



**HAL**  
open science

# Le virus de la rougeole, un système complexe : adaptation, atténuation et modélisation

Johan Druelle

► **To cite this version:**

Johan Druelle. Le virus de la rougeole, un système complexe : adaptation, atténuation et modélisation. Immunologie. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2008. Français. NNT : . tel-00294057

**HAL Id: tel-00294057**

**<https://theses.hal.science/tel-00294057>**

Submitted on 8 Jul 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre :

Ecole Normale Supérieure de Lyon

## **THESE**

En vue d'obtenir le grade de

**Docteur de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon**

Discipline : Biosciences

Ecole Doctorale : Biologie Moléculaire Intégrée et Cognitive

Présentée et soutenue publiquement le 20 juin 2008 par

**Johan DRUELLE**

<p><b>LE VIRUS DE LA ROUGEOLE, UN SYSTEME COMPLEXE : ADAPTATION, ATTENUATION ET MODELISATION</b></p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------

Réalisée au sein du laboratoire « Immunobiologie des Infections Virales »  
ex INSERM U404, INSERM U758, ENS Lyon, département de Virologie Humaine  
Sous la direction du Docteur T.Fabian Wild

### **JURY**

Dr Dominique Garcin	rapporteur
Dr Sonia Longhi	rapporteur
Dr Marie Beurton Aimar	examineur
Pr Philippe Bouvet	examineur
Dr. T Fabian Wild	directeur de thèse



N° d'ordre :

Ecole Normale Supérieure de Lyon

## **THESE**

En vue d'obtenir le grade de

**Docteur de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon**

Discipline : Biosciences

Ecole Doctorale : Biologie Moléculaire Intégrée et Cognitive

Présentée et soutenue publiquement le 20 juin 2008 par

**Johan DRUELLE**

<p><b>LE VIRUS DE LA ROUGEOLE, UN SYSTEME COMPLEXE : ADAPTATION, ATTENUATION ET MODELISATION</b></p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------

Réalisée au sein du laboratoire « Immunobiologie des Infections Virales »  
ex INSERM U404, INSERM U758, ENS Lyon, département de Virologie Humaine  
Sous la direction du Docteur T.Fabian Wild

### **JURY**

Dr Dominique Garcin	rapporteur
Dr Sonia Longhi	rapporteur
Dr Marie Beurton Aimar	examineur
Pr Philippe Bouvet	examineur
Dr. T Fabian Wild	directeur de thèse



" La nature est un livre écrit en langage mathématique ",  
Galilée

« La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne  
fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et  
que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théo-  
rie et pratique : Rien ne fonctionne... et personne ne  
sait pourquoi ! », Einstein

« Un vent s'éleva... ce vent n'était pas le commencement.  
Il n'y a ni commencement ni fin dans les révolutions de la  
Roue du Temps. Mais c'était *un* commencement », Robert Jordan



## **REMERCIEMENTS**

Voici les quelques pages qui seront les plus lues de tout mon manuscrit aussi, en écho au mérite qu'il te revient à toi lecteur de t'aventurer aussi loin dans la lecture de mes travaux, je me dois de remercier, avec toute l'emphase qu'ils méritent, nombre de gens...

Je tiens à remercier de tout cœur (T) Fabian Wild qui m'a accueilli au sein de son équipe pendant un nombre indécent d'années. Je suis fier d'être le dernier de ses étudiants et resterai admiratif face à l'immensité de ses connaissances et sa bonhomie. Merci de m'avoir laissé avancer, à mes risques et mes périls sur des sentiers dont tu ignorais même l'existence. Courage pour le jardinage, là non plus, je n'arriverai pas à te suivre !

Merci beaucoup à Branka Horvat qui, au travers de son expérience et de son caractère a su également me forger, bon gré mal gré. Un grand merci aussi à Denis Gerlier pour m'avoir apporté une écoute plus qu'attendue et une vision rafraichissante du VR et de la recherche. Merci également à Emmanuel Grenier, le seul chercheur que je connaisse à mettre des smileys dans ses mails et qui pourtant arrive à théoriser la biologie.

Je remercie évidemment les 4 membres de mon jury pour leur effort quasi suicidaire de juger mes travaux. Merci aux Drs Sonia Longhi, Marie Beurton Aimar, Dominique Garcin et Philippe Bouvet.

Aux différents plateaux techniques de l'IFR128, un bravo et un merci, spécialement à Chantal et à Jean François.

A l'ensemble des « gens du labo » un grand merci également. Robin (et ses bières), Dominique (ah, cette macarena), Thierry (non, non, ce n'est pas exactement le même pantalon). Chantal (merci beaucoup pour ton intérêt, ton soutien, tes cours), Hélène (j'en aurai grimpé des étages pour te rattraper), Olga (muchas gracias, eres el sol del Quinto), Nathalie (quelle écoute ! et comment tu arrives à comprendre quoique ce soit au PHP ?), Karelle (tes gâteaux et tes rire nous manquent), Nadège (si tu savais à quel point mes P1 ont souffert grâce à tes travaux de thèse), Morgan (mais oui, tu es viril), Laurent (oh ouiiiiii, tu es viril), Marie (non, c'est pas vrai je suis pas un boulet), Carole (on abandonne ou pas nos plateaux techniques ?), Paul (comment tu fais pour toujours être aussi calme) Michèle (bon, je te laisse le créneau tôt le matin, j'ai pas survécu), Dame Manu (toutes les courbettes du monde...), Thomas (fichu rival va !), Christophe (cobureau loufoque sisi), les filles qui ont toujours froid et tellement chaud au cœur, Lydie et Hanane, Virginie qui a préféré s'enfuir mais qui avait tellement de gout pour les couleurs !!! Nico Tico Tacos , un stagiaire comme on en fait rarement (bon OK, Fabien, dans ton genre t'était pas mal non plus).



Les actuels, Joëlle (ah les charmes de la Belgique), Jeff (bon on aurait pu avoir pire dans le bureau...), Cyrille (ah ah je suis le plus jeune, mais bon, t'es pas si mal que ça quand mm), Thomas (allez change la coupe de cheveux et deviens le vrai metrosexuel qui sommeille en toi) Céline (ah les pique nique, les souris, les articles chiants que t'arrives à rendre compréhensibles), Solène (enfin une qui a du goût), Géraldine (un concept à toi toute seule), Olivier (allez encore un cobureau sympa, t'auras pas réussi à me contaminer avec tes fichues chauve-souris na !), Diane (la force tranquille), Julien qui a apporté une tornade de fraîcheur (selon les heures) pince sans rire insondable mais incontournable.

Avec un peu plus de pincements au cœur, un grand merci à Séverine qui pendant plusieurs mois a illuminé le labo, le bureau et la vie en général, Bariza aux conseils et aux éclats de rire dont on s'abreuve avec passion, Yann qui a accompagné mes premiers instants dans le labo avec ses éclats de tout ordre et que je n'oublierai pas.

Enfin, parce qu'elle fut le maillon le plus fort de l'équipe, un énorme merci à Caro pour m'avoir offert sa vision de la vie, de la science, de l'amitié et un soutien imparable en toute circonstance (sauf si je suis trop contagieux lol), bravo pour toutes tes réussites (y compris la mise au point d'une espèce hybride humain/humain) et bonne chance pour la suite (mais je n'ai pas trop de doutes).

Et parce qu'il n'y avait pas que la thèse mais aussi le monitorat, un grand merci à Domini-que Baas et au Professeur Rousset pour m'avoir permis de découvrir les joies de l'enseignement. A tous mes étudiants de L1 et L3 mais surtout à mes P1 (un peu moins le groupe 9) et en particulier ceux du CCM mais surtout Julien Chouchou et Baptiste.

Et parce que malgré tout ce travail, j'avais aussi une vie sociale, avec des gens normaux, qui ne comprenaient pas un traître mot de ce que je racontais, j'adresse un bravo et merci à mes piliers lyonnais, Davy, Cyril, Claire, Seb, Pat, Olivier, Christophe... avec qui j'ai tant partagé et échangé. Aux *pas comme moi* et pourtant tout aussi joyeux (bon OK Claire t'aurais dû être là) Marje, Elo, Dody, Sabine, Charlotte, Cécile qui au détour de MSN ou au téléphone ont égayé mes journées. Merci à tous ceux que je n'ai pas pu (ou ai oublié) de citer de ne pas m'en vouloir.

Enfin, merci à ma famille qui a su me soutenir de loin sans jamais bien cerner ce que je faisais mais qu'en tout cas je le faisais bien, mon pôpô, ma mômon, mes deux ptites sœurs (et leurs alter ego). Bon, merci aussi à Misty mon insupportable chat également (juste pour éviter qu'il miaule encore et encore)

Et à toi lecteur courage pour cette lecture et merci de faire vivre mes travaux !





# PLAN DETAILLE

REMERCIEMENTS.....	3
PLAN DETAILLE.....	7
LISTE DES ABREVIATIONS.....	11
RESUME.....	13
SUMMARY.....	14
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>15</b>
SYSTEMES COMPLEXES ET INFECTIOLOGIE.....	17
LE VIRUS DE LA ROUGEOLE.....	23
1. <i>L'infection rougeoleuse</i> .....	25
1.1 Physiopathologie de l'infection rougeoleuse.....	25
1.2 Isoler et produire le virus.....	27
1.3 Adapter le virus de la rougeole ?.....	29
1.4 Le virus de la rougeole ?.....	31
1.5 Politique(s) de vaccination.....	31
1.6 Etat actuel et avancées thérapeutiques.....	33
2. <i>Description moléculaire du Virus de la Rougeole</i> .....	35
2.1 Généralités et Classification.....	35
2.2 Description.....	35
2.3 Composants de la particule virale.....	36
a) Les glycoprotéines d'enveloppe : l'hémagglutinine H.....	36
b) Les glycoprotéines d'enveloppe : la protéine de fusion F.....	37
c) La protéine de matrice M.....	38
d) La nucléoprotéine N.....	39
e) La protéine large L.....	41
f) La phosphoprotéine P.....	43
g) Les protéines non-structurales.....	44
La protéine V.....	44
La protéine C.....	45
h) Le génome viral.....	45
2.4 Le cycle viral.....	47
a) L'entrée dans la cellule.....	49
b) Transcription.....	50
c) Transition transcription-réplication.....	51
d) Réplication.....	52
e) Encapsidation et bourgeonnement.....	53
f) Fusion intercellulaire viro-induite.....	55
3. <i>Le VR au labo</i> .....	56
3.1 Titration.....	56
3.2 Souches de laboratoire ?.....	57
3.3 Modèles animaux.....	58
LES INTERFERONS DE TYPE I.....	61
1. <i>La production des IFN de type I</i> .....	64
1.1 En quête des cellules productrices d'IFN.....	64
1.2 Caractérisation des <i>Interferon Producing Cells</i> .....	65
1.3 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes.....	65
1.4 A la croisée des chemins.....	67
1.5 Autres cellules productrices d'IFN $\alpha$ .....	68
2. <i>Réponse IFN</i> .....	69
2.1 Détection des « intrus » viraux et induction de la réponse IFN.....	69
a) Senseurs du signal danger à l'extérieur de la cellule: les TLRs.....	69
b) Senseurs du signal de danger cytoplasmique : les hélicases RIG-I et mda-5.....	71
2.2 Réponse à l'interféron et mise en place d'un état de veille antivirale.....	73
2.3 Le système IFN de type I : un système complexe I.....	75
3. <i>Contre mesures virales</i> .....	77
LES APPORTS DE LA MODELISATION MATHÉMATIQUE.....	81

A L'ÉTUDE DE LA VIROLOGIE.....	81
1. <i>Le modèle de base</i> .....	85
1.1 Description.....	85
1.2 Résolution.....	86
2. <i>La virologie en équations</i> .....	86
2.1 Avoir accès à des données non mesurables.....	87
2.2 Optimiser et contrôler la production de particules virales.....	88
2.3 Un virus contre un virus, <i>in silico</i> .....	89
3. <i>Des modèles originaux</i> .....	89
3.1 Une analyse très précise de HIV.....	91
3.2 HCV <i>in vitro</i> et <i>in silico</i> .....	91
3.3 Influenza sous tous ses aspects.....	93
4. <i>Immunovirologie : la modélisation lève l'imbroglia</i> .....	95
4.1 Interféron et HCV, une partition à écrire.....	95
4.2 Les lymphocytes T, des acteurs sans texte.....	96
a) Avec HBV, des rôles discutables.....	96
b) Lever l'ambiguïté et améliorer les diagnostics.....	97
5. <i>Des modèles en temps.. et en espace</i> .....	98
5.1 Automates cellulaires et influenza.....	98
5.2 Cellules, IFN, virus, on mixe le tout.....	101
<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>103</b>
<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>107</b>
ARTICLE I.....	109
RESULTATS COMPLEMENTAIRES DE L'ARTICLE I.....	113
ARTICLE 2.....	115
MODELISATION DE L'INFECTION ROUGEOLEUSE.....	116
<i>Introduction</i> .....	117
<i>Modéliser l'activité de la polymérase du VR</i> .....	120
Hypothèses et connaissances de départ.....	120
L'enzyme se détache.....	121
L'enzyme s'inactive.....	122
Hypothèse 1 : Un ARN génomique circulaire sans arrêt de la polymérase.....	123
Hypothèse 2 : d'autres topologies pour le contenu génétique.....	126
Hypothèse 3 : L'enzyme est poussée.....	128
<i>Modéliser le cycle viral</i> .....	131
Résultats.....	139
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>145</b>
<i>Le polymorphisme, humain et/ou viral</i> .....	147
<i>Que s'est il réellement produit au cours des 13 passages en cellules Vero ?</i> .....	149
<i>(Re)Définir la notion de souche vaccinale</i> .....	151
Compter le(s) virus.....	151
Particules défectives.....	152
Construire une souche vaccinale ?.....	152
Converger vers une souche vaccinale.....	153
En quête de stabilité.....	153
Des preuves de variabilité.....	154
<i>IFN et VR, des relations complexes</i> .....	155
<i>Vers une intégration des données biologiques</i> .....	158
L'échec (partiel) des modèles animaux.....	158
D'autres modèles ?.....	159
<i>Comment fonctionne la polymérase du VR ?</i> .....	159
La moyenne, c'est insuffisant pour prétendre à de bons résultats.....	159
Combien de ribonucléoparticules dans un virion ?.....	160
Le polyméras'omé', un train à l'arrêt ?.....	161
Se détacher pour être plus proche de la réalité ?.....	162
Entre M et F.....	163
<i>Faire tourner le cycle du VR</i> .....	164
Limites et possibilités.....	164
L'intérêt des EDO.....	165
Une transition délicate.....	165
La fusion, ou pourquoi personne n'avait essayé de modéliser le phénomène avant ?.....	166
(Se) Remettre en question(s) ?.....	168

ANNEXES .....	171
ARTICLE 3 .....	172
ARTICLE 4 .....	176
ARTICLE 5 .....	180
ARTICLE 6 .....	185
BIBLIOGRAPHIE.....	187



## **LISTE DES ABREVIATIONS**

ARNag	ARN antigénomique
ARNdb	ARN double brin
ARNg	ARN génomique
ARNm	ARN messenger
CARD	CAspase Recruitment Domain
CBP	CREB-Binding Protein
CDV	Virus de la maladie de Carré (Canine Distemper Virus)
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CTL	Lymphocyte T Cytotoxique
DC	Cellule Dendritique
EDO	Equation différentielle ordinaire
F	Protéine de Fusion
FcγR	Récepteur pour le fragment constant des immunoglobulines G
H	Hémagglutinine
HBV	Virus de l'hépatite B
HCV	Virus de l'hépatite C
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
Hsp	Heat shock protein
HSV	Virus Herpes simplex
HTLV	Virus lymphotrope T humain
IFN	Interféron
IFNAR	Interféron Alpha Receptor
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IPC	Interferon Producing Cell
IRAK	IL-1R Associated Kinase
IRF	Interferon Response Factor
ISG	Interferon-Stimulated Gene
ISRE	Interferon Signal Response Elements
Jak-1	Janus Tyrosine Kinase1
L	Protéine Large
LB	Lymphocyte B
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
LTh	Lymphocyte T helper
M	Protéine de Matrice
MyD88	Myeloïd Differentiation factor 88
N	Nucléoprotéine
NDV	Virus de la maladie de Newcastle
NiV	Virus Nipah (Nipah Virus)
NK	Natural Killer
NR	Nucleoprotein Receptor
ORF	Cadre ouvert de lecture / Open Reading Frame
P	Phosphoprotéine
PAMP	Motif moléculaire associé à un pathogène / Pathogen Associated Molecular Pattern
PBL	Leucocytes du sang périphérique / Peripheral Blood Leukocyte
PBMC	Cellules mononucléées du sang périphérique / Peripheral Blood Mononuclear Cell
pDC	Cellules dendritiques plasmacytoïdes
PDV	Virus de la peste des Phoques (Phocine distemper virus)
pfu	plaque forming unit
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3 kinase



PKR	Protein Kinase RNA dependent
PMV	Morbillivirus des Marsouins (Porpoise Morbillivirus)
PPRV	Virus de la peste des petits ruminants
PRR	Pathogen Recognition Receptor
RdRp	RNA Dependent RNA Polymerase
REG	Reticulum endoplasmique granuleux
RIG-I	Retinoic Acid Inducible Gene 1
RIP	Receptor Interacting Protein
RPV	Virus de la peste bovine (Rinderpest virus)
RT-PCR	Reverse Transcription Polymérase Chain Reaction
SeV	Virus Sendai
SIDA	Syndrôme de l'immunodéficience acquise humaine
SiV	Virus de l'immunodéficience simien
SIV	Saines/infectées/Virus
SLAM	Signaling Lymphocyte Activation Molecule (CD150)
SSPE	Panencéphalite Sclérosante Subaiguë
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TAK	Transforming growth factor $\beta$ Activating Kinase
TANK	TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B Activator
TBK	TANK Binding Kinase
TCR	T Cell Receptor
TICAM	TIR domain containing Adaptator Molecule inducing IFN $\beta$
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAF	Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor
TRAM	TRIF-related adaptator Molecule
TRIF	TIR domain containing Adaptator Inducing IFN $\beta$
Tyk-2	Tyrosine Kinase 2
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VR	Virus de la rougeole
VSV	Virus de la Stomatite Vésiculaire

## **RESUME**

### **Le Virus de la rougeole, un système complexe : adaptation, atténuation et modélisation**

La vaccination anti-rougeoleuse a permis de freiner le développement de cette infection responsable de près d'un demi-million de décès par an. Afin de mieux appréhender la biologie du virus de la rougeole (VR), nous avons étudié l'adaptation de ce virus au contexte cellulaire et établi une modélisation mathématique du cycle viral.

L'analyse génétique d'une souche sauvage, G954-PBL, et d'une souche adaptée par 13 passages en cellules Vero, G954-V13, a mis en évidence uniquement 5 substitutions d'acides aminés. Ces mutations ont affecté la pathogénicité de la souche qui est devenue atténuée dans un modèle de souris transgéniques pour l'un des récepteurs du VR. L'adaptation à un contexte cellulaire au cours de la propagation limite la croissance d'une souche dans un autre environnement, sauf dans le cas des souches vaccinales, robustes. Contrairement au dogme établi, les IFN de type I ne semblent pas jouer un rôle majeur dans cette atténuation.

En parallèle, nous avons développé deux approches mathématiques du cycle viral permettant de mieux interpréter les interrelations virus/cellule. A l'échelle moléculaire, nous proposons plusieurs hypothèses du fonctionnement de la polymérase virale, permettant d'établir le gradient d'ARNm critique pour le développement du virus. Dans une optique multi-échelle, nous avons également modélisé l'ensemble du cycle infectieux du VR. Ces travaux constituent les bases d'une approche inédite de la pathogénie de ce virus.

A travers plusieurs approches expérimentales, ces travaux mettent en avant l'aspect complexe du virus de la rougeole et permettent d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques.

Discipline : Biosciences

Mots-clefs : Virus de la rougeole, Interféron de type I, Atténuation, Adaptation, Modélisation mathématique, Systèmes complexes

## **SUMMARY**

### **Measles Virus as a complex system: adaptation, attenuation and modelling**

Measles vaccines constitute powerful tools against this disease which is still responsible for half a million of deaths. In order to understand more precisely measles virus (MV) biology, we studied the adaptation of this virus to a cellular environment and developed a mathematical modelling of its life cycle.

The genetic analysis of a wild type strain, G954-PBL and of a Vero adapted strain, G954-V13 revealed only 5 coding mutations. These genetic differences induced a strong attenuation of G954 strain as shown by the infection of CD150 transgenic mice. The adaptation to a specific cellular context, during viral propagation, limits the replication of MV strains in other cell types except for the vaccine strains that are robust. In spite of the current dogma, type I IFNs do not play an important role in this attenuation.

In parallel, we developed two mathematical approaches to analyse viral cycle in order to improve our understanding of cell/virus interrelationships. At the molecular level, we propose a few hypotheses for the mechanism of viral polymerase and the establishment of mRNA gradient. In a multi scale approach, we modelled the entire life cycle of MV. This work constitutes the foundation of an original approach of this virus pathogeny.

The several experimental approaches we have used focus on the complexity of measles virus and will permit to investigate new therapeutical strategies.

Field: Biosciences

Keywords: Measles Virus, type I IFN, Attenuation, Adaptation, mathematical modelling, complex systems

# Introduction Bibliographique



***SYSTEMES COMPLEXES ET INFECTIOLOGIE***



Comme le dit le chat de Philippe Geluck, « au fond... la musique, si on la prend note par note, c'est assez nul. » Dans la logique des systèmes complexes, une infection virale est l'égal d'une symphonie... dont il reste à retranscrire la partition.

### *Qu'est ce qu'un système complexe ?*

Un système complexe est composé de grandes quantités d'éléments – ou agents<sup>1</sup> – qui interagissent simultanément. Des règles relativement simples régissent les interactions entre les différentes entités. De ces règles simples, *émergent* des propriétés souvent inattendues, imprévisibles sauf par simulation ; on parle alors de comportement émergent. Il n'y a pas d'organisation centrale même s'il existe des liens privilégiés entre agents. Il existe des boucles de rétroaction, chaque élément pouvant agir sur son propre devenir, il peut ainsi être considéré lui même comme un système complexe.

Parmi les propriétés des systèmes complexes, on note

- \* l'auto-organisation et l'émergence de propriétés ou de structures cohérentes
- \* une robustesse locale et une fragilité (ou contrôlabilité) à moyenne échelle : si un élément est affecté par un événement extérieur ses voisins le seront aussi mais modifier globalement le système (et donc potentiellement le contrôler) peut être fait grâce à une perturbation moins grande que dans un système sans liens.
- \* la connaissance d'une partie du système ne permet pas d'affirmer que le reste du système est en moyenne dans le même état.
- \* plusieurs comportements possibles sont en compétition, certains sont simples, d'autres chaotiques (désordonnés). Le système est souvent à la frontière entre les deux et alterne entre ces deux types de comportement.

---

<sup>1</sup> On définit par *agent*, une molécule, un ensemble de molécule que l'on fera interagir. Par la suite, on emploiera indifféremment acteur et agent.



\* plusieurs échelles temporelles et spatiales apparaissent, il y a ainsi une hiérarchie de structures. ([http://fr.wikipedia.org/wiki/Syst%C3%A8me\\_complexe](http://fr.wikipedia.org/wiki/Syst%C3%A8me_complexe) et <http://www.eurobios.com/>)

\*\*

Les maladies infectieuses représentent toujours une cause majeure de mortalité dans le monde (un décès sur quatre). Cette proportion est accrue dans les pays en développement et culmine chez les enfants, pour qui ces maladies sont la principale cause de mortalité (63%). Elles sont ainsi à l'origine de plus de 13 millions de décès annuels. Hormis le cas de l'infection par le virus d'immunodéficience humaine (VIH), la majorité de ces décès est imputable à un petit nombre de pathologies décrites depuis de nombreuses années : pneumonie, tuberculose, malaria, diarrhée, paludisme, rougeole (WHO, 1999).

Même si les avancées permises par la biologie moléculaire puis par les modèles animaux ont permis de mieux appréhender la pathogénie virale, il reste cependant de nombreux fossés à combler. Une infection virale commence à l'échelle de la cellule par l'entrée puis la multiplication de l'entité virale qui contamine ensuite les cellules avoisinantes. De proche en proche, l'organisme est infecté, parfois mortellement et contamine d'autres individus. Pour contrer cette infection, le système immunitaire met en place d'autres agents qui modifient les règles régissant le cycle infectieux. On est donc en présence d'un système multi échelle, à la fois dans le temps et l'espace. De nombreuses études ont mis en évidence certaines des règles d'interaction mais le passage d'une échelle à l'autre, malgré les études menées sur les animaux transgéniques, reste encore très flou.

Il va donc s'agir dans les années à venir d'avoir une vision de plus en plus intégrée des mécanismes d'infection virale et pour cela mieux définir les agents, les rela-

tions entre eux et développer des approches pluridisciplinaires permettant de mieux intégrer toutes les données obtenues.



## ***LE VIRUS DE LA ROUGEOLE***



La rougeole est la première cause de mortalité infantile malgré l'existence d'un vaccin (345 000 morts en 2005) (*figure 1*). Les vaccins anti-rougeoleux sont d'ailleurs les plus efficaces des vaccins commercialisés à l'heure actuelle, même si on ignore les fondements biologiques de cette réussite. On pense pouvoir utiliser les propriétés de cet agent infectieux pour lutter contre le SIDA et le cancer. Face à ces défis, la rougeole reste donc une pathologie de premier intérêt !

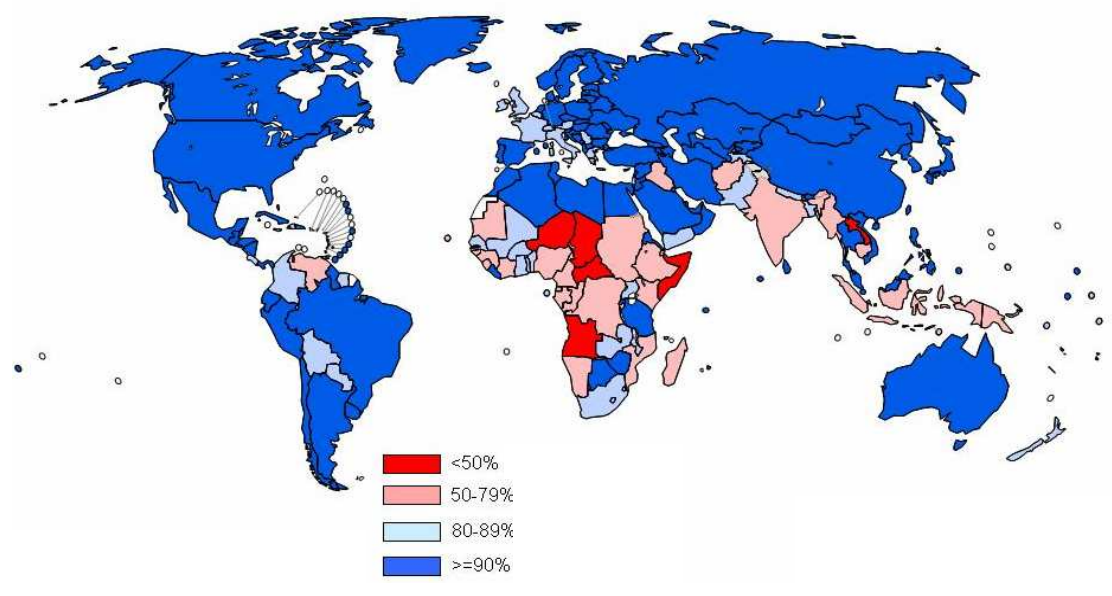
Le virus responsable de cette maladie (Virus de la Rougeole – VR) serait apparu il y a environ 5000 ans, avec la sédentarisation de l'homme, le développement des villes et du commerce, par dérive du virus de la peste bovine (Norby et al., 1985). En dépit du tropisme essentiellement restreint à l'homme, le VR a continué à se disséminer, preuve de son efficacité. En 1875, l'introduction de la rougeole dans les îles Fidji a été associée à un taux de mortalité de 26%. Des modélisations épidémiologiques ont montré que le taux de transmission (principalement par aérosols) de cette infection est très important : il faudrait plus de 95% de la population résistante afin de bouter ce virus (Griffin, 2006).

## **1. L'infection rougeoleuse**

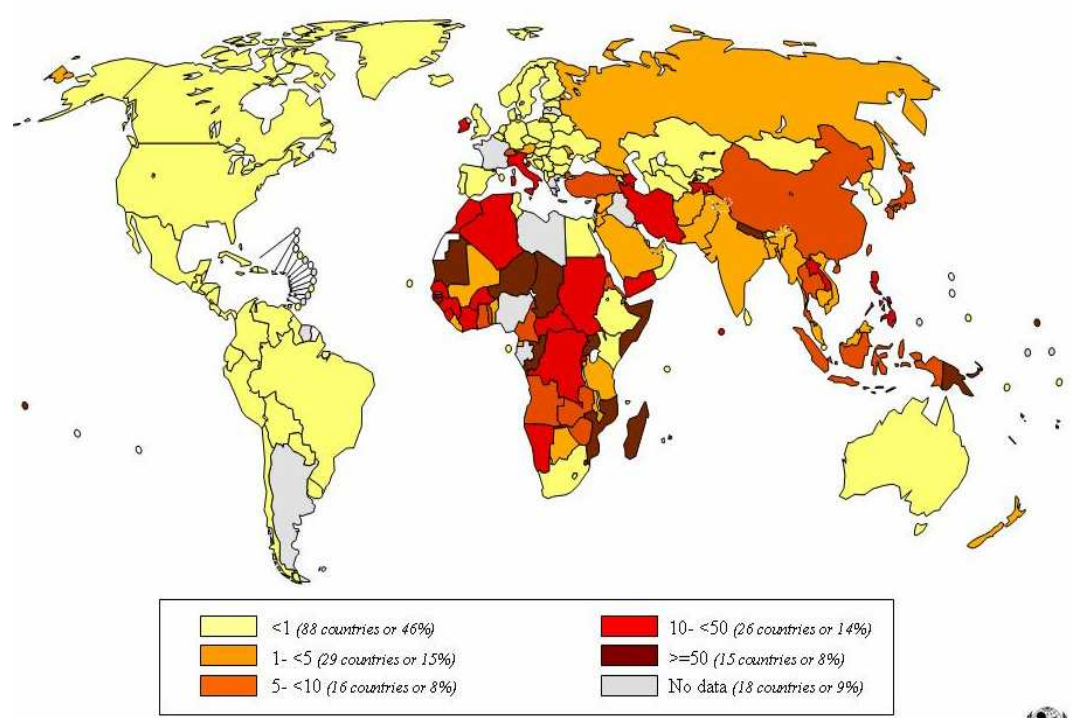
### **1.1 Physiopathologie de l'infection rougeoleuse**

L'infection rougeoleuse commence par une phase asymptomatique allant de 3-4 à une quinzaine de jours en fonction de la souche virale et de l'état de l'individu infecté. Les premiers symptômes sont peu caractéristiques (état fiévreux) et sont suivis de l'éruption cutanée permettant de diagnostiquer la maladie et qui marque le pic de l'infection (*figure 2*). Cette éruption cutanée coïncide avec l'apparition de la réponse immunitaire antivirale adaptative et le début de l'élimination du virus de l'organisme, mais également avec le développement d'une immunosuppression systémique profonde mais transitoire responsable de complications par surinfections opportunistes (Griffin, 2006).

A



B



C



**Figure 1 : La Rougeole dans le monde**

- A. La vaccination anti-rougeoleuse en 2006 (les pourcentages représentent le taux de protection de la population nationale)
- B. Nombre de cas de rougeole recensés en 2003 (les valeurs représentent le nombre de cas pour 100 000 individus)
- C. Deux enfants infectés par la rougeole

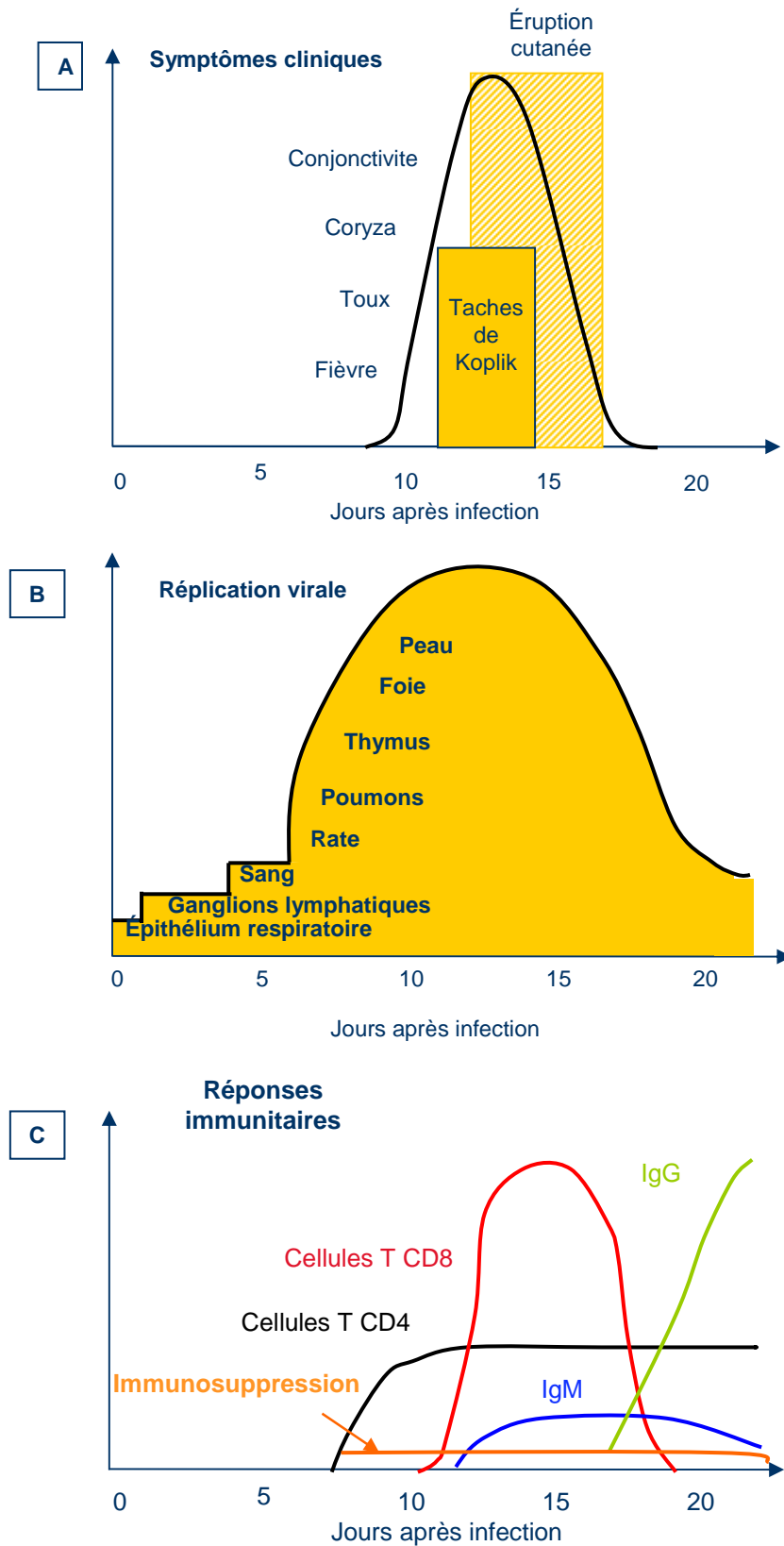
Cette immunosuppression est la cause majoritaire des décès qui font suite à une rougeole. Elle a été mise en évidence par les réponses négatives aux tests antituberculiniques réalisés sur des enfants rougeoleux. On observe son pendant chez les animaux de laboratoire. Elle se traduit par une déplétion des cellules immunitaires : il faut près de 15 jours pour que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> retrouvent une concentration plasmatique moyenne, 30 jours pour les lymphocytes CD4<sup>+</sup> et plus de 100 jours pour les lymphocytes B. L'invalidation du système immunitaire inné intervient également dans le phénomène immunosuppresseur (Griffin, 2006).

Outre le phénomène immunosuppresseur, la rougeole est associée à des troubles neurologiques. Trois types d'encéphalite rares, mais très graves, peuvent survenir : l'encéphalomyélite post-infectieuse (0,1% des cas, associée à une mortalité de 20 % environ), l'encéphalite à corps d'inclusion (en recrudescence puisqu'affectant les individus immunodéprimés) et la pan-encéphalite sclérosante subaiguë (1 cas sur 10 000 ou 100 000, associée à 100% de mortalité) (Schneider-Schaulies et al., 2003).

## 1.2 Isoler et produire le virus

Le VR a été isolé pour la première fois en 1954 par Enders et Peebles à la suite de l'inoculation de cultures primaires de cellules de rein humain avec le sang d'un enfant atteint de la rougeole : David Edmonston (Enders and Peebles, 1954). Depuis, on a privilégié différentes lignées cellulaires de rein de singe (Vero, CV-1) pour propager le virus. Une partie de l'isolat d'origine a également été adaptée sur des fibroblastes embryonnaires de poulet par passages successifs, afin de constituer une souche vaccinale atténuée (Katz et al., 1958). Plus tard, d'autres souches ont été adaptées sur le même principe à partir de la souche Edmonston (*figure 3*). Elles constituent aujourd'hui les principales souches utilisées pour la vaccination. Depuis les années 90, de nouveaux isolats viraux ont été réalisés et propagés principalement sur une lignée de lymphocytes B de singe Marmouset transformée par le Virus d'Epstein-Barr (B95-8 ou B95a) (Kobune et al., 1990) ou sur des cellules Vero transfectées pour exprimer un





**Figure 2 : Physiopathologie de l'infection par le VR**

A. Apparition des symptômes rougeoleux

B. Propagation virale dans l'organisme suite à l'infection par le VR

C. Développement de la réponse immunitaire suite à l'infection rougeoleuse.

(adapté de Griffin, 2006)

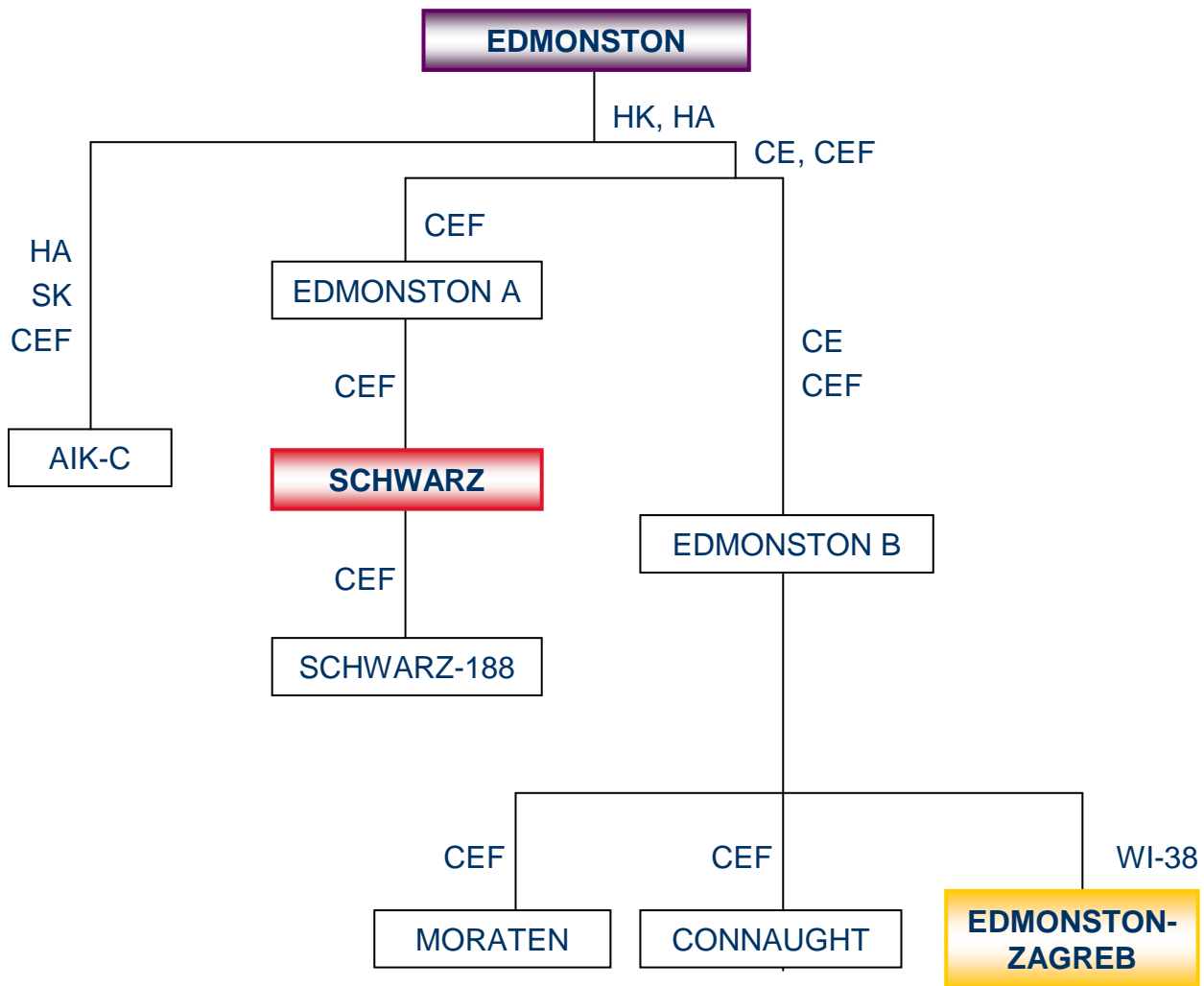
des récepteurs du VR, CD150 = SLAM (Signalling Lymphocytic Activation Molecule) (Ono et al., 2001).

### 1.3 Adapter le virus de la rougeole ?

Cette technique d'isolement de particules virales par « passage » sur un type cellulaire donné peut induire une adaptation du virus à ce nouvel environnement, des modifications d'autant plus importantes que le type cellulaire diffère du contexte cellulaire « classique » de l'infection. L'*histoire* d'une souche virale s'imprègne de ces différents passages.

Ainsi, on considère comme souche sauvage une souche généralement pathogène, en circulation (ou ayant circulé). On peut établir un suivi épidémiologique à l'échelle moléculaire et ainsi étudier l'évolution du VR à travers le temps et l'espace. De même, sont considérés comme sauvages des isolats propagés sur des cellules mononucléées humaines du sang périphérique (PBMC) ou éventuellement sur des cellules B95a (même si aucune étude n'a prouvé que cette technique n'induit aucune modification génétique).

Quant aux souches adaptées, ce sont les isolats qui ont été propagés sur tout type cellulaire (diverses lignées humaines ou animales) hormis PBMCs et B95a. Les souches utilisées dans les vaccins sont des souches adaptées par de très nombreux passages cellulaires, généralement à partir de l'isolat Edmonston et dont le phénotype s'est altéré au point qu'elles sont atténuées, c'est-à-dire non pathogènes. A l'instar des souches sauvages, l'infection qu'elles induisent entraîne une réponse immunitaire efficace et durable (Auwaerter et al., 1999). Les alignements génétiques réalisés entre les différentes souches vaccinales utilisées montrent une grande diversité (Parks et al., 2001b). Pourtant, on peut noter qu'à certaines positions, on retrouve les mêmes acides aminés, quelle que soit la souche vaccinale. Cependant, tous s'accordent à dire qu'il est difficile d'associer un phénotype à des particularités à l'échelle moléculaire. Par rapport aux souches sauvages, on notera que les souches vaccinales semblent être ro-



CE : cavité intra-amniotique d'embryon de poulet (chick embryo intra-amniotic cavity)

CEF : fibroblastes d'embryons de poulet (chick embryo fibroblast)

HA : amnion humain (human amnion)

HK : rein humain (human kidney)

WI-38 : lignée cellulaire diploïde humaine

SK : rein de mouton (Sheep Kidney)

**Figure 3 : Les principales souches vaccinales dérivées de la souche Edmonston utilisées pour la production de vaccins vivants anti-rougeoleux**

-bustes vis-à-vis du passage cellulaire : elles restent stables génétiquement (Borges et al., 2008).

#### 1.4 Variabilité génétique du virus de la rougeole

Le VR a longtemps été considéré comme un virus monotypique stable génétiquement. Néanmoins, l'analyse de séquences nucléotidiques de différentes souches sauvages a montré une certaine variabilité. En conséquence, les souches examinées ont été classées en huit clades (A à H) rassemblant au moins 22 génotypes. Cette classification est basée sur les 450 nucléotides de la séquence C-terminale du gène N et la région codante du gène H, ces deux régions ayant été montrées comme les plus variables. Actuellement, différents génotypes du VR circulent dans le monde (Rima et al., 1995). De plus, compte tenu de la fiabilité de la polymérase (cf ci après), au sein d'une même suspension virale ou d'un organisme/tissu infecté, il faut considérer une population hétérogène de virions. Cependant, les mutations différenciant ces sous populations n'affectent pas l'appartenance à un clade précis. En revanche, on désigne par le terme de quasi-espèces l'ensemble de ces souches (Schrag et al., 1999).

#### 1.5 Politique(s) de vaccination

Contre la rougeole, on dispose d'une dizaine de vaccins vivants atténués. Ils contiennent des virus ayant une pathogénicité réduite et qui sont administrés à de faibles titres infectieux. Ils sont capables de se multiplier chez l'hôte et d'induire une réponse immunitaire comparable à l'infection naturelle sans manifestations cliniques. Leur très grande efficacité s'accompagne de contraintes (logistiques) plus ou moins importantes en particulier leur grande instabilité biochimique (virus vivant) qui impose un strict respect de la chaîne du froid ce qui est fréquemment difficile dans les pays en développement. La vaccination contre le VR est généralement déconseillée chez les femmes enceintes et les personnes immunodéprimées chez lesquelles le faible pouvoir pathogène des souches vaccinales peut avoir des conséquences graves. L'OMS insiste

Ordre MONONEGARIVALES			
Famille	Sous-Famille	Genre	Membres (exemples)
Rhabdoviridae			Virus de la rage
Filoviridae			Virus Ebola
Bornaviridae			BDV
Paramyxoviridae	Pneumovirinae	Pneumovirus	VRS
		Metapneumovirus	hMPV
	Paramyxovirinae	Respirovirus	Virus de Sendai
		Rubulavirus	Virus des oreillons
		Henipavirus	Virus Nipah
		Morbillivirus	Virus de la rougeole
			CDV
			PPRV
			RPV

**Figure 4 : Classification des virus de l'ordre des Mononegavirales**

BDV : Virus de la maladie de Borna, VRS : Virus Respiratoire Syncytial ; hMPV : Metapneumovirus humain ; CDV : virus de la maladie de Carré ; PPRV : Virus de la peste des petits ruminants ; RPV : virus de la peste bovine

donc sur les efforts requis pour mettre au point des politiques de vaccination plus efficaces. Par exemple, on notera des essais de vaccination par voie transcutanée au cours desquels, il y a activation du système immunitaire (LT CD8+ majoritairement) même si on ne détecte pas d'anticorps (Etchart et al., 2007).

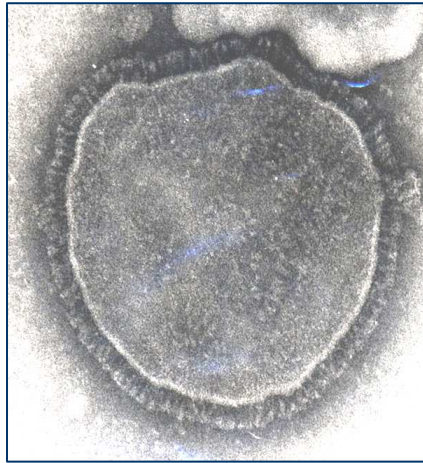
Les souches contenues dans les suspensions vaccinales sont les mêmes que celles établies il y a plus de 40 ans (*figure 3*). Leur production est réalisée exactement de la même façon qu'en laboratoire, mais à très grande échelle.

