

---

# 11

## Biologie des virus

### Biologie moléculaire et cellulaire des virus Influenza

Au microscope électronique, la particule virale apparaît comme une sphère d'environ 1000 Å de diamètre recouverte de deux sortes de « spicules » : l'hémagglutinine qui se fixe sur les globules rouges et provoque leur agglutination et la neuraminidase, enzyme qui dissocie cette liaison avec le globule rouge.

Les progrès en génie génétique sont tels qu'ils permettent aujourd'hui de déterminer la séquence de l'hémagglutinine directement à partir d'un échantillon clinique (Rajakumar et coll., 1990). Ils ont également servi à mieux comprendre les relations structure-fonction des différentes protéines des virus Influenza. L'ARN brin- n'étant pas infectieux, il a fallu attendre la possibilité de construire un ADNc, de purifier les polymérases pour reconstituer un complexe actif de ribonucléoprotéine (RNP) pouvant être transfecté dans des cellules (Palèse et coll., 1993). Les cellules utilisées sont les cellules MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*). Des virus génétiquement altérés ont pu être obtenus ; en particulier, certains présentent un phénomène d'atténuation par la capacité de moduler la synthèse de l'un des segments d'ARN. Ces virus sont les prototypes de vaccins vivants qui peuvent induire une immunité locale, une meilleure immunité systémique, ainsi qu'une immunité cellulaire. De plus, les virus modifiés génétiquement peuvent également être utiles dans le développement de vaccins tués par l'exploitation de propriétés particulières de certains gènes.

### Composition du virus

Les virus de la grippe sont différents des autres virus animaux. L'ARN contenant l'information génétique est fractionné en huit segments monocaténaux qui se répliquent de manière indépendante. Chaque segment d'ARN code pour une seule protéine virale (cf. Tableau 11-1).

A l'intérieur du virion, chacun des huit segments est associé à quatre autres molécules : une nucléoprotéine et trois polymérases. L'arrangement moléculaire de ces complexes est responsable de la structure hélicoïdale

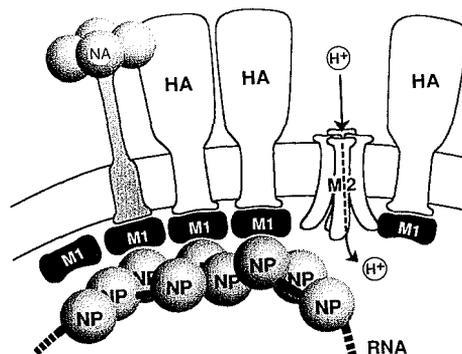
vue au microscope électronique à l'intérieur de certains virions. Les protéines du centre (core), une nucléoprotéine (NP) et une protéine matricielle (M), très semblables chez tous les virus d'un même type, sont donc spécifiques de ce type. Cependant les anticorps dirigés contre ces protéines ne semblent pas prévenir la réinfection.

**Tableau 11-1 - Le génome ARN du virus Influenza A et ses protéines**

Segments	Taille (nucléotides) total 13 588	ARNm (nucléotides)	Protéine	Taille (aa)	Nombre de molécules/virion
1	2 341	2 320	PB2	759	30-60
2	2 341	2 320	PB1	757	30-60
3	2 233	2 211	PA	716	30-60
4	1 778	1 757	HA	566	500
5	1 565	1 540	NP	498	1 000
6	1 413	1 392	NA	454	100
7	1 027	1 005	M1	252	3 000
		316	M2	96	
		276	?	?	
8	890	868	NS1	230	
		395	NS2	121	

SOURCE : LAMB RA, 1983

Les huit segments d'ARN sont individuellement empaquetés dans la nucléoprotéine (RNP). Les RNP sont associées à la protéine matricielle M1 qui interagit aussi avec les domaines cytoplasmiques des glycoprotéines. La protéine M2 est une protéine tétramérique transmembranaire qui sert de canal ionique pour les cations monovalents (cf. Figure 11-1).



