1 est absente (Martin et Helenius, 1991a), lorsque l'expression des gènes tardifs n'a pas lieu (Martin et Helenius, 1991a ; Whittaker, Bui et Helenius, 1996; Bui *et al.*, 2000) ou lorsqu'il y a présence d'anticorps anti-M1 (Martin et Helenius, 1991a).

Certains chercheurs affirment que la protéine M1 escorte le RNPv du noyau, à travers les pores nucléaires où elle serait nécessaire pour la libération du RNPv lié à la matrice nucléaire (Zhironov et Klenk, 1997). Une seconde possibilité est qu'en s'associant avec le RNPv dans le cytosol, M1 préviendrait la réimportation de celui-ci dans le noyau (Martin et Helenius 1991b; Whittaker, Bui et Helenius, 1996). Une hypothèse récente suggère que les protéines M1 et NS2 pénètrent dans le noyau et se lient au RNPv, puis l'interaction de NS2 avec le complexe des pores nucléaires permettrait l'exportation du complexe (O'Neill, Talon et Palese, 1998, Ye *et al.*, 1999). La protéine M1 joue également un rôle dans la régulation de la transcription. Il a été démontré *in vitro* qu'elle inhibe la transcription lorsqu'elle est ajoutée aux RNPv activement transcrits (Ye *et al.*, 1987; Ye, Baylor et Wagner, 1989; Watanabe *et al.*, 1996; Elster *et al.*, 1997). D'autre part, certaines études ont démontré que la protéine M1 inhibe les étapes de l'initiation et de la réinitiation

de la transcription de l'ARNv plus efficacement que l'étape d'élongation de la chaîne nucléotidique (Zvonarjev et Ghendon, 1980; Ye *et al.*, 1987).

Lors d'une infection par l'influenza, la protéine M1 est ciblée par le système immunitaire. En effet, lors d'une d'infection par le virus influenza A, des anticorps dirigés contre la protéine M1 sont produits (Cretescu, Beare et Schild, 1978; Khan *et al.*, 1982). De plus, des titres élevés d'anticorps spécifiques à la protéine M1 sont mesurés suite à une vaccination contre l'influenza (Khan *et al.*, 1982). Par contre, certaines études ont démontré que les anticorps dirigés contre M1 ne protègent pas contre une seconde infection par l'influenza (Oxford et Schild, 1976; Webster et Hinshaw, 1977; Johansson et Kilbourne, 1996). Toutefois, une diminution rapide de la charge virale chez des souris immunisées avec la protéine M1 a été observée (Webster et Hinshaw, 1977). D'autre part, comme la protéine M1 est conservée chez les différents sous-types d'influenza A, elle induit une réponse cytotoxique impliquée dans les réactions croisées (Braciale 1977; Braciale et Yap, 1978, Fleischer, Becht et Rott, 1985). De plus, il semble que les cellules T auxiliaires spécifiques aux protéines M1 ou NP peuvent stimuler les cellules B dans la production d'anticorps spécifiques à la protéine HA (Lamb *et al.*, 1982; Sherle et Gerhard, 1986; Lamb, McMichael et Rothbarb, 1987) pour ainsi augmenter la réponse humorale aux antigènes externes du virus.

1.1.4.4 Les protéines NS1 et NS2

Les protéines NS1 et NS2 sont codées par le segment 8. Ce segment comprend un cadre de lecture ouvert codant la protéine NS1 (Mr 26 kDa) composée de 202 à 237 aa selon le type de virus. La protéine NS2 ayant une masse de 14 kDa est codée par un ARNm de 350 nucléotides (Lamb, Etkind et Choppin, 1978; Inglis *et al.*, 1979; Lamb et Choppin, 1979; Inglis et Almond, 1980; Lamb *et al.*, 1980). Les protéines NS1 et NS2 partagent la région qui contient le codon d'initiation de la synthèse protéique. Par contre, la protéine

NS1 est directement codée par l'ARNm alors que l'ARNm qui code la protéine NS2 doit subir un épissage.

La protéine NS1 est qualifiée de protéine non-structurale, car elle n'a jamais été détectée dans le virion, malgré le fait qu'elle soit exprimée en grande quantité dans la cellule infectée (Lazarowitz, Compans et Choppin, 1975; Krug et Etkind, 1973). Au début de l'infection, la protéine NS1 s'accumule dans le noyau de la cellule, puis dans la phase tardive on la retrouve également dans le cytoplasme (Nieto *et al.*, 1992). Elle est associée aux polysomes (de la Luna *et al.*, 1995; Falcon *et al.*, 1999) et liée à plusieurs types d'ARN (Hatada et Fukuda, 1992; Park et Katze, 1995; Qiu et Krug, 1994; Qiu, Nemeroff et Krug, 1995; Hatada *et al.*, 1997; Marion *et al.*, 1997a). Cette protéine présente deux signaux de localisation nucléaire situés au niveau des aa 34 à 38 et 203 à 237, un domaine de liaison à l'ARN et un domaine effecteur (Greenspan, Palese, Krystal., 1988; Qian, Alonso-Caplen et Krug, 1994). Également, la protéine NS1 possède un signal d'exportation nucléaire situé entre les aa 138 et 147, une séquence riche en leucine (Gorlich et Mattaj, 1996). Sa liaison avec l'ARN double brin (ARNds) (Hatada et Fukuda., 1992) suggère qu'elle prévienne l'activation des défenses antivirales induites par l'interféron. En effet, elle empêcherait l'activation des protéines kinases ARNds dépendantes (Lu, Qian et Krug, 1994; Lu *et al.*, 1995; Tan et Katze, 1998) et inhiberait la voie du NF- κ B impliquée dans la réponse immunitaire de l'hôte (Wang *et al.*, 2000). De plus, la protéine NS1 présente de multiples fonctions dans le cycle viral dont l'inhibition de l'épissage des pré-ARNm (Fortes, Beloso et Ortin, 1994; Lu, Qian et Krug, 1994; Qiu, Nemeroff et Krug, 1995; Wang et Krug, 1998) et l'inhibition de la polyadénylation des l'ARNm cellulaires pour empêcher leur exportation nucléaire (Qian, Alonso-Caplen et Krug, 1994, Qiu et Krug 1994; Nemeroff *et al.*, 1998; Chen, Li et Krug, 1999). Elle stimulerait également la traduction des ARNm viraux (Aragon *et al.*, 2000; de la Luna *et al.*, 1995; Enami *et al.*, 1994; Enami et Enami, 2000) et régulerait la transcription et la réplication des ARNv (Shimizu *et al.*, 1994; Marion *et al.*, 1997b).

La protéine NS2, autrefois qualifiée de protéine non-structurale, est maintenant retrouvée dans le noyau (Greenspan *et al.*, 1985) et dans le cytoplasme des cellules infectées (Smith *et al.*, 1987) et au nombre de 130 à 200 molécules en moyenne par virion. Elle est associée à la protéine M1 (Richardson et Akkina, 1991; Yasuda *et al.*, 1993) et présente un signal d'exportation nucléaire, une séquence riche en leucine à l'extrémité amino-terminale, qui interagirait avec des exportines (O'Neill, Talon et Palese, 1998). La protéine NS2 aurait un rôle dans la régulation de la synthèse des ARNc (Bullido *et al.*, 2001). De plus, elle agirait comme une molécule adaptatrice qui permet la liaison du complexe M1-RNPv avec les composants des pores nucléaires pour l'exportation de ce complexe à travers la membrane nucléaire (O'Neill, Talon et Palese *et al.*, 1998). Certains auteurs affirment que la NS2 serait responsable de l'exportation nucléaire du RNPv par une interaction avec le CRM1 humain (exportine-1), une exportine qui permet le transport bidirectionnel d'une variété de protéines à travers la membrane nucléaire (Neumann, Hughes et Kawaoka, 2000). D'ailleurs, il a été proposé de renommer la protéine NS2, "nuclear export protein", car il a été démontré que des micro-injections de sérum anti-NS2 inhibent l'exportation nucléaire dans les cellules infectées (O'Neill, Talon et Palese, 1998). Par contre, d'après Bui *et al.* (2000), la protéine NS2 ne serait pas essentielle à l'exportation nucléaire du RNPv. En effet, dans les cellules infectées dans lesquelles l'expression des gènes tardifs est bloquée, l'exportation du RNPv peut être rétablie par l'addition de M1 exogène en l'absence de niveau détectable de NS2 (Bui *et al.*, 2000). De plus, certains ont attribué à la protéine NS2 un rôle dans la réplication virale, par contre ce rôle n'est pas reconnu car il a été démontré chez un virus mutant synthétisant des quantités minimales de NS2, que celui-ci se réplique normalement (Wolstenholme *et al.*, 1980; Smith et Inglis, 1985).

1.1.5 Cycle de réplication virale

1.1.5.1 Entrée du virus dans la cellule

Le virus influenza se lie à la surface de la cellule, via la partie distale de l'HA à l'acide sialique présent sur les glycoprotéines ou glycolipides cellulaires. Selon les aa contenus dans le site de liaison (binding pocket) de l'HA, les virus influenza ont différentes spécificités pour les acides sialiques liés aux molécules de galactose par des liens α 2,3 ou α 2,6 (Weis *et al.*, 1988). Suite à la liaison de l'HA aux récepteurs cellulaires, les particules virales pénètrent à l'intérieur de la cellule par endocytose. L'environnement acide des endosomes induit un changement conformationnel de l'HA ce qui provoque la fusion de la membrane virale avec la membrane endosomale. Par la suite, le RNPv se dissocie de la protéine M1 puis ce complexe est libéré dans le cytoplasme de la cellule hôte (Martin et Helenius, 1991a; Maltin *et al.*, 1982). Ainsi, grâce aux signaux de localisation nucléaire des protéines qui composent le RNPv, ce complexe entre dans le noyau de la cellule hôte (Bui, Whittaker et Helenius, 1996, Bui *et al.*, 2000) par un processus actif impliquant la voie de signalisation cellulaire de l'importine α / β (O'Neill *et al.*, 1995). La protéine M1 entre également dans le noyau via son signal de localisation nucléaire.

1.1.5.2 Synthèse d'ARN messager et réplication de l'ARN viral

Le RNPv est transporté dans le noyau de la cellule où se produit la réplication virale (Marsh et Helenius., 1989). En premier lieu, dans le noyau l'ARNv sert de brin matrice pour la synthèse des ARNm, qui seront exportés dans le cytoplasme pour être traduits. La transcription primaire implique un mécanisme par lequel la synthèse d'ARNm est initiée par une coiffe à l'extrémité 5' servant d'amorce, obtenue par le clivage d'ARNm cellulaires par une endonucléase associée avec le complexe des polymérases virales (Bouloy, Plotch et Krug, 1978 ; Plotch *et al.*, 1981; Krug *et al.*, 1989). L'élongation de l'amorce par les polymérases se poursuit jusqu'à la rencontre d'une séquence de 5 à 7

uridines, localisée à 15-17 nucléotides de l'extrémité 5' des brins matrices d'ARNv, qui servent à la polyadénylation de l'ARNm (Luo *et al.*, 1991; Poon *et al.*, 1999; Pritlove *et al.*, 1998, 1999). Plus tard dans la première phase de réplication virale, l'ARNv agira comme brin matrice pour générer des copies d'ARN de polarité positive (Krug *et al.*, 1989). La synthèse de l'ARN complémentaire (ARNc) se déroule sans la présence d'amorce et produit un transcrit dépourvu de queue de poly-A permettant de prévenir la terminaison de la transcription (Hay, Skehel et Mc Cauley, 1982; Hatada et Fukuda, 1992). Par la suite, l'ARNc servira de brin matrice pour obtenir l'ARNv de polarité négative (Krug *et al.*, 1989). La synthèse de l'ARNv ne nécessite pas d'amorce, car ce type d'ARN présente une séquence triphosphate à l'extrémité 5' (Young et Content, 1971).

1.1.5.3 Régulation de l'expression des gènes viraux dans la cellule infectée

Pendant la seconde phase de la réplication virale, la transcription secondaire permettant l'expression des gènes viraux, se déroule en deux étapes nommées précoce et tardive. Durant la transcription secondaire précoce, la synthèse des ARNv spécifiques, des ARNm et des protéines virales sont liées (Hay *et al.*, 1977; Smith et Hay, 1982; Shapiro, Gurney et Krug, 1987). Les premiers transcrits sont traduits en protéines virales en particulier la NP et NS1. La NP est synthétisée plus tôt dans le cycle d'infection, car sa présence est nécessaire pour la synthèse des ARNc et des ARNv. Par contre, la synthèse de la protéine M1 est retardée (Shapiro, Gurney et Krug, 1987), car en plus d'inhiber la transcription de l'ARNv en ARNm (Zvonarjev et Ghendron, 1980), elle a un rôle dans l'exportation du RNPv du noyau au cytoplasme (Martin et Helenius, 1991b). Au début de la phase tardive, la synthèse des ARNm et des ARNv est élevée. Pendant cette phase, les protéines M1, HA et NA sont synthétisées (Shapiro, Gurney et Krug, 1987).

1.1.5.4 Assemblage et bourgeonnement viral

Suite à la synthèse des protéines virales, se produit l'assemblage et le bourgeonnement des virions nouvellement formés. Le bourgeonnement se déroule à la

membrane apicale des cellules épithéliales (Rodriguez-Boulan et Sabatini, 1978; Roth, Fitzpatrick et Compans, 1979). Deux processus sont nécessaires pour permettre au virus de bourgeonner (Nayak *et al.*, 1996). En premier lieu, chaque protéine virale soit M1, M2, PB1, PB2, PA, NS2 et les composants viraux tels que la nucléocapside, l'ARN viral ainsi que l'enveloppe présentant les protéines transmembranaires HA et NA, doivent être transportés et amenés à la membrane apicale pour l'assemblage. En second lieu, ces protéines virales ou composés viraux doivent interagir pour initier le processus de bourgeonnement entraînant la morphogenèse des particules virales et la libération des virions. Selon un modèle proposé, les interactions entre les queues cytoplasmiques des glycoprotéines virales (HA et NA) avec les protéines internes (M1) sont cruciales au processus du bourgeonnement (Jin *et al.*, 1997). Récemment certaines études ont proposé que les protéines HA et NA seraient incorporées dans des vésicules mobiles de cholestérol-sphingomyéline provenant de la membrane plasmique appelées radeaux lipidiques, que certains considèrent maintenant comme le site d'assemblage des virus bourgeonnants à la membrane plasmique (Sheifflele *et al.*, 1999; Zhang, Pekosv et Lamb, 2000). Lors du bourgeonnement, en plus des protéines, les ARNv doivent être incorporés dans la particule virale par un mécanisme qui n'est pas sélectif. Ainsi pour une proportion de 400 virions assemblés, on retrouve une seule particule qui contient au moins une copie de chacun des huit segments d'ARNv que l'on nomme particule infectieuse (Enami *et al.*, 1991).

La particule virale nouvellement formée est libérée de la cellule par un mécanisme inconnu. Par contre, la présence de la neuraminidase semble essentielle à cette étape pour empêcher l'agrégation des virus entre eux et à la surface cellulaire (Compans *et al.*, 1969; Palese *et al.*, 1974; Griffin, Basak et Compans, 1983; Liu *et al.*, 1995).

1.1.6 Mécanismes des variations antigéniques du virus influenza

1.1.6.1 Cassure antigénique

Les cassures antigéniques ou “shift” antigénique sont des réassortiments génétiques, c’est-à-dire des échanges complets de gènes codant pour l’HA ou la NA entre les virus de même type (Webster *et al.*, 1982; Kilbourne, 1987). La cassure antigénique est associée à l’échange de segments d’ARN entre des souches influenza humaines et animales (Webster et Laver, 1971). Le génome segmenté du virus influenza favorise ce type de mécanisme. Ces variations majeures donne lieu à l’apparition de virus avec des antigènes de surface immunologiquement distants des antigènes de surface des virus précédents. À titre d’exemple, plusieurs virus H1N2 ont été isolés chez les porcs aux États-Unis, résultant d’un réassortiment entre une souche porcine H1N1 classique avec une souche H3N2 issus d’un triple réassortiment (Choi *et al.*, 2002). Le gène de la NA était d’origine humaine alors que celui de l’HA était d’origine aviaire ou porcine.

1.1.6.2 Glissement antigénique

Le glissement antigénique ou “drift” antigénique est caractérisé par des variations mineures de la séquence en aa des protéines virales résultant en un changement de l’antigénicité de l’HA ou de la NA. Ce mécanisme se produit chez les virus influenza de type A, B et C (Kilbourne, 1987, Webster *et al.*, 1982). Par contre, l’influenza type A présente la plus grande variabilité (Smith et Palese, 1989). Les glissements antigéniques seraient favorisés par l’instabilité génétique de l’ARN et le caractère infidèle des ARN polymérase virales (Rocha *et al.*, 1991, Domingo *et al.*, 1993; Luoh, McGregor et Hinshaw, 1992). La variation antigénique du virus au niveau de l’HA, serait associée à la substitution d’aa à proximité du site récepteur (Katz, Naeve et Webster, 1987) et au camouflage de sites antigéniques (Inkster, Hinshaw et Schultze, 1993). Les observations qui démontrent que les substitutions ont lieu plus particulièrement au niveau des sites

antigéniques (A à E) de la sous-unité HA1, suggèrent que la pression du système immunitaire de l'hôte est responsable de ces changements antigéniques (Smith et Palese, 1989). D'ailleurs, grâce à l'apparition de ces mutations ponctuelles dans la séquence en aa de la protéine HA, le virus peut échapper aux anticorps neutralisants (Webster *et al.*, 1982; Raymond *et al.*, 1983). Le glissement antigénique se produit également au niveau de la protéine NA du virus influenza, d'après un mécanisme qui serait semblable à celui de la protéine HA (Paniker, 1968; Curry *et al.*, 1974). En Amérique du Nord, des variants antigéniques H1N1 présentant des mutations importantes au niveau des gènes qui codent les protéines HA et NA, ont été isolés (Rekik, Arora et Dea, 1994; Arora, N'Diaye et Dea, 1997a; Arora *et al.*, 1997b).

1.1.6.3 Recombinaison entre les gènes

La recombinaison entre les gènes viraux et cellulaires peut entraîner l'apparition de nouveaux variants. Contrairement aux virus de la famille des *Coronaviridae* et des *Picornaviridae*, dans lesquels la recombinaison des gènes se produit à haute fréquence, jusqu'à tout récemment aucune recombinaison n'avait été démontrée chez l'influenza. Par contre, depuis peu, certains exemples de recombinaison ont été identifiés, lorsque dans la protéine HA, des insertions de nucléotides provenant d'un ARN ribosomal ou de nucléotides provenant de la protéine NP ont eu lieu au niveau du site de clivage (Khatchikian, Orlich et Rott, 1989; Orlich *et al.*, 1990; Orlich, Gottwald et Rott, 1994).

1.1.7 Déterminants moléculaires de l'infection et pathogénèse

Certains faits suggèrent que la diversité des hôtes infectés par l'influenza ainsi que la pathogénèse associée à ce virus sont reliées aux facteurs génétiques. D'après des analyses phylogénétiques du gène qui code la protéine NP, celui-ci aurait un rôle déterminant dans la diversité des hôtes du virus influenza (Gammelmin *et al.*, 1990). En effet, il a été démontré que la protéine NP est un déterminant majeur de la spécificité de l'hôte

(Scholtissek *et al.*, 1985) car la phosphorylation de cette protéine qui diffère d'après l'hôte infecté, peut affecter la réplication virale (Kistner, Muller et Scholtissek, 1989). Les autres gènes internes du virus influenza (PB1, PB2, PA, M1, NS1 et NS2) pourraient également avoir un rôle dans la discrimination de l'hôte. En effet, certaines études ont démontré l'implication des polymérases virales (Almond et Brand, 1977; Bean et Webster, 1978; Scholtissek, Koennecke et Rott, 1978a; Scholtissek *et al.*, 1978b), ainsi que les protéines NS1 et NS2 (Garcia-Sastre *et al.*, 1998) dans la pathogenèse et la diversité des hôtes infectés.

La pathogenèse des virus influenza est reliée aux propriétés d'une glycoprotéine de surface de l'influenza, l'HA. Le clivage de l'HA en deux sous-unités par les protéases cellulaires est essentiel pour l'infection des cellules. La distribution des protéases chez l'hôte détermine le tropisme et la pathogenèse du virus influenza. Deux groupes de protéases seraient responsables du clivage de la protéine HA *in vivo*. Le premier groupe d'enzymes composé de la plasmine, du facteur de coagulation, de la protéase X, de la tryptase clara et des protéases bactériennes, clivent les protéines HA des souches virulentes et non-virulentes (Klenk et Garten, 1994). La furine et la protéase PC6 qui composent le second groupe d'enzyme, sont responsables du clivage des protéines HA des souches virulentes (Stieneke-Grober *et al.*, 1992; Horimoto et Kawaoka, 1994). Chez les mammifères, la protéine HA est clivée par la tryptase clara, une protéase sécrétée par les cellules épithéliales du système respiratoire ce qui restreint l'infectivité (Steinhauer, 1999). Les souches d'influenza aviaires de sérotypes H5 et H7 sont clivées par des protéases ubiquitaires (Boycott, Klenk et Ohuchi, 1994; Steinhauer, 1999), causant une dissémination du virus dans plusieurs tissus et organes. D'ailleurs, la spécificité du récepteur de la protéine HA dépend de l'hôte infecté. Les virus humains lient de façon préférentielle les résidus cellulaires d'acide sialique (acide N-acétyl-neuraminique) α 2,6 galactose tandis que les virus influenza aviaires préfèrent les résidus d'acide sialique α 2,3 galactose (Marsh et Helenius, 1989).

Certains faits suggèrent que la protéine NA du virus influenza aurait également un rôle dans la discrimination de l'hôte et dans la pathogenèse. Des études récentes ont démontré que le plasminogène trouvé dans le sérum des milieux de culture cellulaire s'associe à la lysine de l'extrémité carboxy-terminale de la neuraminidase de la souche influenza A/WSN/33 (H1N1) ce qui entraîne son activation en plasmine (Li *et al.*, 1993). En concentrant la plasmine à la membrane du virus ou de la cellule infectée, le clivage de l'hémagglutinine peut se produire.

1.2 Influenza et le porc

1.2.1 Épidémiologie

Plusieurs sous-types de l'influenza de type A sont responsables d'infections chez les porcs. La souche H1N1 est la plus répandue dans l'infection porcine, au Canada, aux États-Unis et en Asie (Chambers *et al.*, 1991; Guan *et al.*, 1996). Le variant H1N1 présent en Amérique du Nord, provient de la souche porcine classique alors que les variants H1N1 présents en Asie et en Europe sont d'origine porcine ou aviaire. Contrairement à l'Europe et l'Asie, le sous-type H3N2 qui présente un variant d'origine aviaire et un variant d'origine humaine (Webster *et al.*, 1993) est moins répandu en Amérique du Nord. Depuis le début des années 90, on signale au Canada (Bikour *et al.*, 1994) et aux États-Unis quelques cas isolés d'infection par le sous-type H3N2 (Chambers *et al.*, 1991). Par contre, en 1998, deux nouveaux variants de type H3N2 affectant le porc ont fait leur apparition (Zhou *et al.*, 1999). Le porc est également affecté par le sous-type H1N2 isolé au Japon (Sugimura *et al.*, 1980), en Europe (Gourreau *et al.*, 1994) et aux États-Unis (Choi *et al.*, 2002). Finalement, certains cas d'infections avec l'influenza de type C ont été rapportés chez les porcs en Chine (Guo *et al.*, 1983; Yuanji et Desselberger, 1984) et au Japon (Yamaoka *et al.*, 1991).

Certains variants antigéniques ont fait leur apparition selon Olsen *et al.* (1993) et Wenworth *et al.* (1994). L'étude de Rekik, Arora et Dea (1994) a démontré un glissement antigénique dans le gène HA de différents isolats de virus influenza H1N1 au Canada associé à la pneumonie proliférative et nécrosante (Dea *et al.*, 1992a). Le sous-type H3N2 qui circule chez les porcs, a subi également des variations génétiques. Il a été observé en Europe que la souche virale H3N2 d'origine humaine présente des mutations ponctuelles importantes au niveau du gène HA ce qui augmente les épizooties chez les porcs attribuées à ce virus (De Jong *et al.*, 1999).

1.2.2 Le rôle du porc dans le réassortiment génétique

Le porc est un hôte intermédiaire pour le réassortiment des virus influenza A. En effet, il est susceptible d'être infecté et de permettre la réplication des virus influenza humain et aviaire (Hinshaw *et al.*, 1981; Schultz *et al.*, 1991). Cette susceptibilité est due à la présence des récepteurs pour les virus influenza aviaires (α 2,3 galactose) et humains (α 2,6 galactose) au niveau des cellules trachéales du porc (Ito *et al.*, 1998). Ce dernier est un réservoir pour les virus influenza humains et aviaires qui lors d'une coinfection peut produire des nouveaux variants provenant d'un réassortiment génétique (Scholtissek *et al.*, 1985; Scholtissek et Naylor, 1988; Webster *et al.*, 1992).

Le succès d'une transmission interspèce du virus influenza dépend des gènes viraux. Suite à une transmission interspèce, un réassortiment génétique peut avoir lieu et produire un virus formé de gènes spécifiques, lui permettant de se répliquer chez le nouvel hôte (Webster *et al.*, 1992). Certains auteurs ont proposé que le gène qui code la NP peut restreindre ou atténuer la réplication virale (Scholtissek *et al.*, 1985; Tian *et al.*, 1985; Snyder *et al.*, 1987) contrôlant ainsi, la transmission du virus à un nouvel hôte. Ces observations supportent le rôle du porc comme réservoir de réassortiment génétique entre les virus influenza d'origine humaine et aviaire. En effet, le gène de la NP présent chez les virus ayant subi un réassortiment génétique chez le porc a une large spécificité d'hôte

(Scholtissek *et al.*, 1985). Ainsi, l'introduction de gènes de virus influenza aviaries chez les humains pourrait se produire via les porcs.

Plusieurs cas de transmission du virus influenza entre les porcs et les humains ont d'ailleurs été répertoriés aux États-Unis (Hinshaw *et al.*, 1978; Dacso *et al.*, 1984; Wentworth, McGregor et Macklin, 1997), en Europe (Aymard *et al.*, 1985; Haesebrouck *et al.*, 1985; De Jong *et al.*, 1988; Brown, Harris et Alexander, 1995; Brown *et al.*, 1998) et en Asie (Katsuda *et al.*, 1995). De plus, la mise en évidence de virus influenza porcins chez les espèces aviaries ainsi que l'isolement de souches influenza d'origine aviaire chez les porcs ont été documentés en Amérique du Nord (Hinshaw *et al.*, 1978; Mohan *et al.*, 1981; Pomeroy, 1982; Halvorson *et al.*, 1992; Karasin *et al.*, 2000) et en Asie (Shortridge, 1999).

1.3 Pathogénie des infections associées à l'influenza porcine

Le virus influenza A est l'agent causal de la grippe porcine classique, une maladie respiratoire aiguë contagieuse (Easterday, 1986). La grippe est actuellement l'un des éléments majeurs de la pathologie respiratoire du porc. Elle est généralement introduite par un porc infecté dans un troupeau sain (Haesebrouck et Pensaert, 1986). Une fois le troupeau infecté, le virus persiste par la continuelle disponibilité de porcs juvéniles et non-immuns. Chez les animaux plus âgés, malgré un taux de morbidité très élevé, le taux de mortalité associé à la grippe varie de 1 à 4 % (Morin *et al.*, 1981).

Le virus est présent dans les sécrétions nasales des animaux infectés et se transmet par l'intermédiaire des aérosols. Les contacts rapprochés entre les porcs, le stress, les facteurs environnementaux et météorologiques favorisent la dissémination du virus. La réplication du virus dans les cellules épithéliales se traduit par plusieurs changements pathologiques dans tout le système respiratoire, notamment au niveau du tractus respiratoire inférieur où l'on retrouve les lésions les plus importantes (Hers, 1966). Chez l'animal, après une période d'incubation de 2 à 7 jours, suivi d'épisodes de forte fièvre, l'infection grippale

se manifeste par une baisse d'appétit, un retard de croissance, de la dyspnée accompagnée de toux, d'écoulement nasal et lacrymal (Easterday, 1986). Par contre, la guérison de la maladie est rapide.

Le virus influenza est également responsable de la pneumonie proliférative et nécrosante (PPN), une maladie respiratoire chronique très contagieuse retrouvée principalement chez les porcelets âgés de moins de 4 mois (Girard, Morin et Elazhary, 1992). En plus, d'un taux de morbidité très élevé (Morin, Girard et Elazhary, 1990), la PPN est responsable d'un haut taux de mortalité chez les nouveau-nés et les porcelets non-sevrés (Morin, Girard et Elazhary, 1990; Dea *et al.*, 1992a). La maladie se manifeste par une fièvre souvent persistante, par des retards de croissance, par de la polypnée et par de la dyspnée avec une respiration abdominale laborieuse. Le profil histopathologique de l'infection est caractérisé par une invasion de macrophages, par la présence de débris cellulaires dans les alvéoles et par la prolifération des pneumocytes de type II (Morin, Girard et Elazhary, 1990; Dea *et al.*, 1992b; Girard, Morin et Elazhary, 1992).

1.3.1 Réponse immunitaire au virus influenza porcine

Contrairement au modèle humain et murin, la réponse immune à l'infection par le virus influenza est peu connue chez les porcs. Toutefois, il existe quelques études qui ont décrit certains aspects de la réponse immunitaire porcine à l'influenza. En effet, il a été démontré que des anticorps inhibant l'hémagglutination du virus sont présents dans le sérum et dans les lavages bronchoalvéolaires des porcs infectés (Charley, 1977). De plus, des IgA spécifiques aux virus dans les sécrétions nasales ainsi que des IgG et IgM dans le sérum des porcs infectés ont été détectés (Lee *et al.*, 1995; Larsen *et al.*, 2000). D'autre part, après une infection-défi avec le sous-type H3N2, les porcs préalablement infectés avec le sous-type H1N1 ont montré une augmentation significative des IgG dans les sérums dirigés contre le domaine extracellulaire de la protéine M2 (Heinen, Boer-Luijtz et Bianchi, 2001). De plus, une hausse du nombre de cellules T CD8+ a été observée au

niveau des poumons accompagnée d'une lymphoprolifération dans le sang (Heinen, Boer-Luijtz et Bianchi, 2001).

Des études ont démontré que les cytokines proinflammatoires sont produites dans les premiers stades de l'infection virale chez le porc. L'interféron (IFN)-alpha, le tumor necrosis factor (TNF)-alpha et l'interleukine (IL)-1 ont été détectés dans les lavages bronchoalvéolaires des porcs infectés avec un virus influenza H1N1 (Reeth, Nauwynck et Pensaert, 1998). De plus, une corrélation entre le titre viral dans les poumons, l'IFN-alpha, l'IL-6, le TNF-alpha et l'IL-8 a été démontrée (Van Reeth, Gucht et Pensaert, 2002). Il semble que la pathogénèse de la maladie soit associée avec l'IFN-alpha, l'IL-6, et TNF-alpha (Van Reeth, 2000; Van Reeth, Gucht et Pensaert, 2002).

1.3.2 Prophylaxie

L'ensemble des mesures servant à prévenir l'apparition ou la propagation de la maladie permettent de réduire l'impact économique et hygiénique associés à celle-ci. L'isolement des porcs infectés, la désinfection des porcheries contaminées peuvent contribuer à limiter la propagation de la grippe ou de la PPN ainsi que minimiser les risques associés à l'émergence de nouveaux virus pouvant être responsables de pandémie. Toutefois la vaccination des porcs est privilégiée pour la prévention des infections respiratoires. Les vaccins sont inactivés et administrés aux truies afin de les protéger et induire une immunité maternelle chez leur progéniture. Les porcelets sont également vaccinés au début des périodes d'engraissement afin de réduire les pertes dues aux problèmes respiratoires. Des études récentes démontrent que le vaccin de type inactivé contre la grippe porcine H1N1 commercialisé aux États-Unis réduit la sévérité de la maladie et la dissémination du virus après une infection-défi, mais il ne prévient pas toujours les infections (Brown et McMillen, 1994). Par contre, une nouvelle génération de vaccins, les vaccins à ADN semblent prometteurs (Macklin *et al.*, 1998; Olsen, 2000). En effet, l'administration des plasmides codants la protéine HA d'un virus influenza typique

chez les porcs a permis d'induire une réponse immunitaire protectrice spécifique au virus (Eriksson *et al.*, 1998; Macklin *et al.*, 1998; Olsen, 2000). Toutefois, il semble que les vaccins atténués sont également efficaces dans la protection des porcs contre les infections par l'influenza A (Heinen *et al.*, 2001).

1.3.3 Tests diagnostiques de l'influenza porcin

L'infection causée par l'influenza chez le porc n'est pas toujours évidente à diagnostiquer par les signes cliniques. Ainsi, plusieurs tests diagnostiques ont été développés pour détecter la présence du virus ou des anticorps antiviraux.

1.3.3.1 Détection du virus, des protéines virales et des acides nucléiques

Les tests qui utilisent les anticorps fluorescents ou l'immunohistochimie peuvent détecter les protéines virales ou le virus complet. En effet, ces tests utilisent un antisérum préparé contre le virus (anticorps polyclonaux) ou des anticorps dirigés contre une protéine spécifique (anticorps monoclonaux) appliqués sur des coupes de poumons. Récemment, l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques à la protéine NP chez le porc a été rapportée (Haines, Waters et Clark, 1993; Vincent *et al.*, 1997). Ces tests peuvent détecter les souches H1N1 et H3N2 simultanément et leur sensibilité est similaire (Vincent *et al.*, 1997).

Certains ont démontré qu'un test de capture d'antigènes viraux par ELISA peut constituer une méthode de détection de l'influenza A chez les porcs. L'équipe de Lee *et al.* (1993) a décrit un test ELISA utilisant un anticorps monoclonal anti-NP, pouvant détecter jusqu'à 1 ng/ml de virus purifié chez le porc. Cette méthode s'est avérée aussi sensible que l'isolement du virus dans les oeufs embryonnés pour la détection de la phase précoce de l'infection.

L'isolement du virus influenza peut être fait en inoculant des oeufs embryonnés de poulet, avec des échantillons de sécrétions nasales ou d'homogénats de poumons. Le titre viral est mesuré par l'activité hémagglutinante du liquide allantoïque de l'oeuf, quelques jours après l'inoculation. Les cultures cellulaires (Madin-Darby canine kidney cells, primary porcine kidney cells) sont également utilisées pour l'isolement du virus influenza. La culture du virus dans les cellules s'avère aussi sensible que l'inoculation des oeufs embryonnés (Erickson *et al.*, 1999). D'ailleurs, un avantage important de cette méthode diagnostique est que suite à son isolement, le virus peut-être utilisé pour des analyses antigénique et génétique ainsi que dans la préparation de vaccin. Par contre, la méthode d'isolement du virus influenza est dispendieuse et longue à réaliser.

