

Université du Québec

Institut Armand-Frappier-INRS

**Évaluation de l'immunisation d'un plasmide
codant pour les protéines de la matrice du virus
de l'influenza comme élément protecteur chez les
souris**

Présenté par :

Fabienne Bellessort

Mémoire présenté

en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences

en virologie immunologie

évalué par un jury composé des personnes suivantes :

D Jit S. Arora, directeur de recherche

Peter Tjissen, président du jury

Daniel Martineau, examinateur externe

© Fabienne Bellessort

À Phi et à ma mère

Table des matières

LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xii
REMERCIEMENTS.....	xv
RÉSUMÉ.....	xvi
I INTRODUCTION.....	1
II REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	6
1. Caractéristiques du virus de l'influenza.....	7
1.1. Taxonomie.....	7
1.2. Structure du virus.....	7
1.3. Organisation génétique et les protéines de l'influenza de type A.....	7
1.3.1. Les protéines formant le complexe de la polymérase virale.....	10
1.3.2. La protéine NP.....	10
1.3.3. Les glycoprotéines de surface.....	11
1.3.3.1. L'hémagglutinine.....	11
1.3.3.2. La neuraminidase.....	12
1.3.4. Les protéines de la matrice.....	13
1.3.4.1. La protéine M1.....	13
1.3.4.2. La protéine M2.....	13
1.3.5. Les protéines non structurales.....	16
1.3.5.1. La protéine structurale 1.....	16
1.3.5.2. La protéine non-structurale 2 ou protéine d'exportation nucléaire.....	17
2. Les protéines de la matrice.....	17
2.1. Fonctions de la protéine M1.....	17
2.1.1. Rôle de M1 dans l'assemblage et le bourgeonnement de la particule virale..	17
2.1.2. Rôle de M1 dans le transport de la RNPv.....	18
2.1.3. Régulation par M1 de la transcription de l'ARN viral.....	19
2.1.4. Fonctions de la protéine M2.....	19

2.2. Réponse immunitaire contre M1 et M2.....	20
3. Cycles de réplication du virus influenza A.....	21
3.1. L'endocytose du virus	21
3.2. La fusion de la membrane virale avec celle de l'endosome.....	21
3.3. La décapsidation et le transport de la RNPv dans le noyau de la cellule hôte.....	21
3.4. Synthèse des ARN messagers et réplication des ARN viraux.....	22
3.4.1. Caractéristiques particulières du virus de l'influenza	22
3.4.2. Synthèse des ARNm et ARN viraux	22
3.5. Assemblage de la progéniture virale.....	23
4. Le virus de l'influenza et le porc.....	23
4.1. Généralités.....	23
4.2. Les différents sous-types répertoriés.....	24
4.3. Souches porcines du Québec.....	24
4.4. Le porc, transmetteur potentiel du virus de l'influenza.....	24
4.5. Le porc, un hôte intermédiaire permettant la formation de virus hybrides.....	25
5. Infections expérimentales chez la souris	25
6. La réponse immunitaire contre le virus de l'influenza	26
6.1. La réponse non spécifique.....	26
6.2. La réponse spécifique	26
6.2.1. La réponse humorale	27
6.2.2. La réponse à médiation cellulaire.....	28
6.2.3. Anticorps neutralisants dans les sécrétions nasales.....	28
7. Les vaccins contre le virus de l'influenza.....	29
7.1. Les vaccins commerciaux	29
7.1.1. Les vaccins inactivés	29
7.1.2. Les vaccins sous-unitaires.....	29
7.2. Les vaccins expérimentaux	30
7.2.1. Virus atténués.....	30
7.2.2. Peptides synthétiques	30
7.2.3. Vaccin à ADN.....	30

8. L'immunisation génétique.....	31
8.1. Mécanisme.....	31
8.2. Voies d'immunisation.....	32
8.3. Avantages de l'immunisation génétique	33
8.4. Augmenter l'efficacité de l'immunisation génétique	34
8.4.1. Co-administration d'un plasmide codant pour des cytokines.....	34
8.4.2. Co-administration d'un plasmide codant par molécules de co-stimulation....	34
8.4.3. Les motifs CpG.....	34
8.5. Immunisation génétique anti-influenza	35
9. Objectifs de l'investigation.....	36
III MATÉRIELS ET MÉTHODES	37
1. Le virus SwQc91.....	38
1.1. Souche virale.....	38
1.2. Culture de la souche virale dans les œufs embryonnaires.....	38
1.3. Production et purification de la souche virale.....	38
1.3.1. Étapes de concentration.....	38
1.3.2. Étapes de purification.....	39
1.4. Titrage de l'activité hémagglutinante	39
1.5. Détermination de la concentration protéique.....	40
1.6. Analyse de la pureté du virus purifié.....	40
1.7. Adaptation au virus de l'influenza porcine SwQc91 chez les souris CD-1	41
1.7.1. Les passages chez les souris CD-1	41
1.7.2. Passage et culture de la souche adaptée dans le liquide allantoïde d'œuf embryonnaire.....	41
1.7.3. Détermination du LD50 chez les souris Balb/C	41
2. Extraction de l'acide ribonucléique viral (ARNv) de la souche SwQc91	42
3. Synthèse et amplification du gène codant pour la protéine de la matrice	43
3.1. Amorce oligonucléotidique.....	43
3.2. Réaction de transcription inverse.....	43
3.3. Amplification par PCR de l'ADNc de la protéine de la matrice	44

4. Clonage du gène de la matrice	44
4.1. Purification des produits d'amplification	44
4.2. Clonage du gène de la matrice	45
4.3. Transformation dans les bactéries compétentes InvαF	48
4.4. Criblage des colonies possédant le plasmide et l'insert	48
4.4.1. Purification de l'ADN plasmidique pCR2.1/M	48
4.4.2. Digestion de l'ADN plasmidique par Hind III et Apa I	49
5. Sous-clonage du gène de la protéine de la matrice dans le vecteur eucaryotique pRc/CMV2 (Invitrogen)	49
5.1. Digestion du vecteur	49
5.2. Purification de l'insert et du vecteur	52
5.3. Clonage du fragment M dans le vecteur pRc/CMV2	52
5.4. Transformation des bactéries <i>Escherichia coli</i> TOP10 (Invitrogen)	52
5.5. Criblage des colonies recombinantes pRc/CMV2/M	52
5.5.1. Purification de l'ADN plasmidique cloné dans les bactéries TOP10	52
5.5.2. Digestion de l'ADN plasmidique purifié	52
5.5.3. Séquençage	53
5.5.3.1. Purification de l'ADN plasmidique	53
5.5.3.2. Séquençage	54
6. Évaluation de l'expression des protéines M	54
6.1. Culture des cellules Cos-7	54
6.2. Transfection transitoire de pRc/CMV2/M dans les cellules eucaryotiques Cos-7	55
6.3. Lyse des cellules Cos-7 transfectées	55
6.4. Transfert électrophorétique	56
6.5. Pré-adsorption des sérums polyclonaux anti-SwQc91 de porc	56
6.6. Immunobuvardage	57
7. Production des plasmides pour l'immunisation en gigapréparation	57
8. Plasmide codant pour l'interleukine-2 murine pour l'immunisation	59
9. Protocole d'immunisation	59
9.1. Les animaux	59

9.2. Calendrier d'injections	60
10. Recherche des anticorps	60
11. Défi létal	61
11.1. Immunisation.....	61
11.2. Titre anticorps	61
11.3. Défi létal.....	62
IV RÉSULTATS.....	63
1. Purification du virus.....	64
2. Passage du virus de l'influenza	64
3. Extraction de l'ARN viral.....	64
4. Réaction de transcription inverse et amplification par PCR du gène M.....	67
5. Clonage du gène de la protéine de la matrice dans pCR2.1	67
6. Sous-clonage du gène de la matrice dans le vecteur eucaryotique pRc/CMV2.....	67
7. Séquençage du gène M.....	72
8. Production de pRc/CMV2/M, pcDNA3/IL-2, pRc/CMV2 et pcDNA3 en gigapréparation.....	72
9. Évaluation de l'expression du gène M inséré dans pRc/CMV2 dans les cellules eucaryotes Cos-7	84
10. Cinétique des anticorps sériques	87
11. Défi létal	92
V DISCUSSION	98
CONCLUSION.....	107
VI Bibliographie.....	109
Annexe 1 : Tampons et solutions	138
1. Tampon physiologique stérile	139
2. H ₂ O distillée traitée au DEPC 0,1 % (v/v) (pour l'extraction d'ARNv)	139
3. Solution pour la purification des souches virales.....	139
3.1. Solution de NaN ₃	139
3.2. Solution de saccharose 50 %.....	139
3.3. Solution de saccharose 26 %.....	139

4. Solution pour le dosage protéique.....	140
4.1. Réactif A.....	140
4.2. Solution de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	140
4.3. Solution-stock BSA	140
5. Préparation des solutions pour le gel d'électrophorèse SDS-PAGE.....	140
5.1. Solution-stock de polyacrylamide.....	140
5.2. Solution-stock de SDS.....	140
5.3. Tampon du gel de séparation	141
5.4. Tampon du gel de tassement.....	141
5.5. Solution de persulfate d'ammonium.....	141
5.6. Préparation des gels de polyacrylamide	141
5.7. Tampon dénaturant et réducteur 2 X	142
5.8. Tampon d'électrophorèse	142
5.9. Solution de coloration.....	142
6. Tampon et solution pour l'électrophorèse sur gel d'agarose.....	142
6.1. Solution EDTA	142
6.2. Tampon TAE.....	143
6.3. Tampon échantillon 6X.....	143
6.4. Préparation d'un gel d'agarose.....	143
6.5. Solution de bromure d'éthidium	143
7. Solution pour la purification d'ADN plasmidique par la méthode <i>Boiling Plasmid</i> <i>Miniprep</i>	143
7.1. Solution STET.....	143
7.2. Solution d'acétate d'ammonium dans l'isopropanol	144
7.3. Solution de lysozyme 10 mg/ml.....	144
7.4. Solution d'ARNase 1 mg/ml.....	144
8. Solutions et milieux de culture pour le clonage	144
8.1. Milieu Luria-Bertani.....	144
8.2. Milieu Luria-Bertani solide.....	144
8.3. Milieu SOC.	145

8.4. Solution-stock d'ampicilline	145
9. Solution pour le transfert électrophorétique et pour l'immunobuvardage	145
9.1. Tampon de transfert	145
9.2. Tampon TBS 10 X	146
9.3. Solution-stock Tween-20	146
9.4. Solution de lavage	146
9.5. Solution de blocage	146
9.6. Solution de dilution	146
9.7. Solution de révélation	146
10. Solution pour test ELISA indirect	147
10.1. Tampon de carbonate	147
10.2. Solution stock de Tween-20	147
10.3. Solution de lavage	147
10.4. Solution de blocage	147
10.5. Solution de dilution pour les anticorps	147
10.6. Solution de révélation	147
Annexe 2 : Formules	149
1. Quantification d'ARN viral par densité optique	150
2. Quantification d'ADN plasmidique par densité optique	150
3. Détermination du facteur de purification des préparations d'ARN ou d'ADN	150
4. Calcul de la densité optique seuil d'un essai ELISA	150
5. Calcul du LD50 selon la méthode de G. Kärber	150

Liste des tableaux

Tableau I: Présence de mutations dans la séquence nucléotidique du gène M cloné (C1.6) et leur effet sur les séquences en acides aminés des protéines M1 et M2	80
Tableau II : Titre Ac des semaines 0 et 8 des souris immunisées pour le défi létal.....	93

Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique du virus de l'influenza A.	8
Figure 2: Diagramme schématique des ARNm formés par le segment 7 du virus de l'influenza (M1, M2, M3) et leurs régions codantes.	14
Figure 3: Clonage du gène M de la souche influenza SwQc91 dans le vecteur pCR2.1.....	46
Figure 4 : Sous-clonage du gène M de la souche influenza SwQc91 dans le vecteur d'expression eucaryote pRc/CMV2	50
Figure 5: Évaluation par gel d'électrophorèse SDS-PAGE de la pureté de la suspension virale SwQc91.....	65
Figure 6: Électrophorèse sur gel d'agarose du produit de RT/PCR purifié correspondant à l'ADNc du segment 7 du virus de l'influenza SwQc91.....	68
Figure 7: Profil électrophorétique de l'ADN plasmidique par suite de sa digestion avec les enzymes de restriction Apa I et Hind III.	70
Figure 8: Profil électrophorétique de l'ADN plasmidique par suite de sa digestion avec les enzymes de restrictions Apa I et Hind III.	73
Figure 9: Comparaison entre la séquence nucléotidique de l'insert d'ADNc du gène M extrait des clones de la colonie C1.6 avec la séquence de référence du gène M (SwQc91).	75
Figure 10: Séquences en acides aminés des protéines M1 et M2 déduites de la séquence en acides nucléiques	78
Figure 11: Profil électrophorétique d'ADN plasmidique purifié par gigapréparation, par suite de leur digestion avec les enzymes de restrictions.....	82
Figure 12: Évaluation par immunobuvardage de l'expression du gène M inséré dans pRc/CMV2 dans les cellules eucaryotes.	85
Figure 13: Cinétique et titre d'anticorps sériques anti-SwQc91 du témoin positif (groupe 6)	88
Figure 14: Cinétique et titre des anticorps sériques	90
Figure 15: Survie des souris en fonction du temps après l'instillation de 5LD50 de la souche SwQc91 adaptée.....	95

Liste des abréviations

α :	Alpha
β :	Beta
γ :	Gamma
μg :	Microgramme
μl :	Microlitre
A :	Base désoxyadénosine
a. a. :	Acide aminé
Ac :	Anticorps
Ag :	Antigène
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
APC :	Cellule présentatrice d'Antigène
ARN :	Acide ribonucléique
ARNv :	Acide ribonucléique viral
ARNmv :	Acide ribonucléique messenger viral
AS :	Acide sialique
BCA :	Acide bicinchonique
BSA :	Albumine sérique bovine (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
C :	Base désoxycytosine
$^{\circ}\text{C}$:	Degré Celsius
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CRM1 :	Exportine 1
CTL :	Lymphocyte T-cytotoxique
DEPC :	Diéthylpyrocarbonate
D.O. :	Densité optique
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EDTA :	Acide éthylène diamine tétraacétique
ELISA :	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
G :	Base désoxyguanidine
g :	Gramme
g :	Force gravitationnelle
HA :	Hémagglutinine
IgG :	Immunoglobuline Gamma
IL-2 :	Interleukine-2
i.d. :	Intradermique
i.m. :	Intramusculaire
i.n. :	Intranasale
kb :	Kilobase
kDa :	Kilodalton
kg :	Kilogramme

l :	Litre
LB :	Milieu Luria-Bertani
M :	Mole (concentration molaire)
M1 :	Protéine de la matrice 1
M2 :	Protéine transmembranaire 2
mg :	Milligramme
ml :	Millilitre
mM :	Millimole
mm :	Millimètre
N :	Normal
NA :	Neuraminidase
NEP :	Protéine d'exportation nucléaire
NES :	Signal de localisation nucléaire
NK :	<i>Natural Killer cell</i>
ng :	Nanogramme
nm :	Nanomètre
NP :	Nucléoprotéine
NS1 :	Protéine non-structurale 1
NS2 :	Protéine non-structurale 2
OPD :	Hypochlorure d'orthophénylène diamine
PA :	Polymérase acide
PBS :	Solution physiologique saline
PB1 :	Polymérase basique 1
PB2 :	Polymérase basique 2
PBS :	Solution saline phosphatée
PCR :	Réaction en chaîne de la polymérase
p/p :	Poids par poids
p/v :	Poids par volume
PVDF :	Difluorure de polyvinylidène
RE :	Réticulum endoplasmique
RNP :	Ribonucléoprotéine
RT :	Réaction de transcription inverse
SDS :	Dodécyl sulfate de sodium
SDS-PAGE:	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium
SwQc91 :	Virus de l'influenza A/Sw/Québec/53/91 (H1N1)
SOC :	Milieu de culture 2 % Tryptone, 0,5 % extrait de levure, 0,05 % NaCl
STET :	Solution 8 % sucrose, 5 % Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
T :	Base désoxythymidine
TAE :	Solution 40 mM Tris-acétate, 1 mM EDTA, pH 8,0
TBS :	Tampon 20 mM Tris-acétate, 1 mM EDTA, pH 8,0
T.P :	Température de la pièce (22-24°C)
tr/min	Tours par minute
UHA :	Unité hémagglutinante

UV : Lumière ultraviolet
V : Volt
v/v : Volume par volume

Remerciements

Je remercie le professeur D. J. S. Arora de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de m'avoir enseigné la patience, et du temps qu'il m'a consacré tout au long de cette investigation.

D'autre part, je remercie grandement aussi les membres de ma famille pour leur encouragement, tout particulièrement ma mère de son soutien, ma collègue et amie Annie Poirier de son appui moral, et Quang Phi Pham de sa confiance en moi.

En outre, j'ai apprécié l'aide technique de Carl Gagnon, de Marc Henrichon et du professeur E. G. Brown (Université d'Ottawa), et je remercie D' A. Merzouki de nous avoir donné l'échantillon d'ADN plasmidique pcDNA3/IL-2.

Enfin, cette recherche a pu devenir réalité grâce aux subventions de CORPAQ.

Résumé

L'industrie porcine du Québec est régulièrement aux prises avec des épidémies d'influenza qui entraînent d'importantes pertes économiques. Le porc constitue aussi un hôte intermédiaire produisant des réassortants qui peuvent mener à de graves épidémies chez l'humain. Ainsi, le pouvoir protecteur de l'immunisation génétique d'un plasmide codant pour les protéines de la matrice (M1 et M2) a fait l'objet d'une évaluation. Nous avons ciblé le gène M, le plus conservé du virion. Cette caractéristique représente un avantage par rapport aux antigènes de surface très variables utilisés habituellement en vaccinologie anti-influenza. On a donc cloné le gène M du virus de l'influenza de type A (H1N1), A/Sw/Québec/53/91 (SwQc91) dans le vecteur pRc/CMV2 grâce aux sites de restrictions Apa I et Hind III. Par la suite, on a immunisé les souris Balb/C par voie intramusculaire (i.m.) avec 200 µg d'ADN plasmidique (pRc/CMV2/M) 3 fois à 3 semaines d'intervalles. On a mesuré le titre des anticorps (Ac) anti-M par ELISA en récoltant les sérums des semaines 0, 2, 5, 8 et 11. C'est à partir de la semaine 8 qu'on a observé un titre Ac anti-M de 640. Enfin, 2 semaines après la dernière injection, on a évalué la protection engendrée par l'immunisation, au moyen d'un défi léthal par voie d'injection de 5LD50 de la souche adaptée chez les souris. On a observé un taux de survie de 50 % par suite de cette immunisation. D'autre part, la co-administration d'un plasmide codant pour IL-2 (pcDNA3/IL-2) comme adjuvant n'augmente ni le titre Ac ni la protection. Ainsi, l'administration de pRc/CMV2/M induit une réponse immunitaire menant à une protection potentielle chez les souris infectées par un virus fatal de l'influenza.

Mots clés : *Influenza porcine, porc, immunisation génétique, gène M, réponse humorale, défi léthal*

I INTRODUCTION

Le virus de l'influenza A a été responsable d'épidémies et de pandémies de grippe chez l'humain. Son instabilité antigénique et sa virulence lui permettent de surprendre le système immunitaire de l'hôte en réduisant son habileté à neutraliser le virus par les Ac anti-hémagglutinines (HA). Ainsi, le virus se répand dans toute la population humaine sans difficulté. L'infection peut être encore mortelle dans certains cas, surtout chez les personnes âgées (Barker et Mullooly, 1980; Barker, 1986; Couch et al., 1986), et cause une maladie respiratoire très contagieuse. Habituellement, cette infection se transmet facilement par contact direct ou par la voie aérienne (McBean, Babish et Warren, 1993) et s'accompagne de fièvre.

En plus d'infecter l'espèce humaine, le virus de l'influenza A peut également s'isoler chez les aviaires ou chez les mammifères comme le porc. D'ailleurs, en Amérique du Nord, il est l'un des principaux agents qui interviennent dans les affections respiratoires touchant le porc (Hinshaw et al., 1978). Normalement, les porcs se font infecter par les sous-types H1N1 (Chambers et al., 1991) ou, plus rarement, H3N2 (Schultz et al., 1991; Webby et al., 2000), qui ne causent pas la mort (Olsen, 2000). Les porcs infectés sont pourtant fiévreux et anorexiques (Easterday et Hinshaw, 1992). Bien que l'infection soit rarement fatale pour ces derniers, les pertes pondérales et les frais de vétérinaire associés à la grippe porcine ont une incidence économique sur l'industrie porcine (Brown, 1998).

En 1990, l'apparition de nouvelles maladies respiratoires chroniques chez le porc a mené à l'identification d'une nouvelle souche : SwQc91. Contrairement aux virus classiques, la souche SwQc91 cause la mort des porcelets en causant une pneumonie proliférative et nécrosante (Dea et al., 1992).

D'autre part, la grippe porcine représente un certain danger pour l'espèce humaine. En effet, le porc est un creuset idéal pour la formation de nouveaux variants responsables de graves épidémies chez l'être humain. Les pandémies majeures de grippe ayant frappé l'espèce humaine au XX^e siècle proviennent de virus réassortants entre des virus préexistants d'humains (Huang et al., 2001 ; Nakajima et al., 1982) et de porcs (Webster et al., 1992). Les souches humaines et aviaires peuvent infecter les porcs (Guan et al., 1996), ce qui favorise l'apparition de virus hybrides qui ne sont pas reconnus par le

système immunitaire de l'espèce humaine (Castrucci et al., 1993). En effet, le tractus respiratoire des porcs contient des récepteurs sialiques reconnus par les virus provenant d'aviaires et de mammifères (Ito et al., 1998). En plus de jouer un rôle dans le réassortiment de nouveaux variants, les porcs représentent une source de transmissions zoonotiques des virus de l'influenza porcins (Hinshaw et al., 1978; Wentworth et al., 1997).

Ainsi, il semble important de prévenir la maladie par le biais de vaccins. En réalité, il existe déjà des vaccins chez l'homme et le porc : les vaccins inactivés et sous-unitaires (Olsen, 2000). Dans le cas des vaccins inactivés, il s'agit de l'injection de virus traités à la formaline, alors que pour les vaccins sous-unitaires, il s'agit de l'injection des deux principaux immunogènes du virus de l'influenza: l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). Bien que ces deux types de vaccin diminuent l'incidence et la gravité de la maladie, ils ne sont pas toujours efficaces contre les virus d'influenza humains (Kodihalli et al., 1995; Robertson et al., 1987) et porcins (Brown et al., 1994; Macklin et al., 1998). En outre, ces vaccins ne stimulent pas efficacement la réponse à médiation cellulaire (York et Rock, 1996) et ne protègent pas contre les nouveaux variants (Smith et al., 1999). Par conséquent, il semble important de vérifier d'autres avenues.

Nous avons choisi d'évaluer l'immunisation génétique par voie intramusculaire (i.m.) chez la souris par l'utilisation d'un plasmide codant pour les protéines virales de la matrice. Cette approche prometteuse mime une infection virale (Gregersen, 2001). En effet, l'antigène (Ag) est produit *de novo* en leur conformation endogène, et le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classes I et II peut présenter les Ag, stimulant ainsi respectivement la réponse cytotoxique (les cellules T) et la production d'Ac (McDonnell et Askari, 1996). Contrairement aux vaccins commerciaux, ce type d'immunisation induit une réponse tant cellulaire qu'umorale et offre les mêmes avantages que les vaccins vivants atténués sans leurs risques associés (Gregersen, 2001; Manickan et al., 1997; Ulmer, Sadoff et Liu, 1996). En général, la stratégie habituellement développée en vaccinologie anti-influenza consiste à induire la production des Ac neutralisants contre les glycoprotéines de surface, HA et NA. Or les modifications antigéniques majeures rencontrées se retrouvent essentiellement aux niveaux de HA et de NA. Ainsi, la protection engendrée par leur administration reste limitée (Both et al., 1983; Chakraverty,

1993). De notre côté, nous avons opté pour le gène M du fait qu'il reste relativement constant (Ito et al., 1991; Lamb, Lai et Choppin, 1981; Shu, Bean et Webster, 1993) et que les protéines M sont immunogènes (Bucher et al., 1987). L'utilisation de l'Ag M a donc l'avantage de stimuler une réponse immunitaire contre de nouveaux variants (Okuda et al., 2001). D'habitude, l'administration de l'ADN plasmidique recombinant se pratique par les voies i.m. et intradermique (i.d.) (Gregersen, 2001; Leitner, Ying et Restifo, 2000), mais on a expérimenté d'autres voies, telles que la voie intranasale (i.n.) (Okuda et al., 2001). La réponse immunitaire varie selon le mode d'injection. Par exemple, l'injection i.m. se pratiquant habituellement à l'aide d'une aiguille stimule plutôt une réponse de type Th1 alors que l'injection intradermique, administrée à l'aide d'un pistolet à gènes (*gene gun*), produit normalement une réponse de type Th2 (Barry et Johnston, 1997; Leitner, Ying et Restifo, 2000). Enfin, l'administration i.n. d'ADN plasmidique offre l'avantage de stimuler la production d'Ac neutralisants (IgA) (Moldoveanu et al., 1998; Wong et al., 2001). Notre investigation a valorisé la voie i.m., une méthode d'immunisation simple (Barry et Johnston, 1997) et couramment utilisée. Ce type d'injection recèle l'avantage de stimuler une réponse cellulaire (Th1) soit l'un des mécanismes d'importance mis à contribution dans l'élimination du virus de l'influenza (Flynn et al., 1998).

La majorité des investigations portant sur l'immunisation génétique administrent leur plasmide recombinant dans une solution physiologique saline (PBS) sans adjuvant (Gregersen et al., 2001). D'autre part, il est possible de moduler la réponse immunitaire à la suite de l'administration d'un plasmide codant pour un Ag à l'aide d'un adjuvant. Nous avons adopté la co-administration d'un vecteur codant pour IL-2 afin d'augmenter la réponse humorale. L'IL-2 est une cytokine responsable de l'activation de la prolifération et de l'expansion clonale des cellules T spécifiques (Morgan, Ruscetti et Gallo, 1976). En plus, l'injection i.m. d'un plasmide codant pour une cytokine entraîne *in vivo* l'action biologique de cette dernière (Raz, Durbin et Levy, 1994). De cette façon, il est possible d'augmenter et(ou) de moduler la réponse immunitaire contre une protéine Ag produite grâce à l'immunisation génétique (Raz, Durbin et Levy, 1994).

Une étude de la littérature nous a permis d'établir nos objectifs. (1) D'abord, nous avons conçu le plasmide recombinant codant pour les protéines M: pRc/CMV2/M. (2) Ensuite, nous avons vérifié au moyen d'un test ELISA la réponse humorale (Ac anti-M)

engendrée à la suite de l'immunisation i.m. des souris par le plasmide pRc/CMV2/M. (3) Puis, nous avons évalué le potentiel protecteur de cette immunisation à l'aide d'un défi létal avec une souche influenza adaptée chez les souris. (4) Enfin, nous avons effectué la co-injection de pcDNA3/IL-2 afin d'évaluer son pouvoir adjuvant.

II REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. Caractéristiques du virus de l'influenza

1.1. Taxonomie

Les virus qui entraînent la grippe appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae* (Lamb et Krug, 2001). Le génome de ces virus enveloppés se segmente en huit molécules d'acide ribonucléique (ARN) simples brins linéaires à polarités négatives (Lamb et Krug, 2001) (Figure 1). Des différences dans les protéines internes, la protéine de la matrice 1 (M1) et la nucléoprotéine (NP), permettent de diviser les virus de l'influenza en deux genres distincts: l'influenza A et B, et l'influenza C (de Boer, Back et Osterhaus, 1990). Le virus de l'influenza A se subdivise, selon les glycoprotéines de surface hémagglutinine (HA) et neuraminidase (NA), en sous-types antigéniques (Rohm et al., 1996; Wilson et Cox, 1990). Il existe 15 types antigéniques différents d'HA, et 9 de NA.

1.2. Structure du virus

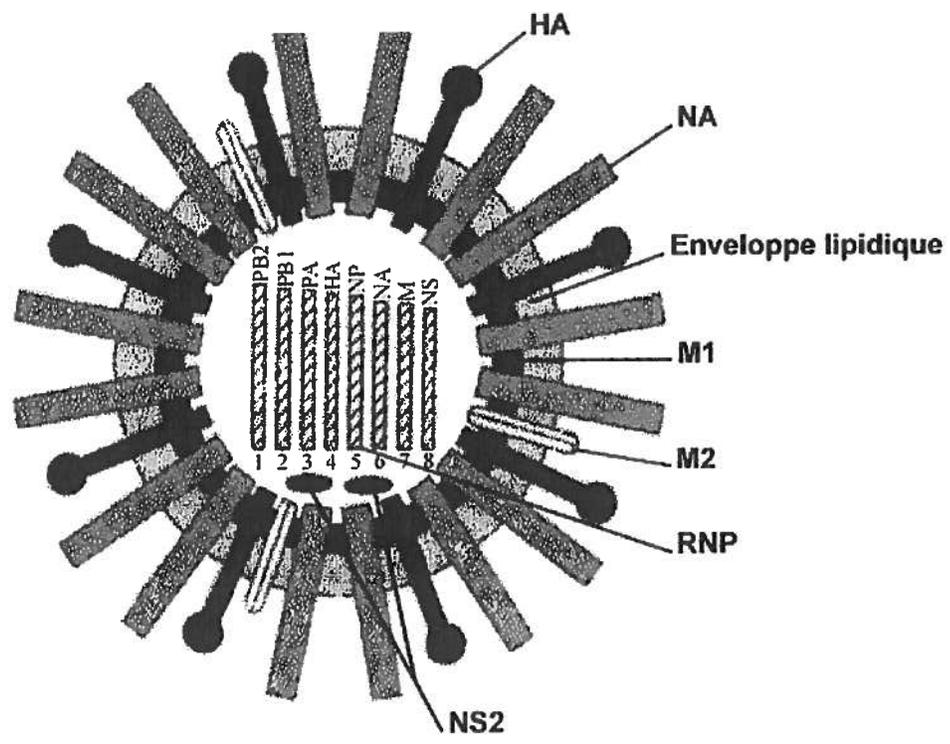
À la surface du virion, nous distinguons des picules saillants: les glycoprotéines de surface HA et NA (Murti et Webster, 1986; Ruigrok, 1998) et une troisième protéine de surface plus petite, soit la protéine transmembranaire 2 (M2) (un canal ionique) (Lamb et Krug, 2001) (Figure 1). Sous-jacente à l'enveloppe lipidique, la protéine M1 s'associe aux domaines cytoplasmiques des glycoprotéines de surface pour former la matrice virale (Helenius, 1992). La protéine M1, la plus abondante du virion, s'associe à la ribonucléoprotéine virale (RNPv) (génome du virus) (Lamb et Krug, 2001). Les huit segments d'ARN viraux (ARNv) se lient à la nucléoprotéine (NP), aux polymérases virales basiques 1 et 2 (PB1 et PB2), et à la polymérase acide (PA) pour former la RNPv (Lamb et Choppin, 1983; Helenius, 1992).

1.3. Organisation génétique et les protéines de l'influenza de type A

Le génome du virus de l'influenza A comprend dix gènes répartis en huit segments simples brins et négatifs d'ARN (ARNss).

Figure 1: Représentation schématique du virus de l'influenza A.

Le virus de l'influenza est un virus enveloppé contenant huit brins d'ARN (-). À la surface, on peut apercevoir les picules saillants formés par l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). En moins grande quantité on trouve une protéine transmembranaire qui agit comme canal ionique nommé M2 (protéine transmembranaire 2). Sous-jacente à l'enveloppe lipidique et associée aux domaines cytoplasmiques des glycoprotéines de surface, la protéine de la matrice 1 (M1) forme la matrice virale. À l'intérieur, les brins d'ARN façonnent la ribonucléoprotéine (RNP) avec la nucléoprotéine (NP), les polymérase basiques 1 et 2 (PB1 et PB2), la polymérase acide (PA) et la protéine non structurale 2 (NS2). Les segments 1, 2 et 3 codent respectivement pour les polymérase PB1, PB2 et PA, le segment 4 code pour la protéine HA, le segment 5 code pour la NP, le segment 6 code pour neuraminidase (NA), le segment 7 code pour M1 et M2 et le segment 8 code pour NS1 et NS2. (Gluck, 1997).



1.3.1. Les protéines formant le complexe de la polymérase virale

Les plus grands segments (1, 2 et 3) codent pour deux protéines basiques (PB1, 85 kDa et PB2, 96 kDa) et une acide (PA et 85 kDa) (Inglis et al., 1976; Lamb et Choppin, 1976; Ulmanen, Broni et Krug, 1981). Dans les cellules infectées, ces protéines forment un hétérotrimère et représentent la machinerie nécessaire à la réplication d'ARN viral (ARNv) et à la transcription d'ARN messager viral (ARNmv) (Blaas, Patzelt et Kuechter, 1982a; Braam, Ulmanen et Krug, 1983; Ulmanen, Broni et Krug, 1983).

Les différentes polymérases du virus de l'influenza A présentent chacune leurs caractéristiques. La protéine PB1 est responsable de l'initiation de la chaîne d'ARNmv, de son élongation et de sa formation (Braam, Ulmanen et Krug, 1983). La sous-unité PB1 contient plusieurs motifs caractéristiques d'un ARN polymérase ARNv dépendant (Poch et al., 1989) essentiels à la synthèse d'ARNv (Biswas et Nayak, 1994). Pour la synthèse des ARNm, des fragments 5' coiffés, provenant des ARNm de la cellule, servent d'amorce (Krug et al., 1989; Luo et al., 1991; Pritlove et al., 1999). La protéine PB2 lie la coiffe des extrémités 5' des ARNm (Blaas, Patzelt et Kuechter, 1982b; Ulmanen, Broni et Krug, 1981) et renferme une activité endonucléolytique responsable du clivage des fragments ARNm coiffés de la cellule hôte (Blok et al., 1996; Licheng et al., 1995). Quant à la sous-unité PA, elle engendre la réplication (Mahy, 1983) par l'induction d'un processus protéolytique (Sanz-Ezquerro et al., 1995; Sanz-Ezquerro et al., 1996) essentiel à l'activité transcriptionnelle (Perales et al., 2000).

1.3.2. La protéine NP

Le segment 5 du virus de l'influenza de type A, code pour la NP de 56 kDa, une protéine basique d'une longueur de 498 a.a. (Albo, Valencia et Portela, 1995; Arrese et Portela, 1996; Privalsky et Penhoet, 1978). Suivant sa synthèse dans le cytoplasme, la NP se dirige vers le noyau où elle prend part à l'élongation de l'ARNv et l'assemblage de la RNPv (Davey, Dimmock et Colman, 1985; Honda et al., 1988; Krug et al. 1989).

La NP, une protéine structurale, forme le squelette de la RNPv (Kingsbury, Jones et Murti, 1987; Pons et al., 1969; Ruigrok et Baudin, 1995). Son domaine de liaison à l'ARN en N-terminal (Albo, Valencia et Portela, 1995; Kobayashi et al., 1994) et la formation d'oligomères de NP (Prokudina-Kantorovich et Semenova, 1996) permettent le maintien de la structure de la RNPv (Prokudina-Kantorovich et al., 1996; Ruigrok et Baudin, 1995). La NP joue aussi un rôle central dans la réplication du virus: elle amorce la réplication du génome au lieu de la transcription qui mène à la production des ARNm_v (Beaton et Krug, 1986; Shapiro et Krug, 1988), en s'associant aux sous-unités PB2 et PB1 (Biswas, Boutz et Nayak, 1998; Mena et al., 1999). En plus, la NP interagit avec plusieurs membres de la famille des importines (récepteur permettant l'importation et l'exportation nucléaires) par son signal d'exportation nucléaire (NES) (Neumann, Castrucci et Kawaoka, 1997; Wang, Palese et O'Neill, 1997; Weber et al., 1998) afin d'exporter la RNPv du noyau (Elton et al., 2001).

1.3.3. Les glycoprotéines de surface

Les segments 4 et 6 codent respectivement pour HA et NA, les protéines les plus immunogènes du virus. Le segment 4, d'environ 1778 nucléotides, code pour un polypeptide de 562 à 566 a.a. (Lamb et Krug, 2001). Le segment 6, d'environ 1413 nucléotides, code pour un polypeptide de 453 a.a. (Laver et Valentine, 1969).

1.3.3.1. L'hémagglutinine

À l'origine, on a baptisé la protéine ainsi en raison de sa capacité d'agglutiner les érythrocytes (Hirst, 1941; McClelland et Hare, 1941). L'HA se fait synthétiser sous la forme d'un précurseur HA0 et se trimérise en s'associant aux chaperons du RE pour subir un transfert à la surface cellulaire grâce à l'appareil de Golgi (Rohm et al., 1996; Hebert et al., 1995). Un clivage se produit à la surface des cellules ou lors de la libération des virus. Le clivage de la protéine HA0 génère le C-terminal d'HA1 (328 résidus d'HA0) et le N-terminal d'HA2 (221 a.a.), libérant HA1 et HA2 partiellement.

La sous-unité HA1 permet l'attachement initial de la particule virale en se liant aux résidus d'acide sialique (AS) des récepteurs, Neu5Ac $\alpha(2,3)$ -Gal ($\alpha(2,3)$) ou Neu5Ac $\alpha(2,6)$ -Gal ($\alpha(2,6)$), de la cellule (Martin et al., 1998; Weis, Brown et Cusack, 1988). Les

virus humains se lient aux résidus d'AS attachés au galactose par une liaison α 2,6, tandis que les virus aviaires et chevalins se lient aux résidus d'AS attachés au galactose par une liaison α 2,3 (Matrosovich et al., 2000). Quant à la protéine HA2, elle intervient dans le processus de fusion (Bizebard et al., 1995; Chen, Skehel et Wiley, 1999; Sato, Kawasaki et Ohnishi, 1983; Skehel et Waterfield, 1975; Skehel et Wiley, 2000); la section hydrophobe de HA2 s'intercale entre l'enveloppe virale et la membrane cytoplasmique de la cellule hôte (Brunner et Tsurudome, 1993).

La protéine HA est hautement immunogène. Les Ac anti-HA neutralisent les virus. Conséquemment, les changements de structure de la protéine HA empêchent la liaison des Ac et entraînent l'apparition de virus susceptibles de causer une épidémie (Skehel et Wiley, 2000).

1.3.3.2. La neuraminidase

Il s'agit d'une protéine membranaire formant un homotétramère de 220 kDa avec une tête catalytique en C-terminal, un domaine trans-membranaire hydrophobe et une queue cytoplasmique de 6 a.a. (Air et Laver, 1989). La NA est aussi connue comme un déterminant antigénique subissant des variations antigéniques (Colman et Ward, 1985).