## 1.6 Etat actuel et avancées thérapeutiques

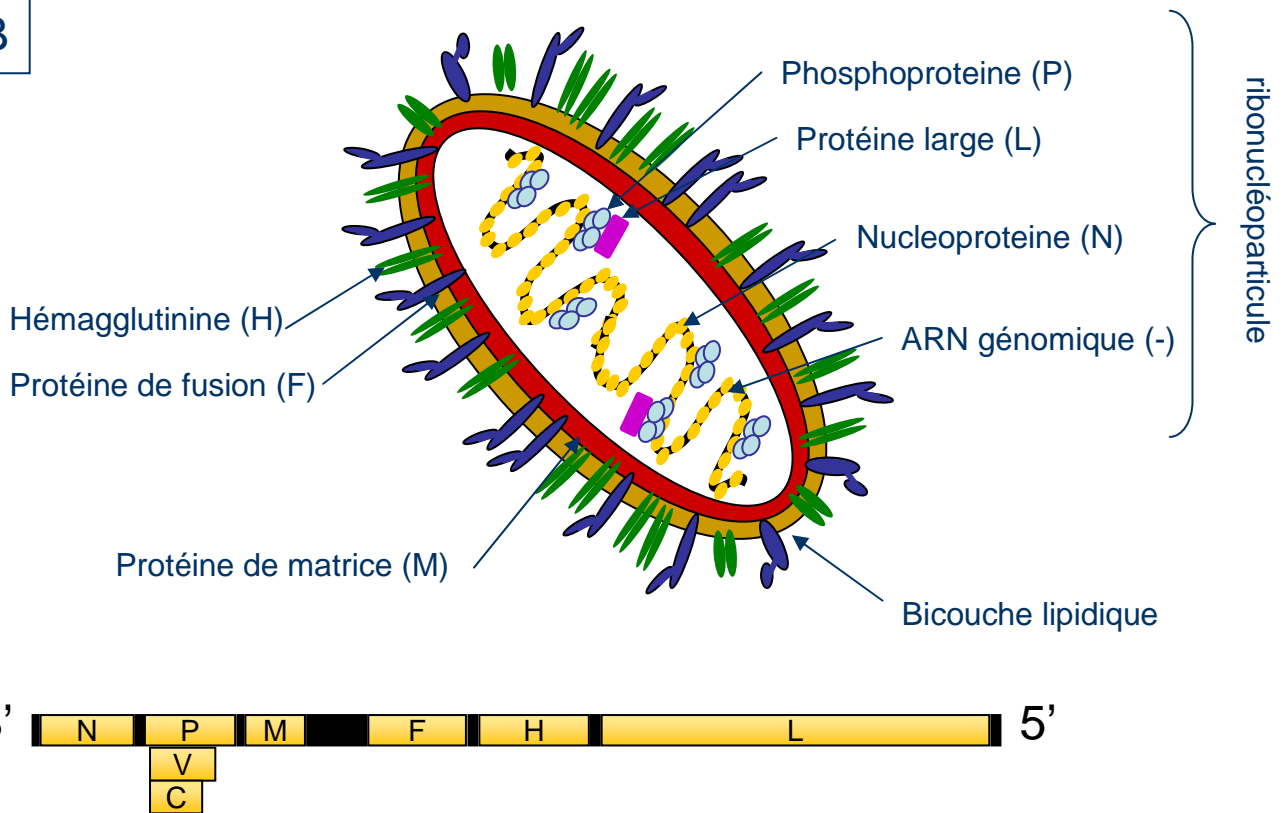
L'accès aux vaccins reste aujourd'hui inégal : dans les pays du Sud économique, du fait de l'insuffisance de la couverture vaccinale et des mauvaises conditions d'hygiène, la rougeole demeure un problème de santé publique majeur. Dans les pays occidentaux, l'infection par le virus de la rougeole n'est pas mortelle, même si quelques rares cas de complications neurologiques sont observés (Panencéphalite Sclérose subaiguë, SSPE) et que l'impact socio-économique est indéniable. Si des foyers épidémiques peuvent être à nouveau observés dans quelques pays du nord de l'Europe, la cause essentielle en est une baisse du taux de couverture suite à une défiance grandissante des opinions publiques vis-à-vis des vaccins, sans fondement en ce qui concerne la rougeole. Très récemment, une dizaine de cas de rougeole ont ainsi été recensés à Reims.

Compte tenu de l'efficacité de ce vaccin, le VR constitue un modèle d'étude de prime intérêt, et notamment un modèle pour l'étude des virus de l'ordre des *Mononegavirales* auquel il appartient, et auquel appartiennent également d'importants pathogènes humains comme les virus parainfluenza, le virus des oreillons, le virus respiratoire syncytial ou des fièvres hémorragiques réémergentes comme Ebola, ou des virus P4 tels que Nipah ou Hendra (*figure 4*).

A



B



### Figure 5 : Le Virus de la Rougeole

**A.** Observation d'une particule du VR en microscopie électronique à transmission  
Cliché obtenu sur le site du Dr Rozenblatt de l'université de Tel Aviv.

<http://www.tau.ac.il/lifesci/departments/biotech/members/rozenblatt/rozenblatt.html>

**B.** Représentation schématique de la particule virale du VR

L'ARN génomique, encapsidé par la nucléoprotéine N, forme avec la phosphoprotéine P et la protéine large L, la ribonucléoparticule. La protéine de matrice M se situe sous la membrane virale qui se compose d'une bicouche lipidique dans laquelle sont enchâssées les deux glycoprotéines d'enveloppe : l'hémagglutinine H et la protéine de fusion F. L'organisation du génome est représentée en-dessous

### *Pourquoi le virus de la rougeole ?*

Les intérêts liés à l'étude du VR sont donc multiples. Le paradoxe immunologique dont il est l'acteur a déjà beaucoup fait couler d'encre et initié quelques brevets : autant l'immunosuppression qu'il induit que la forte réponse immunitaire sont des phénomènes à comprendre et maîtriser afin de les appliquer à des situations pathologiques connues. En particulier, le fait que les vaccins anti-rougeoleux actuels soient à ce point efficace alors qu'on ignore ce qui les différencie d'autres vaccins est un enjeu majeur à relever. De plus, l'effet cytopathique caractéristique de l'infection rougeoleuse pourrait s'avérer un outil de premier ordre dans les thérapies anti-tumorales.

## **2. Description moléculaire du Virus de la Rougeole**

### **2.1 Généralités et Classification**

Le Virus de la Rougeole est un virus à ARN simple brin de polarité négative (Mononegavirales). Il appartient à la famille des *Paramyxoviridae*, sous-famille des *Paramyxovirinae*, genre *Morbillivirus* (*figure 4*). C'est un virus enveloppé pléiomorphe dont le diamètre (à l'état de particule virale) est compris entre 150 et 350 nm (Lund et al., 1984). Le génome viral est non segmenté et compte 15 894 nucléotides. De manière commune aux autres membres de son genre, le génome du VR s'organise comme suit, de 3' en 5' : la séquence leader, les cadres ouverts de lecture des 6 gènes, nucléoprotéine N, phosphoprotéine P, protéine de matrice M, protéine de fusion F, hémagglutinine H, protéine large L, la séquence trailer.

### **2.2 Description**

Le génome du VR est un ARN complexé avec 2649 protéines N pour former la nucléocapside, une structure hélicoïdale relativement souple mesurant 1,25 µm environ de long pour un diamètre externe de 18 nm. (Bhella et al., 2004, Longhi, 2003 #5587). Chaque particule virale contiendrait selon les analyses structurales au moins 2 nucléocapsides (Rager et al., 2002). Le long de cette structure, environ 300 protéines P



se fixent aux protéines N. Ces protéines servent d'ancrage à la protéine « large » L (entre 20 et 50 par nucléocapside) garante de l'activité ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp). L'ensemble ARN-N/P/L constitue le complexe transcriptionnellement actif appelé ribonucléoparticule (RNP). Une enveloppe lipidique (provenant de la cellule hôte) entoure l'ensemble. Elle est tapissée sur sa face interne par la protéine de matrice M. Deux types de glycoprotéines de surface sont enchâssées dans l'enveloppe : l'hémagglutinine H et la protéine de fusion F respectivement impliquées dans l'attachement à la cellule via des récepteurs spécifiques et la fusion des bicouches lipidiques (*figure 5*). Au cours de l'infection virale, 3 protéines non structurales (c'est-à-dire théoriquement non incorporées dans les particules) sont également produites à partir du gène P : les protéines V, C et R.

*On se propose de détailler le virus comme si on épluchait la particule virale...*

## 2.3 Composants de la particule virale

### *a) Les glycoprotéines d'enveloppe : l'hémagglutinine H*

L'hémagglutinine H est la protéine virale permettant la liaison de la particule avec différentes protéines membranaires (TLR2 (Bieback et al., 2002), CD46 (Naniche et al., 1993) et CD150 (Tatsuo et al., 2000)). C'est un partenaire indispensable de la protéine F lors du processus de fusion de la particule virale. Les deux fonctions, liaison au récepteur et cofacteur de la fusion, sont indépendantes (Wild and Buckland, 1995). Comme on le verra plus tard, la protéine H intervient également dans le phénomène de *downregulation*<sup>2</sup> des récepteurs du VR.

C'est une glycoprotéine membranaire de type II de 617 aa (78kDa). Au sein de la cellule infectée, on retrouve dès le reticulum des dimères de protéines H, via des ponts disulfure établis via les cystéines C154 et C139 (Blain et al., 1995). La H

---

<sup>2</sup> Régulation négative de l'expression du récepteur : son expression en surface diminue. Plusieurs mécanismes peuvent être mis en jeu. Aucun n'est précisé dans le cas du VR.

s'organise également sous forme de tétramères. La H du VR ne possède pas d'activité neuraminidase (fixation et clivage des acides sialiques), pourtant présente chez d'autres *Paramyxoviridae* (Langedijk et al., 1997).

Le processus d'oligomérisation des monomères de H ainsi que leur glycosylation sont des événements indispensables au transport de la protéine à la surface cellulaire durant l'infection (Hu et al., 1994; Plemper et al., 2000; Wild and Buckland, 1995). Au sein de cellules épithéliales polarisées, la protéine H est transportée vers les deux membranes, apicale et basolatérale, c'est la co-expression avec M qui redirigerait H vers la surface apicale (Naim et al., 2000; Runkler et al., 2008).

### *b) Les glycoprotéines d'enveloppe : la protéine de fusion F*

La protéine de fusion F est la protéine virale en charge de la fusion des bicouches lipidiques virale et cellulaire. C'est une glycoprotéine de type I de 550 aa. Elle est enchâssée dans l'enveloppe lipidique virale, à l'état de trimères. Elle est synthétisée dans le reticulum endoplasmique sous la forme d'un précurseur F<sub>0</sub> de 60kDa qui est clivé par des protéases cellulaires au cours de sa maturation en deux sous-unités reliées par un pont disulfure F1 (40kDa) et F2 (20kDa).

La sous-unité F1 contient en N terminal le peptide de fusion très hydrophobe, exposé lors du clivage du précurseur. Elle serait stabilisée par la région F2. L'évènement qui déclenche le processus de fusion n'est pas connu. Le VR fusionne à pH neutre, la liaison de H avec le récepteur fournit l'énergie qui abaisse la barrière thermodynamique permettant le changement de conformation de F et l'amorçage de la fusion (Gerlier et al., 1988 ; Lamb and Takeda, 2001).

Le domaine cytoplasmique de la protéine F, long de 33 aa, est fréquemment altéré dans les virus associés à des infections persistantes (Billeter et al., 1984 ; Cattaneo et al., 1989 ; Schmid et al., 1992). Ces modifications interfèrent avec l'assemblage de l'enveloppe et le bourgeonnement, et augmentent la fusion cellule-cellule (Cathomen et al., 1998 ; Cattaneo et al., 1989), suggérant un rôle du domaine cytoplasmique de la

protéine F dans la régulation de son activité fusogénique. L'interaction entre les protéines F et H est modulée par leurs domaines cytoplasmiques et agirait sur l'efficacité des phénomènes de fusion cellule/cellule (Plempner et al., 2001 ; Plempner et al., 2002; Wild et al., 1991 ).

L'ARNm codant pour F contient une zone riche en GC longue d'environ 500 nucléotides dans la région 5' non traduite. Il y est prédit de nombreuses structures secondaires qui pourraient influencer le choix du codon initiateur (Cathomen et al., 1995).

### c) *La protéine de matrice M*

L'enveloppe lipidique virale est tapissée par la protéine M. C'est une protéine basique de 335 aa (37 kDa), très conservée parmi les *Paramyxoviridae*. Exprimée seule, elle est soluble et diffuse dans le cytoplasme avant de s'accumuler sous la membrane plasmique (Naim et al., 2000 ; Riedl et al., 2002). Elle servirait de lien entre les glycoprotéines d'enveloppe du virus et les RNP pour participer à l'assemblage des virions.

Elle interagit avec la queue cytoplasmique de F (Cathomen et al., 1998; Spielhofer et al., 1998). Aucun domaine de liaison à H n'a été identifié mais l'hémagglutinine pourrait rejoindre les plateformes d'assemblage du virus par le biais de son association avec F (Manie et al., 2000). D'autre part, chez les Respiravirus, il y a interaction entre la M et Ntail (un domaine de la protéine N) (Coronel et al., 2001) et ce phénomène pourrait être généralisé à tous les *Paramyxoviridae*. Cette liaison à la RNP inhibe la transcription et pourrait être un mécanisme de contrôle du cycle réplcatif.

M contrôle également le processus de fusion intercellulaire viro-induite (cf. ci après) puisque sa délétion augmente la formation des syncytia mais diminue la production de particules infectieuses (Reuter et al., 2006). Ainsi, les virus associés à des infections persistantes produisant peu ou pas de virions (SSPE par exemple) possèdent

des protéines M où se sont accumulées de nombreuses mutations ((Hirano et al., 1993). On notera que les transcrits codant pour M contiennent une séquence non codante d'environ 400 nucléotides à l'extrémité 3' et de fonction inconnue.

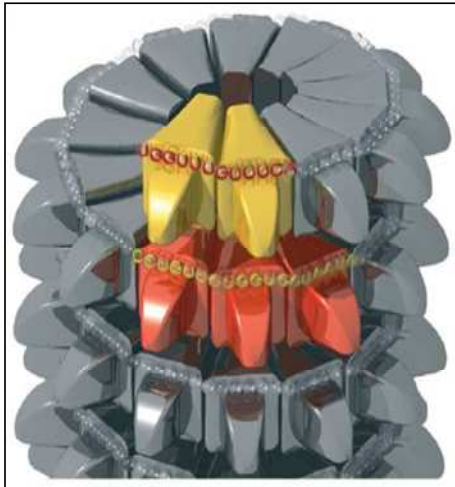
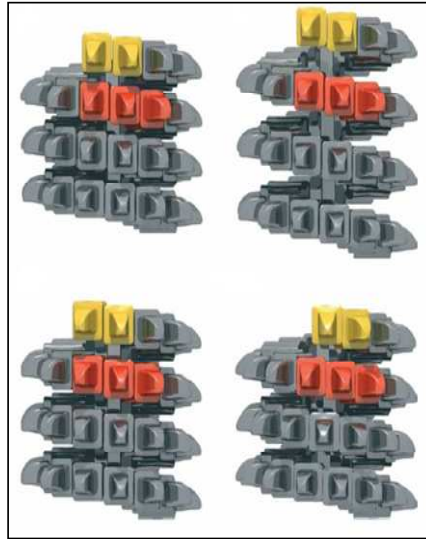
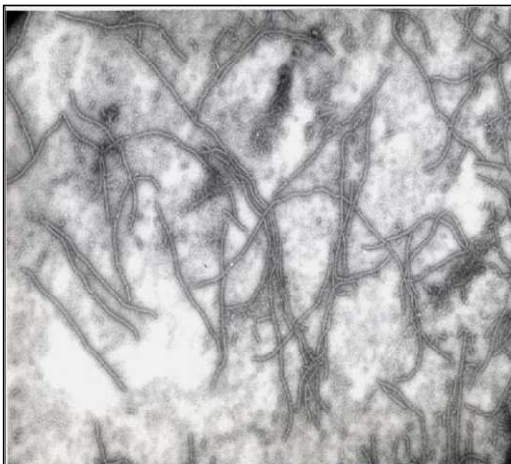
#### *d) La nucléoprotéine N*

La nucléoprotéine N, d'une taille de 550 aa, est la protéine la plus abondante dans les cellules infectées. Bien qu'elle ne possède pas de motif canonique de liaison à l'ARN, elle peut s'associer spontanément avec les acides nucléiques cellulaires. A l'heure actuelle, N n'a pas encore pu être isolée sous forme monomérique ( $N_0$ ) et on suppose que  $N^0$  est très instable. Son association avec P, des acides nucléiques ou son oligomérisation la stabilise (Huber et al., 1991). La N sous une conformation immature se dirigerait spontanément vers le noyau (Gombart et al., 1993).

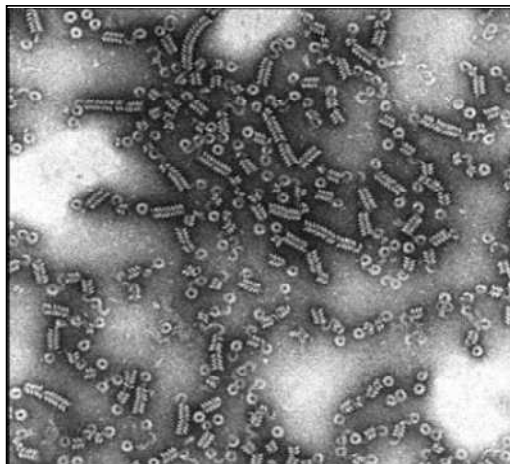
La nucléocapside (ARN génomique + protéines N) peut adopter des états morphologiques (souvent hélicoïdaux) plus ou moins compacts qui correspondent probablement à des formes transcriptionnelles et /ou répliquatives plus ou moins actives, le diamètre de l'hélice jouant sur le rapprochement des éléments promoteurs et sur leur reconnaissance par la RdRp (Bhella et al., 2004) (*figure 6*).

On distingue deux grands domaines dans la protéine N : une partie N terminale, Ncore (aa 1 à 400), capable de s'homopolymériser et de se lier à l'ARN (Karlin et al., 2002a; Lamb and Takeda, 2001 ) et une partie C-terminale, Ntail (aa 401 à 525) exposé sur la partie externe de la nucléocapside et intrinsèquement désordonné c'est-à-dire qu'en l'absence de partenaire, ce domaine ne possède pas d'organisation tridimensionnelle stable dans des conditions physiologiques de pH et de salinité (Bourhis et al., 2005 ; Karlin et al., 2002a) .

N se lie à P via Ncore dans le complexe  $N^oP$  (l'association de P avec N, qui permet de la stabiliser et de la séquestrer dans le cytoplasme) tandis que la liaison de Ntail et P au sein de la RNP serait le moteur permettant à la RdRp de progresser le long de la nucléocapside. N interagit également avec le facteur de transcription IRF3,

**A****B****C**

(x 45 000)

**D**

(x 150 000)

**Figure 6 : Modèle structural et états morphologiques des nucléocapsides viraux et recombinants**

A. Modèle structural de la N du VR faisant apparaître l'ARN viral ainsi que le domaine Ncore « globulaire ».

B. Différents états conformationnels pouvant être adoptés par les nucléocapsides du VR, jouant sur le rapprochement du promoteur génomique (jaune) et du promoteur du gène de la N (rouge) (modèles issus de Bhella et al. 2004)

C et D Photographies de nucléocapsides du VR en microscopie électronique à transmission. Nucléocapsides purifiées C) à partir de cellules Vero infectées par le VR et D) à partir de cellules d'insectes infectées par un baculovirus recombinant exprimant la N du VR (photographies fournies par TF Wild)

la protéine chaperonne Hsp72 et eIF3-p40 (Sato et al., 2007 ; tenOever et al., 2002 ; Zhang et al., 2005).

Enfin, N est impliquée dans certains mécanismes induisant une immunosuppression à l'échelle cellulaire. Elle est capable de se fixer aux récepteurs inhibiteurs de faible affinité pour les IgG RFcgII des lymphocytes B et d'empêcher *in vitro* la synthèse d'anticorps (Ravanel et al., 1997). Un autre récepteur, NR, a également été découvert mais pas encore caractérisé précisément (Laine et al., 2003).

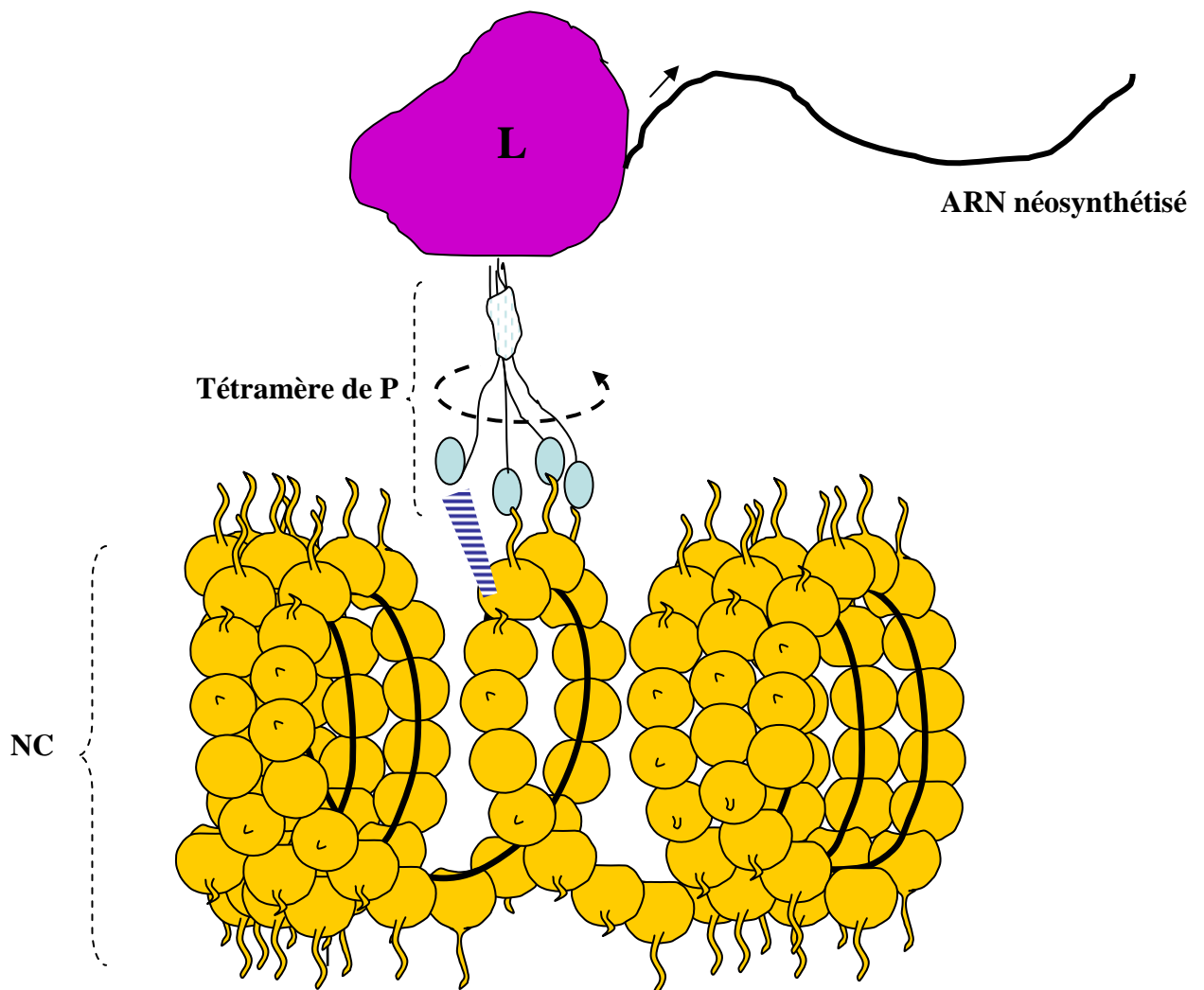
### *e) La protéine large L*

La protéine L est une protéine de taille importante (2183 aa). Elle partage avec les ARN polymérase d'autres virus à brin négatif, le motif caractéristique Gly-Asp-Asn-Gln. C'est d'ailleurs la protéine la plus conservée entre Morbillivirus.

Au cours de la synthèse d'ARN, c'est la protéine L qui assume l'activité enzymatique ; par contre, elle est non fonctionnelle hors du complexe enzymatique N-P-L. C'est une ARN-polymérase ARN-dépendante travaillant sous forme de dimère/d'oligomères (Smallwood et al., 2002) (pour le virus Sendai (Cevik et al., 2003; Cevik et al., 2007)). Exprimée seule, elle est rapidement dégradée mais est fortement stabilisée par son interaction avec P (au niveau des 408 acides aminés N terminaux (Horikami et al., 1994)).

En l'absence de données précises et en comparaison avec la structure d'autres polymérase virales (HCV – virus de l'hépatite C, rhinovirus), la forme générale de la L du VR est supposée être la forme commune à toutes les ARN polymérase : en main droite. La liaison ARN/L est suffisamment lâche pour permettre un processus de "bégalement" lors de l'édition ou de la polyadénylation des messagers mais suffisamment forte pour conférer à la polymérase une très forte processivité.

Enfin, des analyses bioinformatiques prédisaient un domaine 2'-O-ribose méthyltransferase dans la région N Terminale de la protéine L, responsable du capping



### **Figure 7 : Modèle de progression de la RdRp sur la nucléocapside**

La RdRp L progresserait le long de sa matrice grâce à la rotation du tétramère de P qui la relie à la nucléocapside (NC). La torsion créée par la liaison simultanée de 3 P aux Ntail pourrait fournir l'énergie nécessaire au décrochement de la 4ème phosphoprotéine, celle-ci se raccrochant alors en 5' des précédentes par rapport au génome. Un effet du brin naissant pourrait empêcher la L de reculer sur la nucléocapside, favorisant une progression unidirectionnelle lorsqu'il y a synthèse d'ARN. La nucléocapside subit probablement des changements morphologiques lorsqu'elle est transcriptionnellement active mais elle a été ouverte ici seulement pour des raisons de clarté.

des ARN (Ferron et al., 2002). Il a été montré que c'est effectivement le cas pour la L du virus Sendai (Ogino et al., 2005).

### *f) La phosphoprotéine P*

La phosphoprotéine est une protéine modulaire de 507 aa.

La P s'organise sous la forme d'homotétramères via des interactions au niveau du domaine C-terminal (PCT). C'est aussi au niveau de ce domaine que se trouvent les régions de liaisons à Ntail (un des domaines de N) et à la protéine L (Karlin et al., 2002b). La protéine P s'associe à la N via leurs domaines respectifs PNT (domaine N-terminal de P, intrinsèquement désordonné) et Ncore. C'est cette association qui permet à la N de rester monomérique, disponible pour la réplication (Curran et al., 1995).

Compte tenu des interactions possibles, on a montré que la protéine P intervient à de multiples étapes de la transcription et de la réplication du virus : elle stabilise la protéine L (Curran et al., 1995 ; Horikami et al., 1994), elle sert de lien entre L et N, permettant la progression du complexe enzymatique sur la nucléocapside, elle prévient l'encapsidation aspécifique de l'ARN de la cellule hôte en maintenant la N sous une forme soluble. P pourrait également participer au contrôle des mécanismes apoptotiques de la cellule (via le transactivateur p53, (Chen et al., 2005)).

Selon le modèle actuel de structure et déplacement de la polymérase, trois P assureraient la liaison avec les queues C-terminales de trois N associées à l'ARN viral, la dernière phosphoprotéine étant libre. Lors de la progression de la polymérase, liée à la polymérisation du brin d'ARN naissant, le complexe entre L et le tétramère de P avancerait en pivotant sur 3 de ses 4 « jambes », la « jambe » libre créant une liaison P-N pendant qu'une des trois « jambes » liées se décroche. Le brin naissant empêcherait enfin la polymérase de reculer sur sa matrice, rendant la progression unidirectionnelle lorsqu'il y a synthèse d'ARN (Curran, 1998) (*figure 7*).



### *g) Les protéines non-structurales*

Comme pour l'ensemble des *Paramyxoviridae*, le gène P des Morbillivirus code pour la protéine P mais également pour plusieurs autres protéines produites dans les cellules infectées mais (théoriquement) absentes des virions. Ces protéines sont dites « non structurales ». Le gène P code principalement pour 2 protéines non structurales : les protéines V et C (Griffin, 2006). Une troisième protéine codée par le gène P a été décrite, la protéine R, mais n'a pas été étudiée depuis son identification (Liston and Briedis, 1995).

#### *La protéine V*

La protéine V est une protéine de 299 aa. Au cours de la transcription du gène P, la polymérase, par un phénomène de « bégaiement » insère en position 751 une guanosine (G) supplémentaire (à la suite de trois autres G). Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait qu'en certaines régions du génome, des particularités (structurales) de la matrice ou du brin naissant induisent une pause de l'enzyme. Dans ce cas, elle pourrait glisser en arrière. On pense que moins le complexe est stable, plus il y a de chance que l'enzyme glisse (Hausmann et al., 1999) Ce phénomène n'a lieu que dans 40% des cas.

De fait, elle partage ses 231 aa N terminaux avec P (domaine PNT). Les 68 aa C terminaux sont propres à V et contiennent un domaine à doigt de zinc (liaison aux acides nucléiques).

L'un des rôles de la protéine V serait de contrôler la mise en place de la réponse interféron (cf. ci après). Malgré cela, des études ont montré qu'elle n'était pas requise pour la propagation du virus *in vitro* (Baron and Barrett, 2000; Delenda et al., 1998; Kato et al., 1997; Schneider et al., 1997; Skiadopoulos et al., 1999). Son absence limiterait la pathogénicité du virus *in vivo* (Patterson et al., 2000; Tober et al., 1998 ; Val-samakakis et al., 1998 ). Le fait que V puisse inhiber la réplication a été avancé pour expliquer ces résultats (Witko et al., 2006), d'autant que des virus recombinants défi-

cients pour la protéine V produisent des niveaux d'ARN génomique, d'ARNm et de protéines virales supérieurs à la normale au cours de l'infection *in vitro* (Baron and Barrett, 2000; Tober et al., 1998). Le mécanisme par lequel V agit sur l'expression génique et la réplication n'est pas connu, cependant le fait que la protéine V puisse se lier aux protéines virales N et L (via le domaine PNT), mais également à l'ARN via son domaine à doigt de Zinc suggère que ces interactions soient importantes (Curran and Kolakofsky, 1991; Horikami et al., 1996; Parks et al., 2006; Sweetman et al., 2001).

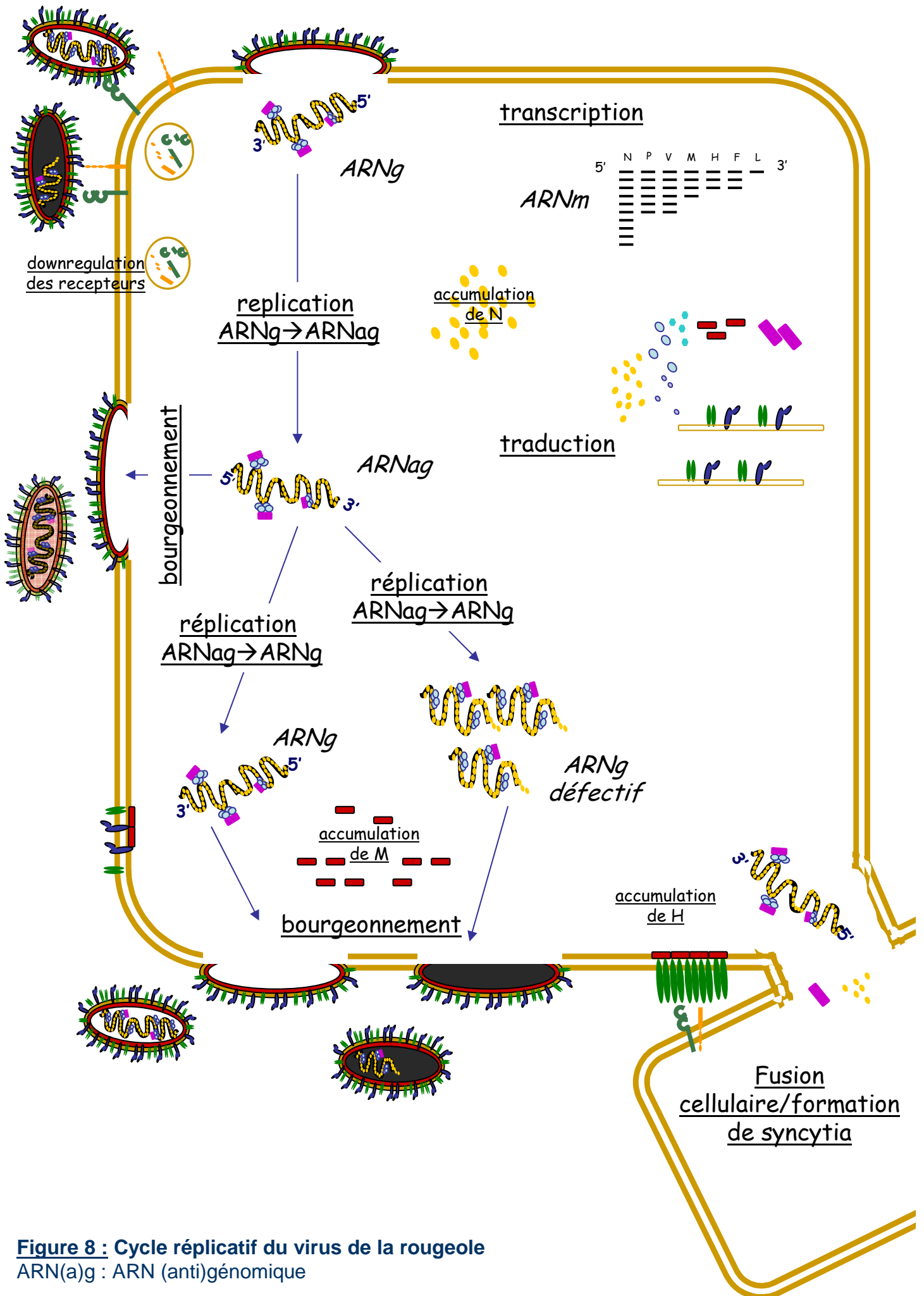
### *La protéine C*

La protéine C est une petite protéine de forte charge positive composée de 186 aa. Elle est codée par l'ARNm de P à partir d'un codon initiateur situé 19 nucléotides en aval de celui utilisé pour produire P et V (Bellini et al., 1985 ; Liston and Briedis, 1995).

A l'instar de V, l'un des rôles de C serait de réprimer la réponse IFN (Shaffer et al., 2003 ; Yokota et al., 2003). Elle serait également capable de réguler les activités de la RdRp (Reutter et al., 2001). Cependant, des virus recombinants, dépourvus de C se répliquent convenablement *in vitro* dans certains types cellulaires (Escoffier et al., 1999; Patterson et al., 2000; Radecke and Billeter, 1996; Shaffer et al., 2003; Takeuchi et al., 2005). *In vivo*, par contre, les virus C<sup>-</sup> sont moins pathogènes suite, vraisemblablement à une moindre croissance (Patterson et al., 2000; Takeuchi et al., 2005; Valsamakis et al., 1998).

### *h) Le génome viral*

Le génome du virus de la rougeole est constitué par une molécule d'ARN unique. Long de 15 894 nucléotides, il sert de matrice pour produire les ARN messagers codant pour chacune des protéines virales. Au cours de la réplication, il y a production



**Figure 8 : Cycle réplcatif du virus de la rougeole**  
 ARN(a)g : ARN (anti)génomique

d'un intermédiaire : l'antigénome, de séquence complémentaire et encapsidé. Cet antigénome est, ensuite, transcrit en génome.

Le génome du VR peut être considéré comme la succession de 6 unités transcriptionnelles (les différents gènes N, P, M, F, H et L) qui possèdent une structure commune, flanquées par deux séquences non traduites mais transcrites, (leader (55nt) et trailer (40 nt)). Au sein de chaque gène, on distingue une séquence GS (gene start) longue d'une dizaine de nucléotides et une séquence GE (gene end). Chaque unité est séparée de la précédente par une courte séquence intergénique (GAA ou GCA) (Griffin, 2006).

Les premiers résidus des séquences GS donnent le signal de mise en place de la coiffe à la polymérase virale et participent à la stimulation du processus d'élongation lors de la synthèse de l'ARN. Les derniers nucléotides en 5' des gènes des *Paramyxovirus* doivent assurer la polyadénylation/terminaison lors de la synthèse des ARNm. Tous les éléments GE des *Mononegavirales* se terminent par une séquence poly U (au minimum 4) sur laquelle la polymérase doit bégayer selon un mécanisme analogue à celui de l'édition du gène P afin d'assurer la polyadénylation (Griffin, 2006).

*...les agents sont mis en place, passons au scénario...*

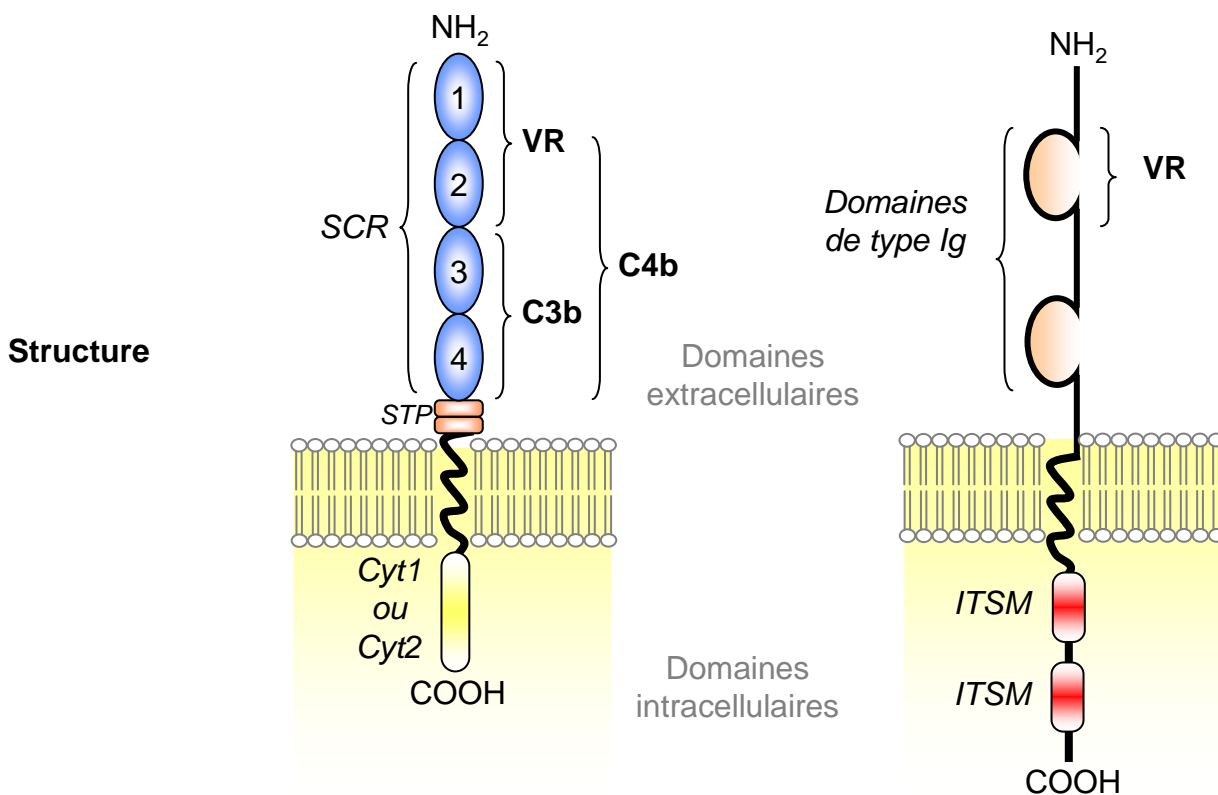
## 2.4 Le cycle viral

L'infection rougeoleuse passe par une étape de multiplication virale au sein des cellules de l'hôte infecté, comme toute infection virale. On distingue différentes étapes de ce cycle : l'attachement du virus via un récepteur spécifique, la fusion des enveloppes lipidiques, la transcription du génome viral en ARN messagers, traduits ensuite en protéines virales, la réplication de la matrice ARN génomique négative en ARN antigénomique complémentaire positif, « l'anti-réplication » de la matrice ARN antigénomique en ARN génomique, l'encapsidation de tout le matériel viral avant bourgeonnement à la surface membranaire (*figure 8*). Ces étapes sont plus ou moins interdé

## CD46

## SLAM (CD150)

<b>Expression Tissulaire</b>	Ubiquitaire (toutes les cellules nucléées)	Lymphocytes T et B, cellules dendritiques et macrophages/monocytes activés
<b>Ligands physiologiques</b>	Fragments C3b et C4b du complément	Interaction homotypique SLAM/SLAM
<b>Récepteur pour les pathogènes</b>	VR, Virus Herpes humain 6, adénovirus du groupe B et D, <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Neisseria</i>	VR, CDV, RPV
<b>Isoformes</b>	4 principales qui diffèrent par le nombre de régions STP et la partie intracytoplasmique	Membranaire, membranaire tronqué, soluble et cytoplasmique



**Figure 9 : Récepteurs cellulaires identifiés pour le VR**

(SCR : Short Consensus Repeat, STP : région riche en sérine, thréonine et proline, Cyt : queue cytoplasmique, ITSM : Immuno-Tyrosine based Switch Motif)

pendantes (la réplication est réalisée principalement par des polymérase virales néo synthétisées, par exemple). En outre, chaque étape est critique pour contrôler la pathogénicité d'une souche virale (Griffin, 2006) .

#### *a) L'entrée dans la cellule*

On considère souvent cette étape du cycle comme celle déterminant la pathogénicité du virus : s'il ne rentre pas, il ne peut pas infecter les cellules... La protéine H peut se lier à plusieurs protéines cellulaires mais seuls CD46 et CD150 ont été irrévocablement démontrés comme récepteurs (*figure 9*) (Yanagi et al., 2006a). Récemment, il a été montré que DC-SIGN permettait la fixation du VR à la surface des cellules dendritiques, initiant ainsi l'infection des lymphocytes au voisinage, sans production de virion (de Witte et al., 2006; de Witte et al., 2008).

L'utilisation de CD46 a été la première mise en évidence. C'est une molécule exprimée à la surface de toutes les cellules nucléées humaines, elle appartient à la famille des régulateurs de l'activité du complément. (Dorig et al., 1993 ; Nanche et al., 1993). Depuis, on a démontré son rôle de récepteur pour de nombreux autres pathogènes (Fleischli et al., 2007).

Dans le cas du VR, il s'avère que CD46 n'est pas le récepteur utilisé par les isolats sauvages. Ceux-ci utiliseraient préférentiellement CD150, une molécule exprimée essentiellement par certaines cellules immunitaires (lymphocytes B et T, monocytes et cellules dendritiques activés) (Tatsuo et al., 2000). Les régions d'attachement de H à ses récepteurs ne sont pas les mêmes (Colf et al., 2007 ; Masse et al., 2004; Masse et al., 2002)

Cependant, l'utilisation d'anticorps dirigés contre CD46 et CD150 ne bloque pas totalement l'infection par certaines souches sauvages. Certaines cellules épithéliales (en particulier, les cellules pulmonaires, sièges chez l'homme de l'entrée du virus) n'expriment pas CD150. Enfin, on peut adapter des souches sauvages à des cellules

dépourvues de CD150 (ce qui implique l'entrée du VR au sein de ces cellules). L'existence d'un troisième récepteur ou de mécanismes alternatifs d'entrée (endocytose) n'est plus à exclure (Andres et al., 2003; de Witte et al., 2006; Erlenhofer et al., 2002 ; Kouomou and Wild, 2002; Richardson, 2006; Tahara et al., 2008; Takeda et al., 2007; Watari et al., 2005; Yanagi et al., 2007; Yanagi et al., 2006b).

Deux études ont mesuré l'affinité de la protéine virale H pour les deux récepteurs viraux connus. La plus récente montre que ces valeurs ont peu d'impact sur l'attachement de H au récepteur mais sont déterminantes pour la formation des syncytia. De plus ils mettent en avant l'importance de la densité, tant de H que de CD46/CD150 dans ces phénomènes (Hasegawa et al., 2007; Santiago et al., 2002 ).

Après attachement à la cellule, le phénomène de fusion entre les deux bicouches lipidiques s'opère. La dynamique de ces événements n'est pas connue dans les détails. On notera que le mécanisme de fusion intercellulaire (formation des syncytia) s'opère selon un mécanisme différent (mais inconnu).

*...ensuite le contenu du virus est relargué dans le cytosol...*

### ***b) Transcription***

Dès que la/les nucléocapside(s) est/sont libérée(s) dans le cytosol, la transcription démarre mais on ignore s'il existe un mécanisme initiant ce phénomène. Le virus dispose d'une vingtaine (jusqu'à 50) de polymérases. Certains supposent que la protéine M, lors de l'encapsidation, s'associe avec N et bloque l'activité polymérasique ; la nucléocapside une fois libérée, le complexe de réplication n'a plus de lien avec M et serait donc libre d'agir.

L'enzyme responsable de la synthèse des ARNm viraux est la vRdRp L. A chaque région intergénique, du fait vraisemblablement de motifs secondaires d'ARN, l'enzyme va bégayer puis éventuellement se détacher ou s'inactiver... au final, arrêter

son activité de synthèse. Puisque chez les Paramyxovirus, la polymérase ne peut se lier au génome qu'au niveau de la séquence leader, ce phénomène de synthèse avortée conduit à l'établissement d'un gradient d'ARNm viraux, connus depuis longtemps et quantitativement caractérisé récemment (Plumet et al., 2005). Dans le cas du VSV (virus de la stomatite vésiculaire), l'ordre des gènes est important pour établir le gradient et de fait intervient dans la pathogénicité *in vivo* (Flanagan et al., 2003).

Les ARN messagers produits sont coiffés<sup>3</sup> en 5' et polyadénylés, vraisemblablement par la vRdRp. Les ARN messagers codant pour la protéine V sont synthétisés par édition au cours de la transcription du gène P. On considère qu'environ 40% des transcrits P sont édités en transcrits V (Bankamp et al., poster, 2007).

Le premier ARN transcrit serait un ARN leader, non coiffé, non polyadénylé donc hypersensible aux RNAses (Castaneda and Wong, 1989). L'abondance réelle de ces transcrits leader est encore incertaine du fait de la difficulté qu'il y a à les isoler. Des transcrits leader ont été identifiés lors des infections par SeV ou VSV ; dans le cas du VR, il s'agirait plutôt de transcrits leader-N (Castaneda and Wong, 1989). Certains auteurs ont trouvé ces transcrits leader-N sous forme d'ARN encapsidés (Castaneda and Wong, 1989). La contrepartie antigénomique de ces transcrits leader, les transcrits trailer, est peu décrite. Le rôle de ces transcrits est mal connu ; compte tenu de la situation chez le virus Sendai, ils pourraient moduler la pathogénicité *in vivo* et posséder des propriétés anti-apoptotiques.

### *c) Transition transcription-réplication*

L'ARN génomique encapsidé relargué dans la cellule est la matrice commune pour la production des ARN messagers et de l'intermédiaire de réplication, l'ARN anti-génomique. On ignore encore à l'heure actuelle s'il existe un mécanisme permettant de passer d'une activité de transcription à une activité de réplication. Techniquement, la seule différence entre les deux étapes est que l'ARNag est encapsidé : il est

---

<sup>3</sup> Etape de maturation des ARNm induisant leur stabilisation



associé à des protéines N et P. On peut supposer l'existence d'un seuil de quantité de protéines N, éventuellement au niveau local, au delà duquel, c'est l'activité de réplication qui prendrait le pas sur l'activité de transcription des ARNm. Il s'avère en effet que la protéine N est dite « stimuler » la réplication (Blumberg et al., 1988; Blumberg and Kolakofsky, 1981; Kolakofsky, 1982), peut-être en étant tout simplement indispensable. Une autre hypothèse met à profit la plasticité structurale de la protéine N (compte tenu du caractère intrinsèquement désordonné d'une partie de cette molécule) et propose que selon les états des protéines N de la nucléocapside, la polymérase initierait la réplication plutôt que la transcription (et réciproquement) (Bourhis et al., 2006).

Cependant, les données actuelles supposent fortement (sans s'en assurer) que sur un même génome, les polymérases puissent pour certaines produire des ARNm et pour d'autres, de l'ARNag : les deux fonctions (transcriptase et répliqueuse) ne seraient pas exclusives (Plumet et al., 2005).

#### *d) Réplication*

Les étapes de réplication consistent simplement en la transcription de l'ARNg en ARNag puis de cette molécule en ARNg complémentaire. Les mécanismes de polymérisation sont les mêmes que ceux de la transcription en ARNm, à cela près qu'il y a association des molécules d'ARN néo synthétisées avec des protéines N. A l'instar d'autres *Paramyxovirus*, le génome du VR observe la « règle de 6 ». En effet, sa longueur est un multiple de 6 et il s'avère que chaque monomère de N couvre exactement 6 nucléotides, indépendamment de la séquence. On peut considérer cette règle comme un mécanisme de sélection. Si le gène P, siège d'édition au cours de la transcription, venait à subir également une édition au cours de la réplication, seuls les génomes respectant la règle de 6 pourraient être correctement encapsidés et incorporés dans les virions (Kolakofsky et al., 2005).

L'enzyme n'a pas d'activité de « proof reading » et le taux de mutation observé est donc relativement élevé :  $9.10^{-5}$  nucléotide par cycle répliatif, soit 1.43 mutation par cycle. Ceci implique une grande variabilité au sein du pool d'ARN génomique produits et l'existence de quasi espèces virales (Schrag et al., 1999).

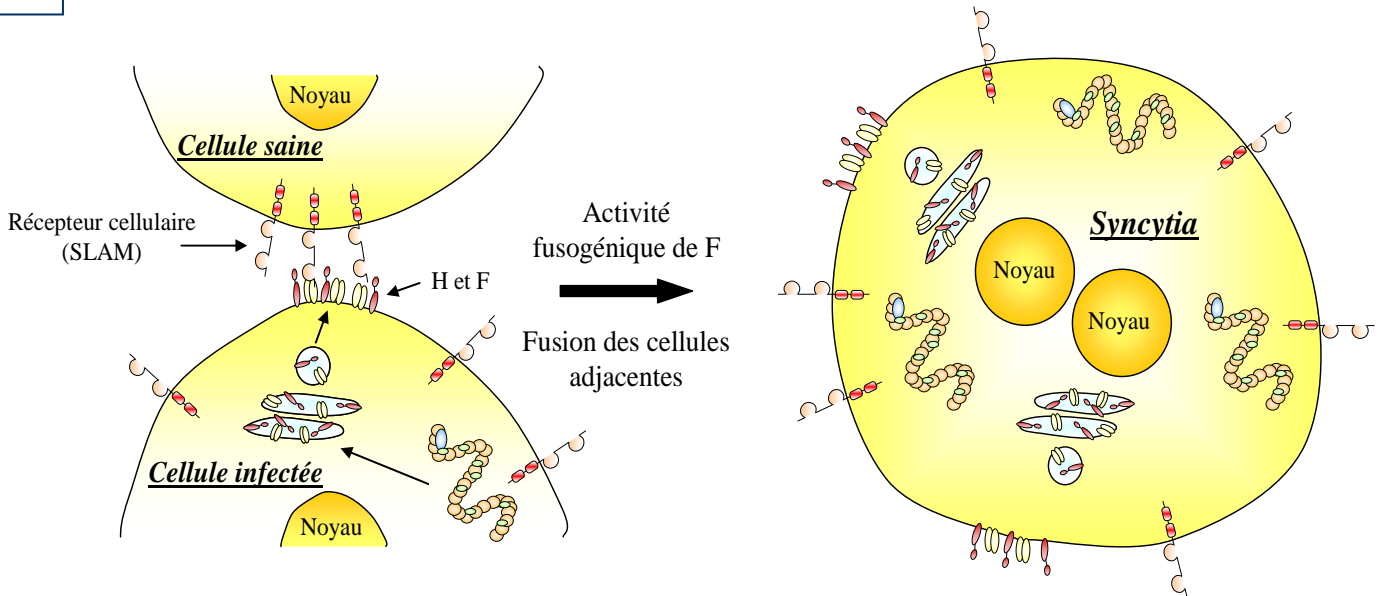
Au cours de la réplication, principalement lors d'infection à haut titre infectieux, sont générés des génomes défectifs. Les particules virales ainsi produites sont dites interférentes parce qu'elles entrent en compétition avec les particules au génome intact mais plus long. Dans certains cas, la séquence génomique leader est remplacée par une copie de la séquence antigénomique trailer (obtention de particules copy back) (Baczko et al., 1986; Calain and Roux, 1988; Hall et al., 1974; Kiley et al., 1974; Rima et al., 1977; Schrag et al., 1999 ; Sidhu et al., 1994; Whistler et al., 1996 ).