La technique du PCR (réaction de polymérase en chaîne), une méthode puissante pour amplifier des séquences d'acides nucléiques, a été utilisée pour la détection du virus influenza. Le génome du virus influenza étant composé d'ARN simple brin, des fragments d'ADNc complémentaire à l'ARN viral doivent être synthétisés par réaction de transcriptase inverse avant la réaction de PCR. Par la suite, les oligonucléotides (amorces) complémentaires à des séquences du virus influenza, en présence d'une ADN polymérase permettent la synthèse des fragments d'ADNc grâce à plusieurs cycles d'amplification. La sensibilité et la spécificité de cette méthode sont déterminées par le choix de la séquence des amorces. Récemment, des amorces ont été synthétisées pour la détection des sous-types H1N1 et H3N2 (Janke, 2000). Chez le porc, des études préliminaires ont montré qu'une amorce reconnaissant le segment codant la NP a permis la détection de tous les tissus infectés (Harmon, Krauss et Yoon, 1999). Cette méthode est hautement sensible mais elle est laborieuse et coûteuse.

1.3.3.2 Détection des anticorps anti-influenza

Les tests sérologiques détectent les anticorps dirigés contre l'influenza, ce qui permet de démontrer l'exposition récente ou passée au virus. Présentement, le test

diagnostic sérologique de l'influenza porcine le plus couramment utilisé dans les laboratoires, est le test d'inhibition d'hémagglutination (IHA) (Murphy *et al.*, 1981). Ce test détecte les anticorps qui se lient à l'HA à la surface du virus et qui neutralise la liaison des particules virales aux érythrocytes pour causer une inhibition d'hémagglutination. Le test IHA qui a été décrit initialement par Hirst (1942) puis modifié par Salk (1944) permet d'identifier le sous-type de l'HA des souches influenza. Ce test est relativement sensible, mais hautement spécifique (Murphy *et al.*, 1981; Julkunen, Pyhala et Hovi, 1985). Par contre, ce test nécessite un renouvellement fréquent des réactifs à cause de la variation de l'HA, requiert une source continue d'érythrocytes et les sérums utilisés doivent être traités pour inactiver les inhibiteurs non-spécifiques de l'hémagglutination.

Un deuxième test sérologique, le test de la fixation du complément mesure les anticorps dirigés contre la NP avec le système du complément (Rebello-de-Andrade et Zambon, 2000). Le sérum à tester est incubé avec un virus influenza puis les érythrocytes sont ajoutés. Si les anticorps ont reconnu le virus, il y a fixation du complément, ce qui diminue la quantité de protéines du complément disponibles pour lier les complexes anticorps-érythrocytes qui entraîneraient une hémolyse. Ce test détecte les anticorps dirigés contre une protéine conservée du virus ce qui représente un avantage lorsque de nouveaux variants antigéniques apparaissent. Par contre, cette technique est peu sensible, une grande quantité de réactifs biologiques doivent être standardisés et il permet de détecter uniquement les classes d'anticorps impliquées dans la fixation du complément.

La technique nommée "single radial hemolysis" permet également de mettre en évidence les anticorps anti-influenza (Mumford *et al.*, 1983; Wood *et al.*, 1983, 1994). Pour mesurer les anticorps présents dans les sérums, ce test utilise la diffusion des anticorps dans les gels d'agar et la propriété d'hémolyse des complexes antigène-anticorps. En plus, d'être sensible et hautement reproductible (Gibson *et al.*, 1985), cette méthode de détection est relativement simple à réaliser et permet de tester rapidement plusieurs échantillons

simultanément (Morley *et al.*, 1995a). De plus, les sérums peuvent être analysés sans être dilués et ce test est facilement standardisé (Morley *et al.*, 1995b).

Le test d'inhibition de la neuraminidase (NI) détecte les anticorps dirigés contre la NA. Le NI utilise la capacité enzymatique de la NA. Ce test détecte les anticorps du sérum qui se lient à la NA à la surface du virus et qui inhibent l'action de l'enzyme viral sur un substrat spécifique pour entraîner une inhibition de la NA. Ce test est laborieux car il implique plusieurs étapes de dilutions des sérums et nécessite des réactifs dispendieux (Gibson *et al.*, 1985). De plus, la quantité de sérums pouvant être analysés à chaque test est limitée. Le test NI est peu sensible et les résultats dépendent de plusieurs variables expérimentales telles que la concentration d'enzyme, la souche virale, la température et le pH (Gibson *et al.*, 1985).

Les tests ELISA indirects avec des antigènes viraux natifs ou recombinants peuvent aussi être utilisés pour détecter les anticorps contre le virus influenza. Cette technique est facile à exécuter, rapide et peu coûteuse. En effet, des tests ELISA ont été utilisés avec succès pour la détection des anticorps contre le virus influenza chez l'homme (Hammond, Smith et Noble, 1980; Koskinen, Vuorinen et Meurmann, 1987). D'ailleurs, plusieurs tests ELISA utilisant les protéines virales ou recombinantes ont été décrits (Khan *et al.*, 1982; Joassin, Reginster et Vaira., 1983; Harmon *et al.*, 1989; Rota *et al.*, 1990, Voeten *et al.*, 1998). De plus, les tests ELISA sont sensibles et permettent la détection des anticorps de différents isotypes retrouvés suite à l'infection avec le virus influenza chez les porcs (Lee *et al.*, 1995; Larsen *et al.*, 2000). Récemment, des tests ELISA diagnostiques, permettant la détection des anticorps dirigés contre l'influenza chez le porc ont été décrits (Cornaglia *et al.*, 1999; Velek, Hogan et Liauw, 1999).

1.4 Antigènes

1.4.1 Protéines virales

Le virus influenza ainsi que les différentes protéines virales peuvent être utilisés comme antigène dans les tests diagnostiques sérologiques. Certains avantages sont associés à l'utilisation d'antigènes natifs. En effet, les épitopes présentent la conformation native pouvant être indispensable au potentiel antigénique de la protéine. D'autre part, les protéines virales subissent les modifications post-traductionnelles nécessaires, par exemple à la présence d'épitopes de neutralisation dans les glycoprotéines HA et NA (Ausebel *et al.*, 1995). Par contre, le processus de purification ainsi que les techniques de culture du virus influenza dans les oeufs embryonnés de poulet ou en culture cellulaire sont laborieux et dispendieux. De plus, ces méthodes de culture peuvent affecter les propriétés biologiques et antigéniques des protéines virales (Robertson *et al.*, 1987; Katz et Webster, 1989; Wood *et al.*, 1989).

1.4.2 Protéines recombinantes

Les protéines recombinantes produites chez les organismes procaryotiques ou eucaryotiques sont régulièrement utilisées comme antigène dans les tests diagnostiques permettant le dépistage d'anticorps. Les vecteurs d'expression typiques contiennent un promoteur qui dirige la synthèse d'une quantité importante d'ARNm correspondant au gène cloné. La protéine recombinante produite conserve généralement les propriétés biologiques et antigéniques de la protéine native correspondante. Elles sont utiles en médecine dans le traitement de maladies et permettent de caractériser la structure et la fonction des protéines (Swartz, 2001). La purification des antigènes recombinants est simple et moins coûteuse que celle des antigènes viraux.

Dans le cadre de cette étude, la protéine M1 recombinante utilisée comme antigène dans un test diagnostique a été produite par un système d'expression procaryotique pour plusieurs raisons. En effet, contrairement au système d'expression eucaryote la technique est simple, peu dispendieuse et rapide. Dans certains cas, la protéine recombinante représente près de 40 % des protéines nouvellement synthétisées par la bactérie (Ausebel *et al.*, 1995). De plus, une variété de vecteurs et de souches *E. coli* sont disponibles pour l'expression des protéines recombinantes (Ausebel *et al.*, 1995).

La protéine M1 a été choisie dans le test diagnostique proposé dans ce projet car elle est hautement conservée parmi les différents sous-types d'influenza A (Lamb, 1989). D'autre part, il a été démontré que des anticorps dirigés contre la protéine M1 sont produits lors d'une infection par l'influenza A (Cretescu, Beare et Schild, 1978; Khan *et al.*, 1982). De plus, elle est antigénique car elle présente quatre sites reconnus par les anticorps (Ye *et al.*, 1987; Ye, Baylor et Wagner, 1989). L'avantage majeur de l'utilisation de la protéine M1r est la possibilité de mesurer les anticorps contre tous les sous-types de l'influenza A.

1.5 Objectifs du projet de recherche

Les objectifs de cette étude étaient de : 1) De produire la protéine M1r de la souche influenza porcine SwQc91 à l'aide d'un système d'expression procaryote et de procéder à sa purification ; 2) D'évaluer l'immunogénicité et l'antigénicité de la protéine M1r ; 3) De mettre au point un test ELISA utilisant la protéine M1r comme antigène pour détecter les anticorps anti-influenza A chez les porcs.

Les objectifs 1 et 2 de ce projet de recherche ont été réalisés selon un plan identique à celui suivi dans le mémoire de Mélanie Welman (Welman, 1999). Le mémoire de Madame Welman rapportait une étude réalisée sous la direction du Dr Arora qui avait consisté à séquencer le gène de la protéine de la matrice du virus influenza porcine et à exprimer la protéine M1 recombinante. Malgré l'existence des clones positifs qui aurait pu servir à l'expression de la protéine M1r, les étapes de cette étude portant sur la production de la protéine recombinante ont dû être répétées pour le projet de recherche actuel pour les raisons suivantes :

1) La protéine M1 recombinante produite par Mme Welman était fusionnée à un épitope T7-tag, ayant impliqué l'ajout d'une séquence de 16 acides aminés à l'extrémité amino-terminale de la protéine. Dans le but d'éviter l'apparition de résultats faux-positifs pouvant être causés par la présence d'anticorps dans les sérums de porc réagissant contre cette séquence et en considérant que celle-ci ne pouvait être clivée par une enzyme, le RT-PCR et le clonage ont dû être refaits pour le projet présent. De plus, de nouvelles amorces ont été synthétisées pour permettre l'ajout des sites NdeI et HindIII au gène M cloné dans le vecteur d'expression pET21(a+) pour éviter l'expression d'une protéine de fusion.

2) L'étude des conditions optimales de production de la protéine a aussi été reprise considérant la nouvelle colonie recombinante utilisée.

3) De plus, il était primordial de démontrer la reconnaissance de la protéine M1r par des anticorps d'un sérum de porc anti-SwQc91 par le biais d'un immunobuvardage pour s'assurer de la fonctionnalité du test diagnostic proposé. Finalement, l'étude de l'immunogénicité de la protéine a dû être reprise pour démontrer que la protéine M1r a conservé les propriétés immunogènes de la protéine virale en induisant une production d'anticorps chez les souris.

2 MATERIEL ET MÉTHODES

2.1 Virus

2.1.1 Souches virales

La souche virale H1N1, A/Swine/Québec/5393/91 (SwQc91) isolée chez des porcs présentant des lésions de PPN (Dea *et al.*, 1992b), a été obtenue du laboratoire du Docteur Serge Dea.

2.1.2 Production et purification de la souche virale SwQc91

2.1.2.1 Production

La production de la souche virale a été réalisée d'après la méthode du WHO Collaborating Center for Reference and Research on Influenza (1982). Les manipulations relatives à cette étape ont été réalisées en conditions stériles. La souche virale SwQc91 a été propagée à l'aide d'oeufs embryonnés de poule de 11 jours du Couvoir Simetin (St-Canut, Québec). Une injection par voie chorio-allantoïdienne de 0,2 ml de culture virale ajustée à deux unités hémagglutinantes par millilitre (2 UHA/ml) à l'aide d'une seringue de 3 centimètres cube 3cc (Fisher) et d'une aiguille 23 G (Fisher) a permis de propager le virus dans le liquide allantoïque. Suite à l'inoculation, les oeufs ont été incubés à 34°C pendant 48 heures, suivi d'un transfert à 4°C pendant 18 heures. Après la récolte du liquide allantoïque infecté, il a été distribué dans plusieurs tubes et conservé à -80 °C.

2.1.2.2 Purification

La purification de la souche virale a été effectuée selon la méthode de Arora *et al.* (1985) à l'aide d'un gradient discontinu de saccharose. Cette méthode comporte deux étapes, l'une permet la concentration de la suspension virale et l'autre sa purification.

2.1.2.3 Étape de concentration

En premier lieu, le liquide allantoïque a été clarifié par une filtration à l'aide de laine de verre (Pyrex Fiber Glass, Corning New York). Ensuite, un gradient discontinu de saccharose a été préparé en ajoutant dans un tube de polyallomère de 30 ml (Beckman), 1 ml d'une solution de 50 % (p/p) saccharose ultrapure (Canadian Scientific Products) (Appendice I, section 1.02), suivi d'une congélation de 30 secondes dans un mélange éthanol : glace sèche. Par la suite, à ce tube ont été ajoutés 2 ml d'une solution de 22 % (p/p) de saccharose, puis le gradient a été congelé à nouveau 30 secondes. Un volume de 25 ml de liquide allantoïque infecté a été ajouté dans chaque tube, suivi d'une centrifugation à 100 000 x g (Beckman) pendant 60 minutes à 4°C dans un rotor 50,2 Ti. Après la centrifugation, un volume approximatif de 2 ml de liquide allantoïque a été laissé au-dessus du gradient, puis le tout a été congelé de nouveau. Par la suite, un volume de 25 ml de liquide allantoïque infecté a été ajouté au tube, lequel a été centrifugé tel que décrit plus haut. Après avoir répété ces étapes jusqu'à l'épuisement du liquide allantoïque, les gradients (culots) ont été rassemblés et conservés pour l'étape de purification.

2.1.2.4 Étape de purification

Les culots récoltés lors de l'étape de concentration ont été traités aux ultrasons (30 Mhz par seconde) à l'aide du Sonic Dismembrator (Fisher Scientific), suivi d'une centrifugation à 3000 x g pendant 15 minutes. Ensuite, les surnageants ont été recueillis et rassemblés, puis leur concentration en saccharose a été ajustée à 50 % p/p avec du saccharose solide. Le surnageant ainsi obtenu a été distribué dans plusieurs tubes, et il a été

centrifugé à 100 000 x g pendant 90 minutes à 4°C. Après la centrifugation, la concentration en saccharose des surnageants rassemblés a été ajustée à 26 % (p/p) en ajoutant du tampon PBS. Après une centrifugation à 100 000 x g pendant 90 minutes à 4 °C, les culots ont été resuspendus avec du PBS et conservés à 4°C. Par la suite, un dosage protéique, un titrage de l'activité hémagglutinante et l'analyse du contenu protéique de la suspension virale purifiée ont été effectués.

2.1.3 Titre hémagglutinant

La détermination du titre hémagglutinant a été réalisée selon la méthode du WHO Collaborating Center for Reference and Research on Influenza (1982). Dans chacun des puits d'un plateau de 96 puits à fond rond (ICN Biomedicals) a été déposé 0,05 ml de PBS 10 mM pH 7.2, sauf dans ceux de la première colonne dans lesquels a été ajouté 0,1 ml de virus purifié. Par la suite, des dilutions sérielles en base deux du virus ont été effectuées, suivi de l'ajout de 0,05 ml d'érythrocytes de coq 0,5 % (Centre de biologie expérimentale) à chacun des puits. Après une incubation de 45 minutes à TP, le titre hémagglutinant de la souche virale a été déterminé selon la réciproque de la plus haute dilution présentant une hémagglutination complète.

2.1.4 Dosage protéique

La méthode de BCA protein assay (Pierce) a été utilisée pour déterminer la concentration protéique de la souche virale. En premier lieu, une solution d'albumine sérique bovine (BSA ; Sigma) de 1 mg/ml a été préparée afin de réaliser une courbe étalon. De plus, le réactif BCA a été préparé en mélangeant la solution A et la solution B dans une proportion de 50 :1 (Appendice I, section 1.03). Un volume de 1 ml du réactif BCA a été ajouté à 0,1 ml de différentes concentrations de BSA ainsi qu'à plusieurs dilutions de la souche virale purifiée (1/10, 1/100 et 1/1000). Après une incubation de 30 minutes à 65°C avec agitation constante dans un bain-marie, les absorbances de chaque échantillon ont été

mesurées à l'aide du spectrophotomètre Carry 1E U-V visible (Varian, Australie) à une longueur d'onde de 562 nm. Ensuite, la courbe étalon a été réalisée à l'aide des résultats d'absorbance obtenus pour les différentes concentrations de BSA. La concentration protéique de la souche virale a été déterminée par l'extrapolation des absorbances obtenues sur la courbe étalon.

2.1.5 Analyse par SDS-PAGE de la souche virale SwQc91

L'analyse de la souche virale purifiée a été effectuée à l'aide d'un gel de polyacrylamide, d'après la méthode de Laemmli (1970) avec le système électrophorétique "Mini-Protean II Dual Slab electrophoresis" (Bio-Rad). Les solutions et les tampons utilisés dans l'analyse de la pureté de la souche virale sont décrits dans l'Appendice I, section 1.04. Un gel de séparation de 12 % de polyacrylamide (Bio-Rad), ainsi qu'un gel de chargement de 4 % de polyacrylamide ont été préparés en ajoutant le TEMED et le persulfate d'ammonium à la dernière minute. Le gel de séparation a été coulé rapidement entre les deux plaques de verres. Après la polymérisation, le gel de chargement a été ajouté ainsi qu'un peigne de 10 puits (Bio-Rad). Les échantillons ont été préparés comme suit ; 20 µl (20 µg) de virus purifié ont été ajoutés à 20 µl de tampon 2X dénaturant avec ou sans β-mercaptoéthanol (Sigma) et un volume de 4 µl de standard protéique "SDS PAGE Molecular Weight Markers, low range" (Bio-Rad) comprenant la myosine (200,0 kDa), la phosphorylase B (97,4 kDa), la BSA (66,2 kDa), l'ovalbumine (45,0 kDa), l'anhydrase carbonique (31,0 kDa), l'inhibiteur de trypsine (21,5 kDa) et le lysozyme (14,4 kDa) a été ajouté à 4 µl de tampon 2 X dénaturant et réducteur. Ensuite, les échantillons ont été incubés à 100°C pendant 5 minutes. Après avoir rempli de tampon d'électrophorèse le réservoir, les échantillons ont été déposés dans différents puits du gel et une tension de 200 Volts fournis par un générateur Buchler a été appliquée pendant 40 minutes à TP. Après la migration, le gel a été incubé pendant 20 minutes à TP dans la solution de coloration de bleu de Coomassie. Par la suite, il a été décoloré jusqu'à l'apparition des bandes de

protéines. La masse moléculaire des protéines virales a été déterminée à l'aide de la migration relative (M_r) des protéines du standard moléculaire "High range".

2.2 Purification de la protéine M1 virale

Les protéines virales de la souche influenza SwQc91 ont été séparées par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide, d'après la technique décrite par Laemmli (1970). Par la suite, la protéine M1 virale a été extraite du gel par une électroélution (Donofrio *et al.*, 1986) pour son utilisation subséquente dans l'immunobuvardage et dans les tests ELISA.

2.2.1 Électrophorèse et conditions électrophorétiques

Un volume de 20 μ l de virus SwQc91 (8,64 mg/ml) purifié a été mélangé à 20 μ l de tampon échantillon 2X, l'échantillon a été bouilli pendant 5 minutes, puis déposé dans un puits d'un gel de polyacrylamide formé d'un gel de chargement de 4 % et d'un gel de séparation 12 % (section 2.1.5). Le marqueur de masse moléculaire (GibcoBRL) a été ajouté dans le second puits. Après la migration des échantillons d'après les conditions électrophorétiques décrites à la section 2.1.5, le gel a été incubé quelques minutes dans l' H_2O distillée. Par la suite, les protéines ont été visualisées par une coloration au cuivre d'après la méthode de Lee, Levin et Branton (1987). Ainsi, les gels ont été incubés avec une solution de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (Copper stain ; Bio-Rad) pendant 5 minutes avec agitation constante. Après avoir transféré les gels dans l' H_2O distillée, les protéines ont été visualisées sur fond noir, puis la bande protéique correspondant à la protéine M1 virale a été excisée du gel. Les bandes de gel ont été décolorées par 3 lavages successifs de 15 minutes dans une solution composée de 0,25M EDTA, 0,25M Tris-HCl (pH 9,0) (Appendice I, section 1.04K) puis rééquilibrées dans un tampon électrophorétique (Appendice I, section 1.04H) pendant quelques minutes.

2.2.2 Électroélution

L'électroélution des protéines a été réalisée à l'aide du "Micro Eluter model 422" (Bio-Rad) selon les directives du manufacturier. En premier lieu, les membranes à dialyse de porosité 12-15 kDa (Bio-Rad) ont été incubées à 60°C pendant 1 heure dans le tampon d'élution (Appendice I, section 1.10A). Par la suite, l'extrémité inférieure de chaque tube de verre composant ce système, a été bloquée à l'aide d'un "fritz" (Bio-Rad), puis les tubes ont été disposés dans les ouvertures du module. Chaque membrane à dialyse a été fixée à un adaptateur en caoutchouc, lequel a par la suite été rempli de tampon d'élution puis glissé à l'extrémité inférieure des tubes en verre. Ensuite, les bandes de gel obtenues à l'étape précédente ont été découpées en petits morceaux, puis déposées dans les tubes de verre (1 cm d'épaisseur par tube) préalablement remplis de tampon d'élution. Le module a été déposé dans le bac, puis des volumes de 600 ml et 100 ml de tampon d'élution ont été ajoutés respectivement dans la chambre inférieure et supérieure. L'électroélution a été effectuée à 4°C pendant 5 heures en appliquant un courant de 10 mA/tube fourni par un générateur de courant Bio-Rad 250/2,5, avec agitation constante du tampon contenu dans la chambre inférieure.

2.2.3 Dialyse

Après l'électroélution, les échantillons de protéines purifiées ont été déposés dans un sac à dialyse de porosité 12-14 kDa préalablement bouillis (Spectra/Por, Spectra medical industrie, LA, USA). Les échantillons ont été dialysés à 4 °C, 2 fois pendant 60 minutes, puis pendant 18 heures dans un tampon composé de 0,05 M Tris-HCl pH 7,5 (Appendice I, section 1.10B). La dialyse a été effectuée dans un erlenmeyer de 2 litres sous agitation constante avec un barreau métallique alimenté par un générateur Buchler. Par la suite, le tampon de dialyse a été changé pour un tampon composé de 0,008 M Tris-HCl pH 7,5 (Appendice I, section 1.10C), puis la dialyse s'est déroulée d'après les conditions décrites précédemment. Par la suite, le contenu des sacs à dialyse a été prélevé et des volumes de

0,5 ml ont été distribués dans plusieurs tubes Eppendorf. Les tubes ont été déposés dans un mélange méthanol : glace sèche pendant quelques minutes puis les échantillons de protéines purifiées et dialysées ont été concentrés pendant 3 heures à l'aide de l'appareil Speed-Vac (Savant, Farmingdale, NY, USA). La concentration protéique des échantillons a été déterminée à l'aide du BCA protein assay kit (section 2.1.4) et la pureté des échantillons a été analysée sur un gel de polyacrylamide de 12 %.

2.3 Extraction des acides ribonucléiques viraux

Les ARN viraux de la souche SwQc91 ont été extraits à l'aide du TRIzol (GibcoBRL) d'après le protocole du manufacturier. Ainsi, un volume de 3 ml de liquide allantoïque ayant un titre hémagglutinant de 256 UHA/ml, a été ultracentrifugé à 100 000 x g à 4°C pendant 1 heure. Le culot obtenu a été resuspendu dans 1 ml de TRIzol pour permettre la lyse des cellules. Ensuite, le mélange a été incubé 5 minutes à TP, suivi de l'ajout de 266 µl de chloroforme. Après une agitation vigoureuse, le mélange a été incubé 15 minutes et centrifugé (Eppendorf model 5415 C : Brinkman) à 10 000 x g pendant 15 minutes à 4°C. Suite au prélèvement de la phase supérieure aqueuse non-colorée contenant l'ARN, celle-ci a été transférée dans un tube préalablement traité pour éliminer les ARNases, auquel 750 µl d'alcool isopropylique (Sigma) a été ajouté pour précipiter l'ARN. Après une incubation de 10 minutes à TP, le mélange a été centrifugé à 10 000 x g pendant 10 minutes à 4°C. L'ARN recueilli (culot), a été lavé avec 1,33 ml d'éthanol 75 %, suivi d'une centrifugation à 10 000 x g pendant 5 minutes à TP. Par la suite, le culot a été séché sous la hotte chimique pendant 15 minutes et redissous dans un volume de 20 µl d'H₂O traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC ; Sigma) auquel a été ajouté 1 µl de RNAsine (Pharmacia Biotech). Finalement, les ARN extraits ont été dosés au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 260 nm (Appendice II) et la pureté de l'échantillon d'ARN a été déterminé par un rapport des densités optiques à des longueurs d'ondes de 260 nm et 280 nm (Appendice II).

2.4 Synthèse et amplification de l'ADNc codant la protéine M1 (gène M)

2.4.1 Amorces oligonucléotidiques

Des amorces nucléotidiques sens et anti-sens ont été synthétisées par le service de synthèse des oligonucléotides de l'Institut Armand-Frappier pour les réactions de transcription inverse (RT) et d'amplification par polymérisation en chaîne (PCR). La première amorce nommée sens M/F 26-43 (5' GAC GCT TCT CAT ATG AGT CTT CTA ACC GAG 3') est complémentaire aux nucléotides 26 à 43 de la séquence nucléotidique du de l'ADNc du gène M qui code la protéine M1 (GenBank #AF188004). Le site de restriction de l'endonucléase Nde1 (5' CAT ATG 3') a été ajouté à cette amorce pour permettre le clonage dans le vecteur d'expression pET21a (+). Dans le but de permettre une meilleure hybridation, la séquence 5'GAC GCT TCT 3' a été ajoutée pour que la quantité de G et de C représente environ 50 % de la composition de l'amorce. La deuxième amorce nommée anti-sens M/R 978-996 (5' CGC GCG AAG CTT CTA TGT TGA CAA AAT GAC 3'), est complémentaire à l'inverse de la séquence correspondant aux nucléotides 978 à 996 de l'ADNc du gène M. L'amorce présente un site de reconnaissance (5'AAG CTT 3') pour l'enzyme de restriction HindIII permettant le clonage dans le plasmide pET21a(+). De plus, la séquence 5'CGC GCC 3' a été ajoutée pour augmenter le contenu en GC pour permettre une meilleure hybridation de l'amorce.

2.4.2 Synthèse de l'ADNc simple brin

Par l'utilisation de l'amorce anti-sens M/R 978-996 décrite précédemment, l'ARN du segment 7 qui code les protéines de la matrice, a été inversement transcrit en ADNc par réaction de transcriptase inverse. Ainsi, un volume 5 µl de l'ARNv extrait (3 µg) a été prélevé et déposé dans un tube Eppendorf préalablement traité pour éliminer les ARNases.

Par la suite, dans le tube ont été ajoutés respectivement : 1 μl de RNAsine (Pharmacia Biotech), 1 μl de l'amorce M/R 978-996 (50 pmol/ μl) et 5 μl d' H_2O distillée traitée au DEPC. Après une incubation de 15 minutes à 70°C, le mélange a été refroidi sur glace 15 minutes et centrifugé 10 secondes à 10 000 x g à 4°C. Ensuite, 7 μl d'un mélange contenant 4 μl de tampon 5X (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2) (GibcoBRL), 2 μl de 0,1 M dithiothréitol (DTT) (GibcoBRL) et 1 μl de 10 mM dNTP (GibcoBRL) a été ajouté au mélange réactionnel. Après une incubation de 2 minutes à 42°C, 1 μl de Superscript II (200U) (GibcoBRL) a été ajouté et la solution a été incubée 50 minutes à 42°C, suivi d'une seconde incubation de 15 minutes à 70°C pour inactiver l'enzyme. Finalement, le mélange a été refroidi sur glace, puis centrifugé 10 secondes à 10 000 x g et conservé à -20°C.

2.4.3 Amplification de l'ADNc

La réaction de polymérisation en chaîne a été réalisée en ajoutant les produits nécessaires dans l'ordre suivant : 77,5 μl d'eau distillée stérile, 10 μl de tampon PCR 10 X sans Mg^{2+} (GibcoBRL), 3 μl de MgCl_2 50 mM (GibcoBRL), 2 μl de dNTP 10 mM (GibcoBRL), 2,5 μl de l'amorce 26-43 M/F (50 pmol/ μl), 2,5 μl de l'amorce M/R 978-996 (50 pmol/ μl), 3 μl de l'ADNc obtenu de la réaction de transcription inverse et 0,5 μl d'ADN taq polymérase (5 U/ μl) (GibcoBRL). Dans un second tube correspondant au témoin négatif, l'ADNc a été remplacé par de l' H_2O distillée traitée au DEPC. À ces mélanges a été ajouté, 100 μl d'huile minérale (Sigma) pour éviter l'évaporation de l'échantillon, lors des changements de température pendant les cycles d'amplification. Les réactions d'amplification ont été effectuées par le biais d'un thermocycleur (MiniCycler, Perkins). Les 35 cycles d'amplification ont été effectués comme suit : une étape de dénaturation de 45 secondes à 95°C, une hybridation de 1 minute à 55°C, une extension de 1 minute à 72°C et au dernier cycle une étape d'extension finale de 10 minutes à 72°C. Après l'amplification, les échantillons ont été refroidis à 4°C puis analysés par une migration sur gel d'agarose. Après l'immersion du gel d'agarose 0,8 % (p/v) dans le tampon TAE 1 X

(Appendice I, section 1.07C), un volume de 0,30 μ l de marqueur moléculaire (1 Kb DNA ladder; GibcoBRL) dilué dans 10 μ l de tampon échantillon 6 X et 10 μ l du produit de RT-PCR mélangé à 2 μ l de tampon échantillon 6 X ont été déposés dans différents puits du gel. La migration des échantillons s'est effectuée pendant 40 minutes à 90 V à l'aide du générateur de courant Bio-Rad 250/2,5. Par la suite, le gel a été coloré avec une solution de bromure d'éthidium (5 mg/ml) (Appendice I, section 1.07E) pendant 45 minutes, puis rincé brièvement dans l'eau distillée. Les bandes d'ADN ont pu être visualisées par une exposition aux rayons ultraviolets (UV).

2.5 Clonage et séquençage du gène M dans le vecteur pCR2.1

2.5.1 Clonage du gène M dans le vecteur pCR2.1

2.5.1.1 Purification des produits d'amplification

Les produits de PCR obtenus à l'étape précédente ont été purifiés à l'aide du "GeneClean kit" (Bio101, Vista, CA, USA), d'après la méthode proposée par le manufacturier. Ainsi, un volume de 1 μ l des produits de PCR a été mélangé à 6 μ l de tampon d'échantillon 6 X, puis le tout a été déposé dans un puits d'un gel d'agarose 0,8 %. Les conditions électrophorétiques décrites à la section 2.4.3 ont été appliquées. Après une exposition aux rayons ultraviolets d'une longueur d'onde de 254 nm, les fragments d'ADNc correspondant au gène M ont été extraits du gel à l'aide d'un scalpel, puis déposés dans un tube Eppendorf pré-pesé. Trois volumes de solution d'iodure de sodium déterminés selon le poids du morceau de gel d'agarose prélevé (1g = 1 ml), ont été ajoutés au tube Eppendorf. Ensuite, le mélange a été incubé à 55°C pendant 5 à 7 minutes jusqu'à la dissolution de l'agarose. Après l'addition de 5 μ l de billes de silice (Glassmilk), le mélange a été agité vigoureusement et incubé 15 minutes à température pièce en prenant soin de mélanger à chaque minute pour resuspendre les billes de silice. Par la suite, le tube a été centrifugé 10 secondes à 10 000 x g à TP et le culot a été resuspendu dans 0,3 ml de la

solution de lavage (NEW WASH), suivi d'une centrifugation de 10 secondes à 10 000 x g. Ensuite, deux autres lavages ont été effectués et après avoir rejeté le surnageant, le culot a été resuspendu dans 5 µl d'H₂O distillée stérile et incubé à 55°C pendant 2 à 3 minutes. Après cette incubation, le tube a été centrifugé 30 secondes à 10 000 g pour récolter le surnageant. Cette étape a été répétée une deuxième fois pour obtenir un volume final de 10 µl. Finalement, l'ADN obtenu a été quantifié à l'aide du spectrophotomètre à une longueur d'onde de 260 nm (Appendice II).

2.5.1.2 Ligation

L'ADNc codant pour la protéine de la matrice (gène M) a été cloné en premier lieu dans le vecteur pCR2.1 (Figure 2) provenant de la trousse TA cloning Kit (Invitrogen). Ce vecteur linéarisé favorise sa ligation avec le fragment d'ADN par la présence d'une déoxythymidine (T) libre à l'extrémité 3' et d'une déoxyadénosine (A) libre à l'extrémité 5' de l'insertion ajoutée par la Taq polymérase lors de la réaction d'amplification. Ainsi, les produits suivants ont été déposés dans un tube Eppendorf ; 2 µl de vecteur pCR2.1 (25 ng/µl), 1,8 µl (70 ng) de l'ADNc purifié, 2 µl de tampon de ligation 5X (250 mM Tris-HCl pH 7,6, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25 % (v/v) polyéthylène glycol-8000) (GibcoBRL), 4 µl de ligase à ADN du phage T4 (1U/µl) (GibcoBRL) et 0,2 µl d'H₂O distillée stérile. Après avoir agité, le mélange réactionnel a été incubé à 14°C pendant 16 heures, puis conservé à - 20°C.