La tête de NA catalyse le clivage des liaisons α -kétosidiques entre un résidu sialique terminal (N-acétylneuraminique) et un D-galactose ou D-galactosamine (Gottschalk, 1957) de n'importe quelle chaîne d'oligosaccharide. L'activité enzymatique de NA permet le clivage l'oligosaccharide de NA lui-même, de HA et des récepteurs cellulaires (Palese et al., 1974). Ainsi, l'activité enzymatique de NA favorise la libération de la progéniture virale des cellules hôtes et empêche l'agrégation des virus entre eux (Compans, Dimock et Meier-Eward, 1969; Griffin, Basak et Compans, 1983; Liu et al., 1995). De ce fait, en absence de la fonction sialidase de NA, la progéniture virale reste agrégée à la surface des cellules par HA et ne peut se libérer (Palese et al., 1974; Shibata et al., 1993). L'activité de sialidase n'est pas requise pour l'attachement, l'entrée, la réplication et la formation de progéniture virale (Liu et al., 1995), mais apparaît nécessaire pour une réplication virale efficace (Hughes et al., 2000; Wagner et al., 2000). Du reste, NA permet le transport du virus à travers le tractus respiratoire en lui permettant de trouver sa cible dans les cellules épithéliales (Palese et al., 1974).

1.3.4. Les protéines de la matrice

Le segment 7 de 1 027 nucléotides, code pour les deux protéines de la matrice : M1, qui entoure l'enveloppe, et M2, une composante mineure jouant un rôle de canal ionique (Figure 2). Les gènes M1 et M2 sont partiellement chevauchants. Un mécanisme d'épissage alternatif réalisé par la machinerie cellulaire régule la synthèse des ARNm et permet la synthèse de deux ARNm à partir du segment 7 (Inglis et Brown, 1981; Lamb, Lai et Choppin, 1981). L'ARNm codant pour M1 (252 a.a. et de 27 kDa) est colinéaire au segment 7 (Allen et al., 1980; Lamb, Lai et Choppin, 1981), tandis que l'ARNm de M2 (97 a.a. et de 14 kDa) découle de l'épissage alternatif (Lamb, Lai et Choppin, 1981). Dans le cas de M2, il y a un premier exon codant pour 9 a.a., identique à la protéine M1, et un second exon utilisant un autre cadre de lecture (ORF) (Lamb, Lai et Choppin, 1981). Il faut ajouter qu'un autre donneur alternatif génère à partir du segment 7 un troisième ARNm présentant une légère capacité codante (Inglis et Brown, 1981), mais aucune preuve n'a démontré l'existence de la protéine M3 *in vivo* (Inglis et Brown, 1981).

1.3.4.1. La protéine M1

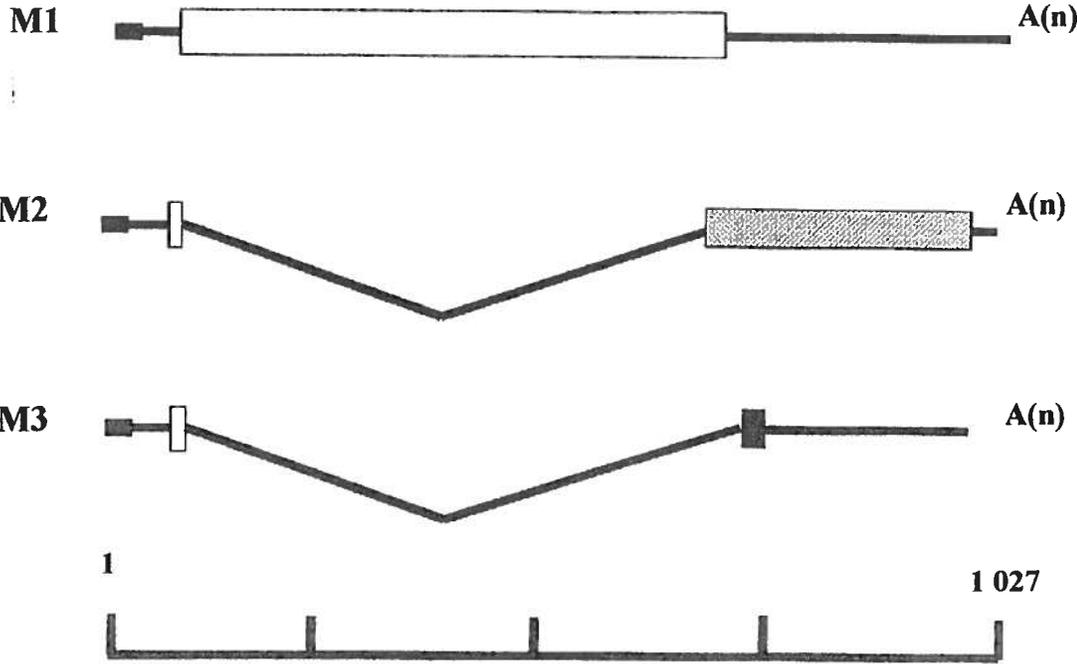
Le segment 7, le plus conservé du virion (Ortín et al., 1983), code pour M1, la protéine la plus conservée du virion (Ito et al., 1991; Hall et Air, 1981) et la plus abondante du virus (Bucher et al., 1987).

1.3.4.2. La protéine M2

La protéine M2 est une composante de l'enveloppe virale fonctionnant comme un canal ionique pour réguler le pH par le transport d'ions H⁺. M2 s'exprime abondamment à la surface des cellules infectées, mais très peu à la surface du virion (Zebedee et Lamb, 1988; Zebedee, Richardson et Lamb, 1985). L'orientation de cette protéine transmembranaire de type III (Hull, Gilmore et Lamb, 1988) se lit comme suit : 24 a.a. N-terminal sont extracellulaires, 19 sont transmembranaires, et 54 autres forment la queue cytoplasmique (Lamb, Zebedee et Richardson, 1985)

Figure 2: Diagramme schématique des ARNm formés par le segment 7 du virus de l'influenza (M1, M2, M3) et leurs régions codantes.

Le segment 7 du virus de l'influenza, comprenant 1 027 nucléotides, code pour deux protéines connues : M1 (252 acides aminés) et M2 (97 acides aminés). Il s'agit d'un gène bicistronique. Un transcrit colinéaire code pour la protéine M1, alors qu'un épissage alternatif code pour M2. Nous distinguons un 3^e ARNm qui coderait pour un peptide de 9 acides aminés (a.a.), mais aucune preuve n'a démontré l'existence de M3 *in vivo*. Sur le schéma, les lignes fines représentent les régions non codantes, tandis que les rectangles indiquent les régions codantes (blanc pour la région codant pour M1, gris pour la région codant pour M2 et noir pour la région codant pour M3). Les lignes en V symbolisent les introns (Lamb et Krug, 2001).



On a démontré que le domaine extracellulaire jouait un rôle d'importance dans l'incorporation de M2 dans l'enveloppe virale (Pak, Krumbiegel et Blumenthal, 1994), et c'est le domaine transmembranaire hydrophobe où l'on retrouve l'activité biologique de canal ionique pouvant se faire bloquer par l'amantadine, un agent antiviral (Duff et al., 1994). Les protéines de la matrice M1 et M2 feront l'objet d'un examen plus détaillé dans la section 2 ci-dessous.

1.3.5. Les protéines non structurales

L'ARN du segment 8 de 890 nucléotides code pour deux protéines, NS1 et NS2. Un ARNmv colinéaire au segment 8, code pour la protéine NS1, tandis qu'un ARNm épissé code pour NS2 (Lamb et Lai, 1980).

1.3.5.1. La protéine structurale 1

La protéine NS1 de 202 à 237 a.a. et de 26 kDa, s'exprime en grande quantité dans les cellules infectées, principalement dans le noyau et aussi associée aux polysomes (Compans, 1973; Krug et Etkind, 1973; Krug et Soeiro, 1975), mais n'est pas détectée dans le virion (Krug et Etkind, 1973; Skehel, 1972).

NS1 lie différents types d'ARN, viraux et cellulaires (Hatada et Fukuda, 1992; Hatada et al., 1997; Marión et al., 1997; Park et Katze, 1995; Qiu et Krug, 1994; Qiu, Nemeroff et Krug, 1995), afin de réguler plusieurs activités post-transcriptionnelles. Par exemple, NS1 agit à titre de modulateur post-transcriptionnel durant le cycle de réplication en modifiant l'épissage des pré-ARNm (Fortes, Beloso et Ortin, 1994; Lu, Qiu et Krug, 1994), en inhibant la polyadénylation de ARNm cellulaire (Nemeroff et al., 1998; Chen, Li et Krug, 1999) et en inhibant le transport nucléocytoplasmique (Fortes, Beloso et Ortin, 1994; Quian et Krug, 1994). En plus, NS1 semble stimuler la synthèse des protéines virales (De la Luna et al., 1995; Enami et al., 1994) en accélérant l'initiation de la traduction des ARNm (Aragón et al., 2000; De la Luna et al., 1995; Enami et Enami, 2000) et en modulant la transcription et la réplication de l'ARNv (Marión et al., 1997; Shimizu et al., 1994). Enfin, on a établi que NS1 se lie aux ARNs pour empêcher la mise en action de l'interféron- γ (Lu et al., 1995; Wang et al., 2000; Zurcher, Marión et Ortin, 2000).

1.3.5.2. La protéine non-structurale 2 ou protéine d'exportation nucléaire

On a cru à tort que NS2, petite protéine de 11 kDa, était non structurale. Mais nous connaissons maintenant sa présence dans le virion (environ 130 à 200 molécules) et son association à M1 (Richardson et Akkina, 1991; Yasuda et al., 1993).

Lorsqu'il y a infection, on détecte la présence de NS2 dans le noyau (Greenspan, Krystal et Nakada, 1985) et le cytoplasme (Smith et al., 1987). Sa synthèse survient uniquement pendant la phase tardive de l'infection. En outre, NS2 comprend un signal d'exportation nucléaire (NES) qui semble favoriser l'exportation nucléaire de la RNPv (O'Neill, Talon et Palese, 1998) en interagissant avec le CRM1 (récepteur d'exportation nucléaire appartenant à la famille des importines) (Neumann, Hughes et Kawaoka, 2000). Sur la base de ce modèle, on a même proposé de renommer NS2 protéine d'exportation nucléaire (NEP). Enfin, NS2 semble jouer un rôle important dans la synthèse de l'ARNv (Odagiri et Tobita, 1990).

2. Les protéines de la matrice

2.1. Fonctions de la protéine M1

M1 est une protéine multifonctionnelle pouvant interagir avec les autres protéines virales en plus de former la matrice virale.

2.1.1. Rôle de M1 dans l'assemblage et le bourgeonnement de la particule virale

Afin de contribuer à l'assemblage, la protéine M1 peut se lier aux lipides (Ruigrok et al., 2000; Zhang et Lamb, 1996) et s'associe aux différentes protéines virales pour organiser l'assemblage du virion et procurer la force agissante du bourgeonnement (Gómez-Purtas et al., 1999; Gómez-Purtas et al., 2000; Jin et al., 1997; Latham et Galarza, 2001). La protéine M1 interagit avec HA, NA (Ali et al., 2000; Mitnaul et al., 1996), NS2 (Yasuda et al., 1993; Ye et al., 1999) M2 et la RNPv (Zhang et Lamb, 1996). Cependant, ni HA ni NA n'est absolument requise pour l'assemblage, le bourgeonnement et la libération de la particule (Liu et al., 1995; Pattnaik, Brown et Nayak, 1986).

2.1.2. Rôle de M1 dans le transport de la RNPv

Au moment de la pénétration du virus dans la cellule hôte, l'acidification de l'endosome entraîne la dissociation de M1 et de la RNPv en induisant des changements de conformation à M1 (Bui, Whittaker et Helenius, 1996). De ce fait, il y a libération de la RNPv dans le cytoplasme (Martin et Helenius, 1991). En conséquence, la RNPv migre dans le noyau par un processus actif permis par la voie d'importine α/β nucléaire et grâce au signal de localisation nucléaire de la protéine NP (O'Neill et al., 1995). Ainsi, M1 permet l'importation nucléaire de la RNPv en libérant ce dernier dans le cytoplasme (Martin et Helenius, 1991).

Une fois dans la RNPv entrée dans le noyau, la réplication du génome viral et la transcription de l'ARNv en ARNm_v peuvent avoir lieu. Alors, la NP encapside les ARNv nouvellement formés qui constituent les nouvelles copies du génome pour la progéniture virale naissante (Lamb et Krug, 2001). Pourtant, l'assemblage de la progéniture virale se produit au niveau de la membrane cytoplasmique, ce qui suppose une exportation de la RNPv à travers les pores nucléaires (Zhang et Lamb, 1996). Encore ici, la protéine M1 est indispensable à l'exportation de la RNPv vers le cytoplasme. En effet, l'exportation échoue en absence de M1, soit dans le cas de virus défectueux (Martin et Helenius, 1991), soit en l'absence d'expression des gènes tardifs (Bui et al., 2000; Martin et Helenius, 1991). De plus, les micro-injections d'Ac anti-M1 bloquent efficacement le processus d'exportation de la RNPv (Martin et Helenius, 1991). En fait, M1 est nécessaire à la libération de la RNPv à la matrice nucléaire qui la retient (Bui et al., 2000; Zhimov et Klenk, 1997). Pourtant, M1 n'accompagne pas la RNPv dans son passage à travers le CRM1 (pore nucléaire, exportine 1 appartenant à la famille des importines β) (Bui et al., 2000; Elton, 2001). L'exportation se déroule en deux étapes: d'abord, la libération de la RNPv de la matrice nucléaire grâce à M1, et ensuite, la migration de la RNPv par le CRM1 grâce au NES de la NP (Elton et al., 2001). Des investigations ont aussi démontré la part active de NS2 dans le cadre du processus d'exportation (O'Neil, Talon et Palese, 1998). Ainsi, il peut exister plusieurs routes d'exportation au RNPv mettant à contribution NS2, M1 et NP (Neumann, Hughes et Kawaoka, 2000).

2.1.3. Régulation par M1 de la transcription de l'ARN viral

La protéine M1 régule la réplication virale par son pouvoir inhibiteur. En effet, on a démontré que M1 interagissait *in vitro* avec la RNPv et entraînait une action inhibitrice au moment de l'ajout de M1 au RNPv (Hankins et al., 1989, 1999; Watanabe et al., 1996).

Cette inhibition semble intervenir surtout à l'étape de l'initiation la transcription de l'ARNv, et ce, plus efficacement qu'à l'étape de l'élongation de la chaîne d'ARN (Hankins et al., 1990). Cette action semble possible par un contact entre M1 et NP (Hankins et al., 1990), et non grâce à la présence d'ARN ou des polymérases (Baudin et al., 2001). L'accumulation de M1 entraîne aussi la suppression de la synthèse des ARNm_v au moment de l'infection tardive (Perez et Donis, 1998; Ye et Wagner, 1992; Zvonarjev et Ghendon, 1980).

2.1.4. Fonctions de la protéine M2

Les protéines M2 forment des canaux ioniques en laissant passer plus spécifiquement les ions H⁺ (Chizhnikov et al., 1996; Mould, Li et Dublak, 2000). Ce sont les pH faibles rencontrés dans l'endosome et le trans-Golgi (Chizhnikov et al., 1996; Pinto, Holsinger et Lamb, 1992) qui activent les fonctions de M2 par la protonation d'un résidu histidine du domaine transmembranaire de M2 (Okada, Mivra et Takeuchi, 2001).

Au stade précoce de l'infection, le virus de l'influenza entre dans les cellules par la voie de l'endocytose. L'acidification de l'endosome qui suit, met en action M2 et induit la décapsidation du virus endocyté. L'activation de M2 par de faibles pH permet l'entrée de protons à l'intérieur du virion; or cette acidification entraîne la dissociation entre M1 et la RNPv (Martin et Helenius, 1991; Bron et al., 1993). Il s'agit d'une étape déterminante pour la pénétration du génome viral (RNPv) dans le noyau.

Au stade tardif de l'infection, plusieurs copies de M2 se sont exprimées sous forme de canaux dans le trans-Golgi. Dans ce cas, M2 libère des protons afin de neutraliser le milieu acide des compartiments vésiculaires (Hay, 1992). La régulation du pH dans les compartiments vésiculaires de l'appareil de Golgi est nécessaire pour la protection des protéines HA transportées par le système vésiculaire de la cellule hôte (Takeuchi et Lamb,

1994). Attendu que les protéines HA peuvent se dénaturer dans un environnement acide, la protéine M2 joue un rôle essentiel à la préservation de la conformation de HA.

2.2. Réponse immunitaire contre M1 et M2

La protéine M1 est en mesure de stimuler une réponse humorale (Cretescu, Beare et Schild, 1978; Potter et al., 1979) et cellulaire (Fleischer, Becht et Rott, 1985). D'ailleurs, l'immunisation génétique par un plasmide codant pour M1 engendre chez les souris une réponse humorale primaire et secondaire contre M1 (Chen et al., 1998). Néanmoins, du fait que M1 se retrouve à l'intérieur du virus, elle ne représente pas une bonne cible pour l'induction d'Ac neutralisants (Askonas, McMichael et Webster, 1982). C'est plutôt la mise en action des cellules T cytotoxiques (CTL) qui génère une protection contre une seconde infection (Reay et al., 1989; Webster et Hinshaw, 1977).

Quant à M2, elle est en mesure d'engendrer une réponse humorale (Black, Rota et Gorodkova, 1993; Treanor et al., 1990), et les Ac produits par suite d'une immunisation protègent les souris d'une infection hétérologue (Slepushkin et al., 1995). En outre, un traitement thérapeutique à l'aide d'Ac monoclonaux contre M2 réduit le titre de virus de l'influenza de 100 à 1 000 fois chez les souris infectées (Mozdzanowska et al., 1999; Treanor et al., 1990). La protéine M2 est aussi en mesure d'engendrer une réponse cellulaire permettant la mise en action des CTL (Slepushkin et al., 1995). Il est important d'ajouter que l'injection du domaine extracellulaire de M2 en l'absence d'autres protéines virales peut réduire l'infection virale chez les souris (Neiryck et al., 1999). C'est pourquoi on a proposé un vaccin universel contre l'influenza A fondé sur le domaine extracellulaire de M2 (Neiryck et al., 1999; Heinen, Boer-Luijtz, Bianchi, 2001). Enfin, la capacité de la protéine M2 de stimuler une réponse cellulaire (Jameson, Cruz et Ennis, 1998) protège les souris contre l'infection (Slepushkin et al., 1995).

Finalement, on a récemment prouvé que l'immunisation génétique avec un vecteur (avec un promoteur du cytomégalovirus) codant pour M1 et M2 protégeait les souris contre une infection létale par le virus de l'influenza, et ce, essentiellement grâce à l'activation des CTL (Okuda et al., 2001).

3. Cycles de réplication du virus influenza A

3.1. L'endocytose du virus

L'internalisation se produit grâce à l'interaction du récepteur sialique avec l'HA qui met en action l'endocytose par un processus tributaire de la dynamine cellulaire (Roy et al., 2000). La dynamine est une GTPase qui engendre la formation des vésicules induite par les clathrines (Schimd, 1997). Durant l'internalisation du virus, une invagination de la membrane plasmique se forme grâce aux clathrines (Marsh et Pelchen-Matthews, 1994), et la dynamine permet la constriction de l'invagination et la libération de la vésicule dans le cytoplasme (Stowell et al., 1999; Sweitzer et Hinshaw, 1998).

3.2. La fusion de la membrane virale avec celle de l'endosome

La fusion se produit dans un environnement acide, un pH équivalent à l'endosome tardif, approximativement pH 5,5 (Stegmann et al., 1987; Yoshimura et Ohnishi, 1984). L'exposition au faible pH entraîne des changements structuraux de la sous-unité HA2 qui s'intercale entre la membrane virale et celle de l'endosome (Bulloug et al., 1994; Skehel et al., 1995).

3.3. La décapsidation et le transport de la RNPv dans le noyau de la cellule hôte

L'acidification de l'endosome permet également l'activation des canaux ioniques (M2) situés à la surface de la membrane virale (Hay, 1992; Pinto, Holsinger et Lamb, 1992). Ainsi, M2 permet de transférer l'environnement acide à l'intérieur du virus (Pinto, Holsinger et Lamb, 1992). L'acidification du virus par M2 modifie les interactions protéine-protéines et permet la libération de la protéine M1 du complexe de la RNPv (Takeuchi et Lamb, 1994). Ainsi, la fusion et l'environnement acide permettent la libération dans le cytoplasme de la RNPv dissociée de M1. C'est la dissociation de M1 et de la RNPv qui permet la pénétration de cette dernière dans le noyau par le complexe des pores nucléaires (Bui, Whittaker et Helenius, 1996; Martin et Helenius, 1991).

3.4. Synthèse des ARN messagers et réplication des ARN viraux

Suite à l'entrée de la RNPv dans le noyau, il y a production d'ARNm viraux (ARNmv) en vue de la traduction protéique et production d'ARN viral (ARNv) grâce aux intermédiaires servant de matrice, les ARN complémentaires (ARNc) (Krug et al., 1989).

3.4.1. Caractéristiques particulières du virus de l'influenza

Contrairement aux autres virus à ARN, la synthèse des ARNm du virus de l'influenza dépend des fonctions nucléaires de la cellule hôte (Lamb et Choppin, 1977; Spooner et Barry, 1977). En effet, la synthèse des ARNm requiert une amorce coiffée et méthylée (m7GpppXm) (Bouloy et al., 1979; Krug et al., 1989; Plotch et al., 1981). Or ce type d'amorce découle de la réaction de l'ARN polymérase II d'ARN nucléaire de l'hôte. C'est PB2, une endonucléase coiffe dépendante, qui clive les ARNm cellulaires coiffés 10 à 13 nucléotides à leur extrémité 5' (Plotch et al., 1981). Après l'ajout du fragment d'ARNm coiffé en 5', provenant de l'hôte, à l'ARNv, l'élongation peut avoir lieu (Bouloy et al., 1979).

3.4.2. Synthèse des ARNm et ARN viraux

Le complexe formé par PB1, PB2 et PA catalyse la synthèse des ARNm en présence d'ARNv (Huang, Palese et Krystal, 1990). Au terme de la transcription, une séquence polyadénylée s'ajoute aux ARNm nouvellement formés à l'extrémité 3' (Robertson, Shubert et Lazzami, 1981).

Pour la synthèse d'ARNv, un autre type de transcription est nécessaire. D'abord, une production initiale de copies d'ARNc (+), les matrices servant à la production ultérieure des ARNv (-), est indispensable. La transcription en ARNc naît en l'absence des amorces (m7GppXm) (Young et Content, 1971) et ne se termine pas par l'ajout d'une séquence de polyadénosine (Hay, Skehel et McCauley, 1982). À partir des ARNc produits plus tôt, la production d'ARNv peut suivre (Krug et al., 1989).

Ces trois types d'ARN viral (ARNmv, ARNv et ARNc) se synthétisent dans le noyau (Shapiro et Krug, 1988; Smith et Hay, 1982), et les ARNm suivront le même processus

que l'ARNm de l'hôte: il y a méthylation des adénosines internes (Narayan et al., 1987), et les segments 7 et 8 subissent un épissage alternatif.

3.5. Assemblage de la progéniture virale

La synthèse des protéines virales se réalise dans le cytoplasme: dix protéines se font alors synthétiser à l'aide de la machinerie cellulaire. Les nucléoprotéines nouvellement synthétisées, les polymérases, NS2, NP et M1, entrent dans le noyau et forment la RNPv en s'associant aux huit segments génomiques (Lamb et Krug, 2001). M1, NP et NS2 assurent l'exportation de la RNPv en mettant en action le pore nucléaire CRM1 (Elton et al., 2001). Les trois protéines membranaires, HA, NA et M2, sont synthétisées par les ribosomes du RE et migrent vers la membrane cellulaire grâce au RE et à l'appareil de Golgi. La protéine M1 assure l'assemblage et le bourgeonnement de la progéniture virale en s'associant aux autres protéines et fournit la force nécessaire au bourgeonnement (Jin et al., 1997; Gómez-Purtas et al., 1999; Gómez-Purtas et al., 2000; Latham et Galarza, 2001).

4. Le virus de l'influenza et le porc

4.1. Généralités

On a remarqué l'influenza porcine pour la première fois en 1918 aux États-Unis, en Hongrie et en Chine (Beveridge, 1977; Chun, 1919; Koen, 1919). Cette première observation coïncide avec la pandémie de 1917-1918, la plus grave de l'époque moderne, qui a causé la mort de 20 millions de personnes (Reid et al., 1999).

En général, une infection par le virus de l'influenza chez le porc cause une maladie respiratoire de courte durée associée à des lésions bénignes et microscopiques typiques de la bronchite nécrotique et de la pneumonie. La maladie est rarement létale, mais produit quand même un impact économique ravageur dans l'industrie porcine (Van Reeth, Nauwynch et Pensaert, 1996).

4.2. Les différents sous-types répertoriés

La grippe porcine s'associe le plus souvent aux virus de type H1N1 (Nerome et al., 1982). En fait, les porcs sont susceptibles d'être infectés par plusieurs variants de sous-types H1N1 d'influenza A, y compris les virus H1N1 de l'influenza porcine classique, les virus H1N1 semblables aux virus isolés de souches aviaires, aussi bien que les virus H1N1 semblables aux souches humaines (Ellis et Zambon, 2001). Il est aussi possible d'isoler chez le porc les sous-types H3N2 et H1N2 (Olsen, 2002). Les variants H3N2 d'influenza humaine peuvent aussi se répliquer chez le porc, et on a détecté les réassortiments entre les virus H1N1 et H3N2 humains, porcins et aviaires chez le porc (Scholtissek, Hinshaw et Olsen, 1998).

4.3. Souches porcines du Québec

D'habitude, en Amérique du Nord, la population porcine subit l'infection de virus de l'influenza A de sous-type H1N1 (Chamber et al., 1991), bien que l'infection avec le sous-type H3N2 soit possible (Schultz et al., 1991). En général, la grippe porcine ne cause pas la mort. Les porcs souffrent alors des symptômes classiques de la grippe: fièvre, anorexie, écoulements nasaux et lacrymaux, toux, et perte de poids (Morin et al., 1981). À la fin des années 80, une augmentation des problèmes respiratoires chroniques dans la population porcine a permis l'isolation d'une nouvelle souche au Québec : SwQc91. Cette dernière s'associe à une pneumonie proliférative nécrotique (Morin et al., 1990; Dea et al., 1992) et à un taux de mortalité élevé chez les porcelets (Arora, N'Diaye et Dea, 1997; Arora et al., 1997; Girard, Morin et Elazhary, 1992).

4.4. Le porc, transmetteur potentiel du virus de l'influenza

Très tôt, les recherches menées sur la grippe porcine ont évoqué la possibilité d'une transmission du virus porcine à l'humain. Par exemple, en 1976, au Fort Dix du New Jersey, un virus de l'influenza H1N1 isolé dans un soldat mort de la grippe était identique aux virus isolés de porcs américains. De plus, les virus isolés de cinq militaires malades étaient identiques aux mêmes virus porcins (Hodder et al., 1977; Top et Russell, 1977). Enfin, les tests sérologiques démontraient que près de 500 personnes du Fort Dix

subissaient ou avaient subi l'infection par ce même virus (Hodder et al., 1977; Top et Russell, 1977).

Plus tard, on a retrouvé des Ac contre les virus porcins H1 chez des gens ayant eu un contact étroit avec les porcs (Schnurrenberger, Wood et Martin, 1970). Une confirmation définitive de la nature zoonotique des virus H1N1 porcins est survenue en 1976. Par suite d'une influenza épizootique, on a isolé les virus porcins et humains et prouvé que les deux virus étaient sérologiquement et génétiquement identiques au virus de l'influenza porcin H1N1 (Hinshaw et al., 1978).

4.5. Le porc, un hôte intermédiaire permettant la formation de virus hybrides

Il est maintenant acquis que le porc est un hôte intermédiaire qui entraîne le réassortiment et l'apparition de nouveaux virus d'influenza A. Cette susceptibilité est due à la présence de deux récepteurs distincts à la surface des cellules épithéliales de la trachée du porc, à savoir, $2,3 \alpha$ et $2,6 \alpha$. Les virus aviaires (Schultz et al., 1991) et humains (Chamber et al., 1991) se lient respectivement aux récepteurs $2,3 \alpha$ et $2,6 \alpha$. L'infection chez tous les porcs touchés par ces deux virus favoriserait la création de réassortants pouvant entraîner une pandémie (Ito et al., 1998).

5. Infections expérimentales chez la souris

Les souris ne contractent pas naturellement l'influenza, mais peuvent être infectées expérimentalement avec les virus de type A et B (Barker et Hoyle, 1972). Par exemple, lorsqu'on instille un inoculum d'environ 1 000 HA d'un virus non adapté chez la souris, une pneumonie toxique apparaît même en absence de réplication virale significative (Barker et Hoyle, 1972). Après un temps d'adaptation, le virus devient pathogène pour la souris (Russell, 1977), qui développe alors des maladies respiratoires comparables à celles qui touchent l'humain (Novak et al., 1993). En outre, les mutations présentes sur les gènes des segments HA, NP, M ou NS peuvent contribuer à la pneumovirulence des souches adaptées chez la souris (Brown, 1990; Brown et al., 2001).

Cela fait de la souris un modèle possible pour étudier la pathogénie, la réponse immunitaire contre le virus de l'influenza (Doherty, 1993), les mécanismes de protection (Novak et al., 1993; Topham et Doherty, 1998) et la virulence (Brown et al., 2001).

6. La réponse immunitaire contre le virus de l'influenza

6.1. La réponse non spécifique

Une série de mécanismes innés et protecteurs empêchent le virus de s'infiltrer dans les cellules. La couche de mucine, l'action ciliaire et les inhibiteurs de protéases font partie des mécanismes innés empêchant l'entrée et la décapsidation du virus de l'influenza. Pourtant, il arrive que le virus franchisse cette barrière et infecte les cellules. D'autres mécanismes innés se mettent alors en marche.

Cette nouvelle ligne de défense se trouvant sous la surface de l'épithélium du tractus respiratoire se compose de macrophages, de leucocytes polymorphonucléaires et de cellules NK (*Natural Killer*) (Sweet et Smith, 1980; Fujisawa et al., 1987). Les polymorphonucléaires phagocytent les virus et limitent leur dispersion au stade initial de l'infection (Fujisawa et al., 1987; Tsuru et al., 1987). Les cellules dendritiques capturent les particules virales et migrent à l'organe lymphoïde secondaire pour stimuler les cellules T naïves (Inaba et al., 1990; Steinman, 1991). Les cellules NK, pour leur part, sécrètent l'INF- γ pour déclencher le chimiotactisme des leucocytes dans le parenchyme pulmonaire (Baumgarth et Kelso, 1996). Les macrophages produisent l'interleukin-1 (IL-1) et le facteur nécrotique tumoral (TNF) (Vacheron et al., 1990). Enfin, les cellules épithéliales infectées sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, dont l'interleukin-6 (IL-6) et l'interféron- γ (IFN- γ) (Hayden et al., 1998). La sécrétion de ces différentes cytokines induit le recrutement des cellules inflammatoires au site de l'infection à partir du compartiment sanguin et active les cellules cytotoxiques de l'immunité spécifique (Vacheron et al., 1990).

6.2. La réponse spécifique

Le deuxième mécanisme de défense est spécifique et comprend la réponse immunitaire humorale (locale et systémique) et la réponse à médiation cellulaire. La

production d'Ac par cellules B (Mozdzanowska et al., 2000) et la réponse des cellules T auxiliaires (Scherle, Palladino et Gehard, 1992) prennent toutes deux une part active dans l'élimination du virus de l'influenza lors d'une infection.

6.2.1. La réponse humorale

Brièvement, la présentation de peptides antigéniques par les cellules présentatrices d'Ag (APC) aux cellules T active les cellules T auxiliaires, ce qui entraîne les cellules B à produire des Ac spécifiques contre l'influenza (Abbas, Lichtman et Pober, 1994). De cette façon, lors d'une infection par le virus de l'influenza A, il y a production d'Ac contre HA, NA, NP et des protéines M (Cretescu, Beare et Schild, 1978; Potter et Oxford, 1979). Les anti-HA et les anti-NA s'associent à la résistance à l'infection chez l'humain et chez les animaux de laboratoire, alors que les Ac contre les protéines internes M1 et NP ne s'y associent pas (Askonas, McMichael et Webster, 1982). Quant aux anti-M2, ils engendrent un effet protecteur contre la grippe (Black, Rota et Gorodkova, 1993; Neiryneck et al., 1999; Trenor et al., 1990).

Les glycoprotéines HA et NA sont les cibles principales de l'immunité spécifique et humorale (Clements et al., 1986; Epstein et al., 1993). Plus en détail, les Ac contre HA inhibent l'infection par neutralisation du virus en l'empêchant de reconnaître les cellules cibles (Virelizier, 1975) alors que les Ac dirigés contre NA inhibent le bourgeonnement des virus (Schulman, Khakpour et Kilbourne, 1968).

La production d'Ac permet également l'opsonisation des particules virales. Les IgG2a liés aux Ag du virus fixent le complément (Neuberger et Rajewsky, 1981) pour induire la liaison entre les récepteurs du macrophage ou les récepteurs des NK avec les fragments Fc des IgG2a (Heusser, Anderson et Grey, 1977; Kipps et al., 1985). Ces liaisons activent l'opsonophagocytose pour le macrophage et l'ADCC (*Antibody-Dependent Mediated Cytotoxicity*) pour les NK (Takai et al., 1994). Le mécanisme d'opsonophagocytose du macrophage joue un rôle vital dans l'élimination du virus de l'influenza durant une infection virale (Huber et al., 2001).

Il est important de mentionner que, bien que la réponse humorale induit une protection contre une deuxième infection d'un virus homologue, elle s'avère inefficace contre un virus sérologiquement distinct.

6.2.2. La réponse à médiation cellulaire

Les cellules T CD8⁺ induisent la cytotoxicité en reconnaissant les peptides antigéniques présentés par le CMH de classe I, tandis que les cellules T CD4⁺, reconnaissent les peptides antigéniques associés au CMH de classe II. Les cellules T cytotoxiques inhibent la réplication virale et facilitent l'élimination de l'infection (McMichael et Gotch, 1989). En outre, des études ont démontré que les CTL jouent un rôle primordial dans l'élimination des virus pour plusieurs maladies (Zinkernagel et al., 1996), dont le virus de l'influenza (Klavinskis, Geckeler et Oldstone, 1989), et les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ contribuent toutes deux à éliminer le virus de l'influenza A (Watabe et al., 2001).

Les CTL CD8⁺ reconnaissent autant les fragments présentés par le CMH I des glycoprotéines de surface que les fragments présentés par le CMH I des protéines non glycosylées tels que M, NP et PB2 (Fleische, Becht et Rott, 1985). Cette reconnaissance entraîne la lyse des cellules cibles infectées (Gould et al., 1987). Quant aux CTL CD4⁺ (ou T auxiliaires), elles ont deux propriétés fonctionnelles : elles stimulent les cellules B à produire des Ac anti-influenza, et elles déclenchent la prolifération CTL CD8⁺ (Lamb, McMichael et Rothbard, 1987). Il est intéressant de noter que les cellules T auxiliaires, reconnaissant spécifiquement M et NP, peuvent stimuler les cellules B sécrétrices des anti-HA (Lamb, McMichael et Rothbard, 1987).

6.2.3. Anticorps neutralisants dans les sécrétions nasales

Des Ac neutralisants, les IgA contre HA et NA, se retrouvent dans les sécrétions nasales (Artenstein et al., 1964; Couch et Kasel, 1983); leur production locale (Rossen et al., 1970) contribue à éliminer l'infection dans le tractus respiratoire (Mazenac, Huang et Pimplikar, 1996; Reid et al., 1999). On peut détecter les IgA anti-HA lors d'une première et d'une deuxième infection (Murphy et Clements, 1989).

7. Les vaccins contre le virus de l'influenza

7.1. Les vaccins commerciaux

À l'heure actuelle, la vaccination s'avère un moyen efficace et économique pour contrôler une infection par le virus de l'influenza (Kandel et Hartshorn, 2001). D'ailleurs, il existe chez l'humain et le porc deux principaux vaccins: les vaccins inactivés et sous-unitaires (Olsen, 2000).

7.1.1. Les vaccins inactivés

Ce type de vaccin sert contre les virus de l'influenza porcins (Brown et al., 1994; Olsen, 2000) et humains (Couch, 1989; Kandel et Hartshorn, 2001). Les composants viraux du vaccin proviennent de virus cultivés dans le liquide allantoïdien d'œufs embryonnaires, purifiés, concentrés et inactivés (Clements, 1992). L'inactivation s'effectue avec de la formaline ou du β -propiolactone; le virus est alors entier ou encore inactivé par un traitement chimique. Évidemment, ce type de vaccination parentérale confère au porc une résistance à la maladie et diminue l'extension de l'infection (Edwards et al., 1994; Olsen, 2000); pourtant, il ne prévient pas la maladie de façon uniforme (Brown et al., 1994). D'autre part, on augmente expérimentalement l'efficacité des vaccins inactivés chez le porc en l'administrant par la voie i.n., ce qui permet la production d'Ac dans les sécrétions nasales du porc (Lim et al., 2001).

7.1.2. Les vaccins sous-unitaires

Les vaccins sous-unitaires se composent d'un ou plusieurs antigènes purs ou semi-purs, et en général, nous les préférons aux vaccins inactivés, car ils sont plus sécuritaires (Babiuk, 1999). Dans le cas de l'influenza, nous utilisons les protéines HA et NA, les antigènes majeurs du virus (Potter et Oxford, 1979). Elles se purifient alors à partir du virus et sont utilisées afin d'éviter la réversibilité du virus à la virulence. Il devient donc possible d'induire une bonne réponse humorale si nous administrons les deux glycoprotéines du virus en présence d'adjuvant (Boyce et al., 1999; Tamizifar et al., 1995). En fait, les glycoprotéines administrées sans adjuvant sont peu immunogéniques (Frank et al., 1981).

7.2. Les vaccins expérimentaux

7.2.1. Virus atténués

On produit les vaccins atténués en sélectionnant des mutants non-virulents ne causant pas d'infection (Babiuk, 1999). D'autre part, la grande réversibilité vers la virulence des virus adaptés présente des obstacles à leur utilisation (Murphy, Nelson et Wright, 1982). L'intérêt de taille de leur administration vient de ce qu'ils stimulent l'immunité à médiation cellulaire et humorale (Belshe, Gruber et Mendelmar, 2000; Gorse et al., 1997). De plus, injecté par voie i.n., les virus atténués stimulent l'immunité de la voie respiratoire, procurant une meilleure résistance contre la plupart des pathogènes respiratoires (Boyce, Gruber et Coleman-Dockery, 2000). En fait, l'administration i.n. d'un virus atténué de l'influenza s'avère une méthode efficace pour induire une immunité protectrice de longue durée en activant la sécrétion des Ac IgA, la réponse humorale et la réponse cellulaire (Clements et al., 1986).

7.2.2. Peptides synthétiques

La production d'ADN recombinant peut servir à synthétiser des antigènes de l'influenza dans les systèmes eucaryotes ou procaryotes (Davis et al., 1983). Dans ce cas, le défi consiste à purifier une protéine antigénique pouvant stimuler une réponse humorale et cellulaire, ce qui suppose une bonne connaissance des épitopes (Lerner, 1983). En outre, les peptides synthétiques sont peu immunogéniques, et pour être efficaces, ils requièrent un adjuvant puissant (Clements, 1992; Levi et al., 1995).

7.2.3. Vaccin à ADN

L'immunisation génétique consiste en l'injection d'un plasmide, codant pour un peptide antigénique, que les cellules prendront en charge afin de le traduire en protéine et d'induire une réponse immunitaire (Davis et al., 1994; Liu, 1998). Il s'agit de la plus récente et la plus importante technologie de vaccinologie. En raison de ces nombreux avantages, on considère cette immunisation comme un vaccin de troisième génération (Mor, 1998; Whalen, 1996).