Ces virus sont incapables de se maintenir seuls ("défectifs") mais la coïnfection par le virus homologue non déficient leur permet d'avoir à leur tour un cycle infectieux complet et d'entrer en compétition avec les génomes beaucoup plus longs ("interférents"). Plusieurs études donnent à ces particules défectives un rôle dans la mise en route du système immunitaire, en particulier la synthèse d'IFN de type I (Shingai et al., 2007). Cependant, il n'y a aucune preuve expérimentale que ces particules soient autre chose que des artefacts de laboratoire...

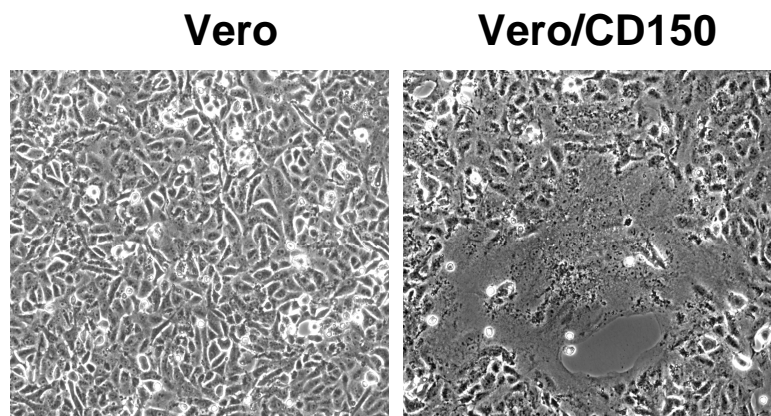
### *e) Encapsidation et bourgeonnement*

Après avoir subi plusieurs modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique puis l'appareil de Golgi (oligomérisation, clivage, glycosylation), les protéines H et F gagnent la membrane plasmique. D'autre part, dans le cytoplasme, les nucléocapsides produites au cours du processus de réplication et formées par l'association de protéines N, P et L (Waters and Bussell, 1974) s'associeraient à la protéine M via une interaction entre N et M et seraient ainsi adressées vers la membrane plasmique. Une fois à la membrane, M interagit avec la queue cytoplasmique de F entraînant également le recrutement de H via l'interaction entre H et F.

A



B



**Figure 10 : Les effets cytopathiques du VR dépendent du type cellulaire.**

- A. Représentation schématique de la fusion viro-induite
- B. Infection de cellules Vero et Vero/CD150 par G954-PBL et formation de syncytia

Pour le VR, selon le modèle de Manié & coll., cet assemblage « final » de tous les constituants du virion a lieu au niveau de domaines membranaires particuliers riches en glycosphingolipides et en cholestérol, les radeaux, connus pour concentrer ou, au contraire, exclure certaines protéines membranaires (Manie et al., 2000; Vincent et al., 2000). Pour l'instant, les étapes ultimes permettant le bourgeonnement membranaire et la libération des nouveaux virions ne sont décrites qu'à travers des clichés de microscopie électronique et les mécanismes moléculaires associés sont inconnus. Cependant, ce bourgeonnement nécessiterait la présence de facteurs cellulaires et notamment certains composants du cytosquelette dont l'actine (Bohn et al., 1986; Vincent et al., 1999).

La variabilité dans la taille et la forme des particules virales (100 à 300 nm) s'expliquerait par le fait que le bourgeonnement ne serait pas foncièrement une activité coordonnée mais plutôt un largage semblable à une petite éruption. Ceci expliquerait que lors de la production de virus, le cycle de congélation/décongélation occasionne des ruptures de la membrane cellulaire facilitant la formation de particules virales.

#### *f) Fusion intercellulaire viro-induite*

La particule virale une fois larguée dans le milieu extracellulaire pourra ensuite infecter de nouvelles cellules. Le virus de la rougeole dispose cependant d'une autre voie d'infection. Le phénomène de fusion entre les protéines virales H et F d'une part et des protéines cellulaires, dont les récepteurs CD46 et CD150 d'autre part, peut aussi s'opérer entre cellules infectées (exprimant les protéines virales) et cellules non infectées (exprimant les récepteurs) (*figure 10*). On ne connaît pas le mécanisme précis ni les conditions permettant cet événement. La formation de syncytia, les cellules géantes multinucléées, est caractéristique des infections par le VR. On les retrouve dans les infections naturelles (cellules de Warthin Finkeldey dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires) (Griffin, 2006).

On a longtemps pensé que les syncytia étaient une forme de fin de vie des cellules infectées. Cependant une étude récente a montré que ce sont des entités dynamiques. En culture cellulaire, les syncytia forment d'abord des entités très plates puis projettent des extensions vers les cellules avoisinantes. Ensuite, ils se rétractent, puis se détachent. Si on ne leur apporte pas de cellules vivantes neuves avec lesquelles fusionner, ils meurent par apoptose (Herschke et al., 2007).

### **3. Le VR au labo...**

#### **3.1 Titration**

L'évaluation de la quantité d'entités virales au sein d'une suspension peut se pratiquer de différentes manières.

On peut quantifier le nombre de génomes par RT-PCR quantitative. Cependant, on ignore combien de génomes sont embarqués au sein de chaque particule virale et il n'y a pas de preuve que ce nombre soit constant.

La quantité de particules virales infectieuses peut être mesurée par titration. On met à profit l'effet cytopathogène du VR. On dépose sur des tapis cellulaires confluents des dilutions en série de suspension virale. Après plusieurs jours de culture, les tapis sont plus ou moins morcelés suite à la formation de syncytia. On considère qu'un syncytium correspond à l'infection initiale d'une cellule par une particule virale infectieuse. Cependant avec cette méthode, on ne peut pas tenir compte des particules non infectieuses (déficientes et/ou interférentes) (Griffin, 2006).

La microscopie électronique permet de visualiser et donc de compter les particules virales, mais c'est une manipulation bien plus lourde et coûteuse et elle ne permet pas de distinguer les particules infectieuses des particules non infectieuses (Griffin, 2006).

La quantification du VR est donc inexacte et bien souvent non-reproductible (en particulier dans le cas de la titration par plages de lyse = syncytia). Compte tenu de l'existence de quasi espèces comme précédemment dit, on ne peut considérer une sus-

pension de VR comme une solution homogène. De plus, les virus en général sont des espèces biochimiquement instables, le titre viral est de ce fait dépendant des conditions de stockage et du nombre de congélation/décongélation. A ce jour aucune étude n'a montré que les suspensions vaccinales échappent à ces observations (Griffin, 2006).

Au final, il est donc relativement difficile de savoir exactement de quoi se composent les suspensions virales et d'en définir l'infectivité.

### 3.2 Souches de laboratoire

L'appellation « souche de laboratoire » regroupe tous les VR qui ont été modifiés en laboratoire : que ce soit par adaptation en culture cellulaire ou génie génétique. Ce sont des outils pour une meilleure compréhension de la biologie du virus.

Analyser et maîtriser la pathogénicité du VR est un grand défi actuel. Comment le virus s'adapte à un nouveau contexte cellulaire afin, au final, de « devenir » une souche vaccinale apparaît simple à appréhender pourtant aucune étude actuelle n'a élucidé l'ensemble des questions posées.

Deux questions majeures de la biologie du VR ont été abordées à travers l'adaptation de souches sauvages à des types cellulaires précis : l'entrée dans la cellule et la sensibilité aux IFN de type I.

Très tôt, on a remarqué que certains types cellulaires pouvaient être le siège d'infection par les souches sauvages et pas d'autres. Si, après plusieurs passages dans ces cellules, on obtenait des particules virales, cela signifiait que le virus avait pu entrer dans ces cellules, initialement non-permissives. Evidemment, le blocage pouvait se situer à d'autres étapes du cycle viral mais les études se sont centrées sur la fixation au récepteur et l'entrée.

En particulier, les travaux de Tahara et coll. se sont centrés sur la comparaison de IC-B et IC-V, deux souches issues du même isolat mais adaptées respectivement aux cellules B95-a et cellules Vero. Ces deux types cellulaires ne disposent pas des mêmes récepteurs à la surface. De fait, la sélection qui s'est opérée au cours de

l'adaptation a privilégié des virus pouvant utiliser CD46 plutôt que CD150 et inversement. Les alignements génétiques réalisés sur les séquences de la protéine H de ces deux souches ont mis en évidence plusieurs acides aminés différents (N481Y, N390I, E492G, N461D, T446S). L'importance de ces derniers a été démontrée en développant des mutants ponctuels de IC-B et en y incorporant les acides aminés de IC-V (Tahara et al., 2007a; Tahara et al., 2005; Tahara et al., 2007b ; Xu et al., 2006).

Dans un autre registre, une étude menée sur des souches de VR ayant induit une SSPE et pouvant entrer dans des cellules Vero, générer des syncytia mais sans se lier à CD46 a permis d'appuyer le rôle de la protéine F dans les phénomènes d'entrée et de fusion intercellulaire (Ayata et al., 2007).

Pour ce qui est de l'apport de ces approches à l'étude des interrelations VR/système IFN de type I, elles sont résumées dans l'introduction de l'article I. On notera que dans ce contexte, les résultats sont beaucoup moins clairs et univoques, faisant intervenir des mutations au sein de plusieurs protéines virales.

### 3.3 Modèles animaux

On l'a dit, l'homme est l'hôte préférentiel du VR même si d'autres espèces de primates sont également infectables et permettent d'étudier certains aspects immunologiques (Permar et al., 2007 ; Sato et al., 2008). Expérimentalement, ce ne sont pas des modèles très pratiques d'utilisation. *In vitro* cependant, autant les cellules humaines que les cellules simiennes sont infectables avec une efficacité dépendant de la souche testée. Les cellules murines ne le sont pas à l'exception de lignées de neuroblastomes. On retrouve cette résistance chez les rongeurs en général. En effet, seules des souches adaptées aux rongeurs peuvent infecter souris, rats et hamsters, chez lesquels elles ne déclenchent pas de pathologies mortelles (sauf dans le cas d'infections de nouveau-nés). Le génie génétique a permis de développer des lignées de souris sensibles à l'infection soit en leur octroyant l'expression des récepteurs viraux, soit en éliminant la réponse IFN de type I (via l'invalidation du récepteur IFNAR par exemple). Cependant, aucun modèle animal à l'heure actuelle ne permet de retrouver l'ensemble

des symptômes observés. (Hahm et al., 2003; Hahm et al., 2004; Horvat et al., 1996; Lawrence et al., 1999; Mrkic et al., 2000; Ohno et al., 2007; Oldstone et al., 1999; Patterson et al., 2001; Rall et al., 1997 ; Shingai et al., 2005; Welstead et al., 2005). De plus, jusqu'à récemment (Sellin et al., 2006), les modèles murins n'étaient pas infectables par des souches sauvages, mais uniquement des souches adaptées.





## ***LES INTERFERONS DE TYPE I***



Pour faire face à une infection (virale), l'organisme met en place tout un système de protection. Certains agents seront effecteurs et lutteront directement contre l'infection à différentes échelles. Par exemple, au niveau tissulaire, les lymphocytes T cytotoxiques détruisent les cellules infectées et à une échelle plus moléculaire, on peut citer la molécule ADAR1 qui induit des modifications dans les ARN viraux, les déstabilisant et les mutant.

D'autres agents participent à l'établissement de l'état anti-infectieux. Ces médiateurs, molécules informatives, sont regroupés sous le terme de cytokines.

L'agent infectieux, viral, met en place des contre-mesures pour limiter l'efficacité et/ou l'établissement de ces défenses. D'un autre côté, il est lui-même responsable de l'éveil du système immunitaire : c'est la notion de signal de danger. Divers éléments viraux sont responsables de cette activation et regroupés sous le terme de PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern) : le contenu génétique, des sous unités des protéines constitutives, des intermédiaires de réplication...

Les Interférons (IFN) de type I furent les premières cytokines à être mises en évidence, il y a un peu plus d'un demi-siècle en 1957 par Isaacs et Lindenman (Isaacs and Lindenmann, 1957). Ce sont également les premières cytokines secrétées en réponse à un signal de danger. A l'origine, on considéra les IFN comme une population moléculaire homogène. Cependant, on mit rapidement en évidence 2 classes distinctes, puisque deux récepteurs membranaires différents étaient engagés dans la signalisation : les IFN de type I et les IFN de type II (IFN  $\gamma$ ).

Les IFN de type I se répartissent (chez l'homme) en IFN  $\alpha$  (13 gènes),  $\beta$  (1 gène),  $\kappa$  (produit par les kératinocytes) et  $\omega$ . L'IFN de type II, ou IFN $\gamma$ , est synthétisé seulement par certaines classes de cellules immunitaires (NK, LT CD4+, LT CD8+). Enfin, les IFN de type III ont été récemment distingués des IFN de type I et comprennent les IFN  $\lambda$  (de I à III) (Kotenko et al., 2003).

Les IFN de type I partagent le même récepteur (IFNAR = IFN  $\alpha$  Receptor) mais ont une affinité différente et/ou des régions de liaison différentes ce qui expliquerait les cascades distinctes qu'ils initient. L'IFN  $\gamma$  se lie à IFNGR et les IFN  $\lambda$  à IFNLR.

Historiquement, on considérait que les fibroblastes étaient les principaux producteurs d'IFN  $\beta$  tandis que les monocytes produisaient l'IFN  $\alpha$ . A l'heure actuelle, le constat est plus mitigé. De nombreuses cellules sont capables de produire l'IFN  $\beta$ , massivement, y compris des neurones (Prehaud et al., 2005). Pour ce qui est des IFN  $\alpha$ , le consensus actuel désigne une sous population de cellules dendritiques, les pDC (DC plasmacytoïdes) comme les principales usines cellulaires à IFN  $\alpha$ . Cependant, les modes d'activation de la production de ces molécules sont encore flous et la plupart des données dont on dispose proviennent de l'étude de lignées de fibroblastes.

## **1. La production des IFN de type I**

### **1.1 En quête des cellules productrices d'IFN**

Face à l'importance des IFN  $\alpha$  au cours des réactions virales, ce furent les virologistes qui s'interrogèrent les premiers sur l'origine cellulaire de cette molécule (Isaacs and Lindenmann, 1957).

On pensa d'abord que toutes les cellules hématopoïétiques et en particulier les monocytes pouvaient produire de l'IFN  $\alpha$ . C'est effectivement le cas. Cependant, on mit rapidement en évidence qu'une population cellulaire extrêmement rare répondait beaucoup plus fortement que les autres aux tests d'hybridation *in situ* contre l'ARNm de l'IFN  $\alpha$  suite à une stimulation virale (HSV – Herpes Simplex virus et SeV) (Gobl et al., 1988; Sandberg et al., 1990). Des divergences d'opinion subsistèrent. En particulier, beaucoup soutenaient l'importance des monocytes. Ceux-ci produisent beaucoup d'IFN mais uniquement suite à l'infection avec certains virus (par exemple, SeV) mais se révèlent assez médiocres en réponse au HSV (Sandberg et al., 1990).

Face à ces interrogations et sans données sur la nature précise de ces cellules, elles furent désignées *Interferon Producing Cells* (IPC). Restait ensuite à les caractériser.

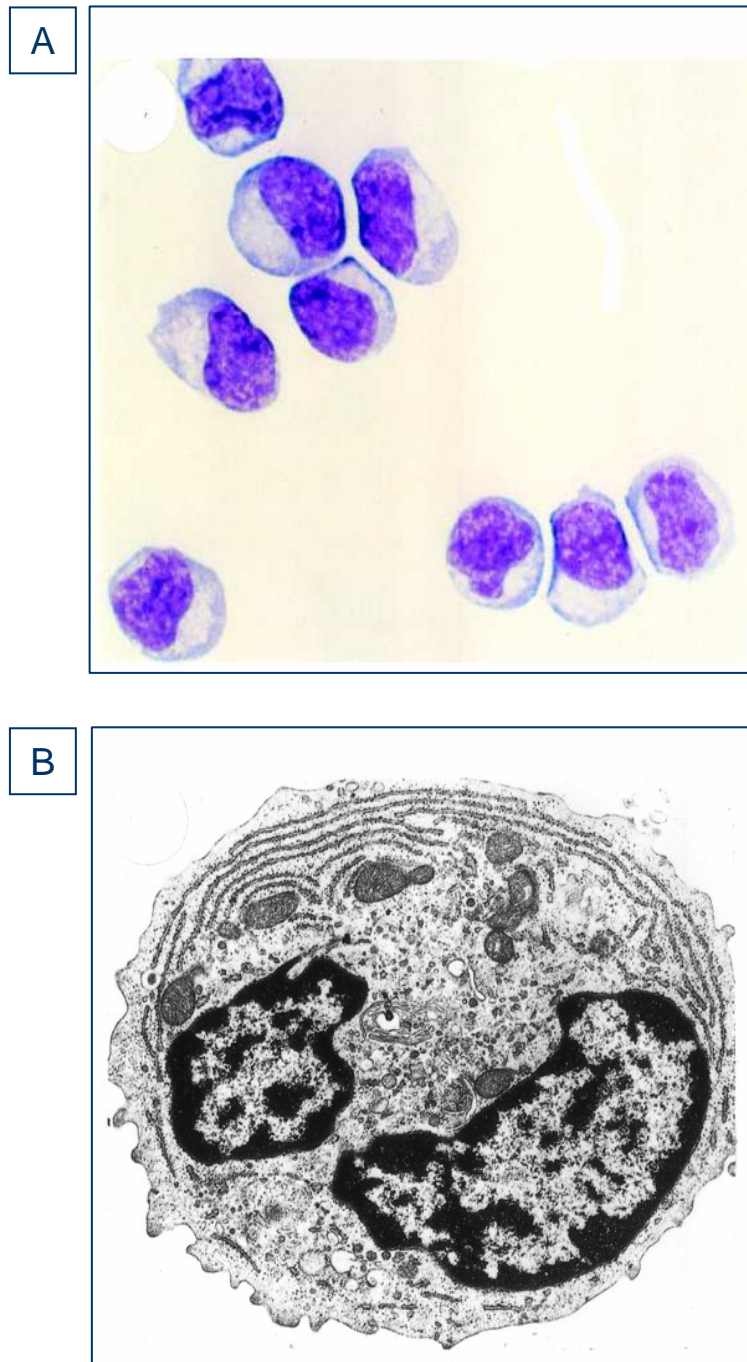
## 1.2 Caractérisation des *Interferon Producing Cells*

Les IPC ont initialement été caractérisées par l'absence des marqueurs de surface spécifiques des lignages cellulaires sanguins. En effet, le criblage de plus en plus précis de différentes populations cellulaires circulantes via les marqueurs de surface mit en évidence que les IPC n'expriment pas CD3 (marqueur des cellules T), CD19 ni CD20 (cellules B), CD14 (monocytes), CD16 ni CD56 (cellules NK). Par contre, elles expriment à des taux élevés des molécules du CMH de classe II (HLA-DR) (Galibert et al., 2001; Sandberg et al., 1990).

Des expériences de cytométrie en flux dirigées contre l'IFN  $\alpha$  ont permis de s'assurer en parallèle des résultats obtenus. Des études de dilution limite ou d'ELISPOT utilisant des anticorps dirigés contre l'IFN- $\alpha$  ont permis de démontrer que les IPC sont des cellules assez peu représentées dans le sang humain, aux environs de 0,2 à 0,7% des PBMC. Par contre, même si elles sont rares, on a pu calculer que chaque IPC fonctionnelle produisait entre 1 et 2 UI d'IFN  $\alpha$ , ce qui représente entre 3 et 10 pg par cellule, en réponse à de nombreux virus enveloppés en particulier VSV (Vesicular Stomatitis virus), HSV, HIV (Human Immunodeficiency virus) (Feldman et al., 1994; Gobl et al., 1988).

## 1.3 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

C'est en 1958 que Lennert et Remmele attirèrent l'attention sur un type cellulaire présent dans les aires interfolliculaires des ganglions humains. (Lennert and Remmele, 1958) Leur ultrastructure rappelle celle des plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines (taille moyenne, noyau bien rond, cytoplasme rempli de réticulum endoplasmique granuleux (REG) et d'appareils de Golgi, proches du noyau) mais elles n'en



**Figure 11 : Phénotype des IPC (Interferon Producing Cells)**

A : Coloration au Giemsa des IPC

B : Ultrastructure d'une IPC en Microscopie Electronique à Transmission

*d'après Siegal et al.*

ont pas les marqueurs de surface spécifiques (Galibert et al., 2001). On leur accorda de nombreux noms, en écho à leur localisation et leur phénotype : lymphocytes, cellules de la zone T ou monocytes plasmacytoïdes (Galibert et al., 2001). Pourtant, peu de certitudes sur leurs rôles ou leur développement furent établies avant la fin des années 1990, avec l'amélioration des techniques d'isolement de ces cellules.

Entre temps, on les avait mis en évidence au niveau des ganglions lymphatiques, de la moelle osseuse, du thymus, de la rate, des amygdales, de la peau, du nasopharynx mais aussi dans de nombreux autres tissus lymphoïdes lors de certaines pathologies telles que la maladie de Castleman, la maladie de Hodgkin, les granulomes épithéliaux ou les lymphadénites. En outre, on a mis aussi en évidence un équivalent circulant dans le sang (Dzionic et al., 2000; Dzionic et al., 2002; Dzionic et al., 2001).

Par la suite, des études phénotypiques de ces cellules, en particulier par cytométrie en flux, ont permis de les assimiler à une catégorie de cellules dendritiques. On les nomme depuis cellules dendritiques plasmacytoïdes. Récemment, Dzionic et al. ont mis en évidence des antigènes de surface permettant d'identifier les DC circulantes. Les pDCs sont désormais plus facilement détectables et isolables via BDCA2 et BDCA4, en plus d'être CD123<sup>+++</sup> (IL3 récepteur) (Dzionic et al., 2000; Dzionic et al., 2002; Dzionic et al., 2001).

#### 1.4 A la croisée des chemins

L'isolement de plus en plus aisé des pDCs permet de s'intéresser aux protéines élaborées et stockées dans le REG très abondant de ces cellules. Il s'avéra qu'une partie d'entre elles produisaient en masse de l'IFN  $\alpha$  (et en plus faibles proportions  $\beta$  et  $\omega$ ).

Siegal et al. prirent le parti d'isoler les pDCs à partir de sang humain de patients sains par déplétions successives. Une fois stimulées par HSV, ces cellules produisaient une quantité très importante d'IFN- $\alpha$ . Cette particularité disparaissait quasi totalement



quand les cellules étaient en condition de maturation. Des marquages intracellulaires et des analyses du transcriptome de ces cellules confirmèrent bien que les pDC étaient en fait les IPC. Ils confrontèrent ensuite les pDCs à tous les stimuli connus pour induire la production d'IFN. Il en est ressorti que les caractéristiques des IPC, précédemment démontrées, recouvraient entièrement celles des pDC (Siegal et al., 1999) (*figure 11*).

Des expériences de cytométrie en flux intracellulaire indiquent que parmi les pDCs, seules les cellules CD123<sup>+++</sup> produisent de l'IFN en réponse à une infection au HSV et qu'au sein de cette population, on peut constater des disparités en ce qui concerne le taux de production d'IFN par cellule (Blomberg et al., 2003).

### 1.5 Autres cellules productrices d'IFN $\alpha$

Même si, parmi les PBMCs, les pDCs sont de loin les plus puissantes cellules productrices d'IFN, d'autres cellules peuvent en produire.

Les monocytes peuvent produire de l'IFN  $\alpha$  en réponse à certains virus tels que SeV et HIV-1, les pDCs étant, elles aussi, sensibles à ces stimuli. Ainsi, les premiers essais de production en masse d'IFN à usage clinique mettaient en œuvre des cellules mononucléées infectées par le SeV sous des conditions défavorables au fonctionnement et à la survie des pDC (Siegal et al., 2001). On conclut donc à tort que les monocytes étaient les principales cellules productrices d'IFN  $\alpha$ . Cependant, bien que les cellules monocytaires productrices d'IFN soient plus nombreuses que les pDCs suite à l'infection par le SeV, chaque monocyte produit 10 à 20 fois moins d'IFN  $\alpha$  (Feldman et al., 1999; Feldman et al., 1994; Gobl et al., 1988).

Enfin, les lymphocytes B et les DC CD11c<sup>+</sup> (Myeloid Dendritic Cell : MDC) produisent aussi de l'IFN  $\alpha$  sous certaines conditions, à l'instar des macrophages, des fibroblastes ou bien encore d'autres types cellulaires. On constatera cependant que les pDCs expriment toute une gamme d'IFN  $\alpha$  ainsi que l'IFN  $\beta$  alors que les fibroblastes expriment surtout l'IFN  $\beta$  et que chez les monocytes l'expression du gène IFNA1 prédomine (Barnes et al., 2001).

L'IFN  $\alpha$  employé en thérapie est une molécule recombinante, à partir de la séquence de l'IFN  $\alpha 4$ . Les IFN de type I distribués sont obtenus après purification de surnageants de lymphocytes infectés par HSV.

## **2. Réponse IFN**

La réponse IFN se décompose en deux séries d'événements. L'initiation de la réponse s'effectue par détection d'un signal de danger qui va mettre en place la production d'IFN de type I selon des séquences précises. Ensuite, les molécules émises dans le milieu extérieur s'associent à leur récepteurs (de manière auto ou paracrine) et permettent l'établissement d'un état antiviral.

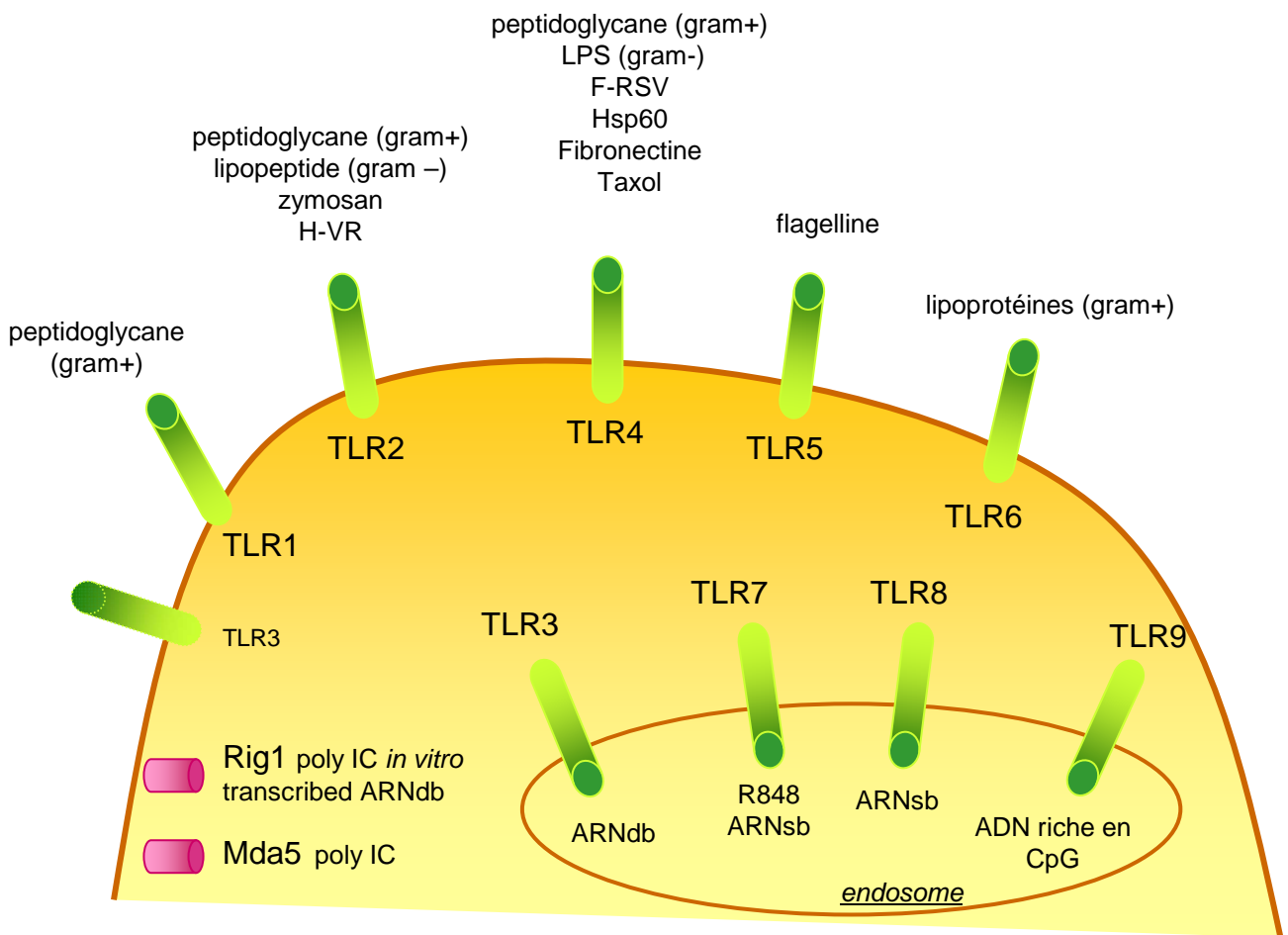
### **2.1 Détection des « intrus » viraux et induction de la réponse IFN**

Parmi les molécules susceptibles de reconnaître un signal de danger porté par un pathogène les mieux caractérisés sont les TLR (Toll like receptors) et les hélicases RIG-I (Retinoic acid Inducible Gene I) et mda-5 (les RLR, Rig-1 like receptors). Elles forment un réseau de sentinelles qui se partagent l'espace de la cellule : les TLRs 1, 2, 4, 5, 6 sont susceptibles de reconnaître des motifs étrangers de type membranaire présents à la membrane plasmique, les TLR 3, 7, 8 et 9 reconnaissent des acides nucléiques étrangers dans les vésicules d'endocytose que certains virus utilisent comme voie de pénétration dans la cellule, RIG-I et mda-5 sont des senseurs des ARN viraux dans le cytoplasme, (Akira and Takeda, 2004 ; Berghall et al., 2006; Plumet et al., 2007; Takeda et al., 2003 ) (*figure 12*).

#### ***a) Senseurs du signal danger à l'extérieur de la cellule : les TLRs***

La détection des motifs infectieux se fait via l'ectodomaine des TLR. Le domaine cytoplasmique permet le recrutement des adaptateurs du signal.

Après liaison avec leurs ligands, les TLR impliqués recrutent le facteur Myd88 qui s'associe à diverses kinases. Suite à une cascade de phosphorylations, la voie NF-



**Figure 12 : Les PRR ('Pattern Recognition Receptor) et leurs ligands PAMP ('Pathogen Associated Molecular Motifs').**

Les TLR ('Toll Like Receptor') en vert et RLR ('Rig1 Like Receptor') en fuschia.

TLR3 est représenté en pointillés à la surface membranaire puisque son expression y est très faible.

$\kappa$ B est activée, s'achevant par la translocation nucléaire de ce facteur. La transcription des gènes de la réponse interféron requiert la coopération de cette molécule et d'autres facteurs de transcription, tel que IRF5 (Interferon Response 5) (Akira and Takeda, 2004).

TLR3 et TLR4 (dans certains cas) utilisent une voie d'activation indépendante de Myd88 en recrutant un autre adaptateur, TRIF. Dans ce cas, on aboutit à la phosphorylation de IRF3 présent de manière latente dans le cytoplasme, provoquant sa dimérisation et son interaction avec les coactivateurs CBP et p300. Le complexe migre alors dans le noyau où il active les promoteurs ISRE ((de séquence consensus A/G NGAAANNGAAACT (Darnell et al., 1994)) comportant un domaine de liaison à IRF3, comme le gène de l'IFN  $\beta$ .

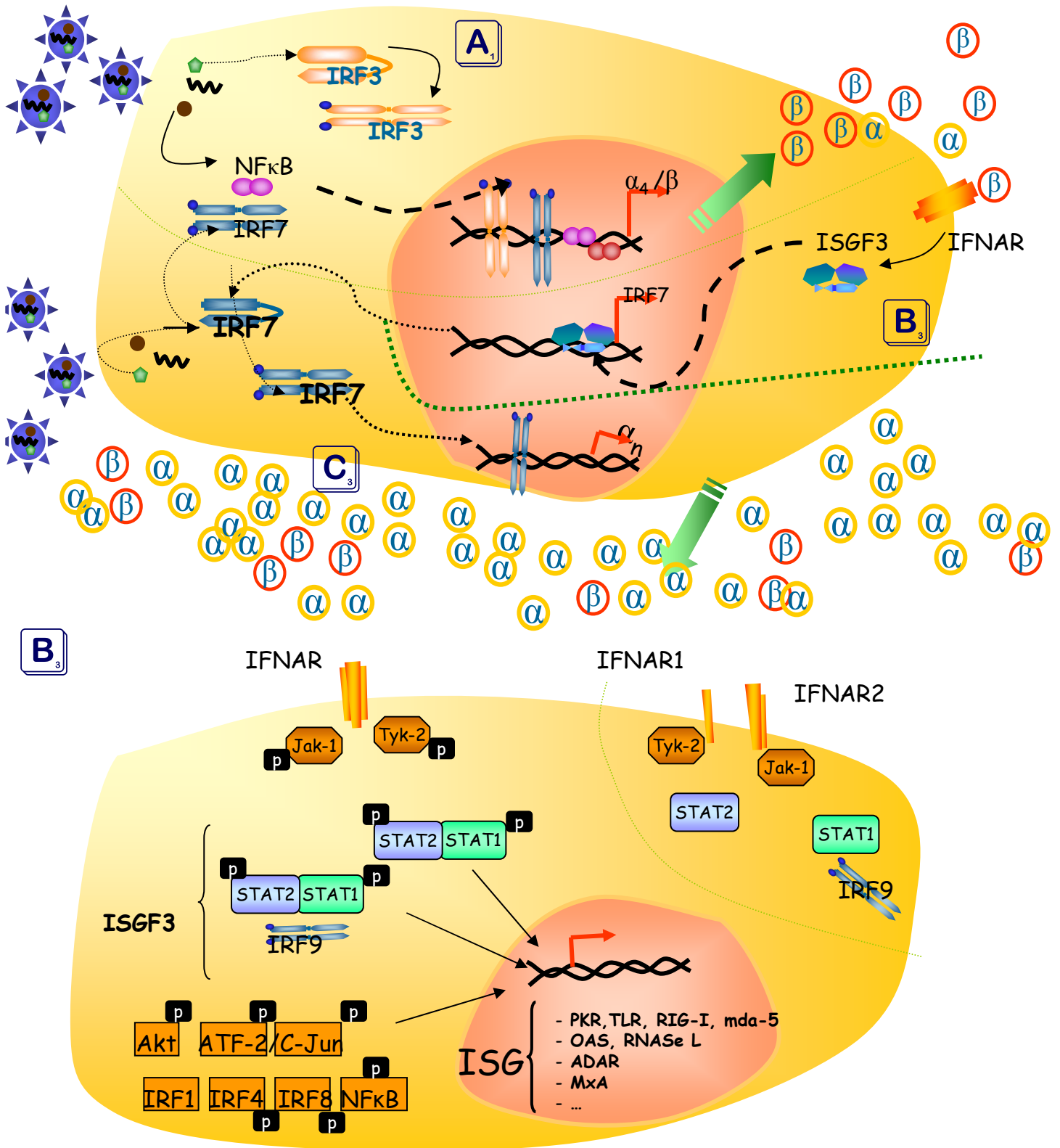
#### *b) Senseurs du signal de danger cytoplasmique : les hélicases RIG-I et mda-5*

RIG-I (*Retinoic acid inducible gene*) est une protéine de 925 aa, contenant un domaine hélicase dans sa partie C-terminale, et dont l'implication dans la transduction du signal interféron a été découverte récemment (Yoneyama et al., 2004). Elle peut intervenir suite à l'infection par un certain nombre de virus à ARN.

Une autre RNA hélicase à boîte DEXD/H, mda-5, a été impliquée dans l'activation d'IRF3 suite à l'infection par des virus à ARN simple brin et identifiée en outre comme cible de la protéine V du virus de Sendai, mais pas du VR, sans que son rôle soit précisé ni distingué de celui de RIG-I (Andrejeva et al., 2004; Kang et al., 2002).

Une dernière hélicase, LGP2 semble agir comme répresseur de RIG-I et mda-5 dans les cellules non infectées (Yoneyama et al., 2005).

Pour induire la synthèse d'IFN, il y a donc détection du pathogène via les TLR ou les RLR. Ceci induit une cascade de phosphorylation aboutissant en particulier à l'activation de facteurs de transcription. Le gène de l'IFN  $\beta$  répond à IRF3 et IRF7, NF $\kappa$ B et atf2/cjun ; par contre il est inhibé par IRF2. Les gènes des IFN  $\alpha$  répondent



**Figure 13 : Modèle multiphasique d'action et de synthèse des IFN  $\alpha/\beta$**

A : l'infection virale induit la phosphorylation de NF $\kappa$ B, IRF-3 et l'IRF-7 présents *ab initio* dans la cellule. Ces facteurs de transcription activés vont induire la transcription des gènes codant pour l'IFN  $\alpha_4$  et de l'IFN  $\beta$ .

B : les molécules d'IFN produites dans la première phase initient un signal (via les phosphorylations de Jak-1 Tyk-2 puis STAT1 et 2) conduisant à l'activation d'ISGF3 qui va induire la transcription du gène codant pour IRF7 et les autres ISG impliqués dans la réponse antivirale.

C : l'accumulation puis l'activation des molécules IRF-7 permet la transcription des gènes codant pour les différentes espèces d'IFN- $\alpha$ . Celles-ci s'accumulent et pourront participer à la boucle de rétrocontrôle positive.

aux IRF 3, 5 et 7, avec, certainement des sensibilités différentes mais non détaillées. (*figure 13*)

On notera dès à présent que des molécules dont l'expression est induite par les IFN de type I, interviennent dans l'induction de leur synthèse.

Une fois que les IFN de type I sont produits et émis dans le milieu cellulaire, ils se fixent à IFNAR et vont mettre en place un état de veille antivirale.

## 2.2 Réponse à l'interféron et mise en place d'un état de veille antivirale

L'attachement des IFN  $\alpha/\beta$  sur les 2 sous-unités constitutives de IFNAR entraîne l'activation des protéines Jak-1 et Tyk-2. Cette activation se solde par la phosphorylation de Jak-1, Tyk-2 et de IFNAR1. S'ensuit le recrutement de STAT-1 et STAT-2 qui sont alors phosphorylés. Après recrutement d'IRF-9 (Interferon Response Factor 9) migrent dans le noyau. Ce complexe de 3 protéines, appelé ISGF3, transactive la transcription d'une série de gènes sous promoteurs ISRE. STAT-1 peut également s'homodimériser et activer également la transcription d'autres ISG (*figure 13*).

Ces gènes codent pour un ensemble de protéines impliquées dans la mise en place de l'état antiviral dans la cellule sensibilisée par l'IFN : les PRR – Pattern Recognition Receptor – (TLRs, RIG1, mda-5), la 2',5' oligoadénylate synthétase (OAS), la PKR, la RNase L, l'adénosine désaminase ARN spécifique (ADAR), les GTPases de type Mx, les Interferon Stimulated gene 15 (ISG15), ISG 20, ISG 56, etc.

Des études de transcriptome ont montré que plus de 100 gènes sont directement induits après traitement à l'IFN (Der et al., 1998).

L'OAS catalyse la synthèse d'oligonucléotides polyA particuliers, polymérisés en 2',5' au lieu de 3', 5', qui activent la RNase L. Celle-ci dégrade tous les ARN présents dans la cellule, ARNm cellulaires et viraux, ARN ribosomiaux (Grandvaux et al., 2002; Samuel, 2001).

L'hélicase ADAR catalyse la modification des adénosines des ARN en inosines. Cette modification des ARN entraîne une confusion de la machine traductionnelle

qui lit l'inosine comme une guanine ce qui conduit à la synthèse de polypeptides cellulaires et viraux aberrants (Grandvaux et al., 2002; Samuel, 2001).

Le génome humain code pour deux protéines Mx, MxA et B, capables, via l'hydrolyse de GTP, d'interagir directement avec les protéines virales, dans le cytoplasme ou le noyau, pour exercer une activité antivirale. Les cibles et les mécanismes en jeu sont mal connus ; ils peuvent varier d'un virus à l'autre, voire d'un type cellulaire à un autre au sein d'un organisme. Dans le cas des virus encapsidés, MxA pourrait relocaliser les protéines de capsidie dans un compartiment cellulaire où elles seraient non fonctionnelles. MxA empêche ainsi l'import nucléaire de la NP du virus Thogoto, bloquant la réplication de son génome ou induit la redistribution à la membrane de la NP du virus de La Crosse hors des plateformes d'assemblage du virus (Grandvaux et al., 2002; Samuel, 2001).

ISG15 est une protéine susceptible de modifier l'ubiquitination de plus de 200 protéines associées à des fonctions cellulaires diverses comme la maturation des ARNs, le remodelage de la chromatine, l'organisation du cytosquelette, etc. Elle est aussi capable de modifier l'ubiquitination de Jak1 et STAT1 mais son rôle est mal cerné (Grandvaux et al., 2002; Samuel, 2001).

ISG20 code pour une 3'-5' exonucléase spécifique des ARN simple brins. ISG56 est un inhibiteur de traduction (Grandvaux et al., 2002; Samuel, 2001).

Enfin, la PKR peut agir à différents niveaux. Elle phosphoryle et inhibe le facteur d'initiation de la traduction eIF2- $\alpha$ . Elle phosphoryle également I $\kappa$ B (et l'inactive) permettant ainsi l'activation du facteur NF $\kappa$ B. De plus, elle phosphoryle également le facteur de transcription NFAT (Grandvaux et al., 2002; Samuel, 2001).

Récemment une étude a montré que la cascade de phosphorylation initiée par la stimulation des TLR, au sein des pDCs fait intervenir la molécule TREM. C'est d'elle et non pas des TLR que les phosphorylations débutent. Son expression est augmentée après stimulation des TLR (Watarai et al., 2008).

Le traitement à l'IFN bloque la division cellulaire, rend la cellule résistante à un certain nombre d'infections virales (typiquement infection par VSV) mais n'induit pas

à lui seul le déclenchement de la mort programmée qui n'interviendra que si la cellule rencontre en plus un signal de danger.

### 2.3 Le système IFN de type I : un système complexe !

Au regard du nombre d'éléments interagissant pour initier la production d'IFN de type I et répondre à leur activité antivirale, on se doute que la régulation fine de ce système est « complexe ».

De manière intuitive, on comprend (et on constate expérimentalement) qu'il y a un système de dose dépendance de la réponse anti virale en fonction de la dose d'IFN de type I mise en jeu. C'est sur ce principe qu'est effectué le dosage biologique des interférons, en étudiant la résistance à l'infection par VSV de cellules Vero (ou de cellules MDBK – Madin-Darby Bovine Kidney – pour les analyses médicales) mises en présence de dilutions successives de surnageants contenant (potentiellement) des IFN de type I. A l'autre bout de la cascade, la sécrétion d'interféron par des cellules humaines 293T est proportionnelle à la quantité de poly I:C transfectée.

De plus, il faut aussi avoir une lecture dynamique des événements. Au cours d'une infection, certaines cellules seront effectivement infectées et répondront de manière limitée (action de la PKR par exemple) ; une cellule préalablement mise en contact avec l'IFN est dans un état de défense antivirale efficace. Enfin, une cellule sensibilisée et malgré tout infectée déclenche une action antivirale conduisant au blocage du cycle du pathogène, et à la mort de la cellule. Toute réaction immunitaire observée est donc la composée de chacun de ces 3 types de configuration. Il s'avère que le(s) programme(s) génétique(s) mis en place diffère(nt) et peu(ven)t interagir, positivement ou négativement (Nakaya et al., 2001). Certaines molécules telles qu'IRF7 forment des plateformes entre les différents programmes, couplant signal de danger et signal induit par l'IFN.

On notera cependant que de manière redondante, quelle que soit la voie employée, on retrouve une surexpression des PRR (sentinelles). La plupart des voies convergent vers NF- $\kappa$ B et IRF3. Cependant, contrairement au dogme qui veut que la réponse immunitaire innée soit aspécifique, il semblerait que, selon le stimulus viral,



Etape inhibée	Agent viral	Virus
phase d'induction des IFN		
fixation de l'ARNdb	NS1	influenza
	protéine E32	poxvirus
	VP35	virus ebola
	sigma 3	reovirus
	US11	HSV
	M142, M143	cytomégalovirus murin
fixation de MDA-5 et inhibition	protéine V	VR et d'autres paramyxoviridae
dégradation de IPS1	NS3-4A protéase	HCV
inhibition de TBK1	protéine P	virus de la rage
	glycoprotéine G1	Hantavirus NY-1
dégradation de IRF3	Npro protéines	swine fever virus
		bovine viral diarrhea virus
substrat de IRF3		HHV8 (virus de Kaposi)
phase d'amplification de l'IFN		
inhibition de la phosphorylation des protéines STAT	protéines P et C	VR
	protéine C	respirovirus
inhibition de la translocation des protéines STAT vers le noyau et/ou de la liaison de STAT à l'ADN	protéine VP24	virus ebola
	protéines V et C	VR
	protéine P	virus de la rage
dégradation des protéines STAT	protéine V	rubulavirus
		HCV, HSV, HHV8, cytomégalovirus murin
effecteurs de l'IFN		
blocage de la RNase L	ICP0	HSV
upregulation de la protéine inhibitrice de la RNase L (RLI)		HIV, picornavirus
dephosphorylation de eIF2alpha	gamma34.5	HSV
protéines eIF2alpha'like'	protéine E2	HCV
	Tat	HIV
	protéine K3L	virus de la vaccine
substrat de la PKR	petits ARN hautement structurés	adénovirus
	EBER	HCV
		EBV, HIV
métabolisme cellulaire		
transcription	protéine NS	virus de la Rift Valley
		Bunyamwera virus
	protéine M	VSV
échange noyau/cytoplasme	protéine M	VSV
	protéine NS1	influenza A
traduction	protéine M	VSV
modification post transcriptionnelles	protéine NS1	influenza A
métabolisme en général		Picornavirus, Pestivirus

**Tableau 1 : Contremesures virales au système IFN de type I**

des cascades précises et spécifiques soient mises en place (Moynagh, 2005a; Moynagh, 2005b).

Malgré tout, aucun modèle disponible n'est complètement satisfaisant. Un certain nombre de données apparaissent contradictoires, ce qui explique sans doute pourquoi toutes les revues sur l'IFN se concentrent sur un type de PRR et un type de cascade, sans se risquer à proposer un modèle global du réseau des médiateurs de la réponse IFN. Enfin, rares sont les études sur la mise en place de la production d'IFN par les pDCs.

### **3. Contre mesures virales**

Pour pallier son manque de discrétion face au système immunitaire, le virus met en place une série de contre mesures lui permettant d'échapper, en particulier, au système IFN de type I

A l'évidence, toutes les étapes de synthèse et de signalisation des IFN de type I peuvent être affectées par des protéines virales. Le [tableau 1](#) présente quelques uns des mécanismes connus.

Dans le cas particulier des *Paramyxoviridae*, quelques études montrent également une grande diversité d'actions. Pour ce qui est du VSV, la rapidité avec laquelle il infecte les cellules ainsi que la diminution globale de la transcription cellulaire, médiée par la protéine M sont les seules parades connues contre les IFN de type I (Ferran and Lucas-Lenard, 1997).

La majeure partie des études menées sur les interactions entre VR et système IFN de type I se sont centrées sur l'importance des protéines V et C. A cette fin, plusieurs modèles d'étude ont été employés : lignées cellulaires transfectées pour exprimer une protéine virale, virus génétiquement modifiés, virus adaptés par passage cellulaire.

La seule étude publiée sur le VR et les pDCs est celle réalisée par Schlender et collaborateurs. Elle montre que ces cellules sont infectables par la souche hyper atténuée Ed-Schwarz et que l'infection inhibe la production d'IFN de type I initiée par une

stimulation via TLR7 et TLR9 (Schlender et al., 2005). En outre, une étude récente menée sur des cellules dendritiques conventionnelles montre le rôle des particules défectives dans l'induction d'IFN de type I via IRF3 et la synthèse précoce d'IFN  $\beta$  (Shingai et al., 2007). Récemment une étude a mis en avant que l'extrémité 5' triphosphate d'ARN leader du VR est reconnu par RIG-1 induisant ainsi l'expression du système IFN (Plumet et al., 2007). Cependant, on ignore si de tels transcrits existent au cours de l'infection rougeoleuse.

