

Université de Montréal

**VARIATIONS GÉNOMIQUES ET ANTIGÉNIQUES DU VIRUS
DE LA GRIPPE PORCINE (INFLUENZAVIRUS PORCIN) SUR
LE TERRITOIRE QUÉBÉCOIS**

Par ZEINEB M'HAMDI

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc)

en sciences vétérinaires option microbiologie

Avril, 2016

©M'HAMDI, 2016

RÉSUMÉ

A ce jour, les données génétiques et moléculaires se rapportant aux virus influenza de type A (VIs) présents dans la population porcine au Québec sont relativement rares. Pourtant, ces informations sont essentielles pour la compréhension de l'évolution des VIs à grande échelle de 2011 à 2015. Afin de remédier à ce manque de données, différents échantillons (pulmonaires, salivaires et nasaux) ont été prélevés à partir de 24 foyers dans lesquelles les animaux présentaient des signes cliniques. Ensuite, les souches virales ont été isolées en culture cellulaire (MDCK) ou sur œufs embryonnés. Les 8 segments génomiques des VIs de 18 souches virales ont par la suite été séquencés et analysés intégralement. La résistance aux drogues antivirales telles que l'oseltamivir (GS4071) carboxylate, le zanamivir (GS167) et l'amantadine hydrochloride a également été évaluée par des tests d'inhibition de la neuraminidase (INAs) ainsi que par un test de réduction sur plaque. Deux sous-types viraux H3N2 et H1N1 ont été identifiés dans la population porcine au Québec. Douze souches des VIs de sous-type trH3N2 ont été génétiquement liées au Cluster IV, avec au moins 6 profils de réassortiment différents. D'autre part, 6 souches virales ont été trouvées génétiquement liées au virus pandémique A(H1N1)pdm09 avec au moins trois profils de réassortiment génétique différents. Le sous-type trH3N2 des VIs est le plus répandu dans la population porcine au Québec (66,7%). La cartographie d'épitope de la protéine HA de sous-type H3 a présenté la plus forte variabilité avec 21 substitutions d'acides aminés sur 5 sites antigéniques A (5), B (8), C (5), D (1), et E (2). Toutefois, la protéine HA du sous-type H1 avait seulement 5 substitutions d'aa sur les 3 sites antigéniques Sb (1), Ca1 (2) et Ca2 (2). Un isolat H1N1 (1/6 = 16,7%) et 1 autre trH3N2 (1/12 = 8,3%) ont été trouvés comme étant résistants à l'oseltamivir. En revanche, 2 isolats du H1N1 (2/6 = 33,3%) et 2 autres du trH3N2 (2/12 = 16,7%) ont révélé être résistants au zanamivir. Dans l'ensemble, le taux de résistance aux INAs et à l'amantadine était compris entre 33,3% et 100%. La présence des VIs résistants aux drogues antivirales chez les porcs ainsi que l'émergence possible de nouvelles souches virales constituent des préoccupations majeures en la santé publique et animale justifiant ainsi la surveillance continue des VIs dans la population porcine au Québec.

Mots-clés: Virus Influenza A; Porcs; H1N1; H3N2; Réassortiment; Résistance antivirale; Inhibiteurs de la neuraminidase (INAs)

ABSTRACT

Data about genomic variability of swine influenza A viruses (SIV) in Quebec herds are scarce. Yet, this information is important for understanding virus evolution in Quebec from until 2015. Different clinical samples were obtained from 24 outbreaks of swine flu in which animals were experiencing respiratory disease. Samples including lung tissues, saliva and nasal swabs were collected and virus isolation was attempted in MDCK cells and embryonated eggs. All eight gene segments of the 18 isolated SIV strains were sequenced and analysed. Antiviral drugs resistance against oseltamivir carboxylate (GS4071), zanamivir (GS167) and amantadine hydrochloride was evaluated by neuraminidase inhibition assays (NAIs) and plaque reduction assay. Two subtypes of SIV, H3N2 and H1N1, were identified in Quebec pig herds. Twelve SIV strains were genetically related to trH3N2 Cluster IV and at least 6 different reassortment profiles were identified. On the other hand, 6 Quebec SIV strains were found to be genetically related to the pandemic virus A(H1N1)pdm09 and from which three reassortment profiles were identified. Overall, the trH3N2 was the most prevalent subtype (66.7%) found in Quebec swine herds. The epitope mapping of HA indicated that the H3 subtype was the most variable with a possibility of 21 amino acids (aa) substitutions within the 5 antigenic sites A(5), B(8), C(5), D(1) and E(2). However, the HA protein of the H1 subtype had only 5 aa substitutions within 3 antigenic sites Sb(1), Ca1(2) and Ca2(2). One H1N1 (1/6 = 16.7%) and one trH3N2 (1/12 = 8.3%) were identified as strains resistant against oseltamivir. In contrast, two H1N1 (2/6 = 33.3%) and two trH3N2 (2/12 = 16.7%) strains were found to be resistant against zanamivir. Overall, the SIV resistance against antiviral neuraminidase inhibitor drugs was (33.3%). All strains were resistant against the M2 inhibitor antiviral drug, amantadine. The presence of antiviral drug resistance in Quebec swine herds and the possible emergence of new SIVs strains are public health concerns supporting the surveillance of SIVs.

Keywords: Influenza A virus; Swine; H1N1; H3N2; Reassortment; Antiviral resistance; Neuraminidase inhibitors.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
ABSTRACT	iii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
REMERCIEMENTS	xi
CHAPITRE 1: INTRODUCTION SUR LE VIRUS INFLUENZA.....	1
1.1 ASPECTS HISTORIQUES.....	1
1.2 LA GRIPPE PORCINE.....	2
1.3 SYMPTÔMES ASSOCIÉS.....	2
1.4. LE VIRUS INFLUENZA.....	3
1.4.1 <i>Orthomyxoviridae</i>	3
1.4.2 <i>Influenzavirus A</i>	4
1.4.3 LA MORPHOLOGIE DU VIRUS INFLUENZA.....	5
1.4.3.2.2 LA NEURAMINIDASE : la protéine NA.....	9
1.4.3.2.3 LE CANAL À PROTONS	10
1.4.3.2.4 LA PROTÉINE DE LA MATRICE :	10
1.4.3.2.6 COMPLEXE DE LA POLYMÉRASE	11
1.4.3.2.7 LA PROTÉINE NON STRUCTURALE	11
1.4.3.2.8 LA PROTÉINE D'EXPORTATION NUCLÉAIRE.....	11
1.4.4.1 ENTRÉE DU VIRUS DANS LA CELLULE.....	12
1.5 DIAGNOSTIC.....	14
1.5.1 ISOLEMENT DU VIRUS.....	14
1.5.1.1 Test d'hémagglutination : test HA.....	14
1.5.1.2 Test d'infectivité	15

1.5.2 RÉACTION D'AMPLIFICATION EN CHAÎNE PAR POLYMÉRISE (PCR)...	16
1.5.3 SÉROLOGIE	16
1.6 MÉCANISMES D'ÉVOLUTION DU VIRUS INFLUENZA	18
1.6.1 DÉRIVE ANTIGÉNIQUE.....	18
1.6.2 CASSURE ANTIGÉNIQUE	19
1.7 ÉPIDÉMIOLOGIE DE VIRUS INFLUENZA PORCINS	20
1.7.1 VIRUS INFLUENZA CLASSIQUE	20
1.7.2 VIRUS INFLUENZA	22
1.7.3 GRIPPE A(H1N1)pdm09	23
CHAPITRE II : HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	24
2.1 PROBLÉMATIQUE	24
2.2 HYPOTHÈSE	24
2.3 OBJECTIFS.....	24
CHAPITRE III: RÉSULTATS.....	25
2.2 Virus identification and phylogenetic analysis.....	30
3.2 CARACTÉRISATION GÉNOMIQUE DES AMORCES DE GÉNOTYPAGE.....	59
IV. DISCUSSION GÉNÉRALE	62
V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	65
VI. RÉFÉRENCES.....	66
VII. Annexe:	xii

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Comparaison des pandémies les plus récentes et des épidémies saisonnières.....2

Tableau 2 : Caractéristiques des segments de gènes et des protéines qui constituent un virus influenza A.....6

Table supplémentaire S2 : Amorces utilisées pour le géotypage des gènes H1 et N1.....xvii

Table supplémentaire S3 : Amorces utilisées pour le géotypage des gènes H1 et N1....xviii

Article:

Table 1: Genomic constellations identified in contemporary H3N2 viruses isolated from Quebec swine herds.....38

Table 2: Genomic constellations identified in contemporary H1N1 viruses isolated from Quebec swine herds.....38

Table 3: HA amino acid sequences of the antigenic sites (A, B, C, D and E) of H3N2 Quebec swine influenza virus.....39

Table 4: HA amino acid sequences of the antigenic sites (Sa, Sb, Ca1, Ca2 and Cb) of H1N1 Quebec swine influenza virus.....40

Table 5: Neuraminidase inhibitor susceptibility of swine influenza A viruses isolated in Quebec between 2011 and 2015.....42

Supplementary Table S1: Viral genome sequence homologies of Quebec SIV strains with references strains.....41

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Arbre phylogénétique montrant les relations entre les différents genres de la famille <i>Orthomyxoviridae</i>	3
Figure 2: Nomenclature des virus influenza.	4
Figure 3: Virus influenza de type A observé en microscopie électronique.....	5
Figure 4: Représentation schématique d'influenzavirus A.....	6
Figure 5: Représentation du trimère d'hémagglutinine HA du virus influenza.....	8
Figure 6: Représentation schématique de la répartition des sites antigéniques sur la protéine HA.	9
Figure 7: Cycle réplicatif du virus influenza.....	133
Figure 8: Test d'hémagglutination.....	155
Figure 9: Effets cytopathiques (CPE) induits par des VIs sur des cellules MDCK	166
Figure 10: Glissement antigénique des VIs.	19
Figure 11: Modèle d'un réassortiment génétique de la pandémie 1957..	20
Figure 12: Relations phylogénétiques du gène HA des virus H1N1 présentées sur la base des séquences nucléotidiques, en association avec d'autres virus de référence.....	211
Figure 13: Relations phylogénétiques du gène HA des virus H3N2 de Québec présentées, en association avec d'autres virus de référence.....	233
Article:	
Figure 1: Phylogenetic analysis of the hemagglutinin (HA) nucleotide sequences of 12 Quebec H3 subtype viruses isolated from pigs	43
Figure 2: Phylogenetic analysis of the Neuraminidase (NA) nucleotide sequences of 12 Quebec N2 subtype viruses isolated from pigs.....	44
Figure 3: Phylogenetic analysis of the hemagglutinin (HA) nucleotide sequences gene of 6 Quebec H1 subtype viruses isolated from pigs.....	45
Figure 4: Phylogenetic analysis of the Neuraminidase (NA) nucleotide sequences of 6 Quebec N1 subtype viruses isolated from pigs.....	46
Supplementary Figure S1: Phylogenetic analysis of the M nucleotide sequences of 24 Quebec viruses found in pigs samples.....	47
Supplementary Figure S2: Phylogenetic analysis of the NS nucleotide sequences of 24 Quebec viruses found in pigs.....	48

Supplementary Figure S3: Phylogenetic analysis of the NP nucleotide sequences of 18 Quebec viruses isolated from pigs.....	49
Supplementary Figure S4: Phylogenetic analysis of the PA nucleotide sequences of 21 Quebec viruses found in pigs.....	50
Supplementary Figure S5: Phylogenetic analysis of the PB1 nucleotide sequences of 19 Quebec viruses found in pigs.....	51
Supplementary Figure S6: Phylogenetic analysis of the PB2 nucleotide sequences of 20 Quebec viruses found in pigs.....	52

LISTE DES ABRÉVIATIONS

a.a: acide aminé

ARN: acide ribonucléique

ARNc: acide ribonucléique complémentaire

ARNm: acide ribonucléique messenger

ARNv: acide ribonucléique viral

ARNg: acide ribonucléique génomique

AS: Acide sialique

A(H1N1)pdm09: A(H1N1)pandémique2009

Av: aviaire

CIDRAR: Center for Infectious Disease Research and Policy

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

D.O: densité optique

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

GR(s): Globules rouges

Hu: human

HA: Protéine hémagglutinine

IC₅₀: Concentration inhibitrice médiane

IHA : test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA)

MDCK: Madin-Darby Canine Kidney cells

NA: Protéine neuraminidase

NEP: Nuclear Export Protein/Protéine d'exportation nucléaire

NP: Protéine nucléoprotéine

NLS: signaux de localisation nucléaire

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

RT-PCR: Tests de réaction en chaîne par polymérase en temps réel

PA: Polymérase acide

PB1: Polymérase basique 1

PB2: Polymérase basique 2

PCR: Polymérase chain reaction/Réaction en chaîne par polymérase

RBS: Receptor binding site/Site de fixation au récepteur

RNP: Ribonucléoprotéine

SIV: Virus Influenza Porcins

Sw: Swine

TrH3N2: Triple réassortiment H3N2

TRIG: Triple-Réassortant de gènes internes VI: Virus Influenza

REMERCIEMENTS

L'élaboration de ce mémoire ainsi que la réussite de ma maîtrise ont été rendus possible grâce à de nombreuses personnes à qui je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères.

Je voudrais tout d'abord exprimer ma reconnaissance au Dr Carl A.Gagnon, en tant que Directeur de recherche, pour m'avoir donné l'opportunité de m'épanouir au sein de son équipe de recherche. Merci pour tout ce que j'ai pu apprendre de précieux au cours de ma maîtrise.

Je tiens à remercier sincèrement, Dr Christian Savard, qui s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ma maîtrise. Mes remerciements s'adressent également au Dr Levon Abrahamyan et au Dr Lucie Lamontagne d'avoir accepté de participer à la lecture et à la correction de ce mémoire de maîtrise.

Je suis très reconnaissante à l'ensemble des membres d'équipe de virologie animale de la Faculté de Médecine vétérinaire à Saint-Hyacinthe, Université de Montréal. Je tiens d'ailleurs à remercier tous mes collègues, présents et anciens.

D'un point de vue personnel, je tiens à remercier ma famille. Merci de toujours m'avoir encouragé à continuer dans les moments où je ne croyais plus pouvoir y arriver. Merci de m'avoir offert ce support moral dont j'ai tant eu besoin. Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes amis qui m'ont soutenus et encouragés au cours de la réalisation de ce mémoire.

CHAPITRE 1: INTRODUCTION SUR LE VIRUS INFLUENZA

1.1 ASPECTS HISTORIQUES

L'influenza communément abrégé «flu» semble provenir de l'expression italienne «influenza di freddo». La grippe semble frapper l'homme depuis l'antiquité. En effet, une maladie aux symptômes similaires à ceux de la grippe a été décrite en 412 avant Jésus-Christ. L'origine bactérienne ou virale de l'infection a longtemps été source de débat. À la fin du XIX^{ème} siècle, il a été proposé que la bactérie *Haemophilus* soit l'agent infectieux responsable de l'influenza. Finalement, c'est en 1930 Richard Shope a démontré l'origine virale de la grippe après l'isolement du virus chez le porc. Le premier virus influenza chez les humains a été isolé en 1933 par Wilson Smith (Smith et al., 1933). L'influenza affecte 5 à 10 % de la population humaine, causant une maladie sévère chez 3 à 5 millions de personnes et 250 000 et 500 000 décès annuellement (Schirmer & Holodniy, 2009). Au Canada, la grippe affecte 10 à 20% de la population, causant environ 8000 décès et entre 30 000 à 60 000 hospitalisations. En 2003, Stiver et ces collègues ont été classés, la grippe a été classée comme la sixième cause de mortalité (Stiver, 2003). Les épidémies d'influenza ont été identifiées premièrement en Europe puis en Afrique et en Asie pour finalement identifiée en Amérique du Nord (Kawaoka et al., 1989; Scholtissek et al., 1978). En 1918, la pandémie renommée "la grippe espagnole" A(H1N1) a touché le monde entier avec un taux des décès entre 50 à 100 millions (Potter, 2001). Les pandémies qui ont suivies ont été beaucoup moins sévères telles que: la grippe asiatique (1957-1958)/A(H2N2), la grippe de Hong-Kong (1968-1969)/A(H3N2) (Taubenberger et al., 2001). En avril 2009, une nouvelle souche pandémique A(H1N1)pdm09 est apparue au Mexique, et s'est transmise rapidement à travers le monde devenant ainsi la pandémie du 21^{ème} siècle (Morens et al., 2010). Le Tableau 1, compare les pandémies les plus récentes ainsi que leurs principaux impacts.

Tableau 1: Comparaison des épidémies saisonnières et des pandémies les plus récentes. D'après Donaldson et al., 2009.

Nom commun	Années	Type de Virus	Nombre de décès	Taux de mortalité
Grippe Espagnole	1918 - 1919	A/H1N1	40 - 50 millions	2.0 – 3.0%
Grippe Asiatique	1957 - 1958	A/H2N2	2 millions	0.2 %
Grippe de Hong Kong	1968 - 1969	A/H3N2	1 million	0.2 %
Grippe porcine	2009 - 2010	A/H1N1	> 18000	0.01 – 0.03%
Grippe saisonnière	Annuelle	A/H1N1, A/H3N2 et B	250 000 – 500 000	0.2%

1.2 LA GRIPPE PORCINE

La grippe porcine est une maladie épizootique virale, aiguë et hautement contagieuses causée par le virus influenza de type A (VI) (Baranovich et al., 2015; Olsen et al., 2006). Malgré les symptômes spectaculaires associées avec un taux de morbidité élevé ($\approx 100\%$), la mortalité demeure faible ≈ 1 à 4% chez les porcs malades (Olsen et al., 2006; Shope, 1931b; 1938). La grippe porcine devenue enzootique est fréquente dans les régions à forte densité porcine dont l'Amérique du Nord, l'Amérique du Sud, l'Europe et dans certaines régions d'Asie. Il s'agit d'une maladie auto-limitante (≈ 7 à 10 jours) (Jung et al., 2005). L'infection est aérogène et la dissémination entre les élevages est très rapide. En 1930, Shope et ses collègues ont identifié le VI de sous-type H1N1 comme étant l'agent pathogène responsable de la grippe porcine chez le porc (Shope, 1931a; 1938). Au Canada, trois sous-types de VI dominant chez le porc. Ce sont H1N1, H1N2 et H3N2 (Grgic et al., 2015; Grgic et al., 2014; Vincent et al., 2009a; Zhou et al., 2000). La lettre "H" vient du mot "hémagglutinine" et la lettre "N" de "neuraminidase" qui constitue les deux protéines structurales majeures du VI. En 2009, la grippe porcine a été classée comme une maladie à déclaration non obligatoire par l'appellation "grippe porcine" définit la pathologie chez les porcs causée par le virus influenza de type A (VI).

1.3 SYMPTÔMES ASSOCIÉS

La grippe porcine est une maladie respiratoire présentant une incidence accrue en automne et en hiver (Shope, 1931a). Les symptômes cliniques les plus observés chez les animaux malades sont la fièvre ($\approx 41^\circ\text{C}$), la bronchite, l'anorexie, la toux, l'écoulement nasal et la fatigue (Jung et al., 2005). Malgré les symptômes spectaculaires, les taux de mortalité sont généralement faibles ≈ 1 à 4% à moins que l'infection virale soit accompagnée par une co-

infection secondaire virale ou bactérienne (exemple: *Mycoplasma hyopneumoniae*, le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) et le Circovirus porcin de type 2 (PCV2)) (Palzer et al., 2008; Shope, 1931a).

1.4. LE VIRUS INFLUENZA

1.4.1 *Orthomyxoviridae*

Les virus influenza font partie de la famille des *Orthomyxoviridae*, qui est une famille des virus enveloppés, constituée d'un génome segmenté "8 brins d'ARN(-)" : l'hémagglutinine (HA), la neuraminidase (NA), la protéine de la matrice 1 (M1), la protéine de la matrice 2 (M2), la nucléoprotéine (NP), la protéine non structurale 1 (NSP1), la protéine non structurale 2 (NS2), la protéine acide (PA), la protéine basique 1 (PB1), la protéine basique PB1 -F2 et la protéine basique 2 (PB2) (Tableau 2). (Enami *et al.*, 1985; Heggeness *et al.*, 1982; Horimoto & Kawaoka, 2005; Lamb & Choppin, 1983). À ce jour, 5 genres composent cette famille virale (Figure 1): *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Thogotovirus*, *Isavirus* et le genre *Quaranjavirus* (Allison *et al.*, 2015; Fenner, 1995). La classification des VIs repose sur les différences antigéniques au niveau des protéines M1 et NP des virions (Hampson & Mackenzie, 2006).

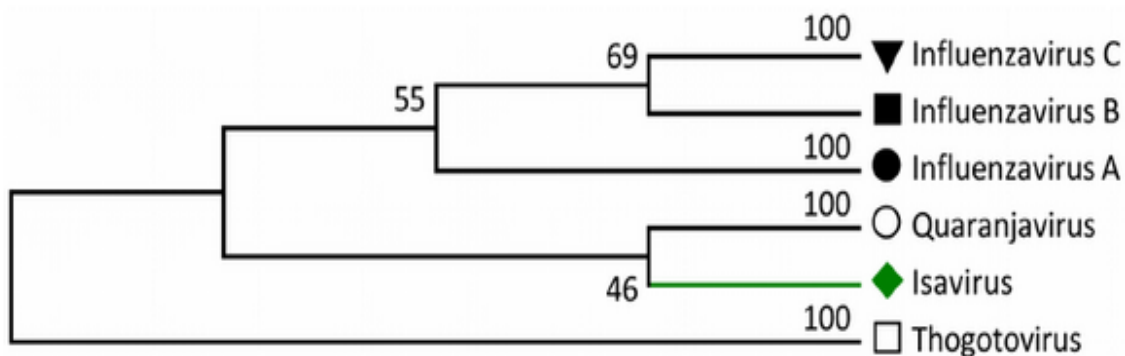


Figure 1: Arbre phylogénétique montrant les relations entre les différents genres de la famille *Orthomyxoviridae*, tiré de Cardenas et al.,2014. Le triangle noir = *Influenzavirus C*. Le carré noir = *Influenzavirus B*. Le cercle noir = *Influenzavirus A*. Le losange vert = *Isavirus*. Le carré blanc = *Thogotovirus*. Le cercle blanc = *Quaranjavirus*.

1.4.2 Influenzavirus A

Les VIs de type A infectent de nombreuses espèces d'oiseaux et de mammifères parmi lesquels on retrouve l'homme, les porcs, les visons, les chevaux et les chiens (Thiry *et al.*, 2007; Webby *et al.*, 2000). En effet, les VIs se répliquent au niveau du tractus intestinal des oiseaux et au niveau de l'appareil respiratoire des êtres humains et des porcs. La transmission du virus d'une espèce à un autre est rare. Cependant, la « barrière d'espèce » peut tout de même être parfois franchie. D'après divers analyses génomiques, plusieurs chercheurs ont démontrés que le virus de la grippe espagnole est génétiquement reliée au groupe aviaire et il se serait adapté à l'homme par des plusieurs mutations. (Kawaoka *et al.*, 1989; Potter, 2001; Scholtissek *et al.*, 1978). La grippe porcine est due à des VIs de type A (Chambers *et al.*, 1991). Ces virus sont les plus importants en terme de santé publique dans la mesure où ils provoquent des épidémies saisonnières voire des pandémies souvent mortelles (Thiry *et al.*, 2007). C'est pourquoi la suite de cette introduction traitera quasi exclusivement des VIs de type A. Au sein du type A, les VIs sont divisés en fonction de leurs propriétés antigéniques des glycoprotéines externes, l'HA et la NA. À ce jour, 16 sous-types d'HA (H1 à H16) et 9 sous-types de la NA (N1 à N9) ont été identifiés chez les oiseaux aquatiques (Sonnberg *et al.*, 2013; Tong *et al.*, 2013). Récemment, deux nouveaux sous-types H17 et H18 et N10 et N11 ont été identifiés chez les chauves-souris (Tong *et al.*, 2012). Seuls les sous-types H1, H3, N1 et N2 circulent chez le porc (Grgic *et al.*, 2015; Grgic *et al.*, 2014; Olsen *et al.*, 2006). La nomenclature actuelle des VIs inclut le type, le nom de l'espèce animale d'origine, le lieu, le numéro d'identification du laboratoire et l'année de l'isolement ainsi que la nature des antigènes de surface. La Figure 2 détaille la nomenclature qui s'appliquent à tous les VIs (exemple: A/Swine/Québec/FMV-1279920/2011 (H3N2)).

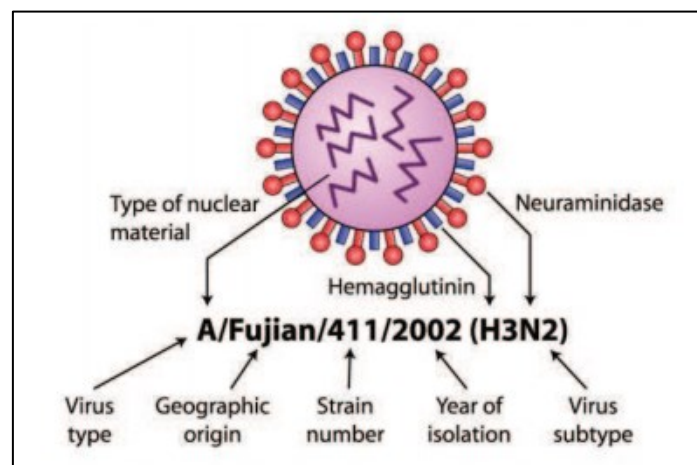


Figure 2: Nomenclature des virus influenza A, tirée de CIDRAP, 2011.

1.4.3 LA MORPHOLOGIE DU VIRUS INFLUENZA

1.4.3.1 LA PARTICULE VIRALE

Le VI se présente sous la forme d'un virion ovoïde (≈ 80 à 120 nm de diamètre) recouvert de spicules qui sont les deux glycoprotéines de surface transmembranaires associées, en trimère pour l'HA et en tétramère pour la NA (Figure 3) (Yoon *et al.*, 2014). La protéine HA, codée par le segment d'ARN 4, assure l'entrée des VIs dans la cellule et cela grâce à ses fonctions d'attachement au récepteur cellulaire et de fusion. La protéine NA, codée par le segment d'ARN 6, est caractérisé par une activité enzymatique permettant le clivage des liaisons formées entre l'HA et les résidus d'acide sialique pour libérer les virions nouvellement formés. Le segment d'ARN 7 code pour la protéine matrice M1 et la protéine canal M2. La libération du matériel génétique fait appel au canal ionique M2. Comme on le voit dans la Figure 4, le VI est composé d'une bicouche lipidique dérivée de la membrane plasmique des cellules hôtes, enveloppant le complexe de ribonucléoprotéines (RNP) (Sriwilaijaroen & Suzuki, 2012). À l'intérieur de la particule, l'ARN viral est associé à une nucléoprotéine (NP), codée par le segment d'ARN 5 (Palese *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 1997). Les protéines PB2, PB1 et PA forment un complexe de polymérase et sont associées à chaque nucléocapside (Complexe ARN-NP), formant ainsi la ribonucléoprotéine (RNP) (Figure 4) (Noda *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 1996; Wise *et al.*, 2009; Le Goffic *et al.*, 2010). Les propriétés de chaque segment d'ARN de type A ainsi que les protéines encodées sont décrites dans le Tableau 2. Finalement, le segment 8 code pour la protéine non structurale NS1 et la protéine d'exportation nucléaire NEP (Nogales *et al.*, 2014) (Figure 4).

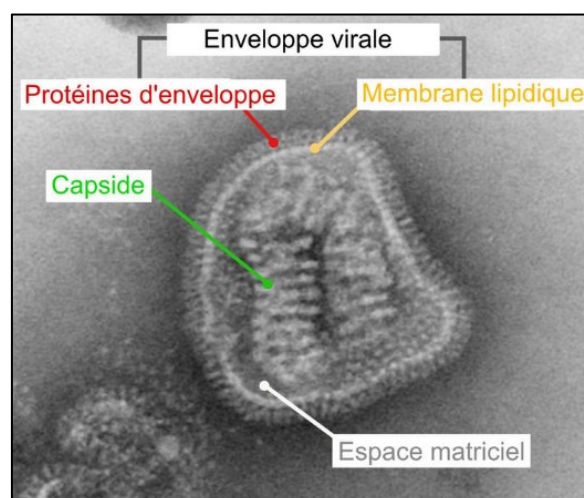


Figure 3 : Virus influenza de type A observé en microscopie électronique, tiré de Fujiyoshi, 1994.

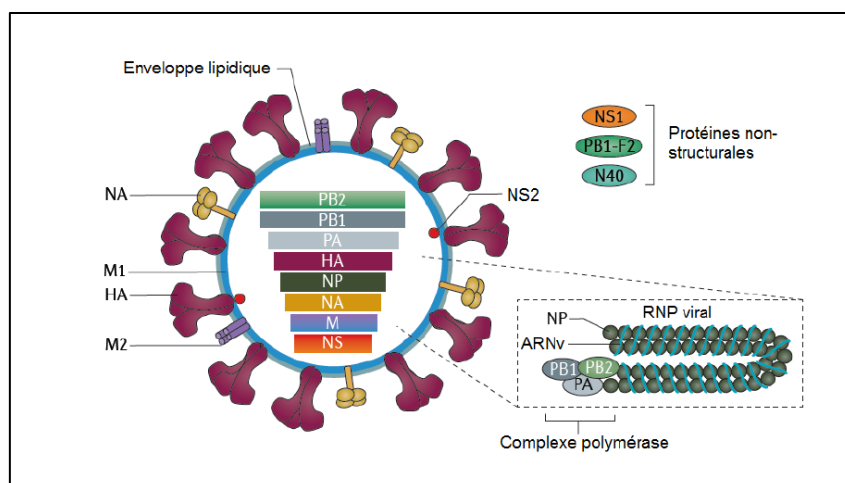


Figure 4 : Représentation schématique d'influenzavirus de type A. Le VI possède deux types de glycoprotéines de surfaces (HA; violet) et (NA; jaune foncé). Le génome virale est composé de 8 segments d'ARN (-) qui interagissent avec la NP (NEP; gris foncé) et le complexe polymérase PB1 (gris), PB2 (vert clair) et PA (bleu foncé). D'après Medina & Garcia-Sastre, 2011.

Tableau 2 : Protéines codées par les segments d'ARN du virus influenza de type A.