On avait compris depuis longtemps les fondements de la transfection *in vitro*, mais on a démontré seulement en 1990 que les cellules animales pouvaient aussi intégrer les plasmides codant pour un Ag (antigène) et exprimer l'Ag *in vivo* (Wolff et al., 1990). Il était alors logique de penser que l'expression du gène étranger *in vivo* entraînerait l'activation d'une réponse immunitaire contre la protéine produite par le gène. Cette nouvelle technologie emballante s'est développée très rapidement, les publications sur le sujet ont proliféré, et on a intégré plusieurs gènes de différents pathogènes dans les plasmides sous le contrôle d'un promoteur afin de mettre à l'essai leur pouvoir immunogène. Cela a été le cas de gènes d'une grande variété d'éléments, y compris les virus, les bactéries et les parasites (Anderson et al., 1996; Davis, Michel et Whalen, 1993; Donnelly, Ulmer et Liu, 1993; Fynan et al., 1993; Hoffman, Sedegah et Hedstrom, 1994). D'ordinaire, les promoteurs les plus utilisés sont ceux du cytomégalovirus (CMV) ou ceux du virus du sarcome de Rous que l'on retrouve sur les plasmides commerciaux (Ertl et Xiang, 1996; Norman et al., 1997).

La description de théorie concernant l'immunisation génétique sera plus détaillée dans la section 8.

8. L'immunisation génétique

8.1. Mécanisme

Le promoteur et l'ADNc, du plasmide injecté, permet la synthèse de l'ARNm de l'Ag et induit la production de protéine antigénique dans les cellules transfectées. Bien qu'il ne soit possible de quantifier les protéines produites *in vivo*, il suffit d'une petite quantité de protéines pour créer une réponse immunitaire cellulaire et humorale chez plusieurs espèces animales (Cox, Zamb et Babiuk, 1993; Yokonama, Zhang et Whitton, 1995).

Dans le cas de l'immunisation épidermique, le plasmide injecté codant pour un Ag transfecte directement une petite quantité de cellules présentatrices d'antigène (APC) (Cohen, Boyer et Weiner, 1998). Ces cellules expriment à leur surface une grande quantité de molécules de CMH I et II aussi bien que les molécules de co-stimulation comme B7.1 et B7.2. De cette façon, les APC transfectées expriment par le CMH I et II

les peptides antigéniques et migrent aux tissus lymphoïdes pour activer les cellules T CD4+, T CD8+ et B (Pardoll et Beckerleg, 1995).

Ce mécanisme est concevable pour l'immunisation épidermique, car la peau contient une quantité considérable de cellules de Langerhans; mais dans le cas de l'immunisation i.m., d'autres processus expliquent l'activation des cellules immunitaires. Une hypothèse propose que les Ag, produits par les myocytes transfectées, sont transférés aux APC qui ont infiltré le muscle à la suite de l'inflammation déclenchée par l'immunisation (Fu et al., 1997). Le transfert peut se générer grâce à deux événements: l'apoptose des cellules transfectées, ou la sécrétion de la protéine Ag par les cellules transfectées (Whitton et al., 1999).

8.2. Voies d'immunisation

La réponse immunitaire engendrée à la suite de l'administration d'un même plasmide recombinant peut varier selon la méthode et le site d'immunisation (Cohen, Boyer et Weiner, 1998). Les cibles les plus classiques sont le muscle et la peau (Leitner, Ying et Restifo, 2000). On a évalué d'autres sites potentiels, entre autres la surface de la muqueuse nasale, la voie intra-veineuse et la voie sous-cutanée (Fynan et al., 1993). En général, ces différentes voies sont capables d'induire une réponse immune pour l'Ag donné (Fynan et al., 1993). Il existe aussi deux méthodes d'injection: par une aiguille, ou à l'aide d'un pistolet à gènes (*gene gun*). Le procédé du pistolet à gènes consiste à projeter l'ADN associé à des billes d'or directement dans les cellules. Cette technique permet de diminuer la quantité d'ADN injecté en augmentant l'efficacité de l'immunisation (Gregersen, 2001).

L'injection i.m. à l'aide d'une aiguille est une méthode simple et aussi la plus courante. La grande quantité d'ADN administré habituellement par la voie i.m. (200 µg) dirige une réponse de type Th1, alors que l'immunisation i.m. ou i.d. avec le pistolet à gènes requiert une très petite quantité d'ADN (1 µg) et induit une réponse de type Th2 (Leitner, Ying et Restifo, 2000).

8.3. Avantages de l'immunisation génétique

D'abord, la réponse immunitaire induite, humorale et cellulaire, engage tant le CMH I que le CMH-II (Gregersen, 2001; Haynes et al., 1996), et ce, sans l'injection d'un organisme entier (Wang et al., 1998). Donc l'immunisation génétique offre la plupart des avantages des vaccins à base de virus, mais sans leurs risques associés (Babiuk, 1999). En outre, l'administration de protéines recombinantes comme vaccin ou l'utilisation de vaccins sous-unitaires engage seulement une réponse humorale et ne favorise pas une bonne réponse cytotoxique (York et Rock, 1996). Pourtant, la prévention d'infection et la guérison d'une maladie requièrent l'activation d'une réponse immunitaire cellulaire et humorale (Babiuk, 1999).

De plus, la protéine s'exprime *de novo* dans les cellules; ainsi, elle subit toutes les modifications post-traductionnelles rencontrées lors d'une véritable infection, ce qui est nécessaire pour l'induction d'une réponse immunitaire neutralisante (M^cDonnell et Askari, 1996; Donnelly, Ulmer et Liu, 1996). Les protéines recombinantes ne subissent pas les mêmes modifications post-traductionnelles, et la réponse immunitaire n'est donc pas optimale (Montgomery et al., 1997).

En plus d'être sécuritaire et peu coûteuse, la production de plasmide codant pour une protéine s'avère un produit stable qu'on peut lyophiliser aux fins d'entreposage (Justewick et Webster, 1996; Robinson et al., 1996; Manickan, Karem et Rouse, 1997).

Enfin, ce type d'immunisation a souvent prouvé expérimentalement son efficacité à protéger contre plusieurs maladies chez plusieurs espèces d'animaux (Olsen, 2000).

En somme, l'approche est sécuritaire bien qu'elle mime une infection. Toutefois, on doit absolument s'assurer que le plasmide ne s'intègre pas dans le génome des cellules hôtes, ce qui pourrait entraîner des altérations chromosomiques ou une réorganisation chromosomique, une activation d'oncogène ou l'inactivation de gène de suppression de tumeur (Schubbert et al., 1997). Mais il faut savoir que l'intégration est un phénomène relativement rare, et qu'on peut en amoindrir le risque en développant un plasmide n'ayant que peu ou pas d'homologie avec la séquence de l'hôte (Babiuk, 1999).

8.4. Augmenter l'efficacité de l'immunisation génétique

8.4.1. Co-administration d'un plasmide codant pour des cytokines

Les cytokines sont des molécules sécrétées par des cellules immunitaires qui créent une réponse spécifique des cellules exprimant un récepteur particulier de cytokine (Cohen, Boyer et Weiner, 1998). En général, les cytokines jouent un rôle d'importance dans la régulation et le développement de la réponse immunitaire. Les cytokines Th1 déclenchent la réponse à médiation cellulaire (Arai et al., 1990; Morgan, Ruscetti et Gallo, 1976), tandis que les cytokines Th2 régulent la réponse humorale (Seder et Paul, 1994). Plusieurs études ont aussi démontré que l'injection intramusculaire de plasmides codant pour une cytokine entraînait *in vivo* l'action biologique de cette dernière (Kim et al., 1998). Ainsi, la co-injection de plasmide codant pour une cytokine produit un effet sur la réponse immunitaire dirigée contre la protéine Ag codée par un autre plasmide (Flo, Tisminetzky et Baralle, 2000).

8.4.2. Co-administration d'un plasmide codant par molécules de co-stimulation

Afin de mettre les cellules T en action, les APC envoient deux signaux aux cellules T: l'un provenant du CMH ou du peptide antigénique au récepteur T, et l'autre provenant d'une molécule de co-stimulation, B7 (Caux et al., 1994; Engel et al., 1994). Les protéines B7, B7.1 et B7.2 s'expriment à la surface des APC et sur d'autres tissus, après une exposition aux cytokines inflammatoires (Mendoza, Cantwell et Kipps, 1997). Les deux se lient à CD28, exprimé constitutivement sur les cellules T, ou à CTLA-4, exprimé sur les cellules T mises en action pour promouvoir l'activation des cellules T (June et al., 1994). L'utilisation de B7.1 pour l'immunisation génétique intensifie considérablement l'effet protecteur de l'immunisation en rehaussant la capacité de présenter l'Ag des cellules transfectées (Iwasaki et al., 1997; Kim et al., 1997; Flo, Tisminetzky et Baralle, 2000).

8.4.3. Les motifs CpG

Les séquences palindromiques non méthylées contenant un motif CpG sont en mesure d'activer l'immunité innée en mettant en action les monocytes, les cellules NK et les cellules dendritiques, et dirigent la réponse immunitaire de type Th1 (Krieg, 1996). Les

motifs CpG sont de puissants adjuvants non toxiques dont nous pouvons comparer l'action à l'adjuvant de Freud complet (Weiner et al., 1997).

Dans le cas de l'immunisation génétique, les motifs CpG peuvent faire l'objet soit d'une co-administration avec un plasmide codant pour un Ag sous forme d'oligonucléotide, soit d'une greffe sur le plasmide à injecter (Leitne, Ying et Restifo, 2000).

8.5. Immunisation génétique anti-influenza

Plusieurs études portant sur l'immunisation génétique contre le virus de l'influenza ont démontré qu'il est possible de produire des Ac anti-influenza et d'induire une immunité cellulaire cytotoxique menant à une protection contre une infection du virus de l'influenza chez la souris (Chen et al., 1998; Chen et al., 1999; Fomsgaard et al., 2000; Fu et al., 1999; Okuda et al., 2001; Ulmer et al., 1993; Ulmer et al., 1998) et le furet (Donnelly et al., 1995; Donnelly et al., 1997a). Jusqu'à présent, on a prouvé que les gènes NP, HA, NA et M peuvent engendrer une réponse immunitaire protectrice.

L'immunisation par un plasmide codant pour HA et NA induit une forte réponse cellulaire chez les souris et les protège d'une infection malgré le bas niveau d'Ac produit (Chen et al., 1999; Chen et al., 2000; Johnson et al., 2000; Kadowaki et al., 2000; Kodihalli et al., 1997; Pertmer et al., 2000; Wong et al., 2001). On peut injecter les plasmides codant pour HA et NA à l'aide d'une aiguille ou du pistolet à gènes (*gene gun*) pour instaurer une protection (Fynan et al., 1993). En outre, en ciblant la muqueuse nasale comme site d'immunisation, on augmente la protection engendrée par l'administration d'un plasmide codant pour HA par induction de la sécrétion des IgA (Sha, Vincent et Compans, 1994). Bien que l'immunisation génétique de plasmide codant pour HA et NA soit efficace dans le cas d'une infection homologue, les mutations que subissent régulièrement ces Ag limitent la génération d'une protection contre un virus hétérologue (Both et al., 1983). L'utilisation de gènes plus conservés en immunisation génétique anti-influenza, comme les gènes codant pour NP (Donnelly et al., 1997b; Pertmer et al., 2000; Ulmer et al., 1993; Ulmer et al., 1998) ou pour les protéines M, aboutit à une protection hétérologue chez les souris (Ulmer et al., 1993; Okuda et al., 2001). Dans ce cas, c'est la capacité de générer une réponse cellulaire, et plus particulièrement la mise en action des CTL, qui entraîne la protection et non l'induction d'Ac (Ulmer et al., 1993; Okuda et al., 2001).

9. Objectifs de l'investigation

L'immunisation génétique par l'ADN plasmidique codant pour les protéines M est une voie possible pour l'induction d'une protection hétérologue contre le virus de l'influenza A par la stimulation de la réponse humorale et cellulaire. Ainsi, nous avons voulu déterminer si l'injection i.m. de ce plasmide recombinant favorise une réponse immunitaire créant une protection chez les souris. Pour ce faire, tout d'abord, nous avons construit le vecteur pRc/CMV2/M. Nous avons immunisé les souris Balb/C avec la construction pRc/CMV2/M. Ensuite, nous avons surveillé la réponse humorale pour confirmer la stimulation de la réponse immunitaire. Enfin, nous avons voulu déterminer la protection à l'aide d'un défi létal.

III MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Le virus SwQc91

1.1. Souche virale

La souche de type A (H1N1), A/Sw/Québec/5393/91, (SwQc91) du laboratoire du feu professeur Serge Dea, qui était associé au centre de recherche de virologie INRS-IAF, a servi à l'investigation. Cette dernière a été isolée dans des porcelets et porcs dont les poumons présentaient des lésions spécifiques d'une pneumonie proliférative et nécrosante (Dea et al., 1992a).

1.2. Culture de la souche virale dans les œufs embryonnaires

Nous avons cultivé la souche virale dans des œufs embryonnaires de poule de 11 jours. Pour ce faire, nous avons injecté un inoculum de la souche, dilué à deux unités hémagglutinantes par millilitre (UHA/ml) dans un volume final de 0,2 ml complété d'un tampon PBS (Annexe 1, section 1), dans des œufs par la voie chorio-allantoïque à l'aide d'une seringue de 3 centimètres cubes munie d'une aiguille 23G (Fisher, Montréal [Québec], Canada) dans des conditions stériles. Ensuite, nous avons incubé les œufs à 33°C pendant 48 heures en atmosphère humide et les avons transférés à 4°C pendant 18 heures. Enfin, nous avons récolté le liquide allantoïde en conditions stériles et évalué le titre HA.

1.3. Production et purification de la souche virale

La démarche servant à purifier les virus cultivés dans le liquide allantoïde est celle qu'ont mise au point Arora et al. (1985).

1.3.1. Étapes de concentration

D'abord, nous avons préparé un gradient discontinu de saccharose. Pour ce faire, nous avons initialement placé 1,0 ml d'une solution de saccharose, ultra pure 50 % poids/poids (p/p) (*Canadian Scientific Products*, London [Ontario], Canada) dans du PBS, dans un tube de polyallomère de 37,5 ml (Beckman, Mississauga [Ontario], Canada) pour

la congeler dans de l'azote liquide. Puis, nous avons ajouté au tube 2,0 ml d'une solution de saccharose 22 % (p/p) et recongelé le tout.

Nous avons ensuite filtré le liquide allantoïde à l'aide de fibres de verre (*Pyrex Fiber Glass*, Corning, New York, É.-U.) et déposé un volume d'environ 30 ml du liquide allantoïde sur le gradient discontinu de saccharose. Nous avons bouché les tubes et les avons placés dans le rotor 50.2 Ti (Beckman) et centrifugés à 100 000 x *g* pendant 60 minutes à 4°C. Le liquide allantoïde a alors été aspiré en ne laissant qu'un volume approximatif de 2,0 ml au-dessus du gradient de saccharose. Nous avons repris cette opération jusqu'à l'épuisement du liquide allantoïde et groupé les fractions contenant les virus dans un erlenmeyer.

1.3.2. Étapes de purification

Nous avons soniqué les fractions contenant les virus 3 fois 10 secondes à 4°C, à une intensité de 30 Megahertz (MHz) (*Sonic Dismembrator*, Fisher Scientific, Farmingdale, New York, USA). Par la suite, nous avons centrifugé ce mélange à 10 000 x *g* pendant 15 minutes à 4°C. Nous avons récupéré le surnageant, rectifié la concentration en saccharose du surnageant à 50 % (p/p), et recentrifugé ce dernier à 100 000 x *g* pendant 90 minutes à 4°C. De cette façon, les impuretés forment un culot et les particules virales se retrouvent dans le surnageant. Nous avons rectifié la concentration en saccharose de du surnageant à 26 % (p/p) avec du PBS et recentrifugé 100 000 x *g* pendant 90 minutes à 4°C. Ainsi, on retrouve les particules virales dans le culot qui est resuspendu dans du PBS. Enfin, nous avons évalué l'activité HA, la concentration protéique et le degré de pureté de l'échantillon.

1.4. Titrage de l'activité hémagglutinante

Dans ce but, nous avons déposé un volume de 0,05 ml de PBS dans tous les puits d'une plaque de 96 puits à fond rond Libro/titertek (*ICN Biomedicals*, Aurora, Ohio, USA), sauf ceux de la première rangée dans lesquels nous avons déposé 0,1 ml de chaque suspension virale. Puis, nous avons effectué des dilutions en série logarithmique en base deux et ajouté un volume de 0,05 ml d'érythrocytes de coq (0,5 % dans du PBS) fraîchement préparés dans tous les puits. Après une période d'incubation de 45 minutes à

la température de pièce (T.P.), le titre HA a fait l'objet d'une évaluation selon l'inverse de la plus haute dilution de la suspension virale causant 100 % d'hémagglutination.

1.5. Détermination de la concentration protéique

Nous avons déterminé la concentration du virus purifié selon la trousse *BCA Protein Assay Kit* (*Pierce Chemical Company*, Rockford, Illinois). Ensuite, nous avons ajouté un volume de réactif A (Annexe 1, section 4.1) à un volume de sulfate de cuivre 4 % p/v (50 : 1) suivant le protocole du fabricant (*BDH Chemicals*, Toronto [Ontario], Canada). Puis, nous avons aussi ajouté 1 ml de virus purifié à doser, dilué dans de l'eau distillée. À la suite d'une incubation à 60°C, nous avons mesuré la densité optique (D.O.) de l'échantillon à 562 nm, et ensuite déterminé la concentration en protéine à l'aide d'une courbe étalon établie au préalable avec des concentrations connues d'albumine sérique de bovin (BSA; RIA Grade, Sigma, Anachemia, Montréal [Québec], Canada).

1.6. Analyse de la pureté du virus purifié

Nous avons évalué la pureté de la suspension virale sur gel d'électrophorèse de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) à l'aide du système électrophorétique *Mini-Protean® II Dual Slab Electrophoresis* (Bio-Rad). Selon les directives du fabricant, nous avons d'abord fait couler un gel de séparation entre deux plaques de verre séparées par un écartement de 1 mm (millimètre). Ce gel se compose de 12 % de polyacrylamide (Bio-Rad) et de 0,1 % de SDS (Bio-Rad) dans du tampon 0,375 molaire (M) de Tris-HCl (Sigma) pH 8,8 (Annexe 1, section 5.6). Une fois le gel solidifié, nous avons inséré un peigne de 10 puits entre les deux plaques et avons pu épandre le gel de tassement. Le gel de tassement se composait de 4 % de polyacrylamide et de 0,1 % de SDS dans du tampon 0,125 M Tris-HCl pH 6,8 (Annexe 1, section 5.6). Une fois le gel de tassement solidifié, nous avons retiré le peigne et ajouté du tampon d'électrophorèse (Annexe 1, section 5.8) dans le réservoir. Ensuite, nous avons fait bouillir les échantillons de virus purifié (20 µg) 5 minutes avant de les déposer dans les puits du gel de tassement à l'aide d'un embout Prot-Elec (Bio-Rad). Enfin, nous avons appliqué une tension de 200 V afin de réaliser la migration électrophorétique à la T.P.

1.7. Adaptation au virus de l'influenza porcine SwQc91 chez les souris CD-1

1.7.1. Les passages chez les souris CD-1

Afin d'adapter la souche porcine SwQc91 aux souris et de rendre son administration létale, nous avons réalisé plusieurs passages successifs chez celles-ci. Tout d'abord, nous avons anesthésié deux souris CD-1 (Charles River) à l'isoflurane. Juste au moment où elles étaient complètement endormies, nous leur avons instillé d'un seul coup 50 microlitres (μ l) du liquide allantoïde infecté par SwQc91(1024 UHA/ml). Une fois ces souris infectées, nous les avons remises en cage pendant 72 heures et sacrifiées afin d'en récupérer les poumons infectés. Ensuite, nous avons homogénéisé ces deux poumons par sonication (*Sonic Dismembrator*, Fisher) 3 fois 20 secondes à 4°C à 40 MHz dans 1 ml de PBS. De la même manière, nous avons instillé l'homogénat dans deux autres souris pour un nouveau passage. Les passages se sont succédés jusqu'à ce que la souche cause la mort des souris.

1.7.2. Passage et culture de la souche adaptée dans le liquide allantoïde d'œuf embryonnaire

Après 15 passages chez les souris CD-1, la souche adaptée a été multipliée dans les œufs embryonnaires (section 1.2). En résumé, nous avons inoculé 50 μ l de l'homogénat de poumons (passage 15) (volume complété à 200 μ l avec du PBS) dans du liquide allantoïde d'œuf embryonnaire de 11 jours. Puis, nous avons incubé les œufs à 33°C pendant 48 heures, et à 4°C pendant 18 heures. Ensuite, nous avons récolté le liquide allantoïde et évalué le titre HA par la technique décrite au point 1.4. Nous avons répété les passages dans les œufs jusqu'à enregistrer un titre HA relativement élevé.

1.7.3. Détermination du LD50 chez les souris Balb/C

Le protocole décrit par Wyde et al. (1977) et retenu pour calculer la dose létale tuant 50 % de souris (LD50) est celui de Kärber. Dans ce but, nous avons préparé 4 dilutions logarithmiques de la souche virulente (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000) et les avons instillées respectivement à 4 groupes de 4 souris Balb/C (Charles River). Ensuite, nous avons administré 50 μ l d'une dilution (selon le groupe) par instillation. Puis, les souris sont

demeurées sous observation pendant 10 jours afin que nous dénombrions la mortalité selon la dilution pour l'obtention d'une proportion de mortalité. Enfin, nous avons déterminé le LD50 selon les proportions de mortalité dénombrées pour chaque groupe à l'aide d'une formule mathématique (Annexe 2, section 5).

2. Extraction de l'acide ribonucléique viral (ARNv) de la souche SwQc91

L'extraction de l'ARN viral s'est faite à l'aide de la technique utilisant le TRIzol (*Life Technologies, Maryland, USA*) fondé sur le procédé d'extraction au guanidium thiocyanate (Chomczynski et Sacchi, 1987). Nous avons préalablement traité tout le matériel servant à l'extraction avec une solution inhibitrice de l'activité des ribonucléases composée de 0,1 % de diéthylpyrocarbonate (DEPC) (Sigma). Suivant le protocole du fabricant, nous avons centrifugé 3 ml de liquide allantoïde ayant un titre HA de 1 024 HA/ml à 100 000 x g pendant 60 minutes à 4°C. Nous avons par la suite resuspendu le culot dans 1 ml de TRIzol, puis l'avons incubé pendant 5 minutes à la T.P. Ensuite, nous avons ajouté 0,266 ml de chloroforme (Sigma) au mélange. Après une agitation vigoureuse de 15 secondes à l'aide du vortex, et une incubation de 10 minutes à la T.P., nous avons centrifugé le mélange à 10 000 x g pendant 15 minutes à 4°C. Ainsi, il est possible de distinguer deux phases, soit l'une organique de couleur rose, et l'autre aqueuse incolore contenant l'ARN. Nous avons alors transféré la phase aqueuse dans un nouveau tube avec 0,75 ml d'alcool isopropylique. Après une incubation de 10 minutes à la T.P., nous avons centrifugé l'échantillon à 10 000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Une fois le culot lavé avec 0,133 ml d'éthanol à 75 %, nous avons centrifugé l'échantillon à 10 000 x g. Nous avons asséché le culot pendant 15 minutes et fait dissoudre l'ARN dans de l'eau traitée au DEPC contenant de RNAsine (inhibiteur des ribonucléase) (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suisse). Enfin, nous avons déterminé la concentration et la pureté de l'ARN par spectrométrie (Annexe 2, sections 1 et 3).

3. Synthèse et amplification du gène codant pour la protéine de la matrice

3.1. Amorce oligonucléotidique

Le service de synthèse des oligonucléotides de l'INRS-Institut Armand-Frappier a synthétisé les amorces nécessaires pour les réactions d'amplification. Pour la réaction de transcription inverse (RT), l'amorce anti-sens M/R 979-999 (5'-GTC ACG GGG CCC GCT CTA TGT TGA CAA AAT GAC-3') a été synthétisée. Les nucléotides 979 à 999 de l'amorce sont complémentaires à l'inverse de l'extrémité 3' du gène M (GenBank N° AF188004). Nous avons d'abord ajouté à cette séquence complémentaire un site de restriction de l'endonucléase Apa I (5'-GGG CCC-3') afin de cloner l'insert dans le vecteur pRc/CMV2, puis la séquence 5'-GTC ACG-3' pour que la quantité de G et C représente environ 50 % de la composition de l'amorce. Pour la réaction d'amplification en chaîne (PCR), l'amorce sens M/F 23-43 (5'-GTA GGC AAG CTT AAG ATG GGT CTT CTA ACC GAG-3') a été synthétisée. Les nucléotides 23 à 43 de l'amorce M/F sont complémentaires à l'extrémité 5' du gène M, sauf le nucléotide 29 (G au lieu d'A) que nous avons inséré pour compléter la séquence kozak (ANNATGG) nécessaire à l'expression eucaryote. Nous avons d'abord ajouté à cette séquence complémentaire un site de restriction de l'endonucléase Hind III (5'-AAG CTT-3') puis la séquence 5'-GTA GGC-3' afin d'optimiser l'hybridation de l'amorce.

3.2. Réaction de transcription inverse

L'ARN génomique du segment 7 s'est fait transcrire en ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARNv isolé (section 2). À cette fin, nous avons incubé un mélange contenant 3 µg d'ARN en présence de 1 µl de RNAsine et de 1 µl de l'amorce M/R (50 pmol/µl) (979-999) dans un volume final de 12 µl à 70°C pendant 15 minutes. Afin de dénaturer les brins d'ARN nous avons sur-le-champ fait refroidir le mélange en l'incubant dans la glace durant 15 minutes. Puis, nous avons ajouté 7 µl d'un mélange contenant 4 µl du tampon 5X (250 millimoles [mM] Tris-HCl pH 8,3, 375 mM de KCl, 15 mM de MgCl₂ (Gibco BRL), 2 µl de 0,1 M de dithithréitol (Gibco BRL) et 1 µl de 10 mM d'un mélange des 4 désoxynucléotides triphosphates (Gibco BRL) aux brins d'ARN dénaturés. Alors, nous

avons incubé l'échantillon à 42°C pendant 2 minutes avant l'ajout de 1 µl de l'enzyme Superscript II (200 U) (Gibco BRL). Enfin, nous avons incubé le mélange 50 minutes à 42°C et 15 minutes à 70°C afin d'inactiver l'enzyme.

3.3. Amplification par PCR de l'ADNc de la protéine de la matrice

Nous avons ajouté un mélange de 100 µl composé de 10 µl de tampon PCR 10X (Gibco BRL), 3 µl de MgCl₂, 2 µl de 10 mM des 4 désoxynucléotides triphosphates, 2,5 µl de chaque amorce M/F (26-43) et M/R (979-999), 2 µl de l'ADNc produit par RT et 0,5 µl de l'enzyme Taq polymérase (5U/ml) (Gibco BRL) à un tube contenant 77,5 µl d'eau distillée. Nous avons ensuite ajouté 100 µl d'huile minérale légère (Sigma) au volume réactionnel. Puis, nous avons inséré les échantillons dans un thermocycleur (miniCycler, Perkins) où ils ont subi 35 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation à 95°C pendant 45 secondes, une étape d'hybridation à 55°C pendant 1 minute, une extension à 72°C pendant 1 minute, et une extension finale à 72°C pendant 10 minutes.

Enfin, nous avons visualisé les produits de RT/PCR après migration sur un gel d'agarose 0,8 % (p/v) dans du tampon TAE 1X. Dans un puits du gel, nous avons mélangé un volume de 10 µl du produit de RT/PCR avec 2 µl de tampon de chargement 6X, et dans un autre, nous avons ajouté un marqueur (1 kilobase [kb] *DNA Ladder*) (Gibco BRL) afin d'estimer la longueur des bandes obtenues. Après une migration à 90 V, nous avons immergé le gel dans une solution de bromure d'éthidium 0,5 µg/ml (Annexe 1, section 6.5) afin de permettre la visualisation des bandes d'intérêt à la lumière ultraviolet (UV).

4. Clonage du gène de la matrice

4.1. Purification des produits d'amplification

Nous avons purifié les produits d'amplification à l'aide de la trousse *GeneClean kit* (Bio 101, Vista, Californie, É.-U.). En résumé, nous avons déposé un volume de 30 µl du produit d'amplification dilué dans 6 µl de tampon de chargement 6X dans un puits d'un gel d'agarose 0.8 % (p/v) dans le TEA en vue d'une migration à 90 V pendant 40 minutes.

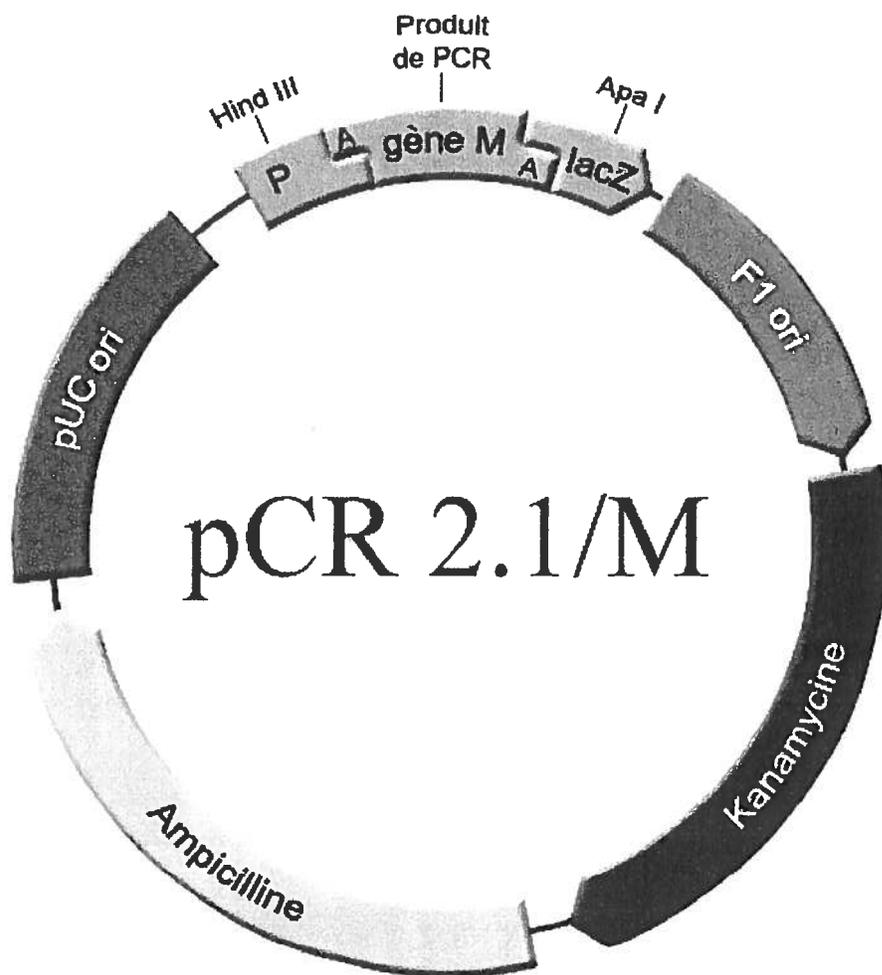
Puis, nous avons fait tremper le gel d'agarose dans une solution de bromure d'éthidium pendant 60 minutes, et l'avons rincé pendant 15 minutes à l'eau distillée. Nous avons ensuite excisé le fragment de l'ADNc du gène de la matrice à l'aide d'un scalpel et de la lumière UV, puis l'avons transféré dans un tube eppendorf (1,5 ml) pré-pesé. Alors, nous avons ajouté trois volumes d'une solution d'iodure de sodium à l'échantillon, que nous avons ensuite incubé à 55°C jusqu'à dissolution complète de l'agarose. Avant d'ajouter 5 μ l de billes de silice (Glassmilk), la mixture a été vortexée pendant 1 minute et laissé à T.P. 5 minutes en mélangeant la silice chaque minute en vortexant, puis avons centrifugé à nouveau l'échantillon à 10 000 x g pendant 10 secondes. Après décantation, nous avons lavé les billes avec 0,3 ml d'une solution de lavage (New Wash), et centrifugé à nouveau le tube à 10 000 x g pendant 10 secondes. Nous avons ensuite effectué deux autres lavages de la même façon. Par la suite, nous avons pu éluer l'ADNc en resuspendant les billes de silice dans 5 μ l d'eau distillée à 55°C et en incubant le tube durant 3 minutes à 55°C. Nous avons alors centrifugé le tube à 10 000 x g pendant 10 secondes, et transféré le surnageant contenant l'ADN dans un autre tube. Enfin, nous avons élué l'ADNc une deuxième fois avec 5 μ l d'eau à 55°C.

4.2. Clonage du gène de la matrice

Dans un premier temps, le clonage des produits d'amplification purifiés a eu lieu dans le vecteur pCR2.1 (Invitrogen, CO, San Diego, Calif.) (Figure 3). Ce vecteur présente aux extrémités 5' des bases thymine libres, ce qui facilite le clonage puisque les produits d'amplification contiennent une adénosine supplémentaire à l'extrémité 3' ajoutés par l'ADN Taq polymérase lors de la réaction de PCR. Le protocole que nous avons appliqué pour la réaction de ligation est celui que conseille le fabricant. Dans un tube contenant 13 nanogrammes (ng) de l'ADNc purifié, nous avons ajouté un mélange de 50 ng du vecteur pCR2.1, 1 μ l de tampon de ligation 10X (60 mM de Tris-HCl pH 7,5, 60 mM de $MgCl_2$, 50 mM de NaCl, 1 mg/ml de BSA, 70 mM de β -mercaptoéthanol, 1 mM d'adénosine triphosphate, 20 mM de DDT et 10 mM de spermidine), 1 μ l (8U Weiss) de l'enzyme ADN ligase du phage T4, et complété le volume à 10 μ l avec de l'eau distillée. Ensuite, nous avons incubé l'échantillon pendant 16 heures à 14°C pour activer la réaction et l'avons conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

Figure 3: Clonage du gène M de la souche influenza SwQc91 dans le vecteur pCR2.1

Le gène M a été cloné dans le vecteur pCR2.1 de 3,9 kb. Ce dernier contient plusieurs sites de reconnaissance pour diverses endonucléases dont Hind III et Apa I, un promoteur *P*_{lac} et des gènes de résistance à l'ampicilline et à la kanamycine pour la sélection des plasmides recombinants. En plus, il possède l'origine ColE1 pour la réplication et l'origine f1 de la transcription. La figure a été construite d'après la représentation schématique de la compagnie Invitrogen.



4.3. Transformation dans les bactéries compétentes Inv α F.

Nous avons réalisé la transformation au moyen de bactéries compétentes *d'E. coli* (*Inv α F One shot™*, Invitrogen, San Diego, Calif.) selon le protocole du fabricant. Pour ce faire, nous avons ajouté 2 μ l de 0,5 M de β -mercaptoéthanol et 2 μ l du produit de ligation (pCR2.1/M) dans un tube contenant 50 μ l de bactéries. Nous avons alors incubé ce mélange sur la glace pendant 30 minutes, puis l'avons transféré dans un bain-marie à 42°C pendant 30 secondes et rapidement remis sur la glace pendant 2 minutes (choc thermique). Après la transformation, nous avons ajouté 0,45 ml de milieu SOC au mélange que nous avons ensuite incubé à l'horizontale à 37°C, sous agitation constante à raison de 250 tr/min pendant 90 minutes. Ensuite, nous avons étalé 100 μ l de produit de transformation sur des boîtes pétries contenant 20 ml de milieu LB (Luria-Bertani) (Annexe 1, section 8.1) auquel on avait ajouté 1,5 % (p/v) d'agar noble (Difco), 100 μ g/ml d'ampicilline (Sigma), et 40 μ l de X-Gal 40mg/ml (Gibco BRL).

4.4. Criblage des colonies possédant le plasmide et l'insert

4.4.1. Purification de l'ADN plasmidique pCR2.1/M

Nous avons sélectionné six colonies blanches ayant résisté à l'ampicilline pour les cultiver dans 2 ml de milieu LB à 37°C, sous agitation constante à raison de 250 tr/min pendant 18 heures. Nous avons suivi le protocole *Boiling Miniprep* décrit dans *Short Protocols in Molecular Biology* (1992) pour isoler l'ADN plasmidique. En résumé, nous avons centrifugé chaque suspension bactérienne à 10 000 x *g* pendant 3 minutes et resuspendu le culot de chacune dans 0,3 ml de milieu STET (0,5 % (v/v) Triton X-100 (Sigma) 50 mM EDTA pH 8,0, 50 mM Tris-HCl pH 7,5). Nous avons alors ajouté 20 μ l de lysozyme (10 mg/ml dans 50 mM Tris-HCl pH 8,3) avec 3 μ l de RNase (1 mg/ml dans de l'eau stérile) (Annexe 1, section 7.4) aux échantillons. Nous avons incubé ce mélange 5 minutes à la T.P., l'avons bouilli pendant 2 minutes dans un bain-marie, puis centrifugé pendant 5 minutes à 10 000 x *g*. Nous avons alors retiré le culot à l'aide d'un cure-dent, et fait précipiter l'ADN contenu dans le sumageant avec de l'isopropanol 75 %/2,5 M

d'acétate d'ammonium. Ensuite, nous avons récupéré le précipité d'ADN plasmidique à l'aide d'une centrifugation à 10 000 x g pendant 5 minutes à la T.P., l'avons lavé avec de l'éthanol 70 % froid (-20°C) et recentrifugé à 10 000 x g pendant 5 minutes à la T.P. Puis, nous avons aspiré l'éthanol et fait évaporer l'excédent en plaçant le tube sous la hotte chimique pendant 15 minutes. Enfin, nous avons resuspendu le culot dans 50 µl d'eau distillée.

4.4.2. Digestion de l'ADN plasmidique par Hind III et Apa I

Afin de vérifier la présence de l'insert M, nous avons fait digérer l'ADN plasmidique purifié avec les enzymes de restriction Hind III et Apa I. Pour réaliser ce but, nous avons ajouté 1 µl de tampon réactif 4 10X (Gibco BRL), 1 µl Hind III (Gibco, BRL), 1 µl Apa I (Gibco BRL) et 2 µl d'eau distillée à 5 µl d'ADN plasmidique purifié. Ensuite, nous avons incubé ce mélange à 30°C pendant 60 minutes, puis à 37°C pendant 60 minutes. Pour cribler les colonies positives, 5 µl des produits de digestion ont subi une migration électrophorétique à 90 V pendant 40 minutes. Enfin, nous avons conservé le reste de l'échantillon à 4°C en prévision de l'expérience suivante.