En fait, les travaux qui ont fait référence depuis leur publication en 2000, sont ceux de Nanche et coll (Nanche et al., 2000) qui montraient que l'infection de PBMCs par des souches sauvages est inhibée par un prétraitement aux IFN de type I et que cette infection ne s'accompagne pas de production d'IFN. La situation est inversée dans le cas de souches vaccinales. Le dogme serait donc que des souches sauvages n'induisent pas d'IFN mais y sont par contre sensibles.

Tout naturellement, des études menées sur l'adaptation cellulaire de souches sauvages s'interrogent également sur le rôle des IFN de type I et leur modulation par V et C. Cependant, aucun consensus clair ne peut être tiré compte tenu du nombre de protocoles expérimentaux employés.

L'infection de cellules A549 (lignée épithéliale pulmonaire) par une souche sauvage active la voie de NF $\kappa$ B et induit la production d'IFN  $\alpha/\beta$  (Helin et al., 2001). L'infection de cellules HUVECS par une souche adaptée en cellules Vero montre une induction de RIG1 et mda-5, une augmentation de l'expression de TLR3 conduisant au final à la production d'IFN  $\beta$ , d'IL 28 et 29 (Berghall et al., 2006).

Des études utilisant la technique de double hybride ont mis en évidence une interaction entre la protéine V de la souche de référence Edmonston et la protéine Jak-1 (un des composants de la cascade initiée par la fixation des IFN type I sur IFNAR) qui aboutit à une invalidation du système IFN (Caignard et al., 2007). Déjà auparavant l'expression de cette protéine en cellules Vero avait montré un blocage de la voie IFN : V s'associerait avec le complexe STAT 1 2 3 et IRF9, bloquant sa relocalisation nucléaire et empêchant ainsi l'activation transcriptionnelle induite par l'IFN (Palosaari et al., 2003).

Si l'on bloque les IFN de type I (par un traitement anticorps), la souche Edmonston privée de protéine C se multiplie en PBMCs et en cellules Hela de manière comparable à la souche parentale. D'ailleurs, l'expression de cette protéine en cellule Vero semble inhiber la réponse induite par les IFN (Shaffer et al., 2003). L'inactivation de la protéine C de la souche sauvage/adaptée en B95a, IC-B, réduit sa pathogénicité *in vitro* (sur cellules 293T), rend ce virus plus sensible aux IFN que la souche parentale même si *in vivo* tout semble fonctionnel (Takeuchi et al., 2005). Une étude ultérieure a montré également une plus forte production d'IFN de type I au cours de cette infection, ainsi que des défauts dans la réplication (Nakatsu et al., 2006). Par contre, l'expression en cellules Vero de cette protéine n'affecte pas le système IFN de type I (Takeuchi et al., 2003a; Takeuchi et al., 2003b). La protéine V de la souche IC-B bloque la synthèse et la protection induite par les IFN de type I : une étude par génie génétique montre que les régions N et C terminales sont importantes pour gérer cette activité (Ohno et al., 2004). Le mode d'action proposé serait de bloquer la phosphorylation des protéines STAT sans les dégrader (Takeuchi et al., 2003a). Il n'est donc pas étonnant que la protéine P (qui a la même séquence N terminale que V) montre également des activités régulatrices de la réponse IFN (Devaux et al., 2007). L'expression des protéines V et C issues d'une autre souche sauvage, AK1, inhibe également le système IFN type I mais en interagissant avec le récepteur IFNAR et toute la plateforme de kinases qui y est rattachée (Yokota et al., 2003).

D'autres études mettent en avant des phénomènes complémentaires. On rappellera que la liaison de N à IRF3 induit la mise en place d'un pattern d'expression des ISG anormal (tenOever et al., 2002). Une étude récente a montré que la protéine V de nombreux *Paramyxoviridae* peut se lier à mda5 inhibant ainsi la synthèse d'IFN de type I (Andrejeva et al., 2004).

On conclura que les protéines V et C des VR semblent avoir un rôle dans le contrôle de la réponse IFN de type I et, sans prendre beaucoup de risques, on peut affirmer qu'elles peuvent affecter cette voie par de nombreux biais. Cependant, les quelques résultats *in vivo* semblent plus délicats à interpréter, du fait notamment, du rôle des protéines V et C dans le contrôle des phénomènes réplcatifs et transcriptionnels. De fait, le système IFN  $\alpha/\beta$ , s'il était déjà complexe, constitue un énième rouage de l'entrejeu entre VR et cellules.



***LES APPORTS DE LA MODELISATION MATHEMATIQUE  
A L'ETUDE DE LA VIROLOGIE***



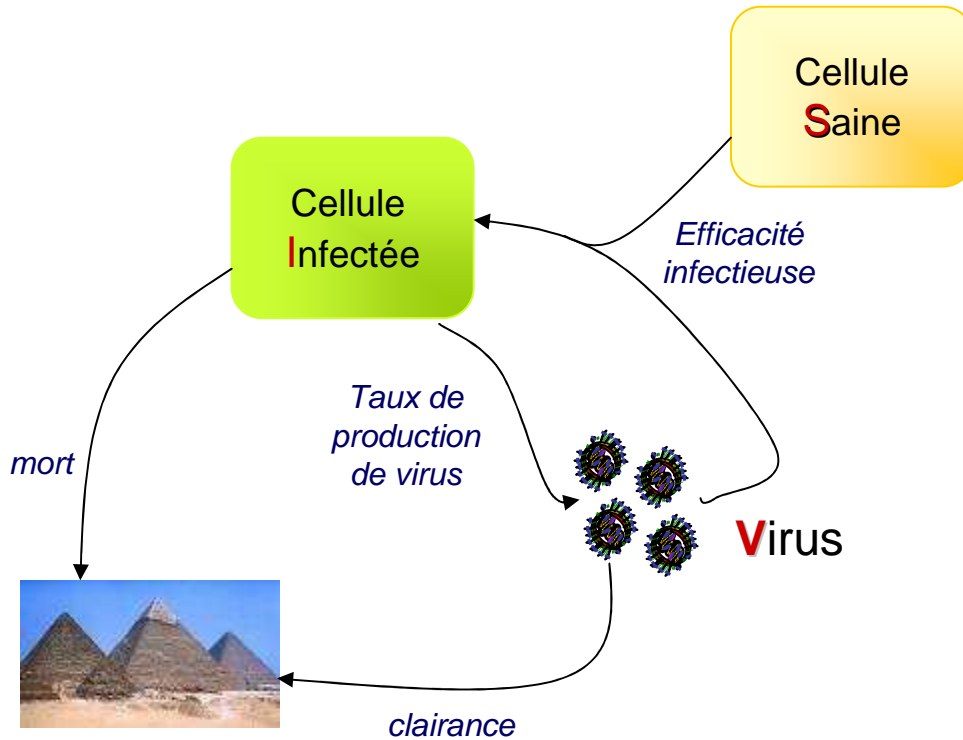
A l'heure actuelle, de nombreux mécanismes biologiques ont été (partiellement) élucidés, y compris dans le domaine de la virologie et de l'immunologie. Cependant, ces connaissances restent parcellaires et souffrent du fait que selon les modèles d'étude, on retrouve parfois une grande hétérogénéité dans les résultats. De plus, même si nous avons une connaissance qualitative de nombreux systèmes biologiques, nous disposons encore trop rarement de données quantitatives qui seraient pourtant d'une aide précieuse dans l'élaboration de thérapies mieux adaptées. D'une manière générale, nous avons accès à une connaissance figée que représentent bien les divers schémas à base de flèches, parfois de couleurs pour différencier si l'effet est activateur ou inhibiteur. Or, la biologie est par essence une science du mouvement, l'évolution se construit au fil des interactions avec l'environnement. Il manque à l'heure actuelle une vision plus intégrée et dynamique des systèmes biologiques en général.

Depuis de nombreuses années déjà, la modélisation mathématique est employée pour formaliser la dynamique des épidémies avec des résultats prometteurs (Matthews and Woolhouse, 2005). De plus en plus, l'interdisciplinarité apporte de nouvelles pistes et la modélisation mathématique de l'immunovirologie n'est pas en reste.

Tandis que les épidémiologistes se penchent avec intérêt sur les jeux en réseaux multi joueurs (Balicer, 2007), de plus en plus d'études permettent aux virologistes d'avoir une vision plus intégrée de leurs modèles préférés. Le traitement mathématique des données de virologie expérimentale est en train de se mettre en place. C'est pourquoi la plupart des données publiées se limitent généralement à montrer que ce genre d'approche est réalisable (et souvent réaliste) en essayant de tirer des conclusions, qui la plupart du temps sont « logiques ». Au final, ce sont des modèles d'étude, de nouveaux outils, encore en cours d'élaboration.

Les virus les plus modélisés sont le HIV, le HBV, le HCV et dans une moindre mesure, les virus influenza et le HTLV. La plupart des études sont menées sur des virus qui persistent au sein de l'organisme et l'intérêt premier de la modélisation est de





$$\frac{d(\text{Cellule\_Saine})}{dt} = \text{naissance} - \text{mort} - (\text{efficacité\_Infectieuse} \times \text{Virus} \times \text{Cellule\_Saine})$$

$$\frac{d(\text{Cellule\_Infectée})}{dt} = (\text{efficacité\_Infectieuse} \times \text{Virus} \times \text{Cellule\_Saine}) - \text{mort}$$

$$\frac{d(\text{Virus})}{dt} = \text{taux\_de\_production\_de\_virus} \times \text{Cellule\_Infectée} - \text{clairance} \times \text{Virus}$$

**Figure 14 : Le modèle SIV (cellules Saines ; cellules Infectées ; Virus)**

Représentation schématique et système d'EDO développés par Perelson et al. pour modéliser les infections virales en phase stationnaire. Sont suivies les quantités de cellules saines, de cellules infectées et de virus.

mieux quantifier et ajuster l'effet de certaines molécules thérapeutiques. De plus, dans le cas du HIV, les cellules cibles de l'infection sont majoritairement les lymphocytes CD4+ et de fait, tout naturellement, les modèles présentés intègrent également le rôle des cellules immunitaires.

## **1. Le modèle de base**

C'est en 1996 que Perelson établit un des premiers systèmes d'EDO (Equations différentielles Ordinaires<sup>4</sup>) afin de définir une infection virale (Perelson et al., 1996). Ce système s'inspire largement des études épidémiologiques, et en particulier du modèle SIR (Sain/Infectés/Résistants, les trois états que peuvent prendre des individus confrontés à une épidémie)

Le modèle de Perelson prend en compte trois variables :

*les cellules cibles, saines,*

*les virus,*

*les cellules infectées, productrices de virus.*

### **1.1 Description**

De manière très intuitive, le décompte de chacune de ces quantités (qui peut se réaliser théoriquement *in vitro*) s'opère comme suit :

- ④ Le nombre de cellules vivantes évolue au cours du temps en fonction du nombre de cellules qui naissent, qui meurent et qui se font infecter.
- ④ La quantité de virus évolue en fonction du nombre de virus produit par les cellules infectées et du temps de demi-vie de ces entités.
- ④ La quantité de cellules infectées dépend de l'efficacité d'infection des cellules saines par le virus. Ces cellules meurent également selon une cinétique qui leur est propre.

---

<sup>4</sup> Une équation différentielle est une relation entre une ou plusieurs fonctions inconnues et leurs dérivées (« ordinaire » en opposition à « partielle »).

Chacune des phrases précédentes peut se traduire par une équation différentielle où l'on décrit la variation de chaque quantité durant un temps très court (*figure 14*).

## 1.2 Résolution

Ce système d'équations différentielles et ceux qui en découlent (en ajoutant d'autres variables...) peuvent parfois être résolus de manière analytique et on obtient alors des solutions littérales : sommes, produits, composées de diverses fonctions mathématiques. Dans certains cas, les systèmes d'EDO n'acceptent pas de solutions littérales évidentes et le seul recours est alors de simuler le système. On obtient alors des courbes, sans en connaître l'équation.

Techniquement, on va considérer que chacune des variables qui nous intéressent est une fonction du temps dont on connaît la valeur au temps initial. Les équations permettent de définir la valeur à un temps donné en fonction de l'état « juste avant ». De proche en proche, on trace les différentes courbes représentant l'évolution de ces variables. Les paramètres (probabilité d'infection, temps de demi-vie des cellules...) sont des inconnues auxquelles on va donner, plus ou moins aléatoirement différentes valeurs jusqu'à obtenir des courbes pour les variables (cellules, virus...) qui sont en accord avec les résultats expérimentaux. Cette étape d'ajustement peut être automatisée et différents algorithmes permettent de faire une recherche de paramètres relativement efficace.

## 2. La virologie en équations...

La plupart des études menées par le groupe de Perelson en particulier, mais aussi par la majorité des équipes de modélisateurs, s'attachent à une résolution littérale de ces systèmes. Dans ce cadre, les mécanismes biologiques sont simplifiés, en particulier, on ne prend pas en compte les aspects spatiaux du développement infectieux. De plus, il faut supposer que le système est à un équilibre, ce qui est rarement le cas dans les infections aiguës ou au début de la phase infectieuse. Loin de vouloir être ex-

haustive, cette introduction se propose de détailler certains des résultats obtenus avec le modèle de base (type TIV : target/infected/virus = SIV : saines/infectées/virus) en particulier dans le cas des infections par HIV et HCV. On détaillera ensuite d'autres modèles à titre d'exemple, certains très élaborés du point de vue de la compréhension moléculaire du cycle viral ou intégrant des aspects spatiaux ou les interactions avec le système immunitaire<sup>5</sup>.

## 2.1 Avoir accès à des données non mesurables

On considère qu'en moyenne il faut 10 ans au HIV depuis l'infection initiale pour établir le SIDA. Si des prélèvements sont réalisés régulièrement chez un patient chronique, on constate que la charge virale n'évolue pas significativement. On en avait déduit que le HIV se réplique à très faible taux. Or durant les phases d'essais cliniques de certains antirétroviraux, on a pu observer une diminution très sensible (près de 2 log) de la quantité d'ARN viraux durant les premières phases de traitement. Le modèle SIV a été employé pour modéliser cette infection persistante par HIV.

A partir de ces équations, on peut avoir accès à la vitesse de production des particules virales ainsi qu'à la vitesse de clairance de l'infection. C'est ainsi qu'il a été mis en évidence que même si la charge virale de patients HIV+ était constante au cours du temps, il s'agissait en fait de la somme d'une très rapide et importante production de particules virales associée à un taux de clairance très rapide lui aussi. Ceci permet d'envisager un effet rapide des inhibiteurs de protéases et de réplases comme il a été observé. Compte tenu de la probabilité de mutation au sein du génome, on a pu également montrer que le virus pouvait très rapidement devenir résistant au moindre traitement, d'où l'intérêt d'utiliser plusieurs molécules en parallèle (Mittler et al., 1999; Mittler et al., 1998; Perelson et al., 1997a; Perelson et al., 1997b; Perelson et al., 1996).

---

<sup>5</sup> Cependant, on gardera à l'esprit que d'autres systèmes de modélisations existent tels que les réseaux de Pétri ou les études par biostatistiques, que nous ne détaillerons pas ici.

D'une manière générale, ces modèles permettent d'avoir accès à des paramètres non mesurables du virus : l'efficacité infectieuse, l'efficacité de production, le temps de demi-vie... et ainsi de donner une base pour améliorer les vaccins existants ou les antiviraux. On a accès à un laboratoire virtuel.

## 2.2 Optimiser et contrôler la production de particules virales

Un certain nombre d'études se sont portées sur la génération de particules défectives, autant pour comprendre les mécanismes que pour l'appliquer éventuellement à des fins thérapeutiques, en généralisant la notion de parasite ou de coinfection. Par rapport aux modèles précédents, on ajoute une équation sur les cellules infectées par une seule des espèces virales et une autre sur les cellules infectées par les deux.

Avec une optique « écologique » de compétition proie/prédateur, McLeod et coll montrent que la production de particules virales défectives est favorisée par le système immunitaire et peut conduire, selon l'efficacité du phénomène à l'élimination de l'infection (McLeod and Burroughs, 2000). Ils ajoutent que la vitesse de remplacement des cellules est aussi un facteur clef. Une population cellulaire qui se renouvelle rapidement aura tendance à favoriser une infection persistante, avec peu de particules virales sauvages (d'origine) et un haut taux de particules défectives (McLeod and Burroughs, 2000). D'autres études permettent de vérifier que s'exerce une sélection de différents variants, que la situation n'est pas figée et dépend de l'agressivité de la souche et des conditions de l'individu : il faut une souche efficace mais habile à se camoufler (Ball et al., 2007; Frank et al., 1999; Frank, 2000; Landi et al., 2008; Nelson and Perelson, 1995; Novella et al., 2004; Novella and Ebendick-Corpus, 2004 ).

Dans un contexte semblable, Coombs et d'autres ont eu pour but d'optimiser la production de particules virales. Les modèles de type SIV employés mettent en avant l'importance du taux de production des particules virales mais également le fait qu'un taux d'encapsulation intermédiaire est préférable. Ils peuvent également définir un seuil au-delà duquel le virus peut persister (Coombs et al., 2003; Krakauer and Komarova, 2003; Mohler et al., 2005). On revient donc sur des notions basiques d'efficacité

à toutes les étapes du cycle viral mais pas de manière excessive. Le problème reste cependant d'adapter ensuite ces données dans un champ plus expérimental.

### 2.3 Un virus contre un virus, *in silico*

Certaines études ont montré que la coïnfection d'une population cellulaire par deux virus pouvait entraîner le déclin de l'un d'entre eux. C'est le cas entre le virus de la rougeole et le HIV (Garcia et al., 2005). Un travail de modélisation en particulier met aussi ces résultats en avant (Revilla and Garcia-Ramos, 2003). Par rapport au modèle de base SIV, on rajoute, une autre population cellulaire, doublement infectée et un deuxième virus, exclusivement produit par cette dernière population cellulaire. Cette étude n'a pas été uniquement réalisée par simulation numérique puisqu'il existe des solutions littérales.

De leurs résultats, les auteurs déduisent 3 états d'équilibre au système, c'est à dire 3 issues possibles : la survie d'aucun virus (rémission/guérison totale), une infection persistante par le premier virus avec la disparition totale du deuxième (échec de la thérapie), ou un équilibre entre les deux virus : infection persistante par les deux espèces. Chacune des issues dépend en particulier de la vitesse à laquelle se répliquent et se dégradent les virus. Même s'il y a peu de chance que l'on puisse concevoir un virus dont les caractéristiques correspondent à ces valeurs, on peut cependant essayer de s'en rapprocher. Cependant, il est bien mentionné que ce modèle n'est valable qu'en absence du système immunitaire c'est à dire dans les phases précoces ou dans les phases tardives de l'infection par le VIH (Revilla and Garcia-Ramos, 2003) (*figure 15*).

## 3. Des modèles originaux

En marge des modèles dérivés du modèle SIV, certains groupes ont mis au point d'autres approches.

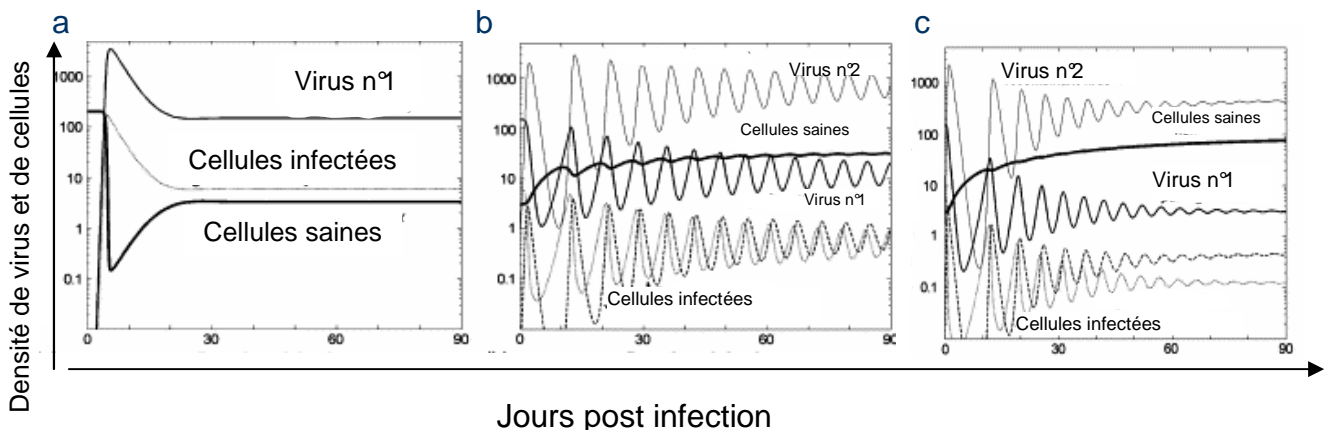
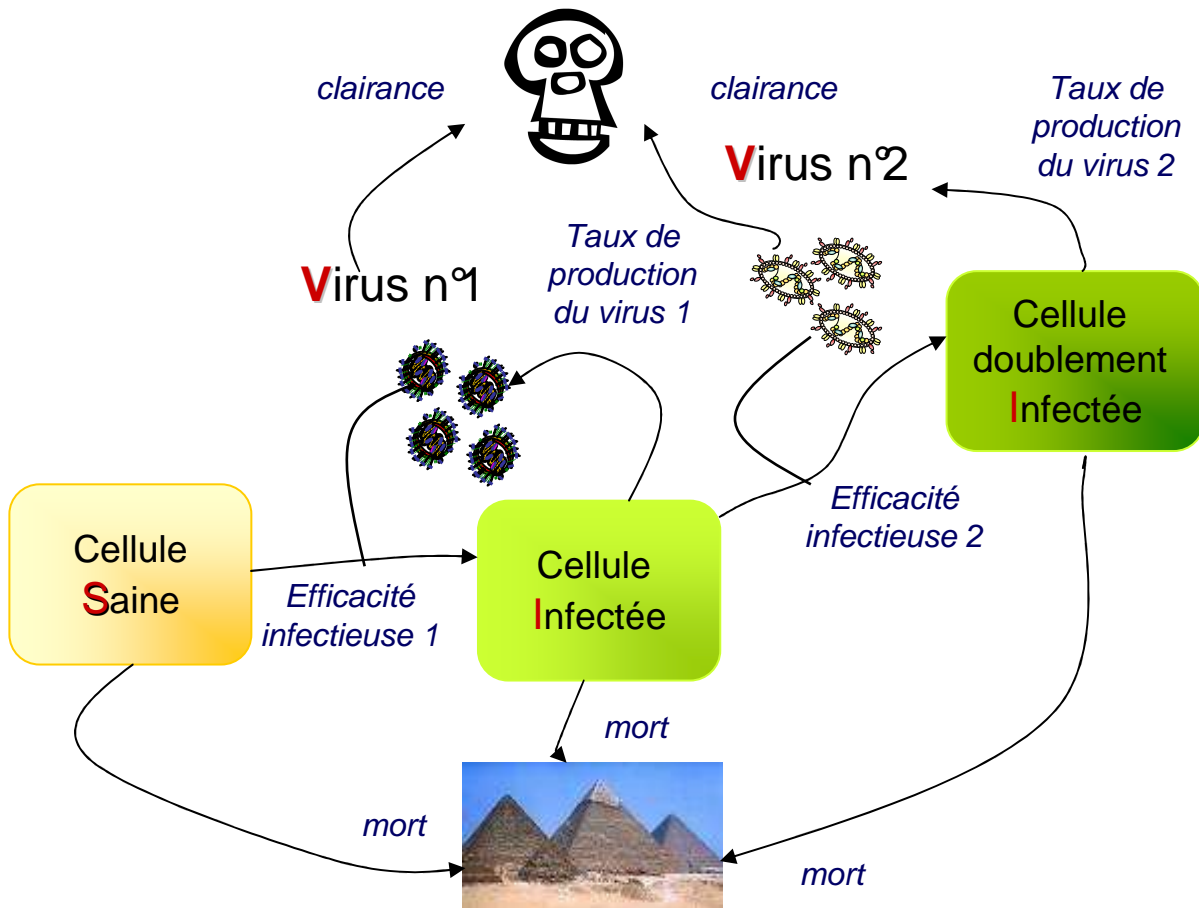
$$\frac{d(\text{Cellule\_Saine})}{dt} = \text{naissance} - \text{mort} - (\text{efficacité\_Infectieuse1} \times \text{Virus1} \times \text{Cellule\_Saine})$$

$$\frac{d(\text{Cellule\_Infecté1})}{dt} = (\text{efficacité\_Infectieuse1} \times \text{Virus1} \times \text{Cellule\_Saine}) - \text{mort} - (\text{efficacité\_Infectieuse2} \times \text{Virus2} \times \text{Cellule\_Infecté1})$$

$$\frac{d(\text{Virus1})}{dt} = \text{taux\_de\_production\_de\_virus1} \times \text{Cellule\_Infecté1} - \text{clairance} \times \text{Virus1}$$

$$\frac{d(\text{Cellule\_Infecté2})}{dt} = \text{efficacité\_Infectieuse2} \times \text{Virus2} \times \text{Cellule\_Infecté1} - \text{mort}$$

$$\frac{d(\text{Virus2})}{dt} = \text{taux\_de\_production\_de\_virus2} \times \text{Cellule\_Infecté2} - \text{clairance} \times \text{Virus2}$$



**Figure 15 : Le modèle SIV et coinfection**

En haut, un schéma représentant le modèle employé par Revila et al. ,2003.

En bas, résultats de leurs simulations.

Conditions initiales : cellules saines = 200, virus n°1, MOI=10<sup>-6</sup>

a. Modèle SIV

b. Modèle SIV avec coinfection, les efficacités infectieuses sont égales, taux de production du virus 2 = 2000 (unités arbitraires)

c. Modèle SIV avec coinfection, l'efficacité infectieuse du virus 1 est égale à 4 fois celle du virus 2

### 3.1 Une analyse très précise de HIV

Dans le cas du HIV, on a accès à certaines données quantitatives permettant de mieux appréhender la biologie de ce virus. Ainsi en 1999, Reddy et Yin ont mis en place un modèle très précis sur les cinétiques intracellulaires de la réplication de HIV1 (Reddy and Yin, 1999). Ils se sont basés sur un système d'équations différentielles dont ils ont simulé les solutions. Leur modèle tient compte des différentes phases du cycle réplicatif (reverse transcription, import nucléaire, intégration au génome, transcription, épissage et export des ARNm, traduction, assemblage et bourgeonnement). Ils mettent à profit des données chiffrées précises sur les constantes cinétiques de différentes réactions enzymatiques ou de temps de demi-vie des différents acteurs moléculaires. Au final, les courbes obtenues théoriquement (concentration des différents éléments viraux au cours du temps), s'accordent bien avec les résultats expérimentaux. Ils insistent cependant sur le nombre d'interactions qu'ils ont évidemment dû négliger ainsi que sur l'absence de données sur des mécanismes tels que le bourgeonnement. C'est à l'heure actuelle un des modèles les plus détaillés sur les mécanismes viraux (Reddy and Yin, 1999).

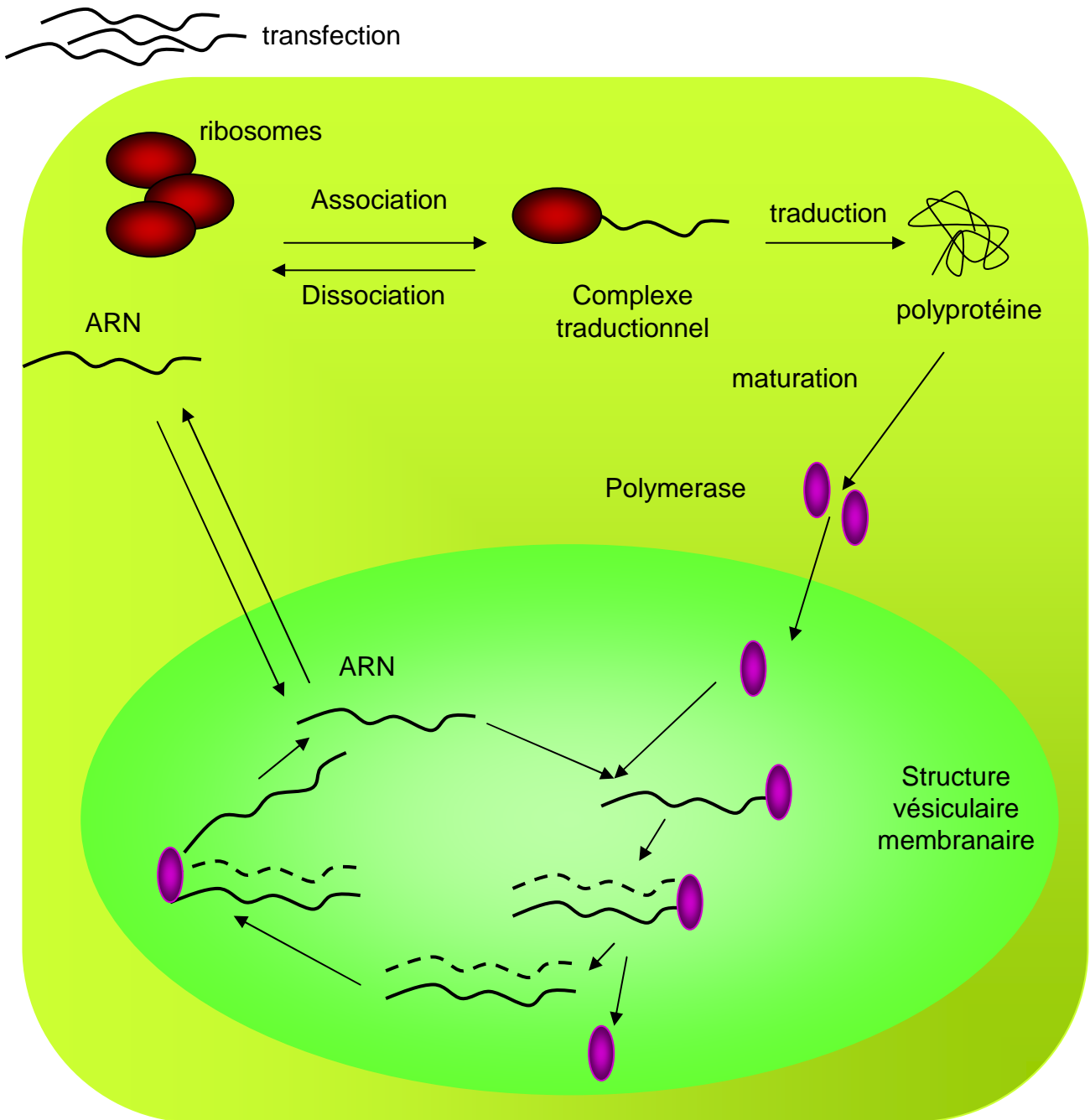
### 3.2 HCV *in vitro* et *in silico*

Dans une optique similaire, une étude récente a permis de mieux appréhender la réplication de HCV *in vitro*. Son but était de retranscrire ce qu'on savait des mécanismes impliqués dans le cycle réplicatif et éventuellement de comprendre certains résultats expérimentaux sans explication intuitive (Dahari et al., 2007b) (*figure 16*).

Le système d'équation employé dans ce cas-là reprend selon la même logique que SIV l'évolution des quantités des différentes espèces moléculaires d'intérêt. L'originalité de l'approche est de considérer deux compartiments entre lesquels des échanges ont lieu.

Cette étude a montré que seule la quantité de ribosomes accessibles à l'infection module la quantité de polymérase virales. En se basant sur les résultats expérimen-





**Figure 16 : Modèle de la réplication de HCV dans les cellules HuH-7**

Chacune des flèches représente une équation. Chaque figuré représente un paramètre quantifié par le système d'EDO. Par souci de lisibilité, n'ont pas été représentées les flèches signifiant la dégradation de chaque molécule/complexe.

taux donnant la quantité de chaque espèce moléculaire d'intérêt, ils ont pu définir des valeurs pour l'affinité de la polymérase pour ces substrats, la vitesse d'entrée et de sortie de chaque compartiment et ainsi mieux appréhender la biologie de ce virus, *in vitro*.

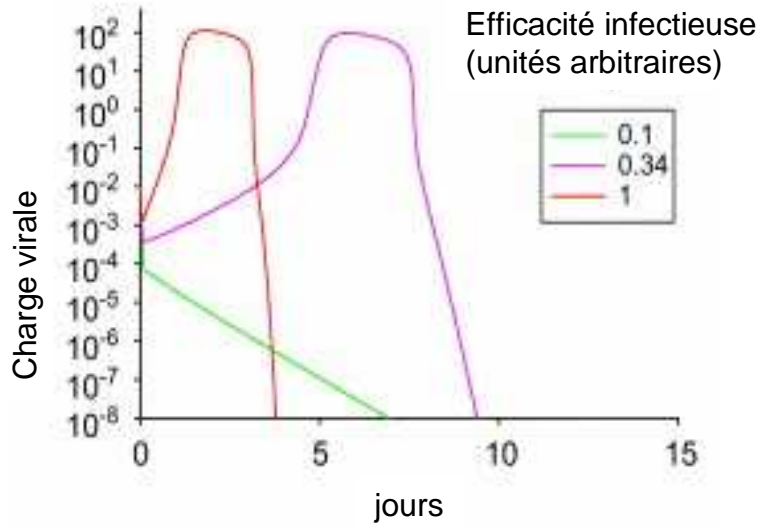
Afin d'optimiser la production de particules virales en cellules Huh7, ils ont testé l'effet de transfections avec l'intermédiaire de réplication et montré que sans affecter l'état stationnaire, cette technique pouvait accélérer son établissement. Enfin, pour tester l'importance de la compartimentation dans le phénomène répliatif de HCV, les auteurs ont testé leur modèle, sans compartimentation et obtiennent des résultats très différents des résultats expérimentaux (Dahari et al., 2007b).

### 3.3 Influenza sous tous ses aspects

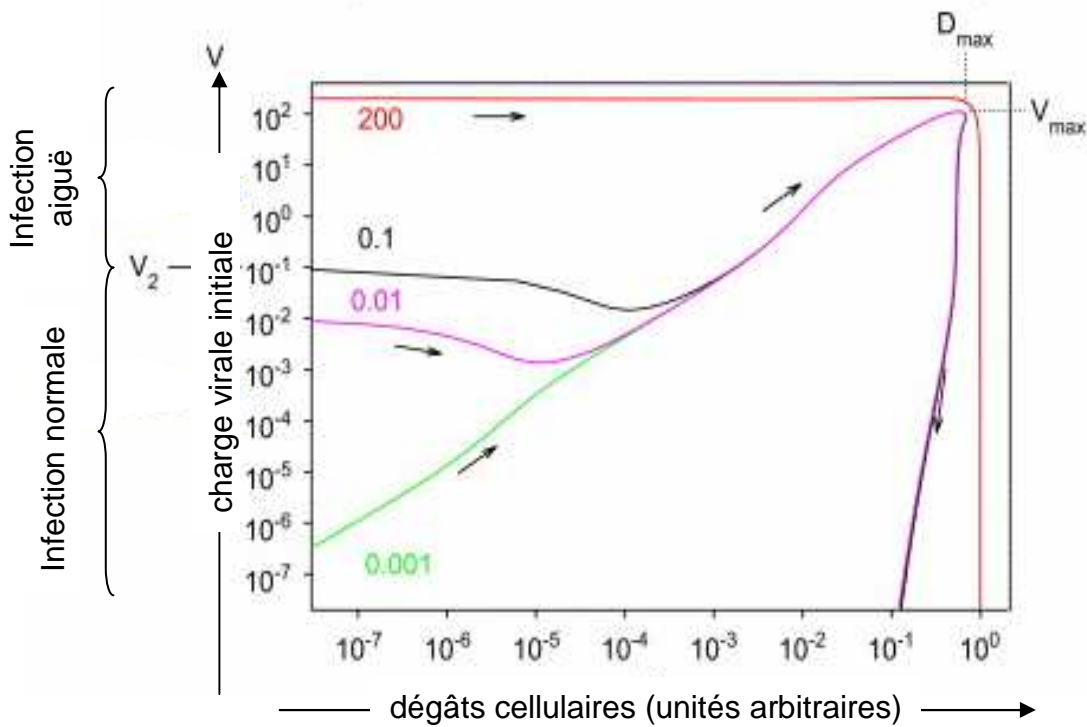
Très récemment, une étude par ODE a été réalisée sur le virus influenza (Hancioglu et al., 2007). Il y est détaillé plusieurs populations cellulaires : saines, infectées, résistantes, mortes, effectrices de l'immunité, présentatrices de l'antigène, productrices d'anticorps... A travers cette modélisation, on a pu étudier l'impact de la charge virale initiale, de la virulence du pathogène ou de l'importance de la réponse IFN. Si leur modèle donne des solutions cohérentes avec les résultats expérimentaux, on peut, comme ils le font eux-mêmes critiquer la simplicité de leur système (malgré les 10 équations et les 27 paramètres). Ils s'accordent sur le fait que leurs résultats ne constituent une fois de plus que les bases d'un travail à plus grande échelle. En particulier, leur interprétation du rôle des IFN dans le contrôle de la production virale (limiter la croissance cellulaire et rendre les cellules résistantes à l'infection) manque de nuances (*figure 17*).

Cependant, cela reste à l'heure actuelle l'un des modèles par EDO les plus poussés pour la description du jeu entre virus et système immunitaire. Ils donnent une optique quantitative à des observations simples : pour une dose initiale infectieuse faible, on obtient un statut asymptomatique (sans éveil du système immunitaire ni production intense de virions), pour une dose intermédiaire, on observe un déroulement

A



B



**Figure 17 :** quelques résultats issus de Hancioglu et al. sur la dynamique d'infection par influenza

A. Suivi cinétique de la quantité de particules virales produites en fonction de l'efficacité infectieuse  
B. Diagramme de phase comparant la charge virale à l'origine (en ordonnée) et les dégâts cellulaires (en abscisse) pour une même efficacité infectieuse. Les flèches indiquent l'écoulement du temps

classique de l'infection mais, stochasticité oblige, l'issue en est variée alors que pour une charge virale initiale importante, l'issue est beaucoup plus sévère. Au final, il est donc possible de décrire objectivement et quantitativement une infection virale (Hancioglu et al., 2007).

## **4. Immunovirologie : la modélisation lève l'imbroglie**

### **4.1 Interféron et HCV, une partition à écrire**

Toujours en partant du modèle simple SIV, Perelson et al ont proposé certaines hypothèses pour le mode d'action du traitement IFN de patients infectés par HCV (Dixit et al., 2004). Ils considèrent que les patients sont dans un état stable, compte tenu de l'avancée de l'infection. Leurs modèles peuvent alors s'appliquer. D'après leurs analyses mathématiques, deux mécanismes sont possibles pour l'action de l'IFN :

\_une première phase (au cours de laquelle la virémie descend rapidement) durant laquelle l'IFN bloquerait la production virale, proportionnellement à la dose utilisée (jusqu'à une valeur plateau de 10mIU).

\_une deuxième phase durant laquelle l'IFN agirait sur la durée de vie des cellules infectées.

Ces résultats sont obtenus en se basant sur la notion de phase d'éclipse : entre le temps d'infection d'une cellule et le moment où elle commence à produire activement du virus, il y a un laps de temps pouvant aller jusqu'à un jour alors que l'effet de l'interféron prend moins de 7 heures à se mettre en place. Les deux phases observables dans l'efficacité du traitement laissent penser à deux mécanismes en relais. Pour vérifier leurs hypothèses, le système SIV a été modifié en ajoutant un facteur d'efficacité (de l'IFN) qui diminue la quantité de particules virales produites par les cellules infectées ce qui permet d'obtenir une réponse littérale pour la quantité de particules virales, en accord avec les résultats expérimentaux.

## 4.2 Les lymphocytes T, des acteurs sans texte

Même si le système immunitaire est primordial pour gérer les infections virales persistantes, on ignore encore le rôle précis de chacun de ses compartiments. En particulier, le rôle des réponses cytotoxiques (médiées par les cellules CD8+) et non cytotoxiques (médiées par les cellules CD4+) reste très flou. Qu'il s'agisse des infections par HIV, HBV, HCV, SiV (Simian Immunodeficiency Virus) ou bien encore HTLV1, le rôle des cellules cytotoxiques ainsi que les conditions dans lesquelles s'établissent la chronicité de l'infection sont débattues.

### *a) Avec HBV, des rôles discutables*

Les travaux de Perelson menés sur HBV se basent sur les précédents résultats obtenus sur HIV. Dans deux articles récents (Ciupe et al., 2007a; Ciupe et al., 2007b), le modèle SIV est adapté en distinguant deux sous populations de cellules infectées (selon la quantité de génome viral qu'elles contiennent) et font intervenir des cellules immunitaires luttant contre l'infection. Les données expérimentales proviennent de l'analyse de 7 patients infectés. Grâce à des données de la bibliographie et à différents simulations, ces travaux donnent des estimations de l'ensemble des paramètres d'intérêt du modèle, en particulier, la vitesse de mort des cellules infectées, le temps d'émergence d'une réaction immunitaire, l'impact des cellules infectées sur cette génération... La conclusion de leurs résultats est qu'une réaction immunitaire non cytotoxique n'a vraisemblablement aucun rôle dans le contrôle de l'infection chronique par HBV mais qu'au contraire on peut distinguer deux phases : une précoce durant laquelle la réponse non cytotoxique est primordiale, une seconde tardive au cours de laquelle la réponse cytotoxique est majoritairement impliquée. De plus, on apprend que la vitesse à laquelle les cellules hépatiques se reproduisent est un facteur critique pour comprendre la clairance d'une infection aiguë.

En revanche, leur modèle ne montre pas de différences significatives si l'on considère un seul pool de cellules infectées alors qu'expérimentalement, c'est un facteur clef. De même, selon les valeurs employées, ils obtiennent un pic de 99% de mor-

talité pour les cellules infectées, ce qui est en contradiction avec les observations sur la survie du foie. L'hypothèse de cellules réfractaires à l'infection est fort peu probable et pourtant pour valider leur système, ils doivent faire l'hypothèse que les cellules nouvellement produites le soient, peut-être via des cytokines qui établissent un état antiviral préventif. Ce modèle permet ainsi de révéler certains des mécanismes sous-jacents impliqués dans l'issue d'une infection : chronicisation ou élimination du virus. Ces résultats avaient déjà été évoqués dans des publications moins récentes (Murray et al., 2005; Whalley et al., 2001). Le « tout cytotoxique » n'est donc pas la bonne solution pour contrer l'infection virale : il faudrait détruire l'équivalent de 11 foies (en quantité de cellules disponibles) pour éliminer HBV. Dans ce modèle, les lymphocytes T non cytotoxiques inhibent la réplication virale en diminuant la demi-vie de la matrice ADN du virus HBV (Ciupe et al., 2007b).

### *b) Questionner l'ambiguïté et améliorer les diagnostics*

Selon un principe similaire, divers groupes ont abouti à des conclusions semblables sur HIV (Murray et al., 1998; Rouzine et al., 2006) et HCV (Dahari et al., 2007a; Dahari et al., 2005; Dahari and Perelson, 2007; Perelson, 1999; Perelson et al., 2005), expliquant la nature biphasique de l'infection (aiguë puis chronique) par la mise en place progressive de l'immunité. Wick annonce entre 0,7 et 3 cellules tuées par jour par CTL suite à une infection par HIV (Wick et al., 2005). Wodarz insiste sur le caractère à double tranchant d'une forte réponse CD4 : ces cellules limitent l'infection (ce sont des cellules immunitaires) mais la favorisent également (ce sont des réservoirs pour le virus) (Wodarz and Hamer, 2007). Guedj et al, en se basant sur leur modèle en EDO, insistent sur l'importance de pratiquer d'autres analyses chez les personnes atteintes du SIDA afin de prévoir l'avancement de la maladie : en plus du relevé des lymphocytes T CD4+ et de la charge virale, il faudrait avoir accès au nombre de cellules infectées et au pourcentage de cellules activées par exemple (Guedj et al., 2007a; Guedj et al., 2007b).

L'augmentation du turnover des cellules immunitaires est une constante des infections lentivirales et semble une hypothèse intéressante pour expliquer la lymphopénie observée. Dans le cas du SiV, Kaur et coll. ont montré que ce n'était pas le cas (Kaur et al., 2008). La modélisation mathématique de leurs propres mesures expérimentales met en évidence différents groupes de cellules mémoire, dont la vitesse de prolifération est inversement proportionnelle au nombre de cellules présentes. Ils montrent de même que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> prolifèrent plus que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ce qui permettrait de maintenir un nombre correct de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (avec les mêmes contraintes que dans le cas de HIV). D'autres équipes (Mandl et al., 2007; Regoes et al., 2004) se sont également penchées sur le rôle des CD8<sup>+</sup>, se contentant généralement de traduire les données expérimentales sans pour autant approfondir les résultats obtenus.

D'une manière générale, les résultats obtenus sont en accord avec l'intuition que l'on avait et ne constituent que les bases pour développer des approches de plus en plus complexes afin de mieux appréhender la logique virale. Les modèles serviraient donc à valider les hypothèses intuitives que forment les biologistes au sortir de la pailasse.

## **5. Des modèles en temps... et en espace**

### **5.1 Automates cellulaires et influenza**

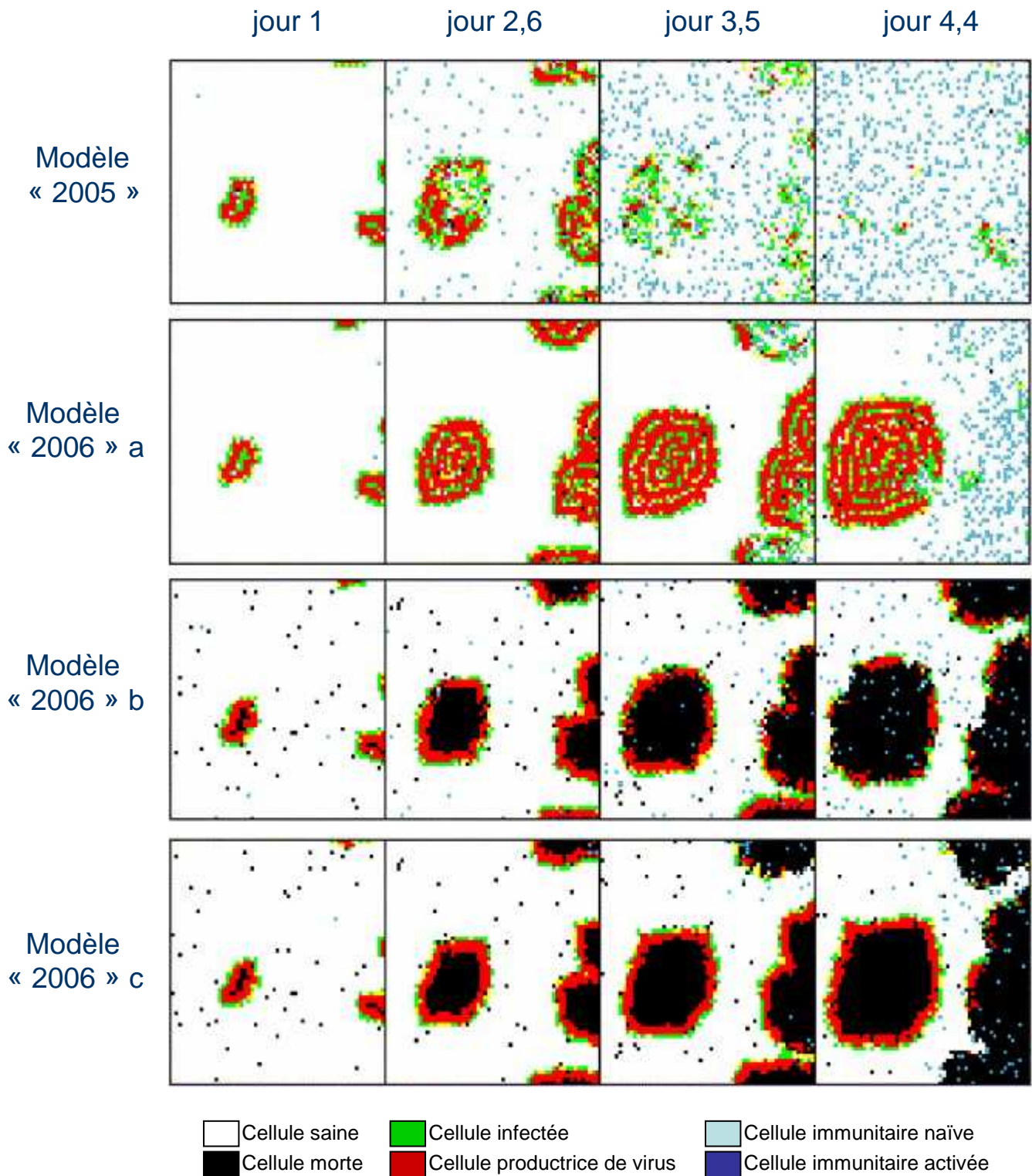
L'une des limitations des études par EDO est qu'elles ne prennent pas en compte des aspects spatiaux du développement viral, mais se limitent à une étude globale, moyenne des phénomènes. Catherine Beauchemin, sur ce principe, a développé une approche d'automates cellulaires sur le virus influenza A. Dans un premier temps, elle s'est basée, sur les travaux de modélisation par ODE publiés une dizaine d'années auparavant. Le constat qu'elle fait est simple. Elle considère un tapis de cellules épithéliales (cibles du virus influenza) qu'elle assimile à une matrice. Sur cette matrice se

déplacent des cellules immunitaires. On considère au départ un certain nombre de cellules épithéliales infectées. La transmission de l'infection se fait de cellule à cellule. Elle distingue les cellules saines, des cellules infectées et des cellules exprimant les protéines virales (et donc infectées depuis un temps donné). Les cellules immunitaires qui se déplacent aléatoirement sur la matrice de cellules épithéliales sont d'abord dans un état immature. Quand elles entrent en contact avec une cellule exprimant les protéines virales, elles les reconnaissent et deviennent matures. Elles recrutent alors des cellules immunitaires immatures. Toutes les cellules ont une durée de vie précise et peuvent mourir des suites de l'infection.