**Figure 11-1 - Interactions moléculaires entre les protéines structurales du virus Influenza (*Cell*, 69. 577-578, 1992)**

Les particules virales transportent le génome viral et les protéines, des cellules infectées vers les non infectées. Le mécanisme d'entrée du virus nécessite la fixation du virus sur un ou plusieurs récepteurs cellulaires portant un acide sialique par l'intermédiaire du site récepteur de l'hémagglutinine. La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire se fait dans une vésicule endosomale par l'intermédiaire de l'extrémité N terminale de la fraction HA2 de l'hémagglutinine et à pH5 (Lamb, 1993 - Bullough PA et coll., 1994). Ensuite, le matériel génétique peut-être libéré dans le cytoplasme sous forme de complexe répliatif et migre dans le noyau.

La transcription et répliation des huit segments d'ARN viral a lieu dans le noyau des cellules infectées. Ces processus se déroulent dans des complexes moléculaires constitués des trois sous-unités de polymérase : deux sous-unités basiques (PB1 et PB2) et une acide (PA), la nucléoprotéine (NP) et le segment d'ARN.

Beaucoup de questions relatives à la structure de ces complexes, et sur le contrôle des étapes de transcription et répliation demeurent en suspens.

### **Les protéines M1 et M2**

La protéine membranaire M1, connue également comme protéine matricielle, est la plus abondante protéine structurale du virus. Elle s'étend à travers la bi-couche lipidique et contribue à la rigidité de l'enveloppe virale. La protéine M1, en interaction d'une part avec l'enveloppe et d'autre part avec la nucléocapside, aurait une activité inhibitrice de l'ARN polymérase et contrôle la croissance virale.

Elle s'associe aux complexes RNP dans le noyau pour favoriser le transport vers la membrane plasmique. Lors de l'infection d'une nouvelle cellule, ce complexe se dissocie avant l'entrée dans le noyau. Le relâchement des interactions M1-RNP serait dépendant du pH acide généré par la protéine M2, de même la dissociation des glycoprotéines et de la protéine M1. L'amantadine bloque spécifiquement cette dissociation. Ainsi, les protéines M1 et M2 interviennent ensemble dans le contrôle de la croissance virale *in vivo* (Martin et coll., 1991).

L'importance de la protéine M2 n'a été comprise que récemment. La protéine M2, composant de l'enveloppe virale, fonctionne comme un canal ionique et régule le pH par le transport d'ions H<sup>+</sup> dans les vésicules. Elle intervient dans la maturation des glycoprotéines. Cette activité est intimement reliée aux caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'hémagglutinine, les deux protéines agissant de concert dans les processus essentiels de la décapsidation et le transport de la glycoprotéine vers la surface cellulaire pour l'assemblage du virus infectieux. Elle est la cible de l'amantadine et la rimantadine, drogues spécifiques du virus Influenza. Les études récentes (revue générale Helenius, 1992) ont montré comment se fait le

transport de l'HA depuis le réticulum endoplasmique vers la surface de la cellule infectée. La protéine M2 contribue à créer un gradient de protons entre la lumière des organelles et le cytosol qui permet le passage de HA. Quand le canal est bloqué par l'amantadine, il ne peut plus assurer cette fonction et les molécules d'HA prennent une conformation qui empêche la formation de particules infectieuses. A l'intérieur des particules virales, les protons peuvent également induire des changements de conformation de la nucléocapside pour initier sa dissociation avant la pénétration dans le cytosol. La différence de structure et de fonction des nucléocapsides qui entrent et qui sortent pourrait s'expliquer par le bain acide durant l'entrée.

### **Rôle régulateur de protéines cellulaires**

Les protéines Mx sont membres de la famille des GTPases, impliquées dans le ciblage et le tri de protéines intracellulaires. Elles peuvent également intervenir dans le transport des protéines virales.

Mx1 est une protéine de souris inducible par l'interféron qui inhibe la croissance virale. La protéine MxA est une protéine humaine cytoplasmique qui bloque le virus sans effet inhibiteur sur la synthèse de l'ARNm viral, mais interviendrait plutôt sur le transport de l'ARNm vers les ribosomes, la traduction ou le transport des protéines nouvellement synthétisées. Un modèle de souris transgénique a montré que la pathogénicité virale est déterminée par une balance subtile entre la quantité de virus infectant et le niveau de protéine Mx1 de l'hôte. La souris peut être rendue résistante à une infection virulente par une « immunisation intracellulaire » (Arnheiter et coll., 1990).