5. Sous-clonage du gène de la protéine de la matrice dans le vecteur eucaryotique pRc/CMV2 (Invitrogen)

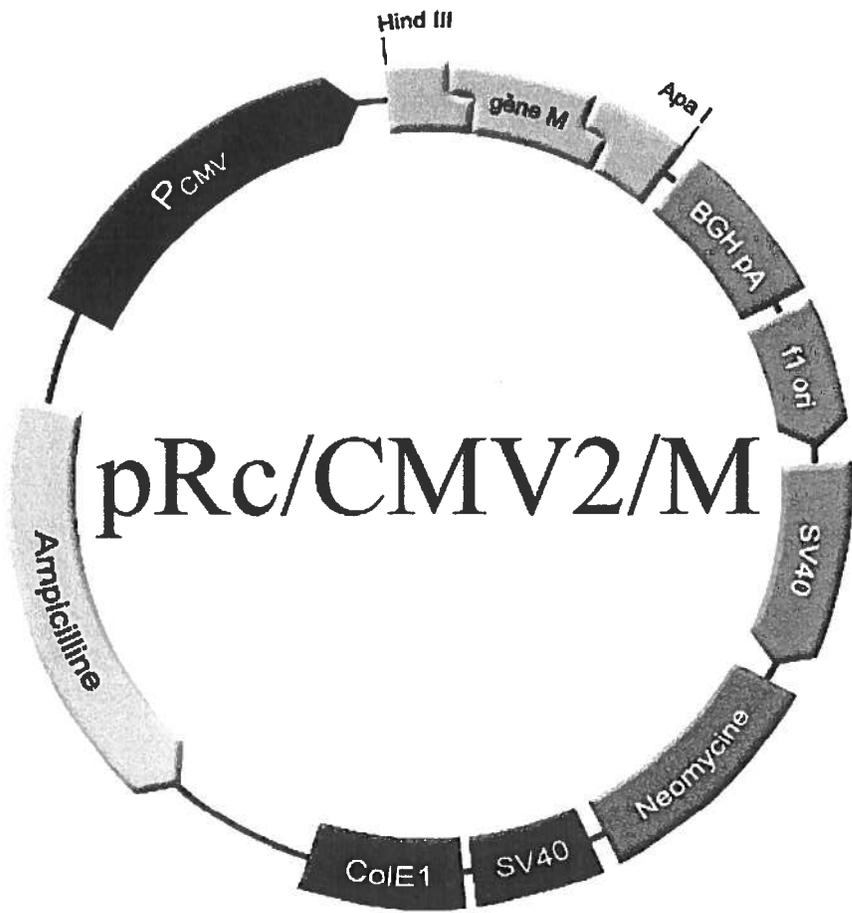
L'insert M obtenu au point 4.3.2 par la digestion d'Apa I et de Hind III de l'ADN plasmidique pCR2.1/M a subi le sous-clonage dans le vecteur d'expression eucaryotique pRc/CMV2 (Invitrogen) (Figure 4).

5.1. Digestion du vecteur

Les enzymes de restriction Hind III et Apa I (Gibco BRL) ont digéré le vecteur pRc/CMV2. Dans ce but, nous avons ajouté 16 µl de pRc/CMV2 à 2 µl de tampon réactif 4 avec 1 µl de chaque enzyme de restriction, et avons incubé le mélange pendant 60 minutes à 30°C, puis 60 minutes à 37°C.

Figure 4 : Sous-clonage du gène M de la souche influenza SwQc91 dans le vecteur d'expression eucaryote pRc/CMV2

Le gène M a été isolé par digestion (Hind III et Apa I) du plasmide recombinant pCR2.1/M pour être sous-cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pRc/CMV2 de 5,5 kb. Le vecteur pRc/CMV2 se compose du promoteur du gène précoce immédiat du cytomégalovirus (CMV), d'un site de clonage multiple dont Hind III et Apa I, d'une séquence de polyadénylation et d'un signal déterminant la fin de la transcription du gène de l'hormone de croissance bovine (BGHpA). Le plasmide contient également les éléments lui permettant la réplication épisomique et son maintien dans les cellules exprimant l'antigène T du SV40 grâce à l'origine du SV40 qu'il contient. De plus, il exprime le gène de la résistance à l'ampicilline et possède l'origine de réplication ColE1 pour le maintien et la sélection dans les cellules d'*E.coli*. Les caractéristiques du catalogue du fabricant Invitrogen.



5.2. Purification de l'insert et du vecteur

Nous avons soumis les deux produits issus de la digestion par les enzymes de restriction (sections 4.3.2 et 5.1) aux mêmes conditions électrophorétiques décrites à la section 4.1. Puis, après avoir coloré au bromure d'éthidium les fragments de gel correspondant à l'insert M et aux plasmides pRc/CMV2 linéarisés, nous avons excisé les fragments de gel et purifié l'ADN à l'aide de la trousse *GeneClean* selon le protocole du fabricant.

5.3. Clonage du fragment M dans le vecteur pRc/CMV2

Le protocole de ligation suivi est celui que propose le fabricant. Pour ce faire, nous avons ajouté 1 μ l de T4 ligase (Invitrogen), 1 μ l du vecteur pRc/CMV2 linéarisé (60 ng) et 0,8 μ l de l'insert M à 1 μ l de tampon de ligation dans 6,2 μ l d'eau distillée. Ensuite, nous avons incubé le mélange réactionnel à 14°C pendant 18 heures.

5.4. Transformation des bactéries *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen)

La description du protocole suivi figure dans la section 4.3.

5.5. Criblage des colonies recombinantes pRc/CMV2/M

5.5.1. Purification de l'ADN plasmidique cloné dans les bactéries TOP10

Parmi les colonies obtenues, nous en avons sélectionné et cultivé 9 à 37°C dans 2 ml de milieu de culture LB avec de l'antibiotique, sous agitation constante pendant 18 heures. Puis, nous avons purifié l'ADN plasmidique de ces 9 colonies afin d'identifier les colonies recombinantes. Le tout s'est fait selon le protocole de la section 4.4.1.

5.5.2. Digestion de l'ADN plasmidique purifié

Afin de cribler les colonies recombinantes, les enzymes de restriction Apa I et Hind III ont digéré l'ADN plasmidique purifié des 9 colonies sélectionnées. Puis, les produits de

digestion ont subi une migration électrophorétique comme nous l'avons établi à la section 4.4.2.

5.5.3. Séquençage

Afin de confirmer le clonage correct de l'insert (dans le bon sens), nous avons purifié l'ADN plasmidique de la colonie positive C1.6 positive aux fins de séquençage.

5.5.3.1. Purification de l'ADN plasmidique

Dans ce cas, nous avons purifié l'ADN plasmidique de la colonie C1.6 par lyse alcaline à l'aide de la trousse *Wizard™ Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega, Madison, Wisconsin, É.-U.) selon le protocole du fabricant avec quelques modifications. Pour ce faire, nous avons mis la colonie positive en culture dans 10 ml de milieu de culture LB en présence de 100 µg/ml d'ampicilline pour multiplication pendant 18 heures sous agitation constante à 37°C. La suspension bactérienne a été transférée dans des tubes eppendorf de 1,5 ml, jusqu'à épuisement du 10 ml, puis centrifugée pendant 2 minutes à 10 000 x g. Nous avons alors resuspendu les culots bactériens formés dans 0,4 ml de tampon de resuspension (Promega) (50 mM Tris HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 100 mg/ml RNase). Puis, nous avons ajouté 0,4 ml d'une solution de lyse (Promega) (0,2 M NaOH, SDS 1 % [p/v]), et mélangé le tube par inversion jusqu'à rendre le mélange clair. Aussitôt, nous avons ajouté 0,4 ml de solution de neutralisation (Promega) (1,32M d'acétate de potassium pH 5,1), l'avons mélangée par inversion, puis centrifugée pendant 5 minutes à 10 000 x g à T.P. Nous avons donc transféré le surnageant, d'environ 1,2 ml, dans un tube de 10 ml auquel nous avons ajouté au préalable 1 ml de résine (Promega). Après avoir mélangé 2 fois, nous avons transféré le contenu des tubes dans une seringue de 3 ml (Fisher) à laquelle nous avons attaché une mini-colonne de silice (Promega). Le piston permet de faire passer le liquide dans la mini-colonne dans lequel l'ADN reste accroché. Par la suite, la mini-colonne a subi deux lavages avec la solution de lavage (Promega; 80 mM d'acétate de potassium 40 mM d'EDTA, 8,3 mM de Tris-HCl pH 7,5, 55 % [v/v] d'éthanol). Pour ce faire, nous avons placé la mini-colonne sur un tube eppendorf de 1,5 ml, puis l'avons centrifugée durant 2 minutes à 10 000 x g à T.P. Ensuite, nous avons ajouté un volume de 50 µl d'eau distillée chauffée à 55°C dans la mini-colonne afin d'éluer l'ADN plasmidique par centrifugation, 30 secondes à 10 000 x g.

Enfin, l'ADN plasmidique a subi une analyse sur gel d'agarose de 0,8 % suivie d'une quantification à 260 nm.

5.5.3.2. Séquençage

Le service de séquençage de l'IAF a séquencé l'ADN plasmidique purifié à l'aide d'un séquenceur automatique *ABI PRISM 310 Genetic Analyser* (Perkin Elmer) selon la méthode de Sanger et collaborateurs (1977). Cette technique se fonde sur l'ajout de didésoxynucléotides 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 pRc/CMV2, l'amorce anti-sens M13 (5'-CAG GAA ACA GCT ATGA-3') et l'amorce interne anti-sens 721-742 (5'-GGC CTG TAA ATT TTC AAG AAG A-3') ont servi au séquençage.

6. Évaluation de l'expression des protéines M

Afin de vérifier l'expression du gène M, nous avons opéré une transfection transitoire dans des cellules eucaryotes, et l'immunoempreinte a permis l'évaluation de l'expression.

6.1. Culture des cellules Cos-7

Nous avons suivi les recommandations d'ATCC (#CRL-1651). En résumé, nous avons cultivé les cellules dans 90 % de milieu *MEM Dulbecco's* (Gibco BRL) auquel nous avons ajouté au préalable 10 % de sérum de bovins (Gibco BRL) dans des flacons (F75) à 37°C en atmosphère humide avec 5 % de CO₂. De plus, nous avons divisé les cultures confluentes tous les 2 à 3 jours en milieu stérile en divisant la culture de 1 : 3. Pour ce faire, à chaque nouvelle culture, on retire le milieu, on lave trois fois avec du PBS, puis on ajoute un mélange de trypsine (0,25 % trypsine, 0,03 % EDTA) (Gibco BRL). On replace le flacon à 37°C jusqu'à ce que les cellules se détachent (15 minutes). Enfin, on aspire les cellules afin de les disperser dans des nouveaux flacons en présence de milieu neuf. Alors, on replace les cellules dans l'incubateur.

6.2. Transfection transitoire de pRc/CMV2/M dans les cellules eucaryotiques Cos-7

Le protocole suggéré par le fabricant (PolyFect ®Transfection Qiagen) a servi pour la transfection transitoire. Explicitement, une journée avant la transfection, nous avons mis les cellules Cos-7 en suspension avec la solution trypsine-EDTA (Gibco BRL), et 4×10^5 cellules/puits en culture à 37°C en atmosphère humide avec 5 % de CO₂ dans un plateau de 6 puits (*Dynalox Labware*). Avant la transfection, les cellules étaient confluentes à environ 60 %. Juste avant la transfection, nous avons préparé les tubes réactionnels. Pour chaque tube, nous avons dilué 1,5 µg de l'ADN plasmidique pRc/CMV2/M (purifié à l'aide des colonnes de Qiagen et dans du tampon TE pH 7) (0,1 µg/µl) dans 100 µl de milieu de culture (sans ajout de sérum). Nous avons ensuite ajouté 10 µl du réactif PolyFect (Qiagen), puis l'avons mélangé par va-et-vient 5 fois à l'aide d'une pipette automatique p200. Nous avons alors incubé les échantillons pendant 8 minutes à la T.P. Pendant ce temps, nous avons retiré de l'incubateur le plateau contenant les cellules Cos-7 en croissance, et aspiré le milieu de culture de chaque puits en environnement stérile. Avant d'ajouter aux puits 1,5 ml de milieu frais contenant du FBS, nous avons rincé ces derniers une fois avec du PBS stérile.

Une fois l'incubation des tubes réactionnels terminée, nous avons ajouté 0,6 ml de milieu de culture (contenant le sérum) à chaque échantillon, et avons mélangé par va-et-vient à l'aide d'une pipette automatique p200.

Il est important de noter qu'un témoin positif a servi à confirmer l'entrée de l'ADN dans les cellules. Dans ce but, nous avons traité l'ADN plasmidique pRc/CMV2/GFP (codant pour une protéine fluorescente) comme les autres échantillons. D'habitude, l'expression de la GFP était maximale de 24 à 48 heures après la transfection.

6.3. Lyse des cellules Cos-7 transfectées

À la suite d'une incubation du plateau cellulaire à 37°C variant entre 24 et 48 heures, nous avons lysé les cellules. Pour ce faire, le milieu de culture de chaque puits a subi une aspiration et deux lavages au PBS. Par la suite, nous avons ajouté 200 µl de tampon

réducteur et dénaturant 2X. Nous avons alors gratté, aspiré et déposé les lysats dans des tubes eppendorf distincts et identifiés. Ensuite, nous avons placé les échantillons dans un bain-marie à 100°C pendant 10 minutes et les avons soniqués à 10 MHz 3 fois 10 secondes sur la glace.

6.4. Transfert électrophorétique

Afin d'évaluer l'expression de la construction pRc/CMV2/M , nous avons déposé les échantillons dans des puits de gel de polyacrylamide de 12 % dans le but d'effectuer ultérieurement une immunoempreinte. Dans le puits 1 du gel, nous avons déposé 4 µl d'un marqueur de masses moléculaires (*Bio-Rad low range*). Les conditions électrophorétiques appliquées sont les mêmes que décrites la section 1.6, mais le gel n'a pas subi de coloration.

Une fois l'électrophorèse terminée, nous avons placé le gel dans 30 ml de tampon de transfert à 4°C. Pendant ce temps, nous avons découpé un morceau de la membrane de polyvinylidène (PVDF) *Immobilon* (Millipore, Bedford, Mass., É.-U.), l'avons activé dans environ 10 ml de méthanol 100 % pendant 10 secondes, et aussitôt posé dans 10 ml d'eau distillée pendant 10 secondes. Enfin, nous avons équilibré la membrane pendant 10 minutes dans du tampon de transfert, et avons pu assembler le système de transfert électrophorétique *MINI Trans-Blot Electrophoretic transfer Cell* (Bio-Rad). Pour ce faire, nous avons étalé le gel sur trois papiers filtres 3M, eux-mêmes étalés sur un coussinet de fibre. Nous avons alors étendu sur le gel, dans cet ordre, la membrane de PVDF, trois papiers filtres et le coussinet de fibre. Puis, nous avons rangé le tout entre deux plaques de plastique pour le caser verticalement dans la cellule de transfert électrophorétique selon l'orientation suivante: gel orienté vers la cathode (-), membrane orientée vers l'anode (+). Nous avons ensuite appliqué une tension de 40 V pendant 18 heures à 4°C. Afin de s'assurer que le transfert a eu lieu, nous avons découpé la fraction correspondant au puits 1 de la membrane (masses moléculaires), puis l'avons colorée au rouge ponçeau.

6.5. Pré-adsorption des sérums polyclonaux anti-SwQc91 de porc

Le sérum anti-SwQc91, nous a été gracieusement donné par le feu professeur Serge Dea qui était associé au centre de recherche de virologie de l'INRS-IAF. Le sérum a été

obtenu à partir de porcs infectés par le virus influenza SwQc91. Le sérum a subi une pré-adsorption afin de diminuer le bruit de fond associé aux sérums polyclonaux de l'immunoempreinte (section suivante). Dans ce but, nous avons rempli quatre tubes de 1,5 ml de milieu LB contenant des bactéries (préalablement cultivées pendant 18 heures à 37°C). Nous avons alors centrifugé les quatre tubes à 10 000 x g pendant 2 minutes et resuspendu les culots dans 0,3 ml de PBS. Ensuite, nous avons soniqué chaque échantillon deux fois à 30 MHz pendant 10 secondes.

Nous avons ajouté 0,1 ml de sérum polyclonal dans un premier tube et l'avons incubé durant 60 minutes à T.P. sous agitation constante. Nous avons centrifugé le mélange à 10 000 x g pendant 3 minutes, et ajouté le sumageant à un nouveau tube de bactéries. Nous avons repris cette étape trois autres fois.

6.6. Immunobuvardage

Une fois le transfert terminé, nous avons saturé la membrane d'une solution de blocage (Annexe 1, section 9.5) durant deux heures à la T.P. sous agitation constante. Ensuite, nous avons retiré la solution de blocage pour la remplacer par la solution de dilution contenant le sérum polyclonal pré-absorbé dilué à 1 : 500. Nous avons alors fait tremper la membrane de la sorte pendant une heure à T.P. sous agitation constante, et l'avons lavée trois fois avec une solution de lavage (Annexe 1, section 9.4) pendant 15 minutes, et deux fois avec du TBS durant 10 minutes. Nous avons alors fait tremper la membrane pendant 45 minutes avec un Ac secondaire (anti-IgG de porc conjugué à la peroxydase) (ICN) dilué à 1 : 1000 avec la solution de dilution. Enfin, après les différentes étapes de lavage, nous avons incubé la membrane dans la solution de révélation jusqu'à l'apparition des bandes (15 minutes).

7. Production des plasmides pour l'immunisation en gigapréparation

Nous avons effectué la purification de l'ADN plasmidique à l'aide de la trousse *Qiagen Giga* suivant le protocole du fabricant. En résumé, pour chaque ADN à purifier, nous avons inoculé une colonie positive dans 5 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline. Ces bactéries ont pu proliférer pendant 8 heures à 37°C sous agitation constante. Nous avons alors inoculé 100 µl de ces cultures dans 2,5 l (litre) de milieu LB comportant de

l'ampicilline. La prolifération bactérienne s'est produite à 37°C sous agitation constante pendant 18 heures. Après cet intervalle, nous avons centrifugé le tout à 6 000 tr/min pendant 15 minutes à l'aide du rotor Beckman JA-14. Nous avons alors resuspendu les culots bactériens dans 125 ml de tampon P1 et ajouté le tampon P2 (tampon de lyse). Nous avons mélangé l'ensemble par inversion six fois et l'avons incubé à la T.P. pendant cinq minutes. Ensuite, nous avons ajouté le tampon de neutralisation (tampon P3) et l'avons immédiatement mélangé par inversion six fois. Puis, nous avons incubé le tout dans la glace pendant 30 minutes. À ce moment se forme un précipité blanc contenant l'ADN génomique, les protéines et autres débris cellulaires. Afin d'éliminer ce précipité, nous avons centrifugé le mélange à 11 500 tr/min à l'aide du rotor JA-14. Au même instant, nous avons équilibré la colonne de résine (Qiagen 10000) avec 75 ml de la solution QBT. Une fois la colonne prête, nous avons ajouté le surnageant à la colonne. La force de la gravité suffit à laisser passer le surnageant tandis que l'ADN plasmidique interagit avec la résine de la colonne. Nous avons alors versé 600 ml de tampon de lavage (solution QC) à la colonne, et élué l'ADN plasmidique par l'ajout de 75 ml du tampon QF. Par la suite, nous avons ajouté 52,5 ml d'isopropanol au mélange contenant l'ADN plasmidique. Nous avons séparé ce mélange dans quatre tubes de centrifugation de polycarbonate pour les centrifuger pendant 30 minutes à 4°C et à 13 000 tr/min à l'aide du rotor JA-17. Ensuite, nous avons lavé les culots d'ADN avec 3 ml d'éthanol 70 % et les avons recentrifugés à 13 000 tr/min à 4°C pendant 10 minutes. Ensuite, nous avons asséché les culots pendant 15 minutes sous la hotte chimique. Enfin, nous avons resuspendu les culots dans du PBS.

Nous avons évalué la pureté des différentes préparations sur gel d'agarose ainsi que leur qualité et leur quantité grâce aux absorbances à 260 nm et 280 nm (Annexe 2, section 2).

De cette façon, nous avons pu purifier l'ADN plasmidique des colonies suivantes :

- celle de la colonie C1.6, contenant le vecteur recombinant pRc/CMV2/M;
- celle d'une colonie contenant le vecteur pRc/CMV2;
- celle d'une colonie contenant le vecteur pcDNA3;
- celle d'une colonie contenant le vecteur pcDNA3/IL-2 (voir section 8 pour provenance)

8. Plasmide codant pour l'interleukine-2 murine pour l'immunisation

La construction pcDNA3/IL-2 contenant le cadre de lecture ouvert de l'IL-2 murine a été fabriquée par le laboratoire du Dr. H. Ertl de l'Institut Wistar de Philadelphie. Le plasmide pcDNA3/IL-2 nous a été gracieusement fourni par le laboratoire du Dr. A. Merzouki. L'intégrité de la construction a été testée et confirmée par le séquençage effectué lors de l'étude de Ligondé (2000) (membre de l'équipe de Dr. A. Merzouki). Cette dernière étude a démontré une augmentation de la réponse humorale chez les souris suite à l'administration d'un plasmide codant pour la gp51 du virus de la leucose bovine avec pcDNA3/IL-2 (Ligondé, 2000).

Nous avons produit en gigapréparation le plasmide pcDNA3/IL-2 pour l'immunisation tel qu'indiqué précédemment dans la section 7.

9. Protocole d'immunisation

9.1. Les animaux

Nous avons immunisé des souris femelles Balb/C âgées de 5 à 6 semaines (Charles River Laboratories, Saint-Constant, Québec, Ca) par la voie i.m. Pour ce faire, nous avons formé 6 groupes de 3 souris:

- le groupe 1 a subi l'immunisation aux plasmides recombinants pRc/CMV2/M et pcDNA3/IL-2;
- le groupe 2 a subi l'immunisation au plasmide recombinant pRc/CMV2/M;
- le groupe 3 a subi l'immunisation au plasmide recombinant pRc/CMV2/M et au plasmide pcDNA3;
- le groupe 4 (témoin négatif) a subi l'immunisation aux plasmides pcDNA3/IL-2 et pRc/CMV2;
- le groupe 5 (témoin négatif) a reçu du PBS;
- le groupe 6 a subi l'immunisation au virus SwQc91 purifié (témoin positif).

9.2. Calendrier d'injections

L'immunisation s'est effectuée par injection au quadriceps des pattes postérieures à l'aide d'une aiguille 27G. La quantité d'ADN injecté par muscle est de 120 µg dans un volume de 50 µl de PBS par muscle. Les quantités d'ADN injectés ont été déterminées grâce à l'absorbance prise à 260 nm (Annexe 2, section 2). Plus précisément :

- le groupe 1 a subi l'immunisation avec un mélange de 200 µg de pRc/CMV2/M et de 40 µg de pcDNA3/IL-2 dans 100 µl de PBS;
- le groupe 2 a subi l'immunisation avec 200 µg de pRc/CMV2/M dans 100 µl de PBS;
- le groupe 3 a subi l'immunisation avec 200 µg de pRc/CMV2/M et 40 µg de pcDNA3 dans 100 µl de PBS;
- le groupe 4 a subi l'immunisation avec 200 µg de pRc/CMV2 et 40 µg de pcDNA3/IL-2 dans 100 µl de PBS;
- le groupe 5 a subi l'immunisation avec 100 µl de PBS;
- le groupe 6 a subi l'immunisation avec le virus SwQc91 purifié dans 100 µl de PBS.

Chaque souris a reçu l'immunisation à 3 reprises à 3 semaines d'intervalle (semaines 0, 3, et 6). Les prélèvements sanguins aux semaines 0, 2, 5, 8, 11 se sont effectués par la veine rétro orbitale.

10. Recherche des anticorps

Selon la technique d'ELISA décrite dans *Antibodies* (1988), nous avons recouvert le fond des plateaux d'ELISA Titertek®/Linbro (Flow, Mississauga, Ontario, Calif.) de 50 µl de virus SwQc91 purifié (10 µg/ml) dilués dans du tampon dilution (Annexe 1, section 10.5). Après une incubation à 4°C pendant 18 heures, nous avons lavé les plateaux deux fois avec la solution de lavage (Annexe 1, section 10.3) et bloqué les sites libres par l'ajout dans chaque puits de 300 µl d'une solution de blocage composée de 2 % de BSA (Annexe 1, section 10.4). Nous avons alors incubé les plaques à la T.P. pendant 2 heures et les avons lavées à 3 reprises avec la solution de lavage. Les 3 sérums de chaque

groupe ont été mélangés également. Par la suite, nous avons réparti les sérums de chaque groupe et les avons dilués dans un volume final de 50 μ l de la solution de dilution (Annexe 1, section 10) dans les plateaux en laissant une rangée libre. Dans les rangées libres de chaque plateau, nous avons ajouté 50 μ l de la solution de dilution. Après une incubation d'une heure, nous avons lavé les puits des plateaux à 5 reprises avec la solution de lavage afin d'éliminer le surplus d'Ac qui ne se serait pas lié aux antigènes. Ensuite, nous avons ajouté dans tous les puits 50 μ l d'un Ac secondaire de chèvre anti-IgG de souris (H+L) conjugué à la peroxydase diluée 1/4000, avec la solution de dilution. Après une incubation d'une heure, nous avons lavé les puits à 5 reprises avec la solution de lavage. Enfin, nous avons ajouté 100 μ l d'une solution de révélation fraîche (Annexe 1, section 10.6) dans tous les puits et incubé les plateaux à la noirceur pendant 15 minutes à la T.P. Ensuite, nous avons arrêté la réaction colorimétrique par l'ajout de 100 μ l d'acide chlorhydrique 1N (normal) et mesuré l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre (Titertek, Multiskan, Flow) à 492 nm.

Pour déterminer les titres Ac de chaque groupe et pour les semaines 0, 2, 5, 8 et 11, nous avons dilué les sérums en série logarithmique de base 2 à partir de 1:10 en duplicata et déterminé une D.O. seuil (Annexe 2, section 4).

11. Défi létal

11.1. Immunisation

Le même calendrier et les mêmes groupes déterminés à la section 8 ont servi pour l'immunisation des souris. Néanmoins, nous avons dans ce cas utilisé 10 souris par groupe.

11.2. Titre anticorps

Nous avons déterminé les titres Ac 3 souris par groupe uniquement pour les semaines 0 et 8 de 3 souris par groupe afin de vérifier la conformité de l'immunisation aux résultats précédents. Dans ce but, nous avons utilisé la technique ELISA avec comme Ag le virus SwQc91 tel que décrite dans la section 9.

11.3. Défi létal

Deux semaines après la dernière immunisation (la semaine 8), les souris ont reçu par la voie i.n. 5LD50 de la souche SwQc91 adaptée (Annexe 1, section 1.7). Ensuite, nous avons gardé les souris sous observation pendant une dizaine de jours afin de quantifier le nombre de survivantes dans chaque groupe.

IV RÉSULTATS

1. Purification du virus

Des œufs embryonnaires de 11 jours ont été infectés par la souche SwQc91 permettant l'obtention d'environ 1.2 litre (l) de liquide allantoïde infecté ayant un titre HA de 512/HA. À partir de ce liquide, nous avons concentré et purifié la souche virale SwQc91 pour obtenir une activité HA spécifique de 2×10^5 UHA/mg. Nous avons évalué la pureté à l'aide d'un gel d'électrophorèse, illustré à la figure 5, en conditions réductrice et non réductrice. Le profil de la figure 5 révèle plusieurs bandes de protéines colorées au bleu de Coomassie. D'abord, en condition non réductrice, le profil (Figure 5, puits 2) nous permet de distinguer la forme dimérique (environ 130 kDa) et la forme monomérique (66 kDa) de protéine HA, la forme oligomérique (122 kDa) de la protéine NA, la protéine NP (56 kDa) et la protéine M1(28 kDa). En condition réductrice (puits 3), le profil est différent. Dans ce cas, à 56 kDa, nous visualisons une bande correspondant à la protéine NP, à 28 kDa, nous retrouvons la bande représentative de M1, et enfin à 26 kDa, la sous-unité HA2.

2. Passage du virus de l'influenza

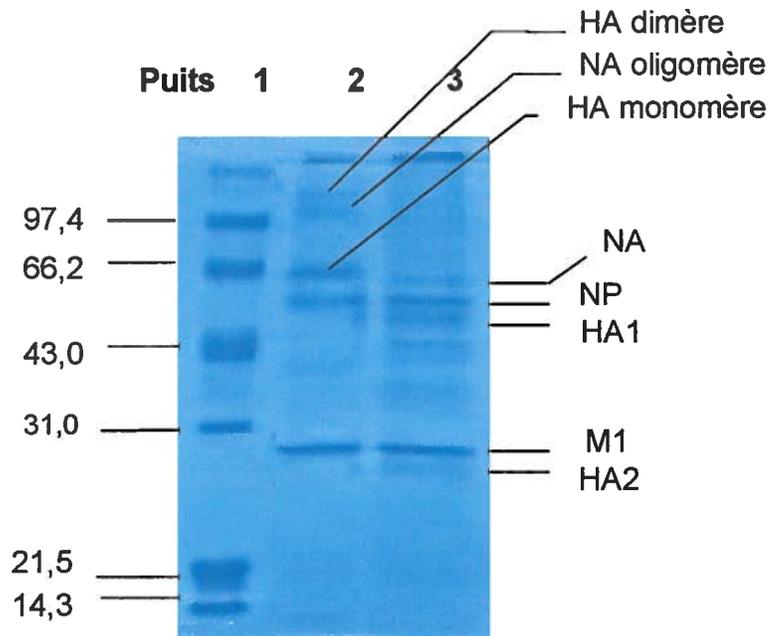
Afin de vérifier l'efficacité de l'immunisation chez les souris, il importait de disposer d'une souche virulente. Pour ce faire, nous avons effectué plusieurs passages successifs jusqu'à ce que l'instillation cause la mort des souris CD-1. Deux souris CD1 sont mortes au 15^e passage de la souche SwQc91. Nous avons alors prélevé et homogénéisé leurs poumons dans 1 ml de PBS, puis avons multipliés les virus dans les œufs embryonnaires. Après trois passages consécutifs dans les œufs, le titre HA de la souche était de 516 HA/ml. En outre, nous avons déterminé le LD50 de cette souche chez les souris Balb/C selon la méthode de G. Kärber et le LD50 = $10^{-3,75}$ (Annexe 2, section 5).

3. Extraction de l'ARN viral

Nous avons extrait l'ARN du virus de l'influenza SwQc91 à partir de 3 ml de liquide allantoïde infecté. La concentration obtenue est de 0,36 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, et le ratio de pureté, de 1,8 (rapport 260/280) (Annexe 2, section 3).

Figure 5: Évaluation par gel d'électrophorèse SDS-PAGE de la pureté de la suspension virale SwQc91

Pour évaluer la pureté de l'échantillon viral, nous avons tiré deux volumes de la suspension de manière à obtenir 20 µg de virus. Nous avons dilué un premier volume de suspension dans un volume équivalent de solution dénaturante 2X avec du β-mercaptoéthanol (5 %) (puits 3), et le deuxième dans un volume équivalent de solution dénaturante 2X sans β-mercaptoéthanol (puits 2). Ensuite, nous avons inséré ces deux produits dans deux puits distincts d'un gel de polyacrylamide en présence de SDS (1,0 mm d'épaisseur, gel de tassement 4 %, gel de séparation 12 %). Puis, nous avons soumis le gel à une tension constante de 200 V pendant 45 minutes à la T.P. Enfin, nous avons coloré le gel au bleu de Coomassie afin de visualiser les bandes de protéines. Ainsi, en condition réductrice, nous observons en ordre décroissant (puits 3) la protéine NA monomérique, la NP, la sous-unité HA1 de l'HA, la protéine M et la sous-unité HA2 de l'HA. En condition non réductrice, (puits 2), nous observons en ordre décroissant l'HA sous forme dimère, la protéine NA sous forme d'oligomère, l'HA sous forme monomérique, la NP et M1 (Lamb et Krug, 2001).



Puits 1 : Marqueurs de masses moléculaires (2 μg par protéine standard) : phosphorylase B (97,4 kDa), BSA (66,2 kDa), ovalbumine de l'oeuf (43 kDa), anhydrase carbonique bovine (31 kDa), inhibiteur de trypsine (21,5 kDa), et lysozyme (14,3 kDa)

Puits 2 : Suspension virale purifiée et concentrée en condition non réductrice (sans β -mercaptoéthanol)

Puits 3 : Suspension virale purifiée et concentrée en condition réductrice (en présence de β -mercaptoéthanol)

4. Réaction de transcription inverse et amplification par PCR du gène M

Afin d'obtenir l'ADNc du segment 7, l'ARN génomique extraite a subi une réaction de transcription inverse. Ensuite, une fois l'ADNc obtenu, nous l'avons amplifié par PCR et purifié. Pour confirmer la réaction d'amplification et la qualité de la purification, nous avons déposé le produit dans le puits 2 d'un gel d'agarose afin qu'il subisse une migration électrophorétique. La figure 6 présente le résultat. La bande visible au puits 1 correspond au produit d'amplification du gène M purifié faisant, selon le marqueur de taille en paires de bases chargé au puits 2, environ 1 kb.

5. Clonage du gène de la protéine de la matrice dans pCR2.1.

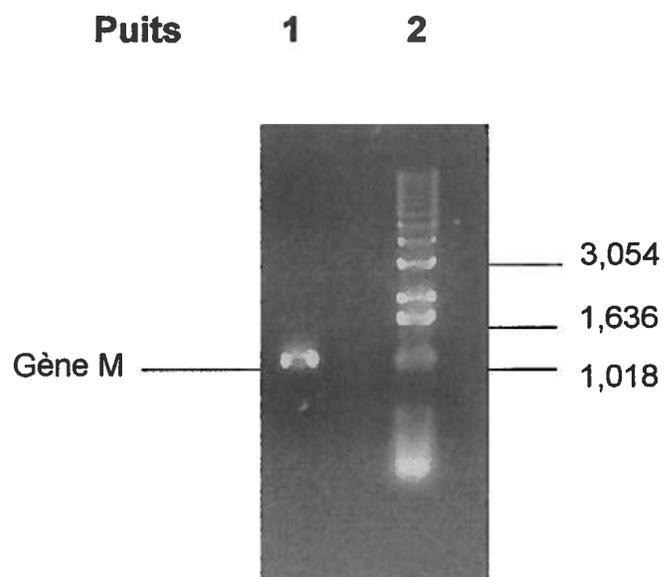
Nous avons introduit le gène M dans le vecteur pCR2.1 pour le cloner, dans les bactéries *E. coli* compétentes. Afin de confirmer la présence de plasmides recombinants (pCR2.1/M), nous avons fait digérer l'ADN plasmidique purifié des bactéries transformées (Apa I et Hind III) et l'avons déposé dans des puits d'un gel d'agarose. Si la colonie est positive, nous pouvons observer deux bandes spécifiques : les enzymes de restriction coupant aux extrémités de l'insert; l'une représente le vecteur pCR2.1 (3,900 kb), et l'autre, le gène M (1,027 kb). Si la colonie est négative, nous observons une bande représentative du vecteur digéré. Ainsi, le profil électrophorétique représenté à la figure 7 indique que parmi les 6 colonies sélectionnées, 5 sont positives: C1, C2, C3, C4 et C6 (puits 1, 2, 3, 4 et 6 respectivement).

6. Sous-clonage du gène de la matrice dans le vecteur eucaryotique pRc/CMV2

Nous avons purifié le fragment M du produit de digestion de l'ADN plasmidique de la colonie recombinante C1, choisi par hasard, en même temps que le produit de digestion du vecteur pRc/CMV2. De cette façon, l'insert M a subi un sous-clonage dans le vecteur pRc/CMV2. Afin de cribler les colonies positives, nous avons purifié l'ADN plasmidique de 9 colonies sélectionnées au hasard (les colonies : C1.1, C1.2, C1.3, C1.4, C1.5, C1.6, C1.7, C1.8 et C1.9), et l'avons fait digérer par Apa I et Hind III.

Figure 6: Électrophorèse sur gel d'agarose du produit de RT/PCR purifié correspondant à l'ADNc du segment 7 du virus de l'influenza SwQc91

Nous avons déposé un mélange contenant 1 μ l du produit d'amplification purifié dans 9 μ l de tampon échantillon 6X, dans le puits 1 d'un gel d'agarose 0,8 % (p/v) préparé dans du tampon TAE 1X. Afin de confirmer la présence du gène M, d'environ 1 kb, sur le gel, nous avons déposé 1 μ l d'un marqueur de taille en paires de bases dans le puits 2 du gel d'agarose. Par la suite, nous avons soumis le gel à une tension de 90 V pendant 40 minutes, puis l'avons fait tremper dans une solution de bromure d'éthidium (0,5 mg/ml) pendant 40 minutes afin de visualiser les différentes bandes d'ADN aux rayons UV.

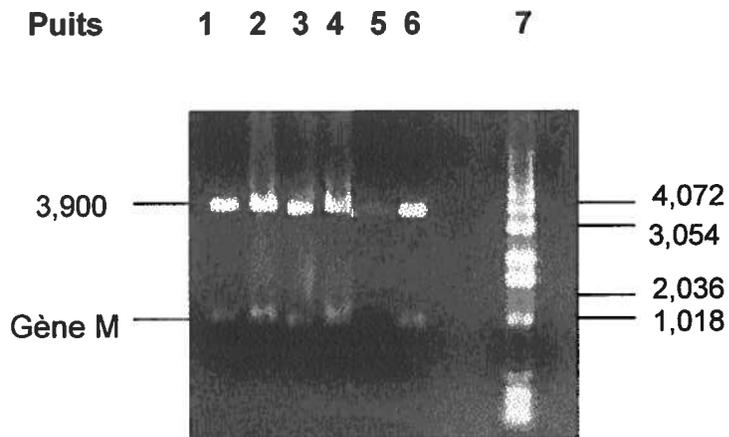


Puits 1 : Produit d'amplification purifié

Puits 2 : Marqueur de taille en paires de bases (kb)

Figure 7: Profil électrophorétique de l'ADN plasmidique par suite de sa digestion avec les enzymes de restriction Apa I et Hind III.

Afin de cribler les colonies recombinantes contenant le vecteur pCR2.1/M, nous avons purifié et fait digérer l'ADN plasmidique de 6 colonies blanches à l'aide des enzymes de restriction Hind III et Apa I. Ensuite, nous avons mélangé 5 μ l de chaque produit de digestion dans 1 μ l de tampon 6X et chargé les mixtures résultantes dans des puits distincts d'un gel d'agarose 0,8 % (p/v) (puits 1 à 6). Par la suite, nous avons soumis le gel à une tension de 90 V pendant 40 minutes et l'avons fait tremper dans une solution de bromure d'éthidium (0,5 mg/ml) pendant 40 autres minutes. Ainsi, nous avons pu visualiser les bandes d'ADN aux rayons UV, puis évaluer la taille des fragments obtenus par la digestion de l'ADN plasmidique grâce à la présence d'un marqueur de taille en paires de bases (puits 8) (1 kb *DNA Ladder*). Le fragment du plasmide pCR2.1 faisait 3,9 kb, et le fragment du gène M, environ 1 kb.



Puits 1 : ADN plasmidique de la colonie C1 digéré

Puits 2 : ADN plasmidique de la colonie C2 digéré

Puits 3 : ADN plasmidique de la colonie C3 digéré

Puits 4 : ADN plasmidique de la colonie C4 digéré

Puits 5 : ADN plasmidique de la colonie C5 digéré

Puits 6 : ADN plasmidique de la colonie C6 digéré

Puits 7 : Marqueur de taille en paires de bases (kb)

Nous avons ensuite déposé les produits de digestion dans des puits d'un gel d'agarose pour leur faire subir une migration électrophorétique dont la figure 8 illustre le profil. En visualisant la figure 8, on peut constater qu'une seule colonie est positive, soit C1.6. En effet, le produit de digestion de l'ADN plasmidique de C1.6 se compose de deux bandes: l'une d'environ 1 kb, le fragment M, l'autre de 5,500 kb, le vecteur pRc/CMV2.