Dans son premier article (Beauchemin et al., 2005), C. Beauchemin discute de l'importance de chacun des paramètres qu'elle peut faire varier : la vitesse de déplacement des cellules immunitaires (qui semble être un paramètre crucial), leur durée de vie (qui, compte tenu du temps maximal d'infection, n'entre pas en jeu), du temps de division des cellules épithéliales et de leur survie... Cela lui permet de se concentrer sur certains paramètres cruciaux et de lancer éventuellement de nouvelles pistes d'investigation pour les chercheurs.

Cependant, dans un article plus récent (Beauchemin, 2006), elle revient sur ce modèle en questionnant certaines hypothèses trop légères. En particulier, elle revient sur l'importance de la distribution initiale des cellules infectées (aléatoire dans le précédent modèle), la multiplication des cellules saines (qui pouvaient apparaître au milieu de cellules infectées précédemment) et également une règle plus « réaliste » sur la prolifération des cellules immunitaires. Plus en accord avec les observations (quoique dans le modèle précédent, certaines des observations corrélaient très bien avec les mesures expérimentales) (*figure 18*), ce nouveau modèle a, entre autre, mis en évidence l'existence d'infection chronique dans certains cas. Cependant, comme elle le mentionne, la quantité très faible de cellules infectées productrices dans ce cas là, ne permettraient pas de les détecter. On peut cependant s'interroger sur l'existence, et le cas échéant, l'impact de ces infections persistantes par influenza A. Au final, ce modèle





**Figure 18 : Images ‘time lapse’ de différentes simulations d’infection de cellules épithéliales selon les modèles de Beauchemin et al.**

Les cellules saines sont indiquées en blanc. Plus la cellule infectée exprime d’antigènes viraux plus sa couleur évolue (vert, rouge puis noir quand elle meurt). Les cellules immunitaires sont représentées en bleu,

La première ligne correspond aux résultats avec le modèle du premier article (modèle 2005). On voit une nette différence par rapport à la deuxième version du modèle. Les trois dernières lignes représentent l’évolution du tapis cellulaire pour différentes conditions (régénération des cellules épithéliales et distribution des cellules immunitaires, aléatoires (modèle 2006 a) ou conditionnées par l’environnement (modèles 2006 b et c))

est encore à affiner, actuellement dans les locaux... de Perelson (Beauchemin et al., 2007).

De bons modèles ?

La prise en compte des aspects spatiaux du développement infectieux permet entre autre de ne plus observer les oscillations caractéristiques des solutions du modèle SIV (Funk et al., 2005). Un modèle d'automate cellulaire a également été mis en place pour étudier HBV (Xiao et al., 2006).

## 5.2 Cellules, IFN, virus, on mixe le tout...

Une étude réalisée par T Howat (Howat et al., 2006), permet de visualiser les interactions entre l'IFN  $\beta$  et HSV au cours de l'infection de cellules MDBK. Le tapis cellulaire est assimilé à une matrice dont les cases seraient hexagonales et distinguent des cellules susceptibles, infectées, mortes ou dans un état antiviral. Chaque cellule interagit avec ses voisines (18 dans le voisinage immédiat ou presque). Elle peut produire des particules virales ou de l'IFN. Virions et cytokines se déplacent à la surface cellulaire selon des cinétiques arbitraires. La transition d'un état sain à un état infecté ou d'un état sain à un état résistant s'opère selon des probabilités choisies aléatoirement et dont on teste les effets. Les résultats obtenus sur le développement des plages de lyse et sur la production d'IFN sont cohérents avec leurs observations expérimentales. Cette étude se conclut sur l'importance de la charge virale initiale, en désignant 3 valeurs seuil : une de l'ordre du centième de pfu par cellule qui permet aux cellules de revenir à un état intact au bout de plusieurs jours, une de l'ordre du dixième de pfu par cellule qui permet la plus forte production d'IFN par les cellules et une proche de 1 qui est le seuil à franchir pour obtenir la plus grande production de virus au détriment de la mort de l'ensemble du tapis cellulaire. Cette étude, basée sur des observations simples et un modèle qui l'est tout autant, met en avant des conclusions intéressantes du point de vue biologique (y compris l'intérêt de pré traiter les cellules avec l'IFN pour minimiser l'impact de l'infection). C'est un exemple de travail illustrant de manière spatia-

le la nature dynamique des interactions entre virus et système immunitaire (Howat et al., 2006).

D'autres études avaient été menées sur les IFN (Bazhan and Belova, 1999 ; Halford et al., 2005) et corroborent l'intérêt d'un prétraitement des cellules avec l'IFN pour lutter contre l'infection virale. De plus, les effets des IFN  $\beta$  et  $\gamma$  seraient multiplicatifs face à HSV (Halford et al., 2005).

Malgré quelques franches réussites et un intérêt indéniable en pharmacologie et en vaccinologie, la modélisation mathématique de la virologie en reste à ses balbutiements. A l'heure actuelle, elle se borne à retranscrire les observations des expérimentateurs. Loin d'être la solution à toutes les questions, il faut la considérer comme un nouvel outil que le développement de l'informatique permet peu à peu d'employer à sa pleine puissance. Insidieusement, le formalisme mathématique met à mal certains des doutes et des flous du biologiste, il ouvre de nouvelles perspectives et permet au final d'avoir une vision intégrée qui manque cruellement face à l'afflux continu de données expérimentales. En particulier, on peut apprécier la souplesse logistique des expériences de modélisation. De plus, le fait de pouvoir tester des hypothèses biologiques réalistes mais irréalisables à la paillasse est un atout majeur. La modélisation et l'interdisciplinarité de manière générale sont en plein développement et même si pour l'instant, les avancées restent anecdotiques, de nouveaux efforts sont de plus en plus prometteurs.

# Objectifs



La vaccination contre la rougeole est aujourd'hui encore le seul moyen de lutte contre cette maladie. La mise au point des vaccins utilisés actuellement se base essentiellement sur la faculté des souches sauvages de VR à s'adapter à un nouveau contexte cellulaire au dépens de leur pathogénicité chez l'homme. Si le principe général de cette technique est facile à interpréter dans une optique écologique, les bases moléculaires permettant d'achever ces processus n'en restent cependant toujours pas élucidées.

Afin d'endiguer une infection virale, le système immunitaire met en place très précocement une réponse IFN de type I. L'efficacité protectrice des vaccins anti-rougeoleux pourrait faire intervenir ces molécules au large spectre d'effets. Le but de mes travaux de thèse était donc de relier l'adaptation du VR (et son atténuation) au système IFN de type I afin, à long terme, de mieux appréhender la vaccination mais aussi de mieux contrôler les IFN  $\alpha/\beta$ .

Dans un premier temps, j'ai caractérisé l'efficacité infectieuse d'une souche sauvage (G954-PBL) et d'une souche dérivée de celle-ci par adaptation aux cellules Vero (G954-V13). Cette étude a été réalisée à différentes échelles et a permis de mettre en évidence que l'atténuation du VR (vérifiée dans un modèle de souris transgénique) ne mettait pas forcément en jeu le système IFN de type I en dépit de mutations affectant les protéines virales connues pour interférer avec ces molécules (P/V/C). De plus, nous remettons en question des paradigmes trop longtemps acceptés tels que la résistance des souches sauvages au système IFN de type I et leur faible capacité inductrice ([article 1](#)).

Au cours de ces expériences, le suivi cinétique de la production de particules infectieuses et d'IFN de type I par des PBMCs infectés a clairement mis en évidence les liens très forts et mal définis entre efficacité infectieuse et induction de réponse IFN. En effet, la production de particules virales dépend de l'efficacité répliquative intrinsèque de la souche virale mais également de la physiologie cellulaire (et pas uniquement de la présence ou absence du/des récepteurs). De plus, la mise en place (et le maintien ?) d'une réponse antivirale est initiée par l'infection et tend à éliminer cette dernière. Ces interrelations difficiles à explorer m'ont conduit à développer une approche

mathématique de l'infection rougeoleuse. A l'heure actuelle, nous nous sommes concentrés sur la caractérisation de la polymérase virale et avons développé un modèle à mi chemin entre les modèles basés agents, les automates cellulaires et les systèmes d'équations différentielles ([article 2](#)).

En marge de ces travaux, des activités collaboratives, toujours en lien étroit avec le VR ont permis de mettre en évidence que la fusion initiée par l'infection rougeoleuse était un mécanisme d'induction de l'IFN de type I ([article 3](#)). En outre, une étude similaire à celle que nous avons menée, utilisant des outils différents, relie des différences génétiques entre souches du VR, l'efficacité répliquative, l'induction d'IFN et l'utilisation spécifique de CD46 ou CD150 ([article 4](#)).

Le modèle de souris transgéniques pour CD150 développé au sein du laboratoire a permis également de s'intéresser à la branche adaptative du système immunitaire ([article 5](#)).

Les travaux présentés ici s'attachent donc à (re)définir les liens entre virus de la rougeole et système IFN de type I ou le système immunitaire en général. Au travers d'approches expérimentales plus ou moins traditionnelles, ils questionnent les notions les plus élémentaires des relations entre virus et cellules.

# Résultats





**ARTICLE I**

Wild type measles virus attenuation independent of  
type I IFN.

**Druelle J, Sellin CI, Waku-Kouomou D, Horvat B, Wild FT**

Virology Journal. 2008 Feb 3;5:22



G954-PBL est la souche sauvage de référence du laboratoire de T.Fabian Wild, isolée à partir de lymphocytes d'un enfant infecté et propagée sur des PBMCs. Adaptée aux cellules Vero par 13 passages successifs, cette souche enregistre 5 mutations affectant les protéines P/V/C et M (*tableau 1*). En accord avec des résultats publiés précédemment, la souche adaptée, G954-V13, n'induit pas de syncytia sur les cellules Vero, à l'instar de la souche dont elle dérive et en dépit de l'expression abondante de protéines virales à la surface de ces cellules. L'expression de CD150 permet d'observer l'effet cytopathique caractéristique du VR.

L'infection intranasale de souris transgéniques pour le CD150 humain avec la souche G954-PBL conduit invariablement à la mort des animaux. En revanche, la souche adaptée infecte les animaux, comme le prouve la présence d'une réponse anticorps dirigée contre la protéine N du VR chez les animaux infectés mais n'a pas d'effet létal. Cette atténuation n'est pas basée sur l'inactivation d'IFNAR, récepteur des IFN de type I, en dépit des mutations au niveau des protéines P/C/V (*tableau 2*).

*In vitro*, il apparaît que les infections par les souches G954 sont restreintes aux types cellulaires auxquels ces virus sont adaptés. Ainsi, G954-PBL se développe intensément et rapidement au sein des PBMCs mais pas au sein des cellules Vero, au contraire de la souche G954-V13 (*figure 1* et *tableau 3*). Quand les cellules sont (pré)traitées avec de l'IFN de type I afin de mimer l'établissement de cette réponse antivirale, l'infection s'opère selon les mêmes limitations. On notera cependant que dans un contexte cellulaire qui les désavantage, les souches G954 sont plus sensibles à l'effet des IFN de type I (*figure 2* et *tableau 4*).

Des résultats publiés précédemment prônaient que les souches sauvages n'induisaient pas d'IFN de type I. Nous montrons que G954-PBL induit la production de 10 fois plus d'IFN que la souche adaptée, G954-V13, et autant que la souche vaccinale Edmonston Zagreb par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (*figure 3*). Les pDCs peuvent donc être considérées dans le contexte d'infection rougeoleuse comme les principales productrices d'IFN de type I, en dépit d'une infection par le VR efficace mais abortive (*tableau 3*).

Ainsi, à peine 5 mutations affectant M et P/V/C peuvent profondément altérer la pathogénicité du VR sans faire intervenir le système IFN de type I.

L'ensemble de ces résultats a été publié sous la forme de l'article I, suivant.

Research

Open Access

## Wild type measles virus attenuation independent of type I IFN

Johan Druelle\*<sup>1</sup>, Caroline I Sellin<sup>1</sup>, Diane Waku-Kouomou<sup>1,2</sup>,  
Branka Horvat<sup>1</sup> and Fabian T Wild<sup>1,2</sup>

Address: <sup>1</sup>Inserm, U758, Lyon, F-69365 France ; Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, F-69007 France ; IFR128 BioSciences Lyon-Gerland Lyon-Sud, Université de Lyon 1; 21 Avenue Tony Garnier, 69365 Lyon Cedex 07 – France and <sup>2</sup>Centre National de Référence pour la Rougeole, Lyon, France

Email: Johan Druelle\* - [druelle@cervi-lyon.inserm.fr](mailto:druelle@cervi-lyon.inserm.fr); Caroline I Sellin - [sellin@cervi-lyon.inserm.fr](mailto:sellin@cervi-lyon.inserm.fr); Diane Waku-Kouomou - [waku@cervi-lyon.inserm.fr](mailto:waku@cervi-lyon.inserm.fr); Branka Horvat - [horvat@cervi-lyon.inserm.fr](mailto:horvat@cervi-lyon.inserm.fr); Fabian T Wild - [fabian.wild@btinternet.com](mailto:fabian.wild@btinternet.com)

\* Corresponding author

Published: 3 February 2008

Received: 12 November 2007

*Virology Journal* 2008, 5:22 doi:10.1186/1743-422X-5-22

Accepted: 3 February 2008

This article is available from: <http://www.virologyj.com/content/5/1/22>

© 2008 Druelle et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

**Background:** Measles virus attenuation has been historically performed by adaptation to cell culture. The current dogma is that attenuated virus strains induce more type I IFN and are more resistant to IFN-induced protection than wild type (wt).

**Results:** The adaptation of a measles virus isolate (G954-PBL) by 13 passages in Vero cells induced a strong attenuation of this strain in vivo. The adapted virus (G954-V13) differs from its parental strain by only 5 amino acids (4 in P/V/C and 1 in the M gene). While a vaccine strain, Edmonston Zagreb, could replicate equally well in various primate cells, both G954 strains exhibited restriction to the specific cell type used initially for their propagation. Surprisingly, we observed that both G954 strains induced type I IFN, the wt strain inducing even more than the attenuated ones, particularly in human plasmacytoid Dendritic Cells. Type I IFN-induced protection from the infection of both G954 strains depended on the cell type analyzed, being less efficient in the cells used to grow the viral strain.

**Conclusion:** Thus, mutations in M and P/V/C proteins can critically affect MV pathogenicity, cellular tropism and lead to virus attenuation without interfering with the  $\alpha/\beta$  IFN system.

### Background

Mass vaccination with live attenuated measles vaccines has greatly reduced the incidence of this disease and its associated pathologies. Most vaccine strains were established after numerous passages on various cell lines. During this period of adaptation, the virus genome mutated in order to replicate efficiently in cell culture and thus, the original viral phenotype has been modified by mechanisms which are still poorly understood. The mutations observed in the RNA genome may be responsible for the

replication of the clinical virus in its new host cell at different levels: entry, transcription, translation or budding.

Measles virus (MV), one of the leading causes of infant death in developing countries, is a member of the Paramyxovirus family. Like other viruses of this family, the MV negative RNA genome is protected by the N protein. Its association with the replicative complex (P and L proteins) constitutes the nucleocapsid. H (haemagglutinin) and F (fusion) proteins are surface glycoproteins, set in a lipid envelope, lined by the M (matrix) protein, and are

responsible for the attachment and fusion processes. In addition to the structural proteins, the MV genome encodes for two accessory proteins, C and V [1].

For many years, few MV wild-type isolates were available for study. This was mainly due to the choice of the cell line used for virus isolation. Clinical or wild type MVs use CD150 (SLAMF7) as their main host cell receptor to attach to cells and so are most easily isolated on cell lines expressing this molecule [2]. The vaccine and vaccine-like strains, which readily multiply in cells lacking this receptor, were shown to be able to use an additional receptor, CD46, a ubiquitously expressed molecule [3,4]. Further, it was established that a critical amino acid (aa) in the MV H glycoprotein governed the use of the two receptors. Mutation of aa 481 from asparagine to tyrosine permitted the wild type strains to attach to CD46 [5]. *In vivo*, wild type viruses are reported to infect both endothelial and epithelial cells, which do not express CD150. Thus, it is not clear how the virus gets into the host cell. Two different hypotheses propose that either the wild type virus enters using CD46 as a low affinity receptor [6,7] or that there is another unidentified receptor involved [8-10].

Naniche et al. showed that in contrast to wild type MV strains, vaccine strains induced high levels of IFN in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [11]. Moreover, the wild type strains were more sensitive to exogenous IFN. A number of studies have shown that MV, C and V accessory proteins may be implicated in both the inhibition of the induction and action of IFN [12-17]. However, it is still unknown whether the function of C and V proteins in the regulation of type I IFN system is altered after virus attenuation. Schlender et al. showed that a measles vaccine strain (Schwarz) replicates efficiently in plasmacytoid Dendritic Cells (pDCs, the major producers of type I IFN [18]) and blocks IFN induction by several ligands [19]. Nevertheless, the complexity and the diversity of the experimental systems previously used made a clear-cut interpretation of these data difficult in the estimation of the role of type I IFN in the attenuated MV phenotype.

It was shown that viruses isolated on B95a cells could induce in a monkey model all the clinical features observed in humans. However, adaptation of the virus to Vero cells attenuated the pathogenicity of the virus [20,21]. Sequence comparison of the 2 viruses showed that there were 5 aa changes in the polymerase (P/V/C and L) and 3 aa changes in the H [22] affecting the replication and transcription processes and also the syncytia formation. In a second study, the attenuating mutations were restricted to the P and M genes [23] with a deletion of the C gene. Recently, Tahara *et al.* adapted a wt strain to Vero cells and observed mutations in the M and L proteins. The

adapted virus could grow in cells that did not express CD150 but was less efficient in the cell/cell fusion process [24]. The mutation E89K in M was then shown to be implied in alteration of the interaction between the M and H proteins [25].

In the present study, we compared G954-PBL, a MV wild type isolate propagated on PBMCs with G954-V13, a virus adapted from G954-PBL by 13 passages on Vero cells. Both strains were shown to have no differences in the H and F proteins and to use CD150 and not CD46 as a receptor [10]. Sequence analysis of both G954 viruses revealed that there were 5 mutations located only in the P/V/C and M genes. These mutations render the virus highly attenuated *in vivo*. Loss of pathogenicity could be related to different aspects of infection. Both G954 strains seemed to be restricted to specific cell types initially used to propagate the virus. Interestingly, the vaccine strain, Edmonston Zagreb (Ed-Zagreb), used as a control, was more robust than either of the G954 strains, multiplying in different cell types. Surprisingly, despite the differences in the P/V/C genes and the current belief that viral sensitivity to and induction of type I IFN correlate with an attenuated phenotype, this study shows the existence of exceptions to this dogma where virus attenuation is not linked to  $\alpha/\beta$  IFN system.

## Methods

### Virus strains and cell lines

The wild-type MV strain, G954-PBL (genotype B3.2), was isolated in Gambia in 1993 and was propagated on activated human PBMCs. The Vero adapted strain, G954-V13 was obtained after 13 successive passages of a G954-PBL sample on Vero cells, [10]. MV vaccine Edmonston-Zagreb was kindly provided by D. Forcic and R. Mazuran (Immunology Institute of Zagreb, Croatia). Vesicular stomatitis virus (VSV) (Indiana strain) was propagated on Vero cells.

Measles viruses were titrated on Vero/CD150 cells by the standard plaque assay method as previously described [10]. For the establishment of viral kinetics, each time point was obtained individually. Infections were performed at a MOI of 0,1.

B95a, Vero, and Vero/CD150 cells were propagated in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U of penicillin/ml, 0.1 mg of streptomycin/ml, 10 mM HEPES, and 10% fetal calf serum or 2% for infections.

### Isolation and infection of human haematopoietic cells

Human PBMCs were prepared from whole blood of healthy donors (Etablissement Français du Sang, Lyon, France) by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation

(Eurobio, France). pDCs were isolated by magnetic activated cell sorting (MACS) using the BDCA-4 dendritic cell isolation kit from Miltenyi Biotec. Prior to positive selection, monocytes, B cells, T cells, NK cells, red cells and macrophages were depleted by negative selection. Cells were incubated with an antibody cocktail directed against CD3, CD8, CD14, CD16, CD19, CD35, CD56 and glyco-phorin-A, then with Biomag Goat anti-mouse IgG magnetic beads (Quiagen) and finally separated using a Biomag magnet. pDCs were labeled with anti-BDCA-4 antibody coupled to colloidal paramagnetic micro beads and passed through a magnetic separation column (LS column; Miltenyi Biotec). The purity of isolated pDCs (BDCA2 positive, CD123-positive) was between 75% and 95%. pDCs from individual donors were used separately in all experiments and were not pooled. Contaminating cells were mainly monocytes. After isolation, cells were infected for 2 hours, then supernatants were removed and cells were cultivated in RPMI supplemented with 10% FCS at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> with 10 ng/mL of IL-3 for the pDC (10<sup>5</sup> cells/mL) and 1 µg/mL PHA, 50 U/mL IL-2 for the other cells (PBMCs, CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, monocytes ; 10<sup>5</sup> cells/mL).

#### **Infection of mice**

Heterozygous one-week-old suckling CD150 transgenic mice [26], backcrossed or not in a type I IFN receptor deficient background [27] and their nontransgenic littermates were infected intranasally (i.n.) by application in both nares of 10 µl of MV (10<sup>3</sup> PFU). Clinical signs of disease and the weight of the mice were assessed daily for 8 weeks after infection. Mice were bred at the institute's animal facility (Plateau de Biologie Experimentale de la Souris, IFR128 BioSciences Lyon-Gerland, France), and *in vivo* protocols were certified by the Comité Rhone-Alpes d'Ethique pour l'Expérimentation Animale (CREEA).

#### **Determination of MV-specific antibodies in murine serum by ELISA**

Sera were taken from G954-V13 infected mice at 60 days after infection from the retro-orbital vein or by intra-cardiac puncture and tested for anti-MV antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described previously [26]. The titer of N-specific antibodies in each serum sample was determined using a standard curve established with sera from mice immunized with MV in complete Freund's adjuvant and expressed in relative units.

#### **Extraction of MV-specific RNA**

For quantitative PCR, total RNA was obtained directly from the supernatant of infected cells or control non-infected cells, using the Nucleospin RNA Virus kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), according to the manufacturer's protocol. For *in vivo* experiments, total RNA was

extracted from murine brains and lungs at 10 days post infection with RNA-NOW (Biogentex, Ozyme, France) and treated with DNase I (Sigma).

#### **Detection and quantification of MV-specific RNA**

Detection of efficient replication in mice brains (presence of mRNA coding for N), was performed as previously described [26]. For determination of viral genome production, cDNA was obtained using the Superscript II kit (Invitrogen) and further diluted to perform quantitative PCR using a Platinum SYBR Green qPCR super mix uracil DNA glycosylase kit (Invitrogen). The RT reaction was specific using the following primer (corresponding to the N region of the genome): 5'-GACATTGACACTGCATC-3'. The Quantitative PCR experiments were performed with this primer as forward and 5'-GATTCCTGCCATGGCTTGCAGCC-3' as reverse. QPCR was performed with an ABI Prism 7000 SDS, and results were analyzed using ABI Prism 7000 SDS software available from the Genetic Analysis Platform (IFR128 BioSciences Lyon-Gerland). In order to normalize the results, the ubiquitin housekeeping gene was quantified [26]. The level of expression of the gene of interest in an unknown sample was calculated from the real-time PCR efficiency of primers and the crossing point deviation of the unknown sample versus a standard, as described previously [28]. Briefly, these standard references were included in each PCR run for every analyzed gene in order to standardize the PCR run with respect to RNA integrity, sample loading, and inter-PCR variations. The calculated relative expression represents, therefore, the ratio of the expression level of gene of interest versus the expression level of the housekeeping gene. Otherwise, when the level of expression of none of the housekeeping genes tested was found to be stable, results were normalized in function of the initial number of cells.

#### **Nucleic acid sequencing**

Experiments were performed as described in Kouomou et al [10]. Briefly, PCR products were electrophoresed on a 1.2% agarose gel, and then purified using a QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. Purified PCR products were sequenced with the ABI prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems, Langen, Germany). The reaction products were analyzed in an ABI Prism 3100 automatic sequencer (Perkin Elmer, Langen, Germany). The MV G954-PBL and G954-V13 sequences were deposited in Genbank under the accession numbers: EF565854 (N gene), EF565855 (P gene, G954-PBL), EF565857 (M gene, G954-PBL), EF565859 (L gene), EF565856 (P gene, G954-V13) and EF565858 (M gene, G954-V13).



**IFN- $\alpha\beta$  detection assay**

UV-inactivated cell culture supernatants were serially diluted (2-fold) and added to confluent Vero monolayer cells. After incubation for 24 h at 37°C, the cells were infected with VSV at 0.1 PFU/cell. Cytopathic effects were determined after fixation with formalin and methylene blue coloration 24 h later. Titration end-point represented dilutions that gave VSV-induced lysis of 50% of the cells. IFN titers are expressed as International Units per milliliter with reference to a standard IFN curve obtained using  $\alpha$ -IFN (Sigma).

**Results**

**Adaptation of wild type MV to Vero cells induced 5 mutations in the P/V/C and M genes**

In a previous study [10], we isolated MV (G954-PBL) from the lymphocytes of a patient and maintained the isolate either in PHA-activated human PBMCs or adapted the virus to Vero cells. During this adaptation to Vero cells, we reported no changes in the amino acid sequences of the two viral glycoproteins, H and F [10]. Although the Vero infected cells expressed large amounts of the two glycoproteins at the cell surface, no fusion (syncytia) was observed. However, infection of Vero cells expressing the MV receptor CD150 readily induced fusion [10]. Three additional passages on Vero cells did not modify this viral phenotype. In order to identify the mutations implicated in the adaptation of the virus (G954-V13) to Vero cells, we sequenced the complete genomes of both viruses. There were a total of 5 nucleotide changes which led to coding changes. These are shown in table 1 (P, E242V ; V, H232D ; C, F93S and V130A ; M, E89K).

**The Vero-adapted strain, G954-V13, is highly attenuated in vivo**

Intranasal infection of CD150 transgenic suckling mice with the G954-PBL strain leads to MV spread to different organs and to the development of a lethal neurological syndrome [26]. To study the pathogenicity of the G954-V13 Vero-adapted virus, transgenic CD150 suckling mice were inoculated intranasally with either the wild type G954-PBL or the adapted G954-V13 virus (table 2). Whereas the G954-PBL infected mice died within 15 days

post infection (pi), no deaths were observed for the G954-V13 infected mice during the period of observation (90 days). Ten days after infection, when a high level of G954-PBL replication is observed [26], some of the infected mice were sacrificed and the presence of virus in the different organs was studied by RT-PCR. In the case of the G954-PBL infected mice, the distribution of the virus was similar to that previously described [26]. In the G954-V13 infected animals, MV was not detected by the technique used. However, at 60 days pi, the mice exhibited anti MV-N antibodies in their sera as detected by ELISA. Infection with UV-inactivated virus did not induce antibody production, strongly suggesting that generation of antibodies requires initial replication of G954-V13 after intranasal infection of CD150 transgenic mice. Therefore, G954-V13 replicates in this transgenic model without provoking any pathological effect demonstrating that MV adaptation to Vero cells is associated with an important loss of viral pathogenicity *in vivo*.

Four of the 5 mutations differing G954-PBL and G954-V13, are located in the P/V and C genes. These proteins are known to interfere with the production and signaling of type I IFN, suggesting potential importance of type I IFN in G954-V13 attenuation. Therefore, we studied the pathogenicity of G954 strains in CD150 transgenic mice crossed into a type I IFN receptor KO background. While intranasal G954 V13 infection was again not lethal for transgenic mice, the infection with G954-PBL resulted in death of all the animals within 11 days (lethal outcome between day 9 and day 11). The absence of pathogenicity of G954-V13 in mice lacking type I IFN receptor strongly suggested that G954 V13 attenuation could be independent of type I IFN.

**Adaptation of MV restricts its replication to specific cell types**

Although the transgenic murine model is a convenient system to test different aspects of MV infection, it cannot reflect completely the physiopathology in humans. Therefore, we further analyzed the properties of G954 viruses in different primate cell types.

**Table 1: Summary of nucleotide and deduced amino acid differences between the G954-PBL and G954-V13 strains.**

Nucleotide				Amino Acid			
Gene	Position	G954 PBL	G954 V13	Protein	Position	G954 PBL	G954 V13
P/V/C	2106	T	C	C	93	Phe	Ser
	2217	T	C	C	130	Val	Ala
	2499	C	G	V	232	His	Asp
	2531	A	T	P	242	Glu	Val
M	3702	G	A	M	89	Glu	Lys

**Table 2: Pathogenicity of G954 MV strains in vivo**

Mice genotype (no. of mice)	Viral strain	Mortality rate (time/days)	MV replication (10 days pi) (*)		anti-N response (15 days pi)(†)
			brain	lung	
C57/Bl6 (8)	G954 PBL	0 %	-	-	-
	G954 V13	0 %	-	-	-
CD150 tg (6–8)	G954 PBL	100% (9–15 d)	+++	+	++
	G954 V13	0%	-	-	+ /+++
	UV inactivated G954 V13	0%	nd	nd	-
CD150/IFNARKO (8–10)	G954 PBL	100% (9–11 d)	nd	nd	nd
	G954 V13	0%	nd	nd	+ /+++

(\*)determined by RT PCR on N mRNA: +++ > 10× housekeeping gene expression; + > 0,1× housekeeping gene expression ; – beyond limit of detection ; nd not determined

(†) determined by ELISA on N specific sera antibodies: ++ between 1 and 10 arbitrary units; + between 0,1 and 1 arbitrary units; – beyond 0,1 arbitrary units

The attenuated phenotype of G954-V13 could reflect its ability to replicate in different tissues. Moreover, the E89K mutation in the M protein of another wt strain of MV permitted an efficient replication in Vero cells while limiting the cell/cell fusion process [25]. In order to verify if such a phenomenon was observed with our strains, we compared the replication of both G954 viruses in several primate cell types and used the Edmonston Zagreb strain as a vaccine reference.

PBMCs from healthy donors were infected with either G954-PBL or G954-V13 or Ed-Zagreb (MOI = 0.1) and the production of virus monitored daily (figure 1A). G954-PBL readily infected these cells with a peak of virus production on day 4. In contrast, G954-V13 virus poorly replicated: 100 fold less in these cultures than its parental strain. The Ed-Zagreb vaccine strain replicated almost as well as the wt strain.

The G954-V13 strain grew well in Vero cells (figure 1B), multiplying far more efficiently than G954-PBL. However, we did not observe any difference in syncytia formation between G954-PBL and G954-V13. The expression of CD150 on Vero cells did not modify the kinetics of G954-V13 replication. Similar results were obtained with the Ed-Zagreb vaccine strain. In the case of the wt strain, the availability of CD150 enhanced by almost 100 the yield of infectious virus (figure 1C).

All three viruses efficiently replicated in B95a cells, which express CD150 but not CD46. G954 V13 yield was 10 times greater than the wt and Ed-Zagreb infections the first 2 days of infection (figure 1D). Thus, the restriction of G954 strains to specific cell types did not seem to rely on known receptor expression.

At day 3 or 4 pi, i.e. when the virus yields were the highest, we performed RT-QPCR analysis on infected cultures. The

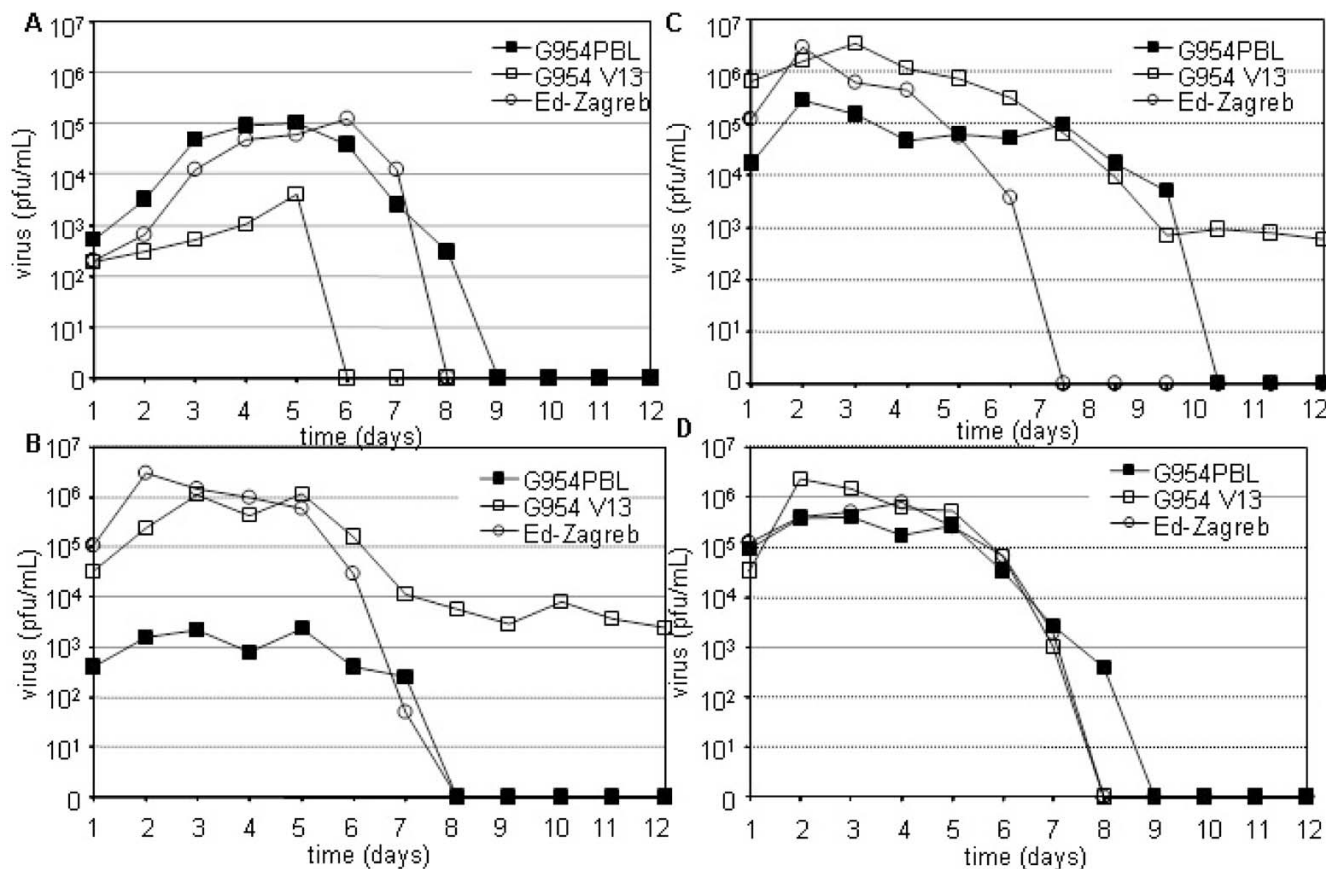
number of MV genomes present in those cultures is shown in table 3. G954-V13 and Ed-Zagreb infections of PBMCs were 20 times less productive than infections of Vero/CD150 cells, while there were 10 fold more genomes of G954-PBL in infected PBMCs than in the Vero/CD150 cells.

Thus, viral adaptation to a specific cell type could be linked to a more efficient production of infectious particles and a greater accumulation/production of genomes in cell culture and not necessarily to restrictions at the entry level.

#### **Sensitivity of MV G954-PBL and G954-V13 to IFN**

Previous studies showed that wild type MV strains are more sensitive than vaccine strains to type I IFN in PBMCs [11] and that V and C proteins can interfere with type I IFN signaling [13-16]. Therefore, we studied the sensitivity of G954 and Ed-Zagreb strains to type I IFN. As PBMCs are a very heterogeneous cell population, Vero/CD150 cells were also included in the study. These cells have the added advantage of not synthesizing IFN while being sensitive to its protective effect which means that any effect can be correlated to exogenously added IFN. Moreover, we studied the kinetics of infection prior to or following addition of type I IFN. This enabled us to study both the inhibition of virus production as well as delay in the establishment and duration of infection.

Addition of different amounts of type I IFN to Vero/CD150 cells prior to infection revealed that G954 viruses were inhibited to similar levels. Treatment of cells 48 hours prior to infection with 100 IU of type I IFN reduced infectious virus production by both viruses by approximately 80–90 % and was completely inhibited with 500 IU when assayed 3 days after infection (table 4). Pre-treatment of the cells with type I IFN for shorter periods revealed similar profiles except that higher concentrations



**Figure 1**  
**Adaptation to a specific cell type limits replication of MV.** Replication kinetics of MVs in PBMCs (A), in Vero cells (B), in Vero/CD150 cells (C), in B95a cells (D). For each experiment, 10<sup>5</sup> cells were infected at a MOI of 0,1. Each time point consists of the mean of 2 independent experiments. Vero/CD150 cells were used for the titration.

of IFN were required to inhibit viral infection, suggesting a threshold effect. Finally, although the Ed-Zagreb infection was more resistant to a pretreatment of 8 and 24 hours than both G954 viruses, it showed similar resistance at the 48 h point.

**Table 3: Number of copies of MV genome in different infected cell types**

	PBMCs	Vero/CD150	pDCs
G954 PBL	3,3.10 <sup>5</sup> *	3,8.10 <sup>4</sup>	8.10 <sup>3</sup>
G954 V13	1,6.10 <sup>5</sup>	3,2.10 <sup>6</sup>	2,7.10 <sup>3</sup>
Ed-Zagreb	1,6.10 <sup>5</sup>	3,2.10 <sup>6</sup>	8.10 <sup>3</sup>
G954 PBL UV	< 10	< 10	< 10
G954 V13 UV	< 10	< 10	< 10

\* Data represent the number of copies of MV genomes deduced from RT-QPCR results obtained from infected cultures extractions when maximum PFU were released (8.104 cells infected at 0,1 PFU/cell).

We next examined the effect of type I IFN during the MV infection. Different quantities of IFN were added to Vero/CD150 cells infected with G954-PBL, G954-V13 or Ed-Zagreb (MOI = 0,1) at 2, 4 or 12 hr post infection (figure 2A–D, G). The later the IFN was added the less effect it had on the inhibition of infectious virus production. Treatment with more than 1250 IU/mL of IFN 2 h pi blocked the infection by the wt strain. The infection was delayed and produced less infectious virus in proportion to the quantity of IFN added. IFN added 12 h after infection did not slow down the production of infectious MV. In the case of G954-V13, the effect of type I IFN was much less important. The infection was never delayed, slightly hampered and shortened, proportionally to the added dose. Interestingly, the infection by Ed-Zagreb was far more robust. Independently of the delay between type I IFN treatment and infection, there was a slight dose effect (figure 2G and unpublished results): the vaccine strain infection of Vero/CD150 cells was less affected by type I IFN. Thus, it appears that type I IFN-induced protection of

**Table 4: Inhibitory efficacy of a type I IFN pre-treatment on Vero/CD150 cells before MV infection**

Time before infection	Strain	Concentration of IFN added (IU/mL)				
		5000	1000	500	100	0
8 h	G954-PBL	100*	92	95	63	0
	G954-V13	100	95	89	56	0
	Ed-Zagreb	100	79	65	58	0
24 h	G954-PBL	100	100	100	95	0
	G954-V13	100	100	100	67	0
	Ed-Zagreb	100	100	100	43	0
48 h	G954-PBL	100	100	100	91	0
	G954-V13	100	100	100	80	0
	Ed-Zagreb	100	100	100	81	0

\* Inhibition indices were calculated as follow:  $100 \times [1 - (\text{PFU}(\text{type I IFN} = x) / \text{PFU}(\text{type I IFN} = 0))]$

Vero/CD150 cells was less effective in the case of infection by the Vero adapted strain, G954-V13. This type of resistance could be linked with a better adaptation of MV to the Vero cell environment.

When the protective effect of type I IFN on MV infection of PBMCs was studied, the wt strain was not inhibited despite the addition of high quantities of IFN (up to 5000 IU/mL). On the contrary, infection by G954-V13 strain was delayed, shortened and of lesser amplitude, proportionally to the IFN concentration and totally blocked with 5000 IU/mL of type I IFN. Finally, there was no effect of time between infection and IFN treatment on the virus replication in PBMCs for both analyzed viruses (figure 2E–F and data not shown). Infection of PBMCs by the Ed-Zagreb virus was unaffected by the different conditions of type I IFN tested (figure 2H). Thus, G954 strains seemed to be rather resistant to type I IFN since the protective effects occurred only when infections were performed on cells less permissive to a specific strain. However, Ed-Zagreb exhibited a strong resistance to type I IFN, independently of the cell type tested.

**Induction of type I IFN by MV infection**

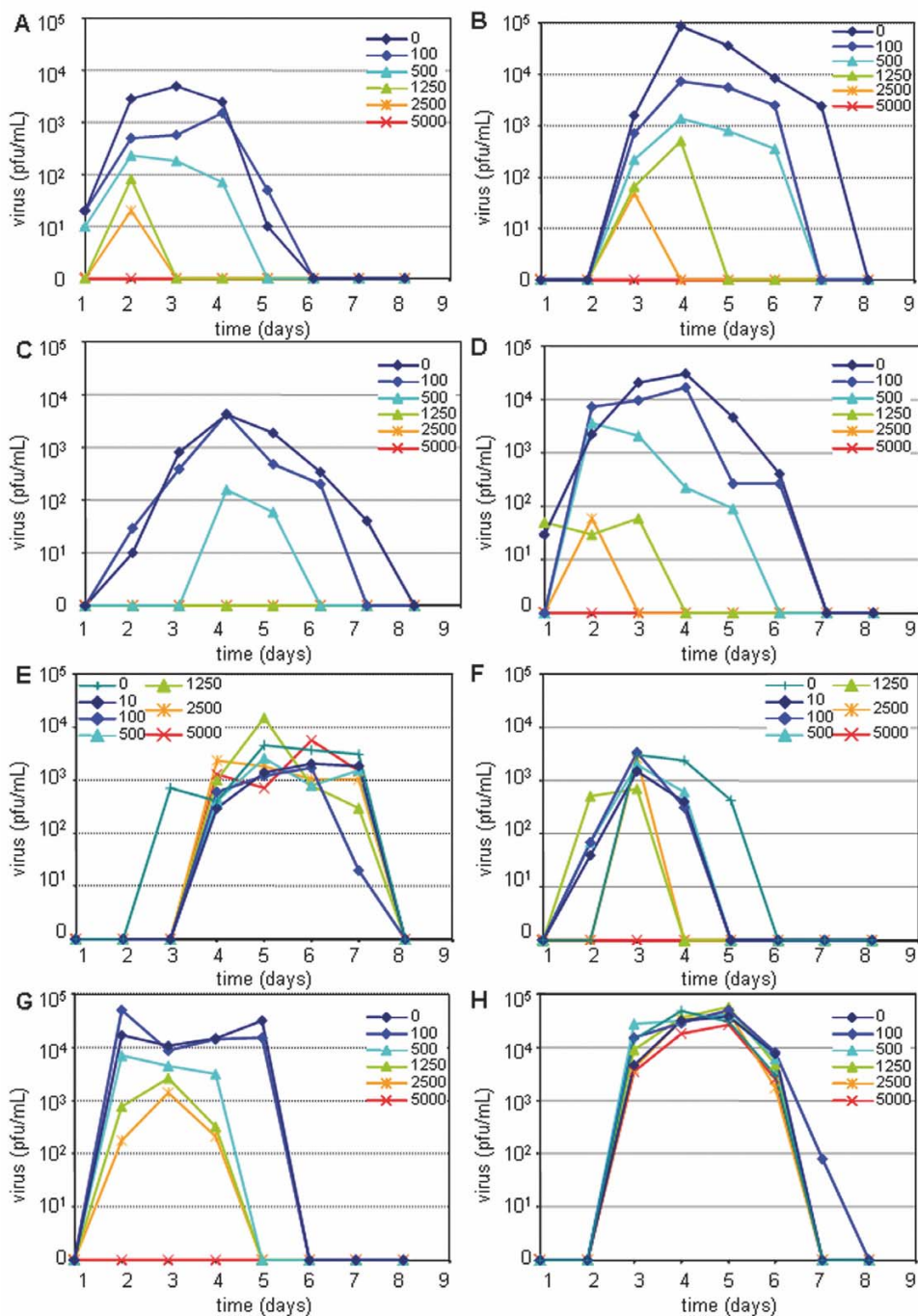
Plasmacytoid Dendritic Cells (pDCs) are the main producers of type I IFN in blood and lymph nodes. Unstimulated pDCs express CD46 at the cell surface, but not CD150 [29]. Schlender et al have shown that pDCs are infectable by the Edmonston-Schwarz vaccine strain of MV but do not produce IFN during the first 36 hours after infection [19]. To study the permissivity of these cells to different MV, pDC cultures were infected for 3 days with G954-PBL, G954-V13 or Ed-Zagreb. Neither G954 virus induced syncytia formation in the cultures nor were any infectious virus particles detectable, whereas infection with the Ed-Zagreb strain induced cell fusion without infectious virus production (figure 3A–D). Quantitative RT-PCR studies on the infected cells showed that RNA replication/transcription could occur in pDCs (table 3). The

pDCs infected with the wt strain and Ed-Zagreb contained 3 fold more genomes than those infected with G954-V13. The presence of MV genomes was not detected after infection with UV-treated virus (table 3) confirming the active replication of MV in pDCs.

To study the induction of type I IFN by these viruses, PBMCs and fractionated preparations (pDCs, CD14+ CD19+, and CD3+ cells) were infected and the production of type I IFN measured 3 days later (figure 3E). The infected pDCs had up to 1,000 fold higher quantities of  $\alpha/\beta$  IFN than the other cells examined. The wild type G954-PBL virus induced 10-fold higher type I IFN amounts than the G954-V13 virus in pDCs and equal amounts as Ed-Zagreb. In all tested cell types, each MV strain induced production of type I IFN, although G954-V13 infection induced lower level, particularly in PBMCs and pDCs. Altogether, those results demonstrate that the G954-V13 attenuation/adaptation was not linked to an enhanced production of type I IFN by either of primary humans haematopoietic cells analyzed in this study.

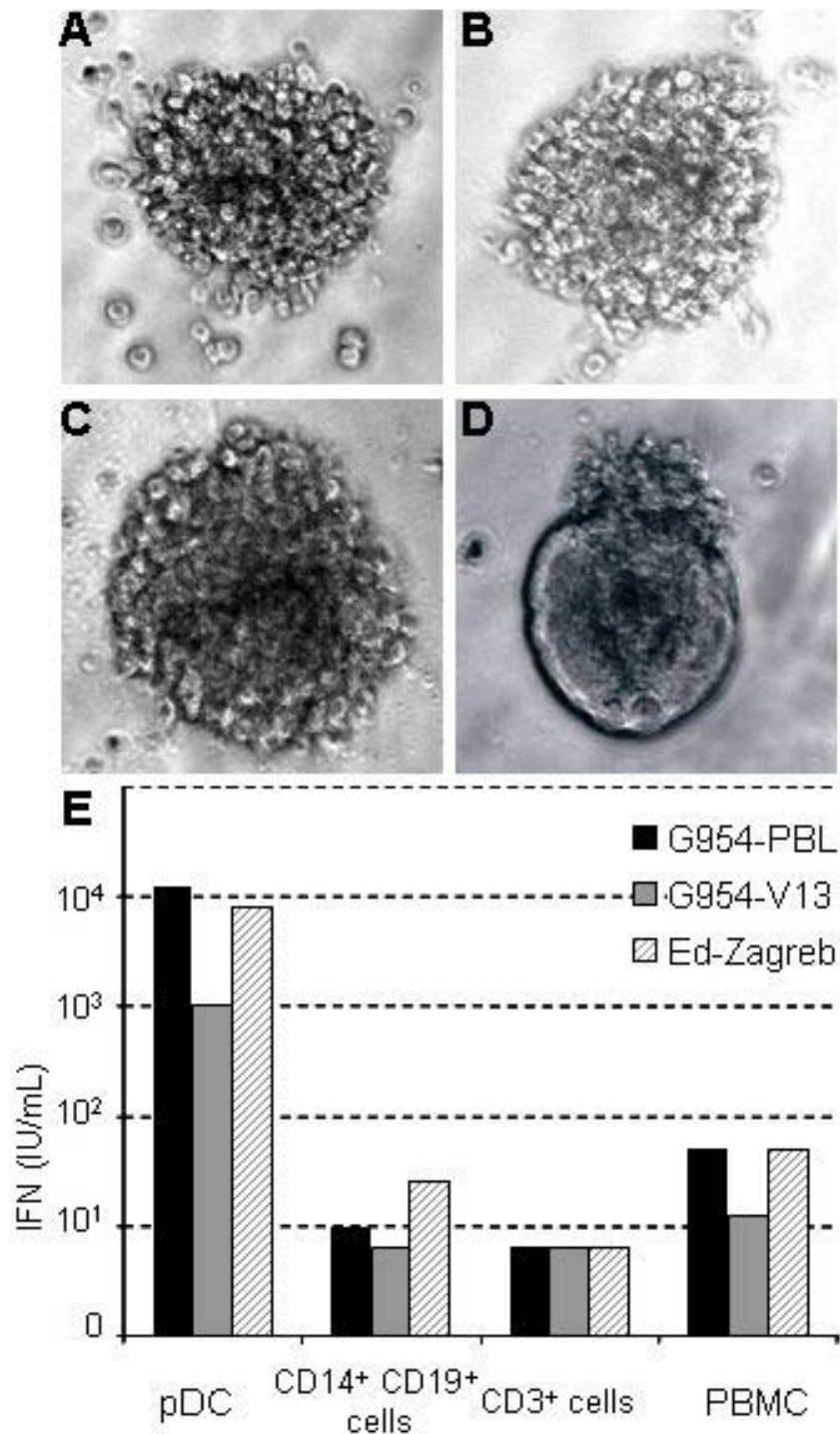
**Discussion**

We have adapted a wild type MV to Vero cells and shown that the adapted strain and the parent strain differ from each other by only 5 coding mutations. Although the differences we have observed were located in the P/V/C and M genes, they were different from mutations observed in previous studies [21-23,30] where viruses were attenuated by passaging on Vero cells and then tested in a monkey model. Our MV adapted to Vero cells (G954-V13) was strongly attenuated when inoculated into CD150 transgenic mice. The E89K mutation in M protein has also been shown to be present in another Vero adapted strain [24] and was shown to permit the wt strain to replicate in Vero cells while provoking limited cell/cell fusion of CD150+ cells. Our results support the proposed importance of the M E89K mutation in replication in Vero cells although we observed a better cytopathic effect in Vero/CD150 cells



**Figure 2**

**Viral resistance to type I IFN induced protection depends upon the cell type used for viral adaptation.** G954-PBL infections of Vero/CD150 cells could be blocked with high doses of type I IFN but the efficacy relied on the delay before treatment [(A): 2 hours (C): 12 hours between infection and type I IFN addition]. Infections with G954-V13 were less affected by type I IFN [(B): 2 hours (D): 12 hours between infection and type I IFN addition]. Infection of PBMCs by wt MV was not affected by type I IFN regardless of dose [(E): 2 hours between infection and type I IFN addition]. However, high doses of type I IFN could inhibit the G954-V13 strain infection [(F): 2 hours between infection and type I IFN addition]. Ed-Zagreb infections of both Vero/CD150 cells [(G): 4 hours between infection and type I IFN addition] and PBMCs [(H): 2 hours between infection and type I IFN addition] were relatively unaffected by type I IFN. Cells were infected at a MOI of 0,1 during 2 hours then washed. Various dilutions of type I IFN were added to cell cultures at specified times.