2.5.1.3 Transformation des bactéries Top 10

La transformation des bactéries a été effectuée d'après les directives du manufacturier (Invitrogen). Les solutions et les milieux utilisés pour la transformation sont décrits à la section 1.09 de l'Appendice I. Ainsi, 2 µl de β-mercaptoéthanol 0,5 M (Invitrogen) et 2 µl du produit de ligation ont été ajoutés à un tube contenant 50 µl de bactéries compétentes Top 10 (Invitrogen) conservé sur glace. Après une incubation de 30 minutes sur glace, le tube a été transféré pendant 30 secondes dans un bain à 42°C pour

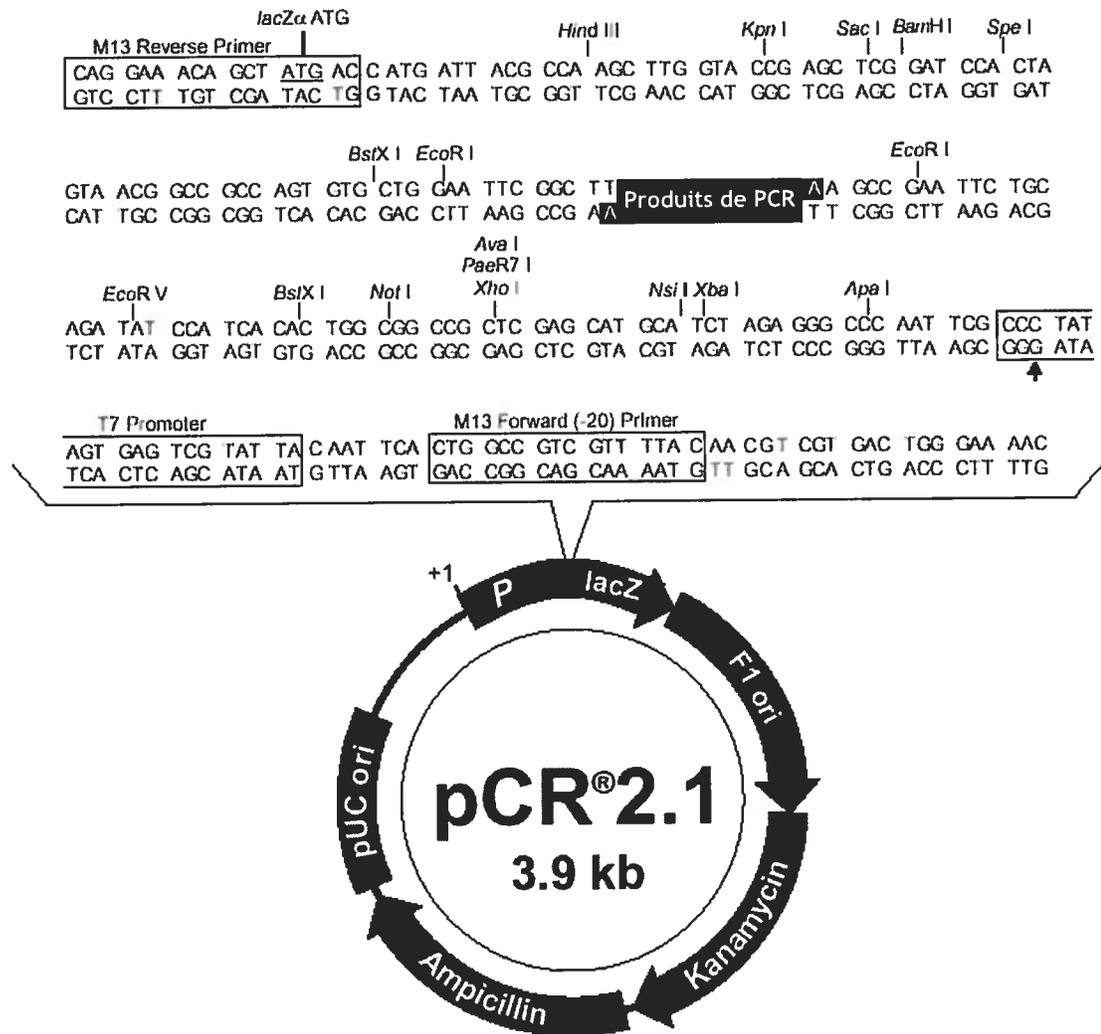


Figure 2 Clonage du gène M de la souche influenza SwQc91 dans le plasmide pCR2.1. D'après la représentation schématique de la compagnie Invitrogen (2002).

Les fragments d'ADNc représentant le gène M, a été cloné dans le vecteur pCR2.1. La taille du vecteur est de 3,9 Kb. Le plasmide présente des sites de reconnaissance pour diverses endonucléases de restriction et un promoteur *P*_{lac}. Il contient le gène de résistance à l'ampicilline et à la kanamycine pour la sélection des plasmides recombinants, l'origine ColE1 pour la répliation et l'origine f1 de la transcription. Des sites sont présents pour les amorces M13, Sp6 et le site du promoteur du phage T7 pour le séquençage de l'insertion.

induire un choc thermique, puis le tube a été rapidement déposé sur glace pendant 2 minutes. Ensuite, 450 μ l de milieu SOC décongelé et maintenu à la TP ont été ajoutés au tube, suivi d'une incubation de 90 minutes à 37°C en position horizontale avec agitation constante (225-250 RPM). Par la suite, des volumes de 50 μ l, 100 μ l, 150 μ l et 200 μ l de culture bactérienne ont été disposés sur des Pétris contenant 20 ml de milieu LB avec agar noble (Difco), 100 μ g/ml d'ampicilline (Sigma) et 40 μ l de bromo-4-chloro-3-indolyl-béta-D-galactopyranoside 40 mg/ml (X-Gal ; GibcoBRL). Après une incubation de 18 heures à 37°C, les colonies recombinantes ont été sélectionnées par leur phénotype négatif d'activité de la β -galactosidase, ainsi que par leur résistance à l'ampicilline. Les cellules transformées avec un plasmide recombinant présentaient un phénotype blanc à cause de la présence de l'insertion dans le gène de la β -galactosidase et les autres un phénotype bleu par la conservation de l'activité de cette enzyme.

2.5.1.4 Sélection des clones positifs

La technique du "boiling miniprep" (Ausebel *et al.*, 1995) a permis de cribler les colonies ayant reçu le plasmide recombinant pCR2.1-M. En premier lieu, les colonies qui présentaient un phénotype blanc ont été sélectionnées et prélevées à l'aide d'un fil bouclé, puis transférées dans 2 ml de milieu LB supplémenté de 100 μ g/ml d'ampicilline. Les milieux de culture ont été incubés 18 heures à 37°C pour permettre la croissance bactérienne. Après l'incubation, les cultures bactériennes ont été centrifugées pendant 2 minutes à 10 000 x g à TP puis le culot a été resuspendu dans un mélange composé de 0,3 ml de milieu STET (Appendice I, section 1.08), 20 μ l de lysozyme 10 mg/ml (Worthington, Biochemicals Co), et 2 μ l d'ARNase (1 mg/ml) (Pharmacia Biotech). Suite à une incubation de 5 minutes à température pièce, le mélange a été bouilli pendant 2 minutes et centrifugé 5 minutes à 10 000 x g. Le culot a été prélevé à l'aide d'un embout de pipette automatique (Gilson) puis 0,3 ml d'une solution d'isopropanol 75 %/ 2,5 M acétate d'ammonium a été ajouté au surnageant pour précipiter l'ADN plasmidique. Après une

centrifugation de 5 minutes à 10 000 x g, le culot a été lavé avec 0,3 ml d'éthanol 70 % froid (-20°C) puis centrifugé 5 minutes à 10 000 x g. Par la suite, le surnageant a été prélevé et le surplus d'éthanol a été évaporé sous la hotte chimique pendant 15 minutes. Le culot correspondant à l'ADN plasmidique a été resuspendu dans 45 µl d'H₂O distillée stérile puis digéré avec l'enzyme de restriction EcoR1, afin de sélectionner les colonies possédant l'insertion. Dans un tube Eppendorf ont été déposés, 5 µl d'ADN plasmidique obtenu de l'étape précédente, 2 µl de tampon React 3 10 X (GibcoBRL; 0,5 M Tris-HCl pH 8,0, 0,1 M MgCl₂, 1 M NaCl), 1 µl (10 U) d'enzyme EcoR1 (GibcoBRL) et 10 µl d'H₂O distillée. Ce mélange a été incubé 60 minutes à 37°C dans un bain-marie puis déposé dans un puits du gel d'agarose (0,8 %) soumis aux conditions électrophorétiques de la section 2.4.3. Les colonies présentant un fragment d'ADN de 1,027 Kb ont été sélectionnées pour l'étape suivante.

2.5.2 Séquençage

L'ADN plasmidique de la colonie 7 (C7) utilisé pour le séquençage du gène M, a été purifié à l'aide de la trousse "Wizard Plus Miniprep DNA Purification System" (Promega, Madison, WI, USA) d'après la méthode de lyse alcaline proposée par le manufacturier. Ainsi, la colonie C7 a été cultivée dans 10 ml de milieu LB supplémenté de 100µg/ml d'ampicilline et incubée pendant 18 heures à 37°C avec agitation constante. La culture bactérienne obtenue a été centrifugée 2 minutes à 10 000 x g, puis un volume de 0,4 ml de solution de resuspension (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 100µg/ml Rnase) a été ajouté au culot bactérien pour le resuspendre. Après l'ajout de 0,4 ml de solution de lyse (0,2 M NaOH, SDS 1%) la suspension a été mélangée par inversion jusqu'à ce qu'elle devienne claire. Par la suite, un volume de 0,4 ml de solution de neutralisation (1,32 M acétate de potassium pH 5,1) a été ajouté rapidement et la suspension a été mélangée par inversion. Après une centrifugation de 5 minutes à 10 000 x g à TP, le surnageant a été récolté et déposé dans un tube contenant 1 ml de résine. La suspension a été mélangée à l'aide d'une pipette automatique (Gilson) et déposée dans une seringue de 5 ml (Fisher)

avec comme embout une mini-colonne (Promega). Un volume de 2 ml de la solution de lavage (80 mM acétate de potassium, 40 μ M EDTA, 8,3 mM Tris-HCl pH 7,5, 55 % (v/v) éthanol) a été ajouté à la seringue. Par la suite, la mini-colonne a été déposée dans un tube Eppendorf et le tube a été centrifugé 2 minutes à 10 000 x g à TP. Pour éluer l'ADN attaché à la résine, 50 μ l d'H₂O distillée chauffée à 55°C a été ajouté à la mini-colonne, puis l'ADN a été recueilli par une centrifugation de 30 secondes à 10 000 x g à TP. Finalement, l'ADN plasmidique extrait a été dosé au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 260 nm (Appendice II) et la pureté de l'échantillon d'ADN a été déterminée par un rapport des densités optiques à des longueurs d'ondes de 260 nm et 280 nm (Appendice II) ainsi que par une électrophorèse en gel d'agarose 0,8 % (Appendice II, section 1.18).

La composition en nucléotides de l'insert a été révélée à l'aide d'un séquenceur automatique "ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer)" d'après la méthode de Sanger, Nicklen et Coulson (1977). Cette technique est basée sur l'ajout de didéoxynucléotides par l'ADN polymérase du phage T7. L'amorce universelle sens (5'-GTA AAA CGA CGG CCAG-3'), située en amont du site de restriction EcoR1 du vecteur pCR2.1, l'amorce anti-sens M13 (5'CAG GAA ACA GCT ATGA-3') et l'amorce interne 721-742 (5'- GGC CTG TAA ATT TTC CAA GAA GA- 3') ont été utilisées pour le séquençage.

2.6 Sous-clonage du gène M dans le vecteur d'expression pET21a(+)

2.6.1 Préparation du vecteur d'expression et du gène M

Les plasmides recombinants (pCR2.1-M) de la colonie positive (C7) préalablement purifiés ainsi que le vecteur d'expression pET21a(+) (Figure 3) ont été digérés par les enzymes de restriction, NdeI et Hind III. Dans un tube Eppendorf de 0,5 ml, les réactifs

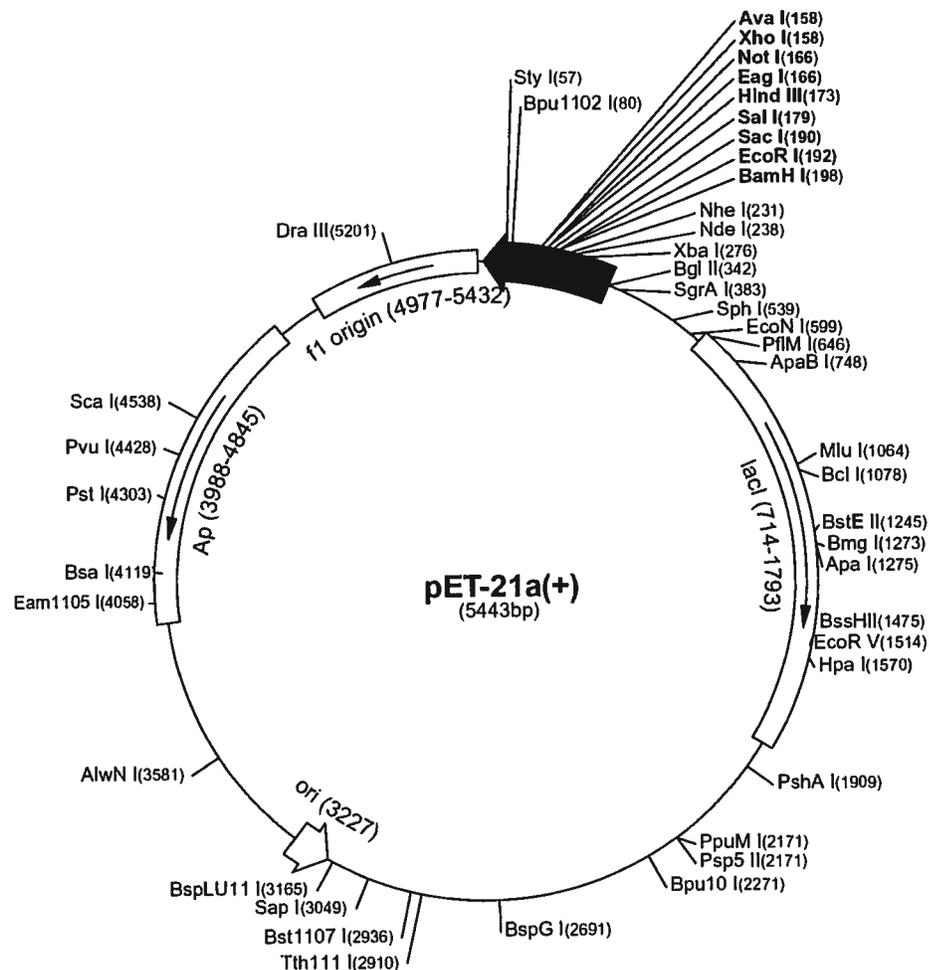


Figure 3 Sous-clonage du gène M de la souche influenza SwQc91 dans le vecteur d'expression pET21a(+). D'après la représentation schématique de la compagnie Novagen (2002).

Les fragments d'ADNc représentant le gène M, préalablement digérés des plasmides recombinants pCR2.1-M, avec les enzymes de restriction NdeI et HindIII, ont été clonés dans le vecteur d'expression pET21a(+). Ce plasmide présente une taille de 5,4 Kb et des sites de reconnaissance pour plusieurs endonucléases de restriction. Il contient le gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection des plasmides recombinants, un site de liaison pour les ribosomes (rbs), l'opérateur lac, une origine de répliation et l'origine de f1 de la transcription. De plus, il présente un promoteur T7 ainsi qu'une séquence T7 tag et une séquence Histidine-Tag (His-Tag) pour la purification des protéines (non-illustré).

suivants ont été déposés ; 2 µl de pCR2.1-M (C7) (0,36 µg/µl) ou 2 µl du vecteur pET21a(+) (Invitrogen), 2 µl de tampon 10 X réactif 2 (GibcoBRL; 0,5 M Tris-HCl pH 8,0, 0,1 M MgCl₂, 0,5 M NaCl), 10 unités de l'enzyme NdeI (GibcoBRL), 10 unités de l'enzyme HindIII (GibcoBRL) et 9 µl d'H₂O distillée stérile. Le mélange réactionnel a été incubé pendant 70 minutes à 37°C. Par la suite, l'ADN digéré a été analysé par une électrophorèse en gel d'agarose 0,8 % tel que décrit précédemment (section 2.4) et purifié à l'aide de la trousse GeneClean (section 2.5.1.1).

2.6.2 Clonage du gène M dans le vecteur pET21a(+)

Le clonage a été effectué d'après le protocole du manufacturier (Invitrogen). Dans un tube Eppendorf de 0,5 ml ont été déposés les réactifs dans l'ordre suivant : 60 ng du gène M purifié (C7), 60 ng du vecteur pET21a(+) linéarisé (section 2.6.1), 1 µl de tampon de ligation 10 X (Invitrogen), 3,5 µl de l'enzyme ligase à ADN du phage T4 (1U/µl) (GibcoBRL) et un volume d'H₂O distillée a été ajouté pour compléter le volume à 10 µl. Par la suite, ce mélange a été incubé 18 heures à 14°C permettant la ligation du vecteur et du gène M suivi d'un entreposage à -20 °C.

2.6.3 Transformation des bactéries *E. coli* BL21(DE3)

La transformation des bactéries *E. coli* a été effectuée d'après les indications du manufacturier (Stratagene). Dans un tube de propylène contenant 100 µl de bactéries BL21(DE3) compétentes (Stratagene) a été ajouté 1,7 µl de β-mercaptoéthanol 1,42 M (Sigma) puis le tout a été mélangé doucement avec l'embout d'une pipette automatique (Gilson). Le tube a été incubé sur glace pendant 10 minutes, en prenant soin de mélanger à toutes les deux minutes. Par la suite, 50 ng du produit de ligation (section 2.5.1.2) a été ajouté au mélange, suivi d'une incubation de 30 minutes sur glace. Le tube a été transféré dans un bain à 42 °C pendant 45 secondes puis déposé sur glace pendant deux minutes. Un volume de 0,9 ml de milieu SOC (Appendice I, section 1.09C) a été ajouté au tube, suivi

d'une incubation à 37°C avec agitation constante (225-250 RPM) pendant 60 minutes. Des volumes de 50 µl, 100 µl, 150 µl et 200 µl de la culture bactérienne ont été étalés sur des Pétris de milieu LB avec agar noble (Difco) supplémentés de 100 µg/ml de carbanicilline (Calbiochem) et les Pétris ont été incubés 18 heures à 37°C.

2.7 Expression de la protéine M1 recombinante

2.7.1 Criblage des colonies exprimant la protéine M1 recombinante

Quelques colonies obtenues lors de l'étape précédente (2.6.3) prélevées à l'aide d'un fil bouclé, ont été transférées dans 2 ml de milieu LB avec 100 µg/ml de carbanicilline (Calbiochem) et incubées 18 heures à 37°C avec agitation constante. Après l'incubation, un volume de 200 µl de chaque suspension bactérienne obtenue a été déposé dans 1,8 ml de milieu LB supplémenté de 100 µg/ml de carbanicilline. Par la suite, les cultures bactériennes ont été incubées à 37°C jusqu'à l'obtention d'une absorbance située entre 0,6 et 0,8 lue à une longueur d'onde de 600 nm. Pour induire l'expression de la protéine recombinante, un volume de 20 µl d'isopropyl-1-β-thiogalactoside 100 mM (IPTG; GibcoBRL) (Appendice I, section 1.09G) a été ajouté à chaque tube, suivi d'une incubation de 90 minutes à 37°C avec agitation constante. Après l'incubation, les tubes ont été déposés sur la glace, et un volume de 20 µl de phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride 100 mM (PMSF; Sigma) (Appendice I, section 1.09) a été ajouté pour inhiber l'action des protéases cellulaires. Par la suite, chaque culture bactérienne a été recueillie et transférée dans un tube de 1,5 ml puis une centrifugation de 2 minutes à 10 000 x g à 4°C a permis de recueillir un culot bactérien. Les culots ont été resuspendus dans 0,3 ml de PBS 10 mM pH 7,2 supplémenté de 1 mM de PMSF.

Pour sélectionner les colonies bactériennes qui expriment la protéine M1 recombinante (M1r), une électrophorèse en gel de polyacrylamide composé d'un gel de séparation de 12 % et d'un gel de chargement de 4 % a été effectuée. Un volume de 10 µl de chaque échantillon a été mélangé à 10 µl de tampon échantillon 2 X et 4 µl de standard

protéique “High Range” (GibcoBRL) comprenant la phosphorylase B (97,4 kDa), la BSA (68,0 kDa), l’ovalbumine (45,0 kDa), l’anhydrase carbonique (29,0 kDa), la β -lactoglobuline (18,4 kDa) et le lysozyme (14,4 kDa) ont été ajoutés à 4 μ l de tampon échantillon 2 X. Ensuite, les échantillons ont été bouillis pendant 5 minutes. Les échantillons ont par la suite été déposés dans les puits du gel puis la migration a été effectuée en appliquant les conditions électrophorétiques décrites à la section 2.1.5 puis le gel a été coloré (section 2.1.5). Chacune des colonies exprimant la protéine recombinante a été conservée à -80°C .

2.7.2 Analyse des niveaux d’expression de la protéine M1 recombinante

Certains paramètres tels que la température, le temps d’incubation et la concentration d’IPTG ont été évalués pour déterminer les conditions optimales d’expression de la protéine M1r. Ainsi, 24 tubes de suspensions bactériennes ont été préparés comme suit : un volume de 200 μ l d’une culture bactérienne exprimant la protéine M1r a été déposé dans 1,8 ml de milieu LB avec carbanicilline. Ensuite, chaque tube a été incubé à 37°C jusqu’à l’obtention d’une absorbance située entre 0,6 et 0,8 lue à une longueur d’onde de 600 nm. Par la suite, les tubes ont été groupés par 4 et divisés en 6 séries, ils ont été incubés à divers temps (2, 4, 8 et 18 heures), à une température déterminée (25°C , 28°C , 33°C et 37°C) avec 0,5 mM ou 1 mM d’IPTG. Par la suite, les échantillons ont été récoltés selon les conditions décrites à la section 2.7.1. Pour déterminer les conditions optimales d’expression, une électrophorèse en gel de polyacrylamide 12 % a été réalisée telle que décrite à la section 2.1.5. Un volume de 10 μ l de chaque échantillon a été mélangé à 10 μ l de tampon échantillon 2 X et 4 μ l de standard de masse moléculaire High range 18,4 kDa-97,4 kDa (GibcoBRL) a été ajouté à 4 μ l de tampon 2 X, suivi d’une incubation à 100°C pendant 5 minutes. Ensuite, les échantillons ont été déposés dans les puits du gel puis la migration a été effectuée en appliquant les conditions électrophorétiques décrites à la section 2.1.5, suivi d’une coloration.

2.7.3 Analyse de la solubilisation de la protéine M1 recombinante

Après avoir déterminé les conditions optimales d'expression, la solubilité de la protéine recombinante exprimée a été analysée. L'échantillon bactérien exprimant la protéine M1r incubé à 37°C pendant 8 heures avec 0,5 mM d'IPTG obtenu à la section précédente, a été sélectionné pour l'évaluation de la solubilité de la protéine recombinante. Ainsi, après la resuspension du culot bactérien dans un volume de 0,3 ml de PBS, celui-ci a été traité aux ultra-sons 3 fois pendant 10 secondes à 30 MHz à l'aide du Sonic Dismembrator (Fisher, Scientific, Farmingdale, New York, USA). Suite à la sonication, le lysat bactérien a été centrifugé pendant 2 minutes à 10 000 x g, et le surnageant a été récolté. Le culot a été resuspendu dans un volume 50 µl de tampon échantillon 2 X et un volume de 30 µl du surnageant a été mélangé à un volume égal de tampon échantillon. Les échantillons ont été incubés 5 minutes à 100°C, suivi d'une analyse sur gel de polyacrylamide 12 % d'après les conditions électrophorétiques de la section 2.1.5.

Les protéines recombinantes ont été solubilisées par un traitement impliquant des agents dénaturants et réducteurs (SDS, β-mercaptoéthanol). Un volume de 100 µl de tampon échantillon 2X supplémenté de 100 mM de Tris-HCl pH 7,5 était ajouté au culot bactérien, suivi d'une incubation de 30 minutes à 50°C.

2.7.4 Production de la protéine M1 recombinante

Un volume de 200 ml de milieu LB supplémenté d'antibiotique a été inoculé de 1 ml de suspension bactérienne exprimant la protéine M1 recombinante, puis incubé à 37°C jusqu'à l'obtention d'une absorbance située entre 0,6 et 0,8 lue à une longueur d'onde de 600 nm. Par la suite, l'induction de l'expression de la protéine a été réalisée en incubant les suspensions bactériennes à 37°C pendant 8 heures avec 0,5 mM d'IPTG. Ensuite, les conditions décrites à la section 2.7.1 ont été appliquées en ajustant toutefois les volumes d'IPTG, de PMSF et de PBS.

2.7.5 Purification de la protéine M1 recombinante

L'appareil électrophorétique "Protein Cell Slab" (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA., USA) a été utilisé pour la purification de la protéine M1r d'après les directives du fabricant. Un volume de 1,2 ml de culture bactérienne obtenue à l'étape précédente a été déposé dans un tube Eppendorf puis les protéines ont été solubilisées d'après les conditions décrites à la section 2.7.3. L'échantillon a été déposé à l'aide d'une seringue de 5 ml munie d'une aiguille 23 G (Fisher) dans le puits large d'un gel de polyacrylamide composé d'un gel de chargement de 4 % et d'un gel de séparation de 12 %. (Appendice I, section 1.04). Un volume de 4 µl de marqueur de masse moléculaire High Range (Gibco BRL) a été déposé dans le puits étroit. La migration des échantillons a été effectuée à 50 V pendant 18 heures à l'aide d'un générateur de courant Bio-Rad 250/2,5 dans un tampon d'électrophorèse. Après l'électrophorèse, les extrémités du gel ont été découpées d'après la méthode suggérée par Arora (1992), puis colorées avec une solution de bleu de Coomassie (Sigma), selon les conditions décrites à la section 2.1.5. Avec les extrémités colorées remises sur le gel, la bande correspondant à la protéine M1 recombinante (environ 28 kDa) a été extraite à l'aide d'un scalpel. Par la suite, les protéines ont été électroéluées, dialysées et concentrées selon les conditions décrites à la section 2.2 et la pureté des échantillons a été analysée sur un gel de polyacrylamide de 12 %.

2.8 Évaluation de l'antigénicité de la protéine M1 recombinante

2.8.1 Transfert électrophorétique

Pour démontrer la réactivité d'un sérum de porc polyclonal anti-SwQc91 avec la protéine matrice recombinante, un immunobuvardage a été réalisé d'après la méthode suggérée par Sambrook, Fritsh et Maniatis, (1989). Les solutions et tampons utilisés pour le transfert sont décrits dans la section 1.12 de l'Appendice I. Le transfert électrophorétique a été réalisé en préparant un gel de séparation de 12 % et un gel de chargement de 4 %.

2.9 Évaluation de l'immunogénicité de la protéine M1 recombinante

2.9.1 Immunisation

La méthode d'immunisation des souris a été réalisée d'après le manuel *Antibodies* (Harlow et Lane, 1988). Ainsi, des souris BALB/c (Charles River, St-Constant, Québec) femelles, âgées de 6 semaines et divisées en trois groupes de 3 souris ont été utilisées. Chaque groupe de souris a été immunisé avec un antigène différent. Les souris du groupe 1 ont été immunisées avec du PBS 10 mM pH 7,2 (témoin négatif), celles du groupe 2 ont été immunisées avec la protéine M1 virale purifiée (témoin positif) et les souris du groupe 3 ont été immunisées avec la protéine M1r purifiée. Les souris ont été injectées à trois reprises, à 14 jours d'intervalle de façon intrapéritonéale à l'aide d'une seringue de 1 ml (Fisher) munie d'une aiguille 26 G (Fisher).

À chacune des injections, une quantité de 50 µg de protéine a été administrée aux souris des groupes 2 et 3. Le volume d'échantillon de protéine à injecter était complété à 250 µl avec du tampon PBS 10 mM pH 7,2. Lors de la première injection, les souris des groupes 1 à 3 ont reçu 0,5 ml d'une émulsion formée de 250 µl d'antigène et 250 µl d'adjuvant de Freund complet (Difco). Lors des injections de rappel, données respectivement au jour 14 et 28, les souris ont reçu les mêmes doses d'antigène mais jumelées avec l'adjuvant de Freund incomplet. Des échantillons sanguins ont été prélevés au niveau du sinus veineux de l'orbite oculaire, aux jours 0 (sérum pré-immun), 24, 38 et 54.

2.9.2 Test ELISA indirect

Le test ELISA indirect a été réalisé avec des sérums de souris immunisées (PBS, M1 virale, M1 recombinante) pour démontrer leur réactivité contre la protéine M1 virale.

Le test ELISA indirect a été réalisé d'après la méthode retrouvée dans le manuel Anticorps (Harlow et Lane, 1988). La première étape a été d'ajuster la concentration de protéine M1 virale purifiée à 1 µg/ml dans du tampon carbonate (0,05 M Na₂CO₃-NaHCO₃ (Baker), pH 9,6) (Appendice I, section 1.13A). Par la suite, un volume de 50 µl de cette solution préparée, a été déposé dans les puits d'un plateau de 96 puits à fonds plats (Linbro/Titertek, ICN), suivi d'une incubation 18 heures à 4°C.

Après l'incubation, les puits ont été lavés à deux reprises avec 0,3 ml d'une solution de lavage (PBS, Tween-20, 0,05 %) puis saturés en ajoutant un volume de 0,3 ml d'une solution de blocage composée de 2% (p/v) BSA et 0,1% (v/v) Tween-20 dans 10 mM de PBS à pH 7,2 (Appendice I, section 1.13D). Après une incubation de 2 heures à TP, une série de trois lavages a été effectuée avec 0,3 ml de solution de lavage. Par la suite, un volume de 50 µl de solution de dilution composée de 1% BSA et 0,05% Tween-20 (Appendice I, section 1.13E) a été ajoutée dans tous les puits des colonnes 2 à 10. Un volume de 100 µl des sérums de tous les groupes, dilués 1 : 500 dans la solution de dilution, a été ajouté dans la première colonne. Par la suite, des dilutions sérielles des sérums ont été effectuées en duplicata et les plateaux ont été incubés pendant 60 minutes à TP. Une fois l'incubation terminée, les puits ont été lavés à cinq reprises avec 0,3 ml de la solution de lavage et un volume de 50 µl d'un anticorps secondaire de chèvre couplé à la peroxydase (Bio-Rad) dilué 1 : 4000 avec le tampon de dilution a été ajouté à tous les puits. Après une incubation de 60 minutes à TP, les puits ont été lavés cinq fois avec 0,3 ml de solution de lavage. Pour révéler les réactions antigènes-anticorps, un volume de 100 µl d'une solution composée de 0,4% d'hypochlorure d'orthophénylène diamine (OPD, Sigma Chemical, Co., St-Louis, Missouri, USA) et 0,012% H₂O₂ a été ajouté dans tous les puits. Ensuite, les plateaux ont été incubés à la noirceur pendant 15 min à TP et l'ajout dans tous les puits d'un volume de 100 µl d'une solution de HCl 1N a permis d'arrêter la réaction enzymatique. L'absorbance de chaque puits a été lue à une longueur d'onde de 492 nm. (Benchmark Microplate reader, Bio-Rad, CA, USA).

2.10 Utilisation de la protéine M1 recombinante dans un test sérologique diagnostique de l'influenza porcine

Un test ELISA utilisant la protéine M1 recombinante purifiée a été développé pour détecter les anticorps anti-M1 chez des sérums de porcs. Le test IHA utilisé comme test sérologique de référence a permis de démontrer la valeur diagnostique du test développé.

2.10.1 Sérums de porcs

Les sérums de porcs utilisés pour le test IHA et pour le test ELISA ont été obtenus de la ferme Robert Lefebvre (St-Hugues, Québec) en 1995, chez des porcs de race Suïdes. Les sérums 1 à 11 (IAF-1443) ont été prélevés chez des porcelets, alors que les sérums 12 à 31 (IAF-1371) proviennent de porcs reproducteurs. De plus, un sérum pré-immun de porc obtenu du laboratoire du Dr. Serge Dea, ainsi qu'un sérum de porc hyperimmun anti-SwQc91 ont été utilisés respectivement comme témoin négatif et positif dans le test ELISA-M1r.

2.10.2 Test ELISA indirect avec la protéine M1 recombinante (ELISA-M1r)

Le test ELISA-M1r a été réalisé avec des sérums de porcs (section 2.10.1) pour démontrer la présence d'anticorps contre la protéine M1 du virus influenza. Les dilutions optimales de l'antigène et du sérum ont été préalablement déterminées par une titration en échiquier avec diverses concentrations de protéine M1r (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 et 1 µg/ml) et plusieurs dilutions (1/10, 1/20, 1/30, 1/40 et 1/50) de sérums pré-immun et immun (anti-SwQc91) de porc. La dilution optimale a été fixée à 1:10 pour les sérums de porc à tester et à 1:1000 pour la protéine M1r, ce qui correspond à une concentration de 0,6 µg/ml. Pour chaque test ELISA, un sérum témoin positif (sérum anti-SwQc91) et un sérum témoin négatif (sérum pré-immun) ont été inclus pour calculer le pourcentage de réactivité. Les

solutions de blocage du plateau ELISA composées de BSA et de lait en poudre ont été inspirées de l'étude de van der Leek, Dame et Litter (1992) pour diminuer le bruit de fond associé aux sérums de porc et accentuer la discrimination entre les sérums négatifs et positifs à l'influenza.

Ainsi, la concentration de protéine M1r a été ajustée à 0,6 µg/ml dans du tampon carbonate (0,05 M Na₂CO₃-NaHCO₃ pH 9,6) (Appendice I, section 1.13A) puis un volume de 50 µl a été absorbé au fond des puits d'un plateau de 96 puits à fonds plats (Linbro/Titertek, ICN), pendant 18 heures à 4°C. Une fois l'incubation terminée, les puits ont été lavés à deux reprises avec la solution de lavage (Appendice I, section 1.13C). Par la suite, les puits ont été saturés en ajoutant un volume de 0,3 ml d'une solution de blocage composée de 2% (p/v) BSA et 10 % (p/v) sucrose dans 10 mM de PBS à pH 7,2 (Appendice I, section 1.14A), suivi d'une incubation de 1 heure à 37°C. Suite à deux lavages avec 0,3 ml de solution de 0,05 % Tween-20 dans 10 mM de PBS pH 7,2, un volume de 0,3 ml d'une solution de blocage composée de 10 % lait en poudre (Carnation) et 0,1 % Tween-20 (Sigma) dans 10 mM PBS à pH 7,2 a été ajouté à tous les puits. Le plateau a été incubé à 37°C pendant 1 heure et les puits ont de nouveau été lavés à trois reprises avec 0,3 ml de solution de lavage. Après la dernière étape de lavage, trente sérums de porcs (section 2.10.1) ainsi qu'un sérum de porc pré-immun et immun anti-SwQc91 (témoins négatif et positif) ont été dilués dix fois dans une solution composée de 1 % BSA, 5 % sucrose, 5 % lait en poudre, 0,05 % Tween-20 (Appendice I, section 1.14C) Un volume de 50 µl de chacun des sérums a été ajouté dans les puits en duplicata et le plateau a été incubé pendant 60 minutes à TP. Après l'incubation, les puits ont été lavés à cinq reprises puis un volume de 50 µl d'un anti-IgG de porc couplé à la peroxydase (Sigma) dilué 1 : 500 avec la solution de dilution a été ajouté à tous les puits. Après une incubation de 60 minutes à TP, une dernière série de sept lavages a été effectuée avec 0,3 ml de solution de lavage. Ensuite, la révélation des réactions antigène-anticorps s'est déroulée d'après les conditions décrites à la section 2.9.2. Les valeurs obtenues ont été transformées et exprimées en pourcentage de réactivité (Appendice II, section 1.20)

2.10.3 Test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA)

Dans le but de déterminer la présence d'anticorps spécifiques à l'hémagglutinine du virus influenza chez des sérums de porcs, le test sérologique classique, le test IHA a été réalisé d'après la méthode du WHO Collaborating Centers for Reference and Research on Influenza (1982).