7. Séquençage du gène M

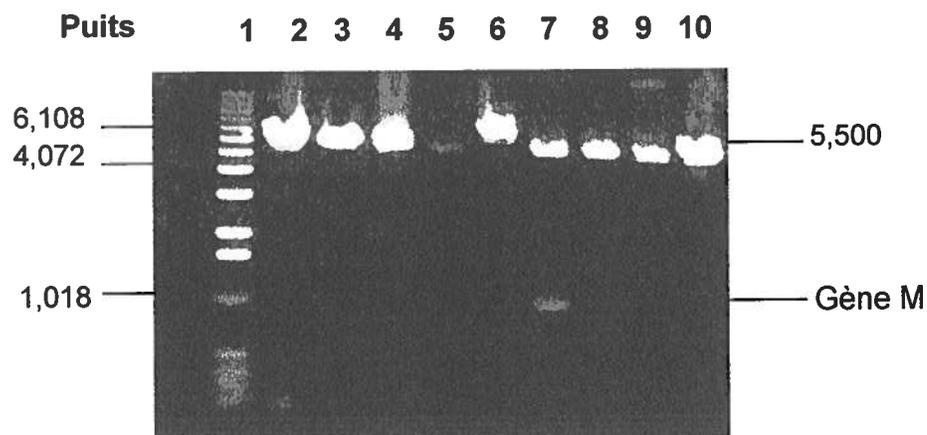
Nous avons purifié et séquencé l'ADN plasmidique de C1.6. Ensuite, nous avons aligné (Figure 9) la séquence expérimentale (C1.6) avec la séquence obtenue par Welman et Arora (2000). Cela nous a permis de répertorier trois mutations ponctuelles par substitution : C au lieu de T au nucléotide 139, T au lieu de C au nucléotide 361, et T au lieu de C au nucléotide 888. Sachant que le cadre de lecture de la protéine M1 débute au nucléotide 26 et se termine au nucléotide 784, nous en avons déduit les séquences en a.a. des protéines M1 et M2 (Figure 10) comparées avec la séquence de référence (Welman et Arora, 2000) afin de déterminer si les mutations aux nucléotides 139 et 361 avaient une incidence sur la séquence en a.a. de la protéine M1 (Figure 10A). De même, sachant que la cadre de lecture de la protéine M2 débute au nucléotide 26 pour s'arrêter au nucléotide 52 et reprendre (épissage alternatif) au nucléotide 740 pour se terminer au nucléotide 1 007, nous avons pu déterminer si la mutation aux nucléotides 888 influent sur la séquence en a.a. de la protéine M2 (Figure 10B). Le tableau I résume les résultats et nous indique que toutes les mutations ponctuelles ne produisent aucun effet sur la séquence d'a.a. puisqu'elles sont silencieuses.

8. Production de pRc/CMV2/M, pcDNA3/IL-2, pRc/CMV2 et pcDNA3 en gigapréparation

Ces quatre types d'ADN plasmidique ont servi à l'immunisation et ont été purifiés à partir de bouillon de culture. La figure 11 représente le profil électrophorétique de leur produit de digestion. En visualisant les différentes bandes du gel, nous pouvons constater qu'il ne subsiste aucun résidu d'ARN ou d'ADN génomique provenant des bactéries.

Figure 8: Profil électrophorétique de l'ADN plasmidique par suite de sa digestion avec les enzymes de restrictions Apa I et Hind III.

Afin de cribler les colonies recombinantes contenant le vecteur pRc/CMV2/M, nous avons purifié l'ADN plasmidique de 9 colonies blanches et fait digérer chaque ADN plasmidique à l'aide des enzymes de restriction Hind III et Apa I. Ensuite, nous avons mélangé 5 μ l de chaque produit de digestion dans 1 μ l de tampon 6X, puis déposé les mixtures résultantes dans des puits distincts d'un gel d'agarose 0,8 % (p/v) (Puits 2 à 10). Par la suite, nous avons soumis le gel à une tension de 90 V pendant 40 minutes, puis l'avons fait tremper dans une solution de bromure d'éthidium (0,01 mg/ml) pendant 40 autres minutes afin de visualiser les bandes d'ADN aux rayons UV. Ainsi, nous avons pu évaluer la taille des fragments obtenus par la digestion grâce à la présence d'un marqueur de taille en paires de bases (puits 1) (1 kb *DNA Ladder*).



- Puits 1** : Marqueur de taille en paires de bases (kb)
Puits 2 : ADN plasmidique de la colonie C1.1 digéré
Puits 3 : ADN plasmidique de la colonie C1.2 digéré
Puits 4 : ADN plasmidique de la colonie C1.3 digéré
Puits 5 : ADN plasmidique de la colonie C1.4 digéré
Puits 6 : ADN plasmidique de la colonie C1.5 digéré
Puits 7 : ADN plasmidique de la colonie C1.6 digéré
Puits 8 : ADN plasmidique de la colonie C1.7 digéré
Puits 9 : ADN plasmidique de la colonie C1.8 digéré
Puits 10 : ADN plasmidique de la colonie C1.9 digéré

Figure 9: Comparaison entre la séquence nucléotidique de l'insert d'ADNc du gène M extrait des clones de la colonie C1.6 avec la séquence de référence du gène M (SwQc91).

Pour le séquençage de l'insert d'ADNc du gène M, extrait des clones de la colonie C1.6, nous avons employé l'amorce universelle (5'-GTA AAA CGA CGG CCAG-3'), située en amont du site de restriction EcoRI du vecteur pRc/CMV2, l'amorce anti-sens M13 (5'-CAG GAA ACA GCT ATGA-3') et l'amorce interne 721-742 (5'- GGC CTG TAA ATT TTC AAG AAG A- 3'). Ensuite, nous avons comparé la séquence obtenue à la séquence du gène M de la souche SwQc91 (Welman et Arora, 2000) (GenBank N° AF188004) de référence. La séquence de référence du gène M (SwQc91) fait l'objet d'une représentation complète, alors que seules les différences en nucléotides de la séquence du fragment M des clones C1.6 portent une identification.

SwQc91	10	20	30	40
C1.6	AGCAAAAGCA	GGTAGATGTT	TAAAGATGGG	TCTTCTAACC
	-----	-----	-----	-----
SwQc91	50	60	70	80
C1.6	GAGGTCGAAA	CGTATGTTCT	CTCCATTGTT	CCGTCAGGCC
	-----	-----	-----	-----
SwQc91	90	100	110	120
C1.6	CCCTCAAAGC	CGAGATAGCG	CAGAGACTTG	AAGATGTTTT
	-----	-----	-----	-----
SWQc91	130	140	150	160
C1.6	TGCAGGGAAA	AACACCGATC	TAGAGGCACT	CATGGAATGG
	-----	-----C-	-----	-----
SwQc91	170	180	190	200
C1.6	CTAAAGACAA	GACCAATCCT	GTCACCTCTG	ACTAAGGGGA
	-----	-----	-----	-----
SWQc91	210	220	230	240
C1.6	TTTTAGGATT	TGTATTCACG	CTCACCGTGC	CCAGTGAGCG
	-----	-----	-----	-----
SwQc91	250	260	270	280
C1.6	AGGACTGCAG	CGTAGACGCT	TTGTCCAGAA	TGCCCTCAAT
	-----	-----	-----	-----
SwQc91	290	300	310	320
C1.6	GGGAATGGTG	ACCCGAACAA	CATGGACAAA	GCAGTCAAAC
	-----	-----	-----	-----
SwQc91	330	340	350	360
C1.6	TGTACAGAAA	ACTTAAAAGG	GAAATAACAT	TTCACGGGGC
	-----	-----	-----	-----
SwQc91	370	380	390	400
C1.6	CAAAGAAGTA	GCGCTCAGTT	ACTCTGCTGG	TGCACTTGCC
	T-----	-----	-----	-----
SwQc91	410	420	430	440
C1.6	AGTTGTATGG	GCCTCATTTA	CAACAGAATG	GGGACTGTCA
	-----	-----	-----	-----
SwQc91	450	460	470	480
C1.6	CCACTGAGGT	GGCATTGTC	CTAGTATGCG	CAACCTGTGA
	-----	-----	-----	-----
SwQc91	490	500	510	520
C1.6	ACAAATTGCC	GATTCCCAGC	ATCGATCTCA	TAGACAAATG
	-----	-----	-----	-----
SwQc91	530	540	550	560
C1.6	GTGACAACAA	CCAATCCACT	AATTAGGCAT	GAGAACAGAA
	-----	-----	-----	-----
SwQc91	570	580	590	600
C1.6	TGGTATTAGC	CAGCACGACA	GCTAAAGCCA	TGGAACAAAT
	-----	-----	-----	-----
SwQc91	610	620	630	640
C1.6	GGCTGGATCA	AGTGAACAAG	CAGCAGAGGC	TATGGAAATT
	-----	-----	-----	-----
SwQc91	650	660	670	680
C1.6	GCCAGCCAAG	CTAGGCAAAT	GGTACAGGCA	ATGAGGACAA
	-----	-----	-----	-----

SwQc91	690	700	710	720
C1.6	TTGGA	ACTCA	TCCTA	GTTCC
	AGCGC	TGGTC	TAAA	AAGATGA
	-----	-----	-----	-----
SwQc91	730	740	750	760
C1.6	TCTTCT	TGAA	AATTTAC	AGG
	CCTAT	CAGAA	ACGA	ATGGGA
	-----	-----	-----	-----
SwQc91	770	780	790	800
C1.6	GTGC	AATGC	AACGG	TCAA
	GTG	ATC	CTCT	CGTTG
	-----	-----	-----	-----
SwQc91	810	820	830	840
C1.6	GCAAG	CATCA	TTGGG	ATTTT
	GCAC	CTGATA	TTGT	GGATTC
	-----	-----	-----	-----
SwQc91	850	860	870	880
C1.6	TTGAT	CGTCT	TTTTT	TCAAA
	TGC	ATTT	TACC	GTTG
	-----	-----	-----	-----
SwQc91	890	900	910	920
C1.6	ATACG	GCTG	AAAAG	AGGGC
	CTTCT	ACGGA	AGG	AGTGCCG
	-----	-----	-----	-----
SwQc91	930	940	950	960
C1.6	GAGT	CTATGA	GGGA	AAGAATA
	TCGG	CAGAAA	CAG	CAGAGTG
	-----	-----	-----	-----
SwQc91	970	980	990	1000
C1.6	CTGT	GGATGT	TGACC	ATGGT
	CATTT	TGTC	ACAT	AGAGCT
	-----	-----	-----	-----
SwQc91	1010	1020	1027	
C1.6	AGAG	TAAAAA	ACTAC	CTTGT
	TTCT	ACT		
	-----	-----	-----	-----

Les séquences débutent à l'extrémité 5' par une adénine.

(A) : Adénine

(T) : Thymine

(C) : Cytosine

(G) : Guanidine

(-) : Même nucléotide

Figure 10: Séquences en acides aminés des protéines M1 et M2 déduites de la séquence en acides nucléiques

Nous avons déduit la séquence en acides aminés des protéines M1 (A) et M2 (B) de la séquence en acides nucléiques obtenue par le séquençage du gène M du virus SwQc91 cloné dans le vecteur pRc/CMV2 de la colonie C1.6; ensuite, nous avons comparé les séquences protéiques à celles qui a été publiées par Welman et Arora (2000).

(A) M1

```

      10          20          30          40          50          60
MSLLTEVETY VLSIVPSGPL KAEIAQRLED VFAGKNTDLE ALMEWLKTRP ILSPLTKGIL

      70          80          90          100         110         120
GFVFTLTVPS ERGLQRRRFV QNALNGNGDP NNMDKAVKLY RKLKREITFH GAKEVALSYS

      130         140         150         160         170         180
AGALASCMGL IYNRMGTVTT EVAFGLVCAT CEQIADSQHR SHRQMETTTN PLIRHENRMV

      190         200         210         220         230         240
LASTTAKAME QMAGSSEQAA EAMEIASQAR QMVQAMRTIG THPSSSAGLK DDLENLQAY

      250
QKRMGVQMQR FK

```

(B) M2

```

      10          20          30          40          50          60
MSLLTEVETP IRNEWECRCN GSSDPLVAAA SIIGILHLIL WILDRLFFKC IYRCFKYGLK

      70          80          90          97
RGPSTEGVPE SMREEYRQKQ QSAVDVDDGH FVNIELE

```

Tableau I: Présence de mutations dans la séquence nucléotidique du gène M cloné (C1.6) et leur effet sur les séquences en acides aminés des protéines M1 et M2

Nous avons extrait l'ADN plasmidique des clones de C1.6 afin de séquencer l'insert M. À partir de la séquence en acides nucléiques, nous avons établi les séquences en acides aminés (a.a.) des protéines M1 et M2, puis les avons comparées à la séquence publiée (Welman et Arora, 2000). Trois mutations par substitution sont visibles aux nucléotides 139, 361 et 888, mais n'ont produit aucun effet sur les séquences en a.a. des protéines M1 et M2 codées par ce gène. Les mutations sont silencieuses.

Résidu ^a	Codon SwQc91 ^b → a.a.	Codon C1.6 → a.a.	Types de mutation
38 de M1	GAT → D	GAC ₍₁₃₉₎ C → D	Silencieuse
112 de M1	GCC → A	GCT ₍₃₆₁₎ → A	Silencieuse
159 de M2	CTG → L	T ₍₈₈₈₎ TG → L	Silencieuse

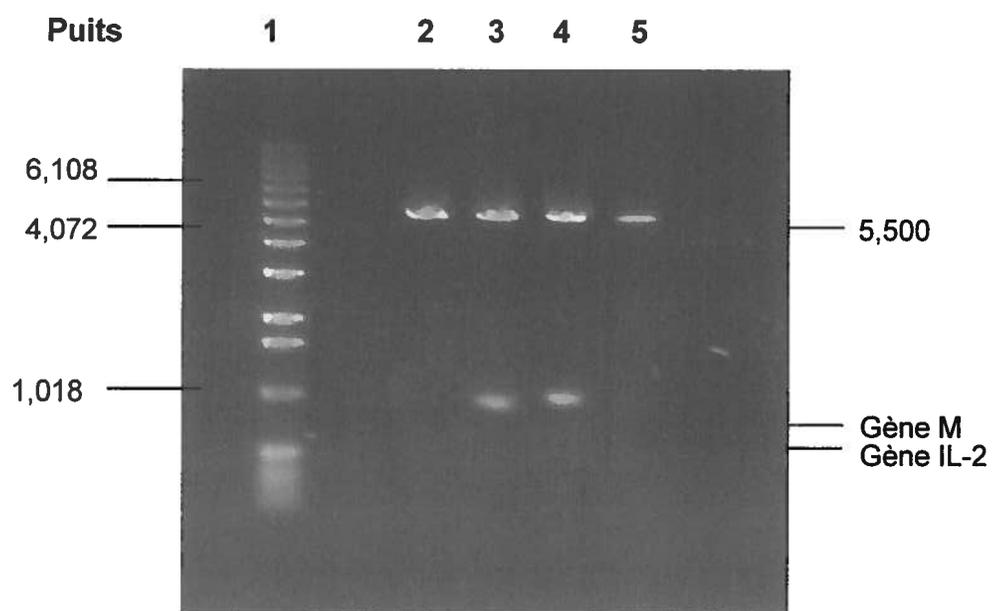
a : Position des a.a. sur la séquence de M1 et M2 du virus SwQc91

b : Codon de référence

c : Position des mutations nucléotidiques

Figure 11: Profil électrophorétique d'ADN plasmidique purifié par gigapréparation, par suite de leur digestion avec les enzymes de restrictions.

Nous avons purifié les différents ADN plasmidiques, soit pRc/CMV2/M, pcDNA3/IL-2, pRc/CMV2 et pcDNA3, à l'aide de la trousse de Qiagen à partir de cultures de bactéries. Nous avons évalué leur pureté en prélevant 100 ng de chaque échantillon afin de réaliser une digestion avec les enzymes de restriction Apa I et Hind III pour pRc/CMV2/M et pRc/CMV2, et avec Bam HI pour pcDNA3/IL-2 et pcDNA3. Ensuite, nous avons mélangé 10 µl de chaque produit de digestion dans 1 µl de tampon 6X, puis déposé les mélanges résultants dans des puits distincts d'un gel d'agarose 0,8 % (p/v) (puits 2 à 5). Par la suite, nous avons soumis le gel à une tension de 90 V pendant 40 minutes, puis l'avons fait tremper dans une solution de bromure d'éthidium (0,01 mg/ml) pendant 40 autres minutes afin de visualiser les bandes d'ADN aux rayons UV. Nous avons ainsi pu évaluer la taille des fragments grâce à la présence d'un marqueur de taille en paires de bases (puits 1) (1 kb *DNA Ladder*). Le fragment du gène M faisait environ 1 kb, le fragment du gène de l'IL-2 faisait environ 0,980 kb.



Puits 1 : Marqueur de taille en paires de bases (kb *DNA Ladder*)

Puits 2 : ADN plasmidique pcDNA3 digéré

Puits 3 : ADN plasmidique pcDNA3/IL-2 digéré

Puits 4 : ADN plasmidique pRc/CMV2/M digéré

Puits 5 : ADN plasmidique pRc/CMV2 digéré

Les différentes bandes que nous distinguons représentent les fragments du gène M et le vecteur digéré pRc/CMV2 (puits 4), le fragment du gène de l'IL-2 et le plasmide pcDNA3 (puits 3), et enfin les plasmides pRc/CMV2 et pcDNA3 (puits 2 et 5 respectivement). En outre, la quantification et la qualité de ces échantillons ont fait l'objet d'une évaluation à l'aide des absorbances à 260 et 280 nm. Comme le rapport des absorbances à 260 nm et à 280 nm était supérieur à 1.7 pour toutes les préparations, nous avons pu confirmer leur pureté (Annexe 2, sections 2 et 3).

9. Évaluation de l'expression du gène M inséré dans pRc/CMV2 dans les cellules eucaryotes Cos-7

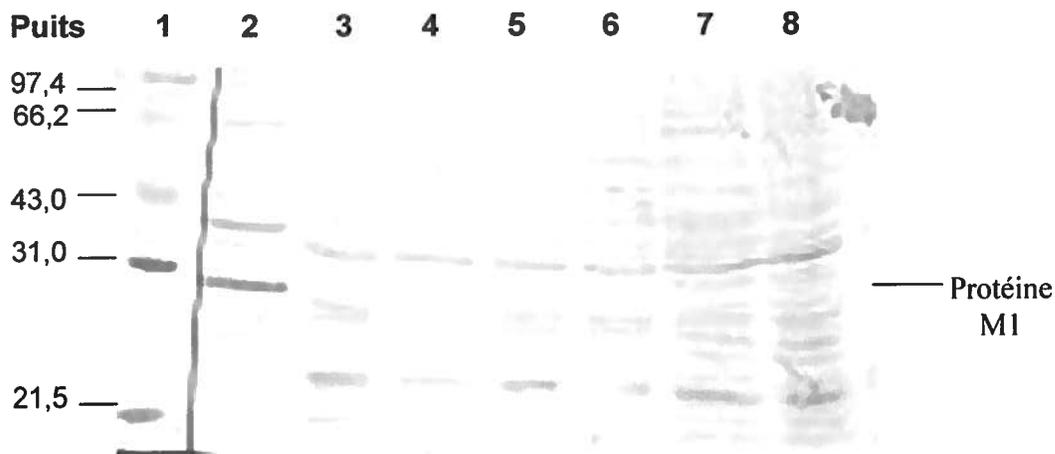
Une transfection transitoire dans les cellules eucaryotes (cellules Cos-7) a été effectuée. Dans un premier temps, nous avons évalué l'efficacité de la transfection au microscope fluorescent avec le témoin positif (pRc/CMV2/GFP). Dans ce cas, 70 % des cellules étaient transfectées. Par extrapolation, l'ADN plasmidique, pRc/CMV2/M, a probablement aussi pénétré dans les cellules.

Nous avons alors lysé les cellules transfectées pour évaluer l'expression du gène M à l'aide d'un immunobuvardage. Pour ce faire, nous avons employé un sérum polyclonal de porc anti-SwQc91 (1 : 500) et un sérum anti-IgG de porc conjugué à la peroxydase. La figure 12 présente le résultat de l'immunobuvardage. On peut y apercevoir au puits 2 le profil correspondant au lysat d'une suspension bactérienne exprimant la protéine M1. Dans ce cas, on peut constater l'apparition d'une bande ayant une masse moléculaire de 28 kDa correspondant à la protéine M1.

D'autre part, le profil des échantillons expérimentaux (puits 3, 4, 5, 6 et 7) correspondant aux suspensions de cellules transfectées avec pRc/CMV2/M ne semble pas différent du profil des témoins négatifs (puits 2 et 8) transfectés avec le vecteur parental. Dans ce cas, nous ne sommes pas en mesure de vérifier l'expression du gène M.

Figure 12: Évaluation par immunobuvardage de l'expression du gène M inséré dans pRc/CMV2 dans les cellules eucaryotes.

À la suite de la lyse des cellules, nous avons déposé les échantillons dans des puits d'un gel de séparation de polyacrylamide de 12 % en présence de SDS pour leur faire subir une migration électrophorétique à une tension constante de 200 V pendant 40 minutes à la T.P. Ensuite, un transfert électrophétique a été effectué sur une membrane de PVDF à 40 V toute la nuit. Nous avons découpé la bande correspondant au profil de marqueur de masses moléculaires (puits 1) et l'avons colorée au rouge de ponceau. Le reste de la membrane a ensuite servi à l'immunobuvardage avec d'abord le sérum polyclonal anti-SwQc91 préabsorbé à raison de 1 : 500 et un Ac secondaire anti-IgG de porc conjugué à la peroxydase et dilué à raison de 1 : 1000.



Puits 1 : Marqueur de masses moléculaires en kDa (2 μ g par protéine) comprenant la phosphorylase B (97,4 kDa), la BSA (66,2 kDa), l'ovalbumine d'œuf (43,0 kDa), l'anhydrase carbonique de bovin (31,0 kDa) et l'inhibiteur de trypsine (21,5 kDa)

Puits 2 : Un volume de 20 μ l composé d'une suspension bactérienne d'*Escherichia coli* (BL21 DE3) transformées avec le plasmide recombinant pET2.1/M et induites avec 1 mM d'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside

Puits 3 : Un volume de 40 μ l d'une suspension de cellules Cos-7 transfectées avec le vecteur pRc/CMV2 et lysées 24 heures après la transfection

Puits 4 et 5 : Un volume de 40 μ l d'une suspension de cellules Cos-7 transfectées avec le vecteur recombinant pRc/CMV2/M et lysées 24 heures après la transfection

Puits 6 et 7 : Un volume de 40 μ l d'une suspension de cellules Cos-7 transfectées avec le vecteur recombinant pRc/CMV2/M et lysées 48 heures après la transfection

Puits 8 : Un volume de 40 μ l d'une suspension de cellules Cos-7 transfectées avec le vecteur pRc/CMV2 et lysées 48 heures après la transfection

10. Cinétique des anticorps sériques

Nous avons immunisé les souris aux semaines 0, 3 et 6, puis récolté les sérums aux semaines 0, 2, 5, 8 et 11 afin de titrer les Ac produits par l'essai ELISA. Pour se faire, on avait dilué les sérums de chaque groupe d'une semaine donnée en série logarithmique de base 2 à partir de 1:10 en duplicata dans un plateau de 96 puits dans lequel on avait fixé l'Ag (SwQc91). De cette façon, il est possible de constater l'évolution des absorbances à 492 nm en fonction de l'inverse des dilutions pour chaque semaine et pour chaque groupe. La détermination d'une densité optique seuil (D.O. = 0,23) (Annexe 2, section 4) permet alors de déterminer le titre en Ac pour chaque groupe aux semaines 0, 2, 5, 8 et 11 (Figures 13 et 14). Plus précisément, le titre coïncide avec la dernière dilution à laquelle l'absorbance est supérieure ou égale à 0,23. Les figures 13 et 14 illustrent la modulation de la réponse humorale en fonction du temps.

Le groupe 6 (Figure 13), souris immunisées avec le virus de l'influenza (le témoin positif), présente dès la semaine 2 un titre d'Ac anti-SwQc91 de 320. Ce titre augmente pour atteindre son maximum de 20480 dès la semaine 5. Les souris immunisées avec du PBS, représentant l'un des témoins négatifs de l'expérience (groupe 5, Figure 14), ont produit un titre Ac anti-SwQc91 faible de 20 tout au long du temps. Les souris immunisées avec les plasmides pRc/CMV2 et pcDNA3/IL2 représentent l'autre groupe témoin négatif (groupe 4, Figure 14). Dans ce cas, aux semaines 0 et 2, le titre en Ac reste à 20 et atteint son maximum à la semaine 5 avec un titre de 80. Pour les autres semaines (8 et 11), le titre anti-SwQc91 se maintient à 80. Dans le cas des groupes expérimentaux (groupe 1, 2 et 3) on peut affirmer que les anticorps produits contre Ag, le virus SwQc91, sont exclusivement des anticorps anti-M puisque le vecteur d'expression code uniquement pour les protéines M1 et M2. Les souris immunisées avec les plasmides pRc/CMV2/M et pcDNA/IL2 incarnent le premier groupe expérimental (groupe 1, Figure 14). D'abord le titre anti-M reste équivalent à 20 aux semaines 0 et 2. À la semaine 5, nous notons une très légère augmentation pour un titre égal à 40. Enfin, nous constatons une augmentation à la semaine 8, où le titre est égal à 640, sa valeur maximale. L'ELISA de la semaine 11 du sérum de ce groupe nous indique aussi un titre de 640.

Figure 13: Cinétique et titre d'anticorps sériques anti-SwQc91 du témoin positif (groupe 6)

Afin de mesurer les titres Ac anti-SwQc91 du groupe 6, témoin positif (SwQc91), nous avons effectué un ELISA indirect avec les sérums (3 sérums groupés en 1 fraction) de chaque groupe prélevés aux semaines 0, 2, 5, 8 et 11. Dans ce but, nous avons utilisé le virus SwQc91 purifié comme Ag en ajoutant 50 µl par puits (10 µg/ml) d'une plaque de 96 puits. Après avoir bloqué les puits, nous avons ajouté et dilué les différents sérums en série logarithmique de base 2 à partir de 1 : 10. L'ajout d'Ac secondaire de chèvre anti-IgG de souris conjugué à la peroxydase et dilué 1 : 4000 avec la solution de révélation a permis de détecter pour chaque semaine l'absorbance à 492 nm en fonction de la réciproque des dilutions. La détermination d'une D.O. seuil (0,23) a alors permis de concéder les titres.

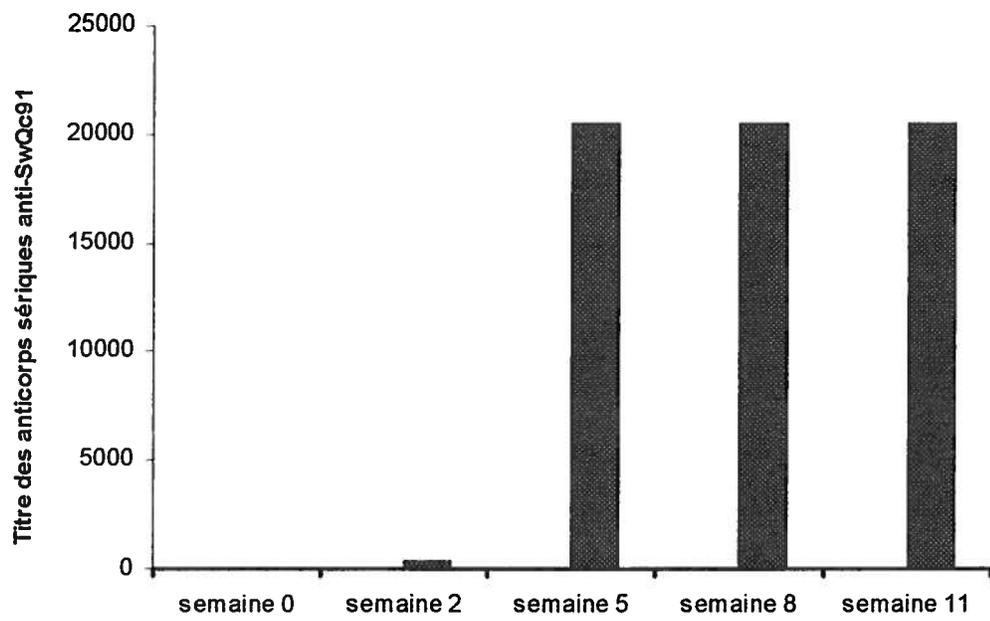
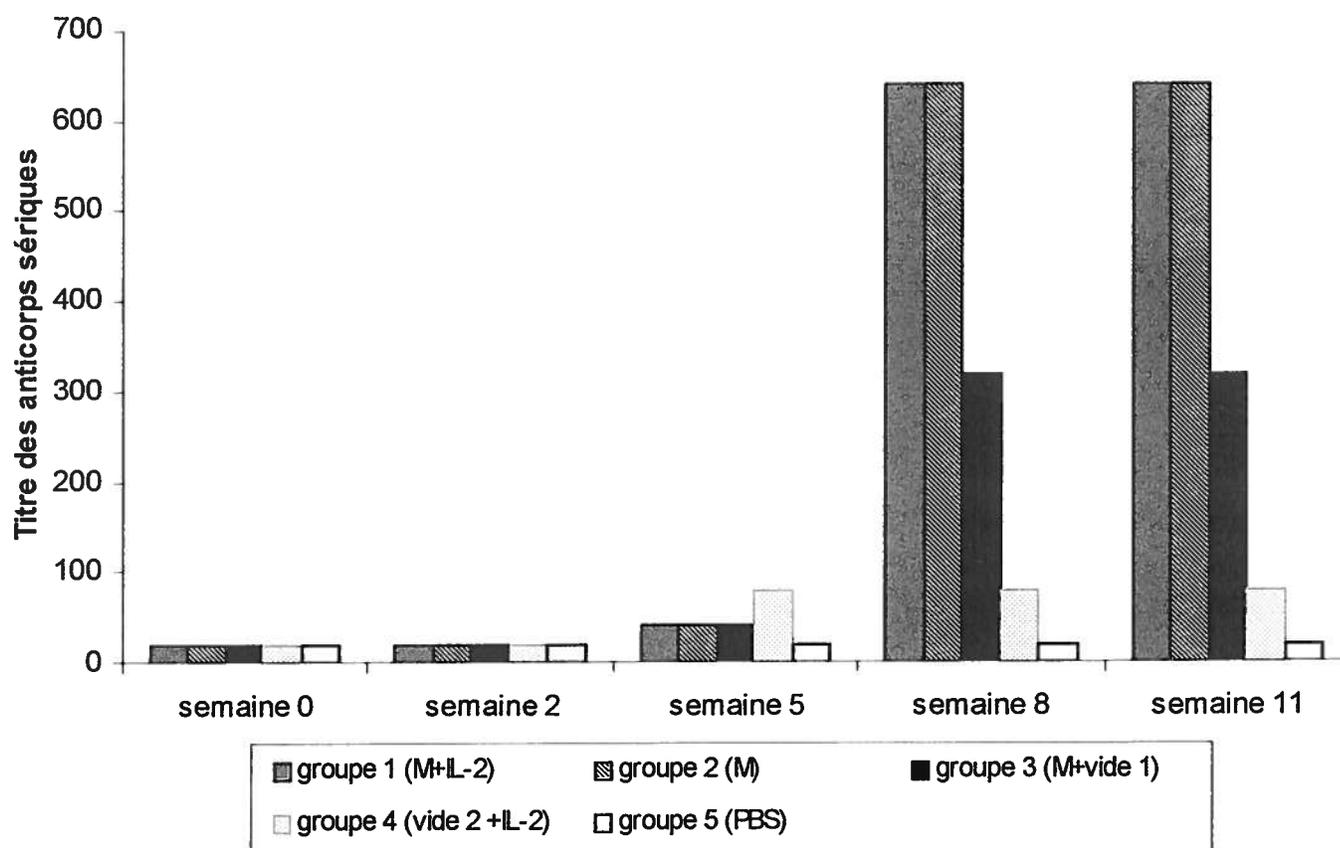


Figure 14: Cinétique et titre des anticorps sériques

Afin de mesurer les titres Ac anti-M des groupes 1 (pRc/CMV2/M + pcDNA/IL-2), 2 (pRc/CMV2/M) et 3 (pRc/CMV2/M + pcDNA3) ainsi que le titre anti-SwQc91 des groupes 4 (pRc/CMV2 + pcDNA3/IL-2) et 5 (PBS), nous avons effectué un ELISA indirect avec les sérums (3 sérums groupés en 1 fraction) de chaque groupe prélevés aux semaines 0, 2, 5, 8 et 11. Dans ce but, nous avons employé le virus SwQc91 purifié comme Ag en ajoutant 50 µl par puits (10 µg/ml) d'une plaque de 96 puits. Après avoir bloqué les puits, nous avons ajouté et dilué les différents sérums en série logarithmique de base 2 à partir de 1 : 10. L'ajout de l'Ac secondaire de chèvre anti-IgG de souris conjugué à la peroxydase et dilué 1 : 4000 avec la solution de révélation a permis de détecter pour chaque semaine l'absorbance à 492 nm en fonction de la réciproque des dilutions. La détermination d'une D.O. seuil (0,23) a alors permis de concéder les titres pour chaque groupe. Sur la figure, M est le plasmide recombinant pRc/CMV2/M, IL-2 le plasmide recombinant pcDNA/IL-2, vide 1 est le plasmide pcDNA3 et vide 2 le plasmide pRc/CMV2.



Les souris immunisées avec le plasmide pRc/CMV2/M (groupe 2, Figure 14) présentent exactement le même profil que les souris du groupe 1. Ainsi, le titre anti-M maximal est de 640 et nous l'obtenons à la semaine 8.

En ce qui a trait aux souris du groupe 3 (Figure 14) immunisées avec les plasmides pRc/CMV2/M et pcDNA3, la modulation de la réponse humorale en fonction du temps ressemble aux résultats des groupes 1 et 2, mais avec une différence. En effet, il y a atteinte du titre maximal également à la semaine 8, mais il est de 320.

À première vue, les résultats de l'ELISA des groupes immunisés avec pRc/CMV2/M (groupes 1, 2 et 3) nous indiquent une réponse humorale anti-M évidente. Cependant, nous remarquons une baisse du titre anti-M de 50 % pour les sérums du groupe 3 comparativement au titre des sérums du groupe 1. En outre, l'injection du vecteur pcDNA3/IL-2 codant l'IL-2 n'agit pas dans ce cas comme adjuvant sur la réponse humorale anti-influenza. En effet, nous ne sommes pas en mesure de constater de différence entre les groupes 1 et 2.

11. Défi léthal

Six groupes de 10 souris, soit les mêmes définies pour la détermination de la modulation de la réponse humorale (section 10), ont subi l'immunisation dans le but d'évaluer l'efficacité de l'immunisation du gène M par un défi léthal. En premier lieu, à la semaine 8, nous avons choisi 3 souris par groupe au hasard afin de confirmer la présence d'Ac dirigés contre le virus SwQc91 (anti-M ou anti-SwQc91) (Tableau II). Puis, l'administration par la voie i.n. de 5LD50 du virus SwQc91 fatal chez les souris a pu avoir lieu. Le tableau II présente les résultats de l'essai ELISA pour chaque groupe, et la figure 15 représente le résultat du défi léthal. Les titres obtenus (Tableau II) sont les mêmes obtenus précédemment à la semaine 8 (Figures 13 et 14), soit 640 pour le groupe 1, 640 pour le groupe 2, 320 pour le groupe 3, 80 pour le groupe 4, 40 pour le groupe 5 et 20840 pour le groupe 6. En plus de confirmer la reproductibilité des titres précédemment obtenus, ce résultat (voir Tableau II) indique que les groupes immunisés sont conformes pour le défi.

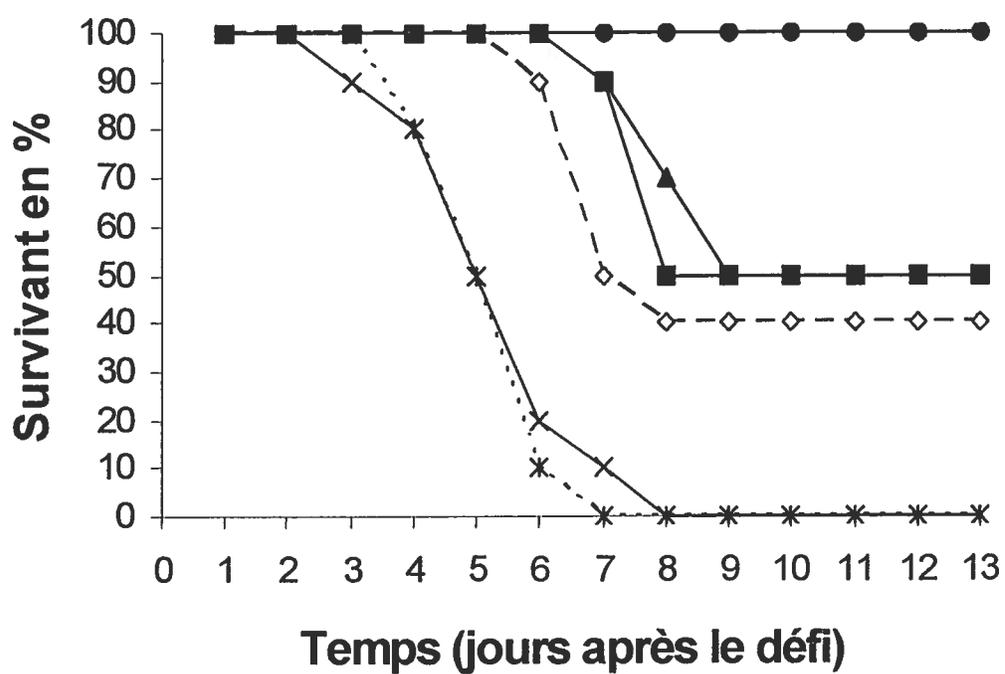
Tableau II : Titre Ac des semaines 0 et 8 des souris immunisées pour le défi létal

Juste avant d'instiller la dose létale de virus adaptés, nous avons choisi trois souris par groupe au hasard afin de déterminer le titre Ac anti-M des groupes 1 (pRc/CMV2/M + pcDNA3/IL-2), 2 (pRc/CMV2/M) et 3 (pRc/CMV2/M + pcDNA3) ainsi que le titre anti-SwQc91 des groupes 4 (pRc/CMV2 + pcDNA3/IL-2), 5 (PBS) et 6 (Virus SwQc91). Pour ce faire, nous avons effectué un ELISA indirect contre le virus SwQc91 (10 µg/ml) avec les sérums (3 sérums groupés en 1 fraction) de chaque groupe récoltés à la semaine 8. Après avoir bloqué les puits, nous avons ajouté en duplicata les sérums dilués en série logarithmique en base 2. L'ajout de Ac secondaire de chèvre anti-IgG de souris conjugué à la peroxydase et dilué 1 : 4000 avec la solution de révélation a permis de détecter pour chaque semaine l'absorbance à 492 nm en fonction de la réciproque des dilutions. La détermination d'une D.O. seuil (0,23) a permis de concéder les titres.

Groupe des souris pour le défi létal	Titre Ac (semaine 0)	Titre Ac (semaine 8)
1	20	640
2	40	640
3	40	320
4	20	80
5	20	40
6	20	20480

Figure 15: Survie des souris en fonction du temps après l'instillation de 5LD50 de la souche SwQc91 adaptée.