**Figure 3**

**Attenuation of G954 strain is not linked to type I IFN induction.** (A-D): Cytopathic effects of MV infection on pDCs. Cells were infected at a MOI of 0,1. Photographs were taken when the maximum of cytopathic effects was observed (2–4 days pi). (A): non infected pDCs; (B): Infection by G954 PBL; (C): G954 V13; (D): Edmonston Zagreb strain induces syncytia formation. Magnification  $\times 400$ . (E): pDCs are the main producers of type I IFN following MV infection. Haematopoietic cells were infected at a MOI of 0,1 with G954 and Ed-Zagreb viruses. Type I IFN amounts were determined by biological assays on UV-inactivated supernatants harvested 3 days pi.

rather than defects in syncytia formation [data not shown and [10]]. A recent study shows that this mutation could affect MV growth by modifying the interaction between M and the cytoplasmic tail of the H protein [25]. Since the predicted domains on H for CD46 and CD150 binding are close, one could hypothesise that a stronger interaction of M with H could change the conformation of H and thus change the affinity of the CD46 binding site (R. Buckland, personal communication).

Parks et al. sequenced a number of the vaccine strains derived from the Edmonston isolate and identified amino acids shared by these attenuated viruses [31]. Eight amino acid coding changes were common to all vaccine strains and an additional two were conserved in all except the Edmonston Zagreb strain. They concluded that modulation of transcription and replication plays an important role in attenuation. Among the mutations found in G954-V13, only M E89K corresponds to an amino acid change observed in the transition toward vaccine strains in this study. The observation that the Edmonston Zagreb strain could readily replicate in PBMCs and Vero cells while resisting to type I IFN induced protection suggests the robustness of vaccine strains. Furthermore, it questions the notion of attenuated and vaccine strains since a virus which does not induce a pathology in humans could still exhibit strong deleterious effects in human cell cultures, demonstrating discrepancies of the virus pathogenicity *in vitro* and *in vivo*. Therefore, these observations beg the question of whether a vaccine phenotype can be predicted and engineered at the genetic level by using only *in vitro* approach.

Innate immunity is an important early response to viral infection. The accessory proteins of Paramyxoviruses, C and V, have been shown to be implicated in the suppression of this response, both in the induction and signalling of type I IFN [12-17,32]. Although in some of those studies, laboratory strains were poor inducers of type I IFN [14], other studies reported that vaccine strains induced 10 to 80 times more type I IFN than wt strains after infection of peripheral blood lymphocytes [11,33]. In contrast, in our study, the wild type and attenuated G954-V13 viruses as well as vaccine strain Ed-Zagreb induced similar quantities of type I IFN in these cells. We showed that following *in vitro* infection, the major cell population producing type I IFN was the pDCs for both the wild type and the attenuated strain. The inhibition of type I IFN production induced by vaccine MV strains observed in another study [19] was probably due to the shorter observation period (36 hours) than in our study (72 hours). Nevertheless, we cannot exclude potential interference of MV infection with TLR-induced type I IFN production by pDCs. Furthermore, it may also be possible that G954 forms part of a particular group of wt MV, able of good induction of

type I IFN and then, during its attenuation, this property is preserved. Even if better induction and higher sensitivity to type I IFN is an attractive explanation for the mechanism of viral attenuation, this study strongly suggests that it is possible to achieve attenuation without perturbing interactions with the innate immune mechanisms.

Our results show that P/V/C mutations are not necessarily linked to modifications in type I IFN resistance and suggest rather that they have a role in the replicative process during infection. This is in agreement with previous studies on the negative effect of V and C proteins on transcription and replication [34-36]. The absence of the V protein was reported to delay replication [37] and the virus was less pathogenic *in vivo* [38,39]. The absence of the C protein reduced the virus yield both *in vitro* and *in vivo* [40]. Even the M protein has been shown to inhibit the replication process [41]. Recent studies showed that the P protein is involved in STAT1 phosphorylation [42] and thus can affect type I IFN efficacy. In our case such a role for P could not be observed. Moreover, other studies demonstrated that the adaptation of MV to Vero cells could induce differences in the amounts of viral proteins produced [43]. More quantitative experiments should be performed to assess if such a phenomenon is important in the adaptation of the G954 viral strain. Therefore, it may be very likely that differences between G954 strains are linked to P/V/C and/or M proteins via cell specific restrictions of viral replication, transcription and translation processes.

## Conclusion

The present study shows that adaptation of wild type MV to Vero cells induces a strong attenuation *in vivo*, which is independent of type I IFN. Identifying the exact role of each of the 5 mutations will determine their role in pathogenicity and could be performed by developing a recombinant virus strategy. Further analysis of the mechanisms implicated in the complex process of virus attenuation should pave the way towards developing new vaccines with a high capacity to induce specific host immune responses.

## Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

JD participated in the conception of the study and performed the majority of the experiments and wrote the manuscript. CIS carried out ELISA assays on mice sera, participated in the *in vivo* assays and helped to draft the manuscript. DW carried out the nucleic acid sequencing and sequence alignment. BH helped in the design of the study, specially the *in vivo* assays and critically helped to

draft the manuscript. TFW in the conception of the study, its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgements

We are grateful to B. Blanquier, Y. Kerdiles, S. Devergnas, B. Dubois (for providing the anti CD14 antibody), T. Duhen, C. Roubardin-Combe (for providing antibodies and thoughtful discussions) and the personnel of the PBES at ENS-Lyon for their help. We thank D. Gerlier for critical reading the manuscript.

JD was supported by grants from MENRT, CIS was supported by the Fondation pour la Recherche Medicale (FRM). This work was supported in part by institutional grants from INSERM, the Institut de Veille Sanitaire and FRM.

### References

- Griffin DE: **Measles Virus**. In *Fields Virology 5th edition*. D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, and S.E. Straus, Eds; 2006:1551-1585.
- Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y: **SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus**. *Nature* 2000, **406(6798)**:893-897.
- Dörig RE, Marciel A, Chopra A, Richardson CD: **The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain)**. *Cell* 1993, **75**:295-305.
- Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Roubardin-Combe C, Gerlier D: **Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus**. *J Virol* 1993, **67(10)**:6025-6032.
- Lecouturier V, Rizzitelli A, Fayolle J, Daviet L, Wild FT, Buckland R: **Interaction of measles virus (Halle strain) with CD46: evidence that a common binding site on CD46 facilitates both CD46 downregulation and MV infection**. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **264(1)**:268-275.
- Masse N, Barrett T, Muller CP, Wild TF, Buckland R: **Identification of a second major site for CD46 binding in the hemagglutinin protein from a laboratory strain of measles virus (MV): potential consequences for wild-type MV infection**. *J Virol* 2002, **76(24)**:13034-13038.
- Santiago C, Bjorling E, Stehle T, Casasnovas JM: **Distinct kinetics for binding of the CD46 and SLAM receptors to overlapping sites in the measles virus hemagglutinin protein**. *J Biol Chem* 2002, **277(35)**:32294-32301.
- Hashimoto K, Ono N, Tatsuo H, Minagawa H, Takeda M, Takeuchi K, Yanagi Y: **SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein**. *J Virol* 2002, **76(13)**:6743-6749.
- Richardson CD, Sarangi F, Iorio C: **Studies towards the identification and characterization of a third receptor for measles virus on human and marmoset smooth airway epithelial cells: June 17th - 22nd 2006; Salamanca, Spain.** ; 2006.
- Koumou DW, Wild TF: **Adaptation of wild-type measles virus to tissue culture**. *J Virol* 2002, **76(3)**:1505-1509.
- Naniche D, Yeh A, Eto D, Manchester M, Friedman RM, Oldstone MB: **Evasion of host defenses by measles virus: wild-type measles virus infection interferes with induction of Alpha/Beta interferon production**. *J Virol* 2000, **74(16)**:7478-7484.
- Nakatsu Y, Takeda M, Ohno S, Koga R, Yanagi Y: **Translational inhibition and increased interferon induction in cells infected with C protein-deficient measles virus**. *J Virol* 2006, **80(23)**:11861-11867.
- Palosaari H, Parisien JP, Rodriguez JJ, Ulane CM, Horvath CM: **STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein**. *J Virol* 2003, **77(13)**:7635-7644.
- Shaffer JA, Bellini WJ, Rota PA: **The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response**. *Virology* 2003, **315(2)**:389-397.
- Ohno S, Ono N, Takeda M, Takeuchi K, Yanagi Y: **Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction**. *J Gen Virol* 2004, **85(Pt 10)**:2991-2999.
- Takeuchi K, Kadota SI, Takeda M, Miyajima N, Nagata K: **Measles virus V protein blocks interferon (IFN)-alpha/beta but not IFN-gamma signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation**. *FEBS Lett* 2003, **545(2-3)**:177-182.
- Yokota S, Okabayashi T, Yokosawa N, Fujii N: **Growth arrest of epithelial cells during measles virus infection is caused by upregulation of interferon regulatory factor 1**. *J Virol* 2004, **78(9)**:4591-4598.
- Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ: **The nature of the principal type I interferon-producing cells in human blood**. *Science* 1999, **284(5421)**:1835-1837.
- Schlender J, Hornung V, Finke S, Gunthner-Biller M, Marozin S, Brzozka K, Moghim S, Endres S, Hartmann G, Conzelmann KK: **Inhibition of toll-like receptor 7- and 9-mediated alpha/beta interferon production in human plasmacytoid dendritic cells by respiratory syncytial virus and measles virus**. *J Virol* 2005, **79(9)**:5507-5515.
- Kobune F, Sakata H, Sugiura A: **Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus**. *J Virol* 1990, **64(2)**:700-705.
- Kobune F, Takahashi H, Terao K, Ohkawa T, Ami Y, Suzuki Y, Nagata N, Sakata H, Yanamouchi K, Kai C: **Nonhuman primate models of measles**. *Laboratory Animal Science* 1996, **46(3)**:315-320.
- Takeda M, Kato A, Kobune F, Sakata H, Li Y, Shioda T, Sakai Y, Asakawa M, Nagai Y: **Measles virus attenuation associated with transcriptional impediment and a few amino acid changes in the polymerase and accessory proteins**. *J Virol* 1998, **72(11)**:8690-8696.
- Takeuchi K, Miyajima N, Kobune F, Tashiro M: **Comparative nucleotide sequence analyses of the entire genomes of B95a cell-isolated and vero cell-isolated measles viruses from the same patient**. *Virus Genes* 2000, **20(3)**:253-257.
- Tahara M, Takeda M, Yanagi Y: **Contributions of matrix and large protein genes of the measles virus edmonston strain to growth in cultured cells as revealed by recombinant viruses**. *J Virol* 2005, **79(24)**:15218-15225.
- Tahara M, Takeda M, Yanagi Y: **Altered interaction of the matrix protein with the cytoplasmic tail of hemagglutinin modulates measles virus growth by affecting virus assembly and cell-cell fusion**. *J Virol* 2007, **81(13)**:6827-6836.
- Sellin CI, Davoust N, Guillaume V, Baas D, Belin MF, Buckland R, Wild TF, Horvat B: **High pathogenicity of wild-type measles virus infection in CD150 (SLAM) transgenic mice**. *J Virol* 2006, **80(13)**:6420-6429.
- Muller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, Aguet M: **Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense**. *Science* 1994, **264(5167)**:1918-1921.
- Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR**. *Nucleic Acids Res* 2001, **29(9)**:e45.
- Facchetti F, Vermi W, Mason D, Colonna M: **The plasmacytoid monocyte/interferon producing cells**. *Virchows Arch* 2003, **443(6)**:703-717.
- Uejima H, Nakayama T, Komase K: **Passage in Vero cells alters the characteristics of measles AIK-C vaccine strain**. *Vaccine* 2006, **24(7)**:931-936.
- Parks CL, Lerch RA, Walpita P, Wang HP, Sidhu MS, Udem SA: **Comparison of predicted amino acid sequences of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage**. *J Virol* 2001, **75(2)**:910-920.
- Caignard G, Guerbois M, Labernardiere JL, Jacob Y, Jones LM, Wild F, Tangy F, Vidalain PO: **Measles virus V protein blocks Jak1-mediated phosphorylation of STAT1 to escape IFN-alpha/beta signaling**. *Virology* 2007.
- Shingai M, Ebihara T, Begum NA, Kato A, Honma T, Matsumoto K, Saito H, Ogura H, Matsumoto M, Seya T: **Differential Type I IFN-Inducing Abilities of Wild-Type versus Vaccine Strains of Measles Virus**. *J Immunol* 2007, **179(9)**:6123-6133.
- Escoffier C, Manie S, Vincent S, Muller CP, Billeter M, Gerlier D: **Nonstructural C protein is required for efficient measles virus replication in human peripheral blood cells**. *J Virol* 1999, **73(2)**:1695-1698.



35. Parks CL, Witko SE, Kotash C, Lin SL, Sidhu MS, Udem SA: **Role of V protein RNA binding in inhibition of measles virus minigenome replication.** *Virology* 2006, **348(1)**:96-106.
36. Reutter GL, Cortese-Grogan C, Wilson J, Moyer SA: **Mutations in the measles virus C protein that up regulate viral RNA synthesis.** *Virology* 2001, **285(1)**:100-109.
37. Tober C, Seufert M, Schneider H, Billeter MA, Johnston ICD, Niewiesk S, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S: **Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis.** *Journal of Virology* 1998, **72(10)**:8124-8132.
38. Paterson RG, Russell CJ, Lamb RA: **Fusion protein of the paramyxovirus SV5: destabilizing and stabilizing mutants of fusion activation.** *Virology* 2000, **270(1)**:17-30.
39. Valsamakis A, Schneider H, Auwaerter PG, Kaneshima H, Billeter MA, Griffin DE: **Recombinant measles viruses with mutations in the C, V, or F gene have altered growth phenotypes in vivo.** *Journal of Virology* 1998, **72(10)**:7754-7761.
40. Takeuchi K, Takeda M, Miyajima N, Ami Y, Nagata N, Suzaki Y, Shahnewaz J, Kadota S, Nagata K: **Stringent requirement for the C protein of wild-type measles virus for growth both in vitro and in macaques.** *J Virol* 2005, **79(12)**:7838-7844.
41. Reuter T, Weissbrich B, Schneider-Schaulies S, Schneider-Schaulies J: **RNA interference with measles virus N, P, and L mRNAs efficiently prevents and with matrix protein mRNA enhances viral transcription.** *J Virol* 2006, **80(12)**:5951-5957.
42. Devaux P, von Messling V, Songsunthong W, Springfield C, Cattaneo R: **Tyrosine 110 in the measles virus phosphoprotein is required to block STAT1 phosphorylation.** *Virology* 2007, **360(1)**:72-83.
43. Sinitsyna OA, Khudaverdyan OE, Steinberg LL, Nagieva FG, Lotte VD, Dorofeeva LV, Rozina EE, Boriskin Yu S: **Further-attenuated measles vaccine: virus passages affect viral surface protein expression, immunogenicity and histopathology pattern in vivo.** *Res Virol* 1990, **141(5)**:517-531.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
[http://www.biomedcentral.com/info/publishing\\_adv.asp](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)



## **RESULTATS COMPLEMENTAIRES DE L'ARTICLE I**

Au cours des expériences menées sur G954-PBL et G954-V13, nous avons intégré deux souches vaccinales à titre de témoin mais également pour mieux analyser la notion de « vaccin ». Les souches utilisées sont Edmonston Schwarz, distribuée sous le nom commercial Rouvax par Sanofi-Pasteur et la souche Edmonston-Zagreb, employée comme vaccin en Europe de l'Est et en Amérique du Sud.

L'alignement des séquences codantes montre de grandes disparités entre les deux souches vaccinales, bien plus grandes qu'entre G954-V13 et sa souche parentale (Parks et al., 2001a).

L'infection des souris transgéniques pour l'expression de CD150 montre l'innocuité de ces souches quand elles sont injectées par voie intranasale. Toutefois, contrairement à ce qui se produit avec la souche G954-V13, l'infection de souris CD150 déficientes pour la molécule IFNAR et donc dépourvues d'un système IFN efficace s'avère mortelle dans 50 % des cas pour Ed Schwarz et 40 % pour Ed Zagreb.

En termes de cinétique et d'adaptation aux différents types cellulaires testés, les résultats présentés dans les figures 1 et 2 de l'article I concernant Ed Zagreb, sont valables également pour la souche Ed-Schwarz.

Enfin, pour ce qui est de la production d'IFN de type I, on constate que la souche Ed-Schwarz est aussi efficace que la souche Ed-Zagreb.

De fait, au travers des expériences que nous avons menées, malgré des différences génétiques importantes, il semble que les deux souches vaccinales montrent un profil similaire.

Ces résultats montrent que malgré une grande diversité génétique, le phénotype vaccinal assure une homogénéité dans les tests *in vitro*. Les différences observées (décalage dans l'établissement de l'infection ou titre infectieux maximal différent) reflètent cependant la variabilité existant entre ces deux souches.

La majorité des expériences qui ont été menées sur le VR et les IFN de type I ont consisté à établir des cinétiques des différents événements infectieux. Assez rapidement, nous avons constaté, d'une part, une grande variabilité selon les souches et les types cellulaires, mais également des relations non triviales entre les étapes que nous quantifions : réplication (suivi de l'ARN génomique par RT-QPCR) ou bourgeonnement (suivi des particules virales par titration des pfu)... Or, avant de pouvoir investiguer l'effet du système immunitaire sur le VR, il pourrait être plus efficace de mieux comprendre et appréhender sa biologie. La plupart des études publiées sur le VR, mais aussi sur de nombreux virus de la même famille, ne font apparaître que des résultats isolés portant sur une étape précise du cycle viral. Aucun travail n'a permis à l'heure actuelle d'avoir une vision globale, intégrée et dynamique de ce système.

En marge des expériences, « à la paillasse », nous nous sommes efforcés de systématiser et rationaliser les connaissances à notre disposition sur le VR, afin, notamment de mettre au point un outil pouvant pallier certaines impossibilités techniques et offrir un « laboratoire virtuel » efficace et léger.

## **ARTICLE 2**

# Mathematical modelling of Measles Virus

Druelle J, Wild FT , Grenier E, Gerlier D.

Manuscrit en préparation



## **MODELISATION DE L'INFECTION ROUGEOLEUSE**

(Travaux réalisés en collaboration avec

le Dr Denis Gerlier

« Interaction virus-cellules » CNRS FRE 3011 IFR62 Lyon Est ;

et

le Pr Emmanuel Grenier

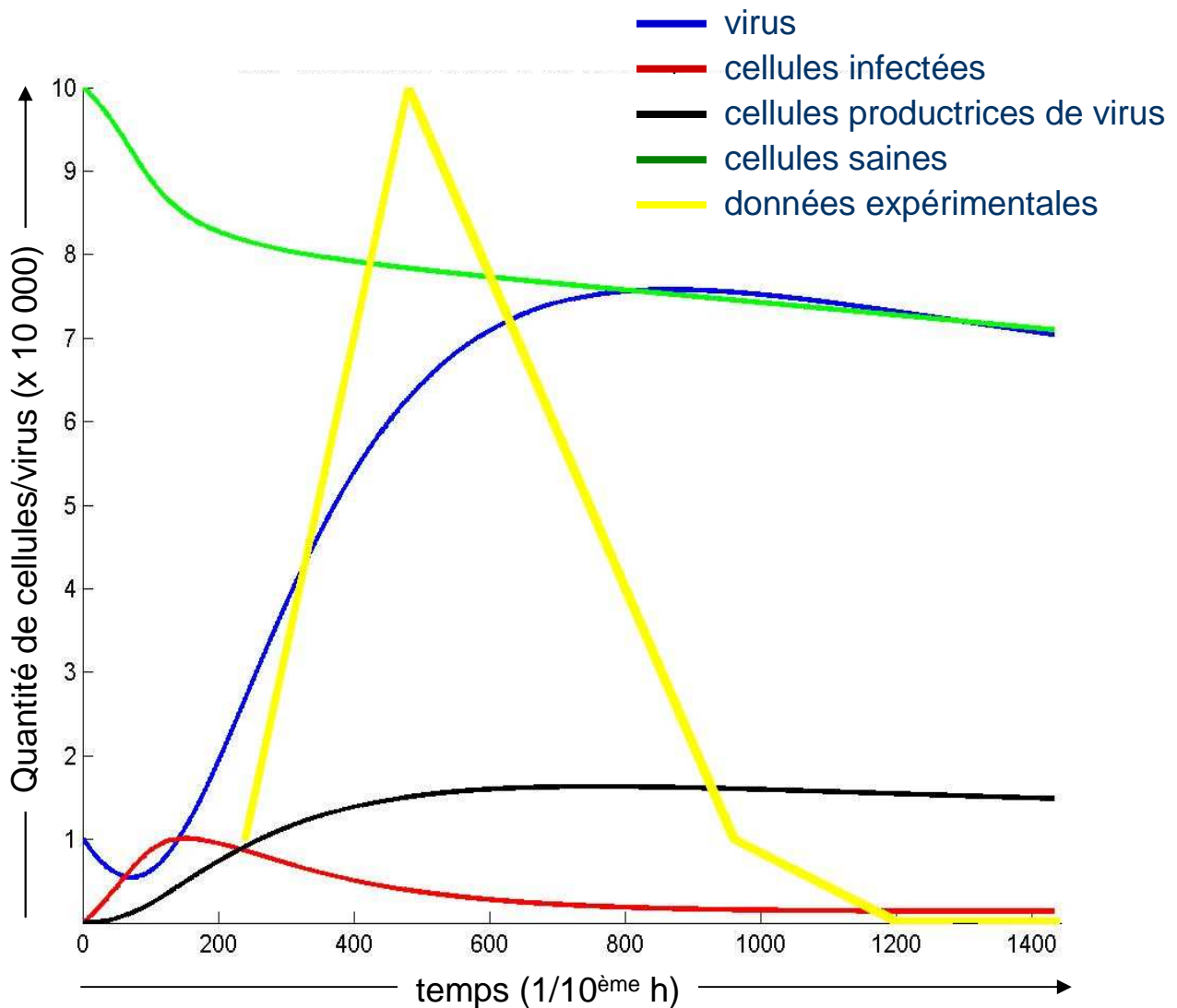
« Unité de Mathématiques Pures et Appliquées » CNRS UMR 5669 ENS de Lyon)

### **Introduction**

Aucune approche mathématique n'a encore été utilisée pour décrire et analyser le cycle du virus de la rougeole. La plupart des travaux réalisés portent sur des infections persistantes et très documentées quantitativement parlant. Outre l'intérêt personnel et l'outil que la modélisation mathématique constitue pour clarifier les liens entre VR et IFN de type I, les travaux présentés par la suite constituent une approche inédite de la dynamique virale.

Depuis près de 20 ans, la notion de gradient d'ARN messagers est connue pour le VR (Cattaneo et al., 1987). Cependant aucune donnée quantitative précise n'avait été établie jusqu'à récemment (Plumet et al., 2005). De plus, aucune explication de ce phénomène, qui est critique pour le développement du virus, n'a encore été validée.

Le virus de la rougeole ne persiste au sein de son hôte (humain ou cellule) que très rarement et au prix de diverses mutations (adaptation). De fait, l'infection rougeoleuse n'atteint pas d'état d'équilibre mais reste toujours dans une phase aiguë que la plupart des systèmes d'ODE actuellement employés ne peut décrire (comme le montre la *figure 1*).



**Figure 1 : Le modèle SIV est inadapté pour étudier le VR**

En bleu la quantité de virus au cours du temps, en rouge, la quantité de cellules infectées, en noir, les cellules produisant des virions, en vert, les cellules saines.

On a représenté en jaune, les données expérimentales d'un suivi cinétique de la production de virions au cours de l'infection de cellules Vero/CD150 par la souche Ed-Zagreb, pendant une semaine.

Les courbes théoriques sont celles obtenues après optimisation des valeurs de paramètres inconnus par la technique d'algorithmes génétiques.

*In vivo* et *in vitro*, la formation de syncytia, fusion de plusieurs cellules saines et infectées, est caractéristique voire moteur de l'infection rougeoleuse, or aucun modèle en ODE ne peut décrire un comportement spatial de ce genre. Des approches telles que celles développées par C. Bauchemin (automates cellulaires + EDO) sont plus adaptées à la problématique du VR mais manquent encore de sensibilité.

J'ai construit le projet de modélisation autour de deux axes en fonction de l'avancée des connaissances dans certaines étapes du cycle infectieux du VR.

En me basant sur les travaux récents du groupe de D.Gerlier sur la dynamique de l'ARNome<sup>6</sup> du VR, j'ai pris le parti de modéliser le fonctionnement de la polymérase durant les temps précoces de l'infection. Mieux comprendre comment et pourquoi la polymérase du VR établit ce gradient caractéristique et clef du cycle répliatif améliorerait notre compréhension de la mécanique virale afin de mieux la contrôler.

Au bout de 6 heures, des protéines virales néosynthétisées entrent en jeu. La production d'ARN génomiques et antigénomiques met à disposition de nouvelles matrices pour la transcription. Dès lors, les modèles précédents ne sont plus suffisants pour représenter le cycle viral. En dépit de données quantitatives précises sur les cinétiques de la plupart des événements moléculaires, j'ai développé une modélisation intégrée du cycle du VR. A mi chemin entre les modélisations par ODE, automates cellulaires et systèmes basés agent, nous avons « traduit » ce que l'on connaît du cycle répliatif du VR en langage compilable afin de mimer l'infection d'un tapis cellulaire uniforme.

L'ensemble des systèmes a été codé sous Matlab distribué par The Mathworks Inc.

Ces travaux constituent une trame qui met en avant certaines incohérences dans notre façon de penser le virus de la rougeole, des pistes pour les chercheurs mais aussi un nouvel outil qui se révélera, nous l'espérons, utile.

---

<sup>6</sup> Ensemble des molécules d'ARN (viraux en l'occurrence) contenus dans une cellule.



## **Modéliser l'activité de la polymérase du VR**

Les résultats de Plumet et al fournissent les premières données quantitatives précises sur la dynamique de l'ARNome du VR (Plumet et al., 2005). Grâce à leur système de RT-QPCR, on a pu avoir accès à la vitesse moyenne d'élongation de la polymérase virale. Parmi les conclusions de leurs observations, on notera le fait que contrairement à ce qui était pensé auparavant, il semble nécessaire que les enzymes soient actives dès le départ et réparties le long du génome. En outre, sur un même génome, des enzymes pourraient réaliser de la transcription ou de la réplication indifféremment.

## **Hypothèses et connaissances de départ**

Durant les 6 premières heures du cycle réplcatif, on peut considérer qu'il n'y a pas de nouvelles polymérases produites et pas de génome néo synthétisé (Plumet et al., 2005). Durant ce laps de temps, les seuls agents intervenant dans l'accumulation des ARN messagers viraux sont donc les molécules embarquées dans le virion et relarguées au cours de l'infection. On considère qu'il y a entre 20 et 50 polymérases par matrice ARN (Griffin, 2006) et qu'il y a au moins deux molécules d'ARN par virion (Rager et al., 2002).

Il n'y a pas, à l'heure actuelle, de consensus sur le mécanisme de fonctionnement de la polymérase. On observe, qu'au cours de l'infection, s'établit un gradient d'ARN messagers viraux, les gènes les plus transcrits étant ceux qui sont les plus proches de l'origine (Plumet et al., 2005).

La polymérase ne peut entrer sur le génome qu'au niveau du codon initiateur, en amont du gène N (Griffin, 2006).

Compte tenu de ces limitations, on peut concevoir plusieurs mécanismes potentiels pour la synthèse d'ARN par la polymérase du VR.

Depuis sa position initiale, l'enzyme avance à la vitesse moyenne de 3 nucléotides par seconde le long du génome ARN. A chaque région intergénique, l'enzyme peut arrêter son activité de polymérisation selon une certaine probabilité en lien direct avec l'affaiblissement observé au niveau du gradient d'ARNm. Cet arrêt peut conduire au détachement de l'enzyme, à un arrêt physique le long du génome ou peut correspondre à une perte d'activité. Aucune étude actuelle ne permet de privilégier une hypothèse plutôt qu'une autre sinon « l'instinct » des chercheurs. Dans la mesure du possible, j'ai essayé de traiter chacune de ces possibilités en privilégiant les modèles les plus simples (à transcrire) et les moins coûteux (en hypothèses et en ressources machines). Je présente ici les résultats de certains de ces modèles les plus aboutis.

### L'enzyme se détache ...

L'hypothèse la plus couramment citée est celle d'un détachement de l'enzyme. La modélisation d'un tel mécanisme implique de prendre en compte la migration de l'enzyme au sein du cytosol selon une constante de diffusion inconnue (Darzacq et al., 2007).

Compte tenu de la structure de la nucléocapside, le modèle admis actuellement serait que les enzymes parcourraient l'hélice par l'intérieur (dans un cylindre d'environ 5 à 6 nanomètres de diamètre). La liberté de déplacement serait alors limitée. Malgré l'absence de données précises sur la géométrie de la polymérase, on pourrait développer une approche qui consisterait à étudier l'encombrement maximal de l'hélice afin de valider ou pas le fait que les polymérases puissent circuler à l'intérieur.

Si l'on se base sur un modèle brownien<sup>7</sup> pour le mouvement de la polymérase, comment faire en sorte que l'enzyme retourne à l'origine du génome et n'aille pas se perdre dans l'océan cytosolique (si elle n'est pas confinée au sein de la nucléocapside) ? De plus, si l'on conçoit un détachement **aléatoire** des enzymes (au mieux, restreint au niveau des régions intergéniques) intuitivement, des problèmes

---

<sup>7</sup> Description mathématique du mouvement aléatoire d'une « grosse » particule immergée dans un fluide et qui n'est soumise à aucune autre interaction que des chocs avec les « petites » molécules du fluide environnant.

d'encombrement (d'embouteillage) risquent d'émerger. Ce modèle est actuellement en cours de développement mais met clairement en évidence un manque crucial de données quantitatives et biochimiques (importance des partenaires cellulaires). De plus, une approche par EDO est clairement insuffisante pour décrire ces phénomènes, il faudrait développer une simulation basé agent ou s'inspirer de modèles mécaniques (wagon sur montagnes russes par exemple).

### L'enzyme s'inactive...

Durant la transcription, la nucléocapside doit s'ouvrir pour laisser la polymérase avancer. Ces changements de la géométrie du complexe polymérase/ARNg pourraient s'accompagner d'une inactivation de l'enzyme. Dans ce modèle, je suppose que l'enzyme parcourt le génome et à un moment donné (au niveau du passage des régions intergéniques ?) s'inactive (suite à une modification d'ordre structurel par exemple). On peut alors supposer qu'elle continue de parcourir le génome sans produire d'ARN messagers ou, puisque l'énergie nécessaire au déplacement proviendrait de la réaction de polymérisation, l'enzyme inactive, s'arrêterait et aurait besoin d'une polymérase active qui la pousserait.

### Inconnues :

On ignore ce que contient chaque particule virale.

Combien y a-t-il de nucléocapsides ?

De quoi sont-elles constituées : ARN génomique et antigénomique ?

Dans le cas le plus probable où il y a plusieurs matrices ARN, quelle est la géométrie de leur organisation ? antiparallèle ? avec leurs extrémités connectées ?

Compte tenu de l'ensemble de ces données, j'ai développé plusieurs approches, de plus en plus complexes. Dans un premier temps, on supposera que les enzymes peuvent se déplacer indépendamment de la production d'ARN. Il s'agit alors de définir

le plus précisément possible le contenu génétique (combien de matrices ?) et les probabilités d'extinction. Dans un deuxième temps, j'ai considéré que les enzymes ne peuvent se déplacer en l'absence de polymérisation et fait l'hypothèse qu'elles pouvaient se pousser les unes les autres.

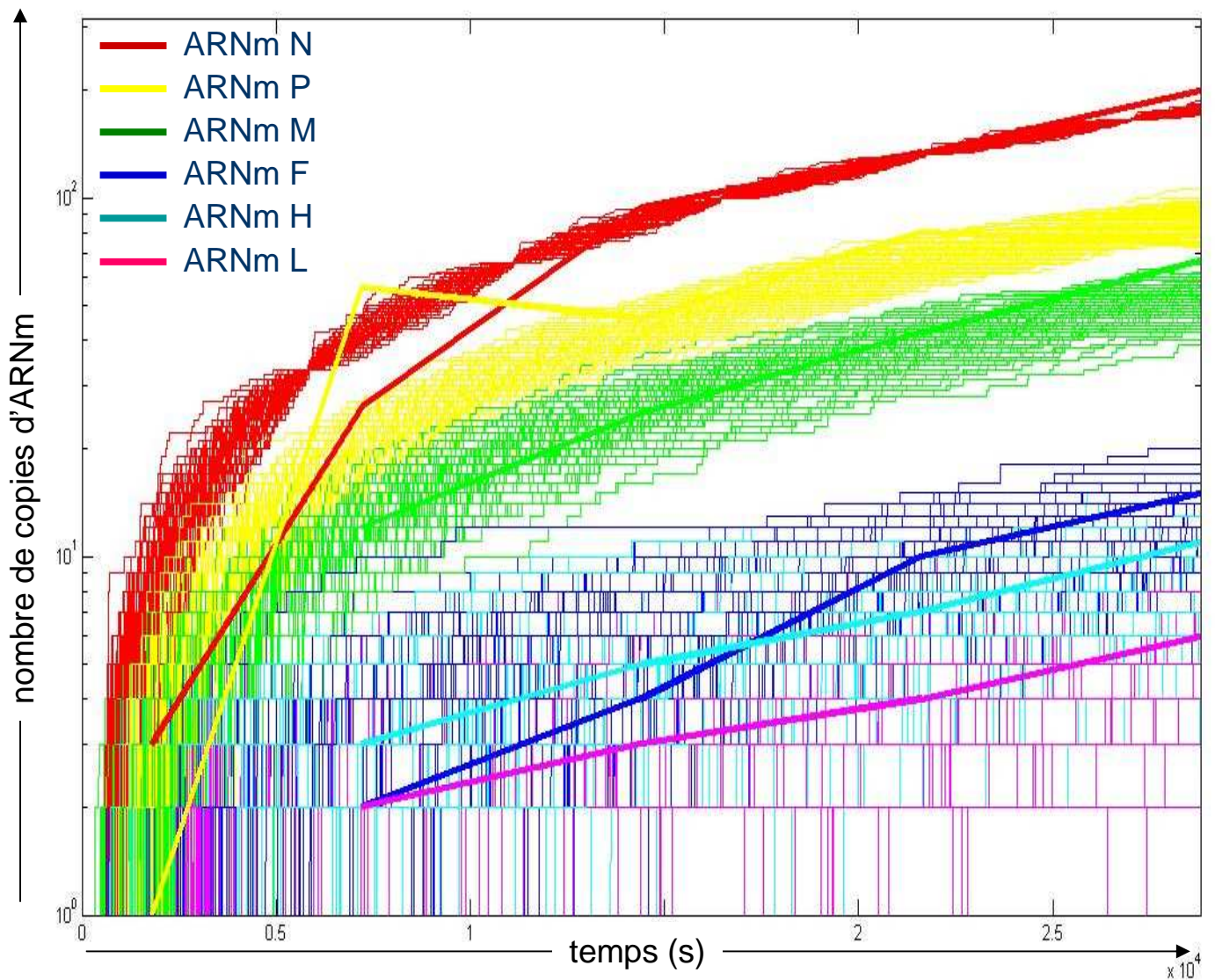
### *Hypothèse 1 : Un ARN génomique circulaire sans arrêt de la polymérase.*

Le modèle le plus simple à écrire et envisager est celui de polymérases qui s'inactiveraient mais continueraient à progresser le long du génome (un génome par virion).

On considère un brin d'ARN qui se courberait sur lui-même : l'entrée et la sortie du génome auraient lieu sans délai. Au temps zéro, un nombre fixe de polymérases est disposé aléatoirement le long du génome. Toutes avancent à la vitesse de 3 nucléotides par seconde. Au niveau des régions intergéniques, elles peuvent s'inactiver selon une probabilité attribuée aléatoirement. On considère qu'un ARN messager est produit quand une polymérase active arrive au niveau du « gene end » correspondant à un gène donné. Quel que soit son statut, une polymérase arrivée en fin de génome, se retrouve ensuite en début de génome et retrouve un statut actif.

Techniquement, on peut simuler le déplacement et l'activité des polymérases (deux tableaux qui enregistrent la position sur le génome et l'activité (0 ou 1) pour chaque polymérase). A chaque région intergénique (associée à une position précise, ex : nucléotide 1687 pour la région intergénique NP), correspond une probabilité d'extinction d'activité ; un nombre aléatoirement choisi détermine si l'activité passe à 0 ou pas. Une fois cette activité tombée à 0, elle ne changera pas avant que la polymérase ne revienne à l'origine.

J'ai également posé et résolu ce système de manière analytique. Compte tenu de la vitesse moyenne de 3 nucléotides par seconde, on détermine aisément le nombre de



**Figure 2 : Cinétiques d'accumulation des ARN messagers viraux selon le modèle d'inactivation de la polymérase.**

**Sont représentés les résultats de 100 simulations pour les conditions initiales suivantes :** 33 polymérase par génome, probabilité d'extinction entre N et P = 0,5 ; P et M = 0,4 ; M et F = 0,8 ; F et H = 0,2 ; H et L = 0,45.

On obtient un faisceau de courbes pour chaque type d'ARNm de plus en plus large que le gène est tardif.

En gras, sont représentées les courbes issues de Plumet et al.

En rouge, l'ARNm codant pour N, en jaune, pour P, en vert, pour M, en bleu, pour F, en turquoise, pour H et en rose pour L.

« tours » de génome entier que l'enzyme a le temps de réaliser dans un temps donné. Ensuite, selon la position initiale, on déduit facilement la position finale. On peut, dès lors, calculer la quantité de chaque ARN messenger en fonction de la position initiale de chaque polymérase.

La deuxième méthode est évidemment plus rapide en termes de temps de calcul mais les deux techniques donnent exactement les mêmes résultats.

En se basant sur les résultats de la dynamique de l'ARNome de Plumet et al., on peut déterminer les différentes inconnues de notre système : le nombre de polymérases et les probabilités d'extinction d'activité à chaque région intergénique (Plumet et al., 2005). Les valeurs pour lesquelles on obtient les écarts entre valeurs théoriques et valeurs expérimentales les plus faibles sont les suivantes :

### **33 polymérases par génome (=par virion)**

Une **probabilité d'extinction** entre **N et P** de **50 %**,  
entre **P et M** de **40 %**,  
entre **M et F** de **80 %**,  
entre **F et H** de **20 %**,  
entre **H et L** de **45 %**.

La *figure 2* montre les résultats que l'on obtient après 100 simulations de ce modèle avec les valeurs ci-dessus. Les courbes représentées en gras sont les résultats obtenus par Plumet et al. Puisque le modèle fait intervenir des probabilités d'extinction, on obtient tout un panel de résultats possibles, représentés par les traits les plus fins. Pour les gènes les plus tardifs, les résultats varient beaucoup plus parce que le statut « actif » de la polymérase dépend des probabilités précédentes. On peut considérer que chacune de ces courbes représente la situation au sein d'une cellule. Si l'on moyenne les résultats, on obtient des courbes expérimentales quasiment superpo-

sées aux résultats de Plumet et al. De fait, il faut considérer ces résultats comme des valeurs moyennes mais notre modèle montre qu'au sein de chaque cellule, la cinétique de l'ARNome peut être différente d'une cellule à l'autre.

### Hypothèse 2 : d'autres topologies pour le contenu génétique

En se basant sur ce modèle, j'ai étudié d'autres topologies des matrices génétiques apportées par une particule virale infectieuse.

Soit la topologie suivante : deux génomes, tête-bêche – c'est-à-dire 3'—5' ...3'—5' – (Rager et al., 2002 ; Takeda et al., 2006). Afin de simplifier les calculs et parce que les extrémités des génomes sont accolées, j'ai supposé qu'il n'y avait pas de délai pour le passage entre les deux génomes. Dans ce cas, cette topologie revient à considérer deux génomes circulaires, indépendants. De la même façon, s'il n'y a que des ARN génomiques, en supposant que le passage de l'un à l'autre se fait sans délai, on peut toujours considérer que ces topologies correspondent à plusieurs génomes circulaires, indépendants. De fait, peu de topologie sont acceptables. Le système n'a besoin que de 33 polymérases pour être efficace. Si l'on a deux génomes, il n'y a donc qu'entre 16 et 17 polymérases par génome. Il est connu que chaque unité génétique porte entre 20 et 50 polymérases. Donc, dans notre modèle, il ne peut y avoir plus de deux génomes, tête bêche, sans délai entre l'entrée et la sortie.

La présence d'ARN antigénomique « monopolise » des polymérases qui sont alors inutiles. Par rapport au modèle « un génome circulaire », il faut pondérer tous les résultats par le facteur  $G = \frac{\text{nombre\_de\_génomes}}{\text{nombre\_de\_génomes} + \text{nombre\_d\_antigénomes}}$ . On comprend que plus le rapport de génomes par rapport aux antigénomes est important, plus on est proche du modèle « un génome circulaire ». De fait, le nombre de polymérases nécessaires pour obtenir des résultats similaires à ceux du modèle « un génome circulaire » est égal à  $\frac{33}{G}$  pour le virion, soit  $\frac{33}{\text{nombre\_de\_génomes}}$  polymérases par

(anti)génomés. On constate ainsi que seul le nombre de génomes influe sur le nombre de polymérasés.

Le tableau ci-dessous donne quelques unes des valeurs que l'on peut déduire de ce modèle (en rouge, les combinaisons non réalistes).

nombre de génomes	nombre d'antigénomés	G	polymérasés par virion	polymérasés par ARN
1	0	1	33	33
2	0	1	33	16-17
3	0	1	33	11
1	1	0,5	66	33
1	2	0,33	99	33
1	3	0,25	132	33
2	1	0,66	49-50	16-17
2	2	0,5	66	16-17
2	3	0,4	82-83	16-17
3	1	0,75	44	11
3	2	0,6	55	11

En fait, pour déterminer le contenu génétique d'un virion, il faudrait avoir une estimation fiable du nombre de polymérasés embarqués au sein du virion. A l'heure actuelle, nous pouvons conclure, que selon ce modèle (c'est-à-dire sans délai entre la sortie et l'entrée du génome), il ne peut y avoir plus de 2 génomes par nucléocapside. Le nombre d'antigénomés peut varier indéfiniment.

Au final, poser l'hypothèse que la polymérase parcourt le(s) génome(s) en s'inactivant mais en continuant à se déplacer, implique qu'entre chaque gène, les enzymes peuvent s'inactiver selon les probabilités présentées précédemment et que seule, la quantité de polymérasés importe. Faute de données précises, nous n'avons pas souhaité approfondir cette étude : l'hypothèse de continuité entre début et fin de génomes est moins contraignante que celle d'un mouvement sans apport énergétique. En effet, il est indéniable qu'appliquer un temps de latence entre sortie et entrée des génomes, permet une plus grande plasticité dans les topologies que l'on peut retrouver.



### Hypothèse 3 : L'enzyme est poussée...

L'une des hypothèses les plus contraignantes du modèle précédent est que le déplacement des polymérase le long des matrices s'opère en l'absence de réactions de polymérisation. On peut concevoir de tels phénomènes si des partenaires cellulaires constituent une partie de la machinerie transcriptionnelle du VR (et lui permettent de progresser le long du génome).

Alternativement, l'inactivation de l'enzyme s'accompagnerait d'un arrêt de l'enzyme le long de la matrice. Il y aurait alors des polymérase actives et mobiles/matrices, pouvant transcrire le génome, et des polymérase inactives et immobiles. Une polymérase active/mobile pourrait pousser les polymérase inactives tout du long du génome. Aucune mesure à l'heure actuelle ne permet de vérifier si cette idée est réaliste et le cas échéant combien de polymérase pourraient être poussées par une seule enzyme motrice.

Pour ce modèle, j'ai privilégié certaines topologies pour le contenu génétique du virion, principalement, celle contenant deux ARN génomiques, tête bêche. Les résultats de Plumet et al. proposent une répartition équitable des polymérase le long des matrices, on se basera donc sur une répartition de ce genre, au temps initial (Plumet et al., 2005). À chaque région intergénique, une probabilité de s'arrêter et de s'inactiver est définie, aléatoirement. Pour prendre en compte le degré de couverture du génome par une unité de polymérase, les polymérase immobiles sont déplacées (arbitrairement) de 30 nucléotides au-delà, puis elles ne bougent plus.

Une analyse littérale de ce problème a été tentée mais n'a pas abouti (communication personnelle du Dr Julien Michel, UMPA, ENS Lyon), nous nous sommes donc concentrés sur des simulations pour résoudre ce système.

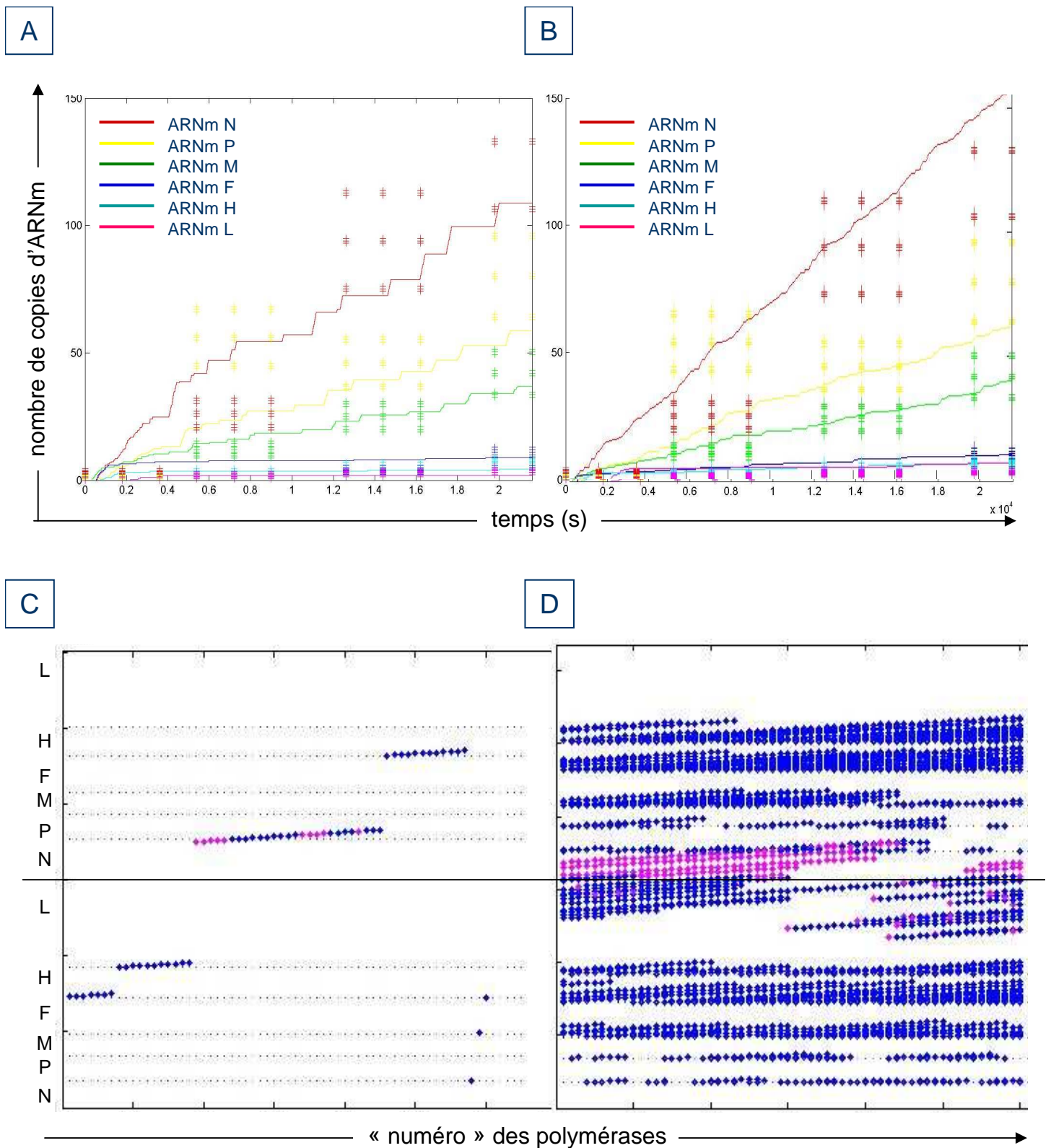
En se basant sur les valeurs de probabilités obtenues avec le précédent modèle, on peut retrouver des séries de courbes relativement cohérentes avec les données expé-

rimentales mais moins ajustées compte tenu de la forme en « escalier » (*figure 3A*). Si l'on moyenne les résultats de 100 simulations, on retrouve des courbes très proches des courbes expérimentales de Plumet et al. (*figure 3B*). L'observation du déplacement des polymérase le long des génomes met en évidence l'établissement rapide de trains de polymérase, de longueurs variables et mus par une seule polymérase active (*figure 3C*). On observe également des trains entiers immobiles, rassemblés juste après les régions intergéniques. La majorité des trains présentant au moins une polymérase active se situe entre le gène N et le gène P. De plus, sur 100 simulations, moins de 4% des polymérase sont actives au bout des 6 heures (*figure 3D*).