2.10.3.1 Inactivation des inhibiteurs non spécifiques des sérums

Les sérums de porc (section 2.10.1) ainsi qu'un témoin positif et négatif correspondant respectivement à un sérum de porc anti-SwQc91 et un sérum de porc pré-immun, ont été traités avec l'enzyme RDE (Receptor destroying enzyme; Whitteker) pour inhiber les agglutinations non-spécifiques. Ainsi, un volume de 0,4 ml de solution-stock de RDE (100 U/ml) a été ajouté à 0,1 ml de chacun des sérums dans un tube Eppendorf. Les tubes ont été agités et incubés à 37°C pendant 18 heures dans un bain-marie. Après l'incubation, un volume de 0,5 ml solution de sodium citrate 1,5 % (Appendice I, section 1.15C) a été ajouté à chacun des tubes, suivi d'une incubation de 30 minutes à 56°C. Par la suite, un volume de 50 µl de globules rouges a été ajouté à 1 ml de sérum traité, suivi d'une incubation à 4°C pendant 60 minutes avec agitation constante. Après l'incubation, les tubes ont été centrifugés à 900 x g pendant 5 minutes, puis le surnageant a été recueilli. Les sérums traités ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

2.10.3.2 Description du test d'inhibition de l'hémagglutination

La souche virale SwQc91 purifiée lors de ce projet (section 2.1.2) et la souche SwQc81 purifiée disponible dans le laboratoire du Dr. Arora ont été utilisées pour réaliser le test IHA. Après avoir ajusté les suspensions virales à 4 HA/0,025 ml, un volume de 0,025 ml de PBS a été déposé dans les puits 2 à 10 du plateau. Par la suite, un volume de 0,05 ml de chacun des sérums de porc traités a été ajouté en duplicata dans la première rangée du plateau, et des dilutions sérielles du sérum en base deux ont été effectuées en

prélevant 0,025 ml. Un volume de 0,025 ml de suspension virale a été ajouté à tous les puits, suivi d'une incubation de 45 minutes à TP. Ensuite, une préparation de 0,05 ml d'érythrocytes de coq 0,5 % (Centre de biologie expérimentale) (Appendice I, section 1.15) a été déposée dans chacun des puits du plateau. Les plateaux ont été incubés 45 minutes à TP et le titre IHA des différents sérums a été déterminé selon la réciproque de la plus haute dilution du sérum présentant une inhibition complète d'hémagglutination. Le titre IHA de plusieurs sérums de porcs a été déterminé pour démontrer la présence d'anticorps dirigés contre l'hémagglutinine.

2.10.4 Test ELISA avec la protéine M1 virale

Le test ELISA avec la protéine M1 virale a été réalisé avec des sérums de porcs (section 2.10.1) pour démontrer la présence d'anticorps contre la protéine M1 du virus influenza. La concentration de protéine M1 virale a été ajustée à 1 µg/ml dans du tampon carbonate (0,05 M Na₂CO₃-NaHCO₃ pH 9,6) (Appendice I, section 1.13A) et puis un volume de 50 µl a été absorbé au fond des puits d'un plateau de 96 puits à fonds plats (Linbro/Titertek, ICN) pendant 18 heures à 4°C. Le test ELISA a par la suite été réalisé d'après le protocole décrit à la section 2.10.2.

3 Résultats

3.1 Souche virale SwQc91

3.1.1 Purification de la souche virale

Un volume de 1,2 litre de liquide allantoïque obtenu suite à l'inoculation d'oeufs embryonnés avec une suspension virale de SwQc91, a été concentré et purifié selon la méthode de Arora *et al.*, (1985) (section 2.1.2). La suspension virale purifiée SwQc91 présentait une concentration protéique de 9,0 mg/ml et une activité hémagglutinante de $3,07 \times 10^5$ UHA/ml avec une activité spécifique de $3,4 \times 10^4$ UHA/mg.

3.1.1.1 Analyse par SDS-PAGE de la suspension virale purifiée

La pureté du virus a été analysée par le profil polypeptidique de la suspension virale SwQc91 sur gel de polyacrylamide 12 % selon la méthode de Laemmli (1970) (Figure 4). Les protéines du virus SwQc91 ont été identifiées à l'aide du profil polypeptidique observé par N'Diaye (1995). En conditions non-réductrices (puits #3), le profil polypeptidique permet d'observer plusieurs bandes protéiques correspondant à la forme dimérique (130 kDa) et monomérique (66 kDa) de la protéine HA, la forme oligomérique de NA (120 kDa), les protéines NP (56 kDa) et M1 (28 kDa). En conditions réductrices (puits 2), en plus des protéines NP et M1, les sous-unités HA₁ (46 kDa) et HA₂ (approximativement 26 kDa) sont visibles.

3.2 Analyse de la pureté de la protéine M1 virale

Après avoir purifié la souche virale SwQc91, la protéine M1 virale a été extraite de la préparation virale par la méthode d'électroélution décrite à la section 2.7.5. Après la

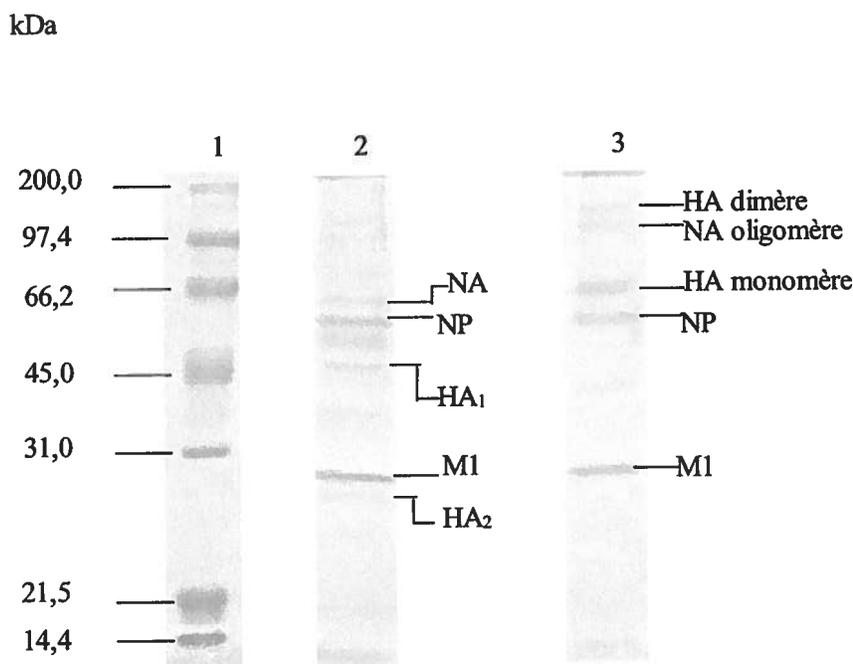


Figure 4 Analyse par SDS-PAGE du profil polypeptidique de la souche virale SwQc91 purifiée.

Les virions présents dans le liquide allantoïque infecté par la souche SwQc91 ont été concentrés par ultracentrifugation à l'aide de gradient discontinu de saccharose (section 2.1.2). Les virus purifiés ont été solubilisés avec le tampon 2X avec ou sans β -mercaptoéthanol et leur contenu protéique a été analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide tel que décrit dans la section matériel et méthodes (section 2.1.5). Les protéines ont été révélées en utilisant le bleu de Coomassie.

Puits # 1 : Marqueurs de masse moléculaire

Puits # 2 : Virus SwQc91 en conditions réductrices

Puits #3 : Virus SwQc91 en conditions non-réductrices

Les protéines virales observées correspondent à l'HA (hémagglutinine), la NA (neuraminidase), la NP (nucléoprotéine) et la protéine M1.

dialyse, la pureté de la protéine M1 virale a été analysée par migration dans un gel de polyacrylamide en présence de SDS. La Figure 5 démontre la pureté de la protéine M1 virale qui présente une seule bande à 28 kDa (puits #3).

3.3 Extraction de l'ARN viral, transcription inverse et amplification par polymérisation en chaîne de l'ADNc

Les ARN viraux ont été extraits à l'aide du TRIzol. Avec un volume de 3 ml de liquide allantoïque, une quantité totale d'ARNv de 8 µg a été obtenue. Suite à l'extraction des ARN viraux, l'ARNv du segment 7 codant les protéines de la matrice, a été inversement transcrit en ADNc par réaction de transcriptase inverse et amplifié par polymérisation en chaîne (PCR) avec les amorces sens M/F 26-43 et anti-sens M/R 978-996 (section 2.4.1). Le puits 2 de la Figure 6 montre un fragment d'ADNc d'une taille approximative de 1,027 Kb correspondant à la masse moléculaire de l'ADN codant les protéines de la matrice (gène M). Aucune bande n'a été démontrée dans le puits correspondant au témoin négatif.

3.4 Clonage du gène M dans le vecteur pCR 2.1

Après avoir extrait du gel d'agarose, les fragments d'ADNc codant pour les protéines de la matrice, ceux-ci ont été clonés dans le vecteur pCR2.1 puis les plasmides recombinants ont été utilisés pour transformer des bactéries compétentes tel que décrit à la section 2.5. Suite au criblage des colonies recombinantes, l'ADN plasmidique extrait a été digéré avec l'enzyme de restriction EcoR1 afin de vérifier la présence de l'insertion correspondant au gène M. La Figure 7 montre le profil électrophorétique sur gel d'agarose des produits de digestion des plasmides recombinants. Cette figure permet d'observer un fragment d'ADN de 3,9 Kb représentant le vecteur linéarisé pCR2.1 ainsi qu'un fragment 1,027 Kb correspondant au gène M. Les colonies C5, C7, C10 et C11 contiennent l'insertion (Figure 7).

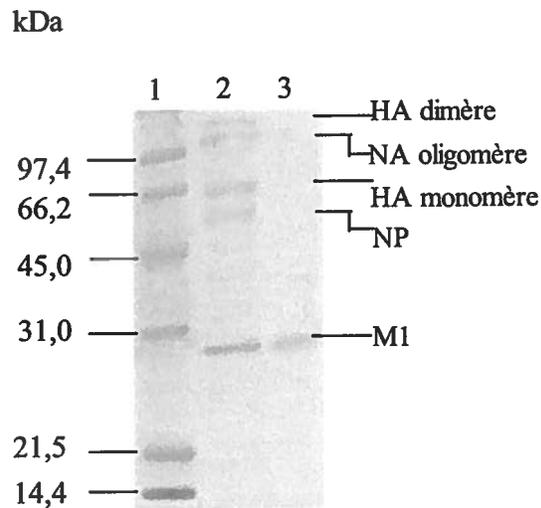


Figure 5 Analyse par SDS-PAGE de la pureté de la protéine M1 virale.

Le virus SwQc91 purifié a été solubilisé avec un tampon échantillon 2X, puis déposé dans un puits d'un gel de polyacrylamide. Après la migration des échantillons, les gels ont été incubés dans une solution de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, puis la bande correspondant à la protéine M1 virale a été excisée du gel. Par la suite, les protéines ont été électroéluées dialysées et concentrées (section 2.2). L'analyse de la pureté a été réalisée par SDS-PAGE d'après la technique de la section 2.1.5.

Puits #1 : Marqueurs de masse moléculaire

Puits #2 : Virus SwQc91

Puits #3 : Protéine M1 virale purifiée

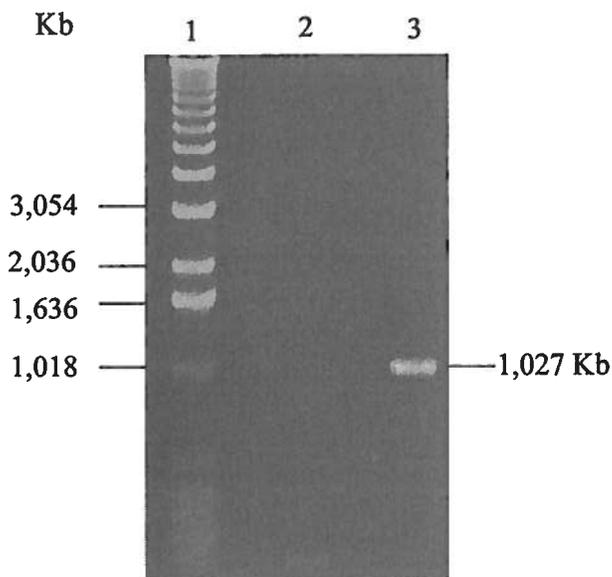


Figure 6 Électrophorèse en gel d'agarose du fragment d'ADNc correspondant au gène de la matrice de la souche virale porcine SwQc91 produit par RT-PCR

L'extraction de l'ARN viral a été réalisée selon la méthode décrite par Chomczynski et Sacchi (1987) à partir du virus SwQc91 purifié (section 2.3) Les réactions de RT-PCR ont été réalisées d'après la technique décrite à la section 2.4 avec des amorces spécifiques au gène M qui code la protéine M1. Les produits de RT-PCR ont été analysés par une électrophorèse sur gel d'agarose, coloré avec une solution de bromure d'éthidium et exposé aux rayons UV. Le témoin négatif correspond à la réaction de PCR sans ADNc.

Puits 1 : Marqueurs de masse moléculaire

Puits 2 : Témoin négatif

Puits 3 : ADNc codant les protéines de la matrice de la souche SwQc91

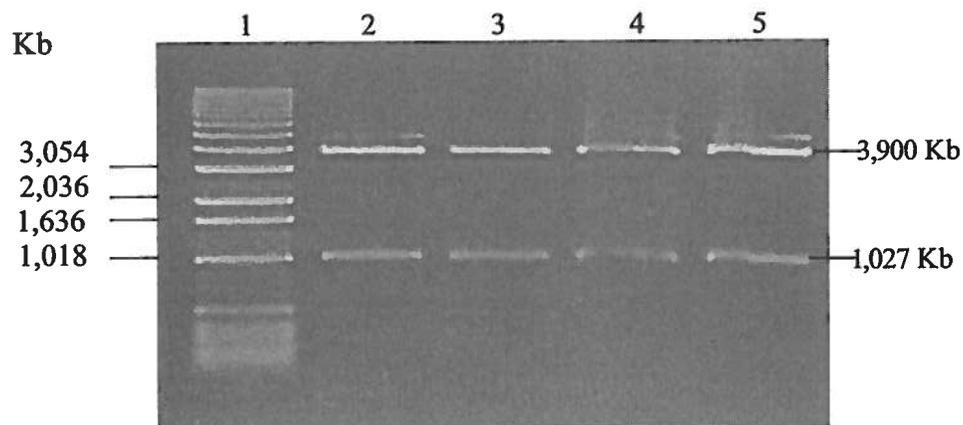


Figure 7 Électrophorèse en gel d'agarose des plasmides recombinants pCR2.1-M extraits de colonies recombinantes Top 10 après digestion avec l'enzyme de restriction EcoR1.

Après le clonage du gène M dans le vecteur pCR2.1 et la transformation des bactéries, l'ADN plasmidique de chacune des colonies a été extrait selon la technique décrite dans la section 2.7.1. L'ADN plasmidique a été digéré avec l'enzyme de restriction EcoR1 et analysé par une électrophorèse en gel d'agarose, coloré avec une solution de bromure d'éthidium et visualisé à l'aide d'une exposition aux rayons UV.

Puits 1 : Marqueurs de masse moléculaire

Puits 2 à 5 : Plasmides recombinants des colonies C5, C7, C10 et C11

3.5 Comparaison des séquences en nucléotides et en acides aminés

Suite à la sélection des colonies recombinantes contenant l'insertion, le clone C7 a été choisi pour le séquençage. L'ADN plasmidique de cette colonie a été purifié par la méthode de lyse alcaline et séquencé à l'aide d'amorces spécifiques d'après la méthode décrite à la section 2.5.2. La séquence du gène M de la colonie C7 a été comparée avec la séquence de référence de la souche virale porcine SwQc91 publiée par Welman et Arora (2000). La Figure 8 démontre que la séquence nucléotidique du gène M de la colonie C7 est composée des 1027 nucléotides requis, aucune insertion ou délétion nucléotidique n'est observée. Par contre, quelques substitutions de nucléotides ont été observées, lorsque la séquence du gène M de la colonie C7 est comparée à la séquence publiée. En effet, il a été possible de noter la présence de 5 changements aux niveaux des nucléotides 64, 139, 141, 373 et 542 ce qui représente une homologie de 99,5 % avec la séquence de référence. Il aurait tout de même été préférable de séquencer plusieurs colonies.

De plus, il a été possible de noter que la séquence nucléotidique du gène M présente un codon d'initiation au nucléotide # 26 et un codon de terminaison de traduction au nucléotide # 784 pour la protéine M1. Par contre, le cadre de lecture de la protéine M2 débute au nucléotide # 26 jusqu'au nucléotide # 52, puis continue du nucléotide # 741 à # 1007 tel qu'indiqué sur la séquence. Par la suite, la séquence en aa de la protéine M1 de la colonie C7 a été comparée avec la séquence protéique de référence de la souche virale SwQc91 publiée par Welman et Arora, (2000). Ainsi, la séquence de la protéine M1 de la colonie C7 est formée de 252 aa, tout comme la séquence de référence (Figure 9). Par contre, un seul changement d'aa à la position 173 a été observé, un aa isoleucine a été substitué par un résidu valine, une mutation neutre qui ne change pas les propriétés biochimiques de la protéine. D'autre part aucun des épitopes de la protéine M1 n'est affecté par cette mutation. Finalement, la séquence polypeptidique de la colonie C7 présente une homologie de 99,6 % avec la séquence de référence.

Figure 8 Comparaison de la séquence nucléotidique de l'insertion d'ADNc du gène M de la souche virale SwQc91 extrait d'une colonie recombinante avec la séquence de référence.

L'ADNc extrait de la colonie C7 a été séquencé à l'aide de l'amorce universelle sens située en amont du site de restriction EcoR1 du vecteur pCR2.1 et des amorces anti-sens M13 et M/R 721-742 selon la méthode de Sanger, Nicklen et Coulson (1977). La séquence nucléotidique obtenue, a été comparée avec la séquence de référence du gène M de la souche virale SwQc91 publiée par Welman et Arora (2000) (GenBank #AF188004).

(A) : Adénosine

(T) : Thymidine

(C) : Cytosine

(G) : Guanidine

(.) : même nucléotide

(—) : nucléotides appartenant à la séquence codante de la protéine M1

(*) : nucléotides appartenant à la séquence codante de la protéine M2

```

*****
SwQc91      AGCAAAGCA GGTAGATGTT TAAAGATGAG TCTTCTAACC GAGGTCGAAA CGTATGTTCT 060
SwQc91-C7   .....

SwQc91      CTCTATTGTT CCGTCAGGCC CCCTCAAAGC CGAGATAGCG CAGAGACTTG AAGATGTTTT 120
SwQc91-C7   .....C.....

SwQc91      TGCAGGGAAA AACACCGATC TAGAGGCACT CATGGAATGG CTAAAGACAA GACCAATCCT 180
SwQc91-C7   .....C.T.....

SwQc91      GTCACCTCTG ACTAAGGGGA TTTTAGGATT TGTATTACAG CTCACCGTGC CCAGTGAGCG 240
SwQc91-C7   .....

SwQc91      AGGACTGCAG CGTAGACGCT TTGTCCAGAA TGCCCTCAAT GGGAATGGTG ACCCGAACAA 300
SwQc91-C7   .....

SwQc91      CATGGACAAA GCAGTCAAAC TGTACAGAAA ACTTAAAAGG GAAATAACAT TTCACGGGGC 360
SwQc91-C7   .....

SwQc91      TAAAGAAGTA GCGCTCAGTT ACTCTGCTGG TGCACCTGCC AGTTGTATGG GCCTCATTTA 420
SwQc91-C7   .....A.....

SwQc91      CAACAGAATG GGGACTGTCA CCACTGAGGT GGCATTTGGC CTAGTATGCG CAACCTGTGA 480
SwQc91-C7   .....

SwQc91      ACAGATTGCC GATTCCCAGC ATCGATCTCA TAGACAAAATG GAGACAACAA CCAATCCACT 540
SwQc91-C7   .....

SwQc91      AATTAGGCAT GAGAACACAGAA TGGTATTAGC CAGCACGACA GCTAAAGCCA TGGAACAAAT 600
SwQc91-C7   .....G.....

```

SwQc91 GGCTGGATCA AGTGAACAAG CAGCAGAGGC TATGGAATT GCCAGCCAAG CTAGGCAAAT 660
 SwQc91-C7

SwQc91 GGTACAGGCA ATGAGAACA TTGGGACTCA TCCTAGTCC AGCGCTGGTC TAAAAGATGA 720
 SwQc91-C7

SwQc91 TCTTCTTGAA AATTACAGG CCTATCAGAA ACGAATGGGA GTGCAGATGC AACGGTTCAA 780
 SwQc91-C7

SwQc91 GTGATCCTCT CGTTGCTGCC GCAAGCATCA TTGGGATTT GCACCTGATA TTGTGGATTC 840
 SwQc91-C7

SwQc91 TTGATCGTCT TTTTTCAAA TGCATTTACC GTTGCTTTAA ATACGGTCTG AAAAGAGGGC 900
 SwQc91-C7

SwQc91 CCTCTACGGA AGGAGTGCCG GAGTCTATGA GGAAGAATA TCGGCAGAAA CAGCAGAGTG 960
 SwQc91-C7

SwQc91 CTGTGGATGT TGACGATGGT CATTGTGCA ACATAGAGCT AGAGTAAAA ACTACCTTGT 1020
 SwQc91-C7

SwQc91 TTCTACT 1027
 SwQc91-C7

Figure 9 Comparaison de la séquence en aa de la protéine M1 de la souche virale SwQc91 obtenue, avec la séquence de référence.

La séquence nucléotidique de l'insertion d'ADNc de la colonie 7, a été traduite en aa puis elle a été comparée avec la séquence de référence de la protéine M1 publiée par Welman et Arora (2000) (GenBank #AAG28376). La protéine M1 présente quatre sites antigéniques (Ye, Baylor et Wagner, 1989). L'épitope 1 (*) situé entre les aa 46-89, l'épitope 2 (*) situé entre les aa 129-164 et les épitopes 3 et 4 situés entre les aa 45-119 (*). La liste des abréviations des aa est donnée en page xii.

SwQc91 MSLLTEVETY VLSIVPSGPL KAEIAQRLED VFAGKNTDLE 40
SwQc91-C7

SwQc91 ALMEWLKTRP ILSPLTKGIL GFVFTLTVPS ERGLQRRRFV 80
SwQc91-C7

SwQc91 QNALNGNGDP NNMDKAVKLY RCLKREITFH GAKEVALSYS 120
SwQc91-C7

SwQc91 AGALASCMGL IYNRMGTVTT EVAFGLVCAT CEQIADSQHR 160
SwQc91-C7

SwQc91 SHRQMETTTN PLIRHENRMV LASTTAKAME QMAGSSEQAA 200
SwQc91-C7V.....

SwQc91 EAMEIASQAR QMVQAMRTIG THPSSAGLK DDLENLQAY 240
SwQc91-C7

SwQc91 QKRMGVQMOR FK 252
SwQc91-C7

3.6 Sélection des colonies exprimant la protéine M1 recombinante

Après avoir sélectionné les colonies recombinantes possédant le gène M, celui-ci a été sous-cloné dans le vecteur d'expression pET21a(+), puis les plasmides recombinants ont été utilisés pour transformer des bactéries compétentes, celles-ci ont été incubées à 37°C pendant 90 minutes avec 1 mM d'IPTG, afin d'induire l'expression de la protéine M1r. Une électrophorèse en gel de polyacrylamide (gel de séparation : 12 %, gel de chargement 4%), a permis l'analyse des profils polypeptidiques afin de déterminer les colonies exprimant la protéine recombinante. Les résultats obtenus démontrent que les colonies C1 à C6 (Figure 10) présentent une protéine abondante ayant une masse moléculaire de 28 kDa. Cette protéine correspond à la protéine M1r car elle n'apparaît pas au niveau des profils du lysat bactérien transformé avec le plasmide parental (puits #2).

3.7 Étude des niveaux d'expression de la protéine M1 recombinante

Les niveaux d'expression de la protéine M1r ont été analysés afin de déterminer les conditions optimales d'expression de la protéine M1r certains paramètres tels que la température (25, 28, 33 et 37°C), le temps d'incubation (2, 4, 8 et 18 heures) et la concentration d'IPTG (0,5 mM et 1 mM) ont été analysés. Une analyse des échantillons par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Figure 11, Gel A) démontre qu'à une température de 25°C, l'expression de la protéine M1r est visible après 18 heures d'incubation avec des concentrations en IPTG de 0,5 mM ou 1 mM. L'incubation des bactéries à 28°C, à 33°C et 37°C (Figure 11, Gel B, C et D) dans les mêmes conditions expérimentales, montre la présence de la protéine M1r après une induction de 2, 4, 8 et 18 heures. À une température de 37°C, la quantité de protéine produite avec des concentrations d'inducteur de 0,5 mM et 1 mM, semble similaire. D'après l'intensité des bandes

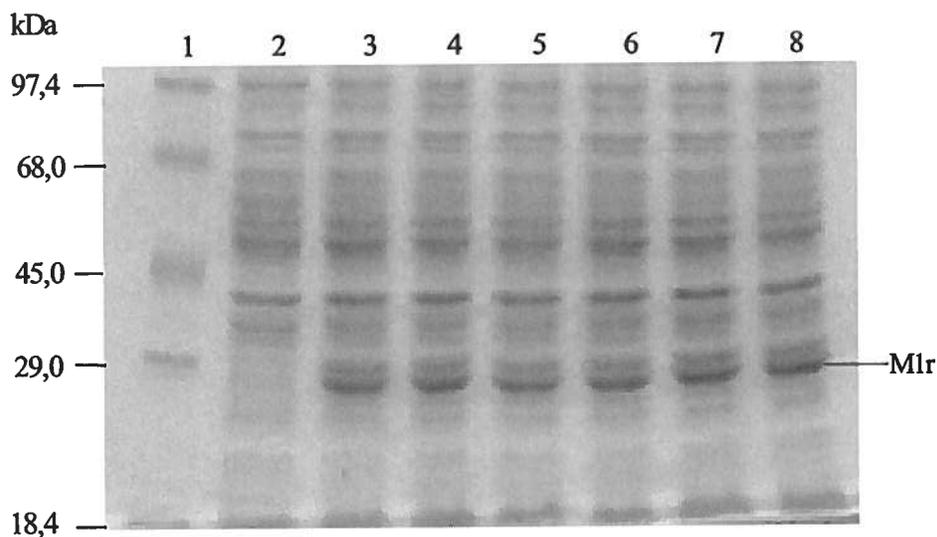


Figure 10 Profil électrophorétique de lysats de bactéries compétentes BL21(DE3) transformée avec le plasmide pET21(a+)-M exprimant la protéine M1 recombinante

L'expression de la protéine recombinante dans les bactéries *E. coli* BL21(DE3) transformées avec le plasmide parental ou recombinant a été induite avec une concentration finale d'IPTG de 1 mM. Par la suite, chaque suspension bactérienne a été solubilisée puis analysée par une électrophorèse en gel de polyacrylamide (section 2.7). Les protéines ont été révélées par une coloration au bleu de Coomassie.

Puits #1 : Marqueurs de masse moléculaire

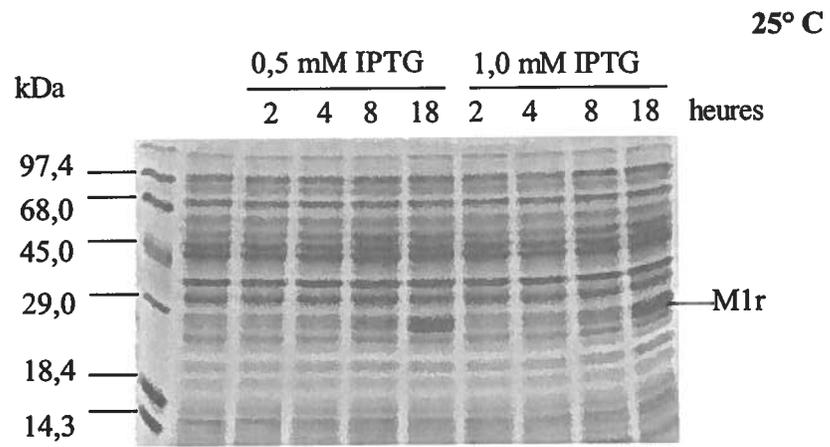
Puits #2 : Suspension de bactéries compétentes transformées avec le plasmide parental pET21a (+)

Puits #3 à 8 : Suspension de bactéries compétentes transformées avec le plasmide recombinant pET21a(+)-M (colonie C1 à C6)

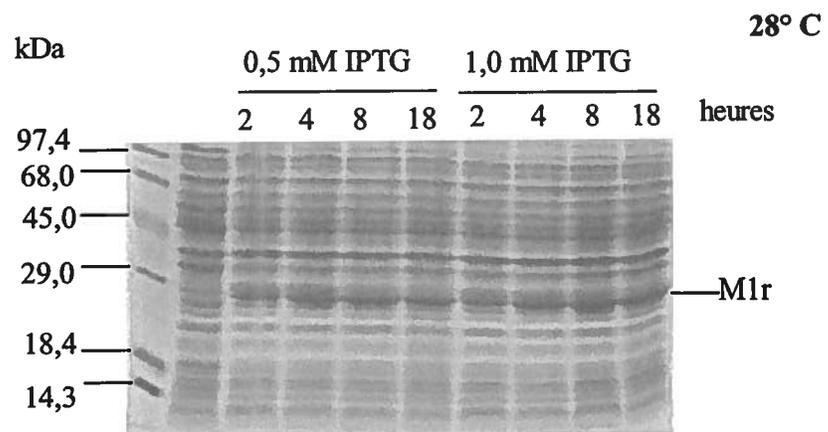
Figure 11 Effet des variations de la température, du temps d'incubation et de la concentration d'IPTG sur l'expression de la protéine M1 recombinante par des bactéries compétentes BL21(DE3).

Les figures A, B, C et D représentent la cinétique d'expression de la protéine M1r aux différentes températures (25°C, 28°C, 33°C et 37°C), aux différents temps d'incubation (2, 4, 8 et 18 heures) avec une concentration de 0,5 mM ou 1,0 mM d'IPTG. Chaque suspension bactérienne a été solubilisée puis analysée par une électrophorèse en gel de polyacrylamide (section 2.7.2). Une suspension de bactéries transformées avec le plasmide parental a été déposée dans le puits #2 des figures A et B. Les protéines ont été révélées par une coloration au bleu de Coomassie. L'échantillon de marqueurs de masse moléculaire a été déposé dans le premier puits de chaque gel.

A

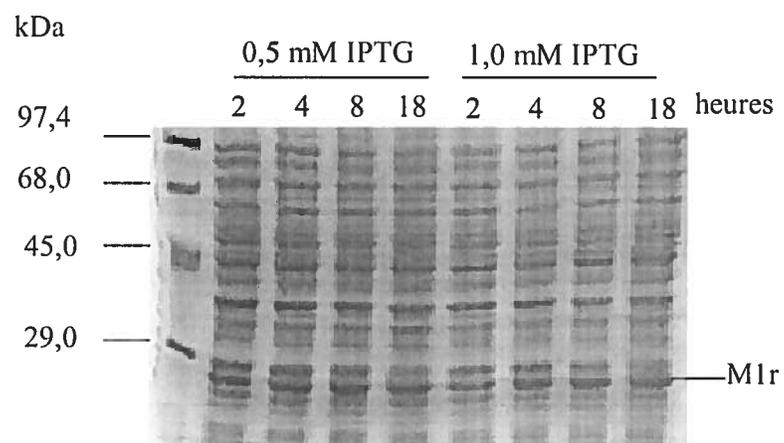


B



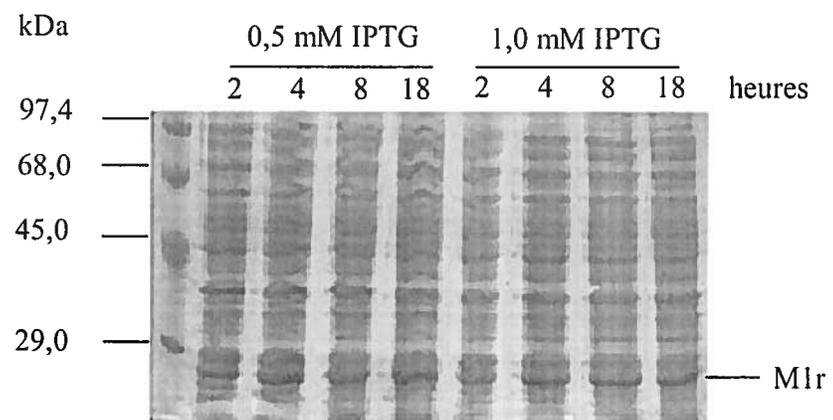
C

33 °C



D

37 °C



protéiques, les conditions optimales d'expression de la protéines recombinantes sont atteintes en incubant les suspensions bactériennes à 37°C pendant 8 heures en présence de 0,5 mM d'IPTG. En plus d'être optimales, ces conditions d'expression réduisent le coût et le temps associés à la production de la protéine.

3.8 Solubilisation de la protéine M1 recombinante

Après avoir déterminé les conditions optimales d'expression de la protéine M1r, l'analyse sa solubilité a été réalisée à l'aide d'une électrophorèse en gel de polyacrylamide (Figure 12). Après l'induction de l'expression de la M1r avec 0,5 mM d'IPTG pendant 8 heures à 37°C, il a été possible d'observer que suite à une brève sonication, la M1r se retrouve principalement dans le culot bactérien. Ainsi, les protéines recombinantes ont été solubilisées à l'aide d'un traitement impliquant le SDS et le β -mercaptoéthanol.

3.9 Production et purification de la protéine M1 recombinante

Après avoir déterminé les conditions optimales d'expression, la protéine M1 recombinante a été produite dans un volume de 400 ml de milieu LB, qui a été incubé pendant 8 heures à 37°C avec une concentration d'IPTG de 0,5 mM. Suite au traitement de solubilisation impliquant le SDS et le β -mercaptoéthanol, la protéine M1 recombinante a été purifiée par excision de la bande (28 kDa) correspondant à celle-ci sur un gel de polyacrylamide (12%). Le recouvrement de la protéine M1r a été réalisé par la méthode d'électroélution et l'échantillon protéique a été dialysé et concentré (section 2.7.5). Une électrophorèse en gel de polyacrylamide (gel de séparation : 12 %, gel de chargement 4%), a permis l'analyse de la pureté des protéines M1 recombinantes (Figure 13). Les résultats obtenus démontrent que la M1r purifiée forme une seule bande à 28 kDa (puits #3) contrairement au lysat bactérien (puits #2).