Nous avons immunisé les souris comme pour l'évaluation de la réponse humorale avec des groupes se composant de 10 souris : groupes 1 (pRc/CMV2/M + pcDNA3/IL-2), 2 (pRc/CMV2/M), 3 (pRc/CMV2/M + pcDNA3), 4 (pRc/CMV2 + pcDNA3/IL-2), 5 (PBS) et 6 (Virus SwQc91). Deux semaines après la dernière immunisation, soit la semaine 8, nous avons instillé la dose létale de la souche adaptée (5LD50) à chaque souris. Puis, nous avons gardé les souris sous observation pendant une dizaine de jours afin de dénombrer les survivants de chaque groupe. Sur la figure, M est le plasmide recombinant pRc/CMV2/M, IL-2 est le plasmide recombinant pcDNA/IL-2, vide 1 est le plasmide pcDNA3 et vide 2 est le plasmide pRc/CMV2.



--◇-- groupe 1 (M+ IL-2)	—■— groupe 2 (M)
—▲— groupe 3 (M+ vide 1)	—×— groupe 4 (vide 2 + IL-2)
...*... groupe 5 (PBS)	—●— groupe 6 (SwQc91)

La figure 15 montre que la co-injection de pRc/CMV2/M et de pcDNA3/IL-2 (groupe 1) protège 40 % des souris, et l'injection de pRc/CMV2/M (groupe 2), tout comme la co-injection de pRc/CMV2/M et pcDNA3 (groupe 3), protègent 50 % des souris contre le défi létal. À l'opposé, aucune souris n'a survécu à l'administration du virus fatal dans le cas des groupes témoins négatifs (groupes 4 et 5). D'autre part, toutes les souris du groupe témoin positif ont survécu au défi. Ces résultats nous indiquent que l'immunisation génique du gène-M représente un élément potentiellement protecteur pour les souris infectées par le virus fatal. En outre, la co-administration du gène de IL-2 semble avoir diminué l'incidence de survie des souris de 10 %.

V DISCUSSION

Nous avons séquencé l'insert M pour vérifier la cohésion de notre construction. Le séquençage (Figure 9) a permis l'évaluation d'éventuelles mutations dans la séquence nucléotidique. Nous avons répertorié trois mutations sur la séquence nucléotidique. Cependant, celles-ci n'entraînent pas de modifications sur la séquence en a.a. Même si ces mutations sont sans conséquences (Tableau II), nous avons évalué les causes probables de ces mutations ponctuelles. À première vue, il semble que la réaction de la transcription inverse, permettant d'obtention de l'ADNc du gène M, soit responsable des mutations. La réaction de la transcription utilise la transcriptase inverse qui ne renferme pas l'activité exonucléase 3'→5' lui permettant de corriger d'éventuelles erreurs. Les mutations ponctuelles observées dans notre cas se lisent comme suit : T→C ou C→T, soit des mutations dominantes produites en général par la transcriptase inverse (Robertson et al., 1991). De plus, nous savons maintenant que la Taq polymérase utilisée dans le cadre de l'amplification du gène M par PCR présente une fréquence d'erreur de 1 pour 9 000 et ce pour une seule étape d'amplification (Tindall et Kunkel, 1988). Par conséquent, nous pensons que les mutations dans la séquence nucléotidique se sont probablement produites lors du RT-PCR. Étant donné que les mutations de la séquence nucléotidique n'entraînaient aucune modification de la séquence a.a., nous avons vérifié l'expression du gène M dans un système eucaryote avant d'immuniser les souris.

Nous avons immunisé les souris avec pRc/CMV2/M se composant du promoteur du cytomégalovirus (CMV). Pour que le gène M du plasmide recombinant s'exprime dans les cellules transfectées, il est essentiel qu'il dispose d'un promoteur fort et reconnu par la polymérase d'eucaryote (ARN pol II). Le promoteur du CMV représente un choix possible, car il est fort, induit une expression constitutive, et est le promoteur le plus utilisé en immunisation génétique (Spier, 1996). D'habitude, lors d'une véritable infection, le segment 7 permet la production de M1 et M2 (Inglis et Brown, 1981; Lamb, Lai et Choppin, 1981; Hiebert, Williams et Lamb, 1986). De ce fait, la construction plasmidique établie (le promoteur du CMV et le gène M) est en mesure de produire dans un système eucaryote les deux protéines, soit M1 et M2. En outre, le séquençage (Figure 9) a permis la vérification de la conformité de la construction. Donc, nous devrions être en mesure de vérifier par immunobuvardage l'expression du gène M dans les cellules Cos-7. Néanmoins, cette technique ne nous a pas permis de le prouver (Figure 12). Pourtant, les souris immunisées avec le plasmide recombinant pRc/CMV2/M (Figure 13, groupes 1, 2 et

3) produisent une réponse humorale évidente et spécifique contre l'Ag, le virus SwQc91 complet. De plus, nous avons été en mesure d'engendrer une protection potentielle par cette même immunisation (Figure 15). Par conséquent, nous pouvons conclure que le vecteur recombinant pRc/CMV2/M induit la production des protéines M activant une réponse anti-M. De ces faits, nous ne pouvons nier l'expression du gène M du plasmide recombinant pRc/CMV2/M chez les souris immunisées même si nous n'avons pu la prouver par immunobuvardage dans le système eucaryotique (Cos-7) (Figure 12). Il est possible d'expliquer cette contradiction par le fait que la technique utilisée pour démontrer l'expression n'est pas assez sensible pour détecter les protéines M1 et M2. Par exemple, la présence de bruit de fond nous empêche de confirmer l'expression de M1 et M2, le sérum polyclonal de porc anti-SwQc91 reconnaissant de façon non spécifique d'autres protéines. Il est fort envisageable qu'une technique plus sensible, comme la radio-immunologie (RIA) ou plus typique (avec un sérum plus spécifique, par exemple), nous aurait permis de détecter l'expression du gène M dans les cellules Cos-7. D'autre part, il est possible que les cellules Cos-7 ne puissent traduire l'ARN du gène M.

Nous avons choisi le gène M principalement pour l'immunisation car il s'agit du gène le plus conservé du virion (Ortín et al., 1983). L'émergence de nouvelles souches dans la population porcine causée par un réassortiment génétique, laisse supposer que les gènes moins conservés, tels que HA et NA, protègent moins contre des nouveaux variants. Plus précisément, attendu que le virus de l'influenza A est hautement variable, il n'existe pas de vaccins commerciaux capables d'une protection efficace contre des virus variants (Both et al., 1983; Chakraverty, 1993). Néanmoins, par le biais du gène M, nous sommes en mesure de produire une réponse immunitaire pouvant reconnaître les nouveaux variants (Okuda et al., 2001). C'est pourquoi, dans le cadre de cette étude, nous désirions vérifier si l'administration de pRc/CMV2/M induisait une réponse immune pouvant protéger les souris infectées par un virus fatal. D'autre part, dans le but d'augmenter la réponse humorale, nous avons co-administré un vecteur codant pour IL-2 (pcDNA3/IL-2) à un autre groupe de souris.

Pour prouver l'activation du système immunitaire par l'administration de pRc/CMV2/M, nous avons effectué un essai ELISA contre le virus complet SwQc91 (Figures 13 et 14). En premier lieu, afin de comparer la réponse immunitaire engendrée par l'administration

de la construction pRc/CMV2/M, nous avons injecté les souris avec le virus purifié inactivé SwQc91 (Figure 13, groupe 6). Ainsi nous pouvons observer une production d'anticorps élevé avec un maximum atteint à la semaine 5 s'élevant à 20480. Le titre du témoin positif peut se justifier par la présence de la majorité des protéines virales lors de l'immunisation. Ainsi, les protéines constitutives ont conservé leur pouvoir immunogène pour activer une réponse immune résultant de la sélection clonale grâce aux interactions des différentes protéines virales et des cellules T et B. En outre, l'essai a permis de certifier la présence d'Ac anti-M engendré par l'immunisation d'un vecteur codant pour les protéines M (Figure 14, groupes 1, 2 et 3). On peut affirmer que les anticorps produits contre Ag de l'essai ELISA, le virus SwQc91, sont exclusivement des anticorps anti-M car le vecteur d'expression pRc/CMV2/M code uniquement pour les protéines M1 et M2. Plus précisément, nous avons obtenu seulement un titre certain à compter de la semaine 8 (640 pour les groupes 1 et 2, et 320 pour le groupe 3). Les titres expérimentaux obtenus pour les groupes 1, 2 et 3 sont conformes à la littérature. En effet, une autre étude visant l'immunisation par un plasmide codant pour les protéines M1 et M2 (Okuda et al., 2001) a obtenu sensiblement les mêmes résultats. Dans ce cas particulier, les chercheurs avaient introduit le gène M dans un vecteur ayant le promoteur du virus SV40, et l'avaient injecté par voie intramusculaire à des souris Balb/C. Par la suite, ils ont déterminé le titre par ELISA. Les titres contre les protéines recombinantes M1 et M2 sont égaux respectivement à 630 et à 388.

Cependant, nous obtenons pour le groupe 3 un titre anti-M 50 % fois moins inférieur au groupe 1 (Figure 14). Pour expliquer ce phénomène, nous nous sommes fondés sur les résultats d'une autre étude. Dans le cadre de cette investigation, Abai et al. (1994) ont co-injecté un gène codant pour l'IL-2 et un autre codant pour la NP du virus de l'influenza. Or, l'analyse de la réponse humorale par ELISA montrait plutôt une diminution de la réponse humorale en présence du gène IL-2. En outre, la co-injection du gène codant pour la NP avec un plasmide non codant entraînait aussi la diminution de la réponse humorale, laissant entendre que l'abaissement n'était pas attribuable à l'activité biologique de IL-2, mais plutôt à une compétition entre les deux vecteurs co-administrés (Abai et al., 1994). Ainsi, l'ajout d'un plasmide non codant peut entraîner une diminution de la réponse humorale. En outre, notre investigation ne démontre pas de différences remarquables entre les groupes 1 et 2 (Figure 14). Par conséquent, la co-immunisation de pcDNA3/IL-2

ne semble pas augmenter la réponse humorale anti-M. D'ordinaire, IL-2 est une cytokine induisant plutôt une réponse de type Th1 (Cohen, Boyer et Weiner, 1998; Cox et Coulter, 1997), et sa sécrétion entraîne la prolifération et l'expansion clonale des cellules immunitaires activées (Morgan, Ruscetti et Gallo, 1976). Depuis peu, on l'administre comme adjuvant, et cela permet habituellement l'augmentation de la production en Ac (Chow et al., 1997; Cohen, Boyer et Weiner, 1998; Cox et Coulter, 1997; Geissler et al., 1997; Watanabe et al., 1993). Pourtant, dans notre étude, il n'y a pas eu d'augmentation de la production en Ac. Avec ou sans co-administration d'IL-2, la réponse humorale déterminée par le test ELISA est la même (Figure 14, groupes 1 et 2). Il est important de mentionner que notre étude n'a pas vérifié l'expression du gène de IL-2. En fait, le plasmide pcDNA3/IL-2 nous a été offert par une autre équipe qui avait remarqué une augmentation de la réponse humorale chez les souris après avoir administré ce dernier avec un plasmide codant pour la gp51 du virus de la leucose bovine (Ligondé, 2000). D'autre part, il est possible que malgré l'expression d'IL-2, la réponse humorale n'augmente pas, et ce, sans que ce soit attribuable aux bio-effets de l'expression IL-2. Encore ici, nous pouvons expliquer le phénomène par une compétition établie entre les deux plasmides injectés (pRc/CMV2/M et pcDNA3/IL-2). D'ailleurs, nous avons déjà mentionné une baisse d'anti-M chez le groupe 3. Ainsi, cette compétition empêcherait IL-2 d'agir convenablement lorsqu'on le co-administre avec le plasmide codant pour M (Figure 14, groupe 1) et induirait la diminution de la réponse anti-M observée pour le groupe 3 (Figure 14). Dans ce cas, la compétition peut se produire à divers moments, entre autres lors de la prise en charge de l'ADN par le muscle ou lors de l'expression des deux plasmides codants (Abai et al., 1994), par exemple, dans le cas d'une compétition directe avec ARN polymérase, avec les facteurs de transcription ou encore lors de l'initiation de la traduction. Donc, pour annuler cette compétition nous devrions insérer les deux gènes d'intérêt, soit les gènes d'IL-2 et le gène des protéines M, dans un même plasmide. Une autre explication pour élucider l'inaction du gène d'IL-2 dans notre étude serait qu'en réalité, l'IL-2 n'agit pas normalement comme agent modulateur de la réponse immune contre les protéines M du virus de l'influenza. Pourtant, avant d'évaluer ces hypothèses, il serait primordial de vérifier l'expression de l'IL-2.

Grâce au test ELISA, nous avons pu démontrer que nous avons bien engendré une réponse immunitaire suite à l'administration de pRc/CMV2/M par la voie i.m. En sus,

nous avons voulu vérifier si la stimulation immune induisait une protection chez les souris suite à un défi létal.

Préalablement au défi létal, nous avons dû adapter la souche porcine SwQc91 aux souris. Les gènes Mx, des souris codant pour des GTPase, suffisent à la protection et permettent une résistance contre le virus de l'influenza (Horisberger, 1995). Néanmoins, l'administration i.n. d'une souche de virus de l'influenza adaptée par plusieurs passages de suite cause habituellement une pneumonie aiguë entraînant la mort des souris (Shcheglovitova et Mentkevich, 1977). De ce fait, nous avons effectué 15 passages de suite chez les souris CD1 pour l'adapter et la rendre fatale pour cette espèce. Le nombre de passages effectués dépend de la souche et des mutations qu'elle doit obtenir pour acquérir une certaine virulence au nouvel hôte (Ward, 1997). En outre, 15 passages successifs chez la souris afin d'arriver à l'adaptation ne constituent pas une quantité énorme. Il arrive d'effectuer plus du double de ce nombre de passages. Entre autres, Rota et al. (1990) ont dû effectuer 44 passages avant l'obtention d'une souche H2N2 adaptée chez la souris entraînant donc la mort quelques jours après l'instillation. L'adaptation de la souche s'effectue en général par l'acquisition de mutations permettant l'augmentation de la virulence par la croissance de la pathogénicité (Brown, 1990; Brown et al., 2001). Dans notre cas, nous avons effectué les passages chez les souris CD-1, car elles sont exogames. La sensibilité et la mortalité constatées chez les souris CD-1 lors des passages ont trouvé confirmation chez les souris Balb/C par le calcul du LD50 mesuré chez ces dernières.

Habituellement, l'instillation de cinq fois LD50 doit entraîner la mort des souris dans les 10 jours après l'administration. Dans ce cas, la survie reflète l'habileté du système immunitaire de la souris à limiter la gravité de l'infection sachant que d'habitude, si l'infection n'est pas contrôlée, les souris meurent (Yetter et al., 1980). Ainsi, il nous est possible d'évaluer la protection engendrée par l'immunisation génétique administrée par voie i.m. de pRc/CMV2/M. Le défi létal est une technique régulièrement utilisée en laboratoire de recherche pour évaluer la protection suite à une immunisation anti-influenza: d'abord on adapte la souche, puis nous évaluons la protection sur une dizaine de souris par groupe (Neiryneck et al., 1999; Okuda et al., 2001; Rota et al., 1990; Ulmer et al., 1998).

Préalablement au défi, nous avons revérifié le titre Ac avec l'essai ELISA contre le virus SwQc91 (Tableau II) et confirmé les résultats précédents et leurs reproductibilités (Figures 13 et 14). La figure 15 représente la survie des souris suite à l'instillation de 5LD50 de la souche adaptée. Le résultat permet de reconnaître que les groupes expérimentaux immunisés avec le gène M ont connu un taux de survie entre 40 % et 50 % alors que les groupes témoins négatifs n'ont pas survécu. De cette façon, la réponse immunitaire détectée par ELISA (Tableau II) par suite de l'injection de pRc/CMV2/M détecté permet l'induction d'une protection potentielle. Ce résultat confirme celui obtenu par une autre étude (Okuda et al., 2001). Néanmoins, ces chercheurs ont aussi obtenu un taux de survie de 80 % par l'injection i.n. d'un vecteur codant pour les protéines M. En fait, la réponse immune induite par la voie i.n. est plus efficace que par la voie i.m. pour le gène M (Okuda et al., 2001). En effet, il est vrai qu'une approche distincte d'inoculation pour l'immunisation (Barry et Johnston, 1997) peut induire une certaine modulation de la réponse immune. Nous avons opté pour la voie i.m. car il s'agit d'une administration simple et qui active une réponse de type Th1 en immunisation génétique. Pourtant, Okuda et al. (2001) ont démontré que la voie i.n. est plus efficace par l'activation du tissu lymphoïde associé au médiastin et que cette activation est de taille. D'autre part, nous remarquons une diminution du taux de survie du groupe 1 par rapport aux autres groupes expérimentaux (2 et 3). Nous obtenons un taux de survie de 40 % pour le groupe 1, co-immunisé avec pRc/CMV2/M et pcDNA3/IL-2, mais de 50 % pour les groupes 2 et 3. Pourtant, nous ne croyons pas que cette différence soit significative, et nous ne la prenons pas en considération étant donné que chaque groupe contenait uniquement 10 souris. Évidemment, dans ce cas, une différence de 10 % représente uniquement la mortalité d'une souris de plus que les groupes 2 et 3.

Au départ, il n'est pas évident que l'immunisation d'un plasmide codant pour des protéines peu classiques comme les protéines M engendre une protection. D'ordinaire, en vaccinologie anti-influenza, on se sert des Ag HA et NA, soit les plus immunogènes et qui mettent les Anti-HA neutralisants à profit. Néanmoins, les vaccins classiques ne sont pas efficaces lors de l'apparition de nouveaux variants (Both et al., 1983; Chakraverty, 1993; Keitel et al., 2001). C'est pour cette raison que la recherche se tourne maintenant vers les protéines internes, restées relativement constantes depuis plus de 60 ans (Ito et al., 1991; Shu, Bean et Webster, 1993). De cette façon, les chercheurs espèrent que la réponse

immune induite, opérant sur des mécanismes immunologiques différents (sans la neutralisation du virus), induise une protection, et ce, pour différents variants viraux. D'ailleurs, la protéine NP (autre protéine interne) a démontré son efficacité contre un défi létal (Rhodes et al., 1993; Ulmer et al., 1993). Pourtant, elle ne permet pas l'induction d'Ac-neutralisants. Donc d'autres mécanismes immuns peuvent induire une protection en activant l'immunité à médiation cellulaire plus spécifiquement l'activation des cellules T CD4+ et T CD8+ (Epstein et al., 2000; Ulmer et al., 1998).

Il est possible d'expliquer la protection engendrée par l'immunisation génétique de pRc/CMV2/M par suite du défi chez les souris sur la base de plusieurs faits. D'abord, par la réponse humorale. En effet, d'habitude, lors d'une infection, les Ag du gène M (M1 et M2) induisent une réponse à médiation humorale, donc la production d'Ac anti-M1 et anti-M2. Étant donné que l'injection de pRc/CMV2/M nous a permis de produire des Ac spécifiques contre le virus SwQc91, il est logique de penser que le plasmide recombinant codant pour M1 et M2 a permis la production chez les souris immunisées des Ac anti-M1 et anti-M2. D'ordinaire, seuls les Ac anti-HA et les anti-NA s'associent à la résistance de l'infection de l'influenza chez l'humain et chez les animaux de laboratoire (Askonas et al., 1982). Pourtant, il faut noter que plusieurs études récentes ont démontré que les anti-M2 procuraient aussi une protection (Black, Rota et Gorodkova, 1993; Neiryck et al., 1999; Slepishkin et al., 1995; Treanor et al., 1990). On a démontré (Neiryck et al., 1999) que le transfert passif par l'injection de sérum anti-M2 permettait une protection, donc que les anti-M2 permettent l'élimination de virus sans l'induction de la réponse cellulaire. De plus, bien que M2 fasse partie des Ag « faibles », il est déjà candidat prometteur à l'élaboration de vaccins plus efficaces contre de nouveaux variants (Neiryck et al., 1999). En conséquence, il est possible que les Ac anti-M2 produits par notre immunisation fassent partie des éléments responsables de la protection obtenue (40 % à 50 %) par suite du défi. D'autre part, bien que l'immunisation génétique d'un plasmide codant uniquement pour la protéine M1 soit en mesure de produire des Ac anti-M1, les anti-M1 ne semblent pas induire de protection (Donnelly et al., 1997a). La protéine M1 ne constitue pas une bonne cible pour l'induction des Ac neutralisants, car elle se retrouve à l'intérieur du virus. D'ailleurs, Okuda et al. (2001) n'ont détecté aucune activité neutralisante à la suite de l'immunisation de souris avec un plasmide codant pour les protéines M. Sur cette base, il semble que l'activité neutralisante n'explique pas la protection engendrée par

l'immunisation. Par contre, cette différence peut expliquer en partie pourquoi la survie des groupes expérimentaux n'est pas de 100 % comme le témoin positif. La neutralisation du virus par les IgA, plus particulièrement les IgA anti-HA, ressort comme un élément important induisant l'inhibition de l'invasion du virus, et l'injection du virus complet aux souris met certainement en action ce mécanisme de défense.

Outre la réponse humorale, la réponse à la médiation cellulaire joue un rôle primordial relativement à la protection. Lors d'une véritable infection, les protéines M engendrent une immunité cellulaire cytotoxique responsable de la lyse des cellules infectées par le virus (Webster et Hinshaw, 1977; Reay et al., 1989). De plus, nous savons maintenant que l'injection d'un plasmide codant pour les protéines M active fortement les CTL (Okuda et al., 2001). L'activation des CTL constitue une étape importante dans l'élimination du virus (Flynn et al., 1998). De plus, les cellules T CD4+ et T CD8+ mises en action par l'administration du vecteur codant pour les protéines M jouent toutes deux un rôle important dans l'induction de la protection engendrée par l'immunisation du vecteur codant pour les protéines M (Okuda et al., 2001).

CONCLUSION

L'objectif de notre investigation consistait à évaluer le potentiel protecteur du gène M chez les souris. Pour arriver à nos fins, nous avons amplifié et cloné le gène M dans le vecteur d'expression pRc/CMV2. Tout d'abord, nous avons effectué l'injection i.m. du plasmide recombinant pRc/CMV2/M afin de mettre à l'épreuve sa capacité d'induire une réponse immune. Ensuite, l'administration du plasmide recombinant nous a permis d'apprécier sa valeur protectrice suite à une infection létale chez les souris. En même temps, nous avons co-administré le gène de l'IL-2 (pcDNA3/IL-2) afin de mettre à l'essai son pouvoir immunomodulateur en présence du plasmide recombinant pRc/CMV2/M.

Nous avons observé l'induction d'une réponse immune à la suite de l'injection du plasmide recombinant pRc/CMV2/M par la détection des Ac anti-M à l'aide de la technique ELISA. Les résultats obtenus nous ont permis de confirmer que le plasmide injecté par la voie i.m. peut stimuler une réponse humorale contre le virus de l'influenza.

Nous avons vérifié à l'aide d'un défi létal la protection engendrée par l'immunisation i.m. de pRc/CMV2/M, et constaté une protection de 50 % à la suite de l'administration aux souris du virus fatal.

D'autre part, ni le test ELISA et ni le défi létal ne nous a permis de remarquer respectivement une modulation de la réponse anti-M ou une augmentation de la protection par la co-injection du plasmide codant pour IL-2 (pcDNA3/IL-2) avec le plasmide pRc/CMV2/M.

Une autre investigation a eu lieu sur le potentiel du gène M comme vaccin. Dans ce cas, les résultats obtenus démontrent que l'administration d'un vecteur codant pour les protéines M entraîne une protection d'importance lors d'un défi létal face à des virus de l'influenza hétérologue (Okuda et al., 2001). Dans ce cas, la voie i.n. a également fait l'objet d'essais, et semble plus prometteuse que la voie i.m.; en effet, elle induit une protection de 80 % lors d'un défi létal chez les souris.

Étant donné les résultats, il serait maintenant intéressant de mettre à l'essai la protection conférée chez le porc à la suite d'une immunisation du même type par un défi. De cette façon, il serait concevable de parvenir à la fabrication d'un vaccin anti-influenza.

VI Bibliographie

ABBAS, A. K., A. H. Lichtman et S. Pober, 1994. Cellular and Molecular Immunology. Montréal : W. B. Saunders Company, 2^e édition.

ABAI, A. M., A. Kuwahara-Rundell, M. Margalith, J. Morrow, S. E. Parker, G. H. Rhodes, 1994. "Co-injection of the genes for interleukine-2 and antigen does not increase the humoral immune response". Dans : Norby, E., Brown, J. A., Chanock, R., Ginsberg, R. S (eds). Vaccine 94

AIR, G. M., W. G. Laver, 1989. "The neuraminidase of influenza virus". Proteins - Structure and Function Genetics, vol. 6, pp. 341-356

ALBO, C., A. Valencia, 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, pp. 3799-3806

ALLEN. H., J. McCauley, M. Waterfield, M. J. Gething, 1980. "Influenza virus RNA segment 7 has the coding capacity for two polypeptides". Virology, vol. 107, pp. 548-551

ALI, A., R. T. Avalos, E. Ponimaskin, D. P. Nayak, 2000. "Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein". Journal of Virology, vol. 74, pp. 8709-8719

ANDERSON, E. D., D. V. Mourich, S. C. Fahrenkrug, S. La Patra, J. Shepherd, J. A. Leong, 1996. "Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus". Molecular Marine and Biotechnology, vol. 6, pp. 114-122

ANTIBODIES. 1988. The laboratory Manual. Dans : Harlow, E.D., D. Lane (eds). Cold Spring Harbor Laboratory.

ARAGON, T., S. de la Luna, I. Novoa, I. L. Carrasco, J. Ortín, J. A. Nieto, 2000. "Eucaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus". Molecular Cell, Biology, vol. 6, pp. 6259-6268

ARAI, K. F. L., A. Miyajima, A. S. Miyatake, N. Arai, T. Tokota, 1990. "Cytokines: co-ordinators of immune and inflammatory responses". Annual Review of Biochemistry, vol. 59, pp. 783-836

ARORA D. J. S., P. Tremblay, R. Bourgault, S. Boileau S., 1985. "Concentration and purification of influenza virus from allantoic fluid". Anal Biochemistry, vol. 144, pp. 189-192

ARORA, D. J. S., N'Diaye, M., Dea, S., 1997. "Genomic study of hemagglutinins swine influenza (H1N1) viruses associated with acute and chronic respiratory diseases in pigs". Archives of Virology, vol. 142, pp. 401-412

ARORA, D. J. S., P. Tijssen, S. Dea, M. Henrichon, 1997. "Complete sequences of the neuraminidase genes of swine influenza viruses (H1N1) associated with respiratory disease in pigs". Virus Genes, vol. 14, pp. 251-254

ARRESE, M., A. Portela, 1996. "Serine 3 is critical for phosphorylation at the N-terminal end of the nucleoprotein of influenza virus A/Victoria/3/75". Journal of Virology, vol. 70, pp. 3385-3391

ASKONAS, B. A., A. J. McMichael, R. G. Webster, 1982. "The immune response to influenza viruses and the problem of protection against infection". Dans : Beare, A. S, (ed). Basic and Applied Influenza Research, Boca Raton, Fla. : CRC Press

BABIUK, L. A., 1999. "Broadening the approaches to developing more effective vaccines". Vaccine, vol. 17, pp. 1587-1595

BARKER, S. M., L. Hoyle, 1972. "The nature of the toxic reaction of influenza virus towards lung tissue". Journal of Hygiene, vol. 70, pp. 425-437

BARKER, W. H., J. P. Mullooly, 1980. "Impact of epidemic type A influenza in a defined adult population". American Journal of Epidemiology, vol. 112, pp. 798-811

BARKER, W. H., 1986. "Excess pneumonia and influenza associated hospitalization during influenza epidemics in the United States, 1970-78". American Journal of Public Health, vol. 76, pp. 761-765

BARRY, M. A., S. A. Johnston, 1997. "Biological feature of genetic immunization". Vaccine, vol. 15, pp. 788-791

BAUDIN, F., I. Petit, W. Weissenhorn, R. W. H. Ruigrok, 2001. "In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein". Virology, vol. 281, pp. 102-108

BAUMEGARTH, N., A. Kelso, 1996. "In vivo blockade of gamma interferon affect the influenza virus-induced humoral and the local cellular immune response in lung tissue". Journal of Virology, vol. 70, pp. 4411-4418

BEATON, A. R., R. M. Krug, 1986. "Transcription anti-terminaison during influenza viral template RNA synthesis require the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end". Proceedings of National Academy of Sciences USA, vol. 83, pp. 6282-6286

BELSHE, R. B., W. Gruber, P. M. Mendelman, H. B. Mehta, K. Mahmood, K. Reisinger, J. Treanor, K. Zangwill, F. G. Hayden, D. I. Bernstein, K. Kotloff, J. King, P. A. Piedra, S. L. Block, L. Yan, M. Wolff, 2000. "Correlates of immune protection induced by live, attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine". Journal of Infectious Diseases, vol. 181, pp. 1133-1137

BEVERIDGE, W. I. B., 1977. Influenza: The Last Great Plague. An Unfinished Story of Discovery. London UK: Heinemann Educational Books

BISWAS, S. K., Nayak, D. P., 1994. "Mutational analysis of conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1". Journal of Virology, vol. 68, pp. 1819-1826

BISWAS, S. K., P. L. Boutz, D. P. Nayak, 1998. "Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins". Journal of Virology, vol. 72, pp. 5493-5501

BIZEBARD, T., B. Gigant, P. Rigolet, B. Rasmussen, O. Diat, P. Bosecke, S. A. Wharton, J. J. Skehel, M. Knossow, 1995. "Structure of influenza virus haemagglutinin complexed with a neutralizing antibody". Nature, vol. 376, pp. 92-94

BLAAS, D., E. Patzelt, E. Kuechler, 1982a. "Cap-recognizing protein of influenza virus". Virology, vol. 116, pp. 339-348

BLAAS, D., E. Patzelt, E. Kuechler, 1982b. "Identification of cap binding protein of influenza virus". Nucleic Acids Research, vol. 10, pp. 4803-4812

BLACK, R. A., P. A Rota, N. Gorodkova, 1993. "Antibody response to the M2 protein of influenza A virus expressed in insect cells". Journal of General Virology, vol. 74, pp. 143-146

BLOK, V., Cianci, C., Tibbles, K. W., Inglis, S. C., Krystal, M., Digard, P., 1996. "Inhibition of the influenza virus RNA-dependent RNA polymerase by antiserum directed against the carboxy-terminal region of the PB2 subunit". Journal of General Virology, vol. 77, pp. 1025-1033

BOTH, G.W., M. J. Sleight, N. J. Cox, A. P. Kendal, 1983. "Antigenic drift in influenza virus H3 haemagglutinin from 1968 to 1980: Multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites". Journal of Virology, vol. 48, pp. 52-60

BOULOY, M., M. A. Morgan, A. J. Shatkin, R. M. Krug, 1979. "Cap and internal nucleotides of reovirus mRNA primers are incorporated into influenza viral complementary RNA during transcription *in vitro*". Journal of Virology, vol. 32, pp. 895-904

BOYCE, T. G., H. H., E. C. Hsu, Sannella, 1999. "Safety and immunogenicity of adjuvanted and unadjuvanted subunit influenza vaccines administered intranasally to healthy adults". Vaccine, vol. 18, pp. 82-88

BOYCE, T. G., W. C. Gruber, S. D. Coleman-Dockery, 2000. "Mucosal immune response to trivalent live attenuated intranasal influenza vaccine in children". Vaccine, vol. 19, pp. 217-226

BRAAM, J., I. Ulmanen, R. M. Krug, 1983. "Molecular model of eucaryotic transcription complex: Functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription". Cell, vol. 34, pp. 609-618

BRON, R., A. P. Kendal, H. D. Klenk, J. Wilschut, 1993. "Membrane role of the M2 protein in influenza virus fusion: effect of amantadine and monensin on fusion kinetic". Virology, vol. 195, pp. 808-811

BROWN, E. G., 1990. "Increased virulence of a mouse-adapted variant of influenza A/FM/1/47 virus is controlled by mutation in genome segments 4, 5, 7, and 8". Journal of Virology, vol. 64, pp. 4523-4533

BROWN, E. G., H. Liu, L. C. Kit, S. Baird, M. Nesrallah, 2001. "Pattern of mutation in the genome of influenza A virus on adaptation to increased virulence in the mouse lung: identification of functional themes". Proceedings of National Academy of Sciences USA, vol. 98, pp. 6883-6888

- BROWN, I. H., D. J. Alexander, P. Chakraverty, P. A. Harris, R. Manvell, 1994. "Isolation of an influenza A virus of unusual subtype (H1N7) from pigs in England, and the subsequent experimental transmission from pig to pig". Veterinary Microbiology, vol. 39, pp. 125-134.
- BROWN, I. H., T. R. Crawshaw, P. A. Harris, D. J. Alexander, 1998. "Detection of antibodies to influenza A virus in cattle in association with respiratory disease and reduced milk yield". Veterinary Record, vol. 143, pp. 637-638
- BRUNNER, J., M. Tsurudome, 1993. "Fusion protein membrane interaction as studied by hydrophobic labeling". Dans : Bentz, J (ed). Viral fusion mechanisms. Boca Raton, Fla.: CRL Press
- BUCHER, D. J., I. G. Kharitonov, M. Wajeed Khan, A. Palo, D. Holloway, A. Mikhail, 1987. "Detection of influenza viruses through selective adsorption and detection of the M-protein antigen". Journal of immunological methods, vol. 96, pp. 77-85
- BUI, M., G. Whittaker, A. Helenius, 1996. "Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins". Journal of Virology, vol. 70, pp. 8301-8401
- BUI, M., E. G. Wills, A. Helenius, G. R. Whittaker, 2000. "Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins". Journal of Virology, vol. 74, pp. 1781-1786
- BULLOUGH, P. A., F. M. Hughson, J. J. Skehel, D. C. Wiley, 1994. "Structure of influenza hemagglutinin at the pH of membrane fusion". Nature, vol. 371, pp. 37-43
- CASTRUCCI, M. R., I. Donatelli, L. Sidoli, G. Barigazzi, Y. Kawaoka, R. G. Webster, 1993. "Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs". Virology, vol. 193, pp. 503-506
- CAUX, C., B. Vanbervliet, C. Massacrier, M. Azyma, K. Okuma, L. L. Lanier, 1994. "B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells". Journal of Experimental Medicine, vol. 180, pp. 1841-1850
- CHAKRAVERTY, M., 1993. "Influenza activity-United States and world-wide, and composition of the 1993-94 influenza vaccine". Morbidity and Mortality Weekly Rep, vol. 42, pp. 177-180
- CHAMBER, T. M., V. S. Hinshaw, Y. Kawaoka, B. C. Easterday, R. G. Webster, 1991. "Influenza viral infection of swines in the United States 1988-1989". Archives of Virology, vol. 116, pp. 261-265
- CHEN, J., J. J. Skehel, D. C. Wiley, 1999. "N- and C-terminal residues combine in the fusion-pH influenza hemagglutinin HA2 subunit to form an N cap that terminates the triple-stranded coiled-coil". Proceedings of National Academy of Sciences USA, vol. 96, pp. 8967-8972
- CHEN, Z., S. Yasuhiro, M. Kazutishi, H. Asanuma, H. Takahashi, T. Iwasaki, Y. Suzuki, C. Aizawa, T. Kurata, S.-I. Tamura, 1998. "Comparison of the ability of viral protein-expressing plasmids to protect against influenza". Vaccine, vol. 16, pp. 1544-1549

- CHEN, Z., M. Kazutishi, H. Asanuma, H. Takahashi, T. Iwasaki, Y. Suzuki, C. Aizawa, T. Kurata, S.-I. Tamura, 1999. "Enhanced protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with both hemagglutinin- and neuraminidase-expressing". Vaccine, vol. 17, pp. 653-659
- CHEN, Z., Y. Li, R. M. Krug, 1999. "Influenza A virus NS1 protein targets poly (A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery". EMBO Journal, vol. 18, pp. 2273-2283
- CHEN, Z., S. Kadowaki, Y. Hagiwara, T. Yoshikara, K. Matsuo, T. Kurata, S. Tamira, 2000. "Cross-protection against a lethal influenza virus infection by DNA vaccine to neuraminidase". Vaccine, vol. 18, pp. 3214-3222
- CHIZHMAKOV, I. V., F. M. Geraghty, D. C. Ogden, A. Hayhurst, M. Antoniou, J. A. Hay. 1996. "Selective proton permeability and pH regulation of the influenza virus M2 channel expressed in mouse erythroleukaemia cells". Journal of Physiology, vol. 494, pp. 329-336
- CHOMCZYNSKI, P., N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochemistry, vol. 162, pp. 156-159
- CHOW, Y., W. Huang, Y. Chi, Y. Chu, M. Tao. 1997. "Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmid co-expressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2". Journal of Virology, vol. 71, pp. 160-178
- CHUN, J., 1919. "Influenza including its infection among pigs". National Medicine. Journal of China, vol. 5, pp. 34-44
- CLEMENTS, M. L., R. F. Betts, E. L. Tierney, B. R. Murphy, 1986. "Serum and nasal wash antibodies associated with resistance to experimental challenge with influenza A wild-type virus". Journal of clinical Microbiology, vol. 24, pp. 157-160
- CLEMENTS, M. L., 1992. "Influenza vaccines". Biotechnology, vol. 20, pp. 129-150
- COHEN, A. D., J. D. Boyer, D. Weiner, 1998. "Modulating the immune response to genetic immunization". FASEB Journal, vol. 12, pp. 1611-1626
- COLMAN, P. M., C. W. Ward, 1985. "Structure and diversity of influenza virus neuraminidase". Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 114, pp. 177-255
- COMPANS, R. W., N. J. Dimmock, 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, pp. 528-534
- COMPANS, R. W., 1973. "Influenza virus proteins. II. Association with components of the cytoplasm". Virology, vol. 51, pp. 56-70
- COUCH, R. B., J. A. Kasel, 1983. "Immunity to influenza in man". Journal of clinical Microbiology, vol. 37, pp. 529-549

COUCH, R. B., J. A. Kasel, W. P. Glenzen, Cate, T. R. Six, H. R. U. T. Tabet, A. L. Frank, S. B. Greberg, M. Zahradnick, W. A. Keitel, 1986. "Influenza: its control in persons and population". Journal of Infectious Diseases, vol. 153, pp. 431-440

COUCH, R. B. 1989. Immunization for prevention of influenza. Dans : Root, R. K., Warren, K. S., Giffiss. J. M., Sande, M. A (eds). New York : Churchill Livingstone

COX, G. J. M., T. J. Zamb, L. A. Babiuk, L. 1993. "Bovine herpesvirus 1: immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA". Journal of Virology, vol. 67, pp. 5664-5667

COX, J., A. Coulter, 1997. "Adjuvants-a classification and review of their modes of action". Vaccine, vol. 15, pp. 248-256

CRETESCU, L., A.S. Beare, G. C. Schild, 1978. "Formation of antibody to matrix protein in experimental human influenza A virus infection". Infection and Immunity, vol. 22, pp. 322-327

DAVEY, J., N. J. Dimmock, A. Colman, 1985. "Identification of the sequence responsible for nuclear accumulation of the influenza virus nucleoprotein in *Xenopus* oocytes". Cell, vol. 40, pp. 667-675

DAVIS, A. R., T. Bos, M. Ueda, D. P. Nayak, D. Doubenko, R. W. Compans, 1983. "Immune Response to human influenza virus hemagglutinin expressed in *Escherichia coli*". Gene, vol. 21, pp. 273-284

DAVIS, H. L., M. L. Michel, R. G. Whalen, 1993. "DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody". Human Molecular Genetics, vol. 2, pp. 1847-1851

DAVIS, H. L., M. L. Michel, M. Mancini, M. Schleef, R. G. Whalen, 1994. "Direct gene transfer in skeletal muscle: plasmid DNA-based immunization against the Hepatitis B virus surface antigen". Vaccine, vol. 12, pp. 1503-1509

DE BOER, G. F., W. Back, A. D. Osterhaus, 1990. "An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in human and various animal species". Archives of Virology, vol. 115, pp. 47-61

DE LA LUNA, S., P. Fortes, A. Beloso, J. Ortin, 1995. "Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs". Journal of Virology, vol. 69, pp. 2427-2433

DEA, S., R. Bilodeau, R. Sauvageau, C. Montpetit, G. P. Martinau, 1992. "Antigenic variation of swine influenza virus causing proliferative and necrotizing pneumonia in pigs". Journal Veterinary Diagnostic Investigation, vol. 4, pp. 380-392.