Contrairement au modèle précédent (avec inactivation mais sans arrêt), l'état initial des polymérase (inactif/immobile) a beaucoup d'impact sur le déroulement de la transcription (données non montrées). De plus, l'emplacement initial des polymérase est lui aussi capital dans la suite de la transcription.

La distribution « finale » de polymérase correspond à un état initial pour une prochaine infection. Il faudrait donc admettre que les polymérase sont initialement massées juste après les régions intergéniques et que la plupart sont inactives (*figure 3C et 3D*). Cette hypothèse permettrait d'expliquer certains résultats expérimentaux obtenus par Plumet et al. (Plumet et al., 2005). En effet, dans les temps précoces, les quantités d'ARNm codant pour P et H sont respectivement supérieures à celles d'ARNm codant pour N et F. Une plus grande proportion de polymérase, actives, initialement distribuées juste avant P et H peut expliquer ces observations.

De plus, on a pu observer que la grande majorité des simulations, au bout de 6 heures, ne présente que des polymérase inactives et immobiles (*figure 3D*). Or, c'est à partir de 6 heures que de nouvelles polymérase sont produites et disponibles éventuellement pour « réveiller » cette machinerie immobile. On pourrait également considérer que l'état dans lequel toutes les polymérase seraient dans un état inactif constitue un autre type de particules défectives. Ces résultats n'invalident pas le modèle.



### Figure 3 : Le modèle du train de polymérases

- A. Un exemple de simulation pour les conditions initiales optimales, définies précédemment.  
 B. Représentation de la moyenne de 100 simulations

Les astérisques représentent les marges d'incertitude par rapport aux valeurs de Plumet et al (pour l'axe du temps, une demie heure, pour l'axe des ARNm, 10%)

- C. Répartition des polymérases en fin de parcours  
 D. Représentation de la répartition des polymérases après 100 simulations

En ordonnée, la localisation sur les 2 génomes mis bout à bout. Les pointillés représentent les régions intergéniques.  
 En abscisse, le « numéro » de la polymérase. On a privilégié une visualisation 2D pour plus de clarté.  
 Les losanges bleus représentent les polymérases inactives, les losanges roses, les polymérases actives.

Pour obtenir les résultats expérimentaux de Plumet et al., il suffit de supposer que l'infection qui s'opère avec 1 PFU représente en fait l'infection par plusieurs dizaines de particules virales dont à peine 4% peuvent réellement induire une infection.

En l'absence de données précises sur l'existence de trains de polymérase et la possibilité pour une seule polymérase d'en pousser au moins une dizaine, ce modèle reste théorique. Même si les courbes obtenues sont moins ajustées vis-à-vis des données expérimentales (*figure 3B*), ce modèle permet de fournir une hypothèse pour expliquer certains résultats expérimentaux.

Les travaux présentés ici se basent sur des conceptions, qui, sans être triviales, restent simples. En écho de travaux réalisés sur la polymérase polIII, nous essayons de développer une approche avec des polymérase allant plus vite, mais réalisant des pauses, au terme desquelles elles pourraient se détacher. Dans ce modèle il faudrait supposer l'intervention de la machinerie cellulaire pour transporter les polymérase qui se sont détachées.

### **Modéliser le cycle viral**

Au-delà de 6 heures, de nouvelles polymérase entrent en jeu, provenant de la traduction des ARN messagers produits précédemment. Dès lors, les modèles présentés précédemment deviennent incapables de rendre compte de cette évolution (nouvelles matrices, nouvelles enzymes). Pour une vision plus intégrée du cycle viral, nous avons développé une approche permettant d'appréhender toutes les espèces moléculaires d'intérêt, pendant un temps plus long.

Ce modèle devra tenir compte de toutes les données quantitatives connues et « traduire » les schémas classiques du cycle du VR : attachement, entrée, transcription, traduction, réplication, bourgeonnement et formation de syncytia. Une fois encore, face au manque de données quantitatives précises ainsi qu'au flou existant autour des différents mécanismes mentionnés, on ne peut établir qu'un modèle partiel.

*In vitro*, la titration du VR peut se faire sur un tapis de cellules Vero exprimant les deux récepteurs connus. La géométrie de ces cellules épithéliales permet de les apparenter à des losanges. Le tapis cellulaire peut alors être assimilé à une matrice dont chaque case constitue une cellule. Contrairement à d'autres modèles, nous ne considérerons que 4 cellules voisines dans ces conditions.

Les différents **agents** intervenant au cours du cycle viral sont les suivants :

- ④ Virions infectieux ou pas (pfubourgeonne ou pfudefbourgeonne), qui représentent ce qu'on considère couramment comme le virus, la particule à l'état libre.
- ④ Les différentes protéines virales : N, P V, C, M, F, H et L. En particulier, les polymérases, (4P+1L) seront réparties en répliques, antirépliques et transcriptases.
- ④ Les différents ARN viraux : ARN génomique (ARNg), ARN antigénomique (ARNag), les différents ARN messagers (ARNmN, ARNmP, ARNmV, ARNmM, ARNmF, ARNmH, ARNmL).
- ④ Les récepteurs CD46 et CD150, assimilés à un seul type de récepteur.
- ④ Les ressources de la cellule.

Pour prendre en compte les aspects spatiaux du développement de l'infection virale, on va tirer parti de la conception matricielle du tapis cellulaire. Chaque case de la matrice représente une cellule. On définit autant de matrices qu'il y a d'espèces moléculaires (= agents). A chaque instant, on dispose ainsi d'une vingtaine de tableaux recensant la quantité de chaque constituant viral au sein de toutes les cellules. L'évolution temporelle du système est régie par des équations différentielles de type SIV, simulées, c'est à dire ramenées à l'état de suite entre la quantité à un instant  $t$  et la quantité à l'instant  $t+1$ . Les particules virales ayant bourgeonné peuvent diffuser le long des matrices. La formation de syncytia est assimilée également à une diffusion entre cellules/cases jointives. Pour simplifier les calculs, on définit également des quantités ne pouvant être mesurées expérimentalement et, éventuellement, non biologiques (exemple, la quantité d'ARN codant pour la protéine C).

Grâce à la bibliographie, on peut avoir accès à certaines données quantitatives. Elles sont résumées dans le [tableau 2](#) (à la fin de cette partie).

Le modèle employé va itérer la routine de calcul que nous allons détailler ensuite, pendant l'équivalent d'une semaine afin de retrouver les données expérimentales de cinétique. Ces données concernent principalement les particules virales infectieuses obtenues et dans une moindre mesure, quelques données de quantification des ARN messagers, génomique et antigénomique.

On va distinguer arbitrairement plusieurs étapes :

- L'initialisation de l'infection est faite au début de la simulation. Ensuite, la routine de calcul s'établit : à chaque instant, on exécutera successivement les événements suivants :
- Des étapes « en dehors de la cellule » : l'attachement des particules virales, leur entrée, la *downregulation* des récepteurs à la surface cellulaire.
- Des étapes « dans la cellule » : mettre à jour les différents paramètres d'efficacité pour les réactions en fonction du vieillissement de la cellule puis les phénomènes de transcription/réplication et de traduction. Sous certaines conditions, il y aura établissement de syncytia et/ou bourgeonnement.
- On « photographie » ensuite l'état de la cellule (mise en mémoire de la valeur de chacune des variables dans toutes les cellules). Ces valeurs serviront de base pour l'itération suivante.

Cette routine est effectuée jusqu'à obtenir des courbes représentant une cinétique de 7 jours. L'enregistrement progressif de toutes les valeurs permet d'observer à chaque instant la situation au sein de chaque cellule et d'avoir ainsi une vision globale du « tapis cellulaire ».

Le but du modèle est de représenter *in silico* ce qui se produit dans la plaque 6 puits. On s'efforcera donc dans la mesure du possible d'avoir accès à chaque instant à des valeurs entières pour les particules virales, que ce soit au moment où elles se dé-

gradient, s'attachent ou sont produites. Techniquement, les cinétiques de dégradation par exemple, assimilées à des cinétiques de désintégration radioactive, sont approximées en prenant la partie entière. On ne « perd » pas des fractions de virus, mais au bout d'un certain temps, un virus « disparaît ».

Contrairement au modèle classique SIV, notre modèle ne considérera pas des variables du temps ( $virus(t)$ ) mais du temps et de l'espace : par exemple,  $\rho_{\text{sub}}(\text{cellule}, t)$  représente la quantité de virions au temps  $t$ , « au-dessus » de la cellule  $\text{cellule}$  repérée par des coordonnées sur la matrice.

*Détaillons maintenant le programme à proprement parler.*

1. L'initialisation va préparer tous les tableaux vides dont on aura besoin afin de gérer au mieux les ressources machines.
2. On donne ensuite à chaque constante sa valeur, tirée de la bibliographie, de nos propres résultats ou choisie aléatoirement.

Les conditions initiales sont les suivantes : le tapis cellulaire est composé de  $10 \times 10$  ou  $100 \times 100$  cellules qui ne se multiplient pas mais peuvent mourir, naturellement ou d'infection. Le statut « vivant » d'une cellule est déterminé par la quantité de ressources dont elle dispose. Ces ressources sont utilisées par les différents processus viraux détaillés ensuite. On va considérer qu'à l'origine, une cellule vivante peut assumer la production de plusieurs millions de molécules (ARN, protéines...). Selon les modèles, certaines cellules pourront être plus ou moins âgées et leurs ressources énergétiques diminuées d'autant. Au fil du temps, les ressources s'amenuisent et la cellule mourra d'infection quand elles deviendront nulles. Une étude préalable nous a permis de modéliser la croissance des cellules Vero SLAM. Nous avons donc accès à la vitesse à laquelle elles meurent naturellement. Un des modèles fait intervenir la mort « programmée » de ces cellules, indépendamment de l'infection. Compte tenu de la mortalité due à l'infection, nous ne considérons pas que les cellules puissent être dans un état stationnaire.

3. L'infection consiste à placer aléatoirement des virus sur la matrice cellulaire : un tableau *pfubourgeonne* est rempli de 0 et 1 selon qu'un virus occupe ou non une case particulière. On peut distinguer des particules virales infectieuses ou non et il y a alors deux tableaux : *pfubourgeonne* et *pfubourgeonnedef*.

*Commence ensuite la routine de calcul.*

4. A chaque instant, toutes les cellules reçoivent aléatoirement une valeur pour des paramètres tels que l'entrée ('ENTREE') ou l'attachement ('ATTACHEMENT') auxquels on comparera les valeurs seuils définies précédemment (et tirées de la bibliographie, [tableau 2](#)).

5. Les virus diffusent dans le milieu.

Chaque case du tableau *pfubourgeonne* reçoit ( $\frac{1}{4} \times$  diffusion) du contenu d'une case voisine. Aux bords, on considère que le virus « rebondit » et revient dans la case d'origine. On ne reçoit pas des fractions de virus. C'est aussi à cette étape-là que les particules virales sont dégradées selon une cinétique assimilée à la désintégration radioactive (en  $N(t) = N(0) \times e^{-\lambda t}$  avec  $\lambda = \frac{\ln(2)}{t_{1/2}}$  et  $t_{1/2}$  le temps de demi-vie de la molécule).

6. Le virus s'attache à la cellule.

Un tableau *attachepfu* (et *attachepfufef*) compte les particules virales attachées. Un *pfubourgeonne* devient un *attachepfu* en fonction de la valeur définie précédemment ('ATTACHEMENT') et d'une valeur seuil (tirée du [tableau 2](#)).

La *downregulation* des récepteurs est effectuée à ce moment-là également. La quantité de récepteurs diminue en fonction de la quantité de *pfubourgeonne* présent au niveau de la cellule.

$$\text{recepteur}(\text{cellule}, t + 1) = \text{recepteur}(\text{cellule}, t) - \text{downregulation} \times \text{pfubourgeonne}(\text{cellule}, t)$$

On peut aussi tenir compte des protéines H présentes sur les cellules avoisinantes. La *downregulation* de la protéine H en fonction des récepteurs exprimés par les cellules avoisinantes peut également intervenir.



## 7. Le virus entre dans la cellule

Selon une valeur seuil fixée auparavant (*tableau 2*) et un nombre aléatoire donné au début de la séquence, le virus entre ou pas dans la cellule. Si c'est le cas, on incrémente les quantités d'ARN génomique (ARN<sub>g</sub>) et éventuellement d'ARN antigénomique (ARN<sub>ag</sub>) ainsi que des diverses protéines virales (N,P,M...).

## 8. Mise à jour des paramètres cellulaires

Les réserves métaboliques de la cellule sont diminuées en fonction des quantités d'ARN et de protéines produites l'instant d'avant. Toutes les « constantes » cinétiques caractérisant la réplication, la transcription et la traduction sont réduites selon le rapport  $\frac{\text{réserves\_énergétiques}(t)}{\text{réserves\_énergétiques}(0)}$ .

Dans le cas où on définit les activités de la polymérase en fonction des quantités de substrat disponibles, c'est aussi à cette étape là que sont dénombrées les « réplicases », les « antiréplicases » et les « transcriptases ».<sup>8</sup>

## 9. Production des constituants viraux

### a) transcription

On peut considérer une accumulation linéaire des ARNm en se basant sur les travaux de Plumet et al. (Plumet et al., 2005). La quantité d'ARNm est alors définie par l'équation suivante :  $ARNm(\text{cellule}, t) = \text{vitesse\_d\_accumulation\_ARNm} \times t$ . On pondère cette quantité par deux facteurs : le pourcentage de transcriptases parmi les polymérases (l'accumulation linéaire n'a lieu qu'en début d'infection, quand toutes les polymérases ont une activité de transcription) et la quantité d'ARNg « utile », c'est-à-dire réellement impliqué dans les phénomènes de polymérisation.

<sup>8</sup> On tient alors compte du nombre de protéines N disponibles, de la quantité de chaque matrice ARNg et ARNag. Chacune de ces quantités est pondérée par un facteur « d'utilité ». Le fait que le promoteur présent sur l'ARNag soit plus fort pondère positivement la quantité de réplicases au détriment des antiréplicases. Puisque seule la quantité de protéines N est limitante, les transcriptases sont définies par défaut comme l'ensemble des polymérases n'étant ni réplicases ni antiréplicases.

b) réplication

Pour les phénomènes de réplication et d'anti réplication, on peut également considérer une accumulation linéaire selon le même principe et en se basant sur la cinétique tardive d'accumulation des génomes et antigénomes (Plumet et al., 2005). Il est vrai que les auteurs font l'hypothèse d'une accumulation exponentielle des génomes. Selon nous, cette analyse provient du fait que le système s'autocatalyse mais que le mécanisme de réplication suit bien une cinétique linéaire.

La quantité de protéines  $N$  est diminuée proportionnellement à la quantité d'ARNg et ARNag produits.

c) traduction

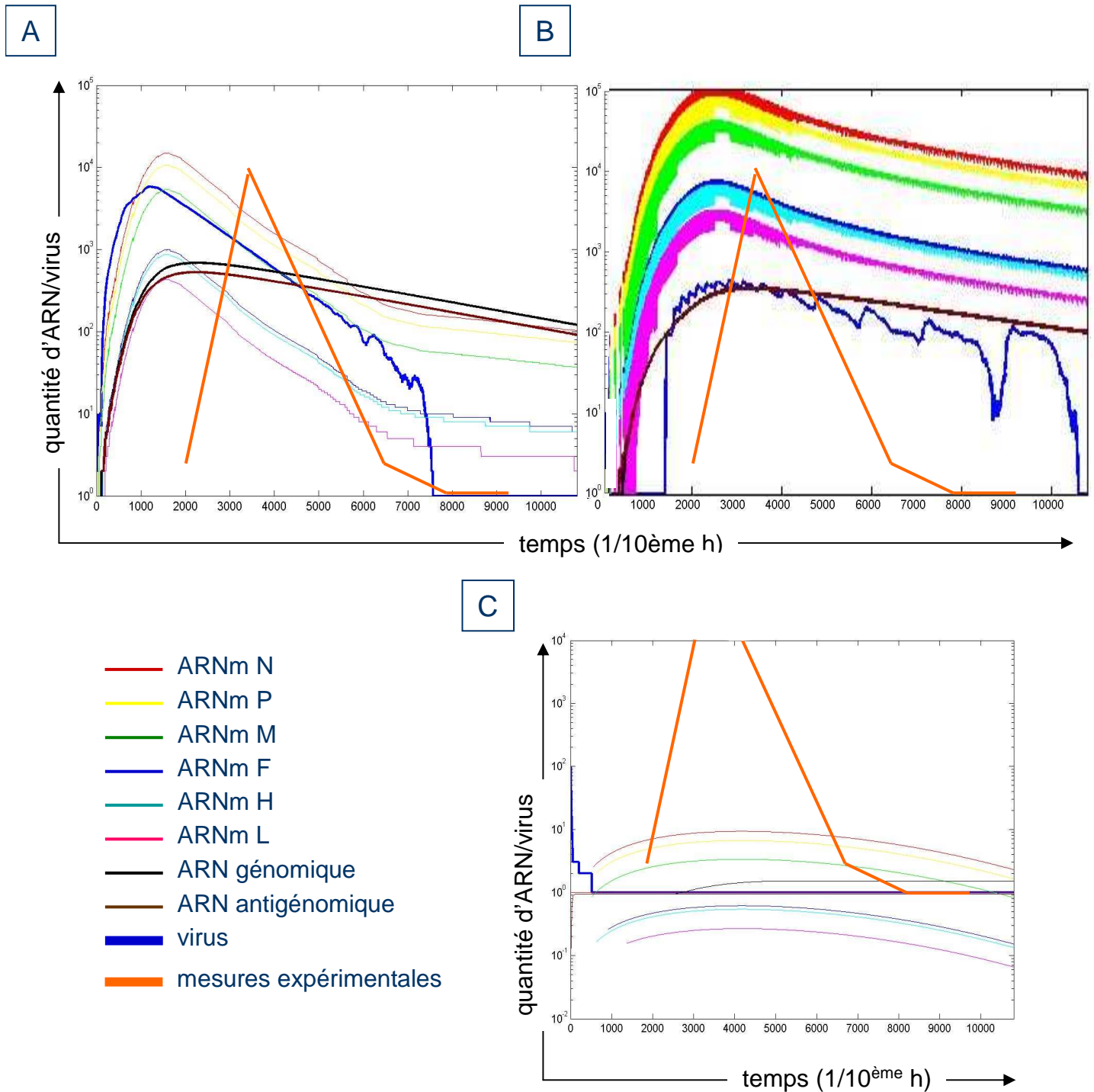
La traduction dépend de la quantité de ribosomes et d'ARNm. La vitesse d'accumulation de chaque protéine a été calculée à partir de la vitesse de parcours d'un ARNm par un ribosome, la vitesse est donc proportionnelle à la longueur de l'ARNm. On considère que plus un type d'ARNm est représenté, plus il y a de ribosomes engagés sur ces ARNm. Par exemple, la quantité de protéines  $N$  est définie par :

$$\text{protéine}N(\text{cellule}, t+1) = \text{protéine}N(\text{cellule}, t) + \text{vitesse}_{\text{production}}_{\text{prot}N} \times \min(\text{ARNm}N(\text{cellule}, t), \text{ribosome}) \times \frac{\text{ARNm}N(\text{cellule}, t)}{\text{ARNmTotaux}(\text{cellule}, t)}$$

#### 10. Fusion cellulaire viro induite : formation de syncytia

J'ai considéré qu'au-delà d'un certain seuil de protéines  $H$  et  $F$ , si les cellules avoisinantes disposent encore de suffisamment de récepteurs, il y a fusion.

On identifie d'abord les cellules pouvant fusionner. Ensuite, selon le même principe que pour la diffusion des pfubourgeonne, (étape 5) toutes les variables « cellulaires » et « virales » diffusent entre les cellules. C'est l'étape la plus longue en termes de temps de calcul.



**Figure 4 : Quelques résultats issus de la modélisation du cycle viral**

A et B Deux simulations faisant apparaître les cinétiques d'accumulation des différents ARNm (selon le même code couleur que précédemment), des ARNg (en noir) et ARNag (en marron), ainsi que des virions (pfu, trait gras en bleu) pendant une semaine.

C Une simulation de conditions non-réalistes : downregulation des récepteurs trop rapide ou transition réplacase/transcriptase en sens unique par exemple

## 11. Bourgeoisement du virus

Après décompte des protéines et des ARNg (et ARNag) disponibles, selon une probabilité d'encapsidation, on définit des pfu, virus « en kit » qui s'ajoutent aux actuels pfubourgeonne. On ne considère pas de délai dans l'établissement de ce phénomène.

## 12. Enregistrement

Afin de garder trace de toute modification, on enregistre toutes les valeurs obtenues pour chacune des variables, dans l'ensemble des cellules. Elles serviront de base pour l'itération suivante.

Ici prend fin la routine de calcul. On dispose au final d'une trentaine de matrices tridimensionnelles que l'on peut afficher de manière dynamique afin de visualiser l'accumulation progressive de chacune des espèces moléculaires d'intérêt. La formation des syncytia ne se visualise pas comme la fusion à proprement parler mais comme un partage du contenu infectieux avec les cellules avoisinantes, sans passage par l'infection via une particule virale (pfubourgeonne).

## Résultats

L'intérêt premier de ce travail est de traduire littéralement les schémas de cycle que l'on retrouve dans les revues. On prend alors pleinement conscience de l'interdépendance de chaque étape du cycle. Conformément à d'autres études, on peut conclure qu'il est possible de développer une approche mathématique du cycle du VR.

La palette de résultats que l'on peut obtenir traduit à la fois l'aspect stochastique de certaines de nos approches mais également la grande variabilité inhérente au système (*figure 4A et B*). En dehors des valeurs du *tableau 2*, l'ensemble des autres paramètres (tels que *downregulation*, *diffusion*, les valeurs de seuils de protéine N, F et H...) sont inconnus. Nous avons réalisé plusieurs dizaines de milliers de simulations avec des valeurs aléatoires pour chacun de ces paramètres. Malheureusement, dans

l'état actuel, nous n'avons pas encore réussi à trouver de jeu de paramètres permettant de reproduire de manière fiable l'ensemble des résultats expérimentaux. En fait, dans la plupart des cas, changer la valeur d'un paramètre modifie grandement tout le système. Comme discuté ultérieurement, nous pensons que le modèle n'est pas encore assez complet pour que puissent se dégager au moins des ordres de grandeur pour certains paramètres.

Cependant, si l'on s'attache uniquement à un seul type de composés moléculaires (ARN, protéines, particules virales), le modèle permet de reproduire avec une grande fiabilité certains résultats publiés, signe que notre compréhension du cycle à un niveau d'étude est suffisamment poussée et que c'est le passage d'une échelle à l'autre qui doit être raffinée.

Ainsi, sur les *figures 4A et B*, on peut observer l'accumulation des ARN messagers viraux selon le même type de gradient que modélisé auparavant avec le modèle de polymérase. On peut ainsi avoir accès à des temps plus longs. De plus, des analyses supplémentaires mettent en évidence que la vitesse d'accumulation des ARNg et ARNag décroît plus lentement que celles des ARNm, passé un certain temps : les pentes décroissantes sont moins prononcées pour les courbes noire et marron. Ceci est conforme aux observations de Plumet et al.

La production de particules virales peut s'apparenter dans la majorité des cas à une courbe en cloche, classique. Cependant, les pentes sont trop raides et jamais nous n'avons obtenu de taux de particules virales aussi élevés qu'expérimentalement (*figure 4A et B*).

En écho à l'étude menée par Perelson sur la cinétique de réplication de HCV au sein des cellules Huh7, nous avons testé l'impact de la quantité de ribosomes disponibles pour la traduction virale. Il apparaît clairement que cette valeur n'a pas d'effet dans notre modèle puisque le nombre d'ARNm viraux disponibles est toujours la quantité limitante, quels que soient les jeux de paramètres employés (cf. 9c :

$$\min(\text{ARNm}N(\text{cellule}, t), \text{ribosome} \times \frac{\text{ARNm}N(\text{cellule}, t)}{\text{ARNmTotaux}(\text{cellule}, t)}).$$

De précédents essais avaient mis en avant les incohérences d'un modèle où les polymérases virales au-delà d'un certain seuil global de protéines N passeraient **toutes** dans un mode « réplique ». En effet, dans ces conditions, la quantité d'ARNm diminue peu à peu et la quantité de protéines disponibles s'égrène également, aboutissant à une infection abortive (*figure 4C*).

Conformément à certaines observations expérimentales, une *downregulation* des récepteurs induite par les protéines virales exprimées sur les cellules avoisinantes bloque tout le système. En effet, selon la valeur de la constante de *downregulation* des récepteurs, soit il n'y a plus le moindre récepteur au bout de 24 heures environ, soit on n'observe pas d'évolution sensible de la quantité de récepteurs (*figure 4C*). Cependant, compte tenu des interdépendances entre chaque paramètre, nous n'avons pas pu définir de seuil déterminant l'évolution du système.

Contrairement à l'idée de départ selon laquelle le cycle du VR serait relativement robuste, on a pu constater qu'en dehors des constantes détaillées précédemment (quantité de ribosomes), toutes les valeurs des constantes de notre modèle ont un impact sur le développement de l'infection. Peut-on alors supposer qu'il existe des jeux de paramètres définitivement interdits ? En l'absence de données quantitatives précises sur les cinétiques des différents événements du cycle, l'on risque de se perdre en conjectures. Cependant, cette première tentative de modélisation mathématique du cycle du VR offre des possibilités inédites vers une vision intégrée de la dynamique de ces événements.

Tableau 2 : Synthèse des données bibliographiques utilisées pour la modélisation du cycle du VR.

Nom de la constante	valeur	
nombreN	2649 (par unité génomique)	Quantité de protéines N constituant un virion
nombreP	300	Quantité de protéines P constituant un virion
nombreL	33	Quantité de protéines L constituant un virion
nombreM	3000	Quantité de protéines M constituant un virion
nombreF	6000	Quantité de protéines F constituant un virion
nombreH	6000	Quantité de protéines H constituant un virion
maxribosome	6000	Nombre de ribosomes par cellule
nombrecepteurs	$10^5$	Nombre de molécules CD46 et CD150 à la surface cellulaire
varnag	1/5298	Vitesse de synthèse des ARN <sub>a</sub> g (en s <sup>-1</sup> )
varng	1/5298	Vitesse de synthèse des ARN <sub>g</sub> (en s <sup>-1</sup> )
van	0.005250	Vitesse d'accumulation des ARNm <sub>N</sub> par s et par (polymérase ou matrice)
vap	0.003131	Vitesse d'accumulation des ARNm <sub>P</sub> par s et par (polymérase ou matrice)
vav	0.003131	Vitesse d'accumulation des ARNm <sub>V</sub> par s et par (polymérase ou matrice)
vam	0.001894	Vitesse d'accumulation des ARNm <sub>M</sub> par s et par (polymérase ou matrice)
vaf	0.000349	Vitesse d'accumulation des ARNm <sub>F</sub> par s et par (polymérase ou matrice)
vah	0.000306	Vitesse d'accumulation des ARNm <sub>H</sub> par s et par (polymérase ou matrice)
val	0.000151	Vitesse d'accumulation des ARNm <sub>L</sub> par s et par (polymérase ou matrice)
tan	563	Temps à partir duquel les ARNm <sub>N</sub> commencent à s'accumuler (en s)
tap	629	Temps à partir duquel les ARNm <sub>P</sub> commencent à s'accumuler (en s)
tav	629	Temps à partir duquel les ARNm <sub>V</sub> commencent à s'accumuler (en s)
tam	519	Temps à partir duquel les ARNm <sub>M</sub> commencent à s'accumuler (en s)
taf	925	Temps à partir duquel les ARNm <sub>F</sub> commencent à s'accumuler (en s)
tah	632	Temps à partir duquel les ARNm <sub>H</sub> commencent à s'accumuler (en s)
tal	1371	Temps à partir duquel les ARNm <sub>L</sub> commencent à s'accumuler (en s)
darnm	$6,4 \cdot 10^{-5}$	vitesse de dégradation des ARNm (en s <sup>-1</sup> )
dpn	$3,8 \cdot 10^{-4}$	vitesse de dégradation de la protéine N (en s <sup>-1</sup> )
dpp	$9,6 \cdot 10^{-5}$	vitesse de dégradation de la protéine P (en s <sup>-1</sup> )
dpv	$3,5 \cdot 10^{-5}$	vitesse de dégradation de la protéine V (en s <sup>-1</sup> )
dpc	$5,8 \cdot 10^{-4}$	vitesse de dégradation de la protéine C (en s <sup>-1</sup> )
dpm	$1,9 \cdot 10^{-4}$	vitesse de dégradation de la protéine M (en s <sup>-1</sup> )
dpf	$2,1 \cdot 10^{-5}$	vitesse de dégradation de la protéine F (en s <sup>-1</sup> )

dph	$1,9 \cdot 10^{-5}$	vitesse de dégradation de la protéine H (en $s^{-1}$ )
dpl	$3,2 \cdot 10^{-5}$	vitesse de dégradation de la protéine L (en $s^{-1}$ )
dg	$4 \cdot 10^{-6}$	vitesse de dégradation de l'ARNg (en $s^{-1}$ )
dag	$4 \cdot 10^{-6}$	vitesse de dégradation de l'ARNag (en $s^{-1}$ )
dpfu	$1,6 \cdot 10^{-5}$	vitesse de dégradation des particules virales (en $s^{-1}$ )
vpn	1/110	vitesse d'accumulation de la protéine N par s par ribosome et par ARNmN
vpp	1/102	vitesse d'accumulation de la protéine P par s par ribosome et par ARNmN
vpv	1/60	vitesse d'accumulation de la protéine V par s par ribosome et par ARNmN
vpc	1/38	vitesse d'accumulation de la protéine C par s par ribosome et par ARNmN
vpm	1/67	vitesse d'accumulation de la protéine M par s par ribosome et par ARNmN
vph	1/110	vitesse d'accumulation de la protéine F par s par ribosome et par ARNmN
vpf	1/124	vitesse d'accumulation de la protéine H par s par ribosome et par ARNmN
vpl	1/88	vitesse d'accumulation de la protéine L par s par ribosome et par ARNmN





# Discussion



Peu de médecins en France seraient capables d'identifier sans se tromper un cas de rougeole (seul un isolement *in vitro* et une titration des anticorps dirigés contre la protéine N permettent de s'en assurer). D'autres affections peuvent ressembler à cette maladie au niveau symptomatique et cependant elle reste unique sous bien des aspects.

Ce fut l'une des premières affections connues pour induire une immunosuppression, en dépit d'une réponse immunitaire efficace. A cause d'une défiance vis-à-vis de la vaccination et des échanges migratoires, on détecte encore des épidémies locales de rougeole en France. Dans les pays où la vaccination n'est plus obligatoire, la recrudescence des cas de rougeole est bien plus importante, signe que le virus reste un pathogène extrêmement habile. Sans cesse retardée, l'éradication de la rougeole à l'échelle mondiale pourrait être possible. Entre les vaccins existants, dont l'efficacité n'est plus à prouver, et le suivi épidémiologique, ce sont en définitive les moyens humains et financiers qui bloquent la situation.

Dans ce contexte, l'étude du virus de la rougeole pourrait apparaître anecdotique puisque l'on dispose déjà des outils permettant de l'éradiquer. Hormis les études centrées sur de nouvelles voies vaccinales et utilisant les vaccins existant déjà, les objectifs de l'OMS (éradication en 2010) ne portent pas sur l'élaboration de nouveaux vaccins. D'ailleurs, compte tenu de leur efficacité et de leur innocuité, y'en aurait-il réellement besoin ? L'intérêt du VR à l'heure actuelle est qu'on le considère comme bien caractérisé et que les vaccins qu'on en a dérivés peuvent être considérés comme « idéaux ». De fait, il s'agira plutôt d'études fondamentales, permettant de mieux comprendre son fonctionnement et de transposer les résultats obtenus à d'autres virus.

### **Le polymorphisme, humain et/ou viral**

Une seule maladie et des centaines de souches de virus de la rougeole. S'agit-il réellement de la même affection ? Dans les pays du Sud économique, l'immunosuppression initiée par la rougeole, chez des enfants bien souvent séropositifs pour le HIV et disposant donc d'une immunité affaiblie, permet l'établissement

d'infections opportunistes et mortelles. Dans certains cas, la rougeole peut se compliquer par des troubles neurologiques souvent létaux. Meurt-on alors de la rougeole ? Quelle est la part de diversité provenant de l'individu (immunodéprimé, mal protégé, sensible...) et du virus en tant que tel ?

Il faut également admettre qu'au cours de l'infection, le virus évolue, s'adapte, mute, lutte contre le système immunitaire. Si à l'échelle de la planète, on arrive à distinguer diverses souches de VR, dans les suspensions virales, au laboratoire, et au sein de l'organisme, on doit considérer non pas une population homogène de virions, mais un ensemble de sous populations hétérogènes, autant en qualité qu'en quantité.

Face à cette diversité inhérente au VR, les individus humains offrent également tout un panel de variations. Dès lors, comment concevoir et expliquer l'unicité apparente de la maladie et l'efficacité à très large spectre des vaccins ? Une piste de réponse est que malgré sa diversité génétique et sa plasticité au cours de l'infection, le VR est antigéniquement stable : il ne leurre pas le système immunitaire adaptatif. L'immunosuppression qu'il induit serait éventuellement une parade à cette absence de camouflage.

Dans l'article 1, nous montrons qu'avec à peine 5 acides aminés de différence, répartis au sein de 4 protéines virales, une souche sauvage change radicalement de caractéristiques. Une étude précédente, menée au sein du laboratoire avait déjà mis en évidence que malgré l'absence de modifications de la protéine H, responsable de l'attachement du virus à CD46/CD150, la souche G954-V13 pouvait infecter des cellules Vero (Kouomou and Wild, 2002). Contrairement à ce qui est rapporté dans d'autres publications, la protéine F ne semble pas impliquée dans ce processus puisque aucune différence n'est détectée entre les deux souches virales. Si l'on se réfère aux travaux de Tahara et al., la mutation E89K de la protéine M pourrait expliquer les caractéristiques de cette souche (Tahara et al., 2005; Tahara et al., 2007b). En effet, cette mutation permet une interaction plus forte entre M et H et améliorerait la formation des particules virales au sein des cellules Vero, au détriment des cellules exprimant CD150.

Leur modèle expérimental ayant consisté à exprimer dans des cellules Vero les protéines H et M, on ne dispose d'aucune information sur une éventuelle modification au moment de l'entrée du virus ! Ces résultats s'accordent bien avec nos observations : la souche G954-V13 se développe correctement en Vero par rapport à la souche G954-PBL. Néanmoins, nous n'avons observé aucun défaut dans la formation de syncytia, y compris en Vero/CD150 (Tahara et al., 2005; Tahara et al., 2007b). D'ailleurs, les plaques de lyse formées par la souche sauvage étaient toujours les plus petites (données personnelles non montrées).

### **Que s'est-il réellement produit au cours des 13 passages en cellules Vero ?**

L'échantillon de G954-PBL, isolé à partir de prélèvements sanguins chez un enfant malade, a été maintenu puis propagé en PBMCs. Historiquement, on considère que dans cet environnement cellulaire, le virus ne va pas se modifier. Premier écueil, qu'y a-t-il réellement dans l'isolat de départ ? A priori, il est constitué d'une population hétérogène de virions (quasi espèces virales). Le maintien en PBMCs puis sa multiplication va forcément entretenir et générer une plus grande diversité ou au contraire commencer à sélectionner un variant plutôt qu'un autre. Le passage en cellules Vero agira de même : avant l'entrée dans la cellule, il y a sélection de virions capables de se fixer ; une fois à l'intérieur de la cellule, sera sélectionné le virus dont la stratégie répliquative est la plus efficace. La souche G954-V13 faisait-elle partie du pool de départ de virions qui infectaient l'enfant ?

Face aux cellules Vero, dépourvues de CD150, comment les virus G954-PBL sont-ils rentrés ? On peut supposer une faible affinité pour CD46 qui aurait permis, événement hasardeux, au virus de rentrer (Masse et al., 2004; Masse et al., 2002). La mutation E89K de M, pourrait avoir modifié la géométrie de cette protéine et éventuellement affecté la géométrie de la protéine H, à laquelle elle est liée, de manière plus forte suite à cette mutation. Dans ce cas, sans avoir affecté H, on pourrait modifier l'accessibilité au site de liaison à CD46. Autre possibilité : en dehors de CD46 et

CD150, il y aurait un autre récepteur, présent sur les cellules Vero et qui aurait permis aux virus G954-PBL de rentrer. Cependant, ce récepteur ne serait pas utilisable pour générer des syncytia puisque l'infection des Vero par G954-PBL est pas ou très peu lytique.

Quoiqu'il en soit, au moins un virus est rentré. Par rapport aux PBMCs, les cellules Vero, en tant que lignée cellulaire, sont une population homogène. Elles ne produisent pas d'IFN de type I mais disposent du récepteur IFNAR. Elles vont également se répliquer plus rapidement et fréquemment que les PBMCs. De plus, ce sont des cellules apolaires, adhérentes, établissant des liens physiques entre elles qui nécessitent de l'EDTA ou de la trypsine pour être rompus. Leur durée de vie est également plus longue. Hormis ces quelques données de base, aucune étude n'a été menée permettant de définir *l'environnement cellulaire*.

Au bout de 13 passages en cellules Vero, 5 mutations se sont accumulées dans les régions codantes. Par rapport à d'autres souches, ces passages se faisaient en aveugle puisqu'il n'y a pas d'effet cytopathique. Habituellement, dans le cas de souches vaccinales comme Ed-Schwarz ou Ed-Zagreb, l'infection de cellules Vero, au bout de 3 ou 4 jours, se conclut par la formation d'immenses syncytia. Ces infections s'opèrent à bas titre, c'est-à-dire qu'on considère qu'il y a un virion pour 100 cellules. Etrangement, ce rapport est plus productif qu'un rapport de 1 pour 1. Pour obtenir la souche G954-V13, les souches parentales ont donc été déposées sur des tapis de cellules Vero et 3/4 jours après, surnageant et culot cellulaire étaient récoltés, sans avoir pu observer le moindre effet. Et pourtant, déposées sur des cellules Vero/CD150, ces suspensions induisaient des effets cytopathiques : l'infection des cellules Vero avait été efficace.

De fait, les souches G954 ont pu entrer au sein des cellules Vero, se multiplier et bourgeonner pour infecter les cellules avoisinantes, sans pour autant générer de syncytia. Pour mieux s'adapter à cet environnement cellulaire, il y aurait donc eu sélection de la souche G954-V13. Compte tenu de la faible quantité d'IFN produite par des PBMCs dans les conditions de passage, ces molécules ou leur absence n'ont vraisemblablement pas joué de rôle dans la sélection des mutations dans P/V/C. Les résultats

de l'article I confirment cette supposition. Dans ce cas, l'intérêt pour la population virale aura été de se multiplier selon une cinétique plus adaptée au contexte cellulaire. Cependant, il serait déraisonnable de dire que telle ou telle mutation a accéléré ou ralenti la réplication ou la transcription par exemple. En effet, autant les modèles mathématiques que les résultats conflictuels publiés tendent à montrer que les protéines virales peuvent intervenir à différents niveaux de contrôle de l'infection (Caignard et al., 2007; Devaux et al., 2007; Griffin, 2006; Kerdiles et al., 2006; Nishie et al., 2007; Parks et al., 2006; Runkler et al., 2008; Sato et al., 2007; Tahara et al., 2007a; Yokota et al., 2008). Même le génie génétique aura du mal à donner une réponse claire et précise tant que nous ne disposerons pas d'outils suffisamment performants pour mesurer et visualiser en temps réel acides nucléiques et protéines.

De plus, nous n'avons pas encore séquencé les parties non codantes et pourtant régulatrices du génome de G954-PBL et G954-V13. Ces régions sont connues pour avoir un rôle crucial dans le développement d'une souche mais principalement en termes de quantité d'ARN produite (Barr et al., 2002; Parks et al., 2001a).

Au final, on conçoit bien que pour comprendre comment G954-PBL a été adapté aux cellules Vero, il faut réussir à intégrer de nombreux niveaux de complexité qu'aucune expérience à l'heure actuelle n'arrive à englober.

### **(Re)Définir la notion de souche vaccinale**

Si d'infimes modifications de la séquence protéique des constituants viraux peuvent affecter aussi profondément la biologie de ce parasite, comment concevoir la notion de « vaccin » ? Au cours de nos expériences, nous avons pu remarquer que Ed-Schwarz et Ed-Zagreb se comportaient de manière analogue sans pour autant suivre la même cinétique d'infection.

### **Compter le(s) virus**

Il faut déjà admettre que la plupart des méthodes utilisées ne sont pas assez résolutes. En particulier, la titration par plages de lyse, que nous avons utilisée de ma-



nière intensive n'est fiable qu'avec un facteur 5. De plus, cette technique quantifie l'infectiosité d'une suspension virale et dépend donc du type cellulaire utilisé. Il n'y a (malheureusement/évidemment) pas de relation simple entre type cellulaire, présence de CD46/CD150 et titre viral. Selon la souche, le titre infectieux sera plus important en Vero/CD150 qu'en B95a et inversement (*données personnelles non montrées*). Dès lors, le fait que les résultats de QPCR annoncent plus de 100 fois plus de génomes que de particules infectieuses (quel que soit le type cellulaire) peut être analysé de diverses façons.

### Particules défectives

On suppose l'existence de particules virales non infectieuses, éventuellement défectives, dans les suspensions de VR, en laboratoire (Ayata et al., 1998; Rager et al., 2002; Schneider et al., 1997; Vincent et al., 1999; Whistler et al., 1996). Dans le cas du VSV, on peut facilement les distinguer, compte tenu de la taille des particules virales. Pour la rougeole, ce n'est pas le cas. De plus, on peut compter entre 2 et 10 ARN par particules virales, même si la plupart des études conservent la notion d'un génome unique. De fait, il n'y a aucune relation simple entre les résultats de QPCR (nombre de génomes) et les résultats de titration (nombre de pfu). Au final, dans une suspension de VR, il faudrait donc compter des virus non infectieux, quel que soit le type cellulaire et d'autres particules, dont le caractère infectieux, dépendrait des cellules cibles. Évidemment, entre nos deux souches vaccinales, on peut penser que ces rapports différaient, ce qui rajoute un degré supplémentaire de complexité.

### Construire une souche vaccinale ?

Sachant qu'on définit une souche de VR comme étant « vaccinale » à partir d'observations menées *in vivo*, chez l'homme est-il réellement surprenant d'ignorer les bases moléculaires permettant d'établir ce phénotype ? Fiers de nos outils, on aurait pu s'attendre à retrouver assez facilement des explications indéniables. Quelques études ont mis en avant des motifs au sein de la séquence génétique des souches vaccinales, autant dans les parties codantes que dans les parties non codantes (Parks et al., 2001a; Parks et al., 2001c; Parks et al., 2006; Zhang et al., 2002). Certains acides aminés se-

raient une signature du caractère vaccinal malgré des protocoles d'adaptation différents. De plus, même si les souches sauvages dont elles dérivent, datent de la même époque et appartenaient vraisemblablement au même génotype, elles n'étaient pas identiques. De fait, les souches vaccinales dont on dispose ont conservé de leurs souches parentales, un « squelette » qui leur est propre avec des régions ou parfois simplement quelques acides aminés bien précis, communs aux souches vaccinales. Nos résultats montrent qu'en touchant à peine 5 acides aminés on peut profondément modifier le comportement d'une souche de VR, il n'est donc pas étonnant d'observer que certains acides aminés sont la signature d'une souche vaccinale.

### Converger vers une souche vaccinale

Une étude portant sur la souche CAM70 a montré une grande stabilité de celle-ci au cours de passages cellulaires (Borges et al., 2008). De même, nos résultats sur les souches vaccinales montrent qu'elles peuvent se développer correctement dans de nombreux types cellulaires, sans être affectées outre mesure par les IFN de type I. Nous proposons donc l'idée qu'une souche vaccinale serait robuste (son comportement n'est pas affecté par de (petites) modifications de l'environnement) et que les passages qu'on fait subir à la souche sauvage sont autant d'étapes d'une suite qui convergerait vers cet état. L'acquisition des mutations typiques des vaccins serait progressive mais convergerait, quelle que soit la souche de départ vers le même arrangement de mutations. De fait, plutôt que de rechercher l'efficacité, la course au vaccin devrait s'orienter vers la recherche de la stabilité. On pourrait ainsi concevoir de manière très simple, de faire subir à diverses souches sauvages, le même traitement que celui pratiqué pour établir les souches vaccinales. Une comparaison des séquences montrerait si oui ou non, on retrouve bien, suite aux passages, les mêmes acides aminés.

### En quête de stabilité

Pourrait-on alors définir une formule vaccinale « canonique » ? Ce défi mériterait d'être relevé mais face aux divergences génétiques observées entre les vaccins utilisés actuellement, on conçoit que notre compréhension de la biologie du virus ne le permet pas encore. On peut cependant élaborer des cartes génétiques avec des points

chauds (très variables et critiques) et des zones de grande stabilité (squelette). Malgré tout, ce genre de travaux ne nous affranchirait pas des effets émergeant des interactions avec le contexte intracellulaire puisqu'on a pu constater que dès que le milieu changeait, les réponses pouvaient rapidement et grandement diverger.

A l'évidence, cette notion de stabilité, au sens plus mathématique, était déjà acquise dans une acception plus moléculaire. En effet, il faut que les souches vaccinales ne révertent pas une fois chez l'humain (majoritairement le jeune enfant). La notion de robustesse se doit également d'être observée à cette échelle puisqu'en dépit de la grande diversité des humains, et de leur système immunitaire, on souhaite que tous soient protégés efficacement. C'est le cas, même si l'on ignore pourquoi. Cependant, gardons à l'esprit que cette protection n'est pas la même pour tous (les taux d'anticorps sériques contre la protéine N varient beaucoup d'un individu à l'autre) et qu'il apparait que l'efficacité dépend étroitement de l'individu (des vaccinations successives chez un individu mal protégé ne le protègent pas à long terme plus efficacement) (Etchart et al., 2007). De même, bien que cela soit rare, certains enfants déclarent une rougeole suite à la vaccination (Griffin, 2006). A une autre échelle, on ne peut admettre que le développement des complications neurologiques rougeoleuses tiennent uniquement à des mutations spontanées du virus, le système immunitaire et éventuellement nerveux ont eux aussi un rôle dans ce processus (Kerdiles et al., 2006).

### Des preuves de variabilité

Nous avons pu observer une certaine variabilité dans les résultats d'expériences menées sur les PBMCs et les pDCs. D'un donneur à l'autre, les infections pouvaient varier du tout au tout. En particulier, l'efficacité infectieuse de G954-PBL était étroitement liée au donneur. En l'absence de données physiologiques précises sur l'état de santé et le passé médical du donneur, nous ne pouvons établir de liens détaillés. A l'échelle cellulaire, le fait d'avoir été vacciné ou pas, n'a pas eu d'impact particulier sur les tests que nous avons menés. En revanche, on observait toujours un taux minimal de multiplication des souches vaccinales, indépendamment du donneur (même s'il

y avait une variabilité, il n'y a jamais eu d'infections abortives, au contraire des pDCs).

### **IFN et VR, des relations complexes**

Depuis de nombreuses années, les virologistes ont recherché l'origine cellulaire des IFN de type I. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont, à l'heure actuelle, considérées comme les principales productrices de ces molécules. Nos résultats, s'ils ne contredisent pas les observations de Schlender et al (induction d'IFN de type I bloquée par l'infection rougeoleuse (Schlender et al., 2005)), les questionnent malgré tout puisque nous avons montré qu'au-delà de 24 heures d'infection, il y a production massive d'IFN. Compte tenu du consensus actuel, nos résultats ne sont pas surprenants et corroborés par d'autres collaborations. Cependant, cette cinétique de production d'IFN, étroitement liée à la cinétique d'infection montre que la biologie de ces cellules est encore imprécise. Une lignée de pDCs avait été développée (Chaperot et al., 2001), nos résultats n'ont pas été concluants vraisemblablement à cause de la grande instabilité de cette lignée. Les résultats de l'équipe de Conzelmann ont été obtenus sur des cellules purifiées à 100%, alors que nous n'avons jamais réussi à atteindre ce taux de pureté (Druelle et al., 2008; Schlender et al., 2005 ). On pourrait alors supposer qu'une interaction avec d'autres cellules immunitaires serait nécessaire pour induire la production d'IFN de type I.