### **Modifications post-traductionnelles**

La façon dont se fait l'assemblage des protéines virales reste inconnue ; de même la façon dont les protéines cellulaires sont exclues de l'enveloppe virale. Il semble qu'un signal soit nécessaire (Naim, 1993).

Le clivage de l'hémagglutinine est non seulement essentiel pour l'infectivité, mais également pour le développement de l'infection à travers l'organisme et pour l'expression de la pathogénicité. Le clivage réalisé à un site arginine dépend de la présence de protéases appropriées. La furine, une protéase eucaryote proche de la subtilisine, pourrait être un candidat éventuel.

Les modifications des parties C terminales de HA peuvent entraîner des modifications conformationnelles du domaine externe des protéines telles que les épitopes (Lydy et coll., 1993). Une autre modification post-traductionnelle de l'hémagglutinine est l'acylation. Les sites de fixation des acides gras ont été élucidés, mais le rôle biologique de l'acylation reste encore à comprendre.

## Évolution des virus Influenza

La segmentation de l'ARN favorise les recombinaisons ou réassortiments lors de l'infection par plusieurs souches de virus A chez l'homme et l'animal. Le phénomène de recombinaison est probablement à l'origine des variations antigéniques majeures des virus de la grippe.

Deux sortes de variations antigéniques peuvent être distinguées au niveau des antigènes viraux principaux HA et NA. La première, appelée dérive antigénique, est une série de changements mineurs à l'intérieur d'un ensemble de souches semblables. La seconde, appelée substitution ou cassure antigénique, consiste en des changements brutaux plus importants dans la composition soit de l'hémagglutinine, soit de la neuraminidase, soit des deux. Elles sont, par convention entre les virologistes, désignées par H0, H1, H2, H3, N1, N2. Ces deux sortes de variation sont observées chez les virus A ; il y a seulement une dérive antigénique chez les virus B. Le virus grippal A, isolé chez l'homme et l'animal, est le seul à pouvoir provoquer des pandémies.

L'évolution des virus a été mise en évidence par l'étude, parfois rétrospective, des virus isolés au cours d'épidémies et de pandémies. Avec les méthodes immunologiques tout d'abord (sérum polyclonaux, anticorps monoclonaux), puis les méthodes modernes de séquençage, il a été possible d'analyser toutes les variations phénotypiques des souches isolées de par le monde et de proposer une classification des virus. Cette étude prend toute son importance pour la sélection des souches composant les vaccins.

L'écologie des virus Influenza A reposent sur les mêmes méthodes d'isolement et d'identification antigénique des virus isolés dans divers réservoirs humains et animaux. Elle a permis d'établir la filiation, le degré de variabilité antigénique, la cocirculation des souches d'un même réservoir, ainsi que le passage d'un réservoir à l'autre et l'existence de souches réassortantes. Ainsi, il a pu être repéré le passage accidentel de virus humains vers l'animal (H3N2) et de l'animal vers l'homme (Sw H1N1).

### Les gènes HA, NA, NS

En 1990, Kilbourne et coll. (1990), ont comparé l'évolution des glycoprotéines HA et NA des souches A H3N2 et A H1N1. Ils montraient que les taux d'évolution antigénique de HA et NA étaient différents et indépendants, qu'il existait entre 1980 et 83 ( $\approx 8\%$  variation) une pause dans l'évolution de la N1 alors que H1 continuait à varier (93 % de variation).

L'évolution plus lente de la NA a une implication importante : une immunisation anti NA qui permet l'infection (rappel d'immunité), mais évite la maladie, serait valable pour une période prolongée par rapport à l'immu-

nisation anti HA, d'autant plus que l'immunité anti NA provoque une immunité croisée hétérologue démontrée depuis 1968.

Les méthodes génétiques ont enrichi considérablement les connaissances depuis leur large application à l'analyse des séquences des différents gènes de souches de virus Influenza A, B et C isolées dans des aires géographiques, dans des réservoirs animaux et à des périodes de temps très divers.