DOHERTY, P. C, 1993. "Virus infection in mice with targeted gene disruptions". Current Opinion of Immunology, vol. 5, pp. 479-483

DONNELLY, J. J., J. B. Ulmer, M. A. Liu, M. A., 1993. "Immunization with polynucleotides: a novel approach to vaccination". Immunology, vol. 2, pp. 20-26

DONNELLY, J. J., Friedman, A., Martinez, D., Montgomery, D.L., Shiver, J. W., Motzel, S. L., Ulmer, J. B., Liu, M. A., 1995. "Preclinical efficacy of prototype DNA vaccine: enhanced protection against antigenic drift in influenza virus". Nature Medicine, vol. 1, pp. 583-587

DONNELLY, J. J., J. B. Ulmer, M. A. Liu, 1996. "DNA vaccines". Life Science, vol. 60, pp. 163-172

DONNELLY, J. J., A. Friedman, J. B. Ulmer, M. A. Liu, 1997a. "Further protection against antigenic drift of influenza virus in ferret model by DNA vaccination". Vaccine, vol. 15, pp. 865-868

DONNELLY, J. J., J. B. Ulmer, J. W. Shiver, M. A. Liu, 1997b. "DNA vaccines". Annual Review of Immunology, vol. 15, pp. 617-648

DUFF, K. C., P. J. Gilchrist, A. M. Saxena, J. P. Bradshaw. 1994. "Neuro-diffraction reveals the site of amantadine blocked in the influenza A M2 ion-channel". Virology, vol. 202, pp. 287-293

EDWARDS, K. M., W. D. Dupont, M. K. Westrich, W. D. Jr. Plummern, P. S. Palmer, P. F. Wright, 1994. "A randomized controlled trial of cold-adapted and inactivated vaccines for the prevention of influenza A disease". Journal of Infectious Diseases, 1 vol. 69, pp. 68-76

ELLIS, J. S, Zambon, M. C., 2001. "Combined PCR-heteroduplex mobility assay for detection and differentiation of influenza A viruses from different animal species". Journal of Clinical Microbiology, vol. 39, pp. 4097-4102

ELTON, D., M. Simpson-Holley, K. Archer, L. Medcalf, R. Hallam, J. McCauley, P. Digard, 2001. "Interaction of influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway". Journal of Virology, vol. 75, pp. 408-419

ENAMI, K., Sato, T. A., Nakada, S., Enami, M., 1994. "Influenza virus NS1 protein stimulate translation of the M1 protein". Journal of Virology, vol. 68, pp. 1432-1437

ENAMI, M., K. Enami. 2000. "Characterization of influenza virus NS1 protein by using a novel helper-virus-free reverse genetic system". Journal of Virology, vol. 74, pp. 5556-5561

ENGEL, P., J. Gribben, J.G. Freeman, L. J. Zhou, Y. Nozawa, M. Abe, C. M. Nadler, H. Watasa, 1994. "The B7-2 (B70) co-stimulatory molecule expressed by monocytes and activated B lymphocytes is the CD86 differentiation antigen". Blood, vol. 84, pp. 1402-1410

EPSTEIN, S. L., J. A. Misplon, C. M. Laswon, E. K. Subbarao, M. Connors, B. R. Murphy, 1993. "β-2-Microglobulin-deficient mice can be protected against influenza A infection by vaccination with vaccinia-influenza recombinants expressing hemagglutinin and neuraminidase". Journal of Immunology, vol. 150, pp. 5484-5493

EPSTEIN, S. L., A. Stack, J. Misplon, C.-Y. Lo, H. Mostowski, J. Bennink, K. Subbaro, 2000. "Vaccination with DNA encoding internal proteins of influenza virus does not require CD8(+) cytotoxic T lymphocytes: either CD4(+) or CD8(+) T cells can promote survival and recovery after challenge". International Immunology, vol. 12, pp. 91-101

- ERTL, H. C. J., Z. Q. Xiang, 1996. "Genetic immunization". Viral Immunology, vol. 9, pp. 1-9
- FLEISCHER, B., H. Becht, R. Rott, 1985. "Recognition of viral antigens by human influenza A virus-specific T lymphocyte clones". Journal of Immunology, vol. 135, pp. 2800-2804
- FLO J, S. Tisminetzky, F. Baralle, 2000. "Modulation of immune response to DNA vaccine by co-delivery of co-stimulatory molecules". Immunology, vol. 100, pp. 259-267
- FLYNN, K. J., G. T. Belz, J. D. Altmann, R. Ahmed, D. L. Woodland, D. P. C. Doherty, 1998. "Virus-specific CD8+ T cells in primary and secondary influenza pneumonia". Immunity, vol. 8, pp. 683-689
- FOMSGAARD, A., H. V. Nielsen, N. Kirkby, K. Bryder, S. Corbet, C. Nielsen, J. Hinkula, S. Buus, 2000. "Induction of cytotoxic T-cell responses by gene gun DNA vaccination with minigenes encoding influenza A virus HA and NP CTL-epitopes". Vaccine, vol. 18, pp. 681-691
- FORTES, P., A. Beloso, J. Ortín, 1994. "Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks RNA nucleocytoplasmic transport". EMBO Journal, vol. 13, pp. 704-712
- FRANK, K. L., R. G. Webster, P. W. Glezen, J. R. Cate, 1981. "Immunogenicity of influenza AUSSR (H1N1) subunit vaccine in unprimed young adults". Journal of Medical Virology, vol. 7, pp. 135 -142
- FU, T.-M., L. A. Guan, A. Friedman, T. L. Schofield, J. B. Ulmer, M. A. Liu, J. J. Donnelly, 1999. "Dose dependence of CTL precursor frequency induced by a DNA vaccine and correlation with protective immunity against influenza virus challenge". Journal of Immunology, vol. 162, pp. 4163-4170
- FU, T. M., J. B., Ulmer, M. J., Caulfield, R. R. Deck, A. Friedman, S. Wang, X. Liu, J. J. Donnell, M. A. Liu, 1997. "Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes". Molecular Medicine, vol. 3, pp. 362-371
- FUJISAWA, S. H., M. Taniguchi, Y. Zinnaka, K. Nomoto, 1987. "Protective mechanisms against pulmonary infection with influenza virus. I. Relative contribution of polymorphonuclear leucocytes and alveolar macrophage to protection during the early phase of intranasal infection". Journal of General Virology, vol. 88, pp. 425-432
- FYNAN, E. F., R. G. Webster, D. H. Fuller, J. R. Haynes, J. C. Santoro, H. L. Robinson, 1993. "DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations". Proceedings of National Academy of Sciences USA, vol. 90, pp. 11478-11482
- GEISSLER, M., A. Gesien, K. Tokushige, J. R. Wand, 1997. "Enhancement of cellular and humoral immune Responses to hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokine-expressing plasmids". Journal of Immunology, vol. 158, pp. 1231-1237
- GIRARD, C., M. Morin, Y. Elazhary, 1992. "Experimentally-induced porcine proliferative and necrotizing pneumonia with an influenza A virus". Veterinary Research, vol. 130, pp. 206-216

- GLUCK, R., 1997. "Influenza immunization". Biologicals, vol. 25, pp. 221-225
- GÓMEZ-PURTAS, P., I. Mena, M. Castillo, A Vivo, E. Pérez Pastrana. A. Portela, 1999. "Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on the levels of viral proteins". Journal of General Virology, vol. 80, pp. 1635-1645
- GÓMEZ-PURTAS, P., C. Albo, E. Pérez Pastrana, A. Vivo, A. Portela, 2000. "Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding". Journal of Virology, vol. 74, pp. 11538-11547
- GORSE, G., E. Otto, C. Daughaday, 1997. "Influenza virus vaccination of patients with chronic lung disease". Chest, vol. 112, pp. 1221-1233
- GOTTSCHALK, A., 1957. "The specific enzyme of influenza virus and *Vibrio cholerae*". Biochemica et Biophysica Acta, vol. 23, pp. 645-646
- GOULD, K. G., H. Scotney, A. R. Townsend, J. Bastin, G. G. Brownlee, 1987. "Mouse H-2k restricted cytotoxic T cells recognize antigenic determinants in both the HA1 and HA2b subunit of the influenza A/PR/8/34 hemagglutinin". Journal of Experimental Medicine, vol. 166, pp. 693-701
- GREENSPANS, D., M. Krystal, S. Nakada, 1985. "Expression of influenza virus NS2 non-structural protein in bacteria and localization of NS2 in infected eucaryotic cells". Journal of Virology, vol. 54, pp. 833-843
- GREGERSEN, J. P., 2001. "DNA vaccine" Naturwissenschaften, vol. 87, pp. 504-513
- GRIFFIN, J. A., S. Basak, R. W. Compans, 1983. "Effect of hexose starvation and the role of sialic acid in influenza release". Virology, vol. 125, pp. 324-334
- GUAN Y, K. F. Shortridge, S. Krauss, P. H. Li, Y. Kawaoka Y, R. G. Webster, 1996. "Emergence of avian H1N1 influenza viruses in pigs in China". Journal of Virology, vol. 70, pp. 8041-8046
- HALL, R. M., G. M. Air, 1981. "Variation in nucleotide sequences encoding for the N-terminal regions of the matrix and non-structural proteins of influenza viruses". Journal of Virology, vol. 38, pp. 1-7
- HANKINS, R. W., K. Nagata, D. J. Bucher, S. Popple, A. Ishihama, 1989. "Monoclonal antibody analysis of influenza virus matrix protein epitopes involved in transcription inhibition". Virus Genes, vol. 3, pp. 111-126
- HANKINS, R. W., K. Nagata, A. Kato, A. Ishihama. 1990. "Mechanism of influenza virus transcription inhibition by matrix (M1) protein". Research in Virology, vol. 141, pp. 305-314
- HATADA, E., R. Fukuda, 1992. "Binding of influenza A virus NS1 proteins to dsRNA *in vitro*". Journal of General Virology, 7 vol. 3, pp. 3325-3329
- HATADA, E., S. Saito, N. Okishio, R. Fukuda, 1997. "Binding of the influenza virus NS1 protein to model genome RNAs". Journal of General Virology, vol. 78, pp. 1059-1063

- HAY, A. J., J. J. Skehel, J. McCauley, 1982. "Characterisation of influenza virus RNA complete transcripts". Virology, vol. 116, pp. 517-522
- HAY, A. J., 1992. The action of amantadine against influenza A virus: inhibition of the M2 ion channel protein. Seminars in Virology, vol. 3, pp. 21-30
- HAYDEN, F. G., R. Fritz, F. R. Scott, M. C. Lobo, W. Alvord, W. Stober, S. E. Staus, 1998. "Local and systemic cytokine responses during experimental human influenza A virus infection: relation to symptom formation and host defense". Journal of Clinical Investigations, vol. 101, pp. 643-649
- HAYNES, J. R., D. E. McCabe, W. F. Swain, G. Widera, J. T. Fuller, 1996. "Particle-mediated nucleic acid immunization". Journal of Biotechnology, vol. 44, pp. 37-42
- HEBERT, D., B. Foellmer, A. Helenius. 1995. "Glucose trimming and reglucosylation determine glyco-protein association with calnexin in the endoplasmic reticulum". Cell, vol. 81, pp. 425-433
- HEINEN, P. P., E. A. Boer-Luijtz, A. T. J. Bianchi, 2001. "Respiratory and systemic humoral and cellular immune responses of pigs to heterosubtypic influenza A virus infection". Journal of General Virology, vol. 82, pp. 2697-2707
- HELENIUS, A., 1992. "Unpacking the incoming influenza virus". Cell, vol. 69, pp. 577-578
- HEUSSER, C. H., C. L. Anderson, H. M. Grey, 1977. "Receptors for IgG: subclass specificity of receptor on different mouse cell types and the definition of two distinct receptors on a macrophage cell line". Journal of Experimental Medicine, vol. 145, pp. 1316-1327
- HIEBERT, S. W., M. A. Williams, 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, pp. 747-751
- HINSHAW, V. S., W. J. Bean, R. G. Webster, B. C. Easterday, 1978. "The prevalence of influenza viruses in swines and the antigenic and genetic relation of influenza viruses from man and swine". Virology, vol. 84, pp. 51-62
- HIRST, G. K., 1941. "Agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus". Science, vol. 94, pp. 22-23
- HOFFMAN, S. L., M. Sedegah, R. C. Hedstrom, 1994. "Protection against malaria by immunization with a *plasmodium yoelii circumsporozoite* protein nucleic acid vaccine". Vaccine, vol. 12, pp. 1529-1533
- HODDER, R. A., J. C. Gaydos, R. G. Allen, F. H. Top Jr., T. Nowosiwsky, P. K. Russell, P. K., 1977. "Swine influenza A at Fort-Dix, New-Jersey January-February, 1976". Extent of spread and duration of outbreak. Journal of Infectious Diseases, vol. 136, pp. S369-S375
- HONDA, A., K. Ueda, N. Nagata, A. Ishihama, 1988. "RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation". Journal of Biochemistry, vol. 102, pp. 1021-1026

- HORISBERGER, R. M., 1995. "Interferons, Mx genes, and resistance to influenza virus". American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, vol. 152, pp. S67-71.
- HUANG, T. S., P. Palese, M. Krystal, 1990. "Determination of influenza virus proteins required for genome replication". Journal of Virology, vol. 64, pp. 5669-5673
- HUANG P, H. Ni, G. Shen, H. Zhou, G. Peng, S. Liu, 2001. "Analysis of the 1991-2000 influenza epidemic in Guangdong Province, China". Southeast Asian Journal in Tropic Medicine Public Health, vol. 32, pp. 787-790.
- HUBER, V. C., J. M. Lynch, D. J. Bucher, J. Le, D. W. Metzger, 2001. "Fc Receptor-mediated phagocytosis makes a significant contribution to clearance of influenza virus infections". Journal of Immunology, vol. 166, pp. 7381-7388
- HUGHES, M. T., M. Matrosovich, M. E. Rodger, M. M^cGregor, Y. Kawaoka, 2000. "Influenza A virus lacking sialidase activity can undergo multiple cycles of replication in cell culture, egg or mice". Journal of Virology, vol. 74, pp. 5206-5212
- HULL, J. D., R. Gilmore, R. A. Lamb, 1988. "Integration of a small integral membrane protein, M2, of influenza virus into the endoplasmic reticulum: analysis of the internal signal-anchor domain of a protein with an ectoplasmic NH₂ terminus". Journal of Cell Biology, vol. 106, pp. 1489-1498
- INABA, K., J. P. Metlay, M. T. Crownley, R. M. Steinman, 1990. "Dendritic cells pulsed with protein antigens *in vitro* can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells *in situ*". Journal of Experimental Medicine, vol. 172, pp. 631-640
- INGLIS, S. C., R. A. Lamb, A. R. Carroll, B. W. J. Mahy, 1976. "Polypeptides specified by influenza virus genome. I. Evidence for eight distinct gene products specified by fowl plague virus". Virology, vol. 74, pp. 489-503
- INGLIS, S. C., C. M. Brown, 1981. "Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus". Nucleic Acids Research, vol. 9, pp. 2727-2740
- ITO, T., O. T. Gorman, Y. Kawaoka, W. J. Bean, 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, pp. 5491-5498
- ITO, T., J. N. Couceiro, S. Kelm, L. G. Baum, S. Krauss, M. R. Castrucci, I. Donatelli, H. Kida, J. C. Paulson, R. G. Webster, Y. Kawaoka, 1998. "Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential". Journal of Virology, vol. 72, pp. 7367-7373
- IWASAKI, A., B. J. Nicolas-Stiernholm, A. K. Chan, N. L. Beristein, B. H. Barbber, 1997. "Enhanced CTL responses mediated by plasmid DNA immunogens encoding co-stimulatory molecules and cytokines". Journal of Immunology, vol. 158, pp. 4591-4601
- JAMESON J, J. Cruz, F. A. Ennis, 1998. "Human cytotoxic T-lymphocyte repertoire to influenza A viruses". Journal of Virology, vol. 72, pp. 8682-8689

JIN , H., G. P. Leser, J. Xhang, R. A. Lamb, 1997. "Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase cytoplasmic tails control particle shape". EMBO Journal, vol. 16, pp. 1236-1247

JOHNSON, PP. A., M. A. Conway, J. Daly, C. Nicolson, J. Robertson, K. H. Mills, 2000. "Plasmid DNA encoding influenza virus haemagglutinin induces Th1 cells and protection against respiratory infection despite its limited ability to generate antibody responses". Journal of General Virology, vol. 81, pp. 1737-1745.

JUNE, C. H., J. A. Blueston, L. M. Nadler, C. B. Thompson, 1994. "The B7 and Cd28 receptor families". Immunology Today, vol. 15, pp. 321-331

JUSTEWICK, D. M., R. G. Webster, 1996. "Long-term maintenance of cell immunity to influenza virus hemagglutinin in mice following DNA-based immunization". Virology, 2 vol. 24, pp. 10-17

KADOWAKI, S., Z. Chen, H. Asanuma, C. Aizawa, T. Kurata, S. Tamura, 2000. "Protection against influenza virus infection in mice immunized by administration of hemagglutinin-expressing DNAs with electroporation". Vaccine, vol. 18, pp. 2779-2788.

KANDEL, R., K. L. Hartshorn, 2001. "Prophylaxy and treatment of influenza virus infection". Biodrugs, vol. 15, pp. 303-323

KEITEL, W. A., T. R. Cate, D. Nino, L. L. Huggins, H. R. Six, H. J. Quarles, R. B. Couch, 2001. "Immunization against influenza: comparison of various topical and parenteral regimens containing inactivated and/or live attenuated vaccines in healthy adults". Journal of Infectious Diseases, vol. 183, pp. 329-332

KIM, J. J., M. L. Bagarazzi, N. Trivedi, Y. Hu, Kazahaya, D. M. Wilson, Ciccarelli, M. A., Chattergoon, K. Dang, S. Mahalingam, A. A. Chalian, M. G., Agadjanyan, J. D. Boyer, B. Wang, D. B. Weiner, 1997. "Engineering of *in vivo* immune responses to DNA immunization via codelivery of costimulatory molecule genes". Nature Biology, vol. 15, pp. 641-646

KIM, J. J., N.N. Trivedi, L. K. Nottingham, L. Morrison, Y. H. Tsai, S. Mahalingam, K. Dang, L. Ahn, N. K. Doyle, D. M. Wilson, M. A Chattergoon, A. A. Chalian, A. A., J. D. Boyer, M. G. Agadjanyan, D. B. Weiner, 1998. "Modulation of amplitude and direction of *in vivo* immune responses by co-administration of cytokine gene expression cassettes with DNA immunogens". European Journal of Immunology, vol. 28, pp. 1089-1103

KINGSBURY, D. W., I. M. Jones, K. G. Murti, K., 1987. "Assembly of influenza ribonucleoprotein *in vitro* using recombinant nucleoprotein". Virology, vol. 156, pp. 396-403

KIPPS, T. J., P. Parham, J. Punt, L. A. Herzenberg, 1985. "Importance of immunoglobulin isotype in human antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity directed by murine monoclonal antibodies". Journal of Experimental Medicine, vol. 161, pp. 1-12

KLAVINSKIS, L. S., R. Geckeler, M. B. Oldstone, 1989. "Cytotoxic T lymphocyte control of acute lymphocytic choriomeningitis virus infection: interferon gamma, but not tumor necrosis factor α . displays antiviral activity *in vivo*". Journal of General Virology, vol. 70, pp. 3317-3325

KOBAYASHI, M., T. Toyoda, D. M. Adyshev, Y. Azuma, A. Ishihama, 1994. "Molecular dissection of influenza virus nucleoprotein: deletion mapping of the RNA binding domain". Journal of Virology, vol. 68, pp. 8433-8436

KODIHALLI S, D. M. Justewicz, L. V. Gubareva, R. G. Webster, 1995. "Selection of a single amino acid substitution in the hemagglutinin molecule by chicken eggs can render influenza A virus (H3) candidate vaccine ineffective". Journal of Virology, vol. 69, pp. 4888-4897

KODIHALLI, S., J. R. Haynes, H. L. Robinson, R. G. Webster, 1997. "Cross-protection among lethal H5N2 influenza viruses induced by DNA vaccine to the hemagglutinin". Journal of Virology, vol. 71, pp. 3391-3396.

KOEN, J. S., 1919. "A practical method for field diagnosis of swine diseases". American Journal of Veterinary Medicine, vol. 14, pp. 468-475

KRIEG, A. M., 1996. "Lymphocyte activation by CpG dinucleotide motifs in prokaryotic DNA". Trend Microbiology, vol. 4, pp. 73-76

KRUG, R.M., P. R. Etkind. 1973. "Cytoplasmic and nuclear virus-specific proteins in influenza virus-infected MDCK cells". Virology, vol. 56, pp. 334-348

KRUG, R.M., R. Soeiro, 1975. "Studies on the intranuclear localization of influenza virus-specific proteins". Virology, vol. 64, pp. 378-387

KRUG, R.M., F. V. Alonso-Caplen, I. Julkunen, M. G. Katze, 1989. "Expression and replication of the influenza virus genome". Dans : Krug, R.M (ed). The Influenza Virus. New York : Plenum Press

LAMB, R. A., P. W. Choppin, P. W., 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, pp. 503-519

LAMB, R. A., P. W. Choppin, 1977. "Synthesis of influenza virus polypeptides in cells resistant to alpha-amanitin: evidence for involvement of cellular RNA polymerase II in virus replication". Journal of Virology, vol. 23, pp. 816-819

LAMB, R. A., Lai, C.-J., 1980. "Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned DNA coding for two overlapping nonstructural proteins of influenza virus". Cell, vol. 21, pp. 475-485

LAMB, R. A., C.-J.Lai, 1981. "Conservation of the influenza virus membrane protein (M1) amino acid sequence and open reading frame of RNA segment 7 encoding a second protein (M2) in H1N1 and H3N2 strains". Virology, vol. 112, pp. 746-751

LAMB, R. A., C.-J. Lai, P. W. Choppin, 1981. "Sequence of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins". Proceedings of National Academy of Sciences USA, vol. 78, pp. 4170-4174

LAMB, R. A., P. W. Choppin, 1983. "The gene structure and replication of influenza virus". Annual review of Biochemistry, vol. 52, pp. 467-506

LAMB, R. A., S. L. Zebedee, C. D. Richardson, 1985. "Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface". Cell, vol. 40, pp. 627-633

LAMB, J. R., A. J. McMichael, J. Rothbard, 1987. J. B. "T-cell recognition of influenza viral antigens". Human Immunology, vol. 19, pp. 79-89

LAMB, R. A., R. M. Krug, 2001. Orthomyxoviridae: the virus and their replication. Dans : Field, B. N., Knipe, D. M., Howley, P.M., et al. (eds), Fields virology. Philadelphia: Lippincott-Raven

LATHAM, T., J. M. Galarza, 2001. "Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four proteins". Journal of Virology, vol. 75, pp. 6154-6165

LAVER, W. G., R. C. Valentine, 1969. "Morphology of isolated hemagglutinin and neuraminidase subunits of influenza virus". Virology, vol. 38, pp. 105-119

LERNER, R. A., 1983. "Synthetic vaccines". Scientific American, vol. 248, pp. 66-74

LEITNER, W. W., H. Ying, N. P. Restifo, 2000. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects". Vaccine, vol. 18, pp. 765-777

LEVI, R., E. Aboud-Pirak, C. Leclerc, G. H. Lowell, R. Arnon, 1995. "Intranasal immunization of mice against influenza with synthetic peptides anchored to proteosomes". Vaccine, vol. 13, pp. 1353-1359

LICHENG, S., D. F. Q, Summers, J. M. Peng, J. 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, pp. 38-47

LIGONDÉ, A., 2000. Immunisation génétique anti-BLV : Effet de la co-injection du gène codant pour l'IL-2 sur la réponse immunitaire humorale. Mémoire de Maîtrise. Institut National de la Recherche Scientifique, Institut Armand Frappier, Université du Québec

LIM YK, A. Takada, T. Tanizaki, H. Ozaki, K. Okazaki, H. Kida, 2001. "Mucosal vaccination against influenza: protection of pigs immunized with inactivated virus and ether-split vaccine". Japon Journal of Veterinary Research, vol. 48, pp. 97-203

LIU, C., M. C. R. W. Eichelberger, G. M. Compans, 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, pp. 1099-1106

LIU, M. A., 1998. "Vaccine development". Nature Medicine, vol. 4, pp. 515-519

LU, Y., X. Y. Qian, X. Y. R. M. Krug. 1994. "The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing". Genes and development, vol. 8, pp. 1817-1828

- LU, Y., M. Wambach, Katze, 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, pp. 222-228
- LUO, G. X., W. Luytjes, M. Enami, P. Palese, 1991. "The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure". Journal of Virology, vol. 65, pp. 2861-2867
- MACKLIN MD, 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, pp. 1491-1496
- MAHY, B.W.J., 1983. "Mutants of influenza virus". Dans : P. Palese and D. W. Kingsbury (Eds). Genetic of influenza viruses. Vienna, Austria: Springer-Verlag
- MANICKAN, E., K. L. Karem, B. T. Rouse, 1997. "DNA vaccines: a modern gimmick or a boon to vaccinology?". Critical Reviews in Immunology, vol. 17, pp. 139-154
- MARIÓN, R. M., T. Aragón, A. Beloso, A. Nieto, J. Ortin, 1997. "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, pp. 4271-4277
- MARSH, M., A. Pelchen-Matthews, 1994. "The endocytic pathway and virus entry". Dans : Wimmer (ed). Cellular Receptors for Animal Viruses. New York: Cold Spring Harbor Press
- MARTIN, K., A. Helenius, 1991. "Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus". Journal of Virology, vol. 65, pp. 232-244
- MARTIN, J., S. Wharton, Y. P. Lin, D. K. Takemoto, J. J. Skehel, D. C. Wiley, D. A. Steinhauer, 1998. "Studies of the binding properties of influenza hemagglutinin receptor-site mutants". Virology, vol. 241, pp. 101-111
- MATROSOVICH, M., A. Tuzikov, N. Bovin, A. Gambaryan, A. Klimov, M. R. Castrucci, I. Donatelli, Y. Kawaoke, Y., 2000. "Early alteration of the receptor-binding properties of H1, H2 and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals". Journal of Virology, vol. 74, pp. 8502-8512
- MAZENAC, M. B., Y. T. Huang, S. W. Pimplikar, 1996. "Mechanisms of inactivation of respiratory viruses by IgA, including intraepithelial neutralization". Seminars in Virology, vol. 7, pp. 285-292
- MCBEAN, MA., D. J. Babish., J. L. Warren, 1993. "The impact and cost of influenza in the elderly". Archives of International Medicine, vol. 153, pp. 2105-2140
- MCCLELLAND, L., R. Hare, 1941. "The absorption of influenza virus by red cells and a new *in vitro* method of measuring antibodies for influenza virus". Canadian Journal of Public Health, vol. 32, pp. 530-538

- MCDONNELL, W. M., F. K. Askari, 1996. "Molecular medicine-DNA vaccines". New England Journal of Medicine, vol. 334, pp. 42-45
- M^CMICHAEL, A. J., F. M. Gotch, 1989. "Recognition of influenza virus by human cytotoxic lymphocytes". Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 257, pp. 109-114
- MENA, I., E. Jambrina, C. Albo, B. Perales, J. Ortin, M. Arrese, D. Vallejo, A. Portela, 1999. "Mutational analysis of influenza A virus nucleoprotein: identification of mutations that affect RNA replication". Journal of Virology, vol. 73, pp. 1186-1194
- MENDOZA, R. B., M. J. Cantwell, T. J. Kipps, 1997. "Immunostimulatory effects of a plasmid expressing CD40 ligand (CD154) on gene immunization". Journal of Immunology, vol. 159, pp. 5777-5781
- MITNAUL, L., M. R. Castrucci, K. G. Murti, Y. Kawaoka, 1996. "The cytoplasmic tail of influenza A virus neuraminidase (NA) affects NA incorporation into virions morphology, and virulence in mice but is not essential for virus replication". Journal of Virology, 70, pp. 873-879
- MOLDOVEANU Z, L. Love-Homan, W. Q. Huang, A. M. Krieg, 1998. "CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus". Vaccine, vol. 16, pp. 1216-1224
- MONTGOMERY, D. L., J. B. Ulmer, J.J. Donnelly, M. Liu, 1997. "DNA vaccines". Pharmacology and therapeutic, vol. 74, pp. 195-205
- MOR, G., 1998. "Plasmide DNA: a new era in vaccinology". Biochemical Pharmacology, vol. 55, pp. 1151-1153
- MORGAN, D. A., F. W. Ruscetti, R. Gallo, 1976. "Selective *in vitro* growth of T lymphocytes from normal human bone marrows". Science, vol. 193, pp. 1007-1008
- MORIN, M., J. B. Phaneuf, R. Sauvageau, F. Difranco, G. Marsolais, A. Boudreault, 1981. "An epizootic of swine influenza in Quebec". Canadian Veterinary Journal, vol. 22, pp. 204-205
- MORIN, M., C. Girard, Y. Elazhary, R. Fajardo, R. Drolet, A. Lagacé, 1990. "Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: A newly recognized disease". Canadian Veterinary Journal, vol. 31, pp. 837-839
- MOULD, J. A., H.-C. Li, C.S. Dudlak, 2000. "Mechanism for proton conduction of the M(2) ion channel of influenza A virus". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, pp. 8592-8599
- MOZDZANOWSKA, K.M., K. Maiese, M. Furchner, W. Gerhard, 1999. "Treatment of influenza virus-infected SCID mice with non-neutralizing antibodies specific for the transmembrane proteins matrix 2 and neuraminidase reduce the pulmonary virus titer but fail to clear the infection". Virology, vol. 254, pp. 138-146
- MOZDZANOWSKA, K.M., K. Maiese, W. Gerhard, 2000. "Th cell-deficient mice control influenza virus infection more effectively than Th- and B cell-deficient mice: evidence for a Th-

independent contribution by B cells to virus clearance". Journal of Immunology, vol. 164, pp. 2635-2640

MURPHY, B. R., D. L. Nelson, P. F. Wright, 1982. "Secretory and systemic immunological response in children infected with live attenuated influenza A virus vaccines". Infection and immunity, vol. 36, pp. 1102-1108

MURPHY, B. R., M. L. Clement, 1989. "The systemic and mucosal immune response of humans to influenza A virus". Dans : Mestecky, J., McGhee, J. (eds). Current topics microbiology and Immunology. New York: Springer-Verlag

MURTI, K. D., R. G. Webster, 1986. "Distribution of hemagglutinin and neuraminidase on influenza virions as revealed by immunoelectron microscopy". Virology, vol. 149, pp. 36-43

NAKAJIMA, K., S. Nakajima, K. F. Shortridge, A. P. Kendal, 1982. "Further genetic evidence for maintenance of early Hong Kong-like influenza A (H3N2) strains in swine until 1976". Virology, vol. 116, pp. 562-572.

NARAYAN, P., D. F. Ayers, F. M. Rottman, P. A. Moroney, T. W. Nilsen, 1987. "Unequal distribution of N6-methyladenosine in influenza virus mRNAs". Molecular Cell Biology, vol. 7, pp. 1572-1575

NEIRYNCK, S., T. Deroo, X. Saelens, P. Valandschoot, W. M. Jou, W. Fier, 1999. "A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein". Nature Medicine, vol. 5, pp. 1157-1163

NEMEROFF, M. E., S. M. L. Barabino, Y. Li, W. Keller, 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, pp. 991-1000

NERMUT, M. V., 1972. "Further investigation on the fine structure of influenza virus". Journal of General Virology, vol. 17, pp. 317-331

NEROME, K., T. Yoshioka, M. Ishida, K. Okuma, Y. Oka, T. Kataoka., A. Inoue, A. Oya, 1990. "Development of a new type of influenza subunit vaccine made by muramyldipeptide-liposome: enhancement of humoral and cellular immune responses". Vaccine, vol. 8, pp. 503-509

NEROME K, M. Ishida, A. Oya, C. Kanai, K. Suwicha, 1982. "Isolation of an influenza H1N1 virus from a pig". Virology, vol. 117, pp. 485-489

NEUBERGER, M. S., K. Rajewsky, 1981. "Activation of mouse complement by monoclonal mouse antibodies". European Journal of Immunology, vol. 11, pp. 1012-1020

NEUMANN, G., M. R. Castrucci, Y. Kawaoka, 1997. "Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein". Journal of Virology, vol. 71, pp. 9690-9700

NEUMANN, G., M. T. Hughes, Y. Kawaoka, 2000. "Influenza A virus proteins mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1". EMBO Journal, vol. 19, pp. 6751-6758.