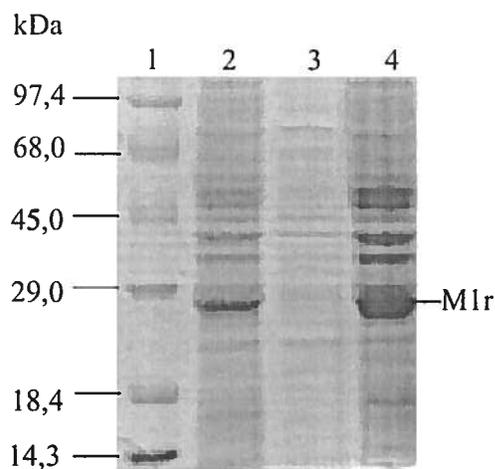


Figure 12 Effet de la sonication de lysats de bactéries BL21(DE3) exprimant la protéine M1 recombinante.

L'expression de la protéine M1r a été induite en conditions optimales dans les bactéries *E. coli* BL21(DE3) transformées avec le plasmide recombinant avec 0,5 mM d'IPTG. Le culot bactérien a été récolté puis resuspendu dans un tampon PBS. Chaque suspension a été soniquée puis les fractions recueillies (culot et surnageant) ont été solubilisées puis analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide (section 2.7.3). Les protéines ont été révélées par une coloration au bleu de Coomassie.

Puits #1 : Marqueurs de masse moléculaire

Puits #2 : Suspension bactérienne transformée avec les plasmides recombinants pET21a(+)-M.

Puits #3 : Surnageant de la suspension bactérienne transformée avec les plasmides recombinants pET21a(+)-M suite à une sonication.

Puits #4 : Culot de la suspension bactérienne transformée avec les plasmides recombinants pET21a(+)-M suite à une sonication.

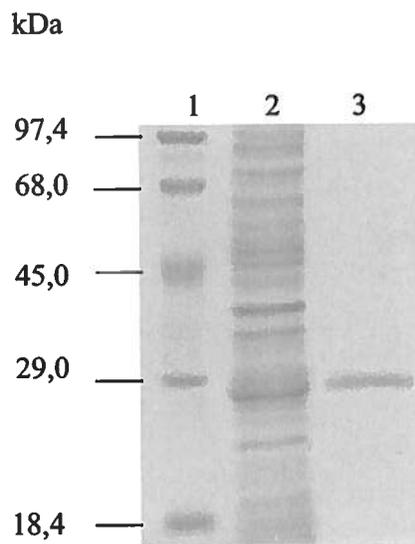


Figure 13 Analyse par SDS-PAGE de la pureté de la protéine M1 recombinante.

L'expression de la protéine M1r a été induite en conditions optimales dans les bactéries BL21(DE3) transformées avec le plasmide recombinant, avec 0,5 mM d'IPTG. Le culot bactérien a été récolté puis resuspendu dans un tampon PBS. Suite au traitement de solubilisation impliquant le SDS et le β -mercaptoéthanol, le surnageant a été déposé dans un puits du gel de polyacrylamide puis après la migration, la bande de protéine correspondant à la M1r a été excisée. Après l'électroélution et la dialyse (section 2.7.5), l'analyse de la pureté de l'échantillon protéique a été réalisée par SDS-PAGE d'après la technique de la section 2.1.5. Les protéines ont été révélées par une coloration au bleu de Coomassie.

Puits #1 : Marqueurs de masse moléculaire

Puits #2 : Suspension bactérienne transformée avec les plasmides recombinants pET21a(+)-M.

Puits #3 : Protéine M1r purifiée

3.10 Réactivité antigénique de la protéine M1 recombinante avec un sérum de porc immun.

L'étude de la réactivité antigénique de la protéine M1r a été effectuée à l'aide de la technique d'immunobuvardage telle que décrite à la section 2.8. La Figure 14 démontre la réactivité de la protéine M1r avec un sérum de porc polyclonal anti-SwQc91. Il est possible d'observer que la protéine M1r exprimée par une suspension bactérienne (puits #4) et la M1r purifiée (puits #5) sont reconnues par les anticorps du sérum par l'apparition d'une bande à 28 kDa, lorsque comparée avec une suspension de bactéries BL21(DE3) non-transformées ou transformées avec le plasmide parental pET21(a+). Les résultats obtenus permettent de constater que la protéine M1r est aussi réactive que la protéine M1 virale (puits #6). Il est à noter que les bactéries non transformées ou transformées avec le plasmide parental (puits #2 et 3) ont réagis avec les anticorps sériques du sérum polyclonal anti-SwQc91.

3.11 Évaluation de l'immunogénicité de la protéine M1 recombinante

La réactivité des sérums de différents groupes de souris BALB/c immunisées à trois reprises avec la protéine M1 virale, avec la protéine M1r ou avec le PBS 10 mM pH 7,2 a été évaluée à l'aide du test ELISA avec la protéine M1 virale comme antigène (section 2.9). Les résultats du 3^{ème} prélèvement représentés à la Figure 15, démontrent que le sérum provenant des souris immunisées avec la protéine M1r réagit significativement avec la protéine M1 virale montrant une valeur d'absorbance maximale d'environ 2,0 à la dilution 1/500 ce qui démontre une forte production d'anticorps. On observe le même type de réactivité avec les sérums de souris anti-M1 virale. Cependant, le sérum des souris qui ont reçu des injections de PBS ne démontre aucune réponse significative contre la protéine M1 virale.

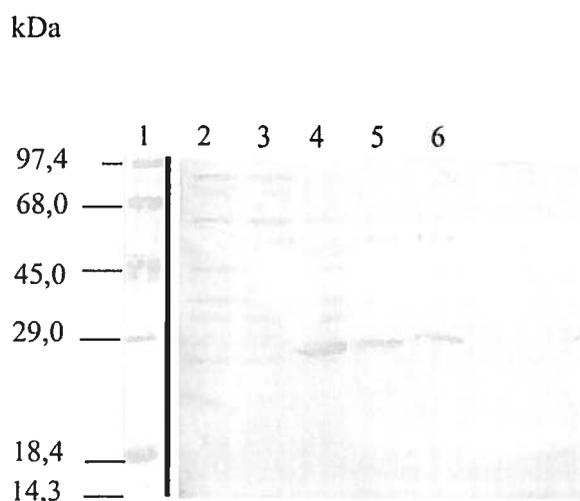


Figure 14 Réactivité antigénique de la protéine M1 recombinante avec un sérum de porc polyclonal anti-SwQc91.

Les protéines des différentes suspensions bactériennes BL21(DE3) transformées avec les plasmides recombinants de même que les protéines M1 virale ou recombinante purifiées ou non ont été séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide puis transférées électrophorétiquement sur une membrane de nitrocellulose. Les protéines ont été détectées par immunobuvardage avec un sérum de porc anti-SwQc91 polyclonal pré-adsorbé avec les bactéries BL21(DE3) (section 2.8). Les complexes immuns ont été révélés avec un anti-IgG de porc conjugué à la peroxydase, la membrane étant ensuite incubée avec le substitut en présence de 4-chloro-naphtol.

Puits 1 : Marqueurs de masse moléculaire

Puits 2 : Suspension de bactéries BL21(DE3) non-transformées

Puits 3 : Suspension de bactéries BL21(DE3) transformées avec le plasmide parental pET21(a+)

Puits 4 : Suspension de bactéries BL21(DE3) transformées avec le plasmide recombinant pET21-M induit avec 0,5 mM d'IPTG à 37°C pendant 8 heures suite au traitement de solubilisation.

Puits 5 : Protéine M1r purifiée

Puits 6 : Protéine M1 virale purifiée

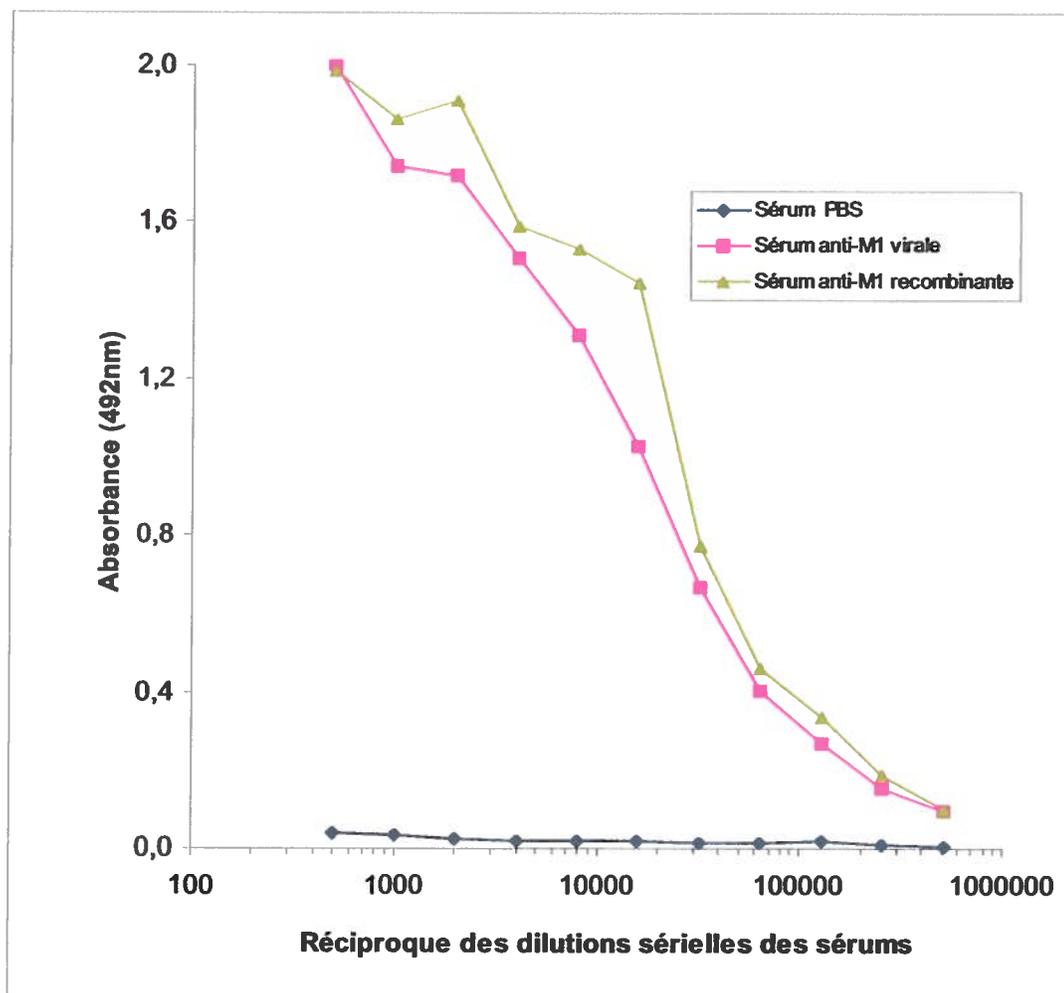


Figure 15 Courbe d'absorbance de la réactivité des sérums immuns de souris contre la protéine M1 de la souche SwQc91.

La présence d'anticorps anti-M1 dans des sérums de différents groupes de souris BALB/c immunisées à trois reprises avec la protéine M1 virale, avec la protéine M1r ou avec le PBS a été mise en évidence à l'aide d'un test ELISA avec la protéine M1 virale comme antigène (section 2.9). Les réactions antigènes-anticorps d'un regroupement des sérums des 3 souris de chaque groupe prélevés au jour 54, dilués 1:500 à 1 : 256 000 ont été révélées avec un anticorps secondaire de chèvre couplé à la peroxydase en présence d'hypochlorure d'orthophénylène diamine et H₂O₂. Pour chaque groupe de souris l'absorbance a été mesurée, permettant la mesure du titre d'anticorps.

Le titre des anticorps a été évalué à partir de la courbe d'absorbance. Une densité optique de 0,4 est la valeur de référence qui a été déterminée comme densité optique significative (Appendice II, section 1.19). Ainsi, le titre d'anticorps d'un sérum donné correspond à la dilution de sérum à laquelle on obtient la densité optique de 0,4 (Figure 15). Les titres d'anticorps des sérums anti-M1 virale et des sérums anti-M1r ont été évalués à 64 000. Le sérum des souris injectées avec le PBS (témoin négatif) n'ont pas d'anticorps dirigés contre la protéine M1. Le titre d'anticorps ne peut être déterminé car les valeurs d'absorbance sont inférieures à celle à la valeur de référence (0,4).

3.12 Test ELISA indirect avec la protéine M1 recombinante

3.12.1 Comparaison du test ELISA-M1r avec le test IHA pour la détection d'anticorps spécifiques à l'influenza A

Le Tableau 1 illustre les valeurs de réactivité des sérums de porc contre la protéine M1r. Les résultats de réactivité ont permis de calculer le seuil de positivité du test ELISA-M1r pour déterminer les sérums qui présentent des IgG dirigés contre la protéine M1 du virus influenza (sérum positif). Le seuil fixé à 15,3 % a été déterminé mathématiquement à l'aide du programme Matlab 5.2 (MathWorks), d'après l'intersection des deux courbes gaussiennes inférées sur les données représentant le nombre de sérum en fonction de leur réactivité. Tous les sérums qui présentaient une réactivité supérieure à 15,3 % étaient considérés positifs alors que des réactivités inférieures à cette valeur représentaient des sérums négatifs.

Tel que représenté dans le Tableau 1, les résultats du test ELISA-M1r démontrent que d'après le seuil de positivité 23 des 30 sérums de porc testés présentent des anticorps

Tableau 1 Détection des anticorps anti-influenza dans des sérums de porc par les tests IHA et ELISA-M1r

La mise en évidence des anticorps anti-M1 des différents sérums de porcs a été réalisée à l'aide d'un test ELISA avec la protéine M1r comme antigène (section 3.12). Les réactions antigènes-anticorps des sérums de porc (1/10) ont été révélées avec un anti-IgG de porc couplé à la peroxydase en présence d'hypochlorure d'orthophénylène diamine et H₂O₂. Pour chaque sérum de porc, l'absorbance a été mesurée permettant le calcul de la réactivité. La présence des anticorps anti-HA des différents sérums de porc a été démontrée par le test IHA avec les suspensions virales SwQc81 et SwQc91 selon la technique décrite à la section 2.10.3.

Légende :

- a. Sérums de porcs prélevés à la ferme Robert Lefebvre
- b. Le titre IHA correspond à la réciproque de la plus haute dilution de sérum inhibant 4 UHA de virus.
- c. Un titre IHA égal ou supérieur à 40 a été considéré, significatif pour déterminer la présence d'anticorps anti-HA (Chambers *et al.*, 1991; Hinshaw *et al.*, 1978).
- d. $\% \text{ réactivité} = \frac{\text{DO}(\text{échantillon}) - \text{DO}(\text{témoin négatif})}{\text{DO}(\text{témoin positif}) - \text{DO}(\text{témoin négatif})} \times 100$
- e. Une réactivité égale ou supérieure à 15,3 % a été considérée comme seuil de positivité pour déterminer la présence d'anticorps anti-M1.
- f. Virus SwQc81 et SwQc91 purifiés, ajustés à 4 UHA/ 25 µl
- g. Sérum de référence : témoin négatif
- h. Sérum de référence : témoin positif

Sérum de porcs ^a		Test IHA		Test ELISA-M1r Réactivité (%) ^{de}	
		Titre ^{bc}			
		SwQc81 ^f (H1N1)	SwQc91 ^f (H1N1)		
Sérum pré-immun ^g		<10	<10	0	
Sérum anti-SwQc91 ^h		2560	2560	100	
1443-	1	80	320	44,8	
	3	40	80	31,2	
	4	40	80	41,4	
	5	10	10	34,0	
	6	80	80	24,8	
	7	<10	<10	6,5	
	8	10	<10	4,0	
	10	<10	<10	30,8	
	11	<10	<10	-7,0	
	1371-	1	10	10	50,8
		2	80	80	43,9
3		40	40	70,0	
4		40	40	151,6	
5		<10	<10	21,7	
6		<10	<10	76,2	
7		80	160	35,9	
8		160	80	39,9	
9		320	640	82,5	
10		20	40	80,6	
11		40	40	53,2	
12		40	40	64,0	
13		80	80	26,2	
14		80	160	54,0	
15		80	80	36,6	
16		80	80	42,4	
18	20	40	38,9		
19	<10	20	-1,2		
20	<10	<10	-1,8		
21	<10	<10	9,8		
22	<10	<10	-0,5		

contre la protéine M1 de l'influenza A. Le Tableau 1 démontre également le titre IHA des sérums de porcs contre les souches influenza porcines SwQc81 et SwQc91, déterminé par le test d'inhibition d'hémagglutination. Ce test est le plus utilisé chez les porcs en milieu vétérinaire (Murphy et al. 1981) et permet de déterminer la présence d'anticorps contre l'hémagglutinine. En utilisant le seuil de positivité standard (Chambers *et al.*, 1991; Hinshaw *et al.*, 1978) déterminé par une valeur de titre IHA égale ou supérieure à 40, 18 des 30 sérums testés présentaient des anticorps dirigés contre l'HA de type H1. De plus, il est possible d'observer que les titres IHA des sérums contre les souches SwQc81 et SwQc91 sont généralement semblables.

Ainsi, 5 nouveaux sérums sont positifs (1443-5, 1443-10, 1371-1, 1371-5, 1371-6) par ce test. La sensibilité du test ELISA-M1r est donc évaluée à 100 %, car tous les sérums positifs à l'influenza déterminés par le test IHA sont également positifs par le test ELISA.

3.12.2 Réactivité des sérums de porcs avec la protéine M1 virale

Le test ELISA utilisant la protéine M1 virale comme antigène a été réalisé dans les mêmes conditions expérimentales que le test ELISA-M1r pour démontrer la présence de résultats faux-positifs. En effet, les résultats obtenus avec le test ELISA-M1r auraient pu être influencés par les réactions non-spécifiques avec des protéines bactériennes *E. coli* présentes dans l'échantillon de M1r. Le Tableau 2 compare les réactivités des 5 sérums de porc déclarés nouvellement positifs par le test ELISA-M1r, avec la réactivité de ces sérums contre la protéine M1 virale. Le seuil de positivité a été fixé à 15,3 % tel que décrit à la section 3.12.1. D'après le seuil, 4 des 5 sérums sont positifs par le test ELISA avec la protéine M1 virale. Ainsi, parmi les résultats obtenus par le test ELISA-M1r, il y a présence d'un résultat faussement positif (sérum 1443-10).

Tableau 2 Analyse comparée de la réactivité des sérums de porcs dans les tests ELISA utilisant comme antigène la protéine M1 recombinante ou M1 virale.

Sérum de porc ^a		ELISA-M1	ELISA-M1r
		virale	
		Réactivité (%) ^{bc}	
Sérum pré-immun ^d		0	0
Sérum anti-SwQc91 ^e		100	100
1443-	5	41,3	34,0
	10	12,1	30,8
1371-	1	65,6	50,8
	5	26,8	21,7
	6	51,9	76,2

La mise en évidence des anticorps anti-M1 des différents sérums de porcs a été réalisée à l'aide d'un test ELISA avec la protéine M1 virale comme antigène (section 2.10.4). Les réactions antigènes-anticorps des sérums de porc (1/10) ont été révélées avec un anti-IgG de porc couplé à la peroxydase en présence d'hypochlorure d'orthophénylène diamine et H₂O₂. Pour chaque sérum de porc, l'absorbance a été mesurée pour le calcul de la réactivité.

a : Sérums de porcs prélevés à la ferme Robert Lefebvre

$$b : \% \text{ réactivité} = \times \frac{DO(\text{échantillon}) - DO(\text{témoin négatif})}{DO(\text{témoin positif}) - DO(\text{témoin négatif})} \times 100$$

c : Une réactivité supérieure ou égale à 15,3 % a été considéré comme seuil de positivité.

d : Sérum de référence : témoin négatif

e : Sérum de référence : témoin positif

4 Discussion

Les objectifs de la présente étude étaient de 1) Produire la protéine M1 recombinante de la souche influenza porcine SwQc91 à l'aide d'un système d'expression procaryote et de procéder à sa purification; 2) D'évaluer l'immunogénicité de la protéine recombinante chez les souris et son antigénicité par immunobuvardage en utilisant un sérum de porc convalescent. 3) De développer un test ELISA indirect utilisant la protéine M1r comme antigène pour la détection d'anticorps chez les sérums de porc.

La première étape de cette étude a été de propager la souche influenza porcine SwQc91 dans les œufs embryonnés de poulet et de procéder à sa purification. Le contenu protéique de cette souche a été analysé par une électrophorèse en gel de polyacrylamide (Figure 4). Les résultats ont démontré que les profils polypeptidiques obtenus en condition réductrices et non-réductrices ainsi que les masses moléculaires des protéines virales du virus SwQc91 correspondent à ceux observés par N'Diaye (1995). De plus, cette analyse polypeptidique a permis d'évaluer la masse moléculaire de la protéine M1 de la souche SwQc91 à 28 kDa, ce résultat confirme les travaux de Welman et Arora, (2000).

Une deuxième étape préliminaire, soit l'analyse nucléotidique du gène M, a été nécessaire pour vérifier la présence de mutations dans la région codante de la protéine M1 suite à la réaction de RT-PCR. La comparaison de la séquence nucléotidique de l'ADNc du clone C7 avec la séquence publiée du gène M de la souche SwQc91 (Welman et Arora, 2000) a permis de démontrer une homologie de 99,5 % (Figure 8). La traduction de cette séquence nucléotidique en aa a permis d'observer, 1 seul changement à la position 173, une mutation dite neutre (I changé pour V), car en principe elle ne change pas les propriétés biochimiques de la protéine. Les résultats obtenus ont permis de révéler un pourcentage d'homologie de 99,6 % avec la séquence polypeptidique de référence.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la présence de mutations dans la séquence nucléotidique. Premièrement, les changements de nucléotides pourraient être attribués à la polymérase à ARN du virus influenza, car elle ne corrige pas ces erreurs de lecture lors de la réplication virale (Rocha *et al.*, 1991; Domingo *et al.*, 1993). Deuxièmement, les mutations auraient pu se produire lors de l'étape de réaction d'amplification de polymérase en chaîne par des erreurs de substitution causées par la *Taq* DNA polymérase. En effet, le taux d'erreurs engendrées par la *Taq* DNA polymérase varie de 0,2 à 2×10^{-4} erreurs par base par cycle (Smith *et al.*, 1997). Le taux déterminé par Saiki *et al.*, (1988) a été révisé à la hausse par plusieurs études portant sur la fidélité de cette enzyme (Kwiatowski *et al.*, 1991). D'autre part, les erreurs causées par la *Taq* DNA polymérase dépendent des paramètres de la réaction d'amplification. À ce propos Eckert et Kundel (1990) ont déterminé les conditions requises pour minimiser les erreurs engendrées par cette enzyme. Par contre, dans le cadre de notre étude il aurait été préférable faire séquencer l'ADNc de plus d'une colonie pour tirer des conclusions sur la présence de mutations.

Dans le but de réaliser le premier objectif qui consistait à produire la protéine recombinante, le gène M a été sous-cloné dans le vecteur d'expression pET21a(+) puis l'expression de la protéine a été induite avec l'IPTG. Ce système d'expression qui utilise la polymérase du phage T7 est une des méthodes les plus efficaces pour la synthèse des protéines recombinantes (Baneyx, 1999). Les résultats du profil polypeptidique (Figure 4) des suspensions bactériennes induites, démontrent clairement l'apparition d'une bande protéique d'environ 28 kDa. Malgré l'absence de modifications post-traductionnelles dans la protéine recombinante, sa masse moléculaire est similaire à celle de la protéine M1 virale. D'après, les travaux de Gregoriades *et al.*, (1984) et Gregoriades, Guzman et Paoletti (1990) la protéine M1 virale est phosphorylée principalement au niveau des résidus sérines.

Les conditions optimales d'expression des protéines recombinantes ont été atteintes en incubant les suspensions bactériennes à 37°C pendant 8 heures en présence de 0,5 mM d'IPTG (Figure 11). Par contre, ces paramètres induisent la surexpression de la protéine

M1r chez *E. coli* ce qui a pour effet de provoquer la formation d'agrégats insolubles de protéines recombinantes (Figure 12). Des résultats similaires ont été rapportés par quelques études d'expression de la M1r chez les bactéries *E. coli* BL21(DE3) (Watanabe *et al.*, 1996; Welman, 1999). Les raisons pour lesquelles les protéines recombinantes nouvellement synthétisées tendent à s'agréger ne sont pas clairement définies. Par contre, certaines températures d'induction telles que 37°C peuvent favoriser la formation de corps d'inclusion (Schein, 1989). Afin de permettre le recouvrement des protéines recombinantes, les culots bactériens obtenus suite à une induction des suspensions bactériennes ont été solubilisés à l'aide d'un traitement avec la chaleur, avec un agent dénaturant et un agent réducteur (SDS et β -mercaptoéthanol), tel que suggéré par Welman (1999). Selon plusieurs études, ce traitement n'affecte pas les propriétés antigéniques de la M1r (Oxford et Schild, 1976; Webster et Hinshaw, 1977; Bucher *et al.*, 1987, Welman et Arora, 2000).

Suite à sa solubilisation, la protéine M1 recombinante a été récoltée par la méthode d'électroélution (Donofrio *et al.*, 1986). La technique de purification utilisée est simple et peu coûteuse, mais elle devient laborieuse lorsque des quantités importantes de protéine pures sont nécessaires. D'autre part, dans notre cas cette technique ne garantissait pas d'avoir un échantillon de protéine entièrement pure, par la présence de protéines bactériennes ayant la même masse moléculaire que la protéine M1r. En fait, pour permettre de séparer les protéines M1r des protéines bactériennes, l'utilisation de la méthode de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide 2-dimensions aurait été préférable (O'Farrell, 1975).

Le second objectif de cette étude était d'évaluer l'antigénicité de la protéine M1r produite, par un immunobuvardage en utilisant un sérum de porc anti-SwQc91. Les résultats obtenus démontrent que la protéine M1r est reconnue par les anticorps présents dans le sérum de porc (Figure 14). La protéine M1r a conservé les propriétés antigéniques de la protéine native correspondante. Des résultats similaires ont été observés dans quelques études portant sur la protéine M1 (Oxford et Schild, 1976; Webster et Hinshaw,

1977; Bucher *et al.*, 1987, Welman et Arora, 2000). Par contre, l'utilisation d'un sérum polyclonal ne permet pas de vérifier l'intégrité des quatre épitopes qui caractérisent la protéine M1. Toutefois, la séquence en aa de la protéine M1 de la souche SwQc91 représentée à la Figure 9, a démontré la conservation des épitopes au niveau de leur constitution en aa.

Les résultats précédents démontrent le potentiel d'utilisation de la protéine M1r dans la détection d'anticorps anti-M1 chez des sérums de porcs convalescents. En effet, la reconnaissance de la protéine M1 par un sérum de porc convalescent, confirme le fait que lors d'une infection par l'influenza A, des anticorps sont produits contre la protéine M1. Ceci corrobore les résultats obtenus par Cretescu, Beare et Schild (1978) et Khan *et al.* (1982).

Le 2^{ème} volet du second objectif de cette étude consistait à évaluer l'immunogénicité de la protéine M1r par un test ELISA indirect utilisant la protéine M1 virale comme antigène. Les résultats obtenus démontrent que la protéine M1r est aussi immunogène que la protéine M1 virale. Les sérums anti-M1r et anti-M1 virale ont réagi significativement avec la protéine M1 virale, montrant des titres d'anticorps non-négligeables (64 000). Des résultats similaires ont été obtenus par une étude de Welman et Arora (2000) avec la protéine M1r fusionnée à l'épitope T7-tag. Par le fait même, il a été démontré dans l'étude actuelle que l'immunogénicité de la protéine M1r n'était pas essentiellement attribuable à la présence de cette séquence. Dans le cadre de ce projet, la production d'une nouvelle protéine M1r recombinante a été nécessaire pour éviter l'apparition de résultats faux-positifs pouvant être causés par la présence d'anticorps dans les sérums de porc réagissant contre cette séquence.

Après avoir démontré l'antigénicité et l'immunogénicité de la protéine M1r, le dernier objectif de cette étude consistait à développer un test sérologique de dépistage utilisant la technique ELISA pour détecter la présence d'anticorps dirigés contre la protéine M1. Dans un premier temps, le test sérologique de référence (Murphy et al., 1981), le test

IHA qui détecte les anticorps dirigés contre l'hémagglutinine, vis-à-vis un sous-type donné, a permis de déterminer la réactivité de 30 sérums de porcs avec différentes souches virales dans le but d'évaluer la sensibilité du test ELISA-M1r. D'après les résultats, 18 des 30 sérums de porc testés présentent des anticorps contre la protéine HA du sous-type H1N1 (Tableau 1). D'autre part, le Tableau 1 démontre que les valeurs des titres IHA des sérums obtenues avec les souches SwQc81 et SwQc91 sont généralement semblables, malgré une divergence considérable au niveau de la région codante du gène de l'HA de ces deux souches (Rekik, Arora et Dea, 1994). Tel que rapporté par Henrichon (1997), les anti-sérums de porcs, ne peuvent différencier la protéine HA du variant antigénique SwQc91 des autres souches virales en circulation ce qui pourrait expliquer la similarité des valeurs de titres IHA. Par ailleurs, en plus du sous-type H1N1, les porcs sont également affectés par les virus de type H3N2. Des travaux antérieurs effectués dans le laboratoire du Dr Arora avec les sérums de porcs utilisés dans cette étude avaient révélé la présence d'un seul sérum positif pour le virus A/Victoria/3/75 H3N2. Cette donnée ne modifie toutefois pas le nombre de sérums positifs à l'influenza déterminé précédemment.

Avec le test ELISA-M1r, il a été démontré que 23 des 30 sérums de porc testés présentent des IgG spécifiques à la protéine M1 (Tableau 1). Malgré le fait que le test ELISA détecte les anticorps produits contre la protéine M1 et que le test IHA détecte les anticorps anti-HA, leurs résultats ont été comparés pour évaluer la valeur diagnostique du test développé. Ainsi, les résultats démontrent que le test ELISA-M1r atteint une sensibilité de 100 % car les sérums positifs à l'influenza d'après le test IHA ont tous été décelés. De plus, le test ELISA-M1r est plus sensible que le test IHA car il permet de mettre en évidence un plus grand nombre de sérums positifs à l'influenza. Par contre, à l'aide d'un test ELISA utilisant la protéine M1 virale comme antigène, il a été démontré qu'un seul des 5 sérums déclarés nouvellement positif par le test ELISA-M1r était un faux-positif (Tableau 2). Ce résultat faussement positif pourrait être expliqué par la réaction d'anticorps sériques avec les protéines bactériennes *E. coli* provenant du système d'expression retrouvées dans la préparation de protéine M1r, vu la méthode de purification utilisée.

Le désavantage principal du test IHA est qu'il détecte un seul sous-type influenza à la fois par la mesure des anticorps dirigés contre la protéine HA qui diffère selon les sous-types. D'ailleurs, le haut niveau de spécificité du test IHA peut provoquer l'apparition de résultats faussement négatifs. Par exemple, si les souches utilisées dans le test IHA diffèrent partiellement ou complètement des souches influenza auxquelles les porcs ont été exposés, les valeurs de titres IHA vont diminuer. Par conséquent, les virus utilisés dans le test IHA doivent être renouvelés fréquemment à cause de la variabilité de la protéine HA.

Le test ELISA décrit dans cette étude présente plusieurs avantages lorsque comparé avec le test IHA. En effet, à cause de l'utilisation de la protéine M1 hautement conservée (Lamb, 1989), le test ELISA-M1r n'est pas affecté par les variations antigéniques des souches influenza A. D'ailleurs, les études de Khan *et al.*, (1982) et de Joassin, Reginster et Vaira (1983), ont décrit des tests ELISA avec la protéine M1 virale démontrant le potentiel d'utilisation de cette protéine dans la détection des anticorps anti-influenza A. Le test ELISA-M1r permet de détecter simultanément les anticorps anti-M1 spécifiques à tous les sous-types d'influenza A incluant les sous-types H1N1 et H3N2 qui sont principalement isolés chez les porcs en Amérique du Nord. D'autre part, en utilisant une protéine conservée comme antigène, ceci permettra également de déceler s'il y a lieu des anticorps anti-M1 induit par de nouvelles souches influenza A. Cet aspect n'est pas négligeable sachant que le porc est susceptible d'être infectés par les différents sous-types des virus influenza humains (H1 à H3) et aviaires (H1 à H9, H11, H13) (Ito *et al.*, 1998) et peut entraîner l'apparition de nouveaux sous-types résultant d'un réassortiment génétique (Scholtissek *et al.*, 1985; Scholtissek et Naylor, 1988; Webster *et al.*, 1992). D'ailleurs, au Québec depuis l'isolement de la souche SwQc91 H1N1, des études ont démontré la circulation simultanée d'autres variants H1N1 (Bikour *et al.*, 1995; Arora, N'Diaye et Dea, 1997a). De plus, récemment certains variants H3N2 ainsi qu'une souche influenza de type H4N6 ont fait leur apparition en Ontario et aux États-Unis (Zhou *et al.*, 1999; Carman *et al.*, 2001; Karasin *et al.*, 2000).

En plus de permettre la détection simultanée de tous les sous-types d'influenza A, ce test ELISA présente plusieurs avantages sur le test sérologique de référence. Les résultats obtenus démontrent que le test ELISA-M1r est plus sensible que le test IHA. En effet, le test développé détecte une plus grande proportion de sérums positifs à l'influenza A. Certaines études ont démontré que l'ELISA est une méthode de détection plus sensible que le test IHA car il peut détecter de plus faibles concentrations d'anticorps. Des ELISA utilisant l'hémagglutinine comme antigène se sont avérés plus sensibles que le test IHA (Julkunen, Pyhala et Hovi, 1985; Murphy *et al.*, 1981). D'autre part, certaines études confirment que les tests ELISA qui mesurent les anticorps spécifiques (IgG) au virus influenza sont plus sensibles que le test sérologique de référence (Bishai et Galli., 1978; Madore, Reichman et Dolin, 1983; Turner *et al.*, 1982).

Outre son manque de sensibilité, le test IHA utilise comme antigène, le virus qui doit être cultivé dans les oeufs embryonnés de poulet. Cette méthode de culture laborieuse et dispendieuse, peut affecter les propriétés biologiques, antigéniques et immunologiques de la souche virale originale au niveau de l'HA (Robertson *et al.*, 1987; Katz et Webster, 1989; Wood *et al.*, 1989). D'autre part, les sérums utilisés doivent être traités pour inactiver les inhibiteurs non-spécifiques de l'hémagglutination et la réalisation du test implique plusieurs étapes de dilutions des sérums. Contrairement au test IHA, la protéine M1r utilisée comme antigène dans le test ELISA-M1r est facile à produire par la technique d'expression des protéines recombinantes dans des cellules compétentes de souches *E. coli*. Une technique simple, peu dispendieuse et dans laquelle le temps nécessaire à la surexpression de la protéine recombinante est court. Des clones bactériens stables pendant plusieurs années à -80°C rendent l'antigène constamment disponible. D'autre part, le choix de la protéine M1r a été privilégiée à la protéine M1v car bien qu'elle présente les épitopes dans la conformation native ainsi que les modifications post-traductionnelles, la protéine M1v nécessite la culture du virus influenza dans les oeufs embryonnés de poulet ou dans des lignées cellulaires.