La séquence nucléotidique permet de déduire la séquence en acides aminés et, en fonction de leur situation sur la molécule, les sites antigéniques et l'impact des variations sur le phénotype antigénique. Cox et coll. (1993) appliquent les méthodes de séquençage des gènes de l'hémagglutinine des souches H1, H3 et B dans le but de mesurer l'évolutivité et de sélectionner les virus pour le vaccin. Pour les souches H1N1 récentes, le taux de variation donne :  $3,59 \times 10^{-3}$  substitution de nucléotide/site/an. Le taux de substitution des AA est de 0,58 %/an. Ces valeurs présentent des fluctuations en fonction des méthodes de calcul, des modifications liées à l'hôte, du nombre d'isolats examinés. Pour H3N2 souches isolées depuis 1968, on constate qu'après l'émergence d'un nouveau variant épidémique, il existe peu de variations au niveau AA dans des virus d'origine géographique différente pour une période de neuf mois, puis les souches sont de plus en plus hétérogènes. Deux lignées peuvent coexister (sans doute plus). Les souches d'épidémie présentent au moins quatre changements d'AA dans au moins trois sites antigéniques. Le taux de substitution des nucléotides a été calculé à  $4,0 \times 10^{-3}$ /site/an, et le taux de substitution d'AA à 0,52 %/an.

Pour les virus B, deux lignées distinctes génétiquement et antigéniquement cocirculent et ont provoqué des épidémies. Ces lignées différentes persistent plus longtemps que dans le groupe des Influenza A. Le taux de substitution des nucléotides varie de 1,03 à  $2,3 \times 10^{-3}$ /nucléotide/an selon Kanegae et coll. (1990) et Air et coll. (1990). Il est de 20 à 30 % inférieur au taux de substitution des nucléotides de l'Influenza A et de 10 à 20 % inférieur au taux de substitution des AA. Le taux de variation est identique pour le gène HA et pour le gène NS d'Influenza B. Les protéines de l'Influenza B étant mieux conservées que les séquences nucléotidiques, sans doute la pression de sélection positive est-elle moins forte que pour le virus Influenza A. On peut admettre que la réponse immune anti influenza B n'a qu'un pouvoir discret de sélection malgré la présence d'anticorps. On peut se demander s'ils sont suffisants, neutralisants ou peu affins ?

Pour Influenza C, les souches sont remarquablement stables aussi bien antigéniquement que génétiquement. Sur une période de 19 ans, le gène NS n'a subi aucune modification en nucléotides, et le gène HA seulement 2 substitutions nucléotidiques.

C'est aux équipes de Fitch, Palese et Scholtissek et coll. (1991-1993) que l'on doit les plus remarquables travaux sur l'évolution génétique des virus Influenza A. Fondés sur le séquençage des gènes HA du sous-type H3 et NS des virus Influenza A, deux arbres phylogéniques sont construits qui montrent l'évolution de la composition des gènes. Chaque arbre est pourvu d'un tronc objectivant l'évolution positive progressive et des branches qui « s'éteignent » plus rapidement pour HA (1,6 an) que pour NS (3 ans).

### Les gènes NP

L'étude extensive de 100 gènes NP provenant d'espèces animales différentes, de périodes différentes a été faite par Scholtissek et coll. (1993). Elle a permis de différencier le réservoir aviaire du réservoir humain, ceux-ci évoluant de manière indépendante. L'analyse phylogénique confirme que tous les virus des mammifères sont originaires directement ou indirectement d'un ancêtre aviaire. Cependant, l'introduction d'un virus aviaire dans les espèces animales semble un événement rare, le dernier datant de 1979, un virus aviaire a infecté les porcs d'Europe du Nord conduisant à l'apparition d'une nouvelle lignée.