Segments	Longueur	*ARNv	Protéine	Fonctions
1	2,341	PB2	759	Composante de l'ARN polymérase (Arranz <i>et al.</i> , 2012)
2	2,341	PB1	757	Composante de l'ARN polymérase (Arranz <i>et al.</i> , 2012)
-	-	PB1-F2	87-91	Activité pro-apoptotique (Chen <i>et al.</i> , 2001)
3	2,233	PA	716	Composante de l'ARN polymérase, protéase (Arranz <i>et al.</i> , 2012)
4	1,778	HA	566	Protéine de surface, liaison au récepteur cellulaire (Stencel-Baerenwald <i>et al.</i> , 2014)
5	1,565	NP	498	Liaison, synthèse et export nucléaire de l'ARN (Arranz <i>et al.</i> , 2012)
6	1,413	NA	454	Protéine de surface, activité enzymatique (Marcelin <i>et al.</i> , 2012)
7	1,027	M1	252	Interaction entre RNPv et les protéines de surface (Zhang <i>et al.</i> , 2012)
-	-	M2	97	Protéine membranaire, canal ionique, assemblage des VIs (Marcelin <i>et al.</i> , 2012)
8	890	NS1	230	Activités diverses, antagoniste de l'IFN (Nogales <i>et al.</i> , 2014)
-	-	NEP	121	Export nucléaire (Nogales <i>et al.</i> , 2014)

*ARNv : acide ribonucléique viral

1.4.3.2 LES PROTÉINES DU VIRUS INFLUENZA

1.4.3.2.1 L'HÉMAGGLUTININE : la protéine HA

La protéine HA est codée par le segment 4 du génome viral. Son nom provient du fait que le VI peut conduire à l'agglutination des érythrocytes (Chu, 1948). Structuellement, il s'agit d'une glycoprotéine homotrimérique dont le poids moléculaire de chaque sous-unité est de 61,5kDa. La protéine HA joue un rôle central dans l'attachement et la pénétration des VIs dans la cellule hôte. Elle présente les sites de liaisons, appelés "receptor binding site", aux récepteurs des cellules cibles comportant des molécules d'acides sialiques (acide N-acétylneuraminique) (Stieneke-Grober *et al.*, 1992). L'HA est d'abord synthétisée comme un précurseur non fonctionnel (HA0), puis elle est glycosylée et clivée par des protéases cellulaires (exemple: trypsine), en deux sous-unités plus petites HA1 (327 a.a) et HA2 (222 a.a), restant liées par un pont disulfure (Figure 5) (Cross *et al.*, 2009). Chaque monomère de l'HA est constitué d'un domaine globulaire "tête" et un domaine transmembranaire "tige".

1.4.3.2.1.1 SPÉCIFICITÉ DE L'HA POUR LA LIAISON AVEC LE RÉCEPTEUR CELLULAIRE

Le domaine globulaire HA1 porte les sites antigéniques les plus fréquemment reconnus par les anticorps neutralisants comme cibles majeures de la réponse anti-virale. Cinq grands sites majeurs ont été localisés sur la sous-unité HA1 des VIs de sous-types H3N2 et H1N1. Ceux des virus H3 ont été identifiés de (A à E): A (résidus; 122, 133, 137, 143-146), B (résidus; 155-156, 158-159, 188-189, 193), C (résidus; 53-54, 275, 278), D (résidus; 201, 205, 207-208, 217, 220) et E (résidus; 62, 75, 78, 91, 91 et 94) (Krystal *et al.*, 1983; Stray & Pittman, 2012; Tharakaraman *et al.*, 2013). De même, 5 domaines antigéniques (Sa à Cb) ont été identifiés chez les virus H1: Sa (résidus; 128-129, 156-160,162-167), Sb (résidus; 187-198), Ca1 (résidus; 169-173, 206-208, 238-240), Ca2 (résidus; 140-145, 224-225) et Cb (résidus; 27, 28, 29, 30, 31 et 32) (s: spécifique; c: commun) (Garten *et al.*, 2009; Raymond *et al.*, 1986; Wilson & Cox, 1990) (Figure 6). L'induction d'anticorps anti-HA représente sans doute, l'étalon-or recherché lors de la vaccination contre le VI. Cependant, l'accumulation des mutations ponctuelles sur ces sites antigéniques permettent aux virus d'échapper aux anticorps neutralisants et par conséquent d'infecter les sujets qui étaient protégés contre la forme native du virus (Wiley & Skehel, 1987). Selon Wilson et Cox.(1990), une dérive génétique avec plus de 4 substitutions d'acides aminés situés au niveau d'au moins 2 pourrait être d'une importance épidémiologique non négligeable (Caton *et al.*, 1982; Kodihalli *et al.*,

1995). En outre, Wood *et al.*(1989) et Kodihalli *et al.*(1990) ont montré qu'une substitution de 1 à 3 a.a sur les cinq sites des VIs H1N1 et H3N2 pourrait réduire la réactivité croisée et l'efficacité du vaccin inactivé (Kodihalli *et al.*, 1995). En effet, dans ce mémoire nous voulons caractériser les variabilités génétiques et antigéniques des souches québécoises isolées entre 2011 et 2015. La glycosylation avait un rôle super important dans la sévérité de la pathogenèse viral et dont la perturbation de la réponse immunitaire innée ainsi que dans la modification conformationnelle des sites antigéniques (épitopes) par l'intermédiaire du blocage des sites de reconnaissance des anticorps neutralisants. En outre, le nombre et la distribution des sites de N-glycosylation ne sont pas conservés parmi les hémagglutinines de différentes souches virales. Aebi *et al.*(2010) ont démontré que l'apparition d'un seul site de N-glycosylation au sein de l'HA pourrait empêcher la fixation des anticorps monoclonaux dirigés contre le virus natif (Igarashi *et al.*, 2010; Schulze, 1997; Xu *et al.*, 2010). C'est pourquoi nous voulons prédire les sites de N-glycosylation des souches québécoises entre 2011 et 2015.

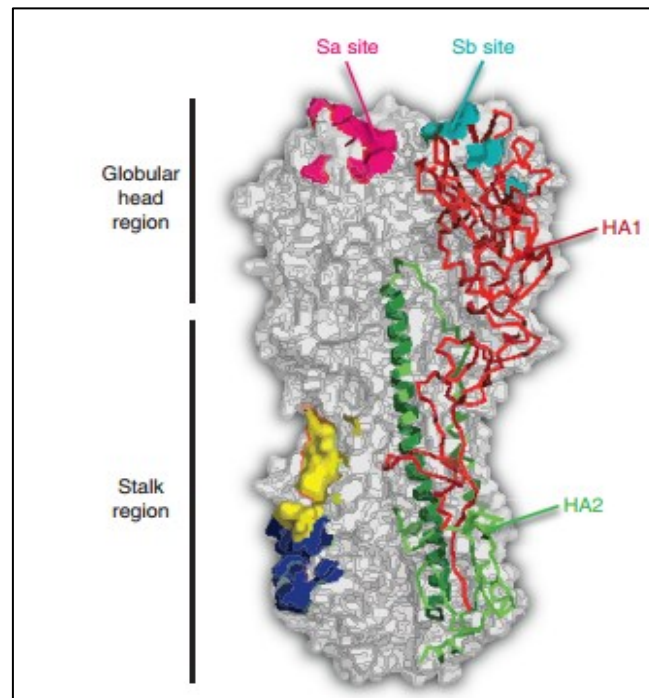


Figure 5 : Représentation du trimère d'hémagglutinine HA du virus influenza. Le précurseur non fonctionnel (HA0) est clivé et donne lieu à deux sous-unités protéiques: la sous-unité HA1 (domaine globulaire «tête» en rouge) et la sous-unité HA2 (domaine transmembranaire «tige» en vert). D'après Xu, 2010 et Kaur, 2011.

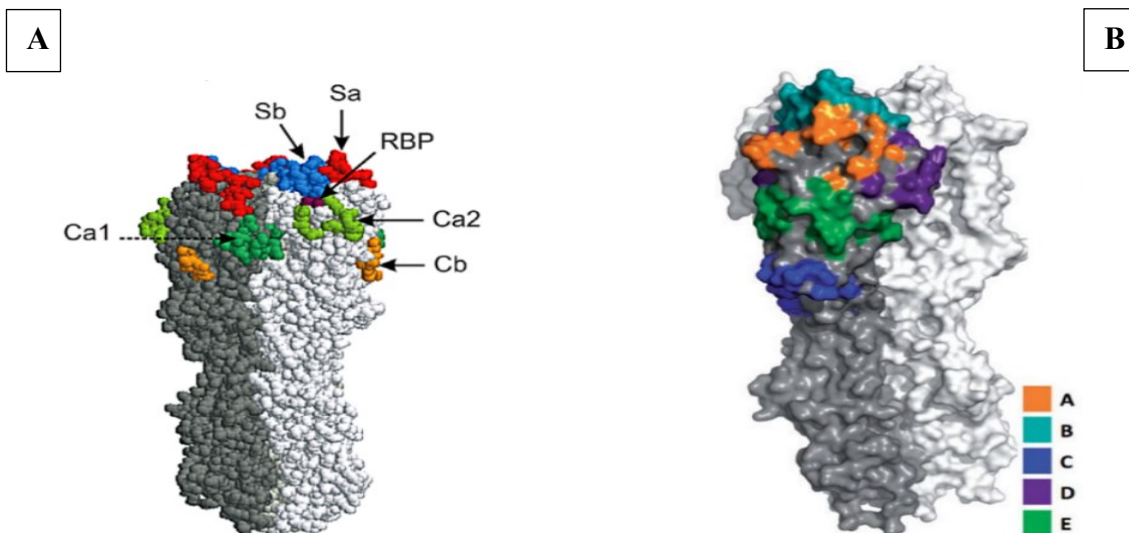


Figure 6: Représentation schématique de la répartition des sites antigéniques sur la protéine HA. **A)** Représentation schématique des sites antigéniques localisés sur le domaine globulaire H1 désignés comme suit; Sa (rouge), Sb (bleu), Ca1 (vert), Ca2 (vert clair) et Cb (orangé) (Strengell *et al.*, 2011). **B)** Représentation schématique des sites antigéniques localisés sur le domaine globulaire H3 désignés comme suit; A (orange), B (bleue clair), C (bleue), D (violet) et E (vert). D'après Krystal, 1983.

1.4.3.2.2 LA NEURAMINIDASE : la protéine NA

La protéine NA, codée par le segment 6 est un homotétramère en forme de champignon (Yuan *et al.*, 2008) (Tableau 2). La NA est insérée dans la membrane virale via son extrémité N-terminale tandis que son extrémité C-terminale est extracellulaire et contient un site catalytique des résidus d'acides sialiques présents au niveau de l'épithélium respiratoire (Burmeister *et al.*, 1992). L'activité enzymatique de cette protéine est indispensable pour la libération des virions néoformés afin de faciliter leur propagation (White *et al.*, 1995). Deux inhibiteurs de la NA (INAs) sont actuellement homologués pour la thérapie des VIs dans le monde entier: l'oseltamivir (GS2104) et le zanamivir (GS167) (Baker *et al.*, 1987; Colman *et al.*, 1983; Samson *et al.*, 2013). Les analyses génomiques du segment NA ont révélées que la résistance aux inhibiteurs de neuraminidase (INAs) est en corrélation avec l'accumulation continue des substitutions sur les sites catalytiques, désignés comme suit: R-118, D-151, R-152, R-224, E-276, R-292, R-371, Y-406, E-119, R-156, W-178, S-179, D-198, I-222, E-227, H-274, E-277, N-294 et E-425 (Colman *et al.*, 1993). Cependant, plusieurs études ont démontré que les substitutions H274, R292 et N294S sont fortement liées à la résistance contre l'oseltamivir (Baz *et al.*, 2009; Le *et al.*, 2005; Mishin *et al.*, 2005a). Par contre, la substitution E119V est en corrélation avec la résistance au zanamivir (Hurt *et al.*, 2009).

Veillez noter que l'un de nos objectifs est l'identification des souches québécoises résistantes aux INAs circulants dans la population porcine entre 2011 et 2015.

1.4.3.2.3 LE CANAL À PROTONS : la protéine M2

La protéine M2 est un homotétramère de 11 kDa, codée par le segment 7 (Tableau 2) (Fujiyoshi *et al.*, 1994; Lamb *et al.*, 1981; Ruigrok *et al.*, 1989). La M2 joue un rôle primordial dans le cycle répliatif des VIs (Takeda *et al.*, 2002). L'entrée des ions H⁺ dans l'endosome causant une dissociation des liens entre la protéine M1 et les RNPs et la libération du génome virale dans le cytoplasme (Takeda *et al.*, 2002). Depuis 1960, la M2 est considérée comme une cible majeure de la thérapie antivirale. Cette molécule bloque les pompes à protons M2 ce qui entraîne l'arrêt de la répliation virale (Kolocouris *et al.*, 2007; Kumpf & Dougherty, 1993; Tataridis *et al.*, 2007). Malheureusement, ces inhibiteurs ont perdu leur efficacité rapidement en raison d'un taux d'évolution trop rapide des VIs (Bright *et al.*, 2006; Deyde *et al.*, 2007). Cependant, plusieurs études ont démontré que les substitutions en a.a. de S31N, R77Q et V27I sont fortement liées à la résistance à l'amantadine (Abed *et al.*, 2005; Schmidtke *et al.*, 2006). Veillez noter que l'un de nos objectifs est l'identification des souches québécoises résistantes à l'amantadine circulants dans la population porcine entre 2011 et 2015.

1.4.3.2.4 LA PROTÉINE DE LA MATRICE : la protéine M1

La protéine de la matrice 1 (M1), est codée par le segment 7 (Tableau 2). La M1 forme la couche matrice localisée entre la membrane lipidique et les ribonucléoprotéines virales (RNPvs) (Coloma *et al.*, 2009) (Figure 3). La M1 joue un rôle primordial dans le cycle répliatif des VIs. Elle contrôle la stabilité et l'architecture du virus en interagissant avec l'ARNv et le complexe RNPv (Bui *et al.*, 1996; Noton *et al.*, 2007). La protéine M1 est aussi impliquée dans le processus de la transcription de l'ARNm (Elster *et al.*, 1994; Wakefield & Brownlee, 1989) mais également dans le contrôle de l'importation exportation de RNPv nouvellement synthétisées, dans l'assemblage et le bourgeonnement des virions néoformés (Cros & Palese, 2003; Portela & Digard, 2002).

1.4.3.2.5 LA NUCLÉOPROTÉINE : la protéine NP

La protéine NP représente l'unité structurale de RNP (Compans *et al.*, 1972). Le monomère NP est une protéine de 56 kDa (Prokudina *et al.*, 2005; Van Rompuy *et al.*, 1981) codée par le segment 5 (Ritchey *et al.*, 1976). Les segments d'ARNv sont encapsidés par la NP (Compans

et al., 1972; Ortega *et al.*, 2000; Ritchey *et al.*, 1976). La NP est impliquée dans la transcription et la réplication des VIs (Mena *et al.*, 1994). Elle interagit principalement avec l'acide ribonucléique viral (ARNv) et l'acide ribonucléique complémentaire (ARNc) afin qu'ils soient reconnus comme gabarit par le complexe polymérase (PB1, PB2 et PA). La polymérisation de la NP est cruciale afin de permettre la formation de structures identiques aux ribonucléoprotéines virales (RNPs) (Ruigrok & Baudin, 1995). Le complexe RNPv est trop gros pour diffuser passivement à travers les pores nucléaires (Martin & Helenius, 1991; Paine *et al.*, 1975). À ce niveau, la NP participe au transport actif de complexe dans le noyau (Martin & Helenius, 1991) par des signaux nucléaires de localisation (NLS) (Cellular importin- α ou karyophérine- α) (Gorlich & Kutay, 1999; O'Neill *et al.*, 1995).

1.4.3.2.6 COMPLEXE DE LA POLYMÉRASE

Le complexe polymérase est composé de trois sous-unités : les protéines basiques PB1 (\approx 86,5 kDa), PB2 (\approx 85,7 kDa) et la protéine acide PA (\approx 84,2 kDa). La PB1 code pour les polymérases PB1, PB1-F2 (\approx 10,5 kDa) et pour la protéine PB1-N40 (Tableau 2) (Chen *et al.*, 2001; Kosik *et al.*, 2015). La PB1 possède une activité polymérase et d'endonucléase pour le clivage des coiffes situées en 5' des ARNm (Li *et al.*, 2001). La substitution d'a.a (K340N) sur la protéine polymérase PB2 est corrélé positivement avec la pathogenèse virale (Maurer-Stroh *et al.*, 2010). Finalement, la PA intervient généralement dans le cycle répliatif des VIs en formant de nouveaux brins d'ARN(-) qui sont incorporés dans l'architecture des virions néoformés (Inglis *et al.*, 1979).

1.4.3.2.7 LA PROTÉINE NON STRUCTURALE : la protéine NS1

La protéine non-structurale 1 (NS1) (\approx 27kDa), codée par le segment 8 (Tableau 2) (Hale *et al.*, 2008). En effet, plusieurs groupes de recherches ont démontrés que la protéine NS1 fait partie des facteurs de virulence du VIs. Elle agit sur la perturbation de la réponse du système immunitaire inné et adaptative des cellules cibles (exemple: régulation négatif des voies de sécrétions des interférons antivirale de type I (IFN α/β) et d'autres cytokines pro-inflammatoires (Karlas *et al.*, 2010).

1.4.3.2.8 LA PROTÉINE D'EXPORTATION NUCLÉAIRE : la protéine NEP

La protéine NS2 (NEP), est une nouvelle protéine virale (\approx 11 kDa), codée par le segment 8 d'ARNv (Londrigan *et al.*, 2015). La protéine virale NEP est détectée à la fois dans le noyau

et dans le cytoplasme des cellules cibles. La NEP, permet de déjouer la réponse immunitaire inné des cellules cibles (Londrigan et al., 2015).

1.4.4 LE CYCLE DE RÉPLICATION DU VIRUS INFLUENZA

1.4.4.1 ENTRÉE DU VIRUS DANS LA CELLULE

Le cycle de vie débute par la liaison des virus à des récepteurs spécifiques situés à la surface des cellules cibles. Les récepteurs sont différents chez les diverses espèces animales. En effet, les cellules humaines portent des récepteurs d'acide sialique de type $\alpha 2,6$. De même, les cellules intestinales d'oiseaux portent des récepteurs d'acide sialique de type $\alpha 2,3$. En revanche chez le porc, les deux types de récepteurs d'acide sialique $\alpha 2,3$ et $\alpha 2,6$ coexistent faisant de cet animal un lieu de recombinaison possible entre les VIs d'origine aviaire et humaine favorisant la survenue de pandémies mortelles (voir Figure 7) (Ito *et al.*, 1998; Rogers *et al.*, 1983; Suzuki *et al.*, 1986). Une fois fixé sur la cellule, le virus entre dans la cellule par endocytose via des vésicules à clathrine (Lazarovits & Roth, 1988). Sous l'action des canaux à protons viraux de la protéine matrice M2, l'intérieur de l'endosome devient acide (pH = 5). Le pH acide à l'intérieure de l'endosome va conduire à des changements à des changements conformationnelles de la membrane virale, ce qui a pour résultat de fusionner la membrane virale à celle de l'endosome de la cellule hôte. Après la fusion, l'intérieur du virion s'acidifie à son tour, provoquant la dissociation des RNPv de la couche de protéine matricielle M1 pour que celle-ci permette ainsi la libération du génome viral dans le cytoplasme de la cellule cible (voir Figure 7).

1.4.4.2 ENTRÉE DES RNPv AU NOYAU

Les 8 segments viraux migrent ensuite vers le noyau, siège de la transcription et de la réplication. Pour cela, l'ensemble des segments viraux vont emprunter les pores nucléaires qui sont l'unique voie de passage entre le noyau et le cytoplasme. Le transport vers le noyau fait intervenir des signaux d'adressages nucléaires (NLS) contrôlés par d'autres protéines viraux telles que la NEP (Matrosovich *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 2006).

1.4.4.3 TRANSCRIPTION ET RÉPLICATION DU GÉNOME VIRAL

La réplication du génome viral commence par la formation d'un ARN complémentaire positif ARNc(+) à partir de l'ARN viral négatif ARNv(-). Cet ARNc(+) sert ensuite de matrice pour fabriquer de nouveau ARNv(-). L'ARNv(-) sert de matrice pour la fabrication d'ARNm, qui

sera transcrit en protéine (voir Figure 7). Les protéines de surface sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique puis elles vont subir des modifications post-traductionnelles pour finaliser leurs maturations. Elles vont ensuite migrer vers la membrane plasmique et s'y insérer au niveau des radeaux lipidiques (He *et al.*, 2008; Noda *et al.*, 2006). Les ARNv(-), néoformés au niveau du noyau sont associés à la protéine M1 et sont exportés vers le cytoplasme à travers des pores nucléaires.

1.4.4.4 ASSEMBLAGE ET BOURGEONNEMENT DES VIRIONS

La dernière étape durant le cycle viral est l'assemblage des virions néoformés, localisés au niveau des radeaux lipidiques où sont insérées les protéines de surface HA, NA et M2. La protéine M1 joue un rôle critique dans les processus d'assemblage et de bourgeonnement. Elle lie les segments du complexe RNPv, et de ce fait, elle forme une coque autour de ceux-ci. Les nouveaux virions sont retenus par liaison aux récepteurs à l'acide sialique. La libération des nouveaux virions est réalisée grâce à l'activité enzymatique de la NA. Il s'agit de l'étape clé responsable de la virulence et de la propagation des pandémies virales (Enami & Enami, 1996; Matsuoka *et al.*, 2013).

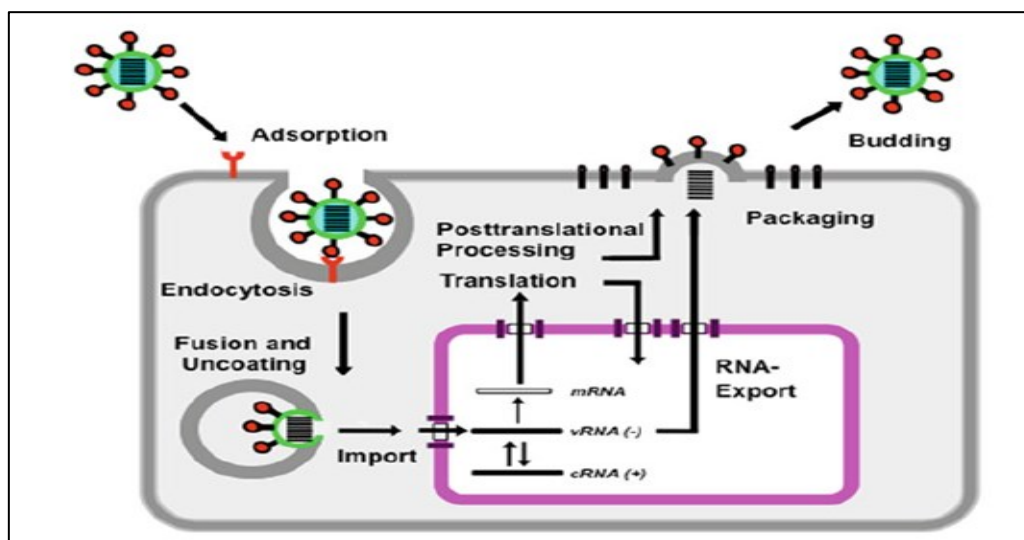


Figure 7: Cycle réplcatif du virus influenza A, tiré de Pleschka, 2013. Le virus se fixe aux récepteurs cellulaires (acides sialiques).

1.5 DIAGNOSTIC

1.5.1 ISOLEMENT DU VIRUS

Les signes cliniques de la grippe coïncident généralement avec la présence des VIs dans les sécrétions nasales, la salive et les poumons (Heinen *et al.*, 2001; Kyriakis *et al.*, 2011). Les prélèvements cliniques sont traités par un mélange d'antibiotiques en vue de supprimer la contamination bactérienne. L'isolement viral peut être conduit sur des lignées cellulaires de type MDCK (Madin-Darby canine kidney) et/ou sur des œufs embryonnés de 10 jours d'âge. Les œufs embryonnés sont considérés comme la méthode de référence pour l'isolement et la propagation des VIs aviaires (Clavijo *et al.*, 2002). Fait intéressant à remarquer, en 1995, Robertson et son équipe ont démontré l'acquisition des changements d'a.a sur la protéine HA des VIs humains isolés à l'aide de cette méthodologie (Katz *et al.*, 1987; Robertson *et al.*, 1995). En bref, 200 µl d'échantillons dilués dans du PBS sont inoculés dans la cavité allantoïque. Après 3 à 4 jours d'incubation à 37°C, les liquides allantoïdiens sont récoltés pour la détermination de la concentration virale à l'aide d'un test HA (Gagnon *et al.*, 2009). Plusieurs lignées cellulaires sont appropriées pour la propagation des VIs telles que les cellules Vero, les MRC-5, les BHK-21 et les MDCK. Cependant, depuis 1966, les cellules MDCK sont les plus souvent utilisées pour la propagation et la réplication des VIs (Gauth *et al.*, 1966). Plus tard, d'autres études ont mentionné l'importance de l'addition de la trypsine pour l'obtention de résultats d'isolement et de propagation plus efficaces (Meguro *et al.*, 1979; Tobita *et al.*, 1975). La trypsine est une enzyme qui facilite la propagation des VIs sur les MDCK en clivant le précurseur HA0 en deux sous-unités fonctionnelles (HA1 et HA2) (Klenk *et al.*, 1975; Meguro *et al.*, 1979). Les VIs peuvent se répliquer dans les MDCK pendant 24 à 48 h. La durée de réplication pourra aller jusqu'à 3 à 4 jours si la concentration initiale du virus est faible. La croissance des VIs dans les MDCK induit la production d'effets cytopathiques (CPE), libérant ainsi le virus et permettant le titrage du virus à partir du surnageant cellulaire.

1.5.1.1 Test d'hémagglutination : test HA

L'agglutination se produit en présence de la glycoprotéine de surface 'HA' qui se lie spécifiquement aux récepteurs cellulaires des globules rouges (GRs). "Acides sialiques". Le test HA est une méthode peu coûteuse rapide et simple à pratiquer (Francis *et al.*, 1944; Hirst, 1941). La lecture de la plaque est alors effectuée à l'œil nu après une période d'incubation par

détermination de la dernière dilution présentant une réaction d'hémagglutination (Figure 8) (Eisfeld *et al.*, 2014).

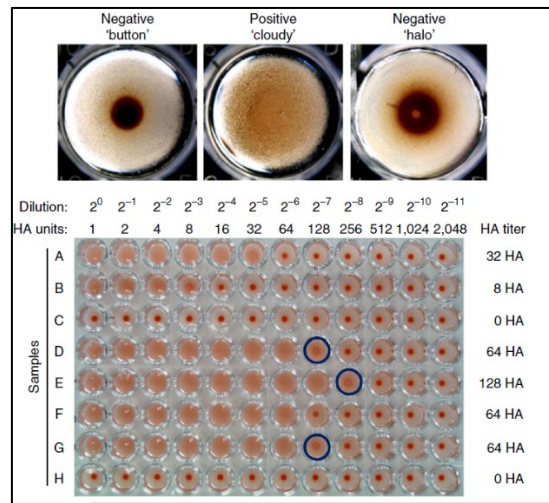


Figure 8 : Test d'hémagglutination, tiré de Eisfeld, 2014. HA positif = agglutination des GRs (une nappe au fond du puits). HA négatif = les GRs migrent au fond du puits pour former une pastille rouge ou "bouton". (a) Puits de gauche = HA négatif. Puits du milieu = HA positif et le puits de droite = HA partiel. (b) Image d'une plaque à fond conique durant un test HA.

1.5.1.2 Test d'infectivité

Reed et al.(1938), ont décrit le principe du test TCID₅₀. Le test d'infectivité TCID₅₀ est une mesure quantitative directe du nombre de puits dans lesquels 50% des cellules présentent des effets cytopathiques (CPE). En bref, les cellules MDCK sont mises en culture la veille (Eisfeld *et al.*, 2014; Gagnon *et al.*, 2009). Par la suite, une dilution en série de l'échantillon viral est effectuée dans du milieu de culture. Les plaques sont ensuite mises à incuber à 37°C avec 5% de CO₂. La lecture microscopique des plaques consiste à déterminer la dernière dilution où l'on peut observer des effets cytopathiques (Figure 9) (Smither *et al.*, 2013).

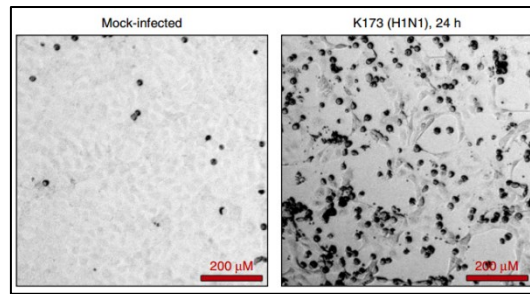


Figure 9 : Images microscopiques des effets cytopathiques (CPE) induits par des VIs sur des cellules MDCK. À gauche, le contrôle négatif = absence des VIs. À droite, présence des effets cytopathiques après infection par VI K173 de sous-type H1N1. D’après Eisfeld, 2014.

1.5.2 RÉACTION D’AMPLIFICATION EN CHAÎNE PAR POLYMÉRASE (PCR)

La présence des VIs peut être évaluée en utilisant la méthode RT-PCR standard ou en temps réel. En 1992, la détection de l’ARN spécifique du VI par transcriptase inverse-amplification génique RT-PCR en temps réel est devenue la méthode de choix pour la majorité des services de diagnostic à l’échelle mondiale (Higuchi *et al.*, 1992). Cette technique est basée sur la détection des VIs indépendamment de leurs sous-types par des amorces spécifiques aux gènes M ou NP. D’ailleurs, le choix de ces gènes s’explique par leur très grande conservation parmi les différentes souches de VIs. La RT-PCR en temps réel est favorisée parce que les résultats peuvent être obtenus très rapidement (Spackman *et al.*, 2002; Spackman & Suarez, 2008). Cette technique est très sensible, spécifique et rapide. La concentration minimale des VIs détectable par RT-PCR en temps réel varie de 10^{-1} à 10^1 TCID₅₀/ml (Richt *et al.*, 2004). En outre, cette technique est capable de détecter l’ARN génomique que le virus soit viable ou non, ce qui constitue le seul inconvénient de la RT-PCR en temps réel. La RT-PCR standard est utilisée pour le séquençage du génome entier des VIs (8 segments).