NORMAN, J. A., P. Hobart, M. Manthorpe, P. Felgner, C. Wheeler, 1997. "Development of improved vectors for DNA-based immunization and other gene therapy applications". Vaccine, vol. 15, pp. 553-555

NOVAK, M., Z. Moldoveanu, D. P. Schaferm, J. Mestecky, R. W. Compans, 1993. "Murine model for evaluation of protective immunity to influenza virus". Vaccine, vol. 11, pp. 55-60

ODAGIRI, T., K. Tobita, 1990. "Mutation in NS2, a non-structural protein of influenza A virus, extragenetically cause aberrant replication and expression of PA gene and leads to generation of defective interfering particles". Proceedings of National Academy of Sciences USA, vol. 87, pp. 5988-5992

OKADA, A., T. Miura, H. Takeuchi, 2001. "Protonation of histidine and histidine-tryptophane interaction of M2 ion channel from influenza A virus". Biochemistry, vol. 40, pp. 6053-6060

OKUDA, K., A. Ihata, S. Watabe, E. Okada, T. Yamakawa, K. Hamajima, J. Yang ,N, Ishii, M. Nakazawa, K. Okuda, K. Ohnari, K. Nakajima, K. Q. Xin KQ., 2001. "Protective immunity against influenza A virus induced by immunization with DNA plasmid containing influenza M gene". Vaccine, vol. 19, pp. 3681-3691

OLSEN, C. W., 2000. "DNA vaccination against influenza viruses: a review with emphasis on equine and swine influenza". Veterinary Microbiology, vol. 74, pp. 149-164

OLSEN, C. W., 2002. "The emergence of novel swine influenza viruses in North America". Virus Research, vol. 85, pp. 199-210

O'NEILL, R. E., R. Jaskunas, G. Blobel, P. Palese, 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, pp. 22701-22704

O'NEILL, R. E., J. Talon, P. Palese, 1998. "The influenza virus NEP (NS2 protein) mediate the nuclear export of viral ribonucleoprotein". EMBO Journal, vol. 17, pp. 288-296

ORTÍN, J., C. Martínez, L. Del Rio, M. Dávila, C. López-Galíndez, N. Villanueva, E. Domingo, 1983. "Evolution of the nucleotide sequence of influenza virus RNA segment 7 during drift of the H3N2 subtype". Gene, vol. 23, pp. 233-239

PAK, C. C., M. Krumbiegel, R. Blumenthal, 1994. "Intermediates in influenza virus PR/8 haemagglutinin-induced membrane fusion". Journal of General Virology, vol. 75, pp. 395-399

PALESE, P., K. Tobita, M. Ueda, R. W. Compans, 1974. "Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase". Virology, vol.61, pp. 397-410

PARDOLL, D.M., A. M. Berkerleg, 1995. "Exposing the immunology of naked DNA vaccines". Immunity, vol. 3, pp. 165-169

PARK, Y. W., M. Katze, 1995. "Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequence and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation". Journal of Biological Chemistry, vol. 270, pp. 28433-28439

PATTNAIK, A. K., D. J. Brown, D. P. Nayak, 1986. "Formation of influenza virus particles lacking hemagglutinin on the viral envelope". Journal of Virology, vol. 60, pp. 994-1001

PERALES, B., J. J. Sanz-Ezquerro, P. Gastaminza, J. Ortega, J. F. Santaén, J. Ortín, A. Nieto, 2000. "The replication activity of influenza virus polymerase is linked to the capacity of PA subunit to induce proteolysis". Journal of Virology, vol. 74, pp. 1307-1312

PEREZ, D. R., R. O. Donis, 1998. "The matrix 1 protein of Influenza A virus inhibits the transcriptase activity of a model influenza reporter genome *in vivo*". Virology, vol. 249, pp. 52-61

PERTMER, T. M., A. E. Oran, J. M. Moser, C. A. Madorin, H. L. Robinson, 2000. "DNA vaccines for influenza virus: differential effects of maternal antibody on immune responses to hemagglutinin and nucleoprotein". Journal of Virology, vol. 74, pp. 7787-7793

PINTO, L. H., L. H. Holsinger, R. A. Lamb, 1992. "Influenza virus M2 protein has ion channel activity". Cell, vol. 69, pp. 517-528

PLOTCH, S. J., M. Bouloy, I. Ulmanen, 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, pp. 847-858

POCH, O., I. Sauvaget, M. Delarue, N. Tordo, 1989. "Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding element". EMBO Journal, vol. 8, pp. 3867-3874

PONS, M. W., L. T. Schulze, G. K. Hirst, R. Hauser, 1969. "Isolation and characterization of ribonucleoprotein of influenza virus". Virology, vol. 39, pp. 250-259

POTTER, C. W., J. S. Oxford, 1979. "Determinants of immunity to influenza infection in man". British Medicine Journal, vol. 5, pp. 69-75

PRITLOVE, D. C., L. L. Poon, J. Devenish, M. B. Leahy, 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, pp. 109-114

PRIVALSKY, M. L., E. E. Penhoet, 1978. "Influenza virus proteins: identity, synthesis, and modification analyzed by two-dimensional gel electrophoresis". Proceedings of National Academy of Sciences USA, vol. 75, pp. 3625-3629

PROKUDINA-KANTOROVICH, E. N., N. P. Semenova, 1996. "Intracellular oligomerization of influenza virus nucleoprotein". Virology, vol. 223, pp. 51-56

QIU, Y., 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, vol. 68, pp. 2425-2432

- QIU, Y., M. Nemeroff, R. M. Krug, 1995. "The influenza virus NS1 protein binds to specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interaction during splicing". RNA, vol.1, pp.304-316
- RAZ, R., J. E. Durbin, D. E. Levy, 1994. "Acute phase response factor and additional members of the interferon-stimulated gene factor 3 family integrate diverse signals from cytokines, interferons, and growth factors". Journal of Biological Chemistry, vol. 269, pp. 24391-24395.
- REAY, PP. A., I. M. Jones, F. M. Gotch, A. J. McMichael, G. Brownlee, 1989. "Recognition of PB1, neuraminidase, and matrix proteins of influenza virus A/NT/60/68 by cytotoxic T lymphocytes". Virology, vol. 170, pp. 477-485
- REID, A, H., T. G. Fanning, J. V. Hultin, J. K. Taubenberger, 1999. "Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene". Proceeding of National Academy of Sciences of USA, vol. 96, pp. 1651-1656
- RHODES, G. H., V. J. Dwarki, A. M. Abai, J. Felgner, P. L. Felger, S. H. Gromkowski, S. E. Parker, 1993. Injection of expression vectors containing viral genes induces cellular, humoral, and protective immunity. Dans : Charnock, R. M., Brown, F., Ginsberg, H. S Norrby, E. (eds). Vaccine 93
- RICHARDSON, J. C., R. K. Akkina, 1991. "NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells". Archives of Virology, vol. 116, pp. 69-80
- ROBERTSON, J. S., M. Shubert, R. A. Lazzarini. 1981. "Polyadenylation sites for influenza mRNA". Journal of Virology, vol. 38, pp. 157-163
- ROBERTSON, J. S, J. S. Bootman, R. Newman, J. S. Oxford, R. S. Daniels, R.G. Webster, G.C. Schild, 1987. "Structural changes in the haemagglutinin which accompany egg adaptation of an influenza A(H1N1) virus". Virology, Vol. 160, pp. 31-37.
- ROBERTSON, J. S., C. Nicolson, J. S. Bootman, D. Major, E. W. Robertson, J. M. Wood, 1991. "Sequence analysis of the haemagglutinin (HA) of influenza A (H1N1) viruses present in clinical material and comparison with HA of laboratory-derived virus". Journal of General Virology, vol.72, pp. 2671-2677
- ROBINSON, H. L., S. Lu, D. M. Feltquate, C. T. Torres, J. Richmond, C. M. Boyle, M. J. Morin, J. C. Santoro, R. G. Webster, D. Montefiori, Y. Yasutomi, N. L. Letvin, K. Manson, M. Wyand, J. R. Haynes, 1996. "DNA vaccines". AIDS Research Human Retroviruses, vol. 12, pp. 455-457
- ROHM, C., N. Zhou, J. Suss, J. Mackenzie, R. G. Webster, 1996. "Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: for determination of influenza A subtypes". Virology, vol. 217, pp. 508-516
- ROSSEN, R. D., W. T. Butler, R. H. Waldman, R. H. Alford, R. B. Hornick, Y. Togo, J. A. Kasel, 1970. "The proteins in nasal secretion. II. A longitudinal study of IgA and neutralizing antibody levels in nasal washing from men infected with influenza virus". JAMA, vol. 211, pp. 1157-1161

- ROTA, PP. A., B. K. De, M. Shaw, R. A. Black, W. C. Gamble, A. P. Kendal, 1990. "Comparison of inactivated, live and recombinant DNA vaccine against influenza virus in mouse model". Virus Research, vol. 16, pp. 83-94
- ROY, A.-M. M., J. S. Parker, R. C. Parrish, G. R. Whittaker, 2000. "Early stages of influenza virus entry into Mv-1 lung cells: involvement of dynamine". Virology, vol. 267, pp. 17-28
- RUIGROK, R. W. H., L. J. Calder, S. A. Wharton, 1989. "Electron microscopy of the influenza virus submembrane structure". Virology, vol. 173, pp. 311-316
- RUIGROK, R. W. H., F. Baudin, 1995. "Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that are indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles". Journal of General Virology, vol. 76, pp. 1009-1014
- RUIGROK, R. W. H., 1998. "Structure of influenza A, B and C virus". Dans : Nicholson, K. G., Webster, R. G., Hay, A. J, (eds). Textbook of influenza. Oxford : Blackwell Science
- RUIGROK, R.W. H., P. C. Barge, P. Durrer, J. Brunner, K. Ma, G. R. Whittaker, 2000. "Membrane interaction of influenza virus M1 protein". Virology, vol. 267, pp. 289-298
- RUSSELL, S. M., 1977. "A mouse model of influenza protection". Developments in Biological Standardization, vol. 39, pp. 397-403
- SANGER, F., G. M. Air, B. G. Barrell, N. L. Brown, A. R. Coulson, C. A. Fiddes, C. A. Hutchison, M. Slocombe, M. Smith, 1977. "Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA". Nature, vol. 265, pp. 687-695
- SANZ-EZQUERRO, J. J., S. de la Luna, J. Ortín, A. Nieto, 1995. "Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of co-expressed proteins". Journal of Virology, vol. 69, pp. 2420-2426
- SANZ-EZQUERRO, J. J., T. Zurcher, S. de la Luna, J. Ortín, A. Nieto, 1996. "The amino-terminal one-third of influenza virus PA protein is responsible for the induction of proteolysis". Journal of Virology, vol. 70, pp. 1905-1911
- SATO, S. B., K. Kawasaki, S.-I. Ohnishi, 1983. "Haemolytic activity of influenza virus haemagglutinin glycoproteins activated in mildly acidic environment". Proceedings of National Academy of Sciences USA, vol. 80, pp. 3153-3157
- SCHERLE, PP. A., G. Palladino, W. Gerhard, 1992. "Mice can recover from pulmonary influenza virus infection in the absence of class I-restricted cytotoxic T cells". Journal of Immunology, vol. 148, pp. 212-223
- SCHIMID, S. L., 1997. "Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process". Annual Review of Biochemistry, vol. 66, pp. 511-548

SCHNURRENBERGER, P. R., G. T. Woods, R. J. Martin, 1970. "Serologic evidence of human infection with swine influenza virus". American Review in Respiratory Diseases, vol. 102, pp. 356-361.

SCHOLTISSEK, C., V. S. Hinshaw, C. W. Olsen, 1998. "Influenza in pig and their role as the intermediate host". Dans : Nichol, K.U., Webster, R. G., Hsu, A. J., (eds). Textbook of Influenza. Oxford : Blackwell Sciences

SCHUBBERT, R., D. Renz, B. Schmitz, W. Doerfler, 1997. "Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA". Proceedings of National Academy of Sciences USA, vol. 94, pp. 961-966

SCHULMAN, J. L., M. Khakpour, E. D. Kilbourne, 1968. "Protective effects of specific immunity to the viral neuraminidase on influenza virus infection of mice". Science, vol. 2, pp. 778-786

SCHULTZ, U., W. M. Fitch, S. Ludwig, J. Mandler, C. Scholtissek, 1991. "Evolution of pig influenza viruses". Virology, vol. 183, pp. 61-73

SEDER, R. A., W. E. Paul, 1994. "Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells". Annual Review in Immunology, vol. 12, pp. 635-673.

SHA, K., M. J. Vincent, R. W. Compans, 1999. "Enhancement of mucosal immune response to the influenza virus HA protein by alternative approaches to DNA immunization". Immunology, vol. 200, pp. 21-30

SHAPIRO, G. I., Krug, R. M., 1988. "Influenza virus RNA replication *in vitro*: Synthesis of viral template RNAs and virion RNA in absence of an added primer". Journal of Virology, vol. 62, pp. 2285-2290

SHCHEGLOVITOVA, O.N., L. M. Mentkevich, 1977. "The course of influenza infection in mice with graft-versus-host reaction". Acta Virology, vol. 21, pp. 469-473

SHIBATA, S., F. Yamamoto-Goshima, K. Maeno, T. Hanaichi, Y. Fujita, K. Nakajima, M. Imai, T. Komatsu, S. Sugiura, 1993. "Characterization of a temperature-sensitive influenza B virus mutant defective in neuraminidase". Journal of Virology, vol. 67, pp. 3264-3273

SHIMIZU, K., H. Handa, S. Nakada, K. Nagata, 1994. "Regulation of influenza virus RNA polymerase activity by cellular and viral factors". Nucleic Acids Research, vol. 22, pp. 5047-5053

SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1992. A compendium of methods from Current Protocols in Molecular Biology. Dans : Wiley, J., R.E. Kingston, D. Moor, F. M. Ausubel (eds). Wiley

SHU, L. L., W. J. Bean, R. G. Webster, 1993. "Analysis of the evolution and variation of the human influenza A virus nucleoprotein gene from 1933 to 1990". Journal of Virology, vol. 67, pp. 2723-2729

SKEHEL, J. J., 1972. "Polypeptide synthesis in influenza virus-infected cells". Virology, vol. 49, pp. 23-36

SKEHEL, J. J., M. D. Waterfield, 1975. "Studies on primary structure of the influenza virus hemagglutinin". Proceedings of National Academy of Sciences USA, vol. 72, pp. 93-97

SKEHEL, J. J., T. Bizebard, pp. A. Bullough, F. M. Hughson, M. Knossow, D. A. Steinhauer, S. A. Wharton, D. C. Wiley, 1995. "Membrane fusion by influenza virus". Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, vol. LX, pp. 573-580

SKEHEL, J. J., D. C. Wiley, 2000. "Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin". Annual Review of Biochemistry, vol. 69, pp. 531-569

SLEPUSHKIN, V. A., J. M. Katz, R. A. Black, W. C. Gamble, P. A. Rota, N. J. Cox, 1995. "Protection of mice against influenza A virus challenge by vaccination with baculovirus expressed M2 protein". Vaccine, vol. 13, pp. 1399-1402

SMITH, D. J, S. Forrest, D. H. Ackley, A. S. Perelson, 1999. "Variable efficacy of repeated annual influenza vaccination". Proceeding National Academy of Sciences USA, vol. 96, pp. 14001-14006

SMITH, G. L., Hay, A. J., 1982. "Replication of the influenza virus genome". Virology, vol. 118, pp. 96-108

SMITH, G. L., J. Z. Levin, P. Palese, B. Moss, 1987. "Synthesis and cellular location of the ten influenza polypeptides individually expressed by recombinant vaccinia viruses". Virology, vol. 160, pp. 336-345

SPOONER L. L. R., R. D. Barry, 1977. "Participation of DNA-dependent RNA polymerase 2 in replication of influenza virus". Nature, vol. 268, pp. 650-652

SPIER, R. E., 1996. "International meeting on the nucleic acid vaccines for the prevention of infectious disease and regulating nucleic acid (DNA) vaccines". Vaccine, vol, 14, pp. 1285-1288

STEGMANN, T., H. W. M. Morselt, J. Scholma, J. Wilschut, 1987. "Fusion of influenza virus in an intracellular acidic compartment measured by fluorescence dequenching". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 904, pp. 165-170

STEINMAN, R. M., 1991. "The dendritic cell system and its role in immunogenicity". Annual Review in Immunology, vol. 9, pp. 271-296

STOWELL, M. H. B., B. Marks, pp. Wigge, H. T. McMahon, 1999. "Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence of a mechanochemical switch". Nature Cell Biology, vol. 1, pp. 27-32

SWEET, C., H. Smith, 1980. "Pathogenicity of influenza virus". Microbiology Review, vol. 44, pp. 303-330

SWEITZER, S. M., K. E. Hinshaw, 1998. "Dynamine undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation". Cell, vol. 93, pp. 1021-1029

TAKAI, T., M. Li, D. Sylvestre, R. Clynes, J. V. Ravetch, 1994. "FcR γ chain deletion results in peiotropic effectors cell defects". Cell, vol. 76, pp. 519-524

TAKEUCHI, K., R. A. Lamb, 1994. "Influenza virus M2 protein ion channel activity stabilizes the native form of fowl plague virus hemagglutinin during intracellular transport". Journal of Virology, vol. 68, pp. 911-919

TAMIZIFAR, H., A. Robinson, R. Jennings, C. W. Potter, 1995. "Immune response and protection against influenza A infection in mice immunized with subunit influenza A vaccine in combination with cellular or acellular DTP vaccine". Virology, vol. 13, pp. 1539-1546

TINDALL, K. R., T. A. Kunkel, 1988. "Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase". Biochemistry, vol. 27, pp. 6008-6013

TOP, F. H., P. K. Russell, 1977. "Swine influenza A at Fort Dix, New Jersey (January-February, 1976) IV. Summary and speculation". Journal of Infectious Diseases, vol. 136, pp. 376-380

TOPHAM, D. J., P. C. Doherty, 1998. "Clearance of an influenza A virus by CD4+ T cells is inefficient in absence of B cells". Journal of Virology, vol. 72, pp. 882-885

TREANOR, J. J., E. L. Tierney, S. L. Zebedee, R. A. Lamb, B. R. Murphy, 1990. "Passively transferred monoclonal antibody to M2 protein inhibits influenza A virus replication in mice". Journal of Virology, vol. 64, pp. 1375-1377

TSURU, S., H. Fujisawa, M. Taniguchi, Y. Zinnaka, K. Nomoto, 1987. "Mechanism of protection during the early phase of a generalized viral infection. II. Contribution of polymorphonuclear leucocytes to protection against intravenous infection with influenza virus". Journal of General Virology, vol. 68, pp. 419-424

ULMANEN, I., B. A. Broni, R. M. Krug, 1981. "Role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structure RES (m7GpppNm) on RNAs initiating viral RNA transcription". Proceedings of National Academy of Sciences USA, vol. 78, pp. 7355-7359

ULMANEN, I., B. A. Broni, R. M. Krug, 1983. "Influenza virus temperature-sensitive cap(m7GpppNm)-dependent endonuclease". Journal of Virology, vol. 45, pp. 27-35

ULMER, J. B., J. J. Donnelly, S. E. Parker, G. H. Rhode, pp. L. Felgner, V. L. Dwarki, S. H. Grmkowski, R. R. Deck, C. M. Dewitt, D. Martinez, H. C. Perry, J. W. Shiver, D. L. Montgomery, M. A. Liu, 1993. "Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein". Science, vol. 259, pp. 1745-1749

ULMER, J. B., J. C. Sadoff, M. A. Liu, 1996. "DNA vaccines". Current Opinion of Immunology, vol. 8, pp. 531-536

ULMER, J. B., T.-M. Fu, R. R. Deck, A. Friedman, L. Guan, C. M. Dewitt, X. L. S. Wang, M. A. Liu, J. J. Donnelly, M. J. Caulfield, 1998. "Protective CD4+ and CD8+ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA". Journal of Virology, vol. 72, pp. 5648-5653

VACHERON, R., A. Rudent, S. Perin, C. Labarre, A. M. Quero, M. Guenounou, 1990. "Production of interleukin 1 and tumour necrosis factor activities in brochoalveolar washing following infection of mice by influenza virus". Journal of General Virology, vol. 71, pp. 477-479

VAN REETH, K., H. Nauwynck, M. Pensaert, 1996. "Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study". Veterinary Microbiology, vol. 48, pp. 325-335

VIRELIZIER, J. L., 1975. "Host defenses against influenza: the role of anti-hemagglutinin antibody". Journal of Immunology, vol. 115, pp. 434-439

WAGNER, R., T. Wolff, A. Rewig, S. Pleschka, H.-D. Klenk, 2000. "Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulator of influenza virus growth: a study by reverse genetics". Journal of Virology, vol. 64, pp. 6316-6323

WANG, B., A. P. Godillot, M. P. Madaio, D. B. Weiner, W. V. Williams, 1998. "Vaccination against pathogenic cells by DNA inoculation". Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 226, pp. 21-35

WANG, P., P. Palese, R. E. O'Neill, 1997. "The NP1-13NP1-3 (karyopherin α) binding site on the influenza A virus nucleoprotein is a non-conventional nuclear localization signal". Journal of Virology, vol. 71, pp. 1850-1856

WANG, X., M. Li, H. Zheng, T. Muster, P. Palese, A. A Beg, A. Garcia-Satre, 2000. "Influenza A virus NS1 proteins prevents activation of NF-KB and induction of alpha/beta interferon". Journal of Virology, vol. 74, pp. 11566-11573

WARD, A. C., 1997. "Virulence of influenza A virus for mouse lung". Virus Genes, vol. 14, pp. 187-194

WATABE, S., K. Q. Xin, A. Ihata A, L. J. Liu, A. Honsho, I. Aoki, K. Hamajima, B. Wahren, K. Okuda, 2001. "Protection against influenza virus challenge by topical application of influenza DNA vaccine". Vaccine, vol. 19, pp. 4434-4444.

WATANABE, A., E. Raz, H. Kohsaka, H. Tighe, S. M. Baird, T. J. Kipps, D. J. Garson, 1993. "Induction of antibodies to kappa V region by gene immunization". Journal of Immunology, vol. 151, pp. 2871-2876

WATANABE, K., H. Handa, K. Mizumoto, K. Nagata, 1996. "Mechanism for inhibition of influenza virus RNA polymerase activity by matrix protein". Journal of Virology, vol. 70, pp. 241-247

WEBBY, P. J., S. L. Swebson, S. L. Krauss, P. J. Gemish, S. M. Goyal, R. G. Webster, 2000. "Evolution of swine H3N2 influenza viruses in United States". Journal of Virology, vol. 74, pp. 8243-8251

- WEBER, F., G. Kochs, S. Gruber, O. Haller, 1998. "A classical bipartite nuclear localization signal on Thogoto and influenza A virus nucleoproteins". Virology, vol. 250, pp. 9-18
- WEBSTER, R.G., W.J. Bean, O.T. Gorman, T.M. Chambers, Y. Kawaoka, 1992. "Evolution and ecology of influenza A viruses". Microbiology Review, vol. 56, pp. 152-179
- WEBSTER, R. G., V. S. Hinshaw, 1977. "Matrix protein from influenza A virus and its role in cross-protection in mice". Infection and Immunity, vol. 17, pp. 561-566
- WEINER, G. J., H. M. Liu, J. E. Wooldridge, C. E. Dahle, A. M. Krieg, 1997. "Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization". Proceedings of National Academy of Sciences USA, vol. 94, pp. 10833-10837
- WEIS, W., J. H. Brown, S. Cusack, 1988. "Structure of influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid". Nature, vol. 333, pp. 426-431
- WELMAN, M., 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, pp. 157-165
- WENTWORTH D. E, M. W. McGregor, M. D. Macklin, V. Neumann, V. S. Hinshaw, 1997. "Transmission of swine influenza virus to humans after exposure to experimentally infected pigs". Journal of Infectious Diseases, vol. 175, pp. 7-15
- WHALEN, R. G., 1996. "DNA vaccines, cyberspace and self-help programs". Intervirology, vol. 39, pp. 20-25
- WHITTON, J. L., F. Rodriguez, J. Zhang, D. E. Hasset, 1999. "DNA immunization: mechanistic studies. Vaccine, vol. 17, pp. 1612-1619
- WILSON, I A., N. J. Cox, 1990. "Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin". Annual Review of Immunology, vol. 8, pp. 737-771
- WOLFF, J. A., R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani, P. L. Felgner, 1990. "Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*". Science, vol. 247, pp. 1465-1468
- WONG, J. P., M. A. Zabielski, F. L. , Schmaltz, G. G. Brownlee, L. A. Bussey, K. Marshall, T. Borralho, L. P. Nagata, 2001. "DNA vaccination against respiratory influenza virus infection". Vaccine, vol. 19, pp. 2461-2467.
- WYDE, P.R., R. B. Couch, B. F. Mackler, T. R. Cate, B. M. Levy, 1977. "Effects of low- and high-passage influenza virus infection in normal and nude mice". Infection and Immunology, vol. 15 p. 221-229
- YASUDA J., S. Nakada, A. Kato, T. Toyoda, A. Ishihama, 1993. "Molecular assembly of influenza virus: association of NS2 protein with matrix". Virology, vol. 196, pp. 249-255

- YE, Z., R. Pal, J. W. Fox, R. R. Wagner, 1987. "Functional and antigenic domains of the matrix (M) protein of influenza A virus". Journal of Virology, vol. 61, pp. 239-246
- YE, Z., N. W. Baylor, 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, pp. 3586-3594
- YE, Z., R. R. Wagner, 1992. "Down regulation of vesicular stomatitis virus transcription by the matrix protein of influenza virus". Journal of General Virology, vol. 73, pp. 743-748
- YE, Z., T. Liu, D. P. Offringa, J. McInnis, R. A. Levandowski, 1999. "Association of virus matrix protein ribonucleoproteins". Journal of Virology, vol. 73, pp. 7467-7473
- YETTER, R. A., S. Lehrer, R. Ramphal, P. A. Jr. Small PA., 1980. "Outcome of influenza infection: effect of site of initial infection and heterotypic immunity". Infection and Immunity, vol. 29, pp. 654-662
- YOKONAMA, M., J. Zhang, J. L. Whitton, 1995. "DNA immunization confers protection against lethal lymphocytic choriomeningitis virus infection". Journal of Virology, vol. 69, pp. 2684-2688
- YOSHIMURA, A., S. Ohnishi, 1984. "Uncoating of influenza virus in endosomes". Journal of Virology, vol. 51, pp. 497-504
- YORK, I. A., K. L., Rock, 1996. "Antigen processing and presentation by class I major histocompatibility complex". Annual Review of Immunology, vol. 14, pp. 369-396
- YOUNG, R. J., J. Content, 1971. "5'-Terminus of influenza virus RNA". Nature, vol. 230, pp. 140-142
- ZEBEDEE, S. L., R. A. Lamb, 1988. "Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 *in vitro*". Journal of Virology, vol. 62, pp. 2762-2772
- ZEBEDEE, S. L., C. D. Richardson, 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, pp. 502-511
- ZHANG, J., R. A. Lamb, 1996. "Characterization of the membrane association of the influenza virus matrix protein in living cells". Virology, vol. 225, pp. 255-266
- ZHANG, J., G. P. Leser, A. Pekosz, R. A. Lamb, 2000. "The cytoplasmic tails of the influenza virus glycoproteins are required for normal genome packing". Virology, vol. 269, pp. 325-334
- ZHIRNOV, O. P., H.-D. Klenk, 1997. "Histones as target for influenza virus matrix protein M1". Virology, vol. 235, pp. 302-310
- ZINKERNAGEL, R. M., M. F. Bachmann, T. E. Kundig, S. Oehen, H. Pirchet, H. Hengartner, 1996. "On immunological memory". Annual Review of Immunology, vol. 14, pp. 333-368

ZURCHER, T., M.R. Marión, J. Ortín, 2000. "Protein synthesis shut-off induced by influenza virus infection is independent of PKR activity". Journal of Virology, vol. 74, pp. 8781-8784

ZVONARJEV, A. Y., Y. Z. Ghendon, 1980. "Influence of membrane (M) protein on influenza A virion transcriptase activity *in vitro* and its susceptibility to rimantadine". Journal of Virology, vol. 33, pp. 583-586

Annexe 1 : Tampons et solutions

1. Tampon physiologique stérile

Dissoudre 8 g de NaCl (*Baker Chemical Company*), 0,2 g de KCL (Fisher) et 1,15 g de KH_2PO_4 (Fisher) dans 800 ml d'eau distillée (H_2O). On rectifie le pH à 7,2-7,4 au moyen d'une solution dibasique 0,1 M de Na_2HPO_4 , et on complète le volume à 1 litre (l) avec de l' H_2O distillée.

2. H_2O distillée traitée au DEPC 0,1 % (v/v) (pour l'extraction d'ARNv)

Ajouter 1 ml de diéthylpyrocarbonate (Sigma) dans 1 l d' H_2O distillée. Puis, pendant 2 heures, on incube l' H_2O à 37°C et on l'autoclave 30 minutes à 15 lb/po² afin d'éliminer les traces de DEPC. On peut conserver cette H_2O à 4°C.

3. Solution pour la purification des souches virales

3.1. Solution de NaN_3

Dans 100 ml d'eau distillée, dissoudre 10,0 g et filtrer à l'aide d'une membrane Millex Gv de 0,22 μm .

3.2. Solution de saccharose 50 %

Dans 50 g de PBS 10 mM, dissoudre 10,0 g de saccharose ultrapure (*Canadian Scientific Products*) et ajouter de l'azide de sodium pour obtenir une concentration finale de 0,02 % (v/v). Ainsi, nous obtenons une solution de saccharose de 50 % (p/p).

3.3. Solution de saccharose 26 %

Dans 78,0 g de PBS 10 mM, dissoudre 10,0 g de saccharose ultrapure (*Canadian Scientific Products*) et ajouter de l'azide de sodium pour une concentration finale de 0,02 % (v/v). Ainsi, nous obtenons une solution de saccharose de 26 % (p/p).

4. Solution pour le dosage protéique

4.1. Réactif A

Ajouter 10,0 g d'acide bicinchoninique (BCA) (Pierce), 20,0 g de carbonate de sodium hydraté ($\text{NaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$; Baker), 1,84 g de tartrate de sodium (Fisher), 4,0 g d'hydroxyde de sodium (NaOH; Fisher) et de 9,5 g de bicarbonate de sodium anhydre (NaHCO_3 ; Fisher) dans 900 ml d'eau distillée. On rectifie le pH à 11,25 avec 5,0 M de NaOH, et on complète le volume à 1 l avec de l'eau distillée.

4.2. Solution de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Dans 25 ml d'eau distillée, dissoudre 1,0 g de sulfate de cuivre (BDH), et filtrer à l'aide d'une membrane Millex GV 0,22 μm . On en obtient une solution de 4 % (p/v) de CuSO_4 .

4.3. Solution-stock BSA

Dans 10 ml d'eau distillée, dissoudre 2 g d'albumine sérique de bovin (BSA; RIA Grade, Sigma) et filtrer sur membrane Millex GV 0,22 μm .

5. Préparation des solutions pour le gel d'électrophorèse SDS-PAGE

5.1. Solution-stock de polyacrylamide

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

5.2. Solution-stock de SDS

Dissoudre 29,2 g d'acrylamide ultra-pure (SDS; Bio-Rad) dans 100 ml d'eau distillée. Filtrer la solution sur membrane Millex HA 0,45 μm .

5.3. Tampon du gel de séparation

Dissoudre 18,15 g de Tris-base (Bio-Rad) et 0,02 g de NaN_3 dans 80 ml d'eau distillée. Rectifier le pH à 8,8 avec de l'HCl concentré (Baker), et compléter le volume à 100 ml à l'aide d'eau distillée. On en obtient une solution de 1,5 M Tris HCl de pH 8,8. Filtrer la solution sur membrane Millex HA 0,45 mm et la conserver à 4°C.

5.4. Tampon du gel de tassement

Dissoudre 6,05 g de Tris base (Bio-Rad) et 0,02 g de NaN_3 dans 80 ml d'eau distillée. Rectifier le pH à 6,8 avec de l'HCl concentré (Baker) et compléter le volume à 100 ml avec de l'eau distillée. On en obtient une solution de 0,5 M de Tris-HCl de pH 6,8. Filtrer la solution sur membrane Millex HA 0,45 mm et la conserver à 4°C.

5.5. Solution de persulfate d'ammonium

Dissoudre 0,1 g de persulfate d'ammonium (Bio-Rad) dans 1,0 ml d'eau distillée. On doit préparer fraîchement cette solution. On en obtient une solution de persulfate d'ammonium de 10 %.

5.6. Préparation des gels de polyacrylamide

Solutions	Gel de 4 %	Gel de 12 %
Solution-stock d'acrylamide 30 % (ml)	1,3	4,0
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 10 % SDS	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 cumulatif (ml)	10,0	10,0

5.7. Tampon dénaturant et réducteur 2 X

Mélanger les éléments suivants :

- 4,0 ml de 10 % (p/v) de solution SDS;
- 2,0 ml de glycérol (Fisher);
- 0,5 ml de β -mercaptoéthanol (Bio-Rad);
- 0,2 ml de bleu de bromophénol (Sigma);
- 2,5 ml de tampon 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8.

On complète ensuite le volume à 10 ml avec de l'eau distillée, et on filtre la solution à l'aide d'une membrane Millex HA 0,45 μ m.

5.8. Tampon d'électrophorèse

Dissoudre 3,03 g de Tris-base (Bio-Rad), 14,41 g de glycine (Bio-Rad) et 1,0 g de SDS ultra pure (Bio-Rad) dans 1 l d'eau distillée.

5.9. Solution de coloration

Dans 200 ml de méthanol, dissoudre 2,0 g du bleu de Coomassie R250 (Bio-Rad), compléter le volume avec 250 ml d'eau distillée, et ajouter 50 ml d'acide acétique glacial (BDH).

6. Tampon et solution pour l'électrophorèse sur gel d'agarose

6.1. Solution EDTA

Dissoudre 37,22 g d'acide tétra-acétique d'éthylènediamine dihydraté (EDTA.2H₂O) (Sigma) dans 150 ml d'H₂O distillée. On rectifie le pH de cette solution à 8,0 avec une solution de NaOH 1 N, et on complète le volume à 200 ml avec de l'eau distillée. On en obtient une solution de 0,5 M d'EDTA. Enfin, on la filtre sur une membrane de 0,22 μ m afin de la stériliser.

6.2. Tampon TAE

Dans 900 ml d'H₂O distillée, ajouter 1,14 ml d'acide acétique glacial, 2 ml de 0,5 M EDTA pH 8,0 (solution 6.1), et 4,84 g de Tris base (Bio-Rad). On complète le volume à 1 l avec de l'H₂O distillée, et on stérilise la solution à l'autoclave à 15 lbs/po² pendant 30 minutes.

6.3. Tampon échantillon 6X

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

6.4. Préparation d'un gel d'agarose

À 100 ml de tampon TAE pH 8,0, ajouter 0,8 g d'agarose (*FMC BioProducts*). On fait alors fondre l'agarose au four à micro-ondes pendant 1 minute. Lorsque la température de la solution a atteint environ 60°C, on fait couler l'agarose liquide dans un moule et la laisse durcir à la T.P.

6.5. Solution de bromure d'éthidium

Dans 500 ml d'eau distillée, ajouter 500 µl d'une solution-stock de bromure d'éthidium 1,0 mg/ml. On en obtient une solution de 0,01 mg/ml de bromure d'éthidium. On doit conserver cette solution à la noirceur dans une hotte chimique.

7. Solution pour la purification d'ADN plasmidique par la méthode *Boiling Plasmid Miniprep*

7.1. Solution STET

Dans 900 ml d'H₂O distillée, ajouter 80 g de saccharose ultra pure, 6,06 g de Tris base, et 50 ml de Triton X-100 (Sigma) et 100 ml de 0,5 M EDTA de pH 8,0. On rectifie le pH à 8,0 avec 1 N d'HCl, et on complète le volume à 1 l avec de l'eau distillée.

7.2. Solution d'acétate d'ammonium dans l'isopropanol

Dissoudre 77,08 g d'acétate d'ammonium dans 70 ml d'eau distillée dans un bain marie à 37°C. Compléter le volume à 100 ml. On en obtient une solution d'acétate d'ammonium 10 M. Ajouter 25 ml de cette dernière à 75 ml d'isopropanol (Sigma). On peut conserver cette solution à la T.P. On en obtient une solution de 2,5 M d'acétate d'ammonium dans 75 % d'isopropanol.

7.3. Solution de lysozyme 10 mg/ml

Dans 10 ml d'eau distillée, ajouter 100 mg de lysozyme (*Worthington BioChemical Co.*). On en obtient une solution de 10 mg/ml de lysozyme. On stérilise ensuite cette solution par filtration à l'aide d'une membrane de 0,22 µm, et on la conserve à -20°C.

7.4. Solution d'ARNase 1 mg/ml

Dissoudre 10 mg de ribonucléase A (*Pharmacia Biotech inc.*) dans 10 ml d'eau distillée. On en obtient une solution de 1 mg/ml d'ARNase. On filtre cette solution à l'aide d'une membrane de 0,22 µm, et on la conserve à -20°C.

8. Solutions et milieux de culture pour le clonage

8.1. Milieu Luria-Bertani

Dans 950 ml d'H₂O distillée, dissoudre 10 g de bactotryptone (Difco), 5 g d'extrait de levure bacto (Difco) et 10 g de NaCl (BDH). On rectifie alors le pH à 7 avec une solution de 1 N NaOH, et on complète alors le volume à 1 l. Ensuite, on autoclave la solution pendant 30 minutes à 15 lb/po². Il faut alors attendre que la solution se refroidisse (environ 55°C) pour ajouter l'antibiotique. On conserve cette solution à 4°C.

8.2. Milieu Luria-Bertani solide

Préparer le milieu LB comme auparavant, et ajouter 15 g/ml d'agar noble (Difco) avant l'autoclavage. Autoclaver pendant 30 minutes à 15 lb/po², laisser refroidir la solution

jusqu'à 55°C et ajouter l'antibiotique. On peut faire couler cette solution dans des pétries et la conserver à 4°C.

8.3. Milieu SOC.

D'abord préparer les solutions suivantes :

A- Préparer une solution de KCl (Fisher) 250 mM en dissolvant 1,86 g de KCl dans 100 ml d'eau distillée.

B- Préparer une solution de $MgCl_2$ 1 M en dissolvant 20,33 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Baker) dans 100 ml d'eau distillée. On filtre ensuite cette solution sur une membrane de 0,22 μm .

C- Préparer une solution de glucose 2 M en dissolvant 36 g de glucose (BDH) dans 100 ml d'eau distillée. On filtre ensuite cette solution sur une membrane de 0,22 μm .

Pour 1 l de milieu, ajouter 20 g de bactotryptone (Difco), 5 g d'extrait de levure bacto (Difco) et 0,5 g de NaCl (BDH) dans 950 ml d'eau distillée. À cette solution, ajouter 10 ml de solution de KCl 250 mM. Rectifier le pH à 7 avec une solution de NaOH 5 M et compléter le volume à 980 ml avec de l'eau distillée. Autoclaver la solution pendant 30 minutes à 15 lb/po². Enfin, ajouter 10 ml de la solution $MgCl_2$ 1 M et 10 ml de la solution de glucose 2 M.

8.4. Solution-stock d'ampicilline

Dans 10 ml d'eau distillée, dissoudre 100 mg d'ampicilline (Sigma). Puis, filtrer sur une membrane de 0,22 μm . On en obtient une solution-stock de 10 mg/ml d'ampicilline. On conserve cette solution à -20°C.

9. Solution pour le transfert électrophorétique et pour l'immunobuvardage

9.1. Tampon de transfert

Dans 1,6 l d'eau distillée, dissoudre 28,82 g de glycine (Bio-Rad), 6,06 g de Tris-base (Bio-Rad), 0,4 g de NaN_3 . Enfin, ajouter 400 ml de méthanol 100 %, et conserver la solution à 4°C.

9.2. Tampon TBS 10 X

Dissoudre 2,42 g de Tris-base (Bio-Rad) et 29,24 g de NaCl dans 900 ml d'eau distillée. Rectifier le pH à 7,5 avec 5 N HCl et compléter le volume à 1 l avec de l'eau distillée.

9.3. Solution-stock Tween-20

Solubiliser 10 ml de Tween-20 (Bio-Rad) dans 90 ml de tampon TBS 1X, pH 7,5.

9.4. Solution de lavage

Ajouter 10 ml de la solution-stock de Tween-20 dans 1,990 ml de tampon TBS 1X, pH 7,5. Conserver la solution à 4°C pour un temps limite d'une semaine.

9.5. Solution de blocage

Dissoudre 2,0 g de BSA dans 98 ml de tampon TBS 1 X, pH 7,5. Ajouter 2 ml de solution-stock 10 % Tween-20.

9.6. Solution de dilution

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

9.7. Solution de révélation

Dissoudre 60 mg de 4 CN (Bio-Rad), dans 20 ml de méthanol 100 %. Entreposer cette solution à -20°C et protéger de la lumière jusqu'à utilisation. Immédiatement avant l'utilisation du substrat, ajouter 50 ml de H₂O₂ 30 % et 80 ml de tampon TBS 1 X, pH 7,5 à la T.P.

10. Solution pour test ELISA indirect

10.1. Tampon de carbonate

Dissoudre 1,59 g de $\text{NaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Barker), 2,93 g de NaHCO_3 (Fisher) et 0,03 g de NaN_3 dans 900 ml d' H_2O distillée. On rectifie ensuite le pH à 9,6 avec une solution de 0,1 M de Na_2CO_3 . Enfin, on complète le volume à 1 l avec de l'eau distillée, et on la conserve à 4°C.

10.2. Solution stock de Tween-20

Dans 90 ml de PBS, ajouter 10 ml de Tween-20 (Bio Rad). On filtre ensuite cette solution sur une membrane de 0,45 μm , et on la conserve à la T.P.

10.3. Solution de lavage

Ajouter 10 ml de la solution-stock de Tween-20 dans 1,990 l de tampon PBS 1X, pH 7,5. On peut conserver cette solution à 4°C pendant 1 semaine.

10.4. Solution de blocage

Dissoudre 2 g de BSA dans 99 ml de tampon PBS 1X, pH 7,5 et ajouter 1 ml de la solution-stock de Tween-20. Enfin, filtrer la solution sur une membrane de 0,45 μm et la conserver à 4°C.

10.5. Solution de dilution pour les anticorps

À 50 ml de tampon PBS 1X, ajouter 50 ml de la solution de blocage.

10.6. Solution de révélation

Préparer d'abord le tampon citraté en dissolvant 10 g d'acide citrique (Fisher), 14 g de phosphate de sodium dibasique (Baker) dans 900 ml d'eau distillée. Ensuite, rectifier le pH à 5 avec 1 N de HCl, et compléter le volume à 1 l. On peut préparer la solution de révélation au besoin en dissolvant 0,04 g d'hypochlorure d'orthophénylène diamine

(Sigma) (OPD) dans 100 ml de solution citraté et 40 μ l d'une solution de peroxyde d'hydrogène 30 % (Fisher).

Annexe 2 : Formules

1. Quantification d'ARN viral par densité optique

Si 1,0 unité de densité optique à 260 nm (D.O. 260) équivalant à 40 µg d'ARN par ml, alors à partir d'une dilution d'ARN génomique 1 : 200, nous aurons:

$$\text{ARN } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (\text{D.O. 260} \times 40 \times 200) / 1\ 000 = \text{D.O. 260} \times 8$$

2. Quantification d'ADN plasmidique par densité optique

Si 1,0 unité de densité optique à 260 nm (D.O. 260) équivalant à 50 mg d'ADN par ml, alors à partir d'une dilution d'ADN plasmidique 1 : 200, nous aurons :

$$\text{ADN (mg/ml)} = (\text{D.O. 260} \times 50 \times 200) / 1\ 000 = \text{D.O. 260} \times 10$$

3. Détermination du facteur de purification des préparations d'ARN ou d'ADN

D'habitude, on évalue le facteur de purification d'une préparation d'acide nucléique par le rapport des densités optiques pris à 260 nm et à 280 nm, donc :

$$\text{Facteur de purification} = (\text{D.O. 260}) / (\text{D.O. 280})$$

En général, on considère une préparation pure lorsque le facteur de purification est supérieur à 1,7.

4. Calcul de la densité optique seuil d'un essai ELISA

La densité optique seuil est obtenu à l'aide de la formule suivante : $\Sigma(T^- - T^+) / N + 2S$

Où T^- sont les densités optiques des sérums dilués des souris témoins négatifs
 T^+ sont les densités optiques des sérums dilués des souris témoins positifs (groupe 6).
 N le nombre de dilution (l'effectif)
 S l'écart-type de la moyenne

5. Calcul du LD50 selon la méthode de G. Kärber

La LD50 se calcule à l'aide de la formule suivante : $\text{Log LD50} = L - d(S - 0,5)$

Où L est le logarithme de la concentration la plus élevée
 d est la différence entre le logarithme des dilutions utilisées
 S est la somme des proportions de mortalité obtenues pour chaque groupe