L'établissement d'arbres phylogéniques basés sur le nombre de substitutions de nucléotides montre les deux branches principales humaine et aviaire chez lesquelles on distingue les souches d'Eurasie et les souches américaines et des branches latérales (chevaux, porc, goéland). On note aussi parmi les gènes « aviaires » des gènes provenant de porc, vison, phoque, baleine (passage accidentel ?). Les gènes NP des souches porcines sont très proches de ceux des souches humaines. L'évolution des gènes humains est plus importante que celle des autres espèces animales. Il est probable que l'ancêtre des NP humaines et mammifères soit aviaire, la NP B et C dérivant de la NP A. Ces gènes NP sont donc spécifiques d'espèce et permettent d'établir l'origine d'un virus qui s'est introduit dans un réservoir de façon accidentelle. Webster et coll. (1991) relatent l'épidémie de 1989 chez le cheval au NE de la Chine. Scholtissek et coll. (1993) décrivent l'introduction de H1N1 avec NP aviaire chez les porcs d'Europe du Nord qui supprime H1N1 swine classique en Italie. On a observé également la réintroduction d'un nouveau swine H1N1 avec NP aviaire dans des élevages de dindes entraînant de fortes pertes économiques.

Ces observations permettent d'émettre l'hypothèse d'un réservoir primordial de tous les virus Influenza A localisé chez les oiseaux aquatiques. Le canard sauvage serait la source de transmission des virus Influenza A aux différents hôtes (Figure 11-2).

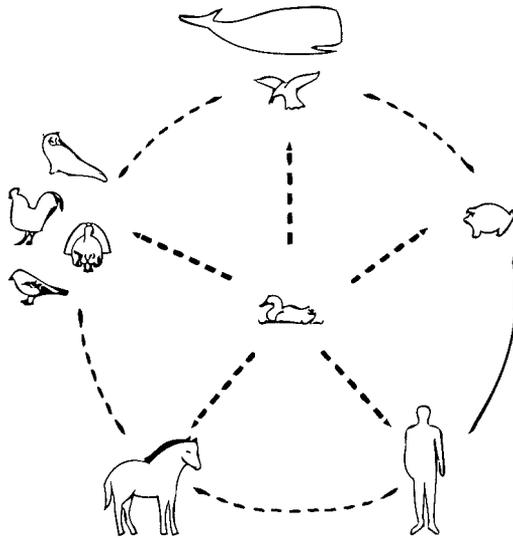


Figure 11-2 - Réservoir des virus influenza A (d'après Webster et coll., 1993)

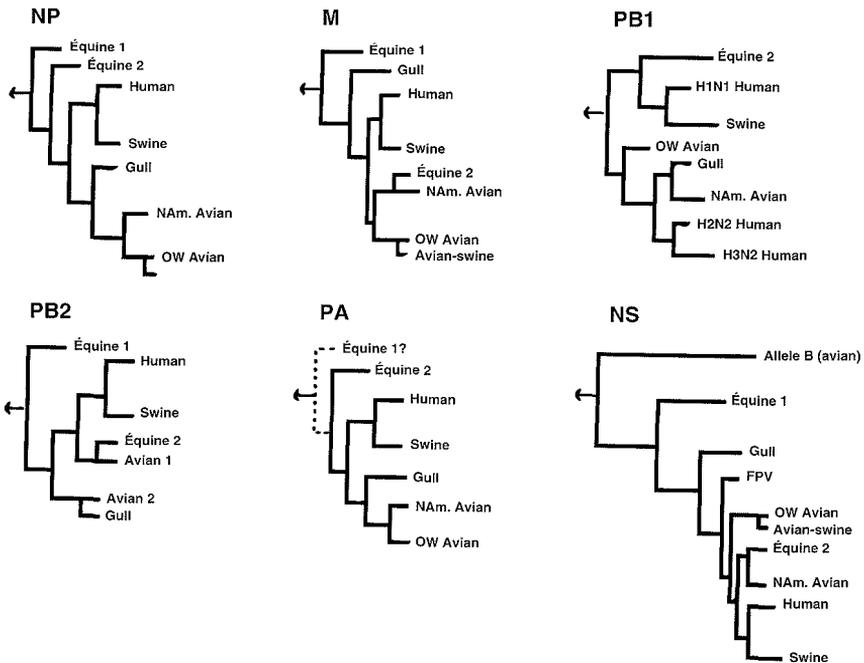


Figure 11-3 - Arbres phylogéniques des gènes du virus Influenza A (d'après Webster et coll., 1993)