1.5.3 SÉROLOGIE

Le test d’inhibition d’hémagglutination (IHA) est le test de choix recommandé pour la confirmation d’une infection par des VIs dans le cadre des enquêtes épidémiologiques (WHO/CDS, 2002). Le test IHA est également utilisé pour la prédiction de l’efficacité des vaccins inactivés. Strictement parlant, le test IHA indique de manière spécifique l’interférence entre certains anticorps anti-VIs et les récepteurs d’acides sialiques localisés sur les GRs. Tout comme le test HA, les titres sont déterminés par une inspection visuelle comme l’équivalent à la réciproque de la dilution du dernier puits qui inhibe l’hémagglutination (Alvarez *et al.*, 2010). Les titres IHA \geq à 1:40 sont généralement considérés comme protecteurs contre

l'infection virale (Hancock *et al.*, 2009). Le test IHA possède plusieurs avantages, tels que la rapidité, le faible coût et la facilité de réalisation (Hancock *et al.*, 2009). Malheureusement, les résultats du test IHA peuvent être variables en fonction de l'opérateur ou de la réactivité croisée entre les différents clusters génétiques et/ou groupes antigéniques (Vincent *et al.*, 2009a; Vincent *et al.*, 2006). Actuellement, plusieurs trousse ELISA sont disponibles sur le marché. Ces trousse sont séparées en fonction des sous-types viraux H1N1 et H3N2 des VIs. Les trousse ELISA pour les VIs classiques H1N1 sont limitées en fonction de l'évolution antigénique. Les trousse ELISA pour les VIs H3N2 ont été développées à partir du Cluster I conduisant à une réactivité plus faible avec les VIs de Cluster IV (Yoon *et al.*, 2004). La majorité des trousse commercialisées est basée sur les gènes HA, NA et NP. La sensibilité et la spécificité varient de 67 à 71% et 99 à 100% respectivement (Hurt *et al.*, 2007).

1.5.4 LIMITES DES TESTS DE DIAGNOSTIC

Au fur et à mesure que la diversité des VIs est devenue de plus en plus variée et notamment à cause des mutations et des phénomènes de réassortiments viraux, il a été observé l'apparition de résultats de tests de diagnostic faux négatifs. Vincent *et al.* (2009) ont observé une réactivité croisée entre les groupes α , β et γ des VIs de sous-type H1. En revanche, peu ou pas de réactivités croisées ont été observées entre ces trois groupes et le groupe δ dans le sérum des porcs infectés expérimentalement ou vaccinés. En outre, la même équipe a démontré la sous-classification du groupe H1 δ en deux sous-groupes (δ_1 et δ_2), distincts sur le plan antigénique. Ce phénomène pourrait par conséquent entraîner des faux négatifs (Vincent *et al.*, 2006; Vincent *et al.*, 2009b). Les variabilités génomiques ont aussi altéré la réactivité croisée entre les groupes I et IV des VIs de sous-type H3 (Kitikoon *et al.*, 2013). En effet, comme le virus continue d'évoluer, l'accumulation des substitutions d'a.a par dérive génétique pourrait aussi bien altérer l'efficacité des tests moléculaires (amorces/RT-PCR), ce qui rend la mise à jour de la conception des amorces, une étape primordiale afin de préserver la détection des VIs par la technique RT-PCR (Kyriakis *et al.*, 2011; Sidoti *et al.*, 2010; Suarez *et al.*, 2007; Vincent *et al.*, 2010).

1.6 MÉCANISMES D'ÉVOLUTION DU VIRUS INFLUENZA

1.6.1 DÉRIVE ANTIGÉNIQUE

La dérive génétique est définie par l'accumulation continue de substitutions nucléotidiques au fil du temps. Le taux de substitutions des VIs varie entre 10^{-5} à 10^{-6} substitutions/site/cycle de réplication (Nobusawa & Sato, 2006; Parvin *et al.*, 1986; Stech *et al.*, 1999). Généralement, les substitutions de base sont neutres, ce qui signifie qu'elles ne provoquent pas de modifications sur les acides aminés (Shu *et al.*, 2012; Webster *et al.*, 1992). Au sein d'un même hôte, la fréquence élevée d'erreurs durant le cycle répliatif induit une population hétérogène que l'on nomme "quasi espèce" de virus (Holland *et al.*, 1982; Yewdell *et al.*, 1979). Ce phénomène s'explique par le fait que la polymérase virale (ARN polymérase/ARN-dépendante) est peu fidèle, car elle est dépourvue d'activité correctrice (Caton *et al.*, 1982; Dowdle *et al.*, 1975) (Figure 10). Ce mécanisme est responsable de l'apparition de nouvelles souches virales capables d'échapper partiellement à la mémoire immunitaire acquise lors d'infections précédentes. L'accumulation de ces mutations peut être létale pour les VIs si elles affectent les sites fonctionnels ou structuraux. En revanche, l'existence de certaines substitutions telles que: D222G et H275Y sur les protéines HA et NA affectent la pathogénicité des VIs et par conséquent augmentent la résistance aux drogues antivirales (Belser *et al.*, 2011; Ferraris & Lina, 2008), telles que l'oseltamivir carboxylate (Tamiflu), le zanamivir (Relenza) et l'amantadine (Abed *et al.*, 2005). Ce phénomène est la raison principale de la mise à jour annuelle de la composition du vaccin contre la grippe saisonnière (Horimoto & Kawaoka, 2001; Webster *et al.*, 1992; Webster & Laver, 1967).

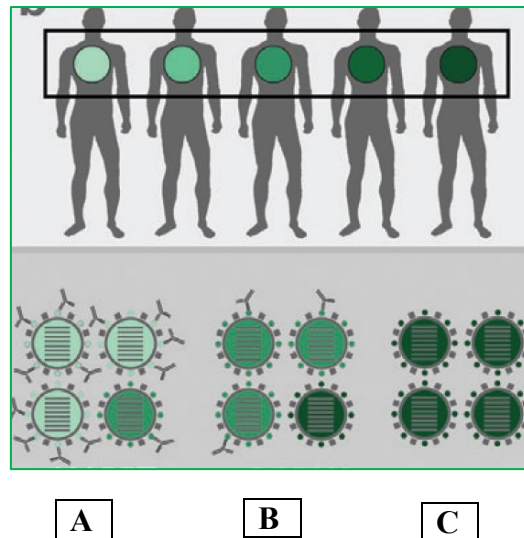


Figure 10 : Glissement antigénique des VIs. La dérive antigénique est le processus par lequel les VIs circulants dans une population mutent sous la pression d'anticorps neutralisants. L'intensité des couleurs est proportionnelle à l'accumulation des substitutions au fil du temps A : vert clair (très peu de mutations). B : vert intermédiaire (peu de mutations). C : vert foncé (très forte fréquence de mutations), tirée de Doherty, 2006.

1.6.2 CASSURE ANTIGÉNIQUE

La nature segmentée du génome viral est à l'origine du phénomène de "cassure antigénique". Il s'agit de changements de la structure d'un ou deux antigènes de surface (HA et/ou NA) (Holland et al., 1982). Le porc possède deux types de récepteurs $\alpha 2,6$ et $\alpha 2,3$. L'Homme ne possède que le récepteur $\alpha 2,6$ tandis que les oiseaux n'ont que le récepteur $\alpha 2,3$ (Hensley et al., 2009). Cette particularité explique très bien le rôle potentiel du porc comme «creuset», pour héberger des co-infections virales d'origine aviaire et humaine, situation favorisant l'émergence de réassortants éventuellement responsables des grandes pandémies de l'Histoire (Figure 11) (Webster *et al.*, 1995). L'ensemble de ces combinaisons peut conduire à la génération d'un virus qui combine la capacité de réplication chez l'homme, mais également chez d'autres espèces. Ce phénomène est arrivé au moins trois fois dans le siècle dernier: la grippe espagnole (1918), la grippe asiatique (1957) et la grippe de Hong Kong (1968). En avril 2009, une nouvelle souche pandémique A(H1N1)pdm09 est apparue au Mexique. Celle-ci s'est transmise rapidement à travers le monde devenant ainsi la première pandémie du 21^{ème} siècle appelée virus de la grippe porcine (Bush *et al.*, 1999; Stech *et al.*, 1999; Yewdell *et al.*, 1979). Habituellement, les pandémies virales peuvent se produire suite à une co-infection des

virus humains, aviaires et porcins. Cependant, ce n'est pas toujours le cas. Par exemple, la grippe aviaire (Hong Kong en 1997) a résulté de la transmission directe de souches aviaires hautement pathogènes (HPAI) à l'humain. Cette souche aviaire "HPA" était associée à un taux de 60% de létalité (Claas *et al.*, 1998; Fouchier *et al.*, 2004; Subbarao *et al.*, 1998). En Angleterre, un nouveau sous-type H1N7 "A/Swine/England/191974/1992" a été isolé chez le porc par l'équipe de Brown en 1994. Les analyses phylogénétiques du VI H1N7 ont démontré un réassortiment génétique entre les six segments (PB2, PB1, PA, HA, NP et NS) des VIs (H1N1) d'origine humaine et deux segments (NA et M) d'origine équine (Brown *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1997).

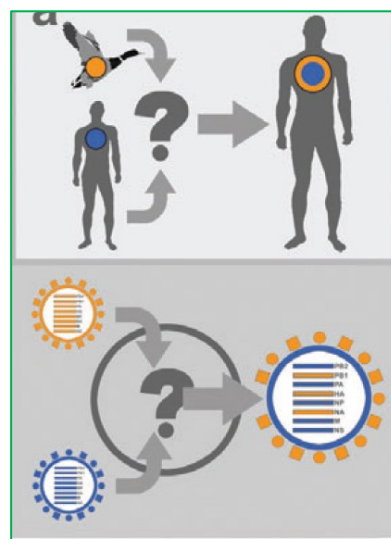


Figure 11 : Modèle d'un réassortiment génétique de la pandémie 1957. La couleur code pour la lignée génétique. Les segments bleus codent pour les VIs humains (H1N1) ; Les segments oranges codent pour les VIs aviaires (H2N2), tirée de Doherty, 2006.

1.7 ÉPIDÉMIOLOGIE DE VIRUS INFLUENZA PORCINS

1.7.1 VIRUS INFLUENZA CLASSIQUE

Chez le porc, le premier virus de sous-type H1N1 dite «porcine classique» cH1N1 a été isolé en 1930 par Robert Shope (Shope, 1931a). Ces virus ont été introduits chez la population porcine à partir de l'homme lors de la grippe espagnole en 1918. Par la suite, le VI dans sa forme classique est devenu endémique aux États-Unis et fut rapporté occasionnellement dans d'autres pays producteurs de porcs (Myers *et al.*, 2007). Durant près de 68 ans, le virus cH1N1 était stable génétiquement et antigéniquement. En effet, il a été le seul sous-type viral prédominant dans la population porcine Nord-Américaine (Vincent *et al.*, 2006).

1.7.1.2 CLASSIFICATION PHYLOGÉNIQUE DES VIRUS H1

Les virus cH1N1 constituait l'unique sous-type responsable de l'infection porcine aux États-Unis (Grgic *et al.*, 2015) jusqu'à l'introduction d'un nouveau virus, le triple réassortant H3N2 (trH3N2) ou (TRIG) en 1998. Ce virus trH3N2 a également modifié le statut épidémiologique des VIs aux États-Unis (Vincent *et al.*, 2010). Afin de mieux représenter l'évolution génétique des VIs porcins de sous-type H1, une stratégie de classification en "Cluster" a été proposée. Structurellement, en se basant sur leur composition génétique, les virus de sous-type H1 pourraient être classés en quatre groupes (Cluster α , β , γ , et δ). Le Cluster α est composé de virus dans lesquels tous les segments étaient semblables à ceux du virus H1N2-like qui ont émergés aux États-Unis en 2007 (Grgic *et al.*, 2015). Le Cluster β est composé de virus dans lesquels tous les segments sont semblables à ceux de virus réassortant rH1N1-like. Le Cluster γ est composé de virus dans lesquels tous les segments sont semblables à ceux du virus classique cH1N1-like. Finalement, les virus de groupe δ sont fortement similaires aux virus humains H1N1. Les quatre groupes des virus H1 peuvent être trouvés avec des gènes NA des sous-types N1 ou N2 (Figure 12).

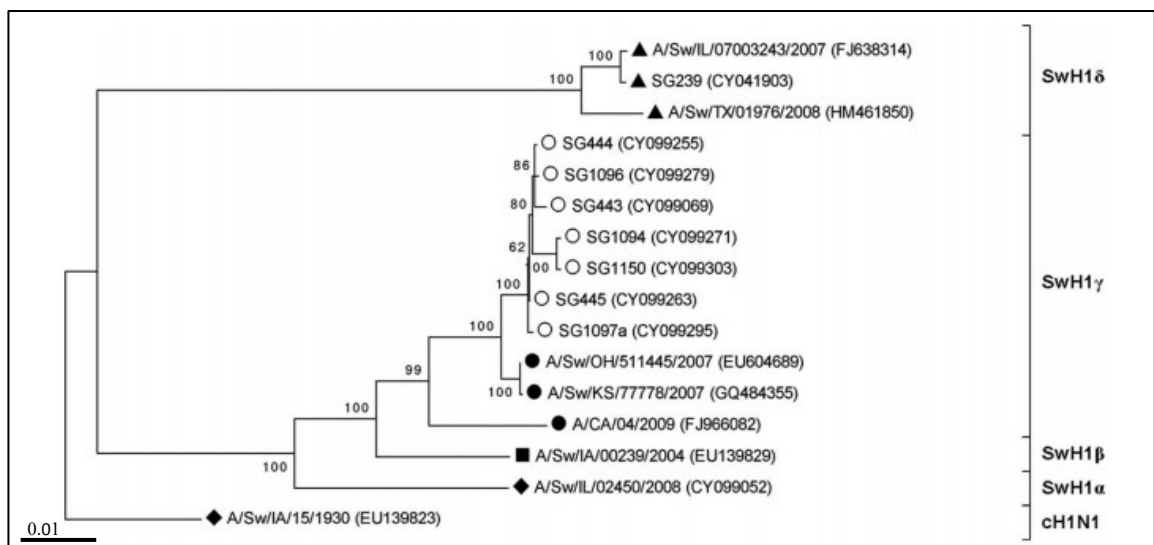


Figure 12 : Relations phylogénétiques du gène HA des virus H1N1 présentées sur la base des séquences nucléotidiques, en association avec d'autres virus de référence. Les 4 Clusters génétiques sont indiqués par des crochets sur la droite de l'arbre phylogénétique. SwH1 α (classique H1N1-like \blacklozenge), SwH1 β (H1N1-like \blacksquare), SwH1 γ (H1N2-like \bullet), SwH1 δ (humain \blacktriangle). Une distance de 0,01 signifie que les souches présentent une identité de 99%, tirée de Detmer, 2013.

1.7.2 VIRUS INFLUENZA

En 1998, Zhou et al.(1999) ont rapporté l'émergence d'un nouveau virus recombinant (humain-porc et humain-porc-aviaire), le triple réassortant H3N2 (trH3N2) dans la population porcine américaine (Zhou *et al.*, 2000). Ce virus réassorti contient une combinaison de gènes internes composés de HA, NA et PB1 d'origine humaine, de NP, M et NS d'origine porcine «classique» et de PA et PB2 d'origine aviaire (Webby & Webster, 2001; Zhou *et al.*, 1999). Cependant, le virus trH3N2 semble avoir un potentiel élevé pour accepter plusieurs sous-types de HA et NA, résultant dans l'apparition de nouveaux VIs (Zhou *et al.*, 2000). Dès lors, le virus trH3N2, s'est propagé très rapidement dans la population porcine américaine (Gagnon *et al.*, 2009; Vincent *et al.*, 2009b). En 2005, le virus trH3N2 a été signalé pour la première fois dans la population porcine canadienne (Grgic *et al.*, 2014). Les virus réassortis sont devenus endémiques et co-circulent dans la plupart des grandes régions productrices de porcs aux États-Unis et au Canada (H3N2, H1N2 et H1N1) (Vincent *et al.*, 2010; Vincent *et al.*, 2009b). Contrairement aux virus cH1N1, il semble que les souches trH3N2 actuellement en circulation dans la population porcine américaine soient devenues plus virulentes (Olsen *et al.*, 2006).

1.7.2.1 CLASSIFICATION PHYLOGÉNIQUE DES VIRUS H3

Les analyses génétiques et antigéniques des VIs de sous-type H3N2 ont connu une évolution constante dans la population porcine américaine. Afin de mieux représenter l'évolution génétique des virus H3, une stratégie de classification en Cluster a été proposée par Vincent et al.(2009). Structurellement, sur la base de leurs compositions génétiques les VIs H3N2 Nord-Américaine ont été classés en quatre groupes (Cluster I, II, III et IV) (Grgic *et al.*, 2014). Le Cluster I est composé de virus dans lesquels tous les segments sont semblables à ceux du virus trH3N2 qui a émergé aux États-Unis en 1998 (Olsen *et al.*, 2006). Le Cluster II est composé de virus dont les gènes HA, NA, PB1 et NS sont génétiquement similaires au virus trH3N2, et les gènes M, PB2, PA et NP sont génétiquement similaires au virus pandémique A(H1N1)pdm09. Le Cluster III est composé de virus dont les gènes HA et NA proviennent du virus trH3N2, alors que toutes tous les gènes des protéines internes sont génétiquement similaires au virus A(H1N1)pdm09. Les virus du Cluster III continuent d'évoluer vers un 4^e groupe (IV) (Grgic *et al.*, 2014). La caractérisation génétique des VIs de groupe IV, indique clairement l'apparition du phénomène de réassortiment entre les virus trH3N2 Nord-Américaine et les VIs A(H1N1) pdm09 (Figure 13) (Tremblay *et al.*, 2011). La souche H1N2

provient d'un réassortiment entre les virus cH1N1 classiques et les virus trH3N2 (Vincent *et al.*, 2006; Vincent *et al.*, 2009b). Des virus d'origine aviaire ont sporadiquement été transmis au porc. Au cours des dernières années, des souches de différents sous-types (exemple: H9N2 et H1N6) ont été identifiées dans la population porcine canadienne. Ces virus sont génétiquement d'origine aviaire (Ducatez *et al.*, 2011; Karasin *et al.*, 2000a).

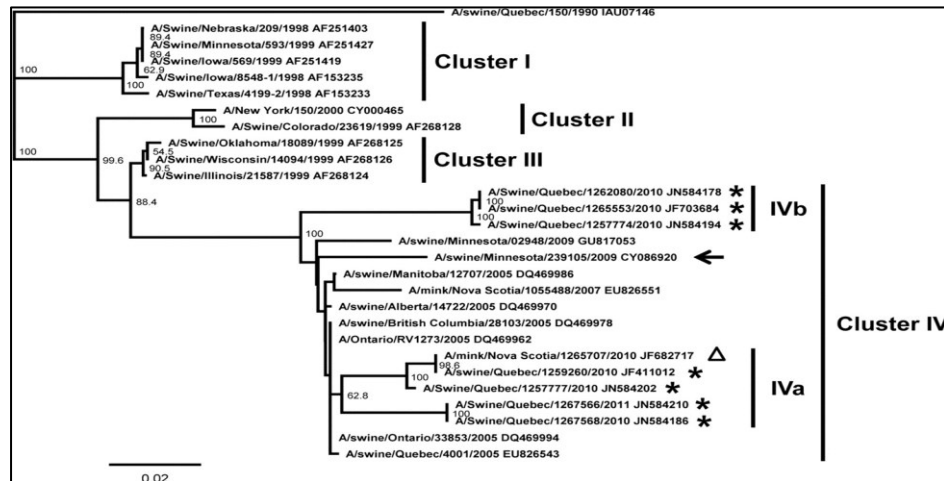


Figure 13 : Relations phylogénétiques du gène HA des virus porcins H3N2 du Québec présentées en association avec d'autres virus de référence. Les 4 Clusters (I, II, III, IVa et IVb) sont regroupés par des lignes sur la droite de l'arbre phylogénétique. Cluster I = trH3N2 [A/Swine/ON/33853/2005 (H3N2)], Cluster II = [HA, NA, PB1 et NS = trH3N2; M, PB2, PA et NP = A(H1N1)pdm09], Cluster III = [HA et NA = trH3N2; M, NS, NP, PA, PB1 et PB2 = A(H1N1)pdm09], Cluster IVa = sous-groupe swH3N2/A(H1N1)pdm09 et Cluster IVb = sous-groupe H3N2/A(H1N1)pdm09. Une distance de 0,02 signifie que les souches présentent une identité de 98%, tirée de Tremblay, 2011.

1.7.3 GRIPPE A(H1N1)pdm09

Depuis 1998, les épidémies d'influenza virus ont majoritairement été causées par des virus des sous-types H3N2, H1N1 et H1N2. En 2010, un nouveau sous-type viral a été identifié appelé le VI A(H1N1)pdm09 (Morens *et al.*, 2010). Le génome de ce virus A(H1N1)pdm09 est constitué d'une mosaïque de segments d'ARNg de différentes origines: le segment PB1 d'origine humaine, les segments HA, NA, NP, M et NS d'origine porcine et les segments PA et PB2 d'origine aviaire (Garten *et al.*, 2009). Le premier cas positif du VI pandémique enregistré dans la population porcine canadienne a été rapporté le 28 avril 2009 en Alberta (Leslieville, Alberta), dans une ferme porcine présentant des animaux non vaccinés contre la grippe porcine (Berhane *et al.*, 2010).

CHAPITRE II : HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

2.1 PROBLÉMATIQUE

La grippe porcine est une infection virale hautement contagieuse chez les porcs. La grippe peut être à l'origine des pertes économiques énormes chez la population porcine. De plus, l'évolution rapide des virus de la grippe conduit à des variabilités génomiques et antigéniques chez les virus influenza porcins au Québec. Ces dernières conduisent parfois à des résultats faux négatifs dans les tests de diagnostic sérologique et moléculaire (amorces/RT-PCR). Pour faire face à cette problématique, il devenait important d'évaluer et de caractériser la variabilité génomique et antigénique des virus influenza porcins qui circulent au Québec.

2.2 HYPOTHÈSE

L'hypothèse de recherche de ce mémoire est que les variabilités génomiques et antigéniques des VIs porcins conduisent à l'émergence de nouveaux sous-types viraux dans la population porcine du Québec perturbant l'efficacité des tests de diagnostic sérologique et moléculaire.

2.3 OBJECTIFS

- 1) Isoler les VIs porcins d'élevage au prise avec des signes cliniques, suite à l'inoculation de cellules MDCK et/ou d'œufs embryonnés de 10 jours d'âge.
- 2) Caractériser les souches des VIs isolées chez le porc au Québec entre 2011 et 2015 au niveau moléculaire et phylogénétique.
- 3) Identifier les mutations ponctuelles au niveau des épitopes antigéniques et des sites de fixation au récepteur (RBS) de la protéine HA.
- 4) Identifier par prédiction les sites potentiels de N-glycosylation de la protéine HA des souches de VI porcins.
- 5) Identifier les profils de résistances aux antiviraux des souches québécoises du VI porcins.
- 6) Déterminer les impacts potentiels des variations génomiques du VIs porcins au Québec sur les tests de diagnostic moléculaire (amorces/RT-PCR).

CHAPITRE III: RÉSULTATS

Authors' contributions

Carl A. Gagnon and Josée Harel conceived the Project. Zeineb Mhamdi conducted cells culture (MDCK), Swine influenza virus isolation, RNA extraction, reverse transcriptase PCR (RT-PCR) and nucleotide sequencing. Zeineb Mhamdi, Christian Savard and Carl A. Gagnon conducted data analysis and construction of phylogenetic trees. Zeineb Mhamdi and Christian Savard conducted data analysis for antiviral resistance. Zeineb Mhamdi wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript. The authors declare no conflict of interest.

3.1 ARTICLE

Type of influenza A virus reassortant strains circulating in Quebec swine and their antiviral drugs resistance from 2011 to 2015

Zeineb Mhamdi¹, Christian Savard¹, Josée Harel¹, Carl A. Gagnon^{1*}

¹Swine and Poultry Infectious Diseases Research Centre (CRIPA) and the Research Group on Infectious Diseases in Animal Production (GREMIP), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Qc, Canada.

* Corresponding author. Mailing address: Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Quebec, Canada J2S 7C6. Phone: 450-773-8521 (8681). Fax: 450-778-8108. E-mail: carl.a.gagnon@umontreal.ca

Abstract

Data about genomic variability of swine influenza A viruses (SIV) in Quebec herds are scarce. Yet, this information is important for understanding virus evolution in Quebec from until 2015. Different clinical samples were obtained from 24 outbreaks of swine flu in which animals were experiencing respiratory disease. Samples including lung tissues, saliva and nasal swabs were collected and virus isolation was attempted in MDCK cells and embryonated eggs. All eight gene segments of the 18 isolated SIV strains were sequenced and analysed. Antiviral drugs resistance against oseltamivir carboxylate (GS4071), zanamivir (GS167) and amantadine hydrochloride was evaluated by neuraminidase inhibition assays (NAIs) and plaque reduction assay. Two subtypes of SIV, H3N2 and H1N1, were identified in Quebec pig herds. Twelve SIV strains were genetically related to trH3N2 Cluster IV and at least 6 different reassortment profiles were identified. On the other hand, 6 Quebec SIV strains were found to be genetically related to the pandemic virus A(H1N1)pdm09 and from which three reassortment profiles were identified. Overall, the trH3N2 was the most prevalent subtype (66.7%) found in Quebec swine herds. The epitope mapping of HA indicated that the H3 subtype was the most variable with a possibility of 21 amino acids (aa) substitutions within the 5 antigenic sites A(5), B(8), C(5), D(1) and E(2). However, the HA protein of the H1 subtype had only 5 aa substitutions within 3 antigenic sites Sb(1), Ca1(2) and Ca2(2). One H1N1 ($1/6 = 16.7\%$) and one trH3N2 ($1/12 = 8.3\%$) were identified as strains resistant against oseltamivir. In contrast, two H1N1 ($2/6 = 33.3\%$) and two trH3N2 ($2/12 = 16.7\%$) strains were found to be resistant against zanamivir. Overall, the SIV resistance against antiviral neuraminidase inhibitor drugs was (33.3%). All strains were resistant against the M2 inhibitor antiviral drug, amantadine. The presence of antiviral drug resistance in Quebec swine herds and the possible emergence of new SIVs strains are public health concerns supporting the surveillance of SIVs.

Keywords: Influenza A virus; Swine; H1N1; H3N2; Reassortment; Antiviral resistance; Neuraminidase inhibitors.

I. Introduction

Swine flu is a highly contagious acute viral disease of the respiratory tract of pigs which is widespread worldwide (Brown, 2013). Typical swine flu outbreaks are characterized by high fever, lethargy, respiratory distress, coughing, sneezing, and nasal discharge (Cong *et al.*, 2007). Its morbidity rate is usually high (nearly 100%), but mortality is generally low (<1%) (Olsen *et al.*, 2006). Such symptoms result in weight loss in fattening pigs and generate important economic losses to swine industry (Kay *et al.*, 1994). Its etiological agent, influenza A virus (IAV), is a member of the viral family *Orthomyxoviridae*, genus *Influenzavirus A* (Thiry *et al.*, 2007). The genome of IAV is composed of eight segments (Zhou *et al.*, 1999) coding for Hemagglutinin (HA), Neuraminidase (NA), Matrix protein (M), Non Structural protein (NS), Nucleoprotein (NP) and transcriptase protein (PA, PB1 and PB2). On the basis of the antigenicity of HA and NA surface glycoproteins, influenza A viruses are classified into 18 HA subtypes (H1-H18) and eleven NA subtypes (N1-N11) (Tong *et al.*, 2013). Segmentation of the viral genome allows for entire viral genes exchange between different IAV strains, a genetic exchange mechanism called reassortment (Zell *et al.*, 2013). Reassortment, which appears when more than one strain are simultaneously co-infecting a cell, provide an efficient way to increase virulence (epidemic potential and host range) of a new IAV strain (Hause *et al.*, 2012). Thus, pigs could be a convenient host for the production of reassortant viruses with pandemic potential. Of the three flu pandemics in the twentieth century, the 1957 (Asian flu) and 1968 (Hong Kong flu) pandemics were both caused by reassortant influenza virus strains from avian and human viruses (Lindstrom *et al.*, 2004; Scholtissek *et al.*, 1978). In April 2009, a previously unrecognized H1N1 of swine-origin subtype appeared in human population. This pandemic strain was a triple reassortant virus of swine origin containing genes from swine, human and avian influenzaviruses (Donaldson *et al.*, 2009). Because epithelial cells of swine trachea contain both avian-like α -2,3-linked sialic acid receptors and human-like α -2,6-linked sialic acids receptors, pigs can be infected by avian and mammalian origin IAVs, which may facilitate the reassortment phenomena and promote the appearance of new viruses with higher pathogenicity (Ito *et al.*, 1998). The HA protein of influenza virus binds to sialic acid receptors on host cells and is the major target of neutralizing antibodies. Viruses originating from this mechanism are able to infect and spread among pigs to cause seasonal swine flu outbreaks. Occasionally, drifted viruses may also cross the species barrier (Olsen *et al.*, 2006). The classical swine lineage H1N1 (cH1N1) SIV, was first isolated from pigs in the Midwestern U.S. in 1930 (Shope,

1931a). From 1930 through the mid-1990, the epidemiology of SIV in the United States (U.S.), was stable at the genomic levels with cH1N1 being the predominant subtype among swine populations in North America (Karasin *et al.*, 2000b). In August 1998, a triple-reassortant internal genes H3N2 (TRIG) composed: HA, NA and PB1 derived from humans H3N2 seasonal influenza viruses (huH3N2), PA and PB2 from avian-origin IAVs, and NP, M and NS from cH1N1 (Vincent *et al.*, 2009b; Zhou *et al.*, 1999). In 1998, phylogenetic analyses of HA genes from trH3N2 can be classified into at least four genetic clusters I, II, III and IV (Gramer *et al.*, 2007; Olsen *et al.*, 2006). Furthermore, these four genetic clusters were also antigenically distinct by different neutralization assays (Hause *et al.*, 2010). At present, phylogenetic studies of Lorusso and collaborators, 2011 and Vincent and collaborators, 2009 lead to grouping of the SIV H1 subtype circulating in North America into four clusters (α , β , γ and δ) based on genetic variations. All four H1 clusters can be associated with NA genes of either the N1 or N2 subtype in swine herds (Lorusso *et al.*, 2011). Therefore, surveillance of SIVs is needed in order to prevent emerging human influenza A virus threat in addition to provide information for potential vaccine updates (Kyriakis *et al.*, 2011). Therefore, the aim of the present study was to genetically identify the evolution of SIVs strains during outbreaks of respiratory disease in Quebec (Canada) swine herds from 2011 until 2015.