Le test ELISA-M1r ainsi développé est sensible, facile à utiliser, rapide et peu coûteux. De plus, le fait de mesurer les réactions immunologiques à l'aide d'un spectrophotomètre rend cette méthode objective et hautement reproductible. L'antigène est stable lorsque congelé pour une période de plusieurs mois et le test ELISA utilisant une microplaque à 96 puits est une technique pratique. De plus, les sérums utilisés dans la technique ELISA ne requièrent pas de traitement particulier. Le test développé permet d'analyser simultanément de multiples échantillons avec une instrumentation simple, des réactifs moins coûteux et il peut être complété en 3 heures environ lorsque les microplaques sont saturées.

Conclusion

Cette étude avait comme premier objectif de produire la protéine M1r de la souche influenza porcine SwQc91 à l'aide d'un système d'expression procaryote et de procéder à sa purification. Par la suite, nous avons évalué l'antigénicité et l'immunogénicité de la protéine exprimée. Finalement, nous voulions mettre au point un test ELISA utilisant la protéine M1r comme antigène pour détecter les anticorps anti-influenza A chez les porcs.

Les résultats de cette étude ont permis de démontrer que la protéine M1r produite à l'aide d'un système procaryote présente des propriétés antigéniques. En effet, par la technique d'immunobuvardage la protéine M1r était reconnue par les anticorps d'un sérum de porc convalescent. Cette étape préliminaire était importante pour mettre en évidence le potentiel d'utilisation de la protéine M1r dans un test ELISA diagnostic. Cette étude a également révélé que la protéine M1r est immunogène car lorsqu'elle est injectée chez la souris des anticorps anti-M1 sont produits.

D'autre part, un test sérologique de dépistage utilisant la technique ELISA et la protéine M1r pour détecter la présence d'anticorps anti-influenza A, a été développé au cours de cette étude. Le test ELISA-M1r a atteint une sensibilité de 100 % lorsque utilisé avec des sérums de porc. Les résultats démontrent également que le test ELISA-M1r est plus sensible que le test sérologique de référence, le test IHA.

Le test ELISA-M1r développé dans ce projet est simple, sensible, rapide d'exécution, peu dispendieux et il permet d'analyser plusieurs échantillons simultanément avec une instrumentation simple. Contrairement aux méthodes de production et de purification des protéines virales, l'utilisation d'un système d'expression procaryote permet de produire l'antigène rapidement, en grande quantité et à faible coût. L'avantage majeur de ce test est qu'il permet la détection simultanée des anticorps spécifiques à tous les sous-types d'influenza A par l'utilisation de la protéine M1 hautement conservée. D'autre part,

pour prévenir l'apparition de résultats faux-positifs lors de la détection d'anticorps anti-influenza A, le choix d'une construction plasmidique évitant l'expression d'une protéine de fusion a été privilégiée. De plus, le format de ce test est éventuellement applicable aux sérums des autres espèces pouvant être affectées par l'influenza A.

La fiabilité de ce test pourrait être augmentée, en améliorant la méthode de purification de la protéine M1r dans le but d'éviter la présence de résultats faussement positifs provoquée par la réaction d'anticorps sériques avec les protéines bactériennes *E. coli* provenant du système d'expression. De plus, des études plus approfondies seraient nécessaires pour démontrer la précision, l'exactitude et la fiabilité du test développé. Après ces études de performance, ce test pourrait représenter un bon outil de dépistage dans les enquêtes sérologiques de suivi, chez les populations porcines.

Le test ainsi développé pourrait simplifier la détermination du diagnostic sérologique, considérant l'apparition de souches virales distinctes et de variants antigéniques chez les porcs. Il permettrait également de connaître et de circonscrire rapidement les foyers d'infection pour diminuer la mortalité et la morbidité associée à l'infection par l'influenza mais aussi de prévenir l'épidémie au sein de la population porcine et éventuellement, la population humaine.

Bibliographie

- Air, G.M., et W.G. Laver. 1989. « The neuraminidase of influenza virus ». Proteins structure Function and Genetics, vol 6, p. 341-356.
- Albo, C., A. Valencia, et A. Portela. 1995. « Identification of an RNA binding region within the N-terminal third of the influenza A virus nucleoprotein ». Journal of Virology, vol 69, p. 3799-3806.
- Ali, A., R.T. Avalos, E. Ponimaskin et D. P. Nayak. 2000. « Influenza virus assembly : effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein ». Journal of Virology, vol 74, p. 8709-8719.
- Allen, H., J. Mc Cauley, M. Waterfield et M.J. Gething. 1980. « Influenza virus RNA segment 7 has the coding capacity for two polypeptides ». Virology, vol 107, p. 458-551.
- Almond, J.W., et C.M. Brand. 1977. « A single gene determines the host range of influenza virus ». Nature, vol 270, p. 617-618.
- Aragon, T., S. de La Luna, I. Novoa, L. Carrasco, J. Ortin, et A. Nieto. 2000. « Eukaryotic translation initiation factor 4 GI is a cellular target for NS1 protein, a translationnal activator of influenza virus ». Molecular Cellular Biology, vol 20, p. 6259-6268.
- Arora, D.J.S, P. Tremblay, R. Bourgault et S. Boileau. 1985. « Concentration and purification of influenza virus from allantoic fluid ». Analytical Biochemistry. vol 144, p. 189-192.
- Arora, D.J.S. 1992. « Localization of separated protein bands in unstained electrophoresed polyacrylamide gradient slab gel ». Electrophoresis, vol 13, p. 100-101.
- Arora D.J.S., M. N'Diaye, et S. Dea. 1997a. « Genomic study of hemagglutinins of swine influenza (H1N1) viruses associated with acute and chronic respiratory diseases in pigs ». Archives of Virology, vol 142, p. 401-412.
- Arora D.J.S., P. Tijssen , S. Dea, et M. Henrichon. 1997b. « Complete sequence of the neuraminidase genes of swine influenza (H1N1) associated with the respiratory disease in pigs ». Virus Genes, vol 14, p. 251-254.
- Arrese, M., et A. Portela. 1996. « Serine 3 is critical for phosphorylation at N-terminal end of the nucleoprotein of influenza virus A/Victoria/3/75 ». Journal of Virology, vol 70, p. 3385-3391.
- Arzt, S., F. Baudin, A. Barge, P. Timmins, W.P. Burmeister et R.W.H. Ruigrok. 2001. « Combined results from solution studies on intact influenza virus M1 protein and

from a new crystal form of its N-terminal domain show that M1 is an elongated monomer ». Virology, vol 279, p. 439-446.

- Ausebel, F.M., R., Brent, R.E. Kingston., D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith et K. Struhl (éd). 1995. Short protocols in molecular biology. États-Unis : John Wiley and sons.
- Aymard, M., J.M Gourreau, C. Kaiser, M. Fontaine, F. Madee et J.P. Tillon. 1985. « Les marqueurs immunovirologiques du risque d'influenza A H3N2 chez les porcs ». Revue Epidémiologique Médicale Société Santé Publique, vol. 33, p. 283-291.
- Baneyx, F. 1999. « Recombinant protein expression in *Escherichia coli* ». Current Opinion in Biotechnology, vol 10, p.411-421.
- Bauer, C.M, L.H. Pinto, T.A. Cross, et R.A. Lamb. 1999. « The influenza virus M2 ion channel protein : probing the structure of the transmembrane domain in intact cells by using engineered disulfide cross-linking ». Virology, vol 254, p. 196-209.
- Baudin, F., I. Petit., W. Weissenhorn, et R.W.H. Ruigrok. 2001. « *In vitro* dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein ». Virology, vol 281, p. 102-108.
- Bean, W.J., et R.G. Webster. 1978. « Phenotypic properties associated with influenza genome segments ». In B.W.J. Mahy et R.D Barry. Negative strand virus and the host cell. London : Academic Press, 1978, p.685-692.
- Beaton, A. R., et R.M. Krug. 1986. « Transcription antitermination during influenza viral templates RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol 83, p. 6282-6286.
- Bikour, M.H, E. Cornaglia, J.M. Weber et Y. Elazhary. 1994. « Antigenic characterization of an H3N2 swine influenza virus isolated from pigs with proliferative and necrotizing pneumonia in Quebec ». Canadian Journal of Veterinary Research, vol, 58, p. 287-290.
- Bikour, M.H., E.H. Frost, S. Deslandes, B. Talbot et Y. Elazhary. 1995. « Persistence of a 1930 swine influenza A (H1N1) virus in Québec ». Journal of General Virology, vol 76, p. 2539-2547.
- Bishai, F.R. et R. Galli. 1978. «Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to influenza A and B and parainfluenza type 1 in sera of patients». Journal of clinical microbiology, vol 8, p.648-656.

- Biswas, S.K., P.L. Boutz, et D.P. Nayak. 1998. « Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins ». Journal of Virology, vol 72, p. 5493-5501.
- Blaas, D., E. Patzelt, et E. Keuchler. 1982. « Identification of the cap binding protein of influenza virus ». Nucleic Acids Research, vol 10, p. 4803-4812.
- Blok, V., C. Cianci, K.W. Tibbles, S.C. Inglis, M. Krystal, et P. Digard. 1996. « Inhibition of the influenza virus RNA-dependent RNA polymerase by antisera directed against the carboxy-terminal region of the PB2 subunit ». Journal of General Virology, vol 77, p. 1025-1033.
- Bouloy, M., Plotch, S.J., et R.M. Krug. 1978. « Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol 75, p. 4886-4980.
- Boycott, R. H.D. Klenk et M. Ohuchi. 1994. « Cell tropism of influenza virus mediated by hemagglutinin activation at the stage of virus entry ». Virology, vol 203, p. 313-319.
- Braam, J., I. Ulmanen, R.M. Krug. 1983. « Molecular model of a eucaryotic transcription complex : function and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription ». Cell, vol 34, p. 609-618.
- Braciale, T.J. 1977. « Immunologic recognition of influenza cell II. Expression of influenza A matrix protein on the infected cell surface and its role in recognition by cross-reactive cytotoxic cells ». Journal of Experimental Medecine, vol 146, p. 673-689.
- Braciale, T.J. et K.L. Yap. 1978. « Role of viral infectivity in the induction of influenza virus-specific cytotoxic T cells ». Journal of Experimental Medecine, vol 147, p.1236-1252.
- Bron, R., A.P. Kendal, H.D. Klenk et J. Wilschut. 1993. « Role of the M2 protein in influenza virus membrane fusion effects of amantadine and monensin of fusion kinetics ». Virology, vol 195, p. 808-811.
- Brown, I.H., P.A. Harris et D.J. Alexander. 1995. « Serological studies of influenza viruses in pigs in Great-Britain 1991-92 ». Epidemiology and Infection, vol 114, p. 511-520.
- Brown, I.H., P.A. Harris, J.W. Mc Cauley et D.J. Alexander. 1998. « Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses en European pigs, resulting in the emergence of an H1N2 virus of novel genotype ». Journal of General Virology, vol 79, p. 2947-2955.

- Brown, G.B. et W.R. Millen. 1994. « MaxVac-Flu : evaluation of the safety and efficacy of a swine influenza vaccine. Proceeding American Association of Swine Practitioners . 25th Annual Meeting. p. 37-39.
- Bucher, D.J., I.G. Kharitonov, M.W. Kan, A. Palo, D. Holloway et A. Mikhail. 1987. « Detection of influenza viruses through selective adsorption and detection of the M-protein antigen ». Journal of Immunological Methods, vol 96, p. 77-85.
- Bui, M., Whittaker, G., et A. Helenius. 1996. « Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins ». Journal of Virology, vol 70, p. 8391-8401.
- Bui, M., E.G. Wills, A. Helenius, et G.R. Whittaker. 2000. « Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins ». Journal of Virology, vol 74, p. 1781-1786.
- Bullido, R., P. Gomez-Puertas, M.J. Saiz et A. Portela. 2001. « Influenza A virus NEP (NS2 protein) downregulates RNA synthesis of model template RNAs ». Journal of Virology, vol 75, p. 4912-4917.
- Carman, S., G. Josephson, C. Stansfield, J. Weber, R. Bildfell et T. V. Dreumel. 2001. « H3N2 influenza A virus in pigs ». Animal Health Laboratory Newsletter, vol 3, p.4.
- Chambers, T.M., V.S. Hinshaw, Y. Kawaoka, B.C. Easterday, R.G. Webster. 1991. « Influenza viral infection of swine in the United-States 1988-1989 ». Archives of Virology, vol 116, p. 261-265.
- Charley, B. 1977. « Local immunity in the pig respiratory tract: Cellular and humoral immune responses following swine influenza virus infection ». Annual Microbiology, vol 1, p.95-107.
- Chen, Z., Y. Li, et R.M. Krug. 1999. « Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery ». European Molecular Biology Organization Journal, vol 18, p. 2273-2283.
- Chizhnikov, I.V., F.M. Geraghty, D.C. Ogden, A. Hayhurst, M. Antoniou et A.J. Hay. 1996. « Selective proton permeability and pH regulation of the influenza virus M2 channel expressed in mouse erythroleukaemia cells ». Journal of Physiology, vol 494, p. 329-336.

- Choi, Y.K., S.M. Goyal., M.W. Farnham et H.S. Joohs. « Phylogenetic analysis of H1N2 isolates of influenza A virus from pigs in the United States ». Virus Research, vol, 87, p.173-179.
- Colman, P.M. « Neuraminidase : enzyme and antigen ». 1989. In R.M. Krug (éd.). The influenza viruses. New York : Plenum Press, 1989, p. 175-218.
- Compans, R.W., N.J. Dimmock, et H. Meier-Ewert. 1969. « Effect of antibody to neuraminidase on the maturation and hemagglutinating activity of an influenza A2 virus ». Journal of Virology, vol 4, p. 528-534.
- Compans, R.W., et P.W. Choppin. 1975. « Reproduction of myxoviruses ». In H. Fraenkel-Conrat et R.R.Wagner, (éd.). Comprehensive virology. New York : Plenum Press, 1975, p.179-252.
- Cornaglia, E., G. Laganière, R. Lallier, J. Arora et S. Dea. 1999. « A new competitive ELISA for serological monitoring of swine influenza ». Proceedings American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, vol 41.
- Cretescu, L., A.S. Beare, G.C Schild. 1978. « Formation of antibody to matrix protein in experimental human influenza A virus infections ». Infection and Immunity, vol 22, p. 322-327.
- Curry, R.L. J.D. Brown, F.A. Baker et D. Hobson. 1974. « Serological studies with purified neuraminidase antigens of influenza B viruses ». Journal of Hygiene, vol 72, p. 197-204.
- Dacso, C.C., R.B. Couch, H.R. Six, J.F. Young, J.M. Quarles et J.A. Kasel. 1984. « Sporadic occurrence of zoonotic swine influenza virus infections ». Journal of Clinical Microbiology, vol 20, p. 833-835.
- Davey, J., N.J. Dimmock et A. Colman. 1985. « Identification of the sequence responsible for the nuclear accumulation of the influenza virus nucleoprotein in *Xenopus* oocytes ». Cell, vol 40, p. 667-675.
- Dea, S., Athanassious, R., Sauvageau, R.A. et G.P. Martineau. 1992a. « Swine reproductive and respiratory syndrome in Quebec : Isolation of an envelopped virus serologically- related to lelystad virus ». Canadian Veterinary Journal, vol 33, p. 801-808.
- Dea, S., R. Bilodeau, R. Sauvageau, C. Montpetit, G.P. Martineau. 1992b. « Antigenic variant of swine influenza virus causing proliferative and necrotizing pneumonia in pigs ». Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, vol 4, p. 380-392.

- De Boer, G.F., W. Black, et D.M.E. Osterhaus. 1990. « An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species ». Archives of Virology, vol 115, p. 47-61.
- de la Luna, S., P. Fortes, A. Beloso, et J. Ortin. 1995. « Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs ». Journal of Virology, vol 69, p. 2427-2433.
- De Jong, J.C., M.F. Paccaud, F.M. de Ronde-Verloop, N.H. Huffels, C. Vernei, T.F. Weigers, P.J. Bangma, E. van Kregten, J.A. Kerkhaert, F. Wicki. 1988. « Isolation of swine-like influenza A (H1N1) viruses from men in Switzerland and the Netherlands ». Annales de l'Institut Pasteur. Virology. vol 139, p. 429-437.
- De Jong, J.C., A.P. Van Nieuwstadt, T.G. Kimman, W. L. Loeffen, T.M. Bestebroer, K. Bijlsma, C. Verweij, A.D. Osterhaus et E.C. Class. 1999. « Antigenic drift in swine influenza H3 haemagglutinins with implications for vaccination policy ». Vaccine, vol 17, p. 1321-1328.
- Digard, P., D. Elton, K. Bishop, E. Medcalf, A. Weeds, et B. Pope. 1999. « Modulation of nuclear localization of influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments ». Journal of Virology, vol 73, p. 2222-2231.
- Domingo, E., J. Diez, M.A. Martinez, J. Hernandez, A. Holguin, B. Borrego et M.G. Mateu. 1993. « New observations on antigenic diversification of RNA viruses : Antigenic variation is not dependent on immune selection ». Journal of General Virology, vol 74, p. 2039-2045.
- Donofrio, J.C., J.D. Coonrod, V. Karathanasis et K.V.W. Coelingh. 1986. « Electroelution for purification of influenza A matrix protein for use in immunoassay ». Journal of Virological Methods, vol 13, p. 107-120.
- Durrer, P. C. Galli, S. Hoencke, C. Corti, R. Gluck, T. Vorherr et J. Brunner. 1996. « H⁺-induced membrane insertion of influenza virus hemagglutinin involves the HA2 amino-terminal fusion peptide but not the coiled coil region ». Journal of Biological Chemistry, vol 271, p.13417-13421.
- Eason, R.J., et M.D. Sage. 1980. « Deaths from influenza A, subtype H1N1, during the 1979 Auckland epidemic ». New Zealand Medical Journal, vol 91, p. 129-131.
- Easterday, B.C. 1986. « Swine Influenza ». In A.D. Leman, B. Straw, R.D. Glock, W.L. Mengeling et RHC Penny et E. Scholl (éd.). Disease of swine. Iowa : University Press, 1986, p.244-255.

- Eckert, K.A. et T.A. Kunkel. 1990. « High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase ». Nucleic Acids Research, vol 18, p.3739-3744.
- Elster, C., Larsen, K., Gagnon, J., Ruigrok, R.W.H., et Baudin, F. 1997. « Influenza virus M1 protein binds to RNA through its nuclear localisation signal ». Journal of General of Virology, vol 78, p. 1589-1596.
- Enami, M., G. Sharma, C. Benham, P. Palese. 1991. « An influenza virus containing nine different RNA segments ». Virology, vol 185, p. 291-298.
- Enami, K., T. A. Sato, S. Nakada, et M. Enami. 1994. « Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein ». Journal of Virology, vol 68, p. 1432-1437.
- Enami, M., et K. Enami. 2000. « Characterization of influenza virus NS1 protein by using a novel helper-virus-free reverse genetic system ». Journal of Virology, vol 74, p. 5556-5561.
- Erickson, E., F. Yao, T. Svensjo, T. Winkler, J. Slama, M.D. Macklin, C. Andree, M. McGregor, V. Hinshaw et W.F. Swain. 1998. « In vivo gene transfer to skin and wound by microseeding ». Journal of Surgical Research, vol 78, p.85-91.
- Erickson, G., J. Landgraf, S. Swenson et S. Greer-Graham. 1999. « New approaches to swine influenza virus isolation ». Proceedings of American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, vol 45.
- Falcon, A., P. Fortes, R.M. Marion, A. Beloso, et J. Ortin.1999. « Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufen in vivo and in vitro ». Nucleic Acids Research, vol 27, p. 2241-2247.
- Fleischer, B., H. Becht et R. Rott. 1985. « Recognition of viral antigens by human influenza A virus-specific T lymphocyte clones ». Journal of Immunology, vol 135, p. 2800-2804.
- Fortes, P., A. Beloso, et J. Ortin.1994. « Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport ». European Molecular Biology Organization Journal, vol 13, p. 704-712.
- Frace, A.M., A.I. Klimov, T. Rowe, R.A. Black, J.M. Katz. 1999. « Modified M2 proteins produce heterotypic immunity against influenza A virus ». Vaccine, vol 17, p. 2237-44.
- Gammelin, M., A. Atmuller, U. Reinhardt, J. Mandler, V.R. Harley, P.J. Hudson, W.M » Fitch et C. Scholtissek. 1990. « Phylogenetic analysis of nucleoproteins suggests

that human influenza A viruses emerged from a 19th-century avian ancestor ». Molecular Biology and Evolution, vol 7, p. 194-200.

- Garcia-Sastre, A., A. Egorov, D. Matassov, S. Brandt, D.E. Levy, J.E. Durbin, P. Palese et T. Muster. 1998. « Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems ». Virology, vol 252, p. 324-330.
- Gething, M.J., R.W. Doms, D. York et J.M. White. 1986. « Studies on the mechanism of membrane fusion : site specific mutagenesis of the hemagglutinin of the influenza virus ». Journal of Cell Biology, vol 107, p.11-23.
- Gibson, C.A., J.M. Wood, J. Mumford, G.C. Schild et A.M. Bevan. 1985. « A single radial haemolysis technique for measurement of antibody to influenza virus neuraminidase in equine sera ». Journal of Virological Methods, vol 11, p.299-308.
- Girard, C., M. Morin, Y. Elazhary. 1992. « Experimentally-induced porcine proliferative and necrotising pneumonia with an influenza A virus ». Veterinary Research, vol 130, p. 206-207.
- Gomez-Puertas, P., C. Albo, E. Perez-Pastrana, et A. Portela. 2000. « Influenza Virus Matrix Protein is the major driving force in virus budding ». Journal of Virology, vol 74, p. 11538-11547.
- Gorlich, D. et I.W. Mattaj. « Nucleocytoplasmic transport ». 1996. Science, vol 271, p. 1513-1518.
- Gottschalk, A. 1957. « The specific enzyme of influenza virus and vibrio cholerae ». Biochimica et Biophysica Acta, vol 23, p. 4189-4195.
- Gourreau, J.M., C. Kaiser, M. Valette, A.R. Douglas, J. Labie et M. Aymard.1994. « Isolation of two H1N2 influenza viruses from swine in France ». Archives of Virology, vol 135, p. 365-382.
- Greenspan, D., M. Krystal, S. Nakada, H. Amheiter, D.S. Lyles et P. Palese. 1985. « Expression of influenza virus NS2 nonstructural protein in bacteria and localization of NS2 in infected eucaryotic cells ». Journal of Virology, vol 54, p. 833-843.
- Greenspan, D., P. Palese et M. Krystal. 1988. « Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein ». Journal of Virology, vol 62, p. 3020-3026.

- Gregoriades, A., T. Christie et K. Markarian. 1984. «The membrane (M1) protein of influenza virus occurs in two forms and is phosphoprotein ». Journal of Virology, vol 49, p.229-235.
- Gregoriades, A., G.G. Guzman et E. Paoletti. 1990. «The phosphorylation of the integral membrane (M1) protein of influenza virus ». Virus Research, vol 16 : 27-41.
- Griffin, J. A., S. Basak, et R.W. Compans. 1983. « Effects of hexose starvation and the role of sialic acid in influenza virus release ». Virology, vol 125, p. 324-334.
- Guan, Y., K.F. Shortridge, S. Krauss, P.H. Li, Y. Kawaoka et R.G. Webster. 1996. « Emergence of an avian H1N1 influenza viruses in pigs in China ». Journal of Virology, vol 70, p. 8041-8046.
- Guo, Y.J., F.G. Jin, P. Wang, M. Wang et J.M. Zhu. 1983. « Isolation of influenza C virus from pigs and experimental infection of pigs with influenza C virus ». Journal of General Virology, vol 64, p. 177-182.
- Haesebrouck, F., P. Biront, M.B. Pensaert et J. Leunen. 1985. « Epizootics of respiratory tract disease in swine in Belgium due to H3N2 influenza virus and experimental reproduction of disease ». American Journal of Veterinary Research, vol. 46, p. 1926-1928.
- Haesebrouck, F. et M.B. Pensaert. 1986. « Effect of intratracheal challenge of fattening pigs previously immunised with an inactivated influenza H1N1 vaccine ». Veterinary Microbiology, vol 11, p.239-249.
- Haines, D.M., E.H. Waters et E.G. Clark. 1993. « Immunohistochemical detection of swine influenza A virus in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues ». Canadian Journal of Veterinary Research, vol. 57, p. 33-36.
- Halvorson, D.A., S. Kodihalli, E. Laudert et J.A. Newman. 1992. «Influenza in turkeys in the USA, 1987-1991». Proceedings of Third International Symposium on Avian Influenza, Wisconsin, USA, p.33-42.
- Hammond, G.W., S.J. Smith et G.R. Noble. 1980. «Sensitivity and specificity of enzyme immunoassays for serodiagnosis of influenza A virus infections». Journal of Infectious Disease, vol 141, p.644-651.
- Harmon, M.W., I. Jones, M. Shaw, W. Keitel, C.B. Reimer, P. Halonen et A.P. Kendal. 1989. « Immunoassay for serological diagnosis of influenza type A using recombinant DNA produced nucleoprotein antigen and monoclonal antibody to human IgG ». Journal of Medical Virology. vol. 27, p. 25-30.

- Harmon, K., S. Krauss et K.J. Yoon. 1999. « Development of a PCR based differential test for H1N1 and H3N2 swine influenza viruses ». Proceedings of American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, vol 44.
- Harlow, E. et D. Lane (éd). Antibodies : A laboratory manual. 1988. New York : Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hatada, E., et R. Fukuda. 1992. « Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro ». Journal of General Virology, vol. 73, p. 3325-3329.
- Hatada, E., S. Saito, N. Okishio, et R. Fukuda. 1997. « Binding of the influenza virus NS1 protein to model genome RNAs ». Journal of General Virology. vol. 78, p. 1059-1063.
- Hausmann, J., E. Kretzschmar, W. Garten et H.D. Klenk. 1995. « N1 neuraminidase of influenza virus A/FPV/Rostock/34 has haemadsorbing activity ». Journal of General Virology. vol. 76, p. 1719-1728.
- Havlickova, M., H., Alartorseva, A. Plyusnin et A. Stumpa. 1992. « Possible use of matrix protein obtained by cloning in *E. coli* in the serological diagnosis of type A influenza ». Acta Virologica, vol. 36, p. 332.
- Hay, A.J., B. Lomniczi, A.R. Bellamy et J.J. Skehel. 1977. « Transcription of the influenza virus genome ». Virology, vol. 83, p. 337-355.
- Hay, A.J. J.J. Skehel, et J. Mc Cauley. 1982. « Characterization of influenza virus RNA complete transcripts ». Virology, vol. 116, p. 517-522.
- Hay, A.J. 1992. « The action of adamantanamines against influenza A viruses : inhibition of the M2 ion channel protein ». Seminars in Virology, vol. 3, p. 21-30.
- Heinen, P.P., E.A. de Boer-Lujitze et A.T. Bianchi. « Respiratory and systemic humoral and cellular immune response of pigs to a heterosubtypic influenza A virus infection ». 2001. Journal of General Virology, vol 82, p. 2697-2707.
- Helenius, A., 1992. « Unpacking the incoming influenza virus ». Cell, vol. 69, p. 577-578.
- Henrichon, M. 1997. « Expression de la sous-unité HA1 du gène de l'hémagglutinine du virus influenza A (H1N1) associé à la pneumonie proliférative et nécrosante ». Mémoire de maîtrise, Québec, Université du Québec, 156 p.
- Hers, J.F. 1966. « Disturbances of the ciliated epithelium due to influenza virus ». American Reviews in Respiratory Disease, vol 93, p.162-171.

- Hiebert, S.W., M.A. Williams et R.A. Lamb. 1986. « Nucleotide sequence of RNA segment 7 of influenza B/Singapore/222/79 : maintenance of a second large open reading frame ». Virology, vol.155, p. 747-751.
- Hinshaw, V.S., W.J. Bean, R.G. Webster Jr et B.C. Easterday. 1978. « The prevalence of influenza viruses in swine and the antigenic and genetic relatedness of influenza viruses from man and swine ». Virology, vol. 84, p. 51-62.
- Hinshaw, V.S., R.G. Webster, B.C. Easterday et W.J. Bean Jr. 1981. « Replication of avian influenza A viruses in mammals ». Infection Immunity, vol. 34, p. 354-361.
- Hirst, G.K. 1942. « The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cells agglutination ». Journal of Experimental Medecine, vol 75, p. 47-64.
- Holsinger, L.J. et R.A. Lamb. 1991. « Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds ». Virology, vol. 183, p. 32-43.
- Honda, A., K. Ueda, N. Nagata et A. Ishihama. 1988. « RNA polymerase of influenza virus : role of NP in RNA chain elongation ». Journal of biochemistry, vol. 102, p. 1021-1026.
- Horimoto, T., et Y. Kawaoka. 1994. « Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus ». Journal of Virology, vol. 68, p. 3120-3128.
- Huang, R.T.C., R. Rott, K. Wahn, H.D. Klenk et T. Kohama. 1980a. « The function of the neuraminidase in membrane fusion induced by myxovirus ». Virology, vol 107, 313-319.
- Huang, R.T., K. Wahn, H.D. Klenk et R. Rott. 1980b. « Fusion between cell membrane and liposomes containing the glycoproteins of influenza virus », Virology, vol 104, p.294-302.
- Inglis, S.C., R.A. Lamb, A.R. Carroll, B.W.J. Mahy. 1976. « Polypeptides specified by the influenza virus genome. I. Evidence for eight distinct gene products specified by fowl plague virus ». Virology, vol. 74, p. 489-503.
- Inglis, S.C., T. Barrett, C.M. Brown, J.W. Almond. 1979. « The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 76, p. 3790-3794.

- Inglis, S.C. et J.W. Almond. 1980. « An influenza virus gene encoding two different proteins ». Philosophical Transactions of the Royal Society of London. vol. 288, p. 375-381.
- Inkster, M.D., V.S. Hinshaw et I.T. Schultze. 1993. « The hemagglutinins of duck and human H1 influenza viruses differ in sequence conservation and in glycosylation ». Journal of Virology, vol. 67, p. 7436-7443.
- Ito, T., O.T. Gorman, Y. Kawaoka, W.J. Bean et R.G. Webster. 1991. « Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins ». Journal of Virology, vol. 65, p. 5491-5498.
- Ito, T., J.N.S.S Couceiro, S. Kelm, L.S. Baum, S. Krauss, M.R. Castrucci, I. Donatelli, H. Kida, J.C. Paulson, R.G. Webster et Y. Kawaoka. 1998. « Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential ». Journal of Virology, vol. 72, p. 7367-7373.
- Invitrogen. 2000. «Original TA cloning kit, instruction manual ». 26 p.
- Janke, B.H. 2000. « Diagnosis of swine influenza ». Swine Health Production. vol. 8, p. 79-84.
- Jin, H., G.P. Leser, J. Zhang et R.A Lamb. 1997. « Influenza virus haemagglutinin and neuraminidase cytoplasmic tails control particle shape ». European Molecular Biology Organization Journal, vol. 16, p. 1236-1247.
- Joassin , L.. M. Reginster et D. Vaira. 1983. « Anti-M protein antibody response to type A or B natural influenza detected by solid phase enzyme linked immunosorbent assay and by complement fixation ». Archives of Virology, vol. 76, p. 15-23.
- Johansson, B.E. et E.D. Kilbourne. 1996. « Immunisation with dissociated neuraminidase, matrix and nucleoproteins from influenza A virus eliminates cognate help and antigenic competition ». Virology, vol. 225, p. 135-144.
- Julkunen, I., R. Pyhala et T. Hovi. 1985. « Enzyme immunoassay, complement fixation and hemagglutination inhibition tests in the diagnosis of influenza A and B viruses infections : purified hemagglutinin in subtype specific diagnosis ». Journal of Virological Methods, vol. 10, p. 75-84.
- Karasin A.I., I.H. Brown, S. Carman, et C.W. Olsen. 2000. « Isolation and characterization of H4N6 avian influenza viruses from pigs with pneumonia in Canada ». Journal of Virology, vol. 74, p. 9322-9327.

- Katsuda, K., S. Sato, T. Shirahata, S. Lindstrom, R. Nerome, M. Ishida, K. Nerome et H. Goto. 1995. « Antigenic and genetic characteristics of H1N1 human influenza virus isolated from pigs in Japan ». Journal of General Virology, vol. 76, p. 1247-1249.
- Katz, J.M., C.W. Naeve et R.G. Webster. 1987. « Host cell-mediated variation in H3N2 influenza viruses ». Virology, vol. 156, p. 386-395.
- Katz, J.M. et R.G. Webster. 1989. « Efficacy of inactivated influenza A virus (H3N2) vaccines grown in mammalian cells or embryonated eggs ». Journal of Infectious Disease, vol. 160, p. 191-198.
- Khan, M.W., D.J. Bucher, A.K. Koul, G. Kalish, H. Smith et E.D. Kilbourne. 1982. « Detection of antibodies to influenza virus M protein by an enzyme-linked immunosorbent assay ». Journal of Clinical Microbiology, vol. 16, p. 813-820.
- Khatchikian, D., M. Orlich et R. Rott. 1989. « Increased viral pathogenicity after insertion of a 28S ribosomal RNA sequence into the hemagglutinin gene of an influenza virus ». Nature, vol. 340, p. 156-157.
- Kilbourne, ED., W.G. Laver. J.L. Schuman, R.G. Webster. 1968. « Antiviral activity of antiserum specific for an influenza virus neuraminidase ». Journal of Virology, vol. 2, p. 281-288.
- Kilbourne, E.D. 1987. Influenza. New York : Plenum Medical Book Company, 359 p.
- Kimura K, A. Adlakha et P.M. Simon. 1998. « Fatal case of swine influenza virus in an immunocompetent host ». Mayo Clinic Proceedings, vol. 73, p. 243-245.
- Kingsbury, D.W., Jones, I.M et Murti, K.G. 1987. « Assembly of influenza ribonucleoprotein *in vitro* using recombinant nucleoprotein ». Virology, vol. 156, p. 396-403.
- Kistner, O., H. Muller, H. Becht, et C. Scholtissek. 1985. « Phosphopeptide fingerprints of nucleoproteins of various influenza A virus strains grown in different host cells ». Journal of General Virology, vol. 66, p.465-472.
- Kistner, O., K. Muller et C. Scholtissek. 1989. « Differential phosphorylation of the nucleoprotein of influenza A viruses ». Journal of General Virology, vol. 70, p. 2421-2431.
- Klenk, H-D. et W. Garten. 1994. « Cellular receptors for animal viruses : Activation cleavage of viral spike proteins by host proteases ». In E. Wimmer (éd). Receptor-mediated virus entry into cells. Cold Spring Harbor, New York : Cold Spring Harbor Press, 1994, p. 241-280.