Les gènes autres que NP ont aussi été extensivement séquencés. Une synthèse de ces résultats est faite par Webster et coll. (1993). Des six arbres phylogéniques (Figure 11-3), aucun n'a de topologie identique. C'est donc qu'il a existé des réassortiments et des extinctions qui ont modifié l'évolution des gènes. Les gènes NP et PA partagent une évolution commune et ne paraissent pas avoir été réassortis indépendamment l'un de l'autre. Le gène M a une évolution notablement différente de NP et PA, il permet aussi de différencier les espèces et deux groupes aviaires (nord-américain et eurasiatique). Les gènes PB2 - PA, constants dans chaque espèce, permettent aussi de différencier les hôtes, y compris dans les deux groupes aviaires et le groupe goéland. Le gène PB1 permet de différencier les 3 sous-types humains H1, H2 et H3. Le gène NS, le plus ancien, est d'origine aviaire, et le gène du premier isolement (FPV) est probablement dérivé de gènes beaucoup plus anciens avant la coupure des souches aviaires du Nouveau et de l'Ancien Monde.

### Transmission inter-espèces

L'application majeure de l'étude des gènes (Wright et coll., 1992) est la mise en évidence de la transmission inter-espèces. C'est ainsi qu'il a été montré que la souche H2N2 - 1957 (pandémie asiatique) contenait trois gènes d'origine aviaire, et la H3N2 - 1968 (pandémie Hong Kong) deux gènes HA et PB1. Nakao et coll. (1993) ont appliqué ces techniques pour essayer de localiser sur l'arbre phylogénique les gènes NS et NA de A (H2N2) isolé en 1967 et 1968 en Europe, en Asie, au nord et au sud de l'Amérique, afin d'identifier l'origine du virus A (H3N2) Hong Kong qui apparaît en 1968. Cette étude permet d'estimer le délai entre le réassortiment et l'apparition de la pandémie ainsi que le lieu de ce réassortiment.

Les auteurs démontrent que NA et NS sont plus proches des souches européennes du groupe II que des souches asiatiques, mais n'osent pas conclure à l'origine européenne, ni à une recombinaison antérieure à 1967.

Une étude phylogénique détaillée du gène HA de H2N2 a porté sur vingt souches d'origine géographique et animale différentes, car ce sous-type pourrait être à l'origine d'une prochaine pandémie (Webster et coll., 1993).

L'antigène H2 a été identifié dans des souches de virus Influenza aviaires en 1972-73 en Allemagne, en Chine et en 1991 en Europe. Aux États-Unis, des virus H2N2 ont été isolés des canards sauvages entre 1980 et 1984, puis, depuis 1988, chez les oiseaux domestiques (dindes). De même, une enquête sérologique et virologique instaurée depuis 1990-91 dans les poulaillers et chez les oiseaux vivants dans les marchés urbains a permis d'isoler des souches H2N2.

Il n'y a pas encore de transmission à l'homme ni au porc mais cette situation mérite une surveillance attentive car le virus H2N2 n'est plus en circulation chez l'homme depuis 1968.

Outre la mise en évidence de réassortiments génétiques entre souches animales (oiseau ↔ porc), entre souches animales et humaines (oiseaux ↔ homme (H2N2, H3N2)), les séquençages des gènes analysent plus finement les échanges entre souches humaines et font la preuve de l'existence fréquente de réassortants entre souches H1N1 et H3N2 (Xu et coll., 1993) et même entre deux lignées de souches d'Influenza B. Ces réassortiments peuvent porter sur les gènes autres que HA et NA et ne pas modifier leur structure antigénique. On ignore dans quelle mesure ils influencent le pouvoir pathogène.