II. Material and Methods

2.1 Samples collection

Convenience samples were taken from pigs during outbreaks of acute respiratory disease. Samples including lung tissues, saliva and nasal swabs were selected based on their positive SIV status confirmed by a matrix gene RT-qPCR diagnostic assay (Tremblay *et al.*, 2011). Samples (n = 24) were submitted by veterinary practitioners between years 2011 to 2015 and submitted to Diagnostic Veterinary Virology Laboratory (DVVL) of the University of Montreal or ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) Complexe de diagnostic et d'épidémiologie vétérinaires du Québec (CDEVQ) laboratories, as part of routine diagnostic testing. Lung tissue homogenates, nasal swabs and saliva specimens were resuspended in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL of penicillin and 100 µg/mL of streptomycin, mixed vigorously, clarified by low speed centrifugation and stored at -80°C. Virus isolation was executed in eggs or in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells (Gagnon

et al., 2009). The presence or the absence of the SIVs was confirmed by hemagglutination assay (Hitachi, model HT7700).

2.2 Virus identification and phylogenetic analysis

Viral RNA was extracted from both SIV positive MDCK cell lysats and allantoic fluids using a Trizol-chloroform based method (Life Technologies, Burlington, ON, Canada). To determine the viral genome characteristics of the SIV isolates, the full genome (8 segments) of SIVs were amplified by RT-PCR. The PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (QIAquick PCR purification kit; Qiagen), and the purified PCR products were sequenced, as previously described (Gagnon *et al.*, 2009). Thereafter, the SIV subtypes and genotypes were defined by pairwise comparisons to influenza A virus reference sequences identified by their state and year of origin in Figures (1 to 4) and supplementary Figure (S1 to S6). Sequences were aligned for each individual internal segments (PB1, PB2, PA, NP, M and NS) and major envelope protein segments (HA and NA). HA and NA were aligned separately based on subtypes classification (H1 and H3 for HA, N1 and N2 for NA). Phylogenetic trees of each viral gesegments were generated by the PHYLIM (Maximum Likelihood) method (Guindon & Gascuel, 2003) with 500 bootstrap replicates with Geneious pro (version 8.1.7) (Biomatters, Ltd., Auckland, New Zealand), using MAFFT alignment (Kato *et al.*, 2002).

2.3 Nucleotide sequence accession numbers:

The GenBank numbers assigned to the gene sequences of the viruses investigated in the present study are as follows:

FMV-15-1708732.sqn: KX571068, KX571087, KX571114, KX571138, KX571161, KX571164, KX571200, KX571217; **FMV-11-P0316.sqn:** KX571069, KX571088, KX571117, KX571162, KX571165, KX571201; **FMV-11-1279825.sqn:** KX571070, KX571089, KX571118, KX571141, KX571166, KX571182, KX571202, KX571218, **FMV-11-1279920.sqn:** KX571071, KX571090, KX571119, KX571142, KX571167, KX571183, KX571203, KX571219; **FMV-14-1561816.sqn:** KX571072, KX571092, KX571121, KX571144, KX571168, KX571185, KX571204, KX571220; **FMV-14-1698185.sqn:**

KX571073, KX571093, KX571122, KX571145, KX571169, KX571186, KX571205, KX571221; **FMV-14-1698182.sqn:** KX571074, KX571094, KX571123, KX571146, KX571170, KX571187, KX571206, KX571222; **FMV-14-1626561.sqn:** KX571075, KX571098, KX571127, KX571150, KX571174, KX571191, KX571209, KX571223; **FMV-13-1557833.sqn:** KX571076, KX571099, KX571128, KX571151, KX571175, KX571192, KX571210, KX571224; **FMV-15-1708733.sqn:** KX571077, KX571100, KX571129, KX571152, KX571176, KX571193, KX571211, KX571225; **FMV-15-1714808.sqn:** KX571078, KX571103, KX571132, KX571155, KX571179, KX571196, KX571214, KX571226; **FMV-14-1603088.sqn:** KX571079, KX571104, KX571134, KX571157, KX571180, KX571197, KX571215, KX571227; **FMV-14-1605785.sqn:** KX571080, KX571086, KX571106, KX571112, KX571136, KX571160, KX571163, KX571199; **FMV-14-1683217.sqn:** KX571081, KX571095, KX571107, KX571124, KX571147, KX571171, KX571188, KX571207; **FMV-14-1587352.sqn:** KX571082, KX571096, KX571108, KX571125, KX571148, KX571172, KX571189, KX571208; **FMV-14-1698189.sqn:** KX571083, KX571101, KX571109, KX571130, KX571153, KX571177, KX571194, KX571212; **FMV-14-1600117.sqn:** KX571084, KX571102, KX571110, KX571131, KX571154, KX571178, KX571195, KX571213; **FMV-15-1709376.sqn:** KX571085, KX571105, KX571111, KX571135, KX571159, KX571181, KX571198, KX571216; **FMV-12-1428325.sqn:** KX571091, KX571120, KX571143, KX571184; **FMV-14-1615034.sqn:** KX571097, KX571126, KX571149, KX571173, KX571190; **FMV-13-1467662.sqn:** KX571113, KX571137; **FMV-13-1467661.sqn:** KX571115, KX571139; **FMV-14-1561817.sqn:** KX571116, KX571140; **FMV-12-1428324.sqn:** KX571133, KX571156; **FMV-11-p0316.sqn:** KX571158, KX571228.

III. Results

3.1 Virus isolation

A total of 18 influenza virus strains were isolated (75%) from our 24 RT-qPCR SIV positive samples. Interestingly, 16, 7 and 1 of them were isolated from lung tissues, saliva and nasal swabs, respectively, as indicated in the supplementary Table 1. Noteworthy, the viral genome of the 6 cases, from which viruses were not isolated, were partially sequenced from the submitted samples. FMV-12-1428324, FMV-12-1428325, FMV-13-1467662, FMV-13-1467661, FMV-14-1561817 and FMV-14-1615034 SIV isolated strains were obtained from clinical cases that occurred in 2012 until 2014, respectively (Supplemental Table 1).

3.2 Phylogenetic analyses of the HA and NA genes of H3N2 SIV strains

During 2011 until 2015, 12 out 18 (66.7%) Quebec SIV isolated strains were classified as H3N2. The phylogenetic relationships between the 12 H3N2 SIVs isolates from Quebec herds between 2011 until 2015 and the previously SIVs H3N2 reference in GenBank are presented in (Figure 1), and the nucleotide identity analyses are presented in Table 1. All 12 H3N2 viruses are genetically related to the trH3N2 cluster IV (Figure 1). The NA proteins from the Quebec SIVs H3N2 were genetically originated to swine North American origin as illustrated in (Figure 2). The 12 Quebec H3N2 subtype were similar to the North American trH3N2 cluster IV [A/swine/Ontario/33853/2005] (Olsen *et al.*, 2006), with 95.2 to 98.9% and 96.4 to 99.9% nucleotides identity of HA and NA proteins, respectively (Table 1).

3.3 Phylogenetic analyses of the HA and NA genes of H1N1 SIV strains

During 2011-2015, 6 out 18 (33.3%) Quebec SIV isolated strains were classified as H1N1. The phylogenetic relationships in HA proteins between the 6 H1N1 SIV isolates from Quebec herds between 2014 and 2015 and the previously SIVs H1N1 reference in GenBank are presented in (Figure 3). The nucleotide identity analyses are presented in Table 2. All the 6 SIVs H1N1 were originated to the A(H1N1)pdm09 (Figure 3). The NA proteins from H1N1 SIVs were highly originated to avian origin as illustrated in (Figure 4). The 6 Quebec H1N1 were similar to the A(H1N1)pdm09 [A/swine/New York/19/2009], with 99.6 to 99.8% and 90.0 to 99.8% nucleotides identity of the HA and NA proteins respectively (Table 2).

3.4 Phylogenetic analysis of the NP, M, NS, PA, PB1 and PB2 genes

Percentage of nucleotides identity of all internal genes sequence of the H3N2 and H1N1 subtypes are illustrated in Table 1 and 2. Phylogenetic trees generated with internal genes sequences indicated that these segments are related to the triple reassortant internal gene (TRIG) constellation. In fact, the M, NP and NS proteins were found to be related to swine lineage. The PB2 and PA proteins were found to be originated to avian lineage and PB1 proteins were found to be related to human lineage. The 58.3 % of NS (n = 14), 100 % of NP, 100 % of M, 71.4 % of PA (n = 15), 57.9 % of PB1 (n = 11) and 60 % of PB2 (n = 12) genes the highest level of identity to the A(H1N1)pdm09. The 41.7 % of NS (n = 10), 28.6 % of PA (n = 6), 42.1% of PB1 (n = 8) and 40 % of PB2 (n = 8) genes had the highest level of identity to trH3N2 cluster IV, as illustrated in Table 1 and 2. Whole-genome analyses of the SIVs H3N2 in the present study indicated that at least 6 different reassortant profiles (RP) (RP1 to RP6) of trH3N2, resulting from different reassortment events currently circulating in Quebec herds from 2011 until 2015, as indicated in Table 1. The number of A(H1N1)pdm09 segments integrated into trH3N2 Quebec SIVs varied between 3 segments (RP5) to all 6 internal genes (RP2). Data from whole-genomic analyses of H1N1 SIVs indicate that at least 3 different RP (RP1 to RP3) of A(H1N1)pdm09, presently circulating in Quebec herds from 2014 until 2015, resulting by multiple reassortment occurrence, as indicated in Table 2. The number of trH3N2 segments integrated into Quebec SIVs A(H1N1)pdm09 subtype varied between one (RP3) to 4 segments (RP1 and RP2). Notably, genotypes RP1 (50%), was most frequently detected in Quebec SIVs than other genotypes.

3.5 HA antigenic sites analysis of H3N2 SIV strains

In order to detect the aa changes in A, B, C, D and E antigenic sites (Stray & Pittman, 2012), the 12 HA aa sequences were aligned and compared to another Canadian reference strain, A/swine/Ontario/33853/2005. Twenty-one potential aa changes within the 5 antigenic sites, A (n = 5), B (n = 8), C (n = 5), D (n = 1) and E (n = 2), were found in the 12 SIVs H3N2 strains (Figure 5). Antigenic sites A and B were found to be the most variable within Quebec H3N2 SIV strains. The receptor binding site of Quebec SIVs was found to be conserved (data not shown). The N-glycosylation sites (motif N-X-T/S; X cannot be a proline) have been determined, using the NetNGlyc1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>). A total of 6 potential N-glycosylation sites have been predicted for the 12 H3N2 SIVs strains and were located at position 22, 38, 63, 126, 165 and 285, with one exception, strain FMV-14-1698182 has an additional potential N-glycosylation site at residue 246 (data not shown).

3.6 HA antigenic sites analysis of the Quebec H1N1 SIV strains

In order to detect the aa changes in Sa, Sb, Ca1, Ca2 and Cb antigenic sites (Sun *et al.*, 2013), the 6 HA aa sequences were aligned and compared to the A/Mexico/InDRE4487/2009, reference strain. Antigenic sites are demonstrated in (Figure 6). Five potential aa changes within the 4 antigenic sites Sb (n = 1), Ca1 (n = 2) and Ca2 (n = 2) were identified in the HA of Quebec H1N1 strains. Antigenic sites Ca1 and Ca2 were found to be the most variable within Quebec H1N1 SIVs strains. The receptor binding site of Quebec isolates was not conserved at position 140, 179 and 180 for the FMV-14-1683217 and FMV-14-1587352 strains (data not shown). Only one N-glycosylation site, at position 44, has been detected in all the 6 H1N1Quebec SIV strains.

3.7 Antiviral resistance of Quebec SIV strains

Eighteen isolates were tested to establish their resistance potential against antiviral NA inhibitors oseltamivir and zanamivir. Viruses are considered resistant if the $IC_{50} > 10nM$. One H1N1 (1/6 = 16.7 %) [FMV-14-1683217], and one H3N2 trH3N2 (1/12 = 8.3%) [FMV-14-1603088] strains were found to be resistant against oseltamivir (Tableau 3). In contrast, two H1N1 strains (2/6 = 33.3%) [FMV-14-1605785; FMV-14-1600117], and two trH3N2 strains (2/12 = 16.7%) [FMV-11-1279920; FMV-14-1698182] were found to be resistant against zanamivir (Tableau 3). Taken together, the overall NA inhibitors antiviral resistance was 33.3%. To establish if the observed antiviral resistance could correlate with NA aa sequences, they were aligned and analyzed. The results demonstrated the existence of some aa changes, that were previously illustrated to be correlated to antiviral drug resistance (Samson *et al.*, 2013), such as H275Y and E119V, were found in FMV-14-1600117, FMV-14-1605785, FMV-14-1683217, FMV-14-1603088, FMV-11-1279920 and FMV-14-1698182 strains. All the Quebec SIV strains tested were resistant against amantadine. Interestingly, all Quebec M2 sequence SIV strains possess the amantadine resistant-mutation in the M2 gene, i.e. the S31N and R77Q aa conversion (Schmidtke *et al.*, 2006).

IV. Discussion

Influenza viruses (IVs) continues to circulate and causing a considerable morbidity in swine population in Canada in spite of control efforts (Brown, 2000), and represent a potential risk to human population (Centers for Disease & Prevention, 2012a; b). The aims of this study was to the genetic and antigenic characteristics of Quebec SIV isolates that are circulating in swine herds (from 2011 until 2015). Based on the present data, it can be concluded that trH3N2 cluster IV (66.7%) together with A(H1N1)pdm09 (33.3%) SIV were circulating in Quebec swine herds during 2011 ton 2015. In the 12 Quebec trH3N2 cluster IV isolated strains and all internal genes were genetically related to trH3N2 cluster IV and pandemic A(H1N1)pdm09. Genomic constellation revealed at least six different reassortment profiles (RP1 to RP6). The characterization of the Quebec H3N2 viruses clearly indicates reassortment of gene segments between the North American swine trH3N2 from cluster IV and the A(H1N1)pdm09. Similar SIVs have been observed until emergence of pandemic A(H1N1)pdm09 in 2009 (Ducatez *et al.*, 2011; Gagnon *et al.*, 2009; Grgic *et al.*, 2014). Recently, Kitikon.(2013), reported ten reassortment profiles based on trH3N2/A(H1N1)pdm09 gene combination. For the H1N1 strains all internal genes were genetically related to trH3N2 cluster IV and A(H1N1)pdm09. Genomic constellation of H1N1 viruses revealed at least three different reassortment profiles (RP1 to RP3). Wenjun and collaborators (2014), reported at least, six or seven reassortment profiles based on trH3N2/A(H1N1)pdm09 gene combination (Ma *et al.*, 2014). Genomic analysis of the H3N2 and H1N1 Quebec SIVs clearly indicates the presence of reassortments between the trH3N2 cluster IV and the pandemic A(H1N1)pdm09. Noteworthy, all trH3N2 and H1N1 RP possess the A(H1N1)pdm09 derived M gene. In 2011, the introduction of the M gene from the pandemic A(H1N1)pdm09 viruses to the H3N2 SIV generated the H3N2 variant viruses (H3N2v), which infect humans and have pandemic potential HA1 protein of Quebec trH3N2 and H1N1 SIV strains possess 21 and 5 aa changes within their antigenic sites, respectively. Wilson and collaborators.(1990) proposed that four or more aa substitutions located in two or more epitopes on the HA protein leading for serious epidemiologic importance (Wilson & Cox, 1990). Therefore, observed aa changes in the antigenic sites of the 18 Quebec SIV isolates suggest virus fitness probably due to virus antibody escape mutants that consequently could have an effect on antibody recognition (Caton *et al.*, 1982; Retamal *et al.*, 2014). This however, should be investigating further with antigenic studies. Additionally, Wood and collaborators (1989) have shown that 1 to 3 substitutions in the HA1 of H1 and H3 subtypes

can reduce efficacy of vaccine, the antigenicity and cross reactivity (Kodihalli *et al.*, 1995; Wood *et al.*, 1989). Consequently, it will be important to conduct heterologous vaccine efficacy studies to better appreciate the impact of those aa changes in immune protection. Nonetheless, the amount of aa changes is relatively high, particularly for trH3N2 strains, that it is fair to assume that there is an impact on commercial swine vaccine efficacy. Furthermore, the increase of N-linked glycosylation sites on the HA protein is thought to play a critical role for IVs by shielding epitopes from interaction with antibodies (Mishin *et al.*, 2005b; Vigerust *et al.*, 2007). The fact the more trH3N2 cluster IV strains were found in Quebec swine herds may be explained by the fact that those strains have the higher amount of potential N-glycosylation sites, also have the potential to be more efficient to escape neutralization by host antibodies. The Quebec SIV antiviral resistant strains found were from 2014. Interestingly, the SIV strains resistant against oseltamivir were different compared to the ones resistant against zanamivir. Overall, the SIV resistance against antiviral neuraminidase inhibitors was relatively high with a value of 33.3%. Since the first wave of the pandemic H1N1 virus, the overall level of oseltamivir resistance in human amongst A(H1N1)pdm09 variants has remained relatively low (0.5%) until the 2007–2008 (Renaud *et al.*, 2011); <1% in the U.S (Storms *et al.*, 2012), <1% in Canada (Hutchinson & Segard, 2010), 2.5% in Europe and 1.6% worldwide (Hurt *et al.*, 2012). The prevalence of antiviral drug-resistance has increased significantly in U.S. from 11% in 2009-2010 season to 74% in 2010-2011 season (Storms *et al.*, 2012). Interestingly, it is likely that oseltamivir and zanamivir-resistant viruses possess the ability to be transmitted among pigs. To our knowledge, it is the first time that the antiviral resistance rate against neuraminidase inhibitors has been evaluated in Quebec SIV strains. Amantadine resistance-associated mutations, such as S31N and R77Q (Abed *et al.*, 2005; Krumbholz *et al.*, 2009), have been detected in all Quebec SIV strains included in the present study which could explained that all Quebec SIV strain are resistant against amantadine. Phenotypic analysis of SIV isolated in Germany confirmed amantadine resistance (86.2%) (Krumbholz *et al.*, 2009). The frequency of amantadine-resistance makers among SIV in the U.S. was high (71%) (Baranovich *et al.*, 2015). Besides amantadine resistance, oseltamivir and zanamivir resistance among Quebec pig herds suggest that swine could be a reservoir for the persistence of influenza A virus antiviral resistant strains but since antiviral drugs or not used by the swine industry stakeholders, it is certainly not involved in the onset of the antiviral drug resistance. In conclusion, two genotypes of influenza A virus: trH3N2 cluster IV and A(H1N1)pdm09 are currently circulating in Quebec swine herds. The trH3N2 cluster IV stain type was the dominant genotype in Quebec pigs from 2011 to 2015.

Pigs are believed to play a vital role in generating influenza A virus reassortants. Overall, these findings highlight the importance of whole genome sequencing for understanding the evolution of genetic diversity among SIV, which has important implications for both public and animal health. Fortunately, influenza virus antiviral drugs are not used for the control of the disease in swine and thus, it is not a risk factor and a concern for the establishment of the antimicrobial resistance.

Acknowledgement

The authors thank Denis St-Martin, Philippe Garneau and Veronique Allard for their technical support. The analysed swine samples were kindly provided by the Diagnostic service of the Faculté de médecine vétérinaire of Université de Montréal and the ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ). This study was financially supported by the MAPAQ. CAG was financially supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) discovery grant. ZM received scholarships from Faculté de médecine vétérinaire of Université de Montréal and CRIPA for the completion of her graduate degree.

Table 1: Genomic constellations identified in contemporary H3N2 viruses isolated from Quebec swine herds. Origin of each gene segment in colour-coded according to the gene lineage.

Viruses	HA	NA	M	NS	NP	PA	PB1	PB2	Reassortment profiles
^a A(H1N1)pdm09									-
^b trH3N2 cluster IV									-
^c trH3N2/A(H1N1)pdm09									-
FMV-13-1557833	95,90%	97,30%	100%	99,60%	99,90%	99,30%	100%	100%	RP1
FMV-14-1626561	95,90%	96,40%	99,90%	99,80%	99,50%	99,70%	99,80%	99,80%	RP1
FMV-11-1279920	95,90%	97,30%	100%	99,90%	97,90%	99,30%	99,90%	99,90%	RP1
FMV-11-1279825	98%	97,60%	99,30%	99,90%	99,80%	99,30%	100%	100%	RP2
FMV-14-1603088	95,90%	97,20%	99,90%	99,90%	99,50%	99,30%	99,80%	99,60%	RP2
FMV-14-1698185	97,80%	97,60%	99,70%	99,50%	99,40%	99,50%	99,70%	99,70%	RP2
FMV-15-1708733	98,90%	98,40%	99,90%	100%	99,50%	99,50%	99,90%	99,90%	RP2
FMV-11-p0316	95,20%	97,30%	100%	99,80%	99,80%	98,50%	100%	100%	RP3
FMV-14-1561816	98,60%	99,90%	99,90%	97,80%	99,90%	99,70%	99,70%	99,70%	RP4
FMV-14-1698182	98,70%	98,20%	99,90%	99,60%	99,60%	99,50%	98,80%	98,80%	RP5
FMV-15-1714808	97,10%	98,50%	99,90%	98,30%	99,40%	99%	97,70%	97,70%	RP5
FMV-15-1708732	98,90%	99,90%	99,80%	99,90%	99,30%	99,50%	99,60%	99,60%	RP6

^apdm09H1N1 lineage; dark gray, ^btrH3N2 cluster IV lineage; light gray, ^ctrH3N2/A(H1N1)pdm09 lineage; reassorted rH3N2p

Table 2: Genomic constellations identified in contemporary H1N1 viruses isolated from Quebec swine herds. Origin of each gene segment in colour-coded according to the gene lineage.

Viruses	HA	NA	M	NS	NP	PA	PB1	PB2	Reassortment profiles
^a A(H1N1)pdm09									-
^b trH3N2 cluster IV									-
^c trH3N2/A(H1N1)pdm09									-
FMV-14-1587352	99,70%	90,00%	99,90%	99,60%	99,90%	99,80%	99,80%	99,80%	RP1
FMV-14-1600117	99,80%	90,00%	99,90%	99,60%	99,70%	98,50%	99,50%	99,50%	RP1
FMV-14-1605785	99,70%	99,60%	99,90%	99,50%	99,90%	98,70%	99,70%	99,70%	RP1
FMV-14-1698189	99,80%	99,70%	99,90%	99,50%	99,40%	99,50%	99,90%	99,70%	RP2
FMV-14-1683217	99,60%	99,40%	99,70%	99,90%	99,40%	99,50%	99,70%	99,70%	RP2
FMV-15-1709376	99,80%	99,80%	100%	100,00%	99,40%	99,50%	100%	100%	RP3

^apdm09H1N1 lineage; dark gray, ^btrH3N2 cluster IV lineage; light gray, ^ctrH3N2/A(H1N1)pdm09 lineage; reassorted rH3N2p

Table 3: HA amino acid sequences of the antigenic sites (A, B, C, D and E) of H3N2 Quebec swine influenza virus

Amino acid position in the HA1																														
A														B																
Strains	121	122	124	126	131	133	135	137	138	140	141	144	145	155	156	158	159	160	186	188	189	193	197	198	199	247	248			
DQ469994	T	Q	S	N	A	D	S	Y	A	R	R	V	N	H	N	D	Y	K	G	D	R	N	Q	A	S	N	S			
FMV-11-1279825	N			
FMV-11-p0316	N	R	S	.	.	D	.	.	H	G	H	.	S	.	E	S			
FMV-11-1279920	N	.	R	S	.	.	D	.	Y	H	G	H	.	.	.	K	S	.	T	.	.	.			
FMV-13-1557833	N	.	R	S	.	.	D	.	Y	H	G	H	.	.	.	K	S			
FMV-14-1561816	N	A	T	.	.	.			
FMV-14-1603088	N	A			
FMV-14-1626561	N	.	R	S	.	.	D	.	Y	H	G	H	.	.	.	K	S			
FMV-14-1698185	N			
FMV-14-1698182	N			
FMV-14-1708732			
FMV-15-1714808	D	.	.	.	N			
FMV-15-1708733	N	S	.	.	.	Y	.	N	H	.	.	.	K	S			
C														B										E						
Strains	49	50	53	54	271	273	275	276	278	166	201	202	207	214	216	219	220	222	223	225	226	227	242	62	75	78	83	91	92	94
DQ469994	G	R	N	S	D	P	G	N	N	V	R	V	K	I	N	S	R	W	V	G	V	S	I	K	H	D	E	S	T	Y
FMV-11-1279825	.	.	.	N	S	K
FMV-11-p0316	.	G	.	.	.	S	D	E	.	.	K	.	.	.
FMV-11-1279920	.	G	.	.	.	S	D	K
FMV-13-1557833	.	G	.	.	.	S	D	K
FMV-14-1561816
FMV-14-1603088
FMV-14-1626561	.	G	.	.	.	S	D	K
FMV-14-1698185	S
FMV-14-1698182
FMV-14-1708732
FMV-15-1714808	.	.	.	N	K	E	.	.	K	.	.	.
FMV-15-1708733	S	K	.	.	.

- The 12 H3 predicted HA1 proteins were aligned and compared to that of H3N2 cluster IV (A/swine/ON/33853/2005), GenBank accession no. DQ469994.

Table 4: HA amino acid sequences of the antigenic sites (Sa, Sb, Ca1, Ca2 and Cb) of H1N1 Quebec swine influenza virus

Amino acid position in the HA1																										
Sa														Sb												
Strains	81	82	110	111	112	113	114	116	117	118	119	120	121	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	
GQ303340	P	N	K	K	G	N	S	P	K	L	S	K	S	T	S	A	D	Q	Q	S	L	Y	Q	N	A	
FMV-14-1605785	K	
FMV-14-1698189
FMV-14-1683217	K
FMV-14-1587352	K
FMV-14-1600117
FMV-15-1709376	K
Ca1												Ca2						Cb								
Strains	123	124	125	126	127	159	160	161	162	192	193	95	96	97	98	99	100	178	179	27	28	19	30	31	32	
GQ303340	I	N	D	K	G	G	S	S	R	E	P	H	A	G	A	K	S	R	D	L	S	T	A	S	S	
FMV-14-1605785
FMV-14-1698189
FMV-14-1683217	K
FMV-14-1587352	T
FMV-14-1587353	T	N	.	E
FMV-15-1709376

- The 6 H1 predicted HA1 proteins were aligned and compared to that of 2009 pandemic H1N1 (A/Mexico/InDRE4487/2009), GenBank accession no. GQ303340.

Supplementary Table S 1: Viral genome sequence homologies of Quebec SIV strains with references strains

Influenza A virus strains	Submitted samples	Isolated strains (in MDCK or eggs)	Number of cell passage	HA	NA	M	NS	NP	PA	PB1	PB2
^a A(H1N1)pdm09											
^b trH3N2 cluster IV											
^c trH3N2/A(H1N1)pdm09											
FMV-11-1279825	Lung tissue	+	2								
FMV-11-1279920	Nasal swab	+	2								
FMV-11-p0316	Lung tissue	+	2								
FMV-13-1557833	Lung tissue	+	2								
FMV-14-1587352	Lung tissue	+	2								
FMV-14-1600117	Lung tissue	+	2								
FMV-14-1605785	Lung tissue	+	2								
FMV-14-1603088	Lung tissue	+	2								
FMV-14-1561816	Lung tissue	+	2								
FMV-14-1626561	Lung tissue	+	2								
FMV-14-1698185	Saliva	+	3								
FMV-14-1698182	Saliva	+	3								
FMV-14-1698189	Saliva	+	3								
FMV-14-1683217	Saliva	+	3								
FMV-15-1709376	Saliva	+	3								
FMV-15-1708732	Saliva	+	3								
FMV-15-1708733	Saliva	+	3								
FMV-15-1714808	Lung tissue	+	3								
FMV-12-1428325	Lung tissue	-	None	^d n.d.	n.d.			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FMV-12-1428324	Lung tissue	-	None	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FMV-13-1467662	Lung tissue	-	None	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FMV-13-1467661	Lung tissue	-	None	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FMV-14-1561817	Lung tissue	-	None	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FMV-14-1615034	Lung tissue	-	None	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

^a[GenBank accession no. FJ998206 to FG998220], ^b[GenBank accession no. DQ469987 to DQ469994] and ^c[GenBank accession no. JN584207 to JN584214]. Colour-coding of genotypes is used to show that the viral genes are genetically related to references strains. Numbers in squares indicate the percentage of nucleotides identity compared to the genetically related strain. ^dn.d.: not determined.