- Kobasa, D., M.E. Rodgers, K. Wells et Y. Kawaoka. 1997. « Neuraminidase hemadsorption activity, conserved in avian influenza A viruses, does not influence viral replication in ducks ». Journal of Virology, vol. 71, p. 6706-6713.
- Kobayashi, M., T. Toyoda, D. M. Adyshev, Y. Azuma, et A. Ishihama. 1994. « Molecular dissection of influenza virus nucleoprotein : deletion mapping of the RNA binding domain ». Journal of Virology, vol. 68, p. 8433-8436.
- Koskinen, P., T. Vuorinen et O. Meurman. 1987. « Influenza A and B virus IgG and IgM serology by enzyme immunoassays ». Epidemiology and Infection, vol 99, p.55-64.
- Krug, R.M. et P.R. Etkind. 1973. « Cytoplasmic and nuclear virus-specific proteins in influenza virus-infected MDCK cells ». Virology, vol. 56, p. 334-348.
- Krug, R.M., F.V. Alonso-Caplen, I. Julkunen et M.G. Katze. 1989. « Expression and replication of the influenza virus genome ». In H. Fraenkel-Conrat et R.R. Wagner. The influenza Viruses. New York : Plenum Press, 1989, p 89-152.
- Kwiatowski, J., P. Skarecky, S. Hernandez, D. Pham, F. Quijas et F.J. Ayalas. 1991. « High fidelity of the polymerase chain reaction ». Molecular Biology and Evolution, vol. 8, p. 884-887.
- Laemmli, U.K. 1970. « Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 ». Nature, vol. 227, p. 680-685.
- Lamb, R.A. et P.W. Choppin. 1976. « Synthesis of influenza virus proteins in infected cells : Translation of viral polypeptides, including three P polypeptides from RNA produced by primary transcription ». Virology, vol. 74, p. 504-519.
- Lamb, R.A., P.R. Etkind et P.W. Choppin. 1978. « Evidence for a ninth influenza viral polypeptides ». Virology, vol. 91, p. 60-78.
- Lamb, R.A. et P.W. Choppin. 1979. « Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 76, p. 4908-4912.
- Lamb, R.A., P.W. Choppin, R.M. Chanock et C-J. Lai. 1980. « Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 77, p. 1857-1861.
- Lamb, R.A., C-J. Lai. 1981. « Conservation of the influenza virus membrane protein (M1) amino acid sequence and an open reading frame of RNA segment 7 encoding a second protein (M2) in H1N1 and H3N2 strains ». Virology, vol. 112, p. 746-751.

- Lamb, J.R., J.N. Woody, R.J. Hartzman et D.D. Eckels. 1982. « In vitro influenza virus-specific antibody production in man: Antigen-specific and HLA-restricted induction of helper activity mediated by cloned human T lymphocytes ». Journal of Immunology, vol. 129, p. 1465-1470.
- Lamb, R.A., S.L. Zebedee et C.D. Richardson. 1985. « Influenza M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface ». Cell, vol. 40, p. 627-633.
- Lamb, J.R., A.J. Mc Micheal et J.B. Rothbard. 1987. « T-cell recognition of influenza viral antigens ». Human Immunology. vol. 19, p. 79-89.
- Lamb, R.A. 1989. Genes and proteins of the influenza viruses. The influenza viruses. R.M Krug, ed New York : Plenum press. p. 1-87
- Lamb, R.A., L.J. Holsinger et L.H. Pinto. 1994. The influenza A virus M2 ion channel protein and its role in the influenza virus life cycle. Wimchannel E. Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Press, p. 303-321.
- Lamb, R.A., et R.M Krug. 1996. « Orthomyxoviridae : the viruses and their replication », B.N Fields et D.M. Knipe (éd.). Fields virology. Philadelphia : Lippincott-Raven, 1996, p.1353-1396.
- Larsen, D.L. A. Karasin, F. Zuckerman et C.W. Olsen. 2000. « Systemic and mucosal immune responses to H1N1 influenza virus infection in pigs ». Veterinary Microbiology. vol. 74, p. 117-131.
- Latham, T., et J.M. Galarza. 2001. « Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins ». Journal of Virology, vol. 75, p. 6154-6165.
- Laver, W.G., P.M. Colman, R.G. Webster, V.S. Hinshaw et G.M. Air. 1984. « Influenza virus neuraminidase with hemagglutinin activity ». Virology, vol. 68, p. 440-454.
- Lazarowitz, S.G., R.W. Compans et P.W. Choppin. 1971. « Influenza virus structural and nonstructural proteins in infected cells and their plasma membranes ». Virology, vol. 46, p. 830-843.
- Lee, C. A. Levin et D. Branton. 1987. « Copper staining : a five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels ». Analytical Biochemistry, vol. 166, p. 308-312.

- Lee B.W., R.F. Bey, M.J. Baarsh et R.R. Simonson. 1993. « ELISA method for detection of influenza A infection in swine ». Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, vol. 5, p. 510-515.
- Lee B.W., R.F. Bey, M.J. Baarsh et M.E. Larson. 1995. « Class specific response to influenza A H1N1 infection in swine ». Veterinary Microbiology, vol. 43, p. 241-250.
- Li, S., J. Schulman, A. Itamura et P. Palese. 1993. « Glycosylation of neuraminidase determines neurovirulence of influenza A/WSN/33". Journal of Virology, vol. 67, p. 6667-6673.
- Licheng, S., D.F. Summers, Q.Peng, et J.M. Galarza. 1995. « Influenza A virus polymerase subunit PB2 is the endonuclease which cleaves host cell mRNA and functions only as the trimeric enzyme ». Virology, vol. 208, p. 38-47.
- Liu,C., M.C. Eichenlberger, R.W. Compans, et G.M. Air. 1995. « Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding ». Journal of Virology, vol. 69, p. 1099-1106.
- Lu, Y., X. Y. Qian et R.M. Krug. 1994. « The influenza virus NS1 protein a novel inhibitor of pre-mRNA splicing ». Genes & Development. vol. 8, p. 1817-1828.
- Lu, Y., M. Wambach, M.G. Katze, et R.M. Krug. 1995. « Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor ». Virology, vol. 214 :222-228.
- Luo, G.X., Luytjes, W., Enami, M., et P. Palese. 1991. « The polyadenylation signal of influenza virus RNA involve a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure ». Journal of Virology, vol. 65, p. 2861-2867.
- Luoh, S-M., M.W. McGregor et V.S. Hinshaw. 1992. « Hemagglutinin mutations related to antigenic variation in H1N1 swine influenza viruses ». Journal of Virology, vol. 66, p. 1066-1073.
- Macklin, M.D., D. McCabe, M.W. McGregor, V. Neumann, T. Meyer, R. Callan, V.S. Hinshaw, W.F. Swain.1998. « Immunization of pigs with a particle-mediated DNA vaccine to influenza A virus protects against challenge with homologous virus ». Journal of Virology, vol 72, p. 1491-1496.
- Madore, H.P., R.C. Reichman et R. Dolin.1983. « Serum antibody responses in naturally occurring influenza A infection determined by enzyme-linked immunosorbent

- assay, hemagglutination inhibition, and complement fixation ». Journal of Clinical Microbiology, vol. 18, p.1345-1350.
- Mahy, B.W.J. 1983. « Mutants of influenza virus ». P.Palese et K.W.Kingsbury (éd.). Genetics of influenza virus. Austriche : Springer-Verlag, 1983, p.192-253
- Marion, R.M., T. Zurcher, S. de la Luna, et J. Ortin. 1997a. « Influenza virus NS1 protein interacts with viral transcription-replication complexes in vivo ». Journal of General Virology, vol. 78, p. 2447-2451.
- Marion, R.M., T. Aragon, A. Beloso, C. Dotti, et J. Ortin. 1997b. « The N-terminal half of the influenza virus NS1 protein is sufficient for nuclear retention of mRNA and enhancement of viral mRNA translation ». Nucleic Acids Research, vol. 25, p. 4271-4277.
- Marsh, K. et A. Helenius. 1989. « Virus entry into animals cells ». Advances in Virus Research, vol 36, p. 107-151.
- Martin, K., H. Reggio, A. Helenius et K. Simons. 1981. « Infections entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. Journal of Cell Biology, vol 91, p.601-613.
- Martin, K. et A. Helenius. 1991a. « Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins : the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import ». Cell, vol. 67, p. 117-130.
- Martin, K. et A. Helenius. 1991b. « Transport of incoming influenza virus nucleocapsid into the nucleus ». Journal of Virology, vol. 65, p. 232-244.
- Matlin, K.S., H. Reggio, A. Helenius, et K. Simons. 1982. « Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line ». Journal of Cell Biology, vol. 91, p. 601-613.
- Meir-Ewert, H. et R.W. Compans. 1974. « Time course of synthesis and assembly of influenza virus proteins ». Journal of Virology, vol. 14, p. 1083-1091.
- Mohan, R., Y.M. Saif, G.A. Erickson, G.A. Gustafon et B.C. Easterday BC. 1981. « Serologic and epidemiologic evidence of infection in turkeys with an agent related to the swine influenza virus ». Avian Disease, vol. 25, p. 11-16.
- Morin, M., Phaneuf, J.B., Sauvageau, R., Difranco, F., Marsolais, G. et A. Boudreault. 1981. « An epizootic of swine influenza in Quebec ». Canadian Veterinary Journal, vol. 22, p. 204-205.

- Morin M, Girard C, et Y. Elazhary. 1990. « Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs : a newly recongnized disease ». Canadian Veterinary Journal, vol. 31, p. 837-839.
- Morley P.S, J.R. Bogdan, H.G.G. Townsend, et D.M. Haines. 1995a. « The effect of changing single radial hemolysis assay method when quantifying influenza A antibodies in serum ». Veterinary Microbiology, vol 44, p.101-110.
- Morley P.S, L.K. Hanson, J.R. Bogdan., H.G.G. Townsend, J.A. Appleton et D.M. Haines. 1995b. « The relationship between single radial hemolysis, hemagglutination inhibition, and virus neutralization assays used to detect antibodies specific for equine influenza viruses ». Veterinary Microbiology, vol. 45, p.81-92.
- Mould, J.A., H-C. Li, C.S. Dudlak, J.P. Lear, A. Pekosz, R.A. Lamb et L.H. Pinto. 2000. « Mechanism for proton conduction of the M(2) ion channel of influenza A virus ». Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 8592-8599.
- Mumford, J.A., J.M. Wood, A.M. Scott, C. Folkers et G.C. Schild. 1983. « Studies with inactivated equine influenza vaccine .2. Protection against experimental infection with influenza virus A/equine/Newmarket/79 (H3N8) ». Journal of Hygiene, vol. 90, p. 385-395.
- Murphy, B.R., M.A. Phelan, D.L. Nelson, R. Yarchoan, E.L. Tierney, D.W. Alling et R.M. Chanock. 1981. « Hemagglutinin-specific enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to influenza A and B viruses ». Journal of Clinical Microbiology. vol. 13, p. 554-560.
- Murphy, B.R. et R.G. Webster. 1996. « Orthomyxoviruses ». In B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, R.M. Chanock, J.L. Melnick, T.P. Monath, B. Roizman et S.E. Straus. Fields Virology. Philadelphia : Lippincott-Raven, 1996, p.1397-1445.
- Nakagawa, Y., N. Kimura, T. Toyoda, K. Mizumoto, A. Ishihama, K. Oda, et S. Nakada. 1995. « The RNA polymerase PB2 subunit is not required for replication of the influenza virus genome but is involved in capped mRNA synthesis ». Journal of Virology, vol. 69, p. 728-733.
- Nayak, D.P. 1996. « A look at assembly and morphogenesis of orthomyxo- and paramyxoviruses ». American Society for Microbiology News, vol. 62, p. 411-414.
- N'Diaye, M. 1995. « Caractérisation d'un variant antigénique du virus influenza porcin de type A (H1N1) associé à la pneumonie proliférative et nécrosante ». Mémoire de maîtrise, Québec, Université du Québec, 201 p.

- Neiryneck, S. T. Deroo, X. Saelens, P. Vanlandschoot, W.M. Jou et W. Fiers. 1999. « A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein ». Nature medicine, vol. 10, p. 1157-1163.
- Nemeroff, M.E., S.M. Barabino, Y. Li, W. Keller, et R.M. Krug. 1998. « Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs ». Molecular Cell, vol. 1, p. 991-1000.
- Neumann, G., M.R. Castrucci, et Y. Kawaoka. 1997. « Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein ». Journal of Virology, vol. 71, p. 9690-9700.
- Neumann, G., M. Hughes et Y. Kawaoka. 2000. « Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1 ». European Molecular Biology Organization Journal, vol. 19, p. 6751-6758.
- Novagen. 2002. «Technical ressource», URL : http://www.novagen.com/SharedImages/TechnicalLiterature/7_TB036.pdf
- Nieto, A.S., S. de la Luna, J. Barcena, A. Portela, J. Valcarcel, J. A Melero et J. Ortin. 1992. « Nuclear transport of influenza virus polymerase PA protein ». Virus Research, vol. 24, p. 65-75.
- O'Farrell. 1975. «High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins ». Journal of Biological Chemistry, vol 250, p. 4007-4021.
- O'Neill, R.E. et P. Palese. 1995. « NPI-1, the human homolog of SRP-1, interacts with influenza virus nucleoprotein ». Virology, vol. 206, p. 116-125.
- O'Neill, R.E., R. Jaskunas, G. Blobel, P. Palese, et J. Moroianu. 1995. « Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import ». Journal of Biological Chemistry, vol. 270, p. 22701-22704.
- O'Neill, R.E., J. Talon, et P. Palese. 1998. « The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins ». European Molecular Biology Organization Journal, vol. 17, p. 288-296.
- Okuda, K., A. Ihata, S. Watabe, E. Okada, T. Yamakawa, K. Hamajima, J. Yang, N. Ishi, M. Nakazawa, K. Okuda, K. Ohnari, K. Nakajima et K.Q. Xin. 2001. « Protective immunity against influenza A virus induced by immunization with DNA plasmid containing influenza M gene ». Vaccine, vol. 19, p. 3681-3691.

- Olsen, C.W., M.W. McGregor et A.J. Cooley, B. Schantz, B. Hotze et V.S. Hinshaw. 1993. « Antigenic and genetic analysis of a recently isolated H1N1 swine influenza virus ». American Journal of Veterinary Research, vol. 54, p. 1630-1636.
- Olsen, C.W. 2000. « DNA vaccination against influenza viruses: a review with emphasis on equine and swine influenza » Veterinary Microbiology, vol 72, p.149-164.
- Orlich, M., D. Khatchikian, A. Teigler et R. Rott. 1990. « Structural variation occurring in the hemagglutinin of influenza virus A/turkey/Oregon/71 during adaptation to different cell types ». Virology, vol. 176, p. 531-538.
- Orlich, M., H. Gottwald et R. Rott. 1994. « Nonhomologous recombination between the HA gene and the NP gene of an influenza virus ». Virology, vol. 204, p. 462-465.
- Oxford, J.S. et G.C. Schild. 1976. « Immunological and physicochemical studies of influenza matrix (M) polypeptides ». Virology, vol. 74, p. 394-402.
- Palese, P., K. Tobita, M. Ueda, et R.W. Compans. 1974. « Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase ». Virology, vol. 61, p. 397-410.
- Paniker, C.K. 1968. « Serological relationship between the neuraminidases in influenza virus ». Journal of General Virology, vol. 2, p. 385-394.
- Patriarca, P.A., A.P. Kendal, P.C. Zakowski, N.J. Cox, M.S. Trautman, J.D. Cherry, D.M. Auervach, J. McCusker, R.R. Belliveau et K.D. Kappus. 1984. « Lack of significant person-to-person spread of swine influenza-like virus following fatal infection of an immunocompromised child ». American Journal of Epidemiology, vol. 119, p. 152-158.
- Park, Y.W. et M.G. Katze. 1995. « Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation ». Journal of Biological Chemistry, vol. 270, p. 28433-28439.
- Perales, B., et J. Ortin. 1997. « The influenza A virus PB2 polymerase subunit is required for the replication of viral RNA ». Journal of Virology, vol. 71, p.1381-1385.
- Perales, B. J.J. Sanz-Ezquerro, P. Gastaminza., J. Ortega, J. F. Santeren, J. Ortin et A. Nieto. 2000. « The replication activity of influenza virus polymerase is linked to the capacity of the PA subunit to induce proteolysis ». Journal of Virology, vol. 74, p.1307-1312.
- Pinto, L.H., L.J. Holsinger et R.A. Lamb. 1992. « Influenza virus M2 protein has ion channel activity ». Cell, vol.69, p. 517-528.

- Plotch, S.J., M. Bouloy, I. Ullmanen et R.M. Krug. 1981. « A unique cap (m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription ». Cell, vol. 23, p. 847-858.
- Poon, L.L.M., D.C. Pritlove, E. Fodor, et G.G. Brownlee. 1999. « Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a track in the virion RNA template ». Journal of Virology, vol. 73, p. 3473-3476.
- Pomeroy, B.S. 1982. « Avian influenza in the United-States (1964-1980) ». In Proceedings of 1st International symposium on avian influenza, Carter Company Corporation, Richmond, USA, 1981, p. 13-17.
- Pons, M.W., L.T. Shulze, G.K. Hirst et R. Hauster. 1969. « Isolation et characterization of the ribonucleoprotein of influenza virus ». Virology, vol. 39, p. 250-259.
- Pritlove, D.C., L.L. Poon, E. Fodor, J.Sharps, et G.G. Brownlee. 1998. « Polyadenylation of influenza virus mRNA transcribed in vitro from model virion RNA templates : requirement for 5' conserved sequences ». Journal of Virology, vol. 72, p. 1280-1286.
- Pritlove, D.C., L.L. Poon, L.J. Devenish, M. B. Leahy, et G. Brownlee. 1999. « A hairpin loop at the 5' end of influenza A virus virion RNA is required for synthesis of poly(A)⁺ mRNA in vitro ». Journal of Virology, vol. 73, p. 109-114.
- Privalsky, M. L., et E.E. Penhoet. 1978. « Influenza virus proteins : identity, synthesis, and modification analysed by two-dimensional gel electrophoresis ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 75, p. 3625-3629.
- Qian, X.-Y., F. Alonso-Caplen, et R.M Krug. 1994. « Two functional domains of the influenza virus NS1 protein are required for regulation of nuclear export of mRNA ». Journal of Virology, vol. 68, p. 2433-2441.
- Qiu, Y., et R.M. Krug. 1994. « The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A) ». Journal of Virology, 68, p. 2425-2432.
- Qiu, Y., M. Nemeroff, et R.M. Krug.1995. « The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing ». RNA. vol. 1, p. 304-316.

- Raymond, F.L., A.J. Caton, N.J. Cox, A.P. Kendal et G.G. Browlee. 1983. « Antigenicity and evolution amongst recent influenza viruses of H1N1 subtype ». Nucleic Acids Research. vol. 11, p. 7191-7203.
- Rebelo-de-Andrade, H et M.C. Zambon. 2000. « Different diagnostic methods for detection of influenza epidemics ». Epidemiology and Infection. Vol 124, p.515-522.
- Reeth, K.V., H. Nauwynck et M. Pensaert. 1998. « Bronchoalveolar interferon- α , tumor necrosis factor- α , interleukin-1 and inflammation during acute influenza in pigs : a possible model for humans ? ». Journal of Infectious disease. vol 177, p.1076-1079.
- Rekik, M.R., D.J.S. Arora et S. Dea. 1994. « Genetic variation in swine influenza virus a isolate associated with proliferative and necrotizing pneumonia in pigs ». Journal of Clinical Microbiology. vol. 32, p. 515-518.
- Retamal, M. 1999. Études d'anticorps monoclonaux dirigés contre la neuraminidase du virus influenza porcin. Mémoire de maîtrise, Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 99 p.
- Richardson, J.C. et R.K. Akkina. 1991. « NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells ». Archives of Virology, vol 116, p.64-80.
- Robertson, J.S, J.S. Bootman, R. Newnan, J.S. Oxford, R.S. Daniels, R.G. Webster et G.C. Schild. 1987. « Structural changes in the haemagglutinin which accompany egg adaptation of an influenza A (H1N1) virus ». Virology, vol. 160, p. 31-37.
- Rocha, E., N.J. Cox, R.A. Black, M.W. Harmon, C.J. Harrison et A.P. Kendal.1991. « Antigenic and genetics variation in influenza A (H1N1) virus isolates recovered from a persistently infected immunodeficient child ». Journal of Virology, vol. 65, p. 2340-2350.
- Rodriguez-Boulan, E., et D.D Sabatini. 1978. « Assymetric budding of viruses in epithelial cell monolayers : a model system for study of epithelial cell polarity ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. vol. 75, p. 5071-5075.
- Rota, P.A., E.P. Rocha, M.W. Harmon MW, V.S. Hinshaw, M.G. Sheerar, Y. Kawaoka, W.J. Cox et T.F. Smith. 1989. « Laboratory characterization of a swine influenza virus isolated from a fatal case of human influenza ». Journal of Clinical Microbiology, vol. 27, p. 1413-1416.

- Rota, P.A., R.A. Black, B.K. De, M.W. Harmon et A.P. Kendal. 1990. « Expression of influenza A and B virus nucleoprotein antigens in baculovirus ». Journal of General Virology, 71, p. 1545-1554.
- Roth, M.G., J.P. Fitzpatrick, R.W. Compans. 1979. « Polarity of influenza and vesicular stomatitis virus maturation MDCK cells : Lack of a requirement for glycosylation of viral glycoproteins ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 76, p. 6430-6434.
- Ruigrok, R.W.H., L.J. Calder et S.A. Wharton. 1989. « Electron microscopy of the influenza virus submembranal structure ». Virology, vol. 173, p. 311-316.
- Ruigrok, R.W.H et F. Baudin. 1995. « Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles ». Journal of General Virology, vol.76, p. 1009-1014.
- Ruigrok, R.W.H., A. Barge, P. Durrer, J. Brunner, K. Ma. et G.R Whittaker. 2000. « Membrane interaction of influenza virus M1 protein ». Virology, vol. 267, p. 289-298.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Sharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis et H.A. Erlich. 1988. « Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase ». Science, vol. 239, p. 487-491.
- Sakaguchi, T., Q. Tu, L.H. Pinto et R.A. Lamb. 1997. « The active oligomeric state of the minimalistic influenza virus M2 ion channel is a tetramer ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 94, p. 5000-5005.
- Salk, J.E. 1944. « Simplified procedures for titrating hemagglutinating capacity of influenza virus and the corresponding antibody ». Journal of Immunology, vol 49, p.87-98.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, et T. Maniatis. 1989. Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F. S. Nicklen et A.R. Coulson. 1977. « DNA sequencing with chain-terminating inhibitors ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74, p. 5463-5467.
- Sauter, N.K., M.D. Bernarski, B.A. Wutzburg, J.E. Hanson, G.M. Whitesides, J.J. Skehel, et D.C. Wiley. 1989. « Hemagglutinin from two influenza virus variants binds to sialic acid derivatives constants : a 500 Mhz proton nuclear magnetic resonance study ». Biochemistry, vol 28, p.8388-8396.

- Schein, C.H. 1989. « Production of soluble recombinant proteins in bacteria ». Bio/Technology, vol 7, p. 1141-1149.
- Scholtissek, C., I. Koennecke, et R. Rott. 1978a. « Host range recombinants of fowl plague (influenza A) virus ». Virology, vol. 91, p. 79-85.
- Scholtissek, C., W. Rohde, E. Harms, R. Rott, M. Orlich et C.B. Boschek. 1978b. « A possible partial heterozygote of an influenza A virus ». Virology, vol. 89, p. 506-516.
- Scholtissek, C., H. Burger, O. Kistner et K. Shortridge. 1985. « The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses ». Virology, vol. 147, p. 287-294.
- Scholtissek, C. et E. Naylor. 1988. « Fish farming and influenza pandemics ». Nature. vol. 331, p. 215-225.
- Schultz, U., W.M. Fitch, S. Ludwig, J. Mandler et C. Scholtissek. 1991. « Evolution of pig influenza viruses ». Virology, vol. 183, p. 61-73.
- Shapiro, G.I., T. Gurney Jr et R.M. Krug. 1987. « Influenza virus gene expression : control mechanism at early and late times of infection and nuclear cytoplasmic transport of virus-specific RNAs ». Journal of Virology, vol. 61, p. 764-773.
- Shapiro, G.I. et R.M. Krug. 1988. « Influenza virus RNA replication in vitro : Synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primers ». Journal of Virology, vol. 62, p. 2285-2290.
- Sheerar, M.G., B.C. Easterday et V.S. Hinshaw. 1989. « Antigenic conservation of H1N1 swine influenza viruses ». Journal of General Virology, vol. 70, p. 3297-3303.
- Shefflele, P., A. Rietveld, T. Wilk et K. Simons. 1999. « Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane ». Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 2038-2044.
- Sherle, P.A. et W. Gerhard. 1986. « Functional analysis of influenza-specific helper T cell clones in vivo : T cells specific for internal proteins provide cognate help for B cell responses to hemagglutinin ». Journal of Experimental Medecine, vol. 164, p. 1114-1128.
- Shimbo, K., D.L. Brassard, R.A. Lamb et Pinto LH. 1996. « Ion selectivity and activation of the M2 channel of influenza virus ». Biophysical Journal, vol. 70, p. 1336-1346.

- Shimizu, K., H. Handa, S. Nakada et K. Nagata. 1994. « Regulation of influenza virus RNA polymerase activity by cellular and viral factors ». Nucleic Acids Research, vol. 22, p. 5047-5053.
- Shortridge, K.F. 1999. « Poultry and the influenza H5N1 outbreak in Hong Kong, 1997: abridged chronology and virus isolation ». Vaccine, vol. 17, p.26-29.
- Skehel, J.J. et D.C. Wiley. 2000. « Receptor binding and membrane fusion in virus entry, The influenza hemagglutinin ». Annual Review of Biochemistry, vol. 69, p. 531-569.
- Slepushkin, V.A., J.M. Katz, R.A. Black, W.C. Gamble, P.A. Rota, et N.J. Cox. 1995. « Protection of mice against influenza A virus challenge by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein ». Vaccine, vol. 13, p. 1399-1402.
- Smith, G.L. et A.J. Hay. « Replication of the influenza virus genome ». 1982. Virology, vol. 118, p. 96-108.
- Smith, D.B., et S.C. Inglis. 1985. « Regulated production of an influenza virus spliced mRNA mediated by virus-specific products ». European Molecular Biology Organization Journal, vol. 4, p. 2313-2319.
- Smith, G.L., J.Z. Levin, P. Palese et B. Moss. 1987. « Synthesis and cellular location of the ten influenza polypeptides individually expressed by recombinant vaccinia viruses ». Virology. vol. 160, p. 336-345.
- Smith, F.L. et P. Palese. 1989. « Variation in influenza virus genes : Epidemiology, pathogenic, and evolutionary consequences ». In R.M. Krug (éd). *The influenza viruses*. New York : Plenum Press.
- Smith, N.R., A. Li, M. Aldersley, A.S. High, A.I. Marknam et P.A. Robinson. 1997. « Rapid determination of the complexity of cDNA bands extracted from DDRT-PCR polyacrylamide gels ». Nucleic Acids Research, vol 17, p.3552-3554.
- Snyder, M.H., A.J. Buckler, W.T. London, E.L. Tierney et B.R. Murphy. 1987. « The avian influenza virus nucleoprotein gene and a specific constellation of avian and human virus polymerase genes each specify attenuation of avian human influenza A/Pintail/79 reassortant viruses for monkeys ». Journal of Virology, vol. 61, p. 2857-2863.
- Steinhauer, D.A.1999. « Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus ». Virology, vol. 258, p. 1-20.

- Stegmann, T et A. Helenius. « Influenza virus fusion : from models toward a mechanism ». J. Bentz (éd). Boca Raton : CRC Presse, 1993, p.89-111.
- Stieneke-Grober, A., M. Vey, H. Angliker, E. Shaw, G. Thomas, C. Roberts, H.D. Klenk et W. Garten. 1992. «Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease». European Molecular Biology Organization Journal, vol 11, p. 2407-2414.
- Sugimura, T., H. Yonemochi, T. Ogawa, Y. Tanaka *et al.* 1980. « Isolation of a recombinant influenza virus (Hsw1N2) from swine in Japan ». Archives of Virology, vol. 66, p. 271-274.
- Sugrue, R.J. et A.J. Hay. 1991. « Structural characteristics of the M2 protein of the influenza A viruses, evidence that it forms a tetrameric channel ». Virology, vol. 180, p. 617-624.
- Swartz, J.R. 2001. « Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins ». Current opinion in Biotechnology, vol 12, p.195-201.
- Takeushi, K. et R.A. Lamb. 1994. « Influenza M2 protein ion channel activity stabilizes the native form of fowl plaque virus hemagglutinin during intracellular transport ». Journal of Virology, vol. 68, p. 911-919.
- Tan, S.L., et M.G. Katze. 1998. « Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon-induced PKR protein kinase ». Journal of Interferon and Cytokine Research, vol. 18, p. 757-766.
- Tian, S.F., A.J. Buckler-White, W.J. London, L.J. Reclé, R.M. Channock et B.R. Murphy. 1985. « Nucleoprotein and membrane protein genes are associated with restriction of influenza A/mallard/NY/78 virus and its reassortants in squirrel monkeys respiratory tract ». Journal of Virology, vol. 53, p. 771-775.
- Treanor, J.J., E.L. Tierney, S.L. Zebedee, R.A. Lamb et B.R. Murphy. 1990. « Passively transferred monoclonal antibody to the M2 protein inhibits influenza A virus replication in mice ». Journal of Virology, vol. 64, p. 1375-1377.
- Turner, R., J.L. Lathey, L.P. Van Voris et R.B. Belshe. 1982. « Serological diagnosis of influenza B virus infection : comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay and the haemagglutination inhibition test ». Journal of Clinical Microbiology, vol. 15, p. 824-829.
- Ulmanen, I., B.A. Broni, et R.M. Krug. 1981. « Role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating

- viral RNA transcription ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 78, p. 7355-7359.
- van der Leek, M.L., J.B. Dame et R.C. Litter. 1992. « Minimizing ELISA background in the diagnosis of swine trichinellosis ». Journal of Parasitology, vol 78, p. 822-829.
- Van Reeth, K. « Cytokines in the pathogenesis of influenza ». 2000. Veterinary Microbiology, vol 74, p. 109-116.
- Van Reeth, K, S. Van Gucht et M. Pensaert. 2002. « Correlation between lung proinflammatory cytokines levels, virus replication, and disease after swine influenza virus challenge of vaccination-immune pigs ». Viral Immunology, vol 15, p.583-594
- Velek, K., S. Hogan et H. Liauw. 1999. « Development of an ELISA for the detection of antibodies to swine influenza virus in swine sera ». Proceedings of American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, vol 105.
- Vincent, L.L., B.H. Janke, P.S. Paul et P.G. Halbur. 1997. « A monoclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues ». Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, vol. 9, p. 191-195.
- Voeten, J.T.M., J. Groen, D. van Alphen, E.C.J. Claas, R. de Groot, A.D.M.E. Osterhaus et G.F. Rimmelzwaan. 1998. « Use of recombinant nucleoproteins in enzyme-linked immunosorbent assays for detection of virus-specific immunoglobulin A (IgA) and IgG antibodies in influenza virus A- or B-infected patients ». Journal of Clinical Microbiology, vol. 36, p. 3527-3531.
- Wakefield, L. et G.G. Brownlee. 1989. « RNA-binding properties of influenza A virus matrix protein M1 ». Nucleic Acids Research, vol 17, p.8569-8580.
- Wang, P., P. Palese., et R.E. O'Neill. 1997. « The NP1-1/NPI-3 (karyopherin α) binding site on the influenza A virus nucleoprotein is a nonconventional nuclear localization signal ». Journal of Virology, vol. 71, p. 1850-1856.
- Wang, W., et R.M. Krug. 1998. « U6atac snRNA, the highly divergent counterpart of U6 sn RNA, is the specific target that mediates inhibition of AT-AC splicing by the influenza virus NS1 protein ». RNA. vol. 4, p. 55-64.
- Wang, X., M. Li, H. Zheng, T. Muster, P. Palese, A.A. Beg, et A. Garcia-Sastre. 2000. « Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF- κ B and induction of alpha/beta interferon ». Journal of Virology, vol. 74, p. 11566-11573.

- Watanabe, K., H. Handa, K. Mizumoto, et K. Nagata. 1996. « Mechanism for inhibition of influenza virus RNA polymerase activity by matrix protein ». Journal of Virology, vol. 70, p. 241-247.
- Wharton, S.A., W. Weis, J.J. Skehel et D.C. Wiley. 1989. « Structure, function and antigenicity of the hemagglutinin of influenza virus », R.M. Krug (éd.). *The influenza viruses*. New York : Plenum, 1989, p.153-173.
- WHO Collaborating centers for reference and research on influenza. 1982. *Concepts and procedures for laboratory based influenza surveillance*. U.S. Department of Health and Human services Public Health Service/Centers for Diseases Control, Atlanta.
- Weber, F., G. Kochs, S. Gruber et O. Haller. 1998. « A classical bipartite nuclear localization signal on Thogoto and influenza A virus nucleoproteins ». Virology, vol. 250, p. 9-18.
- Webster, R.G., et W.G. Laver. 1971. « Antigenic variation in influenza virus : Biology and chemistry ». Progress in Medical Virology. vol. 13, p. 271-338.
- Webster, R.G. et V.S. Hinshaw. 1977. « Matrix protein from influenza A virus and its role in cross-protection in mice ». Infection Immunity. vol. 17, p. 561-566.
- Webster, R.G., W.G. Laver, G.M. Air, G.C. Shild. 1982. « Molecular mechanisms of variation in influenza viruses ». Nature, vol. 296, p. 115-121.
- Webster, R.G., W.J. Bean, O.T Gorman, T.M. Chambers et Y. Kawaoka. 1992. « Evolution and ecology of influenza A viruses ». Microbiology Review, vol. 56, p. 152-179.
- Webster, R.G., S.M. Wright, M.R. Castrucci, W.J. Bean et Y. Kawaoka. 1993. «Influenza a model of an emerging virus disease». Intervirology, vol 35, p.16-25.
- Weis, W., J.H. Brown, S. Cusack, J.C. Paulsar, J.J. Skehel et D.C. Wiley. 1988. « Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid ». Nature, vol. 333, p. 426-431.
- Welman, M. 1999. « Séquençage du gène de la protéine de la matrice du virus influenza porcine et expression de la protéine M1 recombinante ». Mémoire de maîtrise, Québec, Université du Québec. 144 p.
- Welman, M. et D.J.S Arora. 2000. « Genomic analysis of matrix gene and antigenic studies of its gene product (M1) of a swine influenza virus (H1N1) causing chronic respiratory disease in pigs ». Virus genes, vol. 21, p. 157-165.