#### BIBLIOGRAPHIE

- AIR GM, GIBBS AJ, LAYER WG, WEBSTER RG. Evolutionary changes in influenza B are not primarily governed by antibody selection. *PNAS*. 1990. **87**. 3884-3888.
- ARNHEITER H, SKUNTZ S, NOTEBORN M, CHANG S, MEIER E. Transgenic mice with intracellular immunity to Influenza virus. *Cell*. 1990. **62**. 51-61.
- AYMARD M, DOUGLAS A, SKEHEL SS. *Comparative antigenic study of Influenza A (H3N2) viruses isolated from pigs and humans*. Communication International Meeting on Advances in Virology, CATANIA, 1985.
- BULLOUGH PA, HUGHSON FM, SKEHEL JJ, WILEY DC. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature*. 1994. 371.
- COX N, XU X, BENDER C, KENDAL A, REGNERY H, HEMPHILL M, ROTA P. Evolution of hemagglutinin in epidemic variants and selection of vaccine viruses. *Options for the Control of Influenza II*. Elsevier. 1993. 223-230.
- FITCH WM, LEITER JM, LI XQ, PALESE P. Positive Darwinian evolution in human Influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1991. **88**. 4270-4274.
- KANEGAE Y, SUGITA S, ENDO A, ISHIDA M, SENYA S, OSAKA K, NEROME K, OYA A. Evolution pattern of the hemagglutinin gene of Influenza B viruses isolated in Japan : Cocirculation lineage in the same epidemic season. *J Virol*. 1990. **64**. 2860-2865.
- KILBOURNE ED, JOHANSSON BE, GRAJOWER B. Independant and disparate evolution in nature of Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 1990. **87**. 786-790.
- LAMB RA. Minireview - Paramyxovirus fusion : a hypothesis for changes. *Virology*. 1993. **197**. 1-11.
- LYDYE SL, COMPANS RW. Role of the cytoplasmic domains of viral glycoproteins in antibody-induced cell surface mobility. *J Virol*. 1993. **67**. 6289-6294.
- MARTIN K, HELENIUS A. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins : the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell*. 1991. **67**. 117-130.
- NAIM H, ROTH MG. Basis for selective incorporation of glycoproteins into the Influenza virus envelope. *J Virol*. 1993. **67**. 4831-4841.
- NAKAO H. Location on the evolutionary trees of the non-structural protein (NS) and neuraminidase (NA) genes of late human influenza-A (H2N2) - viruses - parental viruses of the NS and NA genes of Hong Kong influenza-A (H3N2) - viruses. *J Gen Virol*. 1993. **74**. 1667-1672.

- PALESE P, LI S, BERGMANN M. Genetic manipulation of Influenza virus : a molecular approach to vaccine development in : *Options for the control of influenza II. Elsevier*. 1993. 263-267.
- RAJAKUMAR A, SWIERKOSZ EM, SCHULZE IT. Sequence of an influenza virus hemagglutinin determined directly from a clinical sample. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 1990. **87**. 4154-4158.
- SCHOLTISSEK C. Analysis of Influenza A virus nucleoproteins for the assessment of molecular genetic mechanisms leading to new phylogenetic virus lineages. *Arch Virol*. 1993. **131**. 237-250.
- WEBSTER RG, SCHAFER JR, SUSS J, BEAN WJ, KAWAOKA Y. Evolution and ecology of Influenza viruses. *Options for the control of influenza II. Elsevier*. 1993. 177-185.
- WEBSTER RG, YUANJI G. New Influenza virus in horses. *Nature*. 1991. **351**. 527.
- WELLS DL, HOPFENSBERGER DJ, ARDEN NH, HARMON MW, DAVIS JP, TIPPLE MA, SCHONBERGER LB. Swine Influenza virus infection. Transmission from ill pigs to humans at a wisconsin agricultural fair and subsequent probable person-to-person transmission. *JAMA*. 1991. **265**. 478-481.
- WRIGHT SM, KAWAOKA Y, SHARP GB, SENNE DA, WEBSTER RG. Interspecies transmission and reassortment of Influenza A viruses in pigs and turkeys in the United States. *Am J Epidemiol*. 1992. **136**. 488-497.
- XU X, GUO Y, ROTA P, HEMPHILL M, KANDAL A, COX N. Genetic reassortment of human influenza in nature. *Options for the control of Influenza II. Elsevier*. 1993. 203-207.