Table 5: Neuraminidase inhibitor susceptibility of swine influenza A viruses isolated in Quebec between 2011 and 2015

Subtypes	Reassortment profiles	Isolates	Oseltamivir		Zanamivir	
			^a IC ₅₀ (nM)	Resistance	IC ₅₀ (nM)	Resistance
H3N2	RP1	FMV-11-1279920	0.08 ± 0,01	-	13.02 ± 1,30	+
"	"	FMV-13-1557833	17.19 ± 0,13	+	0.00 ± 0,00	-
"	"	FMV-14-1626561	0.00 ± 0,00	-	5.82 ± 0,20	-
"	RP2	FMV-11-1279825	0.13 ± 0,02	-	1.08 ± 0,09	-
"	"	FMV-14-1603088	1454.75 ± 4,3	+	5.78 ± 0,01	-
"	"	FMV-14-1698185	0.08 ± 0,01	-	2.06 ± 0,30	-
"	"	FMV-15-1708733	0.00 ± 0,00	-	0.00 ± 0,00	-
"	RP3	FMV-11-p0316	0.83 ± 0,01	-	2.18 ± 0,01	-
"	RP4	FMV-14-1561816	0.44 ± 0,01	-	0.00 ± 0,00	-
"	RP5	FMV-14-1698182	0.00 ± 0,00	-	56.35 ± 2,60	+
"	"	FMV-15-1714808	0.05 ± 0,00	-	5.63 ± 1,30	-
"	RP6	FMV-15-1708732	0.05 ± 0,00	-	4.47 ± 1,40	-
H1N1	RP1	FMV-14-1587352	0.09 ± 0,00	-	0.00 ± 0,00	-
"	"	FMV-14-1600117	0.00 ± 0,00	-	43.01 ± 2,90	+
"	"	FMV-14-1605785	0.08 ± 0,01	-	11.35 ± 1,80	+
"	RP2	FMV-14-1698189	0.83 ± 0,01	-	0.00 ± 0,00	-
"	"	FMV-14-1683217	0.06 ± 0,10	-	7.26 ± 0,30	-
"	RP3	FMV-15-1709376	0.00 ± 0,00	-	0.00 ± 0,00	-

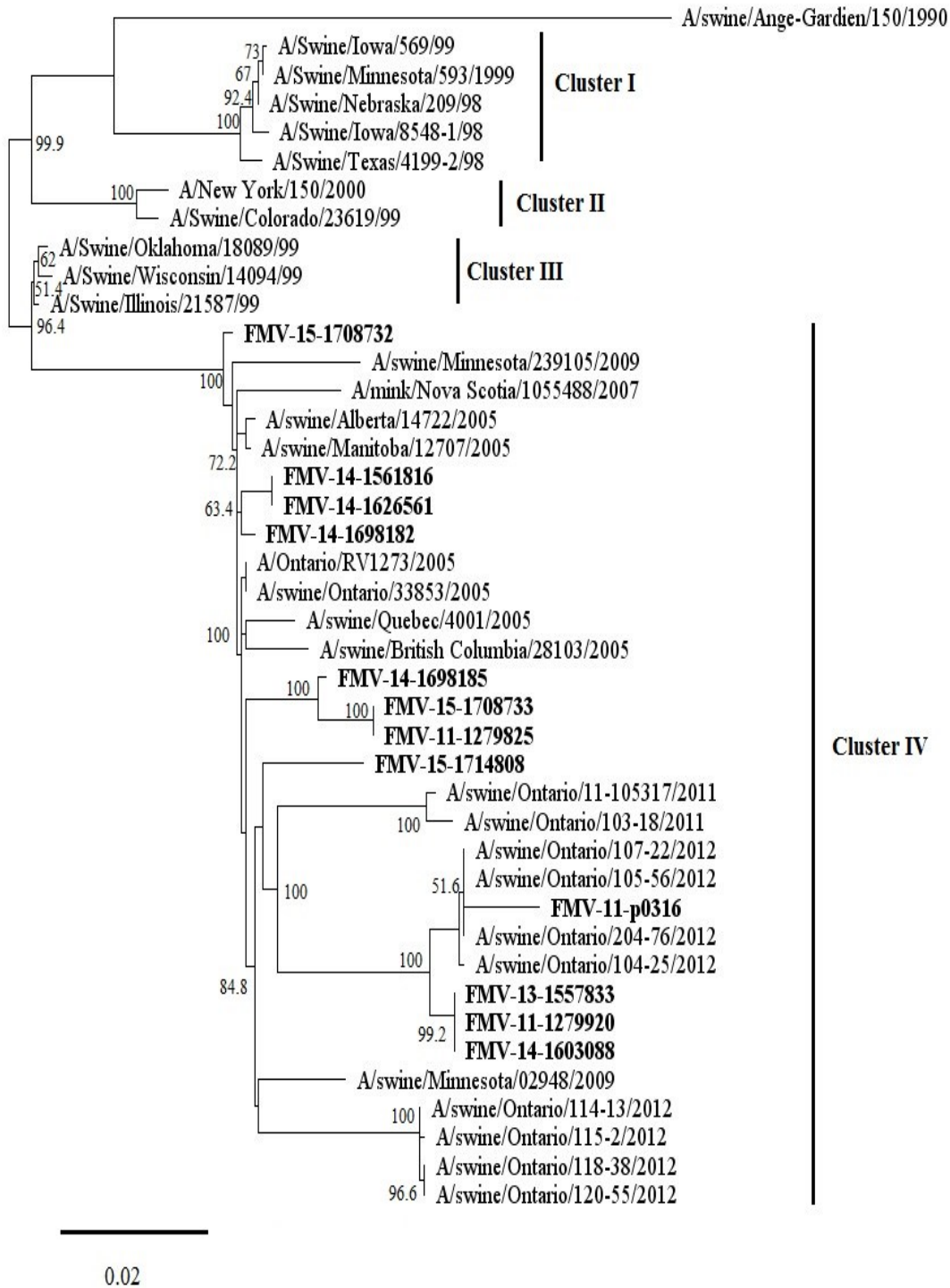


Figure 1: Phylogenetic analysis of the hemagglutinin (HA) nucleotide sequences of 12 Quebec H3 subtype viruses isolated from pigs (bold).

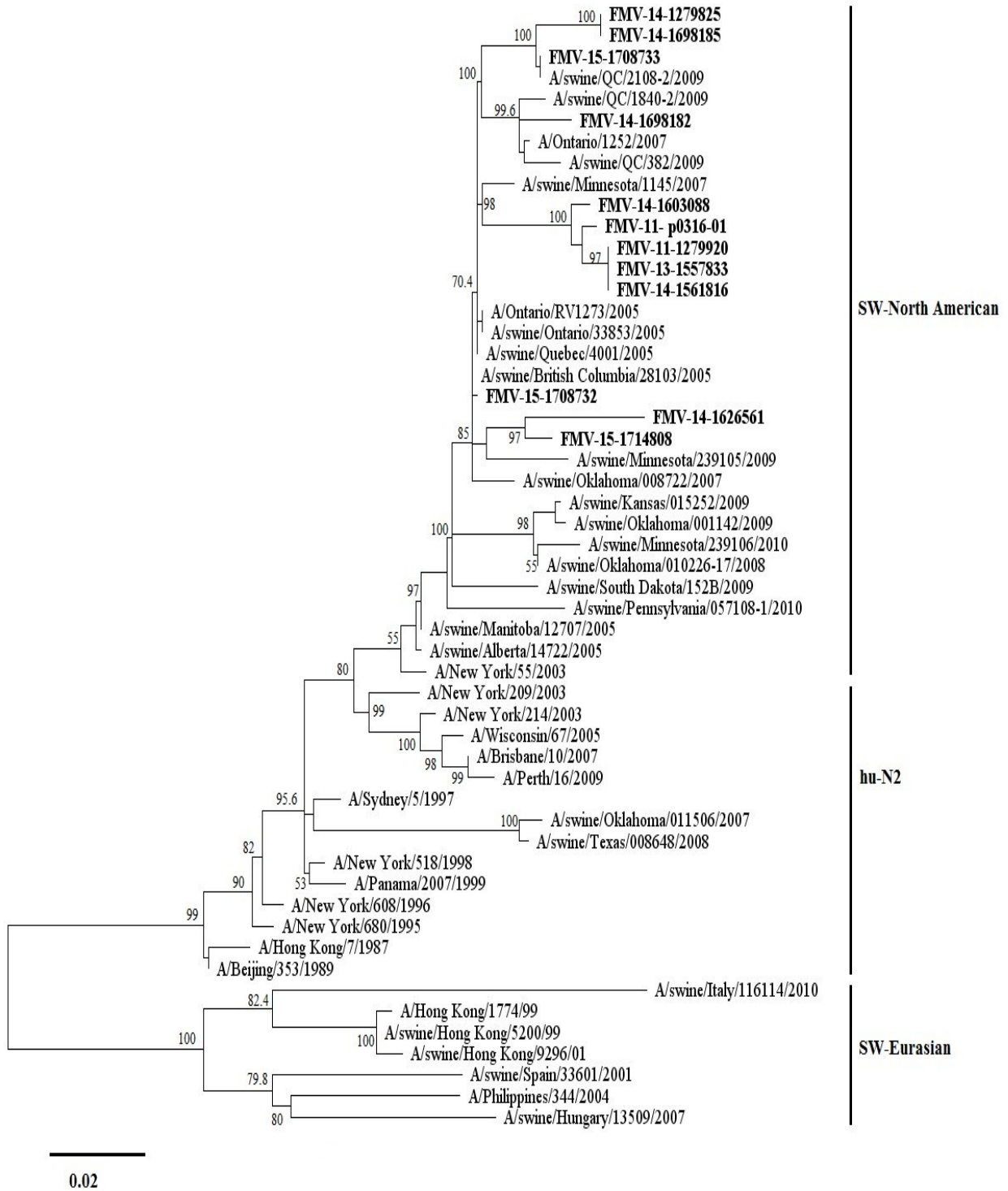


Figure 2: Phylogenetic analysis of the Neuraminidase (NA) nucleotide sequences of 12 Quebec N2 subtype viruses isolated from pigs (bold).

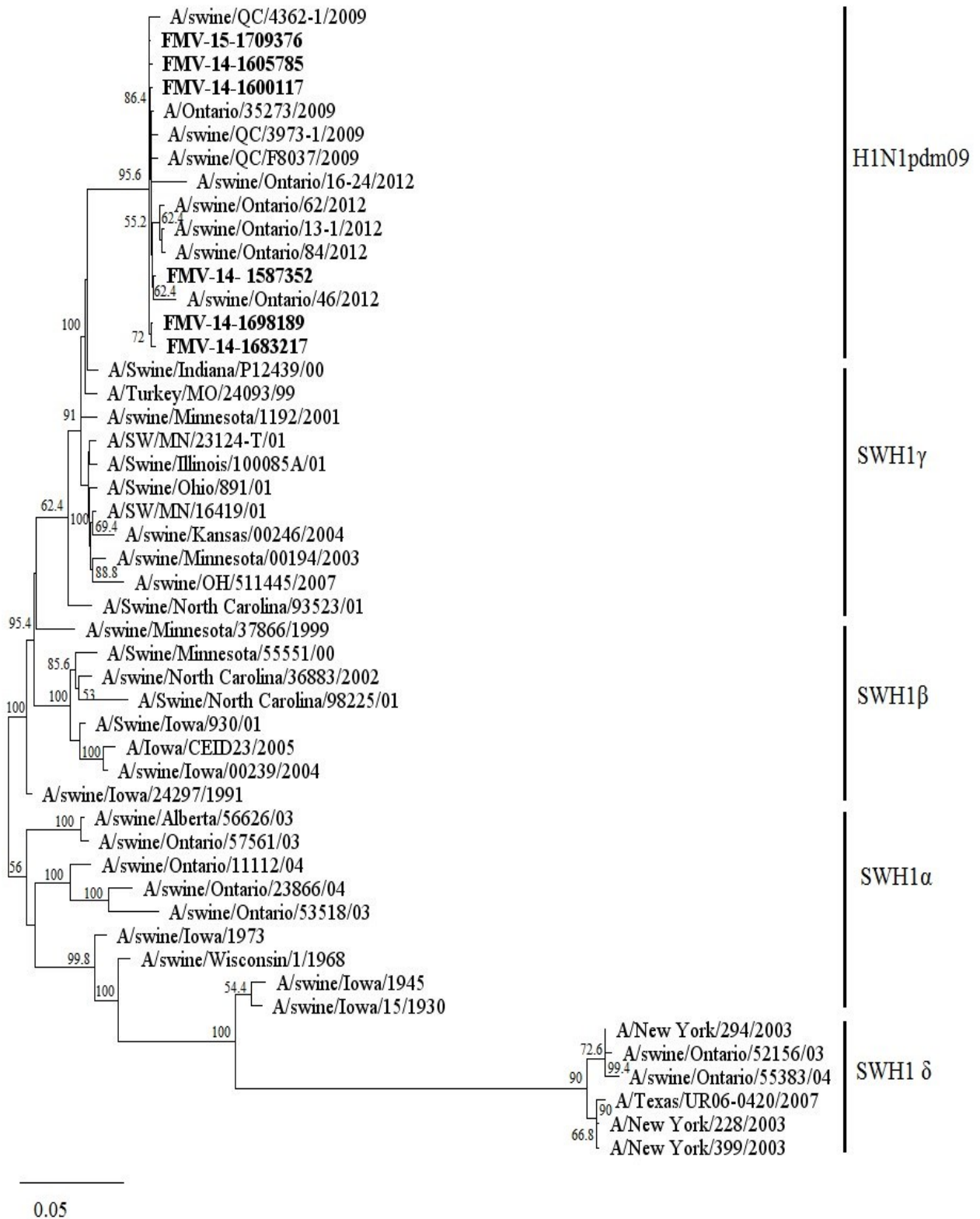


Figure 3: Phylogenetic analysis of the hemagglutinin (HA) nucleotide sequences gene of 6 Quebec H1 subtype viruses isolated from pigs (bold).

N1

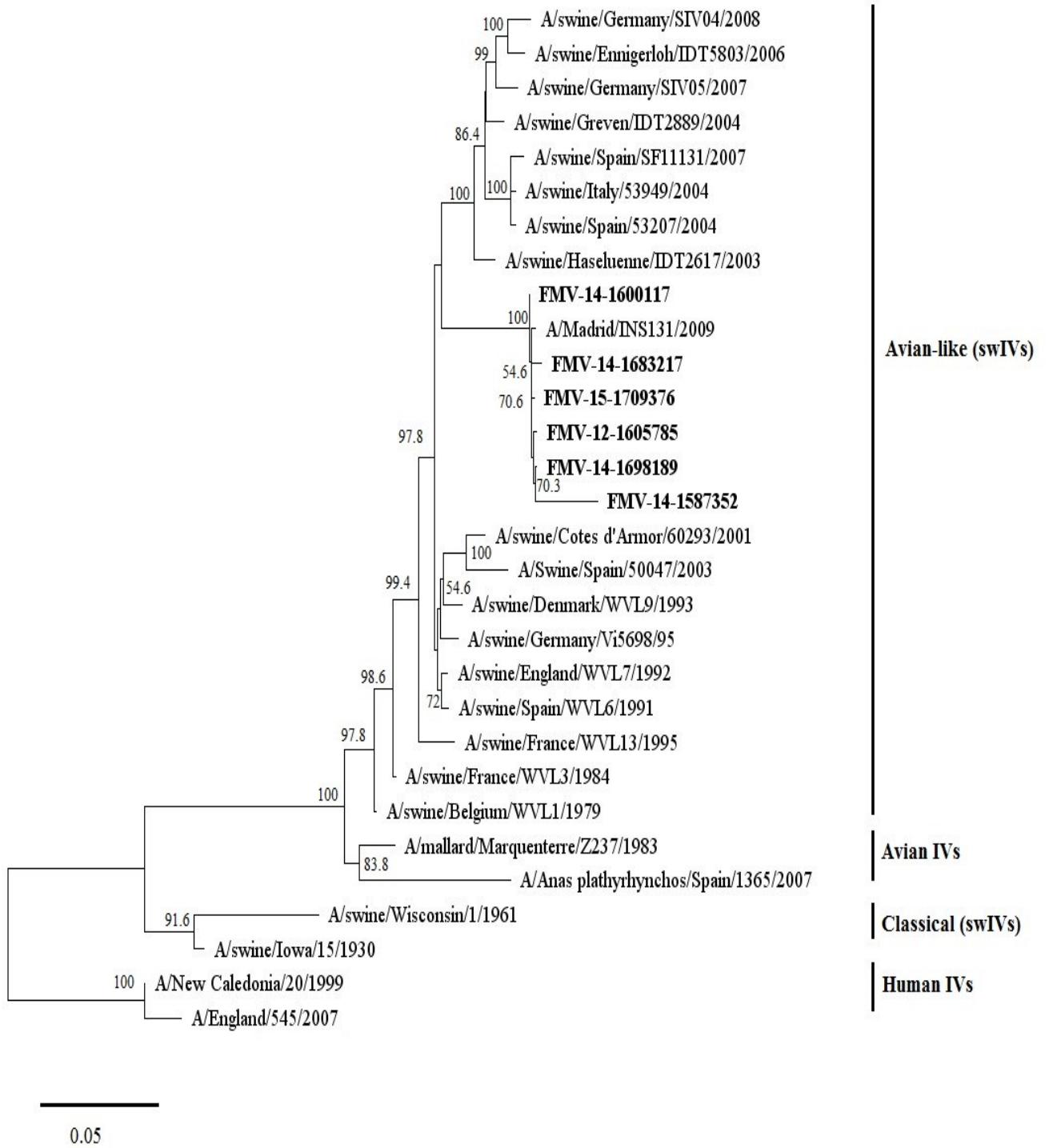
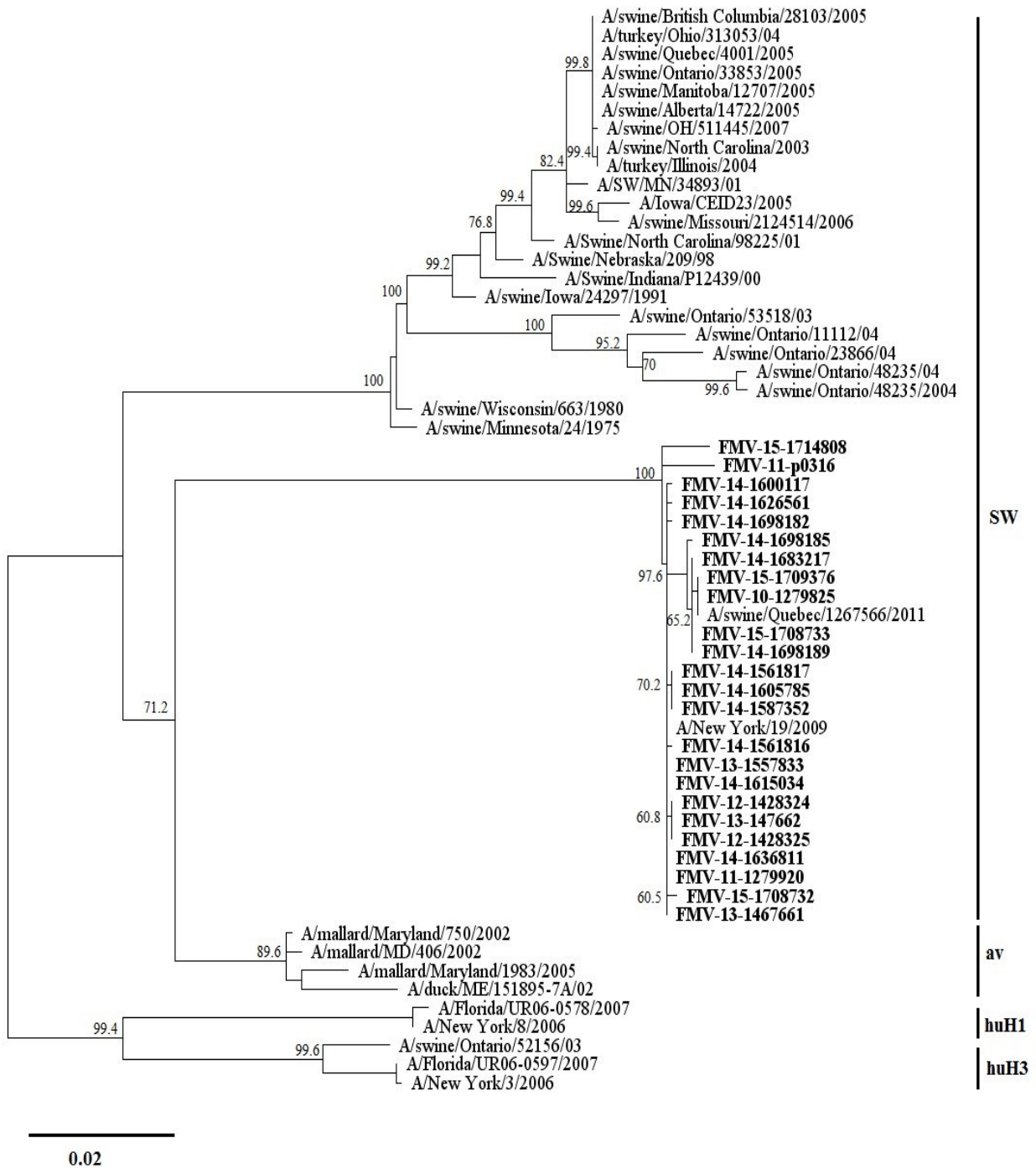


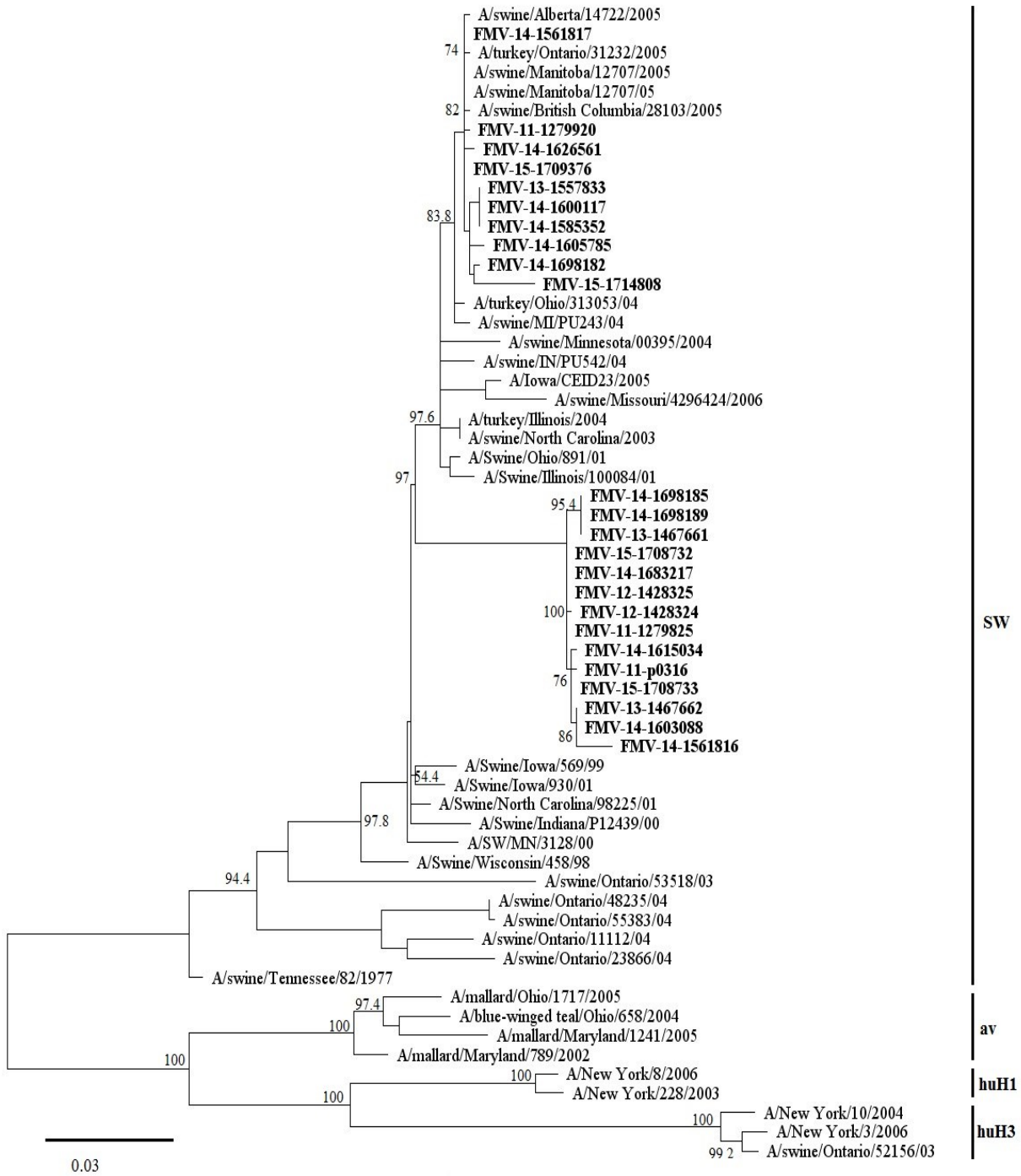
Figure 4: Phylogenetic analysis of the Neuraminidase (NA) nucleotide sequences of 6 Quebec N1 subtype viruses isolated from pigs (bold).

M



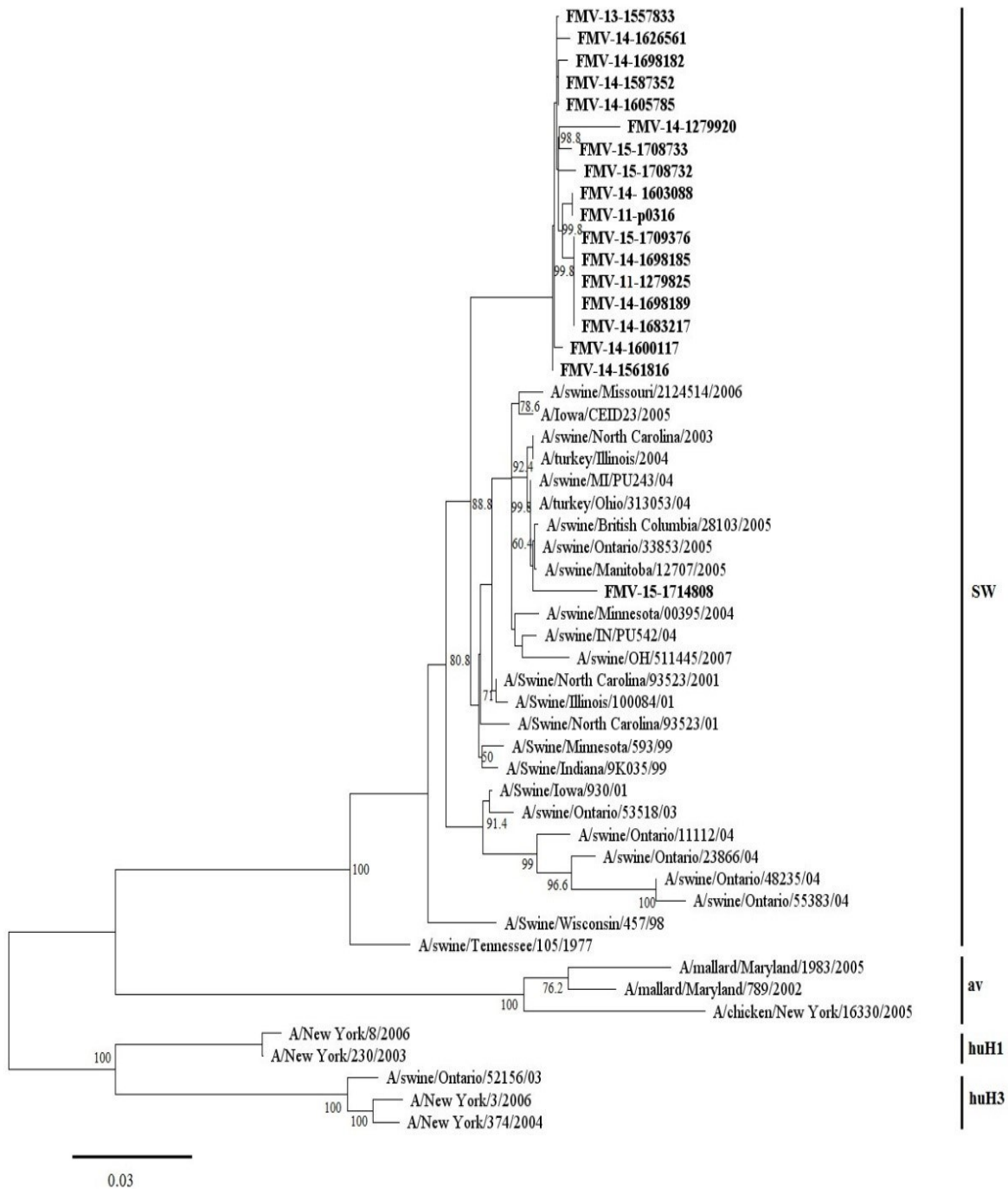
Supplementary Figure S1: Phylogenetic analysis of the M nucleotide sequences of 24 Quebec viruses found in pigs samples (bold). Lineages are indicated by bars to the right of the tree. Abbreviations are as follows: sw = swine; hu = human; av = avian. The reference viruses used in the analysis are abbreviated with their state and year of origin.

NS



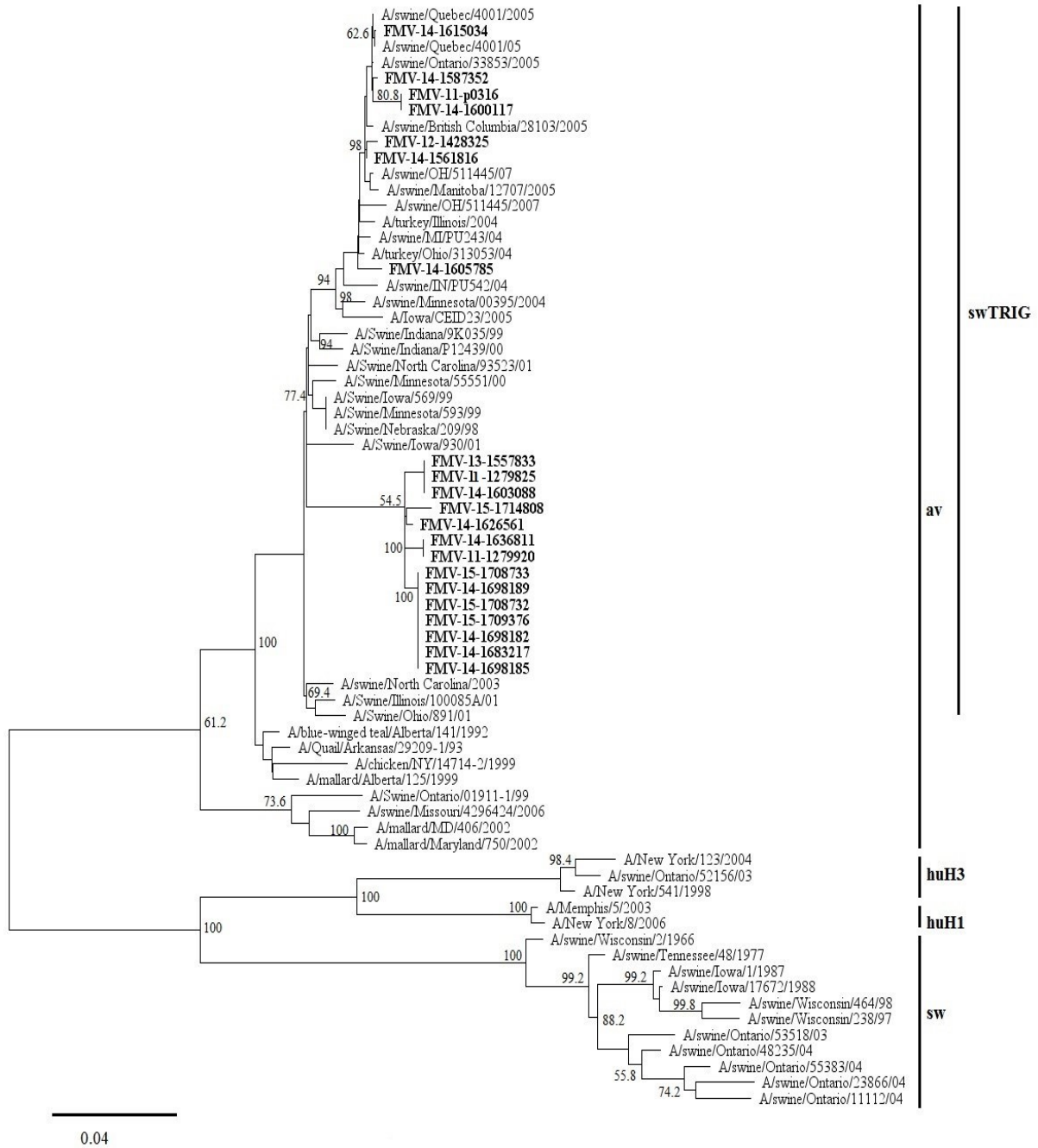
Supplementary Figure S2: Phylogenetic analysis of the NS nucleotide sequences of 24 Quebec viruses found in pigs (bold). Lineages are indicated by bars to the right of the tree. Abbreviations are as follows: sw = swine; hu = human; av = avian. The reference viruses used in the analysis are abbreviated with their state and year of origin.