- Wentworth D.E., B.L. Thompson, X. Xu et H.L. Regnery, A.J. Cooley, M.W. McGregor, N.J. Cox et V.S. Hinshaw. 1994. « An influenza A (H1N1) virus, closely related to swine influenza virus, responsible for a fatal case of human influenza ». Journal of Virology, vol. 68, 2051-2058.
- Wentworth, D.E., M.W. Mc Gregor, M.D. Macklin. 1997. « Transmission of swine influenza virus to humans after exposure to experimentally infected pigs ». Journal of Infectious Disease, vol.175, p. 7-15.
- Whittaker, G., M. Bui, et A. Helenius. 1996. « Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons ». Journal of Virology, vol. 70, p. 2743-2756.
- Wiley, D.C. et J.J. Skehel. 1977. « Crystallization and x-ray diffraction studies on the haemagglutinin glycoprotein from the membrane of influenza virus ». Journal of Molecular Biology, vol. 112, p. 343-347.
- Wiley, D.C. et J.J. Skehel. 1987. « The structural function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus ». Annual Review in Biochemistry, vol 56, p.365-394.
- Wilson, I.A., J.J Skehel et D.C. Wiley. 1981. « Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution ». Nature, vol. 289, p. 366-373.
- Wilson, I.A. et N.J. Cox. 1990. « Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin ». Annual Review in Immunology, vol. 8, p. 737-771.
- Winter, G. et S. Fields. 1980. « Cloning of influenza cDNA into M13 : The sequence of the RNA segment encoding the A/PR/8/34 matrix protein ». Nucleic Acids Research, vol. 8, p. 1965-1974.
- Wolstenholme, A.J., T. Barrett, S. T. Nichol, et B.W. Mahy. 1980. « Influenza virus-specific RNA and protein syntheses in cells infected with temperature-sensitive mutants defective in the genome segment encoding nonstructural proteins ». Journal of Virology, vol. 35, p. 1-7.
- Wood, J.M., J.A. Mumford, C. Folkers, A.M. Scott et G.C Schild. 1983. « Studies with inactivated equine influenza vaccine. 1. Serological response of ponies to graded doses of vaccine ». Journal of hygiene, vol 90, p.371-384.
- Wood, J.M., J.S. Oxford, U. Dunleavy, R.W. Newman, D. Major et J.S. Robertson. 1989. « Influenza A (H1N1) vaccine efficacy in animal models is influenced by two amino acid substitutions in the hemagglutinin molecule ». Virology, vol. 171, p. 214-221.

- Wood, J.M., R.E. Gaines-Das, J. Taylor et P. Chakraverty. 1994. «Comparison of influenza serological techniques by international collaborative study ». Vaccine, vol 12, p.167-174.
- Wrigley, N.G. 1979. « Electron microscopy of influenza virus ». British medical bulletin, vol. 35, p. 35-38.
- Yamanaka, K., A. Ishihama et K. Nagata. 1990. « Reconstitution of influenza virus RNA-nucleoprotein complexes structurally resembling native viral ribonucleoprotein cores ». Journal of Biological Chemistry, vol. 265, p. 11151-11155.
- Yamaoka, M., H. Hotta, M. Itoh et M. Homma. 1991. « Prevalence of antibody to influenza C virus among pigs in Hyogo Prefecture, Japan ». Journal of General Virology, vol. 72, p. 711-714.
- Yasuda, J., S. Nakada, A. Kato, T. Toyoda et A. Ishihama. 1993. « Molecular assembly of influenza virus : Association of the NS2 protein with virion matrix ». Virology, vol. 196, p. 249-255.
- Ye, Z., R. Pal, J.W. Fox et R.R. Wagner. 1987. « Functional and antigenic domains of the matrix protein (M1) of influenza A virus ». Journal of Virology, vol. 61, 239-246.
- Ye, Z., N.W. Baylor et R.R. Wagner. 1989. « Transcription-inhibition and RNA-binding domains of influenza A virus matrix protein mapped with anti-idiotypic antibodies and synthetic peptides ». Journal of Virology, vol. 63, p. 3586-3594.
- Ye, Z., D. Robinson et R.R. Wagner. 1995. « Nucleus-targeting domain of the matrix protein (M1) of influenza virus ». Journal of Virology, vol. 69, p. 1964-1970.
- Ye, Z., T. Liu, D.P. Offringa, J. Mc Innis, et R.A. Levandowski. 1999. « Association of influenza virus matrix protein with ribonucleoproteins ». Journal of Virology, vol. 73, p. 7467-7473.
- Yewdell, J.W. et C.J. Hackett. 1989. « Specificity and function of T lymphocytes induced by influenza A viruses ». In R.M. Krug (éd). The influenza viruses. New York : Plenum, 1989, p. 361-429.
- Young R.J., et J. Content. 1971. « 5'-Terminus of influenza virus RNA ». Nature, vol. 230, p. 140-142.
- Yuanji, J. et U. Desselberger. 1984. « Genome analysis of influenza C viruses isolated from pigs in China ». Journal of General Virology, vol. 65, p. 1857-1872.

- Zebedee, S.L., C.D. Richardson et R.A. Lamb. 1985. « Characterization of the influenza virus M2 integral membrane protein and expression at the infected-cell surface from cloned cDNA ». Journal of Virology, vol. 56, p. 502-511.
- Zebedee, S.L. et R.A. Lamb. 1988. Influenza A virus M2 : « Monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions ». Journal of Virology, vol. 62, p. 2762-2772.
- Zebedee, S.L. et R.A. Lamb. 1989. « Nucleotide sequences of influenza A virus RNA segment 7 : a comparison of five isolates ». Nucleic Acids Research, vol. 17, p. 2870.
- Zhang, J., et R.A. Lamb. 1996. « Characterization of the membrane-association of the influenza virus matrix protein in living cells ». Virology, vol. 225, p. 255-265.
- Zhang, J., A. Pekosz, R.A. Lamb. 2000. « Influenza virus assembly and lipid raft microdomains : A role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins ». Journal of Virology, vol. 74, p. 4634-4644.
- Zhirnov, O.P. 1992. « Isolation of matrix protein M1 from influenza viruses by acid-dependent extraction with nonionic detergent ». Virology, vol. 186, p. 324-330.
- Zhirnov, O.P. et H.D. Klenk. 1997. « Histones as a target for influenza virus matrix protein M1 ». Virology, vol 235, p.302-310.
- Zhou, N.N., D.A. Senne, J.S. Landgraf, S.L. Swenson, G. Erickson, K. Rossow, L.Liu, k. Yoon, S. Krauss et R.G. Webster. 1999. « Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs ». Journal of Virology, vol. 73, p. 8851-8856.
- Zvonarjev, A.Y. et Y.Z. Ghendron. 1980. « Influence of membrane (M) protein on influenza A virus virion transcriptase activity in vitro and its susceptibility to rimantadine ». Journal of Virology, vol. 33, p. 583-586.

Appendice

Appendice I. Préparation des tampons et des solutions

1.01 Tampon PBS 10 mM, pH 7,2-7,4

Dissoudre 8 g de NaCl (Baker); 0,2 g de KCl (Fisher); 1,15 g de Na₂PO₄ (Baker) et 0,21 g de KH₂PO₄ (Fisher) dans 800 ml d'eau distillée (H₂O). Ajuster le pH à 7,2 –7,4 avec une solution dibasique 0,1 M Na₂PO₄ ou avec une solution monobasique 0,1 M de KH₂PO₄. Compléter le volume à 1 litre avec de H₂O distillée.

1.02 Solutions pour la purification de la souche virale SwQc91

A) Solution d'azide de sodium (NaN₃) 10 %

Dissoudre 10,0 g de NaN₃ (Fisher) dans 100 ml d'H₂O distillée et filtrer surmembrane Millex GV 0,22 µm.

B) Solution 50 % saccharose (p/p)

Dissoudre 50 g de saccharose ultrapure (Canadian Scientific Products) dans 50,0 g de PBS 10 mM pH 7,2. Ajouter un volume de la solution NaN₃ 10 % pour avoir une concentration finale de 0,02 % (v/v).

C) Solution 22 % saccharose (p/p)

Dissoudre 22 g de saccharose ultrapure (Canadian Scientific Products) dans 78 g de PBS 10 mM pH 7,2. Ajouter un volume de la solution NaN₃ 10 % pour avoir une concentration finale de 0,02 % (v/v).

1.03 Solution pour le dosage protéique (BCA)

A) Réactif A

Ajouter 10,0 g d'acide bicinchoninique (BCA Pierce), 20,0 g de carbonate de sodium hydraté (Na₂CO₃ · H₂O; Baker), 1,84 g de tartrate de sodium (Fisher), 4,0 g d'hydroxyde de sodium (NaOH ; Fisher), 9,5 g de bicarbonate de sodium anhydre

(NaHCO₃ ; Fisher) dans 900 ml d'eau distillé. Ajuster le pH à 11,25 avec 5,0 M NaOH, compléter le volume à 1 litre avec de l'H₂O distillée.

B) Solution de 4 % (p/v) CuSO₄ · 5H₂O (réactif B)

Dissoudre 1,0 g de sulfate de cuivre (BDH) dans 25 ml d'H₂O distillée et filtrer sur une membrane Millex GV 0,22 µm.

C) Solution-stock BSA à 1 mg/ml

Dissoudre 10 mg d'albumine sérique bovine (BSA; RIA Grade Sigma) dans 10 ml d'eau distillée et filtrer sur membrane Millex Gv 0,22 µm. Déterminer la concentration de la solution par absorbance à 280 nm en utilisant le coefficient d'extinction molaire du BSA pour une solution de 10 mg/ml est de 6,6667.

1.04 Solution pour le SDS-PAGE

A) Solution-stock de polyacrylamide 30 % T, 2,67 % C

Dissoudre 29,2 g d'acrylamide ultra-pure (Bio-Rad) et 0,8 g de N'N'-bis-méthylène-acrylamide (bisacrylamide ; Bio-Rad) dans 100 ml d'H₂O distillée. Filtrer la solution et conserver à la noirceur à 4°C.

B) Solution-stock 10 % (p/v) de SDS

Dissoudre 10 g de sodium dodecyl sulfate ultra-pure (SDS ; Bio-Rad) dans 100 ml d'H₂O distillée. Filtrer la solution sur membrane Millex HA 0,45 µm (Millipore, Bedford USA).

C) Tampon de séparation 1,5 M Tris-HCl pH 8,8

Dissoudre 18,15 g de Tris Base (Bio-Rad) dans 80 ml d'eau distillée, ajuster le pH à 8,8 avec du HCl 10 N (Baker) et compléter le volume à 100 ml avec de l'H₂O distillée. Filtrer la solution sur membrane Millex HA 0,45 µm (Millipore) et conserver à 4°C.

D) Tampon de chargement 0,5 M Tris-HCl pH 6,8

Dissoudre 6,05 g de Tris base dans 80 ml d'eau distillée, ajuster le pH à 6,8 avec du HCl 10 N (Baker) et compléter le volume à 100 ml avec de l'H₂O distillée. Filtrer la solution sur membrane Millex HA 0,45 µm (Millipore) et conserver à 4°C.

E) Solution de persulfate d'ammonium 10 % (p/v)

Dissoudre 0,1 g de persulfate d'ammonium (Bio-Rad) dans 1 ml d'H₂O distillée. Préparer cette solution le jour même.

F) Préparation des gels de polyacrylamide de séparation 12 % et de chargement 4 %

	4%	12 %
Solution-stock d'acrylamide 30,0 % (ml)	1,3	4
Tampon 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 (ml)	---	2,5
Tampon 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 (ml)	2,5	---
Solution SDS 10 % (ml)	0,1	0,1
H ₂ O distillée (ml)	5,99	3,29
TEMED (Bio-Rad) (ml)	0,01	0,01
Persulfate d'ammonium 10 % (ml)	0,1	0,1
Volume total (ml)	10	10

G) Tampon dénaturant et réducteur 2 X

Ce tampon se prépare en ajoutant 4 ml de la solution de SDS 10 %, 2 ml de glycérol (Sigma), 0,5 ml de béta-mercaptoéthanol (Sigma), 0,2 ml de bleu de bromophénol 0,1 % (Sigma) et 2,5 ml de tampon 0,5 M Tris-HCl pH 6,8. Compléter le volume à 10 ml et filtrer sur membrane Millex 0,45 µm et conserver à la température pièce. Si on veut un tampon sans agent réducteur, le β-mercaptoéthanol est remplacé par un volume équivalent d'H₂O distillée.

H) Tampon d'électrophorèse 0,1 % SDS ; 0,192 M glycine et 0,025 M Tris pH 8,3

Dissoudre 3,03 g de Tris base (Sigma), 14,41 g de glycine (Fisher) et 1 g de SDS ultra-pure (Bio-Rad) dans 1 litre d'H₂O distillée.

I) Solution de coloration 0,4 % de bleu de Coomassie, 40 % (v/v) méthanol et 10 % (v/v) acide acétique glacial

Dissoudre 2 g de bleu de Coomassie (Becton-Dickinson) dans 200 ml de méthanol. Ajouter 250 ml d'H₂O distillée et 50 ml d'acide acétique glacial (BDH).

J) Solution de décoloration 50 % (v/v) méthanol, 40 % (v/v) H₂O distillée d'10 % (v/v) acide acétique glacial

Cette solution se prépare en ajoutant 100 ml d'acide acétique glacial (BDH), 400 ml d'H₂O distillée et 500 ml de méthanol.

K) Solution de décoloration 0,25M EDTA; 0.25M Tris-HCl pH 9,0

Dissoudre 30,28 g de Tris base (Sigma) et 93,06 g de EDTA (Sigma) dans 950 ml d'eau distillée. Ajuster le pH à 9,0 avec du HCl 1N (Baker) et compléter le volume à 1 litre.

1.05 Solutions pour le test d'hémagglutination (HA)

A) Solution d'Alsever pour la préparation des érythrocytes de coq

Dans un volume de 900 ml H₂O distillée, dissoudre 20,5 g de dextrose (BDH), 8,0 g de sodium citrate dihydraté (Na₃C₆H₅O₇ · 2H₂O ; Fisher), 4,2 g NaCl (BDH), 0,55 g d'acide citrique (C₆H₈O₇; Fisher). Le pH est ajusté à 6,1 avec 1 N de NaOH (Fisher) ou 1 N HCl (Baker). Compléter le volume à 1 litre avec de l'H₂O distillée. Conserver à 4°C.

Pour préparer les globules rouges de coq, centrifuger le tube contenant 10 ml de sang à 3 000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Remplacer le volume de sérum par un volume équivalent de solution d'Alsever froid et insérer délicatement le tube plusieurs fois pour resuspendre les globules rouges. Centrifuger à 3 000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Après le troisième lavage, décanter le surnageant et conserver le culot de globules rouges à 4°C.

B) Suspension de globules rouges de coq 0,5 %

Un volume de 0,5 ml d'érythrocytes de coq citratés dans 99,5 ml de 10 mM de PBS pH 7,2-7,4 froid. Conserver à 4°C.

1.06 Solution pour l'extraction de l'ARNv

A) Eau distillée traitée au DEPC 0,1 % (v/v)

Sous la hotte chimique, ajouter 1 ml de DEPC (Sigma) à un litre d'H₂O distillée. Incuber à 37°C pendant 2 hrs ou 18 hrs à TP. Autoclaver 30 min à 15 lbs/po² et conserver à 4°C.

1.07 Tampons et solutions pour l'électrophorèse sur gel d'agarose

A) Tampon échantillon 6X : 0,25 % (p/v) bleu de bromophénol, 0,25% (p/v) xylène-cyanol et 30 % (v/v) glycérol.

Dissoudre 0,025 g de bleu de bromophénol (Sigma) et 0,025 g de xylène-cyanol (Sigma) dans 7ml d'H₂O distillée. Ajouter 3 ml de glycérol (Fisher). Filtrer sur membrane de 0,45 µm.

B) Solution EDTA 0,25 M pH 8,0

Dissoudre 18,61 g d'éthylenediamine tetraacetic acid hydraté (EDTA · 2H₂O; Sigma) dans 150 ml d'H₂O distillée (chauffer pour dissoudre). Ajuster le pH à 8,0 avec 1N de NaOH et compléter le volume à 200 ml avec de l'H₂O distillée. Stériliser par filtration sur membrane de 0,22 µm.

C) Tampon TAE; 0,04M tris-acétate; 1 mM EDTA pH 8,0

Dissoudre 4,84g de Tris base dans 900 ml d'eau distillée. Ajouter 1,14 ml d'acide acétique glacial et 4 ml de 0,25 M EDTA (Sigma) pH 8,0. Compléter à 1 litre avec de l'H₂O distillée et autoclaver 30 minutes à 15 lbs/po².

D) Gel d'agarose 0,8 %

Dissoudre 0,8 g d'agarose LE Seakem (FMC BioProducts) dans 100 ml de tampon TAE pH 8,0. Faire chauffer sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète puis déposer l'agarose liquide dans le plateau pour l'électrophorèse.

E) Solution de bromure d'éthidium 0,01 mg/ml

Ajouter 500 µl d'une solution-stock de 10 mg/ml de bromure d'éthidium (Sigma) dans un volume de 500 ml d'H₂O distillée. Conserver à la noirceur sous la hotte chimique.

1.08 Solutions pour la méthode de “boiling plasmid miniprep” utilisée pour la purification d’ADN plasmidique

A) Solution STET ; 8 % (p/v) de saccharose 0,5 % (v/v) Triton X-100 (sigma), 50 mM EDTA pH 8,0 et 50 mM Tris-HCl pH 8,0

Dissoudre 8 g de saccharose ultra-pure et 0,606 g de Tris base (Sigma) dans 60 ml d’eau distillée. Ajouter 0,5 ml de Triton X-100 (Sigma), 25 ml de 0,2 M EDTA pH 8,0 et 5 ml de tris-HCl 1 M pH 8,0. Compléter le volume à 100 ml avec de l’H₂O distillée et filtrer sur membrane de 0,22 µm. Conserver à 4°C.

B) Solution 75 % v/v isopropanol ; 2,5 M d’ammonium acétate

Dissoudre 77,08 g d’acétate d’ammonium 10 M (CH₃COONH₄; Fisher) dans un volume final de 100 ml d’H₂O distillée. (Chauffer pour dissoudre si nécessaire). Ajouter 25 ml de cette solution à 75 ml d’isopropanol (Sigma). Conserver à TP.

C) Solution de lysozyme 10 mg/ml

Dissoudre 100mg de lysozyme (Worthington Biochemicals Co.) dans 10 ml de 50 mM Tris-HCl pH 8,3. Filtrer sur membrane de 0,22 µm et aliquoter dans plusieurs tubes. Conserver à -20°C.

D) Solution d’ARNase 1 mg/ml

Dissoudre 10 mg de ribonucléase I “A” (Pharmacia Biotech inc) dans 10 ml d’H₂O distillée. Filtrer sur membrane 0,22 µm et aliquoter dans plusieurs tubes. Conserver à -20 °C.

1.09 Solutions et milieux de culture utilisés pour la transformation, le clonage et l’expression de la protéine recombinante

A) Milieu LB (Luria-Bertani) : 1,0 % Tryptone, 0,5 % Extrait de levure, 1,0 % NaCl pH 7,0

Dissoudre 10 g de bacto-tryptone (Difco), 5 g d’extrait de levure (Difco) et 10 g de NaCl (Sigma) dans 950 ml d’H₂O distillée. Ajuster le pH à 7,0 avec du NaOH 1N et

compléter à 1 litre avec de l'eau distillée. Autoclaver pendant 20 minutes à 15 lbs/po² et laisser refroidir jusqu'à 55°C avant d'ajouter l'antibiotique. Conserver à 4°C.

B) Milieu LB + 1,5 % agar

Préparer le milieu LB tel qu'indiqué précédemment et ajouter 15 g d'agar noble (Difco). Autoclaver pendant 20 minutes à 15 lbs/po², laisser refroidir à 55°C et ajouter l'ampicilline pour avoir une concentration finale de 100 µg/ml. Déposer 20 ml de milieu dans chacun des Pétris, laisser solidifier et conserver à 4°C.

C) Milieu SOC : 2,0 % tryptone, 0,5 % d'extrait de levure, 0,05 % NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose.

Dissoudre 20,0 g de bacto-tryptone (Difco), 5,0 g d'extrait de levure (Difco), 0,5 g de NaCl (BDH) dans 1 litre d'eau distillée. Autoclaver pendant 20 minutes à 15 lbs/po² et ajouter stérilement 10 ml d'une solution de MgCl₂ (Baker) 1 M et 10 ml d'une solution de MgSO₄ 1 M (Baker). Stériliser par filtration avec une membrane Millex GV 0,22 µm (Millipore). Préparer une solution de glucose 2 M, en dissolvant 36 g de glucose dans 100 ml d'H₂O distillée, stériliser par filtration et ajouter 10 ml de cette solution au milieu préparé initialement. Conserver à 4°C.

D) Solution de X-gal 40 mg/ml

Dissoudre 400 mg de bromo-4-chloro-3-indolyl-béta-D-galactopyranoside (X-gal ; GibcoBRL) dans 10 ml de diméthylformamide. Aliquoter et conserver à la noirceur à -20°C. Étaler 40 µl sur les Pétris, laisser sécher 15 minutes et protéger de la lumière.

E) Solution-stock d'ampicilline 10 mg/ml

Dissoudre 100 mg d'ampicilline (Boehringer Mannheim) dans 10 ml d'H₂O distillée. Filtrer la solution sur membrane 0,22 µm et conserver à -20°C.

F) Solution-stock de carbenicilline 10 mg/ml

Dissoudre 100 mg de carbenicilline (Calbiochem, Novabiochem) dans 10 ml d'H₂O distillée. Filtrer la solution sur membrane 0,22 µm et conserver à -20°C.

G) Solution d'IPTG 100 mM

Dissoudre 500 mg d'isopropyl-β-thiogalactoside (IPTG ; GibcoBRL) dans 20 ml d'H₂O distillée. Filtrer sur membrane de 0,22 µm et conserver à -20°C.

H) Solution de PMSF 100 mM

Dissoudre 400 mg de phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride (PMSF; Sigma) dans 20 ml d'isoamyl alcool (Sigma). Filtrer sur membrane 0,22 μm et conserver à -20°C .

1.10 Solutions pour la purification de la protéine recombinante**A) Tampon d'éluion 0,1 % SDS ; 0,192 M glycine (Fisher) et 0,025 M Tris pH 8,3**

Dissoudre 3,03 g de Tris base (Sigma), 14,41 g de glycine (Fisher) et 1 g de SDS (Bio-Rad) dans 1 litre d' H_2O distillée.

B) Tampon pour la dialyse ; 0,05 M Tris-HCl pH 7,5

Dissoudre 24,22 g de Tris base (Sigma) dans 3,9 litres d' H_2O distillée, ajuster le pH à 7,5 avec du HCl 10 N (Baker). Compléter le volume à 4 litres avec de l'eau distillée et conserver à 4°C .

C) Tampon pour la dialyse ; 0,008 M Tris-HCl pH 7,5

Dissoudre 3,87 g de Tris base (Sigma) dans 3,9 litres d' H_2O distillé, ajuster le pH à 7,5 avec du HCl 10 N (Baker). Compléter le volume à 4 litres et conserver à 4°C .

D) Traitement de la membrane à dialyse

Couper la membrane à dialyse (Spectra/Por 12kDa/14kDa) à la longueur désirée et faire bouillir 5 minutes dans 100 ml d' H_2O distillée contenant 100 μl de 0,5 M EDTA (Sigma) à pH 8,0.

1.11 Solutions pour la solubilisation des protéines recombinantes**A) Tampon dénaturant et réducteur 2X**

Ce tampon se prépare en ajoutant 4 ml de la solution de SDS 10 %, 2 ml de glycérol (Sigma), 0,5 ml de béta-mercaptoéthanol (Sigma), 0,2 ml de bleu de bromophénol 0,1 % (Sigma) et 2,5 ml de tampon 0,5 M Tris-HCl pH 6,8. Compléter le volume à 10 ml et filtrer sur membrane Millex 0,45 μm et conserver à la température pièce.

B) Tampon 1M Tris-HCl pH 7,5

Dissoudre 12,11 g de tris base (Sigma) dans 90 ml d'H₂O distillée et ajuster le pH à 7,5 avec du HCl 1N. Compléter le volume à 100 ml avec de l'H₂O distillée.

1.12 Solutions et tampons pour le transfert électrophorétique et l'immunobuvardage**A) Tampon de transfert 20 % (v/v) méthanol ; 0,192 M glycine ; 0,025 M Tris pH 8,3 et 0,02 % (p/v) NaN₃**

Dissoudre 28,82 g de glycine (Fisher), 6,06 g de Tris base (Sigma), 0,4 g de NaN₃ (Fisher) dans un volume de 1600 ml d'H₂O distillée. Ajouter 400 ml de méthanol 100 %. Conserver à 4°C.

B) Tampon TBS 10 X ; 20 mM Tris base ; 500 mM NaCl, pH 7,5

Dans 1 litre d'H₂O distillée dissoudre 2,42g de tris base et 29,24 g de NaCl (BDH). Ajuster le pH à 7,5 avec 5 N de HCl et compléter à 1 litre avec de l'H₂O distillée.

C) Solution-stock Tween-20 10 % (v/v) dans TBS 1X pH 7,5

Solubiliser 10 ml de Tween-20 10 % dans 90 ml de tampon TBS 1X pH 7,5. Filtrer la solution sur membrane Millex HA 0,45 µm et conserver à TP.

D) Solution de lavage 0,05 % Tween-20 ; TBS 1X pH 7,5

Ajouter 10 ml de la solution-stock 10 % de tween-20 dans 1990 ml de tampon TBS 1X pH 7,5. Conserver 1 semaine à 4°C.

E) Solution de blocage 2 % (p/v) BSA ; 0,2 % (v/v) Tween-20 ; TBS 1X pH 7,5

Dissoudre 2 g de BSA (Sigma) dans 98 ml de tampon TBS 1X pH 7,5. Ajouter 2 ml de la solution-stock 10 % de tween-20 et filtrer la solution sur membrane de 0,45 µm. Conserver à 4°C.

X

F) Solution de dilution pour les anticorps ; 1 % (p/v) BSA, 0,1 % (p/v) de Tween-20, TBS 1 X pH 7,5

Ajouter 50 ml de tampon TBS 1X pH 7,5 à 50 ml de la solution de blocage E).

G) Solution de révélation ; 0,06 % (p/v) 4-chloro-1-naphtol (4CN); 0,015 % (v/v) de peroxyde d'hydrogène 20 % (v/v) de méthanol et 80 % (v/v) de tampon TBS 1X pH 7,5.

Dans 20 ml de méthanol 100 %, dissoudre 60 mg de 4 CN (Sigma), entreposer à -20°C et conserver à la noirceur. Avant l'utilisation de la solution ajouter 50 µl de H₂O₂ 30 % (Fisher) et 80 ml de tampon TBS 1X pH 7,5. Utiliser immédiatement car la solution ne se conserve pas. Pour arrêter la réaction rincer la membrane avec de l'H₂O distillée.

H) Solution de coloration (rouge Ponceau) ; 0,5 % (p/v) rouge ponceau; 1 % (v/v) acide acétique.

Dans 99 ml d'H₂O distillée, dissoudre 0,5 g de Ponceau (Allied Chemical). Ajouter 1 ml d'acide acétique (Baker) et conserver à température pièce.

1.13 Solutions pour le test ELISA

A) Tampon 0,05 M NaCO₃. H₂O pH 9,6

Dissoudre 1,59 g de NaCO₃. H₂O (Baker), 2,93 g de NaHCO₃ (Fisher) et 0,2 g de NaN₃ (Fisher) dans 900 ml d'H₂O distillée. Ajuster le pH à 9,6 avec une solution de 0,1 M Na₂CO₃ ou avec 0,1 M de NaHCO₃. Compléter à 1 litre avec de l'H₂O distillée et conserver à 4°C.

B) Solution-stock de Tween-20 10 % (v/v) dans 10 mM PBS pH 7,2-7,4

Ajouter 10 ml de Tween-20 (Sigma) dans 90 ml de tampon 10 mM PBS pH 7,2-7,4. Filtrer la solution sur membrane Millex HA 0,45 µm et conserver à TP.

C) Solution de lavage ; 0,05 % (v/v) Tween-20, 10 mM PBS, pH 7,2

Ajouter 10 ml de la solution stock Tween-20 dans 1990 ml de tampon 10 mM PBS pH 7,2-7,4. Conserver 1 semaine à 4°C.

**D) Solution de blocage ; 2 % (p/v) BSA, 0,1 % (p/v) Tween-20, 10 mM PBS
pH 7,2**

Dissoudre 2 g de BSA (Sigma) dans 99 ml de tampon 10 mM de PBS pH 7,2-7,4. Ajouter 1 ml de la solution stock 10 % Tween-20.

**E) Solution de dilution pour les anticorps et le conjugué à la peroxydase ; 1 %
(p/v) BSA, 0,05 % Tween-20, 10 mM PBS, pH 7,2-7,4.**

Ajouter 50 ml de tampon 10 mM PBS pH 7,2-7,4 à 50 ml de la solution de blocage en D).

F) Tampon citraté ; 0,1 M Na₂HPO₄, pH 5,0.

Dissoudre 10 g d'acide citrique (C₆H₈O₇), 14 g de phosphate sodium dibasique (Na₂HPO₄) dans 900 ml d'H₂O distillée. Ajuster le pH à 5,0 avec 1N de HCl et compléter le volume à 1 litre. Conserver à température pièce.

**G) Solution de révélation 0,4 % (p/v) OPD, 0,012 % (v/v) H₂O₂, 0,05M acide
citrique 0,1 M Na₂HPO₄, pH 5,0.**

Dissoudre 0,04 g d'hypochlorure d'orthophénylène diamine (OPD; Sigma) dans 100 ml de tampon citraté pH 5,0. Ajouter 40 µl d'une solution de peroxyde d'hydrogène 30 % (H₂O₂; Fisher). Cette solution doit être préparée à la dernière minute.

1.14 Solutions supplémentaires pour le test ELISA diagnostic

**A) Solution de blocage; 2% (p/v) BSA, 10 % (p/v) saccharose, 10 mM de PBS
pH 7,2-7,4.**

Dissoudre 2 g de BSA (Sigma), 10 g de saccharose ultra-pure (Canadian Scientific Products) dans 100 ml de PBS 10 mM pH 7,2-7,4.

**B) Solution de blocage; 10 % (p/v) lait en poudre, 0,1 % (v/v) Tween-20, 10 mM
PBS à pH 7,2.**

Dissoudre 10 g de lait en poudre (Carnation), 10 g de saccharose ultra-pure (Canadian Scientific Products) dans 100 ml de PBS 10 mM pH 7,2-7,4. Ajouter 1 ml de la solution stock 10 % Tween-20 (section 12.0).

- C) Solution de dilution pour les anticorps et le conjugué à la peroxydase ; 1 % BSA, 5 % saccharose , 5 % lait en poudre, 0,05 % Tween-20**

Ajouter 50 ml de la solution de blocage en A), à 50 ml de la solution de blocage en B)

1.15 Préparation de solutions pour le test d'inhibition de l'activité hémagglutinante (IHA)

- A) Suspension de globules rouges de coq à 0,5 % dans PBS pH 7,2**

Ajouter 0,5 ml d'érythrocytes de coq citratés (section 5.0) dans 99,5 ml de 10 mM PBS, pH 7,2 froid. Conserver la suspension à 4°C avant l'utilisation.

- B) Solution calcium/saline 0,1 % Ca^{2+} , pH 7,4 pour le traitement RDE**

Dissoudre 1,0 g de chlorure de calcium dihydraté ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; BDH), 9,0g de NaCl anhydre, 1,2 g d'acide borique anhydre (H_3BO_3 ; Fisher) 0,099 g de sodium borate heptahydraté ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$; Fisher) dans 900 ml d'eau distillée. Ajuster le volume à 1 litre avec de l'eau distillée. Stériliser par filtration ou autoclavage 30 minutes à 15 lbs/po².

- C) Solution de citrate de sodium 1,5 % (p/v) pour le traitement au RDE**

Dissoudre 1,6 g de citrate de sodium dihydraté ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Fisher) dans 100 ml de 10 mM PBS pH 7,2. Stériliser par filtration sur membrane Millex GV 0,22µm. Conserver à 4°C.

Appendice II. Méthodes de quantification

1.16 Méthode de quantification de l'ARN viral par densité optique

Si 1,0 unité de densité optique à 260 nm (DO_{260nm}) équivaut à une concentration de 40 µg d'ARN/ml, alors à partir d'une dilution d'ARN génomique 1:200 on obtient ;

$$\text{ARN} \left[\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right] = \frac{\text{DO}_{260} \times 40 \times 200}{1000} = \text{DO}_{260} \times 8$$

40 : transforme la DO obtenue en $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$

200 : correspond au facteur de dilution

1000 : transforme les *ml* en μl

1.17 Méthode de quantification d'ADN plasmidique par densité optique

Si 1,0 unité de densité optique à 260 nm (DO_{260nm}) équivaut à une concentration de 50 µg d'ADN/ml, alors à partir d'une dilution d'ARN génomique 1:200 on obtient ;

$$\text{ARN} \left[\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right] = \frac{\text{DO}_{260} \times 40 \times 200}{1000} = \text{DO}_{260} \times 8$$

50 : transforme la DO obtenue en $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$

200 : correspond au facteur de dilution

1000 : transforme les *ml* en μl

1.18 Détermination du facteur de purification de la préparation d'ARN ou d'ADN

Le facteur de purification d'une préparation d'acides nucléiques est évalué par le rapport des densités optiques observées à 260 nm et à 280 nm :

$$\text{Facteur de purification} : \left(\frac{\text{DO}_{260}}{\text{DO}_{280}} \right)$$

La valeur du facteur obtenue doit être environ de 2, plus la valeur se rapproche de 1, plus la préparation contient des contaminants soit les protéines qui ont un maximum d'absorption à 280 nm.

1.19 Détermination du titre d'anticorps d'un sérum suite à un test ELISA

Le titre d'anticorps des sérums s'exprime à l'aide des densités optiques obtenues pour chacun des sérums suite à une lecture à 492 nm.

$$\text{Moyenne} = \frac{\sum_{k=0}^n [\text{DO}(\text{témoin négatif}_k)]}{n}$$

$$\text{Écart type} = \sqrt{\frac{\sum_{j=0}^n [\text{DO}(\text{témoin négatif}_j) - \text{Moyenne}]^2}{n}}$$

$$\text{Seuil d'absorbance} = \frac{\sum_{i=0}^n [\text{DO}(\text{échantillon}_i) - \text{Moyenne}]}{n} + 2 \cdot \text{Écart type}$$

Le titre en anticorps correspond à une extrapolation sur la droite du graphique de l'absorbance en fonction des dilutions de sérums, de la valeur du seuil d'absorbance.

1.20 Détermination de la réactivité des échantillons suite à un test ELISA

La réactivité des échantillons s'exprime à l'aide d'un rapport des densités optiques obtenues suite à une lecture d'absorbance à 492 nm.

$$\text{Réactivité}\% = 100 \times \frac{\text{DO}(\text{échantillon}) - \text{DO}(\text{témoin négatif})}{\text{DO}(\text{témoin positif}) - \text{DO}(\text{témoin négatif})}$$