NP



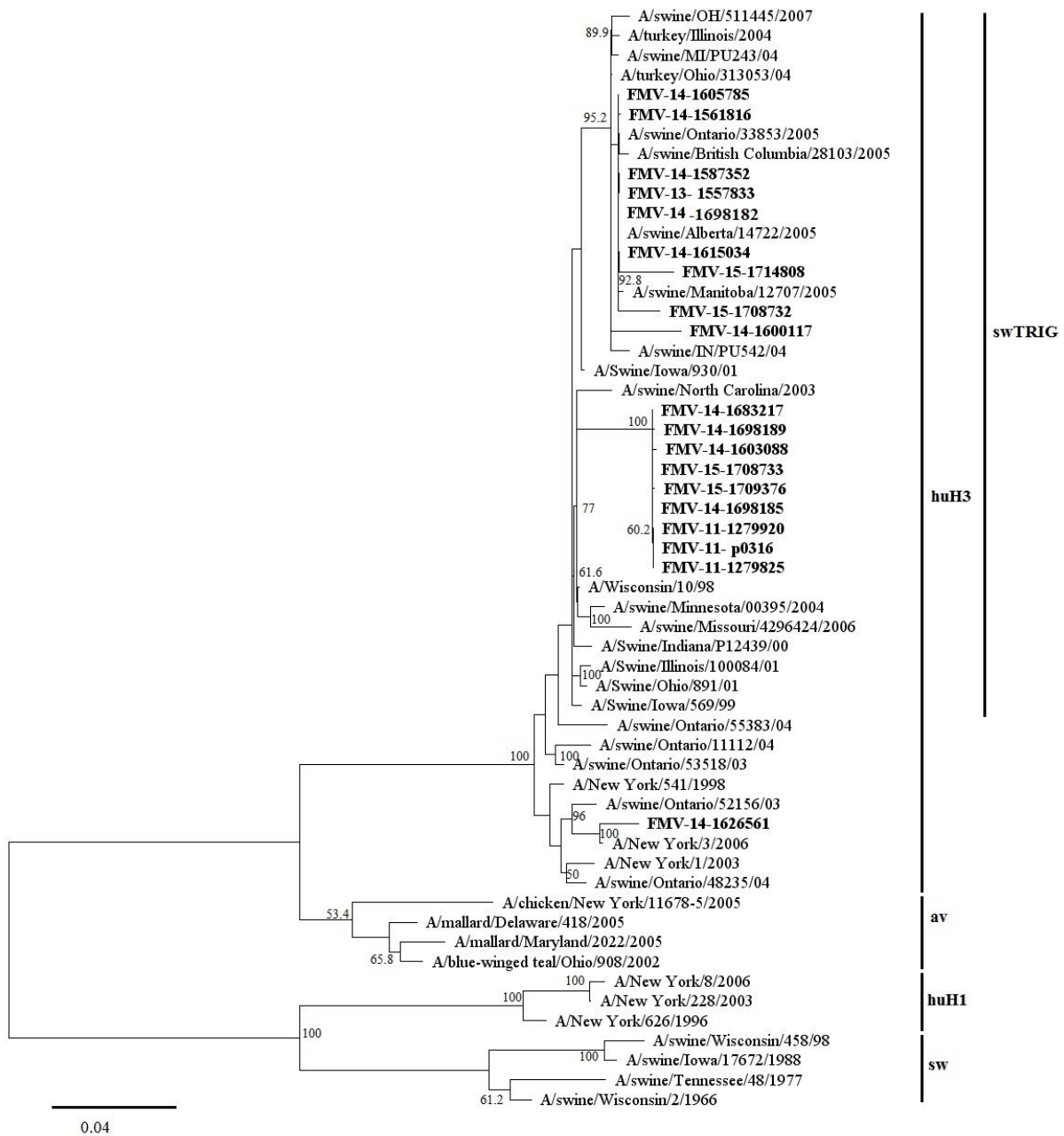
Supplementary Figure S3: Phylogenetic analysis of the NP nucleotide sequences of 18 Quebec viruses isolated from pigs (bold). Lineages are indicated by bars to the right of the tree. Abbreviations are as follows: sw = swine; hu = human; av = avian. The reference viruses used in the analysis are abbreviated with their state and year of origin.

PA

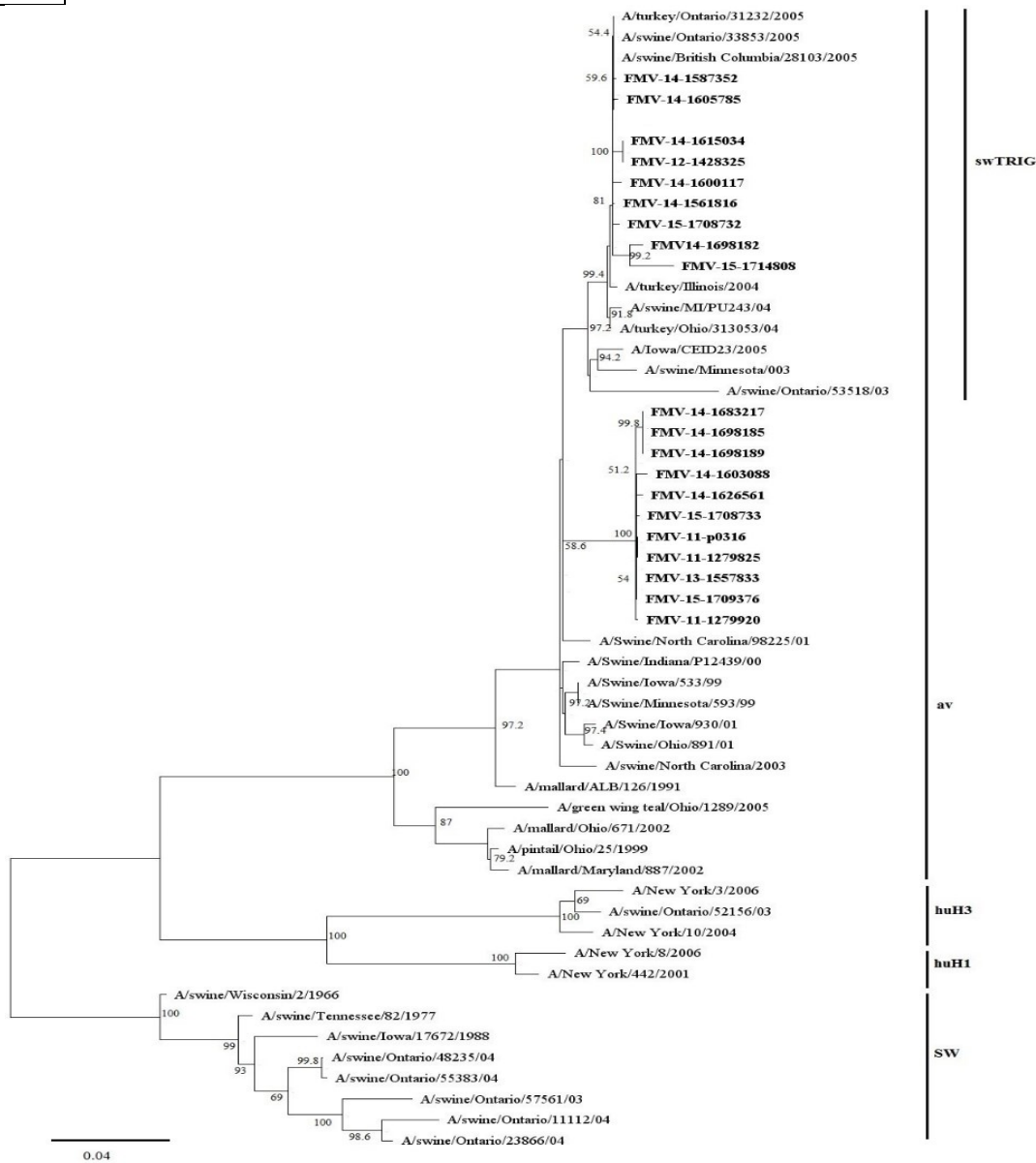


Supplementary Figure S4: Phylogenetic analysis of the PA nucleotide sequences of 21 Quebec viruses found in pigs (bold). Lineages are indicated by bars to the right of the tree. Abbreviations are as follows: sw = swine; hu = human; av = avian. The reference viruses used in the analysis are abbreviated with their state and year of origin.

PB1



Supplementary Figure S5: Phylogenetic analysis of the PB1 nucleotide sequences of 19 Quebec viruses found in pigs (bold). Lineages are indicated by bars to the right of the tree. Abbreviations are as follows: sw = swine; hu = human; av = avian. The reference viruses used in the analysis are abbreviated with their state and year of origin.



Supplementary Figure S6: Phylogenetic analysis of the PB2 nucleotide sequences of 20 Quebec viruses found in pigs (bold). Lineages are indicated by bars to the right of the tree. Abbreviations are as follows: sw = swine; hu = human; av = avian. The reference viruses used in the analysis are abbreviated with their state and year of origin.

V. References

- Abed, Y., Goyette, N. & Boivin, G. (2005).** Generation and characterization of recombinant influenza A (H1N1) viruses harboring amantadine resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 556-559.
- Baranovich, T., Bahl, J., Marathe, B. M., Culhane, M., Stigger-Rosser, E., Darnell, D., Kaplan, B. S., Lowe, J. F., Webby, R. J. & Govorkova, E. A. (2015).** Influenza A viruses of swine circulating in the United States during 2009-2014 are susceptible to neuraminidase inhibitors but show lineage-dependent resistance to adamantanes. *Antiviral Res* **117**, 10-19.
- Bowman, A. S., Sreevatsan, S., Killian, M. L., Page, S. L., Nelson, S. W., Nolting, J. M., Cardona, C. & Slemons, R. D. (2012).** Molecular evidence for interspecies transmission of H3N2pM/H3N2v influenza A viruses at an Ohio agricultural fair, July 2012. *Emerg Microbes Infect* **1**, e33.
- Brown, I. H. (2000).** The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet Microbiol* **74**, 29-46.
- Brown, I. H. (2013).** History and epidemiology of Swine influenza in Europe. *Curr Top Microbiol Immunol* **370**, 133-146.
- Caton, A. J., Brownlee, G. G., Yewdell, J. W. & Gerhard, W. (1982).** The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell* **31**, 417-427.
- Cauchemez, S., Epperson, S., Biggerstaff, M., Swerdlow, D., Finelli, L. & Ferguson, N. M. (2013).** Using routine surveillance data to estimate the epidemic potential of emerging zoonoses: application to the emergence of US swine origin influenza A H3N2v virus. *PLoS Med* **10**, e1001399.
- Centers for Disease, C. & Prevention (2012a).** Influenza A (H3N2) variant virus-related hospitalizations: Ohio, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **61**, 764-767.
- Centers for Disease, C. & Prevention (2012b).** Notes from the field: Outbreak of influenza A (H3N2) virus among persons and swine at a county fair--Indiana, July 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **61**, 561.
- Cong, Y. L., Pu, J., Liu, Q. F., Wang, S., Zhang, G. Z., Zhang, X. L., Fan, W. X., Brown, E. G. & Liu, J. H. (2007).** Antigenic and genetic characterization of H9N2 swine influenza viruses in China. *J Gen Virol* **88**, 2035-2041.

- Dapat, C., Kondo, H., Dapat, I. C., Baranovich, T., Suzuki, Y., Shobugawa, Y., Saito, K., Saito, R. & Suzuki, H. (2013).** Neuraminidase inhibitor susceptibility profile of pandemic and seasonal influenza viruses during the 2009-2010 and 2010-2011 influenza seasons in Japan. *Antiviral Res* **99**, 261-269.
- Donaldson, L. J., Rutter, P. D., Ellis, B. M., Greaves, F. E., Mytton, O. T., Pebody, R. G. & Yardley, I. E. (2009).** Mortality from pandemic A/H1N1 2009 influenza in England: public health surveillance study. *BMJ* **339**, b5213.
- Ducatez, M. F., Hause, B., Stigger-Rosser, E., Darnell, D., Corzo, C., Juleen, K., Simonson, R., Brockwell-Staats, C., Rubrum, A., Wang, D., Webb, A., Crumpton, J. C., Lowe, J., Gramer, M. & Webby, R. J. (2011).** Multiple reassortment between pandemic (H1N1) 2009 and endemic influenza viruses in pigs, United States. *Emerg Infect Dis* **17**, 1624-1629.
- Gagnon, C. A., Spearman, G., Hamel, A., Godson, D. L., Fortin, A., Fontaine, G. & Tremblay, D. (2009).** Characterization of a Canadian mink H3N2 influenza A virus isolate genetically related to triple reassortant swine influenza virus. *J Clin Microbiol* **47**, 796-799.
- Gramer, M. R., Lee, J. H., Choi, Y. K., Goyal, S. M. & Joo, H. S. (2007).** Serologic and genetic characterization of North American H3N2 swine influenza A viruses. *Can J Vet Res* **71**, 201-206.
- Grgic, H., Costa, M., Friendship, R. M., Carman, S., Nagy, E., Wideman, G., Weese, S. & Poljak, Z. (2014).** Molecular characterization of H3N2 influenza A viruses isolated from Ontario swine in 2011 and 2012. *Virol J* **11**, 194.
- Guindon, S. & Gascuel, O. (2003).** A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**, 696-704.
- Hancock, K., Veguilla, V., Lu, X., Zhong, W., Butler, E. N., Sun, H., Liu, F., Dong, L., DeVos, J. R., Gargiullo, P. M., Brammer, T. L., Cox, N. J., Tumpey, T. M. & Katz, J. M. (2009).** Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *N Engl J Med* **361**, 1945-1952.
- Hansen, M. S., Pors, S. E., Jensen, H. E., Bille-Hansen, V., Bisgaard, M., Flachs, E. M. & Nielsen, O. L. (2010).** An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *J Comp Pathol* **143**, 120-131.
- Hause, B. M., Collin, E. A., Ran, Z., Zhu, L., Webby, R. J., Simonson, R. R. & Li, F. (2012).** In vitro reassortment between endemic H1N2 and 2009 H1N1 pandemic swine influenza viruses generates attenuated viruses. *PLoS One* **7**, e39177.

- Hause, B. M., Oleson, T. A., Bey, R. F., Stine, D. L. & Simonson, R. R. (2010).** Antigenic categorization of contemporary H3N2 Swine influenza virus isolates using a high-throughput serum neutralization assay. *J Vet Diagn Invest* **22**, 352-359.
- Hurt, A. C., Leang, S. K., Speers, D. J., Barr, I. G. & Maurer-Stroh, S. (2012).** Mutations I117V and I117M and oseltamivir sensitivity of pandemic (H1N1) 2009 viruses. *Emerg Infect Dis* **18**, 109-112.
- Hutchinson, H. & Segard, S. (2010).** Foreword from Health Canada and the Public Health Agency of Canada. *Can J Public Health* **101 Suppl 2**, S3.
- Ito, T., Couceiro, J. N., Kelm, S., Baum, L. G., Krauss, S., Castrucci, M. R., Donatelli, I., Kida, H., Paulson, J. C., Webster, R. G. & Kawaoka, Y. (1998).** Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* **72**, 7367-7373.
- Karasin, A. I., Schutten, M. M., Cooper, L. A., Smith, C. B., Subbarao, K., Anderson, G. A., Carman, S. & Olsen, C. W. (2000).** Genetic characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America, 1977-1999: evidence for wholly human and reassortant virus genotypes. *Virus Res* **68**, 71-85.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. & Miyata, T. (2002).** MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* **30**, 3059-3066.
- Kay, R. M., Done, S. H. & Paton, D. J. (1994).** Effect of sequential porcine reproductive and respiratory syndrome and swine influenza on the growth and performance of finishing pigs. *Vet Rec* **135**, 199-204.
- Kitikoon, P., Vincent, A. L., Gauger, P. C., Schlink, S. N., Bayles, D. O., Gramer, M. R., Darnell, D., Webby, R. J., Lager, K. M., Swenson, S. L. & Klimov, A. (2012).** Pathogenicity and transmission in pigs of the novel A(H3N2)v influenza virus isolated from humans and characterization of swine H3N2 viruses isolated in 2010-2011. *J Virol* **86**, 6804-6814.
- Kodihalli, S., Justewicz, D. M., Gubareva, L. V. & Webster, R. G. (1995).** Selection of a single amino acid substitution in the hemagglutinin molecule by chicken eggs can render influenza A virus (H3) candidate vaccine ineffective. *J Virol* **69**, 4888-4897.
- Krumbholz, A., Schmidtke, M., Bergmann, S., Motzke, S., Bauer, K., Stech, J., Durrwald, R., Wutzler, P. & Zell, R. (2009).** High prevalence of amantadine resistance among circulating European porcine influenza A viruses. *J Gen Virol* **90**, 900-908.

- Kyriakis, C. S., Brown, I. H., Foni, E., Kuntz-Simon, G., Maldonado, J., Madec, F., Essen, S. C., Chiapponi, C. & Van Reeth, K. (2011).** Virological surveillance and preliminary antigenic characterization of influenza viruses in pigs in five European countries from 2006 to 2008. *Zoonoses Public Health* **58**, 93-101.
- Lindstrom, S., Garten, R., Balish, A., Shu, B., Emery, S., Berman, L., Barnes, N., Sleeman, K., Gubareva, L., Villanueva, J. & Klimov, A. (2012).** Human infections with novel reassortant influenza A(H3N2)v viruses, United States, 2011. *Emerg Infect Dis* **18**, 834-837.
- Lindstrom, S. E., Cox, N. J. & Klimov, A. (2004).** Genetic analysis of human H2N2 and early H3N2 influenza viruses, 1957-1972: evidence for genetic divergence and multiple reassortment events. *Virology* **328**, 101-119.
- Lorusso, A., Vincent, A. L., Harland, M. L., Alt, D., Bayles, D. O., Swenson, S. L., Gramer, M. R., Russell, C. A., Smith, D. J., Lager, K. M. & Lewis, N. S. (2011).** Genetic and antigenic characterization of H1 influenza viruses from United States swine from 2008. *J Gen Virol* **92**, 919-930.
- Ma, W., Liu, Q., Qiao, C., del Real, G., Garcia-Sastre, A., Webby, R. J. & Richt, J. A. (2014).** North American triple reassortant and Eurasian H1N1 swine influenza viruses do not readily reassort to generate a 2009 pandemic H1N1-like virus. *MBio* **5**, e00919-00913.
- Mishin, V. P., Novikov, D., Hayden, F. G. & Gubareva, L. V. (2005).** Effect of hemagglutinin glycosylation on influenza virus susceptibility to neuraminidase inhibitors. *J Virol* **79**, 12416-12424.
- Nelson, M. I., Vincent, A. L., Kitikoon, P., Holmes, E. C. & Gramer, M. R. (2012).** Evolution of novel reassortant A/H3N2 influenza viruses in North American swine and humans, 2009-2011. *J Virol* **86**, 8872-8878.
- Nfon, C. K., Berhane, Y., Hisanaga, T., Zhang, S., Handel, K., Kehler, H., Labrecque, O., Lewis, N. S., Vincent, A. L., Copps, J., Alexandersen, S. & Pasick, J. (2011).** Characterization of H1N1 swine influenza viruses circulating in Canadian pigs in 2009. *J Virol* **85**, 8667-8679.
- Olsen, C. W., Karasin, A. I., Carman, S., Li, Y., Bastien, N., Ojkic, D., Alves, D., Charbonneau, G., Henning, B. M., Low, D. E., Burton, L. & Broukhanski, G. (2006).** Triple reassortant H3N2 influenza A viruses, Canada, 2005. *Emerg Infect Dis* **12**, 1132-1135.

- Renaud, C., Kuypers, J. & Englund, J. A. (2011).** Emerging oseltamivir resistance in seasonal and pandemic influenza A/H1N1. *J Clin Virol* **52**, 70-78.
- Retamal, M., Abed, Y., Corbeil, J. & Boivin, G. (2014).** Epitope mapping of the 2009 pandemic and the A/Brisbane/59/2007 seasonal (H1N1) influenza virus haemagglutinins using mAbs and escape mutants. *J Gen Virol* **95**, 2377-2389.
- Samson, M., Pizzorno, A., Abed, Y. & Boivin, G. (2013).** Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res* **98**, 174-185.
- Schmidtke, M., Zell, R., Bauer, K., Krumbholz, A., Schrader, C., Suess, J. & Wutzler, P. (2006).** Amantadine resistance among porcine H1N1, H1N2, and H3N2 influenza A viruses isolated in Germany between 1981 and 2001. *Intervirology* **49**, 286-293.
- Scholtissek, C., Rohde, W., Von Hoyningen, V. & Rott, R. (1978).** On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology* **87**, 13-20.
- Shope, R. E. (1931).** The Etiology of Swine Influenza. *Science* **73**, 214-215.
- Shu, B., Garten, R., Emery, S., Balish, A., Cooper, L., Sessions, W., Deyde, V., Smith, C., Berman, L., Klimov, A., Lindstrom, S. & Xu, X. (2012).** Genetic analysis and antigenic characterization of swine origin influenza viruses isolated from humans in the United States, 1990-2010. *Virology* **422**, 151-160.
- Stoner, T. D., Krauss, S., DuBois, R. M., Negovetich, N. J., Stallknecht, D. E., Senne, D. A., Gramer, M. R., Swafford, S., DeLiberto, T., Govorkova, E. A. & Webster, R. G. (2010).** Antiviral susceptibility of avian and swine influenza virus of the N1 neuraminidase subtype. *J Virol* **84**, 9800-9809.
- Storms, A. D., Gubareva, L. V., Su, S., Wheeling, J. T., Okomo-Adhiambo, M., Pan, C. Y., Reisdorf, E., St George, K., Myers, R., Wotton, J. T., Robinson, S., Leader, B., Thompson, M., Shannon, M., Klimov, A., Fry, A. M. & Group, U. S. A. R. S. W. (2012).** Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus infections, United States, 2010-11. *Emerg Infect Dis* **18**, 308-311.
- Stray, S. J. & Pittman, L. B. (2012).** Subtype- and antigenic site-specific differences in biophysical influences on evolution of influenza virus hemagglutinin. *Virol J* **9**, 91.
- Sun, H., Yang, J., Zhang, T., Long, L. P., Jia, K., Yang, G., Webby, R. J. & Wan, X. F. (2013).** Using sequence data to infer the antigenicity of influenza virus. *MBio* **4**.
- Thiry, E., Zicola, A., Addie, D., Egberink, H., Hartmann, K., Lutz, H., Poulet, H. & Horzinek, M. C. (2007).** Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in cats and other carnivores. *Vet Microbiol* **122**, 25-31.

- Tong, S., Zhu, X., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Bourgeois, M., Yang, H., Chen, X., Recuenco, S., Gomez, J., Chen, L. M., Johnson, A., Tao, Y., Dreyfus, C., Yu, W., McBride, R., Carney, P. J., Gilbert, A. T., Chang, J., Guo, Z., Davis, C. T., Paulson, J. C., Stevens, J., Rupprecht, C. E., Holmes, E. C., Wilson, I. A. & Donis, R. O. (2013).** New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* **9**, e1003657.
- Tremblay, D., Allard, V., Doyon, J. F., Bellehumeur, C., Spearman, J. G., Harel, J. & Gagnon, C. A. (2011).** Emergence of a new swine H3N2 and pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus reassortant in two Canadian animal populations, mink and swine. *J Clin Microbiol* **49**, 4386-4390.
- Vigerust, D. J., Ulett, K. B., Boyd, K. L., Madsen, J., Hawgood, S. & McCullers, J. A. (2007).** N-linked glycosylation attenuates H3N2 influenza viruses. *J Virol* **81**, 8593-8600.
- Vincent, A. L., Ma, W., Lager, K. M., Gramer, M. R., Richt, J. A. & Janke, B. H. (2009).** Characterization of a newly emerged genetic cluster of H1N1 and H1N2 swine influenza virus in the United States. *Virus Genes* **39**, 176-185.
- Wilson, I. A. & Cox, N. J. (1990).** Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annu Rev Immunol* **8**, 737-771.
- Wood, J. M., Oxford, J. S., Dunleavy, U., Newman, R. W., Major, D. & Robertson, J. S. (1989).** Influenza A (H1N1) vaccine efficacy in animal models is influenced by two amino acid substitutions in the hemagglutinin molecule. *Virology* **171**, 214-221.
- Zell, R., Scholtissek, C. & Ludwig, S. (2013).** Genetics, evolution, and the zoonotic capacity of European Swine influenza viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **370**, 29-55.
- Zhou, N. N., Senne, D. A., Landgraf, J. S., Swenson, S. L., Erickson, G., Rossow, K., Liu, L., Yoon, K., Krauss, S. & Webster, R. G. (1999).** Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. *J Virol* **73**, 8851-8856.

3.2 CARACTÉRISATION GÉNOMIQUE DES AMORCES DE GÉNOTYPAGE

Tableau supplémentaire S2. Amorces utilisées pour le génotypage des gènes H3 et N2

H3:F

Primer H3 Forward	C	C	A	G	A	G	A	A	A	C	A	A	A	C	T	A	G	A	G	G
FMV-11-1279825	.	T	C	A	.	.	.	G	.	.	.	G	.	.
FMV-11-P0316
FMV-11-1279920
FMV-13-1557833
FMV-14-1603088
FMV-14-1626561
FMV-14-1561816
FMV-14-1698185
FMV-14-1698182
FMV-15-1708732
FMV-15-1708733
FMV-15-1714808

H3:R

Primer H3 Reverse	A	G	T	A	G	A	A	A	C	A	A	G	G	G	A	G	A	A	T	T
FMV-11-1279825	.	T	C	T	.	T	.	.	.
FMV-11-P0316	G	.
FMV-11-1279920
FMV-13-1557833	.	.	.	G
FMV-14-1603088	.	.	.	G
FMV-14-1626561
FMV-14-1561816	.	.	.	G
FMV-14-1698185
FMV-14-1698182	.	.	.	G
FMV-15-1708732
FMV-15-1708733
FMV-15-1714808	G

N2:F

Primer N2 Forward	A	G	C	A	A	A	A	G	C	A	G	A	G	T	T	T	A	A	A	T	G	
FMV-11-1279825	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.	T	.	.	T	A	G	.	A
FMV-11-P0316	.	.	G	T	.	.	T	A	A
FMV-11-1279920	.	.	G	T	.	.	T	A	A
FMV-13-1557833	.	.	G	T	.	.	T	A	A
FMV-14-1603088	.	.	G	T	.	.	T	A	A
FMV-14-1626561	.	.	G	T	.	.	T	A	A
FMV-14-1561816	.	.	G	T	.	.	T	A	A
FMV-14-1698185	C	.	G	T	.	.	T	A	A
FMV-14-1698182	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.	T	.	.	T	A	A
FMV-15-1708732	.	.	G	T	.	.	T	A	A
FMV-15-1708733	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.	T	.	.	T	A	A
FMV-15-1714808	.	.	G	.	.	.	G	.	.	.	T	.	.	T	A	A

N2:R

Primer N2 Reverse	A	G	T	A	G	A	A	A	C	A	A	G	G	A	G	T	T	T	T	T	T
FMV-11-1279825	.	.	C	T	A	C	.	.	A	G	G	.	.
FMV-11-P0316	.	.	C	T	A	C	.	.	A	.	A	.	.	G	G	.	C
FMV-11-1279920	.	.	C	T	A	C	.	.	A	G	G	.	.
FMV-13-1557833	.	.	C	T	A	C	.	.	A	.	A	.	.	G	G	.	C
FMV-14-1603088	.	.	C	T	A	C	.	.	A	.	A	.	.	G	G	.	C
FMV-14-1626561	.	.	C	T	A	C	.	.	A	.	A	.	.	G	G	.	C
FMV-14-1561816	.	.	C	T	A	C	.	.	A	.	A	.	.	G	G	.	C
FMV-14-1698185	.	.	C	T	A	C	.	.	A	.	A	.	.	G	G	.	.
FMV-14-1698182	.	.	C	T	A	C	.	.	A	G	G	.	.
FMV-15-1708732	.	.	C	T	A	C	.	.	A	G	G	.	.
FMV-15-1708733	.	.	C	T	A	C	.	.	A	G	G	.	.
FMV-15-1714808	.	.	C	T	A	C	.	.	A	.	A	.	.	G	G	.	.

Tableau supplémentaire S3. Amorces utilisées pour le génotypage des gènes H1 et N1**H1:F**

Primer H1 Forward	C	T	C	G	A	G	A	G	C	A	A	A	A	G	C	A	G	G	G	G
FMV-14-1587352	.	.	.	C	.	C	G	C	T	.	.	T	.	.	T
FMV-14-1600117	.	.	.	C	.	C	G	C	T	.	.	T	.	.	T
FMV-14-1605785	.	.	.	C	.	C	G	C	T	.	.	T	.	.	T
FMV-14-1698189	.	.	.	C	.	C	G	C	T	.	.	T	.	.	T
FMV-14-1683217	.	.	.	C	.	C	G	C	T	.	.	T	.	.	T
FMV-15-1709376	.	.	.	C	.	C	G	C	T	.	.	T	.	.	T

H1:R

Primer H1 Reverse	A	G	T	A	G	A	A	A	C	A	A	G	G	G	T	G	T	T	T	T	
FMV-14-1587352	.	T	.	G	.	C	C
FMV-14-1600117	.	T	.	G	.	C	C
FMV-14-1605785	.	T	.	G	.	C	C
FMV-14-1698189	.	T	.	G	.	C	C
FMV-14-1683217	.	T	.	G	.	C	C
FMV-15-1709376	.	T	.	G	.	C	C

N1:F

Primer N1 Forward	A	G	C	A	A	A	A	G	C	A	G	G	A	G	T	T	T	A	A	A	A	T	G
FMV-14-1587352	C	C	.	.	.
FMV-14-1600117	T	C
FMV-14-1605785	T	C
FMV-14-1698189	T	C
FMV-14-1683217	T	C
FMV-15-1709376	T	C

N2:R

Primer N1 Reverse	A	G	T	A	G	A	A	A	C	A	A	G	G	A	G	T	T	T	T	T	T	
FMV-14-1587352	.	.	G	.	T	.	T	.	G	.	G	T
FMV-14-1600117	.	.	G	.	T	.	T	.	G	.	G	T
FMV-14-1605785	.	.	G	.	T	.	T	.	G	.	G	T
FMV-14-1698189	.	.	G	.	T	.	T	.	G	.	G	T
FMV-14-1683217	.	.	G	.	T	.	T	.	G	.	G	T
FMV-15-1709376	.	.	G	.	T	.	T	.	G	.	G	T

L'alignement des séquences HA et NA des différentes VIs a été effectué avec les séquences de références "amorce de génotypage" utilisées par le service de diagnostic moléculaire de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. L'alignement des séquences H3 et N a été effectué avec les séquences de références H3 "Forward et Reverse" et N2 "Forward et Reverse". Concernant les séquences H1 et N1 l'alignement a été effectué avec les séquences de référence H1 "Forward et Reverse" et N1 "Forward et Reverse". Au total, 5 à 6 et 8 à 9 substitutions d'a.a ont été identifiées respectivement sur les séquences H3 et N2 respectivement. En ce qui concerne les VIs de sous-type H1N1, 4 à 7 et 2 à 6 substitutions d'a.a ont été identifiés sur les séquences HA et NA respectivement. Nos résultats suggèrent que les substitutions observées pourraient affecter l'efficacité des tests de diagnostic (PCR).

IV. DISCUSSION GÉNÉRALE

La grippe porcine est responsable d'une morbidité considérable dans la population porcine en Amérique du Nord et cela en dépit des différentes mesures de contrôle employées pour l'éradiquer (Brown, 2000). Le virus de l'influenza porcine nous inquiète pour plusieurs raisons. La première raison est que le porc peut être infecté à la fois par des virus aviaires, humains et porcins, pouvant ainsi permettre le réassortiment de nouveaux sous-types viraux. En second lieu, le virus de l'influenza porcine peut être transmis du porc à l'homme, ce qui représente un risque zoonotique bien identifié. Pour ces raisons, la surveillance épidémiologique du virus de l'influenza porcine sur le territoire québécois est très importante. Dans ce contexte, la caractérisation génétique de 24 VIs porcins circulants sur le territoire entre 2011 et 2015 a été entreprise. Suite aux résultats phylogénétiques obtenus, nous avons détecté la co-circulation de deux sous-types viraux majeurs dans les fermes porcines québécoises entre 2011 et 2015: le premier étant le sous-type trH3N2 du Cluster IV (66.7%) et le deuxième étant le sous-type H1N1 du cluster A(H1N1)pdm09 (33.3%). L'analyse génétique des souches trH3N2 Cluster IV a révélé 6 profils génétiques différents (RP1 à RP6). Ces profils génomiques indiquent clairement l'existence d'un échange de segment entre les deux VIs trH3N2 Cluster IV et A(H1N1)pdm09. Ducatez et al.(2011), Gagnon et al.(2009) et Grigic et al.(2014), ont démontré à plusieurs reprises depuis l'émergence des virus pandémiques A(H1N1)pdm09 des structures de réassortiment génétique similaires. Plus récemment aux États-Unis, Kitikoon et al.(2013) ont rapporté l'existence d'au moins dix génotypes qui diffèrent des 6 profils que nous avons observés. Toujours, au niveau génomique, la constellation génétique des VIs A(H1N1)pdm09 a révélé au moins trois profils différents (RP1 à RP3), résultant d'un phénomène de réassortiment trH3N2/A(H1N1)pdm09. Wenjun et al.(2014) ont rapporté au moins 7 profils génétiques basés sur le phénomène de réassortiment, dont un seul profil (RP2) est similaire aux résultats que nous avons obtenus dans la présente étude. En outre, le segment (M) des 18 VIs était d'origine H1N1 de Cluster A(H1N1)pdm09, ce qui pourrait suggérer probablement un avantage épidémiologique pour les VIs qui possèdent ce gène. Des structures génomiques similaires ont été observées à plusieurs reprises depuis l'introduction du virus pandémique A(H1N1)pdm09 chez les porcs en 2009 (Ducatez *et al.*, 2011). Il a déjà été démontré en 2012 que les virus trH3N2 avec un gène (M) d'origine A(H1N1)pdm09 pouvaient être impliqués dans des flambées de grippe chez les personnes fréquentant des exploitations agricoles aux États-Unis (Bowman *et al.*, 2012). La présence de ce gène favoriserait la transmission efficace des VIs par aérosol (Pearce

et al., 2012). D'autre part, ce gène (M) d'origine A(H1N1)pdm09 augmenterait également la vitesse de transmissibilité des virus entre les individus (Cauchemez *et al.*, 2013). À partir de ces données, la gestion des VIs porcins en Amérique du Nord apparaît nécessaire dans le but d'empêcher la propagation de ces virus dans les populations animales et humaines. Après avoir déterminé la classification phylogénétique des VIs, nous avons déterminé les mutations en a.a au niveau des sites antigéniques de la HA: A, B, C, D et E et Sa, Sb, Ca1, Ca2 et Cb des VIs H3N2 et H1N1 respectivement, par rapport à des souches de référence [A/Swine/Ontario/33853/05] et [A/Swine/Mexico/InDRE4487/09]. Cinq et 21 substitutions, respectivement, d'a.a ont été détectées au niveau des épitopes des VIs A(H1N1)pdm09 et trH3N2 Cluster IV. Selon Koel *et al.*(2013) une dérive génétique de 4 substitutions sur 2 sites antigéniques pourrait conduire à une modification antigénique non négligeable qui pourrait affecter la reconnaissance d'anticorps neutralisants et par conséquent influencer l'efficacité des vaccins inactivés. En outre, Wood *et al.*(1989) et Kodihalli *et al.*(1995) ont démontré qu'une dérive de 1 à 3 substitutions d'a.a sur la protéine HA est suffisante pour réduire la réactivité croisée et l'efficacité du vaccin inactivé. Toutefois, ces faits devront être confirmés par des études antigéniques plus exhaustives à l'aide d'anticorps spécifiques. En outre, l'acquisition des sites de N-glycosylation sur la protéine HA pourrait jouer un rôle bénéfique pour les VIs en protégeant les sites antigéniques en bloquant leur reconnaissance par les anticorps (Mishin *et al.*, 2005b; Vigerust *et al.*, 2007). Cependant, Vigerust *et al.*(2007) ont démontré que l'augmentation des sites de N-glycosylation est en corrélation avec l'augmentation de la virulence des VIs. La dominance des VIs trH3N2 du Cluster IV pourrait s'expliquer par la grande quantité de sites de N-glycosylation qui ont un potentiel efficace pour échapper aux anticorps neutralisants. La vaccination est utilisée pour prévenir les infections d'influenza saisonnières. L'oseltamivir, le zanamivir (INAs) et l'amantadine sont les principaux antiviraux commercialement disponibles. La principale préoccupation associée à leur utilisation est l'apparition et la transmission de mutations qui augmenteraient la résistance antivirale des virus, les rendant inutilisables cliniquement. La force de notre étude réside dans le fait qu'elle est la première à notre connaissance à caractériser les souches de VIs porcins pour la résistance antivirale dans la population porcine au Québec. L'analyse par MUNANA nous a permis de détecter un taux de résistance de 33.3% = 6/18 aux inhibiteurs de neuraminidase. En outre, des études similaires à la nôtre, réalisées aux États-Unis sur des souches isolées entre 2009 et 2011, ont révélé une inhibition faible (c.à-d. avec des valeurs IC₅₀ variant de 0,33 à 2,56 nM) (Storms *et al.*, 2012). À la base de ces résultats, l'augmentation de la résistance aux INAs présente clairement une préoccupation en santé

animale et publique. Depuis 2009, le taux de résistance à l'oseltamivir chez l'homme est relativement faible (~ 0,5%) (Renaud *et al.*, 2011); < 1% aux É.-U. (Storms *et al.*, 2012), < 1% au Canada (Hutchinson & Segard, 2010), 2,5% en Europe et 1,6% dans le monde entier (Hurt *et al.*, 2012). Le canal M2 est ciblé par la famille d'antiviraux adamantanes. Nous avons identifié les mutations S31N et R77Q (Abed *et al.*, 2005; Krumbholz *et al.*, 2009), associées à la résistance à l'amantadine chez toutes les souches de VIs porcins isolées au Québec entre 2011 et 2015. Ces résultats ont été confirmés *in vitro* sur des cellules MDCK dont 100% des souches virales étaient résistantes à l'amantadine. En outre, des études précédentes ont montré des taux de résistance similaires. En Europe, l'analyse phénotypique des VIs chez le porc a révélé un taux de résistance à l'amantadine de 86,2% (Krumbholz *et al.*, 2009). Aux États-Unis, le taux de résistance à l'amantadine chez les porcs est de 71% (Baranovich *et al.*, 2015).

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette étude avait comme objectif principal la caractérisation génomique des VIs en circulation dans les fermes porcines du Québec entre 2011 et 2015. L'analyse phylogénétique a démontré clairement la prévalence des VIs trH3N2 du Cluster IV avec la présence de 21 substitutions d'a.a distribuées sur les 5 sites antigéniques de la HA. L'évolution génomique constante des VIs dans la population porcine entre 2011 et 2015 a été confirmée par l'existence d'une mosaïque de profils génomiques. Toutefois, des études antigéniques plus exhaustives à l'aide d'anticorps spécifiques pourraient confirmer les résultats des analyses de bio-informatiques. En effet, la mise à jour des séquences nucléotidiques des amorces est une étape primordiale afin de préserver la sensibilité de détection des VIs par les tests de diagnostic RT-PCR au vu de l'accumulation des substitutions d'a.a des VIs par la dérive génétique détectable par les amorces de séquençage utilisées en routine. La circulation des souches résistantes aux antiviraux a été confirmée *in vitro* avec un taux de 33.3% à 100% contre les INAs et l'amantadine. Enfin, des études plus approfondies par séquençage haut débit et avec un modèle animal seraient extrêmement intéressantes à réaliser afin de mieux contrôler l'évolution génétique des souches québécoises.

VI. RÉFÉRENCES

- Abed, Y., Goyette, N. & Boivin, G. (2005).** Generation and characterization of recombinant influenza A (H1N1) viruses harboring amantadine resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 556-559.
- Allison, A. B., Ballard, J. R., Tesh, R. B., Brown, J. D., Ruder, M. G., Keel, M. K., Munk, B. A., Mickley, R. M., Gibbs, S. E., Travassos da Rosa, A. P., Ellis, J. C., Ip, H. S., Shearn-Bochsler, V. I., Rogers, M. B., Ghedin, E., Holmes, E. C., Parrish, C. R. & Dwyer, C. (2015).** Cyclic avian mass mortality in the northeastern United States is associated with a novel orthomyxovirus. *J Virol* **89**, 1389-1403.
- Alvarez, M. M., Lopez-Pacheco, F., Aguilar-Yanez, J. M., Portillo-Lara, R., Mendoza-Ochoa, G. I., Garcia-Echauri, S., Freiden, P., Schultz-Cherry, S., Zertuche-Guerra, M. I., Bulnes-Abundis, D., Salgado-Gallegos, J., Elizondo-Montemayor, L. & Hernandez-Torre, M. (2010).** Specific recognition of influenza A/H1N1/2009 antibodies in human serum: a simple virus-free ELISA method. *PLoS One* **5**, e10176.
- Arranz, R., Coloma, R., Chichon, F. J., Conesa, J. J., Carrascosa, J. L., Valpuesta, J. M., Ortin, J. & Martin-Benito, J. (2012).** The structure of native influenza virion ribonucleoproteins. *Science* **338**, 1634-1637.
- Baker, A. T., Varghese, J. N., Laver, W. G., Air, G. M. & Colman, P. M. (1987).** Three-dimensional structure of neuraminidase of subtype N9 from an avian influenza virus. *Proteins* **2**, 111-117.
- Baranovich, T., Bahl, J., Marathe, B. M., Culhane, M., Stigger-Rosser, E., Darnell, D., Kaplan, B. S., Lowe, J. F., Webby, R. J. & Govorkova, E. A. (2015).** Influenza A viruses of swine circulating in the United States during 2009-2014 are susceptible to neuraminidase inhibitors but show lineage-dependent resistance to adamantanes. *Antiviral Res* **117**, 10-19.
- Baz, M., Abed, Y., Papenburg, J., Bouhy, X., Hamelin, M. E. & Boivin, G. (2009).** Emergence of oseltamivir-resistant pandemic H1N1 virus during prophylaxis. *N Engl J Med* **361**, 2296-2297.
- Belser, J. A., Jayaraman, A., Raman, R., Pappas, C., Zeng, H., Cox, N. J., Katz, J. M., Sasisekharan, R. & Tumpey, T. M. (2011).** Effect of D222G mutation in the hemagglutinin protein on receptor binding, pathogenesis and transmissibility of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *PLoS One* **6**, e25091.

- Berhane, Y., Ojkic, D., Neufeld, J., Leith, M., Hisanaga, T., Kehler, H., Ferencz, A., Wojcinski, H., Cottam-Birt, C., Suderman, M., Handel, K., Alexandersen, S. & Pasick, J. (2010).** Molecular characterization of pandemic H1N1 influenza viruses isolated from turkeys and pathogenicity of a human pH1N1 isolate in turkeys. *Avian Dis* **54**, 1275-1285.
- Bowman, A. S., Sreevatsan, S., Killian, M. L., Page, S. L., Nelson, S. W., Nolting, J. M., Cardona, C. & Slemons, R. D. (2012).** Molecular evidence for interspecies transmission of H3N2pM/H3N2v influenza A viruses at an Ohio agricultural fair, July 2012. *Emerg Microbes Infect* **1**, e33.
- Bright, R. A., Shay, D. K., Shu, B., Cox, N. J. & Klimov, A. I. (2006).** Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA* **295**, 891-894.
- Brown, I. H. (2000).** The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet Microbiol* **74**, 29-46.
- Brown, I. H. (2013).** History and epidemiology of Swine influenza in Europe. *Curr Top Microbiol Immunol* **370**, 133-146.
- Brown, I. H., Alexander, D. J., Chakraverty, P., Harris, P. A. & Manvell, R. J. (1994).** Isolation of an influenza A virus of unusual subtype (H1N7) from pigs in England, and the subsequent experimental transmission from pig to pig. *Vet Microbiol* **39**, 125-134.
- Brown, I. H., Hill, M. L., Harris, P. A., Alexander, D. J. & McCauley, J. W. (1997).** Genetic characterisation of an influenza A virus of unusual subtype (H1N7) isolated from pigs in England. *Arch Virol* **142**, 1045-1050.
- Bui, M., Whittaker, G. & Helenius, A. (1996).** Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *J Virol* **70**, 8391-8401.
- Burmeister, W. P., Ruigrok, R. W. & Cusack, S. (1992).** The 2.2 Å resolution crystal structure of influenza B neuraminidase and its complex with sialic acid. *EMBO J* **11**, 49-56.
- Bush, R. M., Bender, C. A., Subbarao, K., Cox, N. J. & Fitch, W. M. (1999).** Predicting the evolution of human influenza A. *Science* **286**, 1921-1925.
- Caton, A. J., Brownlee, G. G., Yewdell, J. W. & Gerhard, W. (1982).** The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell* **31**, 417-427.

- Cauchemez, S., Epperson, S., Biggerstaff, M., Swerdlow, D., Finelli, L. & Ferguson, N. M. (2013).** Using routine surveillance data to estimate the epidemic potential of emerging zoonoses: application to the emergence of US swine origin influenza A H3N2v virus. *PLoS Med* **10**, e1001399.
- Centers for Disease, C. & Prevention (2012a).** Influenza A (H3N2) variant virus-related hospitalizations: Ohio, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **61**, 764-767.
- Centers for Disease, C. & Prevention (2012b).** Notes from the field: Outbreak of influenza A (H3N2) virus among persons and swine at a county fair--Indiana, July 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **61**, 561.
- Chambers, T. M., Hinshaw, V. S., Kawaoka, Y., Easterday, B. C. & Webster, R. G. (1991).** Influenza viral infection of swine in the United States 1988-1989. *Arch Virol* **116**, 261-265.
- Chandrasekaran, A., Srinivasan, A., Raman, R., Viswanathan, K., Raguram, S., Tumpey, T. M., Sasisekharan, V. & Sasisekharan, R. (2008).** Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin. *Nat Biotechnol* **26**, 107-113.
- Chen, W., Calvo, P. A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J. R. & Yewdell, J. W. (2001).** A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* **7**, 1306-1312.
- Chu, C. M. (1948).** Agglutination of red blood cells of different animal species by influenza and Newcastle disease viruses. *J Hyg (Lond)* **46**, 239-246.
- Ciacchi-Zanella, J. R., Vincent, A. L., Prickett, J. R., Zimmerman, S. M. & Zimmerman, J. J. (2010).** Detection of anti-influenza A nucleoprotein antibodies in pigs using a commercial influenza epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay developed for avian species. *J Vet Diagn Invest* **22**, 3-9.
- Claas, E. C., de Jong, J. C., van Beek, R., Rimmelzwaan, G. F. & Osterhaus, A. D. (1998).** Human influenza virus A/HongKong/156/97 (H5N1) infection. *Vaccine* **16**, 977-978.
- Clavijo, A., Tresnan, D. B., Jolie, R. & Zhou, E. M. (2002).** Comparison of embryonated chicken eggs with MDCK cell culture for the isolation of swine influenza virus. *Can J Vet Res* **66**, 117-121.

- Colman, P. M., Hoyne, P. A. & Lawrence, M. C. (1993).** Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase. *J Virol* **67**, 2972-2980.
- Colman, P. M., Varghese, J. N. & Laver, W. G. (1983).** Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* **303**, 41-44.
- Coloma, R., Valpuesta, J. M., Arranz, R., Carrascosa, J. L., Ortin, J. & Martin-Benito, J. (2009).** The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. *PLoS Pathog* **5**, e1000491.
- Compans, R. W., Content, J. & Duesberg, P. H. (1972).** Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol* **10**, 795-800.
- Cong, Y. L., Pu, J., Liu, Q. F., Wang, S., Zhang, G. Z., Zhang, X. L., Fan, W. X., Brown, E. G. & Liu, J. H. (2007).** Antigenic and genetic characterization of H9N2 swine influenza viruses in China. *J Gen Virol* **88**, 2035-2041.
- Cros, J. F. & Palese, P. (2003).** Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res* **95**, 3-12.
- Cross, K. J., Langley, W. A., Russell, R. J., Skehel, J. J. & Steinhauer, D. A. (2009).** Composition and functions of the influenza fusion peptide. *Protein Pept Lett* **16**, 766-778.
- Dapat, C., Kondo, H., Dapat, I. C., Baranovich, T., Suzuki, Y., Shobugawa, Y., Saito, K., Saito, R. & Suzuki, H. (2013).** Neuraminidase inhibitor susceptibility profile of pandemic and seasonal influenza viruses during the 2009-2010 and 2010-2011 influenza seasons in Japan. *Antiviral Res* **99**, 261-269.
- Deyde, V. M., Xu, X., Bright, R. A., Shaw, M., Smith, C. B., Zhang, Y., Shu, Y., Gubareva, L. V., Cox, N. J. & Klimov, A. I. (2007).** Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide. *J Infect Dis* **196**, 249-257.
- Donaldson, L. J., Rutter, P. D., Ellis, B. M., Greaves, F. E., Mytton, O. T., Pebody, R. G. & Yardley, I. E. (2009).** Mortality from pandemic A/H1N1 2009 influenza in England: public health surveillance study. *BMJ* **339**, b5213.
- Dowdle, W. R., Davenport, F. M., Fukumi, H., Schild, G. C., Tumova, B., Webster, R. G. & Zakstelskaja, L. Y. (1975).** Orthomyxoviridae. *Intervirology* **5**, 245-251.
- Ducatez, M. F., Hause, B., Stigger-Rosser, E., Darnell, D., Corzo, C., Juleen, K., Simonson, R., Brockwell-Staats, C., Rubrum, A., Wang, D., Webb, A., Crumpton, J. C., Lowe, J., Gramer, M. & Webby, R. J. (2011).** Multiple

- reassortment between pandemic (H1N1) 2009 and endemic influenza viruses in pigs, United States. *Emerg Infect Dis* **17**, 1624-1629.
- Eisfeld, A. J., Neumann, G. & Kawaoka, Y. (2014).** Influenza A virus isolation, culture and identification. *Nat Protoc* **9**, 2663-2681.
- Elster, C., Fourest, E., Baudin, F., Larsen, K., Cusack, S. & Ruigrok, R. W. (1994).** A small percentage of influenza virus M1 protein contains zinc but zinc does not influence in vitro M1-RNA interaction. *J Gen Virol* **75 (Pt 1)**, 37-42.
- Elster, C., Larsen, K., Gagnon, J., Ruigrok, R. W. & Baudin, F. (1997).** Influenza virus M1 protein binds to RNA through its nuclear localization signal. *J Gen Virol* **78 (Pt 7)**, 1589-1596.
- Enami, M. & Enami, K. (1996).** Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins stimulate the membrane association of the matrix protein. *J Virol* **70**, 6653-6657.
- Enami, M., Fukuda, R. & Ishihama, A. (1985).** Transcription and replication of eight RNA segments of influenza virus. *Virology* **142**, 68-77.
- Fenner, F. (1995).** ICNV 1966 to ICTV 1994: the contribution of veterinary virology. *Vet Microbiol* **46**, 3-13.
- Ferraris, O. & Lina, B. (2008).** Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. *J Clin Virol* **41**, 13-19.
- Fouchier, R. A., Schneeberger, P. M., Rozendaal, F. W., Broekman, J. M., Kemink, S. A., Munster, V., Kuiken, T., Rimmelzwaan, G. F., Schutten, M., Van Doornum, G. J., Koch, G., Bosman, A., Koopmans, M. & Osterhaus, A. D. (2004).** Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1356-1361.
- Francis, T., Pearson, H. E., Salk, J. E. & Brown, P. N. (1944).** Immunity in Human Subjects Artificially Infected with Influenza Virus, Type B. *Am J Public Health Nations Health* **34**, 317-334.
- Fujiyoshi, Y., Kume, N. P., Sakata, K. & Sato, S. B. (1994).** Fine structure of influenza A virus observed by electron cryo-microscopy. *EMBO J* **13**, 318-326.
- Fulton, B. O., Sachs, D., Beaty, S. M., Won, S. T., Lee, B., Palese, P. & Heaton, N. S. (2015).** Mutational Analysis of Measles Virus Suggests Constraints on Antigenic Variation of the Glycoproteins. *Cell Rep* **11**, 1331-1338.
- Gagnon, C. A., Spearman, G., Hamel, A., Godson, D. L., Fortin, A., Fontaine, G. & Tremblay, D. (2009).** Characterization of a Canadian mink H3N2 influenza A virus

- isolate genetically related to triple reassortant swine influenza virus. *J Clin Microbiol* **47**, 796-799.
- Garten, R. J., Davis, C. T., Russell, C. A., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., Sessions, W. M., Xu, X., Skepner, E., Deyde, V., Okomo-Adhiambo, M., Gubareva, L., Barnes, J., Smith, C. B., Emery, S. L., Hillman, M. J., Rivailler, P., Smagala, J., de Graaf, M., Burke, D. F., Fouchier, R. A., Pappas, C., Alpuche-Aranda, C. M., Lopez-Gatell, H., Olivera, H., Lopez, I., Myers, C. A., Faix, D., Blair, P. J., Yu, C., Keene, K. M., Dotson, P. D., Jr., Boxrud, D., Sambol, A. R., Abid, S. H., St George, K., Bannerman, T., Moore, A. L., Stringer, D. J., Blevins, P., Demmler-Harrison, G. J., Ginsberg, M., Kriner, P., Waterman, S., Smole, S., Guevara, H. F., Belongia, E. A., Clark, P. A., Beatrice, S. T., Donis, R., Katz, J., Finelli, L., Bridges, C. B., Shaw, M., Jernigan, D. B., Uyeki, T. M., Smith, D. J., Klimov, A. I. & Cox, N. J. (2009).** Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* **325**, 197-201.
- Gaush, C. R., Hard, W. L. & Smith, T. F. (1966).** Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc Soc Exp Biol Med* **122**, 931-935.
- Gorlich, D. & Kutay, U. (1999).** Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 607-660.
- Gramer, M. R., Lee, J. H., Choi, Y. K., Goyal, S. M. & Joo, H. S. (2007).** Serologic and genetic characterization of North American H3N2 swine influenza A viruses. *Can J Vet Res* **71**, 201-206.
- Grgic, H., Costa, M., Friendship, R. M., Carman, S., Nagy, E. & Poljak, Z. (2015).** Genetic Characterization of H1N1 and H1N2 Influenza A Viruses Circulating in Ontario Pigs in 2012. *PLoS One* **10**, e0127840.
- Grgic, H., Costa, M., Friendship, R. M., Carman, S., Nagy, E., Wideman, G., Weese, S. & Poljak, Z. (2014).** Molecular characterization of H3N2 influenza A viruses isolated from Ontario swine in 2011 and 2012. *Virol J* **11**, 194.
- Guindon, S. & Gascuel, O. (2003).** A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**, 696-704.
- Hale, B. G., Randall, R. E., Ortin, J. & Jackson, D. (2008).** The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol* **89**, 2359-2376.
- Hampson, A. W. & Mackenzie, J. S. (2006).** The influenza viruses. *Med J Aust* **185**, S39-43.
- Hancock, K., Veguilla, V., Lu, X., Zhong, W., Butler, E. N., Sun, H., Liu, F., Dong, L., DeVos, J. R., Gargiullo, P. M., Brammer, T. L., Cox, N. J., Tumpey, T. M. &**

- Katz, J. M. (2009).** Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *N Engl J Med* **361**, 1945-1952.
- Hansen, M. S., Pors, S. E., Jensen, H. E., Bille-Hansen, V., Bisgaard, M., Flachs, E. M. & Nielsen, O. L. (2010).** An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *J Comp Pathol* **143**, 120-131.
- Hause, B. M., Collin, E. A., Ran, Z., Zhu, L., Webby, R. J., Simonson, R. R. & Li, F. (2012).** In vitro reassortment between endemic H1N2 and 2009 H1N1 pandemic swine influenza viruses generates attenuated viruses. *PLoS One* **7**, e39177.
- Hause, B. M., Oleson, T. A., Bey, R. F., Stine, D. L. & Simonson, R. R. (2010).** Antigenic categorization of contemporary H3N2 Swine influenza virus isolates using a high-throughput serum neutralization assay. *J Vet Diagn Invest* **22**, 352-359.
- He, X., Zhou, J., Bartlam, M., Zhang, R., Ma, J., Lou, Z., Li, X., Li, J., Joachimiak, A., Zeng, Z., Ge, R., Rao, Z. & Liu, Y. (2008).** Crystal structure of the polymerase PA(C)-PB1(N) complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature* **454**, 1123-1126.
- Heggeness, M. H., Smith, P. R., Ulmanen, I., Krug, R. M. & Choppin, P. W. (1982).** Studies on the helical nucleocapsid of influenza virus. *Virology* **118**, 466-470.
- Heinen, P. P., van Nieuwstadt, A. P., de Boer-Luijtz, E. A. & Bianchi, A. T. (2001).** Analysis of the quality of protection induced by a porcine influenza A vaccine to challenge with an H3N2 virus. *Vet Immunol Immunopathol* **82**, 39-56.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. & Griffith, R. (1992).** Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* **10**, 413-417.
- Hirst, G. K. (1941).** The Agglutination of Red Cells by Allantoic Fluid of Chick Embryos Infected with Influenza Virus. *Science* **94**, 22-23.
- Holland, J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S. & VandePol, S. (1982).** Rapid evolution of RNA genomes. *Science* **215**, 1577-1585.
- Horimoto, T. & Kawaoka, Y. (2001).** Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin Microbiol Rev* **14**, 129-149.
- Horimoto, T. & Kawaoka, Y. (2005).** Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol* **3**, 591-600.
- Hurt, A. C., Alexander, R., Hibbert, J., Deed, N. & Barr, I. G. (2007).** Performance of six influenza rapid tests in detecting human influenza in clinical specimens. *J Clin Virol* **39**, 132-135.

- Hurt, A. C., Holien, J. K. & Barr, I. G. (2009).** In vitro generation of neuraminidase inhibitor resistance in A(H5N1) influenza viruses. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 4433-4440.
- Hurt, A. C., Leang, S. K., Speers, D. J., Barr, I. G. & Maurer-Stroh, S. (2012).** Mutations I117V and I117M and oseltamivir sensitivity of pandemic (H1N1) 2009 viruses. *Emerg Infect Dis* **18**, 109-112.
- Hutchinson, H. & Segard, S. (2010).** Foreword from Health Canada and the Public Health Agency of Canada. *Can J Public Health* **101 Suppl 2**, S3.
- Igarashi, M., Ito, K., Yoshida, R., Tomabechi, D., Kida, H. & Takada, A. (2010).** Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus hemagglutinin. *PLoS One* **5**, e8553.
- Inglis, S. C., Barrett, T., Brown, C. M. & Almond, J. W. (1979).** The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 3790-3794.
- Ito, T., Couceiro, J. N., Kelm, S., Baum, L. G., Krauss, S., Castrucci, M. R., Donatelli, I., Kida, H., Paulson, J. C., Webster, R. G. & Kawaoka, Y. (1998).** Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* **72**, 7367-7373.
- Jung, K., Ha, Y. & Chae, C. (2005).** Pathogenesis of swine influenza virus subtype H1N2 infection in pigs. *J Comp Pathol* **132**, 179-184.
- Karasin, A. I., Brown, I. H., Carman, S. & Olsen, C. W. (2000a).** Isolation and characterization of H4N6 avian influenza viruses from pigs with pneumonia in Canada. *J Virol* **74**, 9322-9327.
- Karasin, A. I., Schutten, M. M., Cooper, L. A., Smith, C. B., Subbarao, K., Anderson, G. A., Carman, S. & Olsen, C. W. (2000b).** Genetic characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America, 1977-1999: evidence for wholly human and reassortant virus genotypes. *Virus Res* **68**, 71-85.
- Karlas, A., Machuy, N., Shin, Y., Pleissner, K. P., Artarini, A., Heuer, D., Becker, D., Khalil, H., Ogilvie, L. A., Hess, S., Maurer, A. P., Muller, E., Wolff, T., Rudel, T. & Meyer, T. F. (2010).** Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* **463**, 818-822.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. & Miyata, T. (2002).** MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* **30**, 3059-3066.

- Katz, J. M., Naeve, C. W. & Webster, R. G. (1987).** Host cell-mediated variation in H3N2 influenza viruses. *Virology* **156**, 386-395.
- Kawaoka, Y., Krauss, S. & Webster, R. G. (1989).** Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* **63**, 4603-4608.
- Kay, R. M., Done, S. H. & Paton, D. J. (1994).** Effect of sequential porcine reproductive and respiratory syndrome and swine influenza on the growth and performance of finishing pigs. *Vet Rec* **135**, 199-204.
- Kitikoon, P., Gauger, P. C., Anderson, T. K., Culhane, M. R., Swenson, S., Loving, C. L., Perez, D. R. & Vincent, A. L. (2013).** Swine influenza virus vaccine serologic cross-reactivity to contemporary US swine H3N2 and efficacy in pigs infected with an H3N2 similar to 2011-2012 H3N2v. *Influenza Other Respir Viruses* **7 Suppl 4**, 32-41.
- Kitikoon, P., Vincent, A. L., Gauger, P. C., Schlink, S. N., Bayles, D. O., Gramer, M. R., Darnell, D., Webby, R. J., Lager, K. M., Swenson, S. L. & Klimov, A. (2012).** Pathogenicity and transmission in pigs of the novel A(H3N2)v influenza virus isolated from humans and characterization of swine H3N2 viruses isolated in 2010-2011. *J Virol* **86**, 6804-6814.
- Klenk, H. D., Rott, R., Orlich, M. & Blodorn, J. (1975).** Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* **68**, 426-439.
- Kodihalli, S., Justewicz, D. M., Gubareva, L. V. & Webster, R. G. (1995).** Selection of a single amino acid substitution in the hemagglutinin molecule by chicken eggs can render influenza A virus (H3) candidate vaccine ineffective. *J Virol* **69**, 4888-4897.
- Kolocouris, N., Zoidis, G., Foscolos, G. B., Fytas, G., Prathalingham, S. R., Kelly, J. M., Naesens, L. & De Clercq, E. (2007).** Design and synthesis of bioactive adamantane spiro heterocycles. *Bioorg Med Chem Lett* **17**, 4358-4362.
- Krumbholz, A., Schmidtke, M., Bergmann, S., Motzke, S., Bauer, K., Stech, J., Durrwald, R., Wutzler, P. & Zell, R. (2009).** High prevalence of amantadine resistance among circulating European porcine influenza A viruses. *J Gen Virol* **90**, 900-908.
- Krystal, M., Young, J. F., Palese, P., Wilson, I. A., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1983).** Sequential mutations in hemagglutinins of influenza B virus isolates: definition of antigenic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 4527-4531.
- Kumpf, R. A. & Dougherty, D. A. (1993).** A mechanism for ion selectivity in potassium channels: computational studies of cation-pi interactions. *Science* **261**, 1708-1710.

- Kyriakis, C. S., Brown, I. H., Foni, E., Kuntz-Simon, G., Maldonado, J., Madec, F., Essen, S. C., Chiapponi, C. & Van Reeth, K. (2011).** Virological surveillance and preliminary antigenic characterization of influenza viruses in pigs in five European countries from 2006 to 2008. *Zoonoses Public Health* **58**, 93-101.
- Lamb, R. A. & Choppin, P. W. (1983).** The gene structure and replication of influenza virus. *Annu Rev Biochem* **52**, 467-506.
- Lamb, R. A., Lai, C. J. & Choppin, P. W. (1981).** Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 4170-4174.
- Lazarovits, J. & Roth, M. (1988).** A single amino acid change in the cytoplasmic domain allows the influenza virus hemagglutinin to be endocytosed through coated pits. *Cell* **53**, 743-752.
- Le, Q. M., Kiso, M., Someya, K., Sakai, Y. T., Nguyen, T. H., Nguyen, K. H., Pham, N. D., Ngyen, H. H., Yamada, S., Muramoto, Y., Horimoto, T., Takada, A., Goto, H., Suzuki, T., Suzuki, Y. & Kawaoka, Y. (2005).** Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature* **437**, 1108.
- Li, M. L., Rao, P. & Krug, R. M. (2001).** The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *EMBO J* **20**, 2078-2086.
- Lindstrom, S., Garten, R., Balish, A., Shu, B., Emery, S., Berman, L., Barnes, N., Sleeman, K., Gubareva, L., Villanueva, J. & Klimov, A. (2012).** Human infections with novel reassortant influenza A(H3N2)v viruses, United States, 2011. *Emerg Infect Dis* **18**, 834-837.
- Lindstrom, S. E., Cox, N. J. & Klimov, A. (2004).** Genetic analysis of human H2N2 and early H3N2 influenza viruses, 1957-1972: evidence for genetic divergence and multiple reassortment events. *Virology* **328**, 101-119.
- Lorusso, A., Vincent, A. L., Harland, M. L., Alt, D., Bayles, D. O., Swenson, S. L., Gramer, M. R., Russell, C. A., Smith, D. J., Lager, K. M. & Lewis, N. S. (2011).** Genetic and antigenic characterization of H1 influenza viruses from United States swine from 2008. *J Gen Virol* **92**, 919-930.
- Ma, W., Liu, Q., Qiao, C., del Real, G., Garcia-Sastre, A., Webby, R. J. & Richt, J. A. (2014).** North American triple reassortant and Eurasian H1N1 swine influenza viruses do not readily reassort to generate a 2009 pandemic H1N1-like virus. *MBio* **5**, e00919-00913.

- Marcelin, G., Sandbulte, M. R. & Webby, R. J. (2012).** Contribution of antibody production against neuraminidase to the protection afforded by influenza vaccines. *Rev Med Virol* **22**, 267-279.
- Martin, K. & Helenius, A. (1991).** Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J Virol* **65**, 232-244.
- Matrosovich, M., Zhou, N., Kawaoka, Y. & Webster, R. (1999).** The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol* **73**, 1146-1155.
- Matsuoka, Y., Matsumae, H., Katoh, M., Einfeld, A. J., Neumann, G., Hase, T., Ghosh, S., Shoemaker, J. E., Lopes, T. J., Watanabe, T., Watanabe, S., Fukuyama, S., Kitano, H. & Kawaoka, Y. (2013).** A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle. *BMC Syst Biol* **7**, 97.
- Maurer-Stroh, S., Lee, R. T., Eisenhaber, F., Cui, L., Phuah, S. P. & Lin, R. T. (2010).** A new common mutation in the hemagglutinin of the 2009 (H1N1) influenza A virus. *PLoS Curr* **2**, RRN1162.
- Meguro, H., Bryant, J. D., Torrence, A. E. & Wright, P. F. (1979).** Canine kidney cell line for isolation of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* **9**, 175-179.
- Mena, I., de la Luna, S., Albo, C., Martin, J., Nieto, A., Ortin, J. & Portela, A. (1994).** Synthesis of biologically active influenza virus core proteins using a vaccinia virus-T7 RNA polymerase expression system. *J Gen Virol* **75** (Pt 8), 2109-2114.
- Mishin, V. P., Hayden, F. G. & Gubareva, L. V. (2005a).** Susceptibilities of antiviral-resistant influenza viruses to novel neuraminidase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4515-4520.
- Mishin, V. P., Novikov, D., Hayden, F. G. & Gubareva, L. V. (2005b).** Effect of hemagglutinin glycosylation on influenza virus susceptibility to neuraminidase inhibitors. *J Virol* **79**, 12416-12424.
- Morens, D. M., Taubenberger, J. K. & Fauci, A. S. (2010).** The 2009 H1N1 pandemic influenza virus: what next? *MBio* **1**.
- Myers, K. P., Olsen, C. W. & Gray, G. C. (2007).** Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. *Clin Infect Dis* **44**, 1084-1088.
- Nelson, M. I., Vincent, A. L., Kitikoon, P., Holmes, E. C. & Gramer, M. R. (2012).** Evolution of novel reassortant A/H3N2 influenza viruses in North American swine and humans, 2009-2011. *J Virol* **86**, 8872-8878.

- Nfon, C. K., Berhane, Y., Hisanaga, T., Zhang, S., Handel, K., Kehler, H., Labrecque, O., Lewis, N. S., Vincent, A. L., Copps, J., Alexandersen, S. & Pasick, J. (2011).** Characterization of H1N1 swine influenza viruses circulating in Canadian pigs in 2009. *J Virol* **85**, 8667-8679.
- Nobusawa, E. & Sato, K. (2006).** Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. *J Virol* **80**, 3675-3678.
- Noda, T., Sagara, H., Yen, A., Takada, A., Kida, H., Cheng, R. H. & Kawaoka, Y. (2006).** Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* **439**, 490-492.
- Nogales, A., Baker, S. F., Ortiz-Riano, E., Dewhurst, S., Topham, D. J. & Martinez-Sobrido, L. (2014).** Influenza A virus attenuation by codon deoptimization of the NS gene for vaccine development. *J Virol* **88**, 10525-10540.
- Noton, S. L., Medcalf, E., Fisher, D., Mullin, A. E., Elton, D. & Digard, P. (2007).** Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *J Gen Virol* **88**, 2280-2290.
- O'Neill, R. E., Jaskunas, R., Blobel, G., Palese, P. & Moroianu, J. (1995).** Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J Biol Chem* **270**, 22701-22704.
- Olsen, C. W., Karasin, A. I., Carman, S., Li, Y., Bastien, N., Ojkic, D., Alves, D., Charbonneau, G., Henning, B. M., Low, D. E., Burton, L. & Broukhanski, G. (2006).** Triple reassortant H3N2 influenza A viruses, Canada, 2005. *Emerg Infect Dis* **12**, 1132-1135.
- Ortega, J., Martin-Benito, J., Zurcher, T., Valpuesta, J. M., Carrascosa, J. L. & Ortin, J. (2000).** Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J Virol* **74**, 156-163.
- Paine, P. L., Moore, L. C. & Horowitz, S. B. (1975).** Nuclear envelope permeability. *Nature* **254**, 109-114.
- Palzer, A., Ritzmann, M., Wolf, G. & Heinritzi, K. (2008).** Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia. *Vet Rec* **162**, 267-271.
- Parvin, J. D., Moscona, A., Pan, W. T., Leider, J. M. & Palese, P. (1986).** Measurement of the mutation rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1. *J Virol* **59**, 377-383.

- Pearce, M. B., Jayaraman, A., Pappas, C., Belser, J. A., Zeng, H., Gustin, K. M., Maines, T. R., Sun, X., Raman, R., Cox, N. J., Sasisekharan, R., Katz, J. M. & Tumpey, T. M. (2012).** Pathogenesis and transmission of swine origin A(H3N2)v influenza viruses in ferrets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 3944-3949.
- Portela, A. & Digard, P. (2002).** The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* **83**, 723-734.
- Porter, A. G., Smith, J. C. & Emtage, J. S. (1980).** Nucleotide sequence of influenza virus RNA segment 8 indicates that coding regions for NS1 and NS2 proteins overlap. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 5074-5078.
- Potter, C. W. (2001).** A history of influenza. *J Appl Microbiol* **91**, 572-579.
- Prokudina, E. N., Semenova, N. P. & Chumakov, V. M. (2005).** Stability of intracellular influenza virus nucleocapsid protein oligomers. *Arch Virol* **150**, 833-839.
- Raymond, F. L., Caton, A. J., Cox, N. J., Kendal, A. P. & Brownlee, G. G. (1986).** The antigenicity and evolution of influenza H1 haemagglutinin, from 1950-1957 and 1977-1983: two pathways from one gene. *Virology* **148**, 275-287.
- Renaud, C., Kuypers, J. & Englund, J. A. (2011).** Emerging oseltamivir resistance in seasonal and pandemic influenza A/H1N1. *J Clin Virol* **52**, 70-78.
- Retamal, M., Abed, Y., Corbeil, J. & Boivin, G. (2014).** Epitope mapping of the 2009 pandemic and the A/Brisbane/59/2007 seasonal (H1N1) influenza virus haemagglutinins using mAbs and escape mutants. *J Gen Virol* **95**, 2377-2389.
- Richt, J. A., Lager, K. M., Clouser, D. F., Spackman, E., Suarez, D. L. & Yoon, K. J. (2004).** Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays for the detection and differentiation of North American swine influenza viruses. *J Vet Diagn Invest* **16**, 367-373.
- Ritchey, M. B., Palese, P. & Kilbourne, E. D. (1976).** RNAs of influenza A, B, and C viruses. *J Virol* **18**, 738-744.
- Robertson, J. S., Cook, P., Attwell, A. M. & Williams, S. P. (1995).** Replicative advantage in tissue culture of egg-adapted influenza virus over tissue-culture derived virus: implications for vaccine manufacture. *Vaccine* **13**, 1583-1588.
- Rogers, G. N., Pritchett, T. J., Lane, J. L. & Paulson, J. C. (1983).** Differential sensitivity of human, avian, and equine influenza A viruses to a glycoprotein inhibitor of infection: selection of receptor specific variants. *Virology* **131**, 394-408.
- Ruigrok, R. W. & Baudin, F. (1995).** Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that

- are indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles. *J Gen Virol* **76** (Pt 4), 1009-1014.
- Ruigrok, R. W., Calder, L. J. & Wharton, S. A. (1989).** Electron microscopy of the influenza virus submembranal structure. *Virology* **173**, 311-316.
- Samson, M., Pizzorno, A., Abed, Y. & Boivin, G. (2013).** Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res* **98**, 174-185.
- Schirmer, P. & Holodniy, M. (2009).** Oseltamivir for treatment and prophylaxis of influenza infection. *Expert Opin Drug Saf* **8**, 357-371.
- Schmidtke, M., Zell, R., Bauer, K., Krumbholz, A., Schrader, C., Suess, J. & Wutzler, P. (2006).** Amantadine resistance among porcine H1N1, H1N2, and H3N2 influenza A viruses isolated in Germany between 1981 and 2001. *Intervirology* **49**, 286-293.
- Scholtissek, C., Rohde, W., Von Hoyningen, V. & Rott, R. (1978).** On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology* **87**, 13-20.
- Schulze, I. T. (1997).** Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin. *J Infect Dis* **176 Suppl 1**, S24-28.
- Shaman, J. & Kohn, M. (2009).** Absolute humidity modulates influenza survival, transmission, and seasonality. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3243-3248.
- Shi, L., Galarza, J. M. & Summers, D. F. (1996).** Recombinant-baculovirus-expressed PB2 subunit of the influenza A virus RNA polymerase binds cap groups as an isolated subunit. *Virus Res* **42**, 1-9.
- Shope, R. E. (1931a).** The Etiology of Swine Influenza. *Science* **73**, 214-215.
- Shope, R. E. (1931b).** Swine Influenza : I. Experimental Transmission and Pathology. *J Exp Med* **54**, 349-359.
- Shope, R. E. (1938).** Serological Evidence for the Occurrence of Infection with Human Influenza Virus in Swine. *J Exp Med* **67**, 739-748.
- Shu, B., Garten, R., Emery, S., Balish, A., Cooper, L., Sessions, W., Deyde, V., Smith, C., Berman, L., Klimov, A., Lindstrom, S. & Xu, X. (2012).** Genetic analysis and antigenic characterization of swine origin influenza viruses isolated from humans in the United States, 1990-2010. *Virology* **422**, 151-160.
- Sidoti, F., Rizzo, F., Costa, C., Astegiano, S., Curtoni, A., Mandola, M. L., Cavallo, R. & Bergallo, M. (2010).** Development of real time RT-PCR assays for detection of type A influenza virus and for subtyping of avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *Mol Biotechnol* **44**, 41-50.

- Smither, S. J., Lear-Rooney, C., Biggins, J., Pettitt, J., Lever, M. S. & Olinger, G. G., Jr. (2013).** Comparison of the plaque assay and 50% tissue culture infectious dose assay as methods for measuring filovirus infectivity. *J Virol Methods* **193**, 565-571.
- Sonnberg, S., Webby, R. J. & Webster, R. G. (2013).** Natural history of highly pathogenic avian influenza H5N1. *Virus Res* **178**, 63-77.
- Spackman, E., Senne, D. A., Myers, T. J., Bulaga, L. L., Garber, L. P., Perdue, M. L., Lohman, K., Daum, L. T. & Suarez, D. L. (2002).** Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* **40**, 3256-3260.
- Spackman, E. & Suarez, D. L. (2008).** Type A influenza virus detection and quantitation by real-time RT-PCR. *Methods Mol Biol* **436**, 19-26.
- Sriwilaijaroen, N. & Suzuki, Y. (2012).** Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **88**, 226-249.
- Stech, J., Xiong, X., Scholtissek, C. & Webster, R. G. (1999).** Independence of evolutionary and mutational rates after transmission of avian influenza viruses to swine. *J Virol* **73**, 1878-1884.
- Stencel-Baerenwald, J. E., Reiss, K., Reiter, D. M., Stehle, T. & Dermody, T. S. (2014).** The sweet spot: defining virus-sialic acid interactions. *Nat Rev Microbiol* **12**, 739-749.
- Stieneke-Grober, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H. D. & Garten, W. (1992).** Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J* **11**, 2407-2414.
- Stiver, G. (2003).** The treatment of influenza with antiviral drugs. *CMAJ* **168**, 49-56.
- Stoner, T. D., Krauss, S., DuBois, R. M., Negovetich, N. J., Stallknecht, D. E., Senne, D. A., Gramer, M. R., Swafford, S., DeLiberto, T., Govorkova, E. A. & Webster, R. G. (2010).** Antiviral susceptibility of avian and swine influenza virus of the N1 neuraminidase subtype. *J Virol* **84**, 9800-9809.
- Storms, A. D., Gubareva, L. V., Su, S., Wheeling, J. T., Okomo-Adhiambo, M., Pan, C. Y., Reisdorf, E., St George, K., Myers, R., Wotton, J. T., Robinson, S., Leader, B., Thompson, M., Shannon, M., Klimov, A., Fry, A. M. & Group, U. S. A. R. S. W. (2012).** Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus infections, United States, 2010-11. *Emerg Infect Dis* **18**, 308-311.
- Stray, S. J. & Pittman, L. B. (2012).** Subtype- and antigenic site-specific differences in biophysical influences on evolution of influenza virus hemagglutinin. *Virol J* **9**, 91.

- Strengell, M., Ikonen, N., Ziegler, T. & Julkunen, I. (2011).** Minor changes in the hemagglutinin of influenza A(H1N1)2009 virus alter its antigenic properties. *PLoS One* **6**, e25848.
- Suarez, D. L., Das, A. & Ellis, E. (2007).** Review of rapid molecular diagnostic tools for avian influenza virus. *Avian Dis* **51**, 201-208.
- Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C., Huang, J., Hemphill, M., Rowe, T., Shaw, M., Xu, X., Fukuda, K. & Cox, N. (1998).** Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* **279**, 393-396.
- Sun, H., Yang, J., Zhang, T., Long, L. P., Jia, K., Yang, G., Webby, R. J. & Wan, X. F. (2013).** Using sequence data to infer the antigenicity of influenza virus. *MBio* **4**.
- Suzuki, Y., Nagao, Y., Kato, H., Matsumoto, M., Nerome, K., Nakajima, K. & Nobusawa, E. (1986).** Human influenza A virus hemagglutinin distinguishes sialyloligosaccharides in membrane-associated gangliosides as its receptor which mediates the adsorption and fusion processes of virus infection. Specificity for oligosaccharides and sialic acids and the sequence to which sialic acid is attached. *J Biol Chem* **261**, 17057-17061.
- Takeda, M., Pekosz, A., Shuck, K., Pinto, L. H. & Lamb, R. A. (2002).** Influenza A virus M2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture. *J Virol* **76**, 1391-1399.
- Tataridis, D., Fytas, G., Kolocouris, A., Fytas, C., Kolocouris, N., Foscolos, G. B., Padalko, E., Neyts, J. & De Clercq, E. (2007).** Influence of an additional 2-amino substituent of the 1-aminoethyl pharmacophore group on the potency of rimantadine against influenza virus A. *Bioorg Med Chem Lett* **17**, 692-696.
- Taubenberger, J. K., Reid, A. H., Janczewski, T. A. & Fanning, T. G. (2001).** Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**, 1829-1839.
- Tharakaraman, K., Raman, R., Stebbins, N. W., Viswanathan, K., Sasisekharan, V. & Sasisekharan, R. (2013).** Antigenically intact hemagglutinin in circulating avian and swine influenza viruses and potential for H3N2 pandemic. *Sci Rep* **3**, 1822.
- Thiry, E., Zicola, A., Addie, D., Egberink, H., Hartmann, K., Lutz, H., Poulet, H. & Horzinek, M. C. (2007).** Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in cats and other carnivores. *Vet Microbiol* **122**, 25-31.

- Tobita, K., Sugiura, A., Enomote, C. & Furuyama, M. (1975).** Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med Microbiol Immunol* **162**, 9-14.
- Tong, S., Li, Y., Rivaller, P., Conrardy, C., Castillo, D. A., Chen, L. M., Recuenco, S., Ellison, J. A., Davis, C. T., York, I. A., Turmelle, A. S., Moran, D., Rogers, S., Shi, M., Tao, Y., Weil, M. R., Tang, K., Rowe, L. A., Sammons, S., Xu, X., Frace, M., Lindblade, K. A., Cox, N. J., Anderson, L. J., Rupprecht, C. E. & Donis, R. O. (2012).** A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 4269-4274.
- Tong, S., Zhu, X., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Bourgeois, M., Yang, H., Chen, X., Recuenco, S., Gomez, J., Chen, L. M., Johnson, A., Tao, Y., Dreyfus, C., Yu, W., McBride, R., Carney, P. J., Gilbert, A. T., Chang, J., Guo, Z., Davis, C. T., Paulson, J. C., Stevens, J., Rupprecht, C. E., Holmes, E. C., Wilson, I. A. & Donis, R. O. (2013).** New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* **9**, e1003657.
- Tremblay, D., Allard, V., Doyon, J. F., Bellehumeur, C., Spearman, J. G., Harel, J. & Gagnon, C. A. (2011).** Emergence of a new swine H3N2 and pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus reassortant in two Canadian animal populations, mink and swine. *J Clin Microbiol* **49**, 4386-4390.
- Van Rompuy, L., Min Jou, W., Huylebroeck, D., Devos, R. & Fiers, W. (1981).** Complete nucleotide sequence of the nucleoprotein gene from the human influenza strain A/PR/8/34 (HON1). *Eur J Biochem* **116**, 347-353.
- Vigerust, D. J., Ulett, K. B., Boyd, K. L., Madsen, J., Hawgood, S. & McCullers, J. A. (2007).** N-linked glycosylation attenuates H3N2 influenza viruses. *J Virol* **81**, 8593-8600.
- Vincent, A. L., Lager, K. M., Faaberg, K. S., Harland, M., Zanella, E. L., Ciacci-Zanella, J. R., Kehrli, M. E., Jr., Janke, B. H. & Klimov, A. (2010).** Experimental inoculation of pigs with pandemic H1N1 2009 virus and HI cross-reactivity with contemporary swine influenza virus antisera. *Influenza Other Respir Viruses* **4**, 53-60.
- Vincent, A. L., Lager, K. M., Harland, M., Lorusso, A., Zanella, E., Ciacci-Zanella, J. R., Kehrli, M. E. & Klimov, A. (2009a).** Absence of 2009 pandemic H1N1 influenza A virus in fresh pork. *PLoS One* **4**, e8367.

- Vincent, A. L., Lager, K. M., Ma, W., Lekcharoensuk, P., Gramer, M. R., Loiacono, C. & Richt, J. A. (2006).** Evaluation of hemagglutinin subtype 1 swine influenza viruses from the United States. *Vet Microbiol* **118**, 212-222.
- Vincent, A. L., Ma, W., Lager, K. M., Gramer, M. R., Richt, J. A. & Janke, B. H. (2009b).** Characterization of a newly emerged genetic cluster of H1N1 and H1N2 swine influenza virus in the United States. *Virus Genes* **39**, 176-185.
- Vincent, A. L., Ma, W., Lager, K. M., Janke, B. H. & Richt, J. A. (2008).** Swine influenza viruses a North American perspective. *Adv Virus Res* **72**, 127-154.
- Wakefield, L. & Brownlee, G. G. (1989).** RNA-binding properties of influenza A virus matrix protein M1. *Nucleic Acids Res* **17**, 8569-8580.
- Webby, R. J., Swenson, S. L., Krauss, S. L., Gerrish, P. J., Goyal, S. M. & Webster, R. G. (2000).** Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *J Virol* **74**, 8243-8251.
- Webby, R. J. & Webster, R. G. (2001).** Emergence of influenza A viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**, 1817-1828.
- Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M. & Kawaoka, Y. (1992).** Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* **56**, 152-179.
- Webster, R. G. & Laver, W. G. (1967).** Preparation and properties of antibody directed specifically against the neuraminidase of influenza virus. *J Immunol* **99**, 49-55.
- Webster, R. G., Sharp, G. B. & Claas, E. C. (1995).** Interspecies transmission of influenza viruses. *Am J Respir Crit Care Med* **152**, S25-30.
- White, C. L., Janakiraman, M. N., Laver, W. G., Philippon, C., Vasella, A., Air, G. M. & Luo, M. (1995).** A sialic acid-derived phosphonate analog inhibits different strains of influenza virus neuraminidase with different efficiencies. *J Mol Biol* **245**, 623-634.
- Wiley, D. C. & Skehel, J. J. (1987).** The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem* **56**, 365-394.
- Wilson, I. A. & Cox, N. J. (1990).** Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annu Rev Immunol* **8**, 737-771.
- Wood, J. M., Oxford, J. S., Dunleavy, U., Newman, R. W., Major, D. & Robertson, J. S. (1989).** Influenza A (H1N1) vaccine efficacy in animal models is influenced by two amino acid substitutions in the hemagglutinin molecule. *Virology* **171**, 214-221.
- Xu, R., Ekiert, D. C., Krause, J. C., Hai, R., Crowe, J. E., Jr. & Wilson, I. A. (2010).** Structural basis of preexisting immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. *Science* **328**, 357-360.

- Yamada, S., Suzuki, Y., Suzuki, T., Le, M. Q., Nidom, C. A., Sakai-Tagawa, Y., Muramoto, Y., Ito, M., Kiso, M., Horimoto, T., Shinya, K., Sawada, T., Kiso, M., Usui, T., Murata, T., Lin, Y., Hay, A., Haire, L. F., Stevens, D. J., Russell, R. J., Gamblin, S. J., Skehel, J. J. & Kawaoka, Y. (2006).** Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* **444**, 378-382.
- Yewdell, J. W., Webster, R. G. & Gerhard, W. U. (1979).** Antigenic variation in three distinct determinants of an influenza type A haemagglutinin molecule. *Nature* **279**, 246-248.
- Yoon, K. J., Janke, B. H., Swalla, R. W. & Erickson, G. (2004).** Comparison of a commercial H1N1 enzyme-linked immunosorbent assay and hemagglutination inhibition test in detecting serum antibody against swine influenza viruses. *J Vet Diagn Invest* **16**, 197-201.
- Yoon, S. W., Webby, R. J. & Webster, R. G. (2014).** Evolution and ecology of influenza A viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **385**, 359-375.
- Yuan, P., Leser, G. P., Demeler, B., Lamb, R. A. & Jardetzky, T. S. (2008).** Domain architecture and oligomerization properties of the paramyxovirus PIV 5 hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein. *Virology* **378**, 282-291.
- Zell, R., Scholtissek, C. & Ludwig, S. (2013).** Genetics, evolution, and the zoonotic capacity of European Swine influenza viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **370**, 29-55.
- Zhang, K., Wang, Z., Liu, X., Yin, C., Basit, Z., Xia, B. & Liu, W. (2012).** Dissection of influenza A virus M1 protein: pH-dependent oligomerization of N-terminal domain and dimerization of C-terminal domain. *PLoS One* **7**, e37786.
- Zhou, N. N., Senne, D. A., Landgraf, J. S., Swenson, S. L., Erickson, G., Rossow, K., Liu, L., Yoon, K., Krauss, S. & Webster, R. G. (1999).** Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. *J Virol* **73**, 8851-8856.
- Zhou, N. N., Senne, D. A., Landgraf, J. S., Swenson, S. L., Erickson, G., Rossow, K., Liu, L., Yoon, K. J., Krauss, S. & Webster, R. G. (2000).** Emergence of H3N2 reassortant influenza A viruses in North American pigs. *Vet Microbiol* **74**, 47-58.

VII. Annexe:

I. CONGRÈS:

Mhamdi Z. Savard C, Gagnon CA. Genetic diversity and antigenic characterization of Quebec swine influenza virus strains isolated from pigs. 96nd Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD). Chicago, IL, USA. December 6-8, 2015. Abstract 73P, page 46.

Mhamdi Z. Savard C, Gagnon CA. Genetic diversity and antigenic characterization of Quebec swine influenza virus strains isolated from pigs. 96nd Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD). Chicago, IL, USA. December 6-8, 2015. Abstract 73P, page 46.

Mhamdi Z. Savard C. and Gagnon C.A. (2015). Genetic diversity and antigenic characterisation of Quebec swine influenza viruses strains isolated from pigs. Poster 073. 17th Annual international symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (WAVLD). Saskatoon, Saskatchewan, Canada, June 15-18.

Mhamdi Z. Savard C. and Gagnon C.A. (2015). Genetic diversity and antigenic characterisation of Quebec swine influenza viruses strains isolated from pigs. Poster A20. 8e symposium du CRIPA. Saint-Hyacinthe, Qc, Canada. Les 21 et 22 mai 2015.

Mhamdi Z. Savard C. and Gagnon C.A. (2016). Detection of influenza A virus strains resistant to antiviral drugs, including neuraminidase inhibitors, in Quebec swine herds. Poster A8. 9^e symposium du CRIPA. Saint-Hyacinthe, Qc, Canada. Les 25 et 26 mai 2016.

Mhamdi Z. Savard C. Provost C. and Gagnon C.A. (2016). Detection of influenza A virus strains resistant to antiviral drugs, including neuraminidase inhibitors, in Quebec swine herds. Poster 3. 15th Annual CAHLN Meeting, June 5 – 8, 2016.

II. MÉRITES:

Bourse d'admission "maîtrise", Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal (2500\$).

Bourse d'admission "maîtrise" du centre de recherche en infectiologie porcine (CRIPA) (5500\$).

Bourse de congrès: Annual international symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (WAVLD). Saskatoon, Saskatchewan, Canada.

Bourse d'exemption des frais de scolarité "maîtrise" par la Faculté de Médecine vétérinaire, Saint-Hyacinthe, Université de Montréal.

Bourse de rédaction, "maîtrise", Faculté de Médecine vétérinaire, Saint-Hyacinthe, Université de Montréal (2500\$).

Bourse d'exemption des frais de scolarité "PhD" par la Faculté de Médecine vétérinaire, Saint-Hyacinthe, Université de Montréal.

1^{ère} Prix, Travel Award, 15th Annual CAHLN Meeting, June 5 – 8, 2016 (500\$).