Tous les résultats publiés (ou pas) sur les pDCs et le VR montrent que ces cellules sont infectables par les souches vaccinales. L'absence de CD150 laissait présager qu'elles ne soient pas susceptibles aux souches sauvages (Galibert et al., 2001) et puisque dans aucune condition, nous n'avons observé de production de particules virales infectieuses, cela aurait pu être le cas. L'analyse par RT-QPCR, au-delà des biais expérimentaux possibles, montre clairement que ces cellules peuvent supporter une réplication du VR. Cette réplication génère au moins des fragments de génomes leader-gène N. Ces résultats soulèvent deux questions : comment la souche sauvage est-

elle entrée en l'absence de CD150 et pourquoi la réplication est-elle abortive ? De plus, comment expliquer la synthèse d'IFN dans ces conditions ?

Dans le cas des monocytes, l'expression de CD150 est inducible suite à la maturation des cellules cibles infectées (Minagawa et al., 2001). Compte tenu du faible nombre de pDCs que l'on peut obtenir à partir d'un prélèvement sanguin (moins d'un million à partir de 450 mL de sang), nous n'avons pas pu suivre l'expression de CD150 après infection des pDCs. Quoiqu'il en soit, les hypothèses quant au mécanisme d'entrée de G954-PBL au sein de ces cellules sont les mêmes que celles citées précédemment : faible affinité pour CD46 ou troisième récepteur. En l'absence de données plus précises, on ne peut rien avancer de plus.

L'infection des pDCs par les souches vaccinales Ed-Schwarz et Ed-Zagreb induit la formation de syncytia. Il y a également expression de la protéine H à la surface des pDCs au cours de l'infection (données personnelles de T.Duhen et C.Rabourdin-Combe). Les résultats publiés dans l'article I font état d'une réplication de chacune des souches testées. En définitive, le VR peut infecter les pDCs, s'y répliquer, exprimer les protéines virales mais il n'y a pas bourgeonnement. Les infections par les souches induisant des SSPE montrent des caractéristiques semblables mais aucun lien n'a encore été déterminé entre cette complication neurologique et les IFN de type I. Dans le cas des pDCs, on a vu qu'il y avait une très forte production d'IFN de type I suite à l'infection. On peut supposer que l'effet antiviral de ces molécules s'exercerait entre les phases tardives du cycle répliatif et le bourgeonnement (blocage de l'assemblage des composants viraux à la surface, production massive de particules défectives...).

La mise en place du système IFN est un phénomène rapide et nos résultats le confirment. L'infection par des virus préalablement inactivés aux UV induit une production d'IFN de type I de moindre ampleur (résultats non montrés). Cette observation implique au moins deux modes d'induction du système IFN ou du moins une activation en deux temps. Un premier signal de danger serait émis durant les phases précoces du cycle. Il doit y avoir détection de PAMP à la surface cellulaire ou à l'intérieur de la cellule. Les pDCs n'expriment pas TLR2 (pas de détection de H via ce biais (Bieback

et al., 2002)) et aucune interaction entre le VR et les autres TLR de surface n'a été mise en évidence. Des essais de stimulation de pDCs via CD46 et CD150 à l'aide d'anticorps n'ont pas donné de résultats exploitables mais on ne peut ignorer l'hypothèse d'une activation via ces récepteurs viraux qui sont également des partenaires majeurs dans l'activation d'une cellule. A l'intérieur de la pDC, les TLR7 et 9 ainsi que des RLR pourraient être impliqués. Cependant, en l'absence de réplication, la quantité d'acide nucléique apportée par le virus est-elle suffisante pour déclencher la production d'IFN ?

Face à un virus pouvant se répliquer, les mêmes hypothèses restent valables. La plus grande production d'IFN est-elle alors le reflet d'une activation en deux temps ? Il y aurait détection des PAMPs extra/intra cellulaires puis amplification de la réponse par un mécanisme détectant les ARN viraux néotranscrits ou simplement un effet cumulatif sans autres mécanismes mis en jeu (plus d'ARN donc plus d'IFN). Dans la littérature, on retrouve les deux possibilités. Cependant, face au peu d'études menées sur les pDCs, en particulier au niveau des mécanismes mis en jeu pour induire la production d'IFN, on ne peut guère avancer plus loin dans le raisonnement. De plus, compte tenu de la grande diversité des mécanismes déjà mis en évidence (cf. introduction), il y a de fortes chances que selon les souches virales et selon les donneurs, on ne retrouve pas les mêmes séquences d'événements.

Sous une apparence bénigne, la rougeole reste encore un sujet à débattre. Au-delà des différentes complications qu'elle peut engendrer, c'est surtout la variabilité entre les souches et les liens complexes établis avec le système immunitaire qui génèrent autant de diversité et d'applications thérapeutiques éventuelles.

## **Vers une intégration des données biologiques**

Depuis plus de 50 ans, de nombreuses équipes de recherche ont élagué la forêt d'incertitudes et de doutes centrés sur la biologie du VR. Evidemment et (mal)heureusement, ils n'ont pas tous suivi les mêmes méthodes ni utilisé les mêmes souches virales. S'il en ressort des résultats intéressants et parfois complémentaires, cette diversité d'approches amplifie la diversité inhérente au virus et au polymorphisme génétique humain. A l'heure de la génomique et des analyses à haut débit, la littérature foisonne de renseignements mais aucune intégration de ces données n'est encore disponible.

## **L'échec (partiel) des modèles animaux**

L'intérêt des modèles animaux a été de pouvoir jumeler toutes les approches *in vitro*. Historiquement, le premier récepteur connu pour le VR était CD46 et tout naturellement plusieurs modèles de souris transgéniques ont été générés. Le handicap majeur de cette approche était que ces souris n'étaient pas infectables par la voie respiratoire et, pour la plupart, ne déclenchaient de symptômes qu'en absence d'un système IFN de type I fonctionnel. Plus récemment, d'autres modèles de souris transgéniques ont été développés, basés sur l'expression de CD150, le deuxième récepteur connu pour le VR. Rares sont les modèles de souris infectables par la voie naturelle et les souches sauvages et malgré leur apport indéniable, ils restent, *ab initio* éloignés de la réalité humaine.

D'autres modèles animaux existent et manifestent des symptômes analogues à ceux de l'homme : des singes *Cynomolgus* et des Rhesus (Auwaerter et al., 1999; Hoffman et al., 2003 ; Permar et al., 2003; Polack et al., 1999; Sato et al., 2008; Stittelaar et al., 2000a; Stittelaar et al., 2002a ; Stittelaar et al., 2002b; Stittelaar et al., 2000b; van Binnendijk et al., 1994). Cependant, les problèmes autant techniques qu'éthiques limitent les aspects pratiques de cette approche.

De fait, malgré les avancées technologiques récentes, notre compréhension du VR reste entachée par la complexité dont il fait preuve à tout niveau.

## D'autres modèles ?

Alors que certains essayent de définir la cellule minimale et de recréer virtuellement les interactions de base au sein d'une cellule (Luisi et al., 2006), d'autres mettent à profit une population virtuelle de millions d'individus mobiles au comportement (quasi) humain pour revisiter l'épidémiologie (Balicer, 2007). Depuis quelques années déjà, la virologie et l'immunologie comptent parmi les nouveaux terrains de jeu des mathématiciens et informaticiens. L'approche que nous avons détaillée dans la seconde partie des résultats intègre cette mouvance en gardant, contrairement à d'autres articles, une optique très biologique.

Malgré un formalisme mathématique, nous n'avons pas souhaité adopter une démarche trop éloignée de la démarche biologique. De fait, autant les interprétations que le cheminement des expériences ont été dictés par cette logique. Ainsi, nous n'avons pas souhaité tenter de résoudre de manière analytique la plupart des systèmes que nous avons définis. De plus, si biologiquement un modèle ne semblait pas suffisamment porteur, l'analyse mathématique ne l'approfondissait pas plus (par exemple, l'inactivation des polymérases qui pouvaient cependant continuer à se déplacer).

Cependant, comme nous l'avons dit, nous disposons d'une connaissance figée des événements du cycle infectieux. Aucun schéma aussi complexe soit-il n'arrive à rendre compte d'une manière dynamique de l'ensemble du cycle viral. Et pourtant, il tourne !

## Comment fonctionne la polymérase du VR ?

### La moyenne, c'est insuffisant pour prétendre à de bons résultats

Dans la partie sur la modélisation du fonctionnement de la polymérase, l'une des hypothèses simplificatrices que nous employons est que nous considérons une vitesse moyenne de parcours du génome (Plumet et al., 2005). Cette mesure, aussi utile et précise qu'elle soit peut très bien être artificielle. Une étude récente menée sur la polymérase II a montré que cette enzyme parcourait le génome en faisant des pauses



plus ou moins longues. De fait, la vitesse instantanée de l'enzyme est plus importante que la vitesse moyenne. Dans le cas du VR, si les enzymes ne se détachent pas du génome et qu'il n'y a jamais de délai, en particulier entre la sortie et l'entrée au sein du génome, cette vitesse moyenne peut être considérée comme réelle. Si l'on veut décrire le plus exactement possible comment les enzymes parcourent le génome du VR, cette question est importante, par contre, pour des modèles plus globaux, une vitesse constante et une accumulation linéaire des ARNm sont valables. Enfin, dans les modèles avec arrêt de l'enzyme ou détachement, la vitesse instantanée devrait être beaucoup plus rapide, cependant, comment la déterminer ? Nous n'avons pas encore testé cette hypothèse mais cette approche reste envisageable quoique lourde en calculs.

### Combien de ribonucléoparticules dans un virion ?

Conformément aux études qui annoncent entre 20 et 50 protéines L par génome, nous avons déterminé que la valeur optimale du nombre de polymérase dans un modèle avec un génome circulaire était de 33.

En l'absence de données précises sur le contenu génétique d'un virion, nous avons testé différentes topologies possibles. Un ARN circulaire peut être envisageable compte tenu de la complémentarité des extrémités 3' et 5' même si les forces de torsion s'exerçant alors seraient peut-être trop fortes. L'intérêt de ce modèle aussi irréaliste soit-il, réside dans le fait que des constructions plus complexes peuvent être traitées comme des compositions de ce modèle si l'on fait l'hypothèse d'une absence de délai entre entrée et sortie du génome.

Si l'on revient sur l'hypothèse de plusieurs génomes empaquetés au sein d'un seul virion, plus de deux génomes impliquent moins d'une douzaine de polymérase par génome. Cette valeur n'est pas en accord avec les observations. Dans ce cas, on peut soit supposer qu'il y a forcément des antigénomes au sein des particules virales soit qu'il y a une latence entre la fin d'un génome et l'entrée au sein du second.

En ce qui concerne l'organisation des polymérase le long du génome, dans le modèle « un génome circulaire », la répartition initiale n'a pas d'impact sur l'allure des cinétiques d'ARNm si l'on considère une répartition aléatoire, différente entre toutes les particules virales. Par contre, si les enzymes s'accumulent au niveau de zones précises, au sein de l'ensemble des virions, le gradient n'est pas exactement respecté durant les 2 premières heures, temps maximal qu'il faut aux enzymes pour parcourir l'ensemble du génome. Les observations de Plumet et al. n'abondent pas dans ce sens et dans ce modèle, il n'y a pas de raisons de supposer une répartition non aléatoire des enzymes le long du génome (Plumet et al., 2005).

### Le polyméras'ome', un train à l'arrêt ?

Le modèle d'enzymes wagons poussées par d'autres enzymes a apporté des explications à certaines observations que des modèles plus simples ne permettaient pas d'envisager. L'un des résultats les plus intéressants est celui de génome portant des wagons d'enzymes inactives et immobiles. S'ils sont incorporés au sein de particules virales, on les considérerait comme des particules non infectieuses sans pour autant qu'il y ait de défauts au sein du génome. Cette idée permettrait d'expliquer les rapports de  $1/10^4$  que nous avons observés entre pfu et génome. Les différentes conformations de la N ainsi que la plasticité structurelle de P et L pourraient générer plusieurs états du complexe réplcatif. Cette hypothèse avait été avancée pour expliquer le passage d'un état réplcase à un état transcriptase, nous proposons que sous certaines conditions, le complexe soit dans un état inactif.

Le passage des enzymes le long du génome s'apparente plutôt à l'ouverture d'une fermeture éclair. La polymérase doit ouvrir la nucléocapside pour accéder au génome. L'énergie nécessaire à son déplacement et cette ouverture est apparemment générée par la formation des liaisons nucléotidiques au cours de la polymérisation. L'idée qu'une enzyme s'inactiverait et s'arrêterait sans se détacher peut faire écho aux pauses observées par la pol II. Le fait que nous supposions que des enzymes actives puissent en pousser d'autres ne se base sur aucune étude biochimique et en dépit des

résultats cohérents que nous obtenons, on se doit de remettre en question la viabilité d'une telle hypothèse. S'il apparaît concevable qu'une enzyme puisse en pousser une autre, nos résultats font apparaître qu'il faudrait qu'elle en pousse une dizaine au moins. En l'absence de données plus précises, on ne peut cependant pas infirmer ce modèle.

### Se détacher pour être plus proche de la réalité ?

L'hypothèse la plus couramment admise est celle du détachement de l'enzyme. Les modèles mathématiques classiques sont limités pour étudier des déplacements, apparemment, aléatoires, en trois dimensions. Une étude préliminaire est en cours, en se basant sur la vitesse de diffusion de la polIII au sein de la cellule (Darzacq et al., 2007). Cependant, dans ce cadre, il faudrait avoir une idée beaucoup plus précise de la géométrie de la (les) nucléocapsides, dans le cytosol. Les contraintes que nous avons mentionnées (hélice, encombrement stérique, « immensité de l'océan cytosolique »...) ainsi que les remarques émergeant des modèles présentés précédemment, mettent en avant qu'il faudrait vraisemblablement des facteurs supplémentaires pour mener à bien les réactions de transcription. La protéine V, non structurale, est connue pour moduler répllication et transcription mais à notre connaissance aucune étude n'a montré son implication directe avec la polymérase ou les ARN génomique/antigénomique dans ces phénomènes (Cruz et al., 2006; Fontana et al., 2008; Hu et al., 2005; Parks et al., 2006; Takeuchi et al., 2005; Witko et al., 2006). Des partenaires cellulaires interviennent pour participer à la formation du virion (cytosquelette par exemple), on pourrait concevoir que d'autres molécules non virales interviennent au niveau de la transcription, soit pour fournir l'énergie nécessaire au mouvement des enzymes inactives, soit pour les guider une fois détachées du génome.

Comme nous l'aborderons plus tard, une approche par « système basé agent » serait la plus envisageable pour tester l'hypothèse du détachement des enzymes. Cependant, ces modèles font appel à des données biochimiques précises dont on ne dispose pas.

## Entre M et F

Le résultat qui ressort de l'ensemble de nos expériences, quel que soit le modèle testé est que la probabilité d'arrêt d'activité polymérasique est très forte entre les gènes M et F. Ce n'est pas le message couramment diffusé : on pense plutôt que le passage critique s'opère entre N et P. Pourtant, plusieurs études ont montré l'importance de cette région non traduite, en termes de régulation de la pathogénicité et de la dynamique virale (Heider et al., 1997 ; Parks et al., 2001a; Parks et al., 2001b ; Santak et al., 2007 ; Takeda et al., 2005). Compte tenu de l'aspect mécanique de nos modèles, nous proposerions l'existence de structures secondaires rendant ce passage plus difficile et plus sujet à détachement/extinction. On pourrait également y chercher des sites de liaison pour des protéines régulatrices (virales ou cellulaires). Des mutations intervenant dans cette zone sont connues pour affecter l'établissement du gradient et de fait, des modifications dans la géométrie de la molécule pourraient modifier l'efficacité avec laquelle l'enzyme parcourt cette région du génome.

Même si pour l'instant nous ne pouvons exclure réellement aucune hypothèse, ces modèles devraient nous permettre de mieux envisager le fonctionnement de la polymérase du VR. Ironiquement, ils mettent en avant les incohérences de notre façon de penser le virus et servent également de moteur pour de nouvelles expériences. En particulier, il faudrait générer une approche similaire à celle utilisée pour polIII (Darzacq et al., 2007) en gardant en tête que la fixation d'un anticorps sur la polymérase (et les traitements de perméabilisation préalables) risquent d'altérer la vitesse de parcours, comme observé avec la polymérase-GFP qui est beaucoup plus lente (Plumet et al., 2005). Ces problèmes de visualisation en temps réel pour mesurer des cinétiques d'activité et plus uniquement des localisations de composants moléculaires sont, à notre avis, des défis à relever pour les années à venir. Les modèles mathématiques y auront sûrement un rôle clef à jouer.

## **Faire tourner le cycle du VR**

A une plus grande échelle et afin de capturer toutes les étapes du cycle viral et plus uniquement les phases précoces de la transcription ; nous avons développé une approche mathématique de l'infection d'un tapis cellulaire par le virus de la rougeole. Conformément aux publications mentionnées dans l'introduction, nous avons essayé d'adapter le modèle SIV. Ce fut un échec. Même en y ajoutant une latence entre l'apparition des virus et l'infection des cellules ou en définissant différents stades d'infection (soit de manière continue, comme pour le vieillissement des populations cellulaires, soit de manière usuelle : cellules infectées, cellules productrices...), aucun résultat ne recouvrait les courbes obtenues expérimentalement. Par rapport à d'autres infections virales, on sait que l'infection par le virus de la rougeole est plutôt lente. De plus, les effets cytopathiques et la transmission cellule/cellule, caractéristiques, sont impossibles à gérer avec un modèle en EDO.

## **Limites et possibilités**

Le modèle que nous avons présenté ne représente que l'une des variations les plus abouties que nous avons obtenues pour le moment. L'absence de résultats parfaitement en adéquation avec les résultats expérimentaux ne constitue pas un échec en soi mais témoigne plutôt des imperfections et imprécisions du modèle, reflet lui-même de nos connaissances. Certains des résultats que nous avons obtenus (importance du nombre des ribosomes par exemple) proviennent directement de la façon dont nous avons « traduit » le cycle viral. En l'absence de données précises sur la plupart des régulations des phénomènes enzymatiques, nous ne pouvons que proposer des hypothèses. Toutes peuvent être critiquées et éventuellement condamnées. L'accumulation linéaire des ARNm et ARNg provient directement de l'analyse des résultats de Plumet et al. mais comme nous l'avons discuté précédemment, ne représente pas le phénomène biologique réel mais une vision moyenne de ces événements. (Plumet et al., 2005) Malgré tout, le paramétrage de l'efficacité de transcription (et de réplication...) par l'environnement cellulaire permet d'aborder les interactions virus/cellule et prendre en

compte le vieillissement des cellules. Aucune étude mathématique n'avait encore considéré l'environnement cellulaire comme un facteur important dans le développement viral. La plupart de leurs approches s'intéressent en effet à des effets moyens, alors qu'au sein d'un tapis cellulaire, le nombre de cellules initialement infecté est presque négligeable. L'intérêt majeur de notre approche est donc de se dégager des aspects purement théoriques des systèmes d'EDO et d'offrir une « visualisation » de l'infection d'un tapis de cellules.

### L'intérêt des EDO

Cependant, nous ne remettons pas en cause l'intérêt des systèmes d'EDO. Afin de vérifier l'importance de la division cellulaire sur l'infection rougeoleuse, nous avons d'une part modélisé la croissance des cellules Vero/CD150 et d'autre part, effectué des mesures de cinétiques sur cellules irradiées (donc ne se multipliant plus). Les résultats des cinétiques ont montré des courbes dans le même esprit que les cinétiques publiées dans l'article 1. Cependant, aucune relation simple (facteur multiplicatif ou délai...) n'a pu être mise en évidence entre les résultats avec et sans irradiation des cellules. Par contre, la modélisation par EDO, à partir d'un modèle logistique quelque peu modifié a donné de bons résultats pour mimer la croissance des Vero/CD150. Notre approche « basé biologie » nous a conduit à mimer la formation en 2D du tapis cellulaire. Les vidéos que l'on obtient reproduisent avec une grande fiabilité les observations que l'on peut faire à travers la loupe binoculaire.

### Une transition délicate

Comme nous l'avons abordé dans la partie résultats, des étapes critiques du cycle répliatif ont été particulièrement délicates à modéliser. Aucun consensus actuel ne s'est dégagé sur les activités de la polymérase. Que la protéine N soit un cofacteur indispensable et régulateur de la réplication/transcription est indéniable mais difficile à interpréter. Si l'on considère que passé un certain temps d'infection, toutes les polymé-

rases changent d'activité, abandonnant la transcription au profit de la réplication, il faudrait supposer que suffisamment de protéines N aient été produites... Même si le virus est efficace, on peut douter qu'il puisse gérer et prévoir les stocks de constituants dont il a besoin. De plus, la quantité de protéines (toutes confondues) produites ainsi que la quantité de génomes, par rapport au faible nombre de virus produits montrent plutôt un gaspillage de molécules en désaccord avec cette hypothèse. De fait, le passage (si c'en est réellement un) d'une activité transcriptase à une activité réplicase, ne peut se faire qu'à un niveau local et nous sommes persuadés que sur un même brin d'ARN, les deux états peuvent être retrouvés. La modélisation que nous avons employée : répartir au sein de la cellule les polymérases en trois groupes, en fonction des substrats disponibles fait abstraction de la géographie cellulaire. Des essais précédents dans lesquels nous cartographions la cellule comme une matrice ne se sont pas avérés porteurs et étaient très lourds à gérer pour le logiciel.

### [La fusion, ou pourquoi personne n'avait essayé de modéliser le phénomène avant ?](#)

L'autre point difficile à interpréter est la formation de syncytia. On admet généralement que ce phénomène a lieu quand une cellule infectée exprime suffisamment de protéines H et F à sa surface de telle sorte qu'il peut y avoir fusion avec une cellule voisine, exprimant CD46 et/ou CD150. Nous avons tenté d'établir une valeur seuil pour la fusion. La fusion s'apparente à une diffusion de l'ensemble des ressources et composants viraux d'une cellule vers l'autre. A chaque instant, il fallait donc déterminer si la fusion pouvait avoir lieu. L'assimilation du tapis à une matrice nous conduit à considérer 4 cellules voisines. Si l'on sait que la protéine H va se localiser préférentiellement au niveau des radeaux lipidiques, sont-ils répartis uniformément à la surface cellulaire (Manie et al., 2000; Runkler et al., 2008 ; Vincent et al., 2000)? Les cellules Vero/CD150 ne sont pas des cellules polaires donc théoriquement, aucune répartition préférentielle de H n'est censée être observée. Il faut donc admettre que chaque cellule voisine de la cellule infectée « voit »  $\frac{1}{4}$  des protéines H produites. Nous considérons que la fusion est un phénomène qui a lieu une fois et reste maintenu. Certaines études

prônent l'établissement de micro fusions qui sont réparées permettant malgré tout le passage de composés viraux. Nous ne pouvons atteindre ce degré de précision. On considérera que le passage « en bloc » d'un grand nombre de composés viraux à un instant donné représente en fait la somme de plusieurs petits passages et d'un passage plus important au moment où le syncytium s'établit réellement.

Les travaux de Herschke et al. aussi intéressants soient-ils, représentent un écueil majeur à notre système (Herschke et al., 2007). En effet, ils montrent que les syncytia sont mobiles. Notre système de modélisation ne permet pas d'envisager de tels phénomènes. Il apparaît malgré tout que la mobilité des syncytia dépend étroitement du type cellulaire et (heureusement) les cellules Vero sont beaucoup moins mobiles que les cellules 293T. Cependant, cette observation met en avant l'intérêt d'une modélisation tridimensionnelle de l'infection rougeoleuse. Une modélisation par SMA serait donc une éventualité à envisager avec intérêt.

L'approche que nous avons développée a essayé de contourner la majorité des problèmes qui se présentent généralement aux conceptions bidimensionnelle (plus la dimension temporelle). Au détriment de la rapidité des calculs, nous avons préféré respecter au maximum une conception « basée biologie ». Pour les effets de bord, on constate leur importance éventuelle, mais en considérant mathématiquement que le virus « rebondit » sur la paroi des puits/le bord de la matrice, nous pensons que ces phénomènes sont acceptables. A chaque étape que nous jugions aléatoire ou insuffisamment précise, nous avons privilégié une approche stochastique. De même, la disposition initiale des virus à la surface du tapis cellulaire, la mort programmée des cellules, la dégradation des composants moléculaires, sont des phénomènes gérés par le moteur « random » de Matlab. Il est fort probable que cette approche induise un biais que nous ne pouvons pas contourner. Enfin, notre but était de modéliser l'intégralité du cycle infectieux, nous avons donc dû nous efforcer dans la mesure du possible de reproduire la simultanéité de tous les événements. Cela demande de prendre en compte à chaque instant les modifications apportées ponctuellement et génère beaucoup de



tableaux intermédiaires allongeant le temps de calcul. Malgré tout, dans certains cas (établissement des syncytia en particulier), plutôt que de générer 4 syncytia en même temps si c'est possible, un nombre aléatoire définit avec quelle cellule un syncytium peut être établi et ce, à chaque pas de temps. Des essais au cours desquels la fusion s'opérait entre les 5 cellules en même temps se sont révélés chaotiques à cause de notre conception de diffusion. Malgré tout, à l'heure actuelle, nous n'avons pas encore conçu d'approches plus simples en calcul et plus réaliste.

### (Se) Remettre en question(s) ?

L'un des intérêts de la modélisation est de mettre en évidence certaines des lacunes dans notre raisonnement. Les résultats que nous avons obtenus reflètent ainsi le flou autour de la plupart des mécanismes viraux. De plus, l'absence de données précises pour la plupart des phénomènes apparaît critique. Des études approfondies sérieuses, multifactorielles et quantitatives, telles que celles publiées par Plumet et al. apparaissent nécessaires afin de mieux comprendre le cycle viral. (Plumet et al., 2005)

Le modèle que nous avons présenté est déjà plus complexe que la majeure partie des approches utilisées habituellement. Pourtant, nos résultats montrent des productions de particules virales trop rapides et précoces sans atteindre de valeurs importantes. Ces résultats font écho à des suivis cinétiques de virus déficients pour V et/ou C (Devaux and Cattaneo, 2004 ; Parks et al., 2006 ; Patterson et al., 2000 ; Takeuchi et al., 2005; Witko et al., 2006). En effet, comme on l'a dit, en plus de leur rôle vis-à-vis des IFN de type I, ces protéines régulent le cycle répliatif du VR. Nous n'en avons pas tenu compte dans notre modèle par souci de simplification. Cependant, au vu des publications qui accumulent les preuves de leur rôle régulateur, il semble nécessaire de les incorporer. La question est alors de définir leur impact. Doit-on incorporer un facteur d'efficacité des phénomènes de polymérisation dépendant de la quantité de protéine V ? De plus, si des données existent quant à la quantité d'ARNm codant pour P qui sont édités pour produire V, on ignore avec quelle fréquence, la protéine C est tra-

duite à partir des ARNm de P. Ce nouveau degré de complexité s'il est à envisager va nécessiter plus encore de tests.

L'approche du modélisateur aussi profitable soit-elle se doit d'être remise en question. Peut-on réellement simplifier les événements biologiques et les traduire en langage compilable ? Pour de nombreux phénomènes, cette approche est réaliste. Dans le cas qui nous intéresse, nous avons voulu jongler avec toutes les échelles d'étude. En fait, nous avons voulu retrouver les règles (que l'on suppose simple) régissant les interactions entre molécules virales à partir d'observations des phénomènes finaux, complexes et qui représentent en fait la moyenne d'événements individuels. Ces approches doivent donc être prises avec précaution (et non pas rejetées de prime abord). Les outils mathématique et informatique dont on dispose actuellement dépassent de loin les performances que peuvent atteindre les techniques les plus poussées de biologie moléculaire. En gestion des procédés, les ingénieurs utilisent les modèles de fourmilière par exemple pour optimiser les chaînes de production. La mécanique virale avec son efficacité pourrait être mise à profit dans cette optique. Si des physiciens arrivent à expliquer la répartition des commerces au sein d'une ville (Jensen, 2006), on devrait pouvoir mathématiser l'infection rougeoleuse ! A l'instar du principe d'Heisenberg qui conclut qu'on ne peut efficacement situer une entité et avoir accès à sa vitesse, peut-être faudra-t-il admettre que l'on ne peut avoir accès à tous les niveaux d'investigation du cycle viral... Malgré tout, on ne reviendra pas sur les apports indéniables que les études menées par Perelson et consorts offrent à la virologie !

Sur les toiles que constituent les cellules, les virus de la rougeole, en tant qu'artistes impressionnistes, disposent d'une palette impressionnante de variations possibles. De tout temps, le biologiste a dû ouvrir son champ d'investigation aux technologies émergeant d'autres champs disciplinaires. A l'heure de la rencontre des IFN de type I et du virus de la rougeole, la complexité émergeant de leurs trames respecti-

ves trace des motifs de plus en plus intriqués. A nous de retrouver l'ordre des coups de pinceaux !

# *Annexes*



**ARTICLE 3**

Cell-cell fusion induced by measles virus amplifies the type I interferon response.

Herschke F, Plumet S, Duhon T, Azocar O, **Druelle J**, Laine D, Wild TF, Rabourdin-Combe C, Gerlier D, Valentin H.

[Journal of Virology](#). 2007 Dec;81(23):12859-71

## Contribution

Dans le cadre de ma collaboration avec les Dr. Denis Gerlier, Hélène Valentin et Chantal Rabourdin-Combe, j' ai participé à la mise en évidence du rôle de la fusion viro induite dans l' établissement de la réponse IFN de type I. Pour cela, j' ai réalisé les tests biologiques de titration d' IFN  $\alpha/\beta$  comparés aux mesures par ELISA. (figure 1, 4 et 6)

## Cell-Cell Fusion Induced by Measles Virus Amplifies the Type I Interferon Response<sup>∇†</sup>

F. Herschke,<sup>1‡</sup> S. Plumet,<sup>1‡</sup> T. Duhon,<sup>2‡</sup> O. Azocar,<sup>2</sup> J. Druelle,<sup>3</sup> D. Laine,<sup>2</sup> T. F. Wild,<sup>3</sup>  
C. Rabourdin-Combe,<sup>2§</sup> D. Gerlier,<sup>1§</sup> and H. Valentin<sup>2\*§</sup>

*Interactions Virus Cellule-Hôte, CNRS, Université de Lyon 1, FRE3011, IFR 62 Laennec, 69372 Lyon Cedex 08, France<sup>1</sup>;  
Interaction Virus-Système Immunitaire, INSERM, U851, IFR128 BioSciences Lyon—Gerland, Université de  
Lyon 1, HCL, 21 Avenue Tony Garnier, 69365 Lyon Cedex 07, France<sup>2</sup>; and Immunobiologie des  
Infections Virales, INSERM, U758, IFR128 BioSciences Lyon—Gerland, Université de  
Lyon 1, 21 Avenue Tony Garnier, 69365 Lyon Cedex 07, France*

Received 11 January 2007/Accepted 30 August 2007

Measles virus (MeV) infection is characterized by the formation of multinuclear giant cells (MGC). We report that beta interferon (IFN- $\beta$ ) production is amplified *in vitro* by the formation of virus-induced MGC derived from human epithelial cells or mature conventional dendritic cells. Both fusion and IFN- $\beta$  response amplification were inhibited in a dose-dependent way by a fusion-inhibitory peptide after MeV infection of epithelial cells. This effect was observed at both low and high multiplicities of infection. While in the absence of virus replication, the cell-cell fusion mediated by MeV H/F glycoproteins did not activate any IFN- $\alpha/\beta$  production, an amplified IFN- $\beta$  response was observed when H/F-induced MGC were infected with a nonfusogenic recombinant chimerical virus. Time lapse microscopy studies revealed that MeV-infected MGC from epithelial cells have a highly dynamic behavior and an unexpected long life span. Following cell-cell fusion, both of the RIG-I and IFN- $\beta$  gene deficiencies were *trans* complemented to induce IFN- $\beta$  production. Production of IFN- $\beta$  and IFN- $\alpha$  was also observed in MeV-infected immature dendritic cells (iDC) and mature dendritic cells (mDC). In contrast to iDC, MeV infection of mDC induced MGC, which produced enhanced amounts of IFN- $\alpha/\beta$ . The amplification of IFN- $\beta$  production was associated with a sustained nuclear localization of IFN regulatory factor 3 (IRF-3) in MeV-induced MGC derived from both epithelial cells and mDC, while the IRF-7 up-regulation was poorly sensitive to the fusion process. Therefore, MeV-induced cell-cell fusion amplifies IFN- $\alpha/\beta$  production in infected cells, and this indicates that MGC contribute to the antiviral immune response.

Measles virus (MeV) is an important human pathogen responsible for ~345,000 deaths in 2005 (<http://www.who.int/mediacenter/factsheets/fs286/en/>). However, most humans clear this viral infection provided that they have functional cellular and adaptive immunity (19). MeV infection begins in the respiratory tract and then spreads to local lymphoid tissues, where virus replication can occur in macrophages and possibly conventional dendritic cells (DC) (cDC) (14, 17, 22, 49, 70). This allows MeV to spread to other lymphoid organs and to the whole body. MeV induces a cytopathic effect characterized by the fusion of neighboring cells into multinucleated giant cells (MGC). *In vivo*, 7 days after MeV infection of rhesus monkeys, MGC are found in the respiratory and genitourinary tracts as well as in the esophagus and skin epithelia (47). In addition, a specific subset of infected MGC, called Warthin-Finkeldey cells (WFC), initially described in infants dying of acute mea-

sles, is found in primary and secondary lymphoid organs (19). WFC are usually observed in germinal centers and interfollicular areas of secondary lymphoid organs and in the thymus. They are heterogeneous and display either B- or T-cell markers (54), although macrophage and DC markers have not yet been investigated. *In vitro*, MeV infection of human cells, including primary epithelial cells and cDC, induces the formation of MGC, also referred to as syncytia (17, 78, 82). MeV-induced cell-cell fusion is governed by the interaction of the viral envelope H and F glycoproteins with the cellular receptors CD46 and CD150, which are expressed ubiquitously and solely on immune-activated cells, respectively (19).

The hallmark of the immune response to a viral infection is the rapid production of a range of cytokines, most prominently type I interferon (IFN) (alpha/beta IFN [IFN- $\alpha/\beta$ ]). IFN- $\alpha/\beta$  enables cells to be protected against viral infection via pleiotropic activities such as the inhibition of protein synthesis and cell proliferation and the enhancement of apoptosis of infected cells (reviewed in references 5 and 21). They also activate natural killer (NK) cells and cytotoxic T lymphocytes (CTL) that are capable of eliminating the viral pathogen by killing infected cells. IFN- $\alpha/\beta$  can act directly on CTL or indirectly by inducing the maturation of cDC, which facilitates the cross-presentation of viral antigens to CTL (42, 43). The single IFN- $\beta$  gene and most of the IFN- $\alpha$  genes differ in their promoter regions; the former is acti-

\* Corresponding author. Mailing address: Interaction Virus-Système Immunitaire, INSERM, U851, IFR128 BioSciences Lyon—Gerland, Université de Lyon 1, HCL, 21 Avenue Tony Garnier, 69365 Lyon Cedex 07, France. Phone: (33) 4 37 28 23 51. Fax: (33) 4 37 28 23 41. E-mail: valentin@cervi-lyon.inserm.fr.

† Supplemental material for this article may be found at <http://jvi.asm.org/>.

‡ F.H., S.P., and T.D. contributed equally to this work.

§ C.R.-C., D.G., and H.V. contributed equally to this work.

∇ Published ahead of print on 26 September 2007.



vated by IFN regulatory factor 3 (IRF-3) and IRF-7 heterodimers (56), whereas only IRF-7 homodimers (25) and/or IRF-7/IRF-8 heterodimers, as recently reported for mouse DC (75), can activate the latter. The recognition of peculiar danger molecular motifs of viruses is mediated by host pattern recognition receptors (PRR) (36), which can recognize virus nucleic acids. Two groups of PRR are involved in IFN production in DC, Toll-like receptors (TLR) and RIG-like receptors (RLR). To date, TLR are mainly responsible for IFN- $\alpha$  production by plasmacytoid DC (pDC) via TLR7 and TLR9 (1), which respond to viral nucleic acids within the endosomal compartment. Nucleic acid recognition results in the activation of the IFN- $\alpha$  genes through the phosphorylation and nuclear translocation of IRF-7 (26, 37). Indeed, in comparison with other cells, pDC express high levels of IRF-7 (8, 30), and this allows pDC to produce 100- to 1,000-fold more IFN- $\beta$  and IFN- $\alpha$  than other cell types (26). TLR are also involved in IFN production by cDC via TLR3 after phagocytosis of infected cells (64). However, the IFN response in cDC relies principally on RLR (RIG-I and MDA-5) (34, 35), which are cytosolic PRR expressed in almost all nucleated cells and dedicated to respond to viral nucleic acids produced during replication (28, 60, 87). MDA-5 and RIG-I recognized double-stranded RNA (20) and 5'-triphosphate-ended RNA (28, 60, 62), respectively. Accordingly, they recognize different types of RNA viruses, with MDA-5 being activated by the *Picornaviridae* and RIG-I being activated by the *Flaviviridae*, *Orthomyxoviridae*, and *Mononegavirales* (20, 35). MeV activates RIG-I, which recognizes the 5'-triphosphate end of the small RNA leader transcript (62). The activation of RLR induces the interaction with an adaptor protein called IPS-1 (also known as MAVS, VISA, and CARDIF) that leads to NF- $\kappa$ B, IRF-3, and IRF-7 phosphorylation and their transient translocation into the nucleus, resulting in early IFN- $\beta$  gene induction (34, 57). In contrast to the short-living IRF-7, the more stable IRF-3 is highly expressed in all cells (25). IFN- $\beta$  is then secreted and binds to the IFN- $\alpha$  receptor (IFNAR) to produce late IFN- $\beta$  and all IFN- $\alpha$  subtypes. Indeed, early IFN- $\beta$  induces the transcription of numerous genes known as IFN-stimulated genes (25), including IRF-7. The activation of this supplemental source of IRF-7 allows the delayed production of a boost of both IFN- $\beta$  and IFN- $\alpha$ , according to a robust positive-feedback loop, which amplifies the antiviral response (25). The crucial role of the RLR in the IFN- $\alpha/\beta$  response and control of viral replication has recently been highlighted using IPS-1 (or MAVS)-deficient mice, which show normal IFN- $\alpha$  secretion by pDC (41, 74).

In the case of MeV, IFN- $\alpha/\beta$  production has been found after in vitro infection of various human cell types including epithelial cells (from various tissues), endothelial cells, glial cells, and peripheral blood mononuclear cells (52, 84, 85). MeV propagates more efficiently in mature cDC (mDC) than in immature cDC (iDC) and induces higher level of MGC formation in mDC (17, 66). Given the ability of MeV to induce MGC formation in the epithelium and secondary lymphoid organs, we aimed at investigating, in both human epithelial cells and cDC, the role of MeV-induced cell-cell fusion in the regulation of IFN- $\alpha/\beta$  production.

## MATERIALS AND METHODS

**Reagents.** Antibodies used were monoclonal antibodies (MAbs) clone 55 (anti-H), clone 25, and clone 120 (anti-N); G28.5 (anti-CD40); and rabbit polyclonal anti-human IRF-3. The following reagents were used: Hoechst 33342 (Sigma), fusion-inhibiting peptide (FIP) Z-D-Phe-L-Phe-Gly-OH (Neosystem), recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and recombinant human interleukin-4 (generously provided by Schering-Plough), recombinant human IFN- $\beta$  (Calbiochem, San Diego, CA), and DraQ5 (Alexis Biolabs).

**Cells and phenotypic analysis.** Human kidney epithelial 293T/17 cells (ATCC) expressing CD46 (293T/CD46<sup>+</sup>), HeLa cells, African green monkey Vero fibroblasts (ATCC), 293T/CD150<sup>+</sup> cells (77), Huh7.5 cells, a subline of Huh7 cells defective in RIG-I (73), and human cortical thymic epithelial cells (TEC) (clone P1.4D6) from postnatal thymus (16) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum or as described previously (16, 73). Monocyte-derived DC were generated in vitro from human blood (Etablissement de Transfusion Sanguine, Lyon, France) as previously described (17). After 6 days of culture in 200 ng/ml recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and 10 ng/ml recombinant human interleukin-4, >95% of the cells were iDC. The mDC were derived by treating iDC for 48 h with 10  $\mu$ g/ml of anti-CD40 mAb. cDC phenotyping was determined as previously described (17, 82).

**MeV infection.** MeV (Hallé strain) and recombinant chimeric MGv (72) were maintained in Vero cells. For MeV infection experiments, cells were seeded overnight at the appropriate density in a 24-well plate according to the duration of the observation to avoid cell crowding. 293T cells and TEC were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 1, unless otherwise indicated, and then treated or not treated with FIP. DC were infected with MeV at an MOI of 0.1 as previously detailed (17, 83). As controls, all cells were pulsed with a mock preparation corresponding to uninfected Vero cell supernatant. In some experiments, FIP (100  $\mu$ g/ml) was added to the cDC cultures infected or not infected with MeV.

**Transient cell transfections.** A total of  $4 \times 10^5$  293T/CD46<sup>+</sup> cells were plated onto six-well plates (BD, Falcon). The next day, cells were transfected with either 1  $\mu$ g pCXN2-F (expressing Edm-F) plus 1  $\mu$ g pCXN2-EdH (expressing the CD46-binding H<sup>Ed</sup>), 1  $\mu$ g pCXN2-KAH (expressing the H<sup>KA</sup> from wild-type MeV isolate KA, which does not bind to CD46) (79), or 2  $\mu$ g of pBSK(+) carrier plasmid (Stratagene). All transfections were performed using Lipofectamine (Invitrogen) or Dreamfect (OZ Biosciences) according to the manufacturer's instructions.

**Time lapse.** A total of  $2 \times 10^6$  293T/CD46<sup>+</sup> cells were plated onto a six-well plate and infected with MeV at an MOI of 1 as described above. After 24 h of culture in the presence of 10  $\mu$ g/ml FIP, FIP was removed, and the plate was placed at 37°C and heated in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere (Carl Zeiss, Jena, Germany). Cells were imaged by Metamorph software v6 with a Coolsnap HQ monochrome camera associated with a time lapse microscope (Axiovert 100 M) and a 10 $\times$  (numerical aperture, 0.25) Plan-Apochromat objective (Zeiss). Meta Imaging Series 4.5 (Universal Imaging, West Chester, PA) was used to make Quick-Time movies from image stacks from metamorph software. One picture was made every 10 min for 60 h, and every second of movie represents 235.4 min (3.92 h) of culture (see Fig. S3 in the supplemental material). Images extracted from stacks were processed with Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems, San Jose, CA).

**Coculture experiments.** A total of  $8 \times 10^4$  Huh7.5 and Vero cells were plated into 24-well plates (Costar) and were infected, 24 h later, with MeV at an MOI of 1. At 8 h postinfection (p.i.), Vero cells were trypsinized and added to the Huh7.5 cell monolayers at a 1:1 ratio in the presence or absence of 10  $\mu$ g/ml of FIP. Cell-free supernatants were harvested at different times and frozen before analysis for IFN- $\alpha/\beta$  using a biological assay.

**IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  detection assay.** IFN- $\alpha/\beta$  contents in supernatants were determined using a bioassay as detailed elsewhere previously (84). IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the IFN- $\alpha$  kit from Bender MedSystems (detection limit, 8 pg/ml) and the IFN- $\beta$  kit from PBL Laboratories (detection limit, 250 pg/ml), respectively.

**RNA extraction, cDNA reverse transcription, and real-time quantitative PCR analysis.** A detailed procedure for viral RNA quantification was reported previously (61). Primer sets for human IFN- $\beta$  and IRF-7 mRNA quantification were TGGGAGGATTCTGCATTACC (forward) and CAGCATCTGCTGGTTG AAGA (reverse), respectively. The primer sets were purchased from Search-LC (Heidelberg, Germany). Results were normalized according to amounts of 18S rRNA and expressed in mRNA copy number/25 ng of total RNA.

**MTT colorimetric bioassay.** A total of  $4 \times 10^3$  293T/CD46<sup>+</sup> cells were plated into a 96-well plate (Costar). At 30 h after infection or transfection, cells were

treated with 225 ng/well of 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT; Sigma) to measure mitochondrial activity of metabolically active cells. Four hours later, the supernatant was removed, and the cells were lysed with 100  $\mu$ l/well dimethyl sulfoxide containing 0.04 N HCl. Absorbance was then measured at 490 and 650 nm (18).

**Quantitative fusion assay.** The quantitative fusion assay is based on the conditional expression of  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal) under the control of the T7 polymerase promoter and was performed as previously described (7).

**Subcellular localization of GFP-IRF-3 proteins.** A total of  $5 \times 10^4$  293T/CD46<sup>+</sup> cells, seeded into 24-well plate, were infected or not infected with MeV at an MOI of 1 for 2 h and then transfected by the green fluorescent protein (GFP)-IRF-3 expression plasmid (46) using Lipofectamine. Twenty-four to 48 h later, GFP fluorescence in living cells was analyzed with a Leica DM IRB microscope at a magnification of  $\times 400$ . The percentage of IRF-3-labeled nuclei was calculated by counting, within a microscope field, the total number of nuclei (belonging to mononuclear cells or MGCs [labeled and unlabeled]) and the number of nuclei labeled with GFP-IRF-3. For each condition,  $>100$  nuclei were counted.

**Stainings.** For nuclear staining, cell monolayers were stained with Hoechst 33342 dye as detailed previously (82), and the stained nuclei were observed using a Leica DM IRB microscope.

MeV H-cell surface expression was detected using mAb cl55 plus goat anti-mouse immunoglobulin G phycoerythrin-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories) as previously described (82). MeV N intracellular detection was performed using a Cytotfix/Cytoperm kit (Becton Dickinson, Pharmingen), and 293T/CD46<sup>+</sup> cells were labeled using biotinylated mAb cl25 plus streptavidin-phycoerythrin (Caltag Laboratories) as previously described (82). After labeling, cells were analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson Cellquest software). Integrated fluorescence was measured, and data were collected from at least 5,000 events.

Triple stainings were performed to visualize GFP-IRF-3 (green), MeV N protein (red), and nuclei (blue) by confocal microscopy assays. A total of  $2.5 \times 10^4$  293T/CD46<sup>+</sup> cells were seeded onto precoated poly-L-lysine (10  $\mu$ g/ml overnight at 4°C; Sigma) glass coverslips in 24-well plates and incubated for 20 min at 37°C. Twelve hours later, cells were infected with MeV at MOIs of 0.1, 1, 2, and 4, followed by transfection of the GFP-IRF-3 expression plasmid as described above, and were then cultured in the absence or presence of FIP at 10  $\mu$ g/ml. Forty-eight hours later, cells were fixed in 2% paraformaldehyde-phosphate-buffered saline (PBS) for 20 min at room temperature, treated with 0.1% glycine-PBS for 10 min at room temperature, and permeabilized with 0.5% Triton X-100-PBS for 5 min at room temperature. After washes with PBS, the fixed cells were blocked in a solution containing bovine serum albumin, human and goat sera, and Triton X-100-PBS overnight at +4°C. Cells were then incubated with anti-N mAb cl120 for 90 min at +4°C. Cells were washed three times for 5 min in PBS before incubation with goat anti-mouse immunoglobulin G-Alexa 568 for 30 min at +4°C. After three washes in PBS, cells were mounted onto glass slides with mounting medium (Dako) containing Draq5 as a nuclear marker. Labeled cells were imaged with a confocal microscope (1  $\mu$ m; Zeiss LSM510) using a zoomed ( $\times 2$ ) 63 $\times$  (numerical aperture, 1.4) PlanFluor objective. To prevent cross-contamination between fluorochromes, each channel was imaged sequentially using a multitrack recording module before merging.

Double staining was performed to visualize endogenous IRF-3 (green) and nuclei (blue) by Axioplan2 Imaging microscopy assays. Briefly,  $8 \times 10^4$  mDC were seeded onto precoated poly-L-lysine glass coverslips in 24-well plates and incubated for 20 min at 37°C. Twenty-four hours later, cells were infected at an MOI of 0.1 and then cultured in the absence or presence of FIP at 100  $\mu$ g/ml. At 3 days p.i., cells were then fixed as described above for triple staining. The fixed cells were then blocked in bovine serum albumin-serum-Triton X-100-PBS for 1 h at +4°C and incubated with rabbit anti-IRF-3 serum for 1 h at +4°C. Cells were washed three times for 5 min in PBS before incubation with a goat anti-rabbit immunoglobulin G Alexa 488-conjugated secondary antibody (Molecular Probes) for 30 min at +4°C. After three washes in PBS, cells were incubated with 1  $\mu$ g/ml of Hoechst 33343 stain for 15 min at room temperature before being mounted onto glass slides with mounting medium (Dako). Labeled cells were analyzed with an Axioplan2 Imaging microscope (0.3  $\mu$ m; Zeiss) and then imaged by Metamorph software V6. Images extracted from z stacks were processed with Adobe Photoshop 6.0 software.

## RESULTS

**MeV-induced cell-cell fusion amplifies IFN- $\beta$  activation in epithelial cells.** While MeV induced a high number of syncytia

containing numerous nuclei in cells expressing both MeV receptors (293T/CD46<sup>+</sup> CD150<sup>+</sup>), syncytia were smallest and less numerous in 293T/CD46<sup>+</sup> cells expressing only CD46 (supplemental data may be found at [hal.archives-ouvertes.fr/hal-00169132](http://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00169132)). MeV infection of 293T/CD46<sup>+</sup> cells led to the accumulation of F viral transcripts and to the induction of IFN- $\beta$  gene expression (supplemental data may be found at [hal.archives-ouvertes.fr/hal-00169132](http://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00169132)). The accumulation of viral F mRNA and the transcription of the IFN- $\beta$  gene were both enhanced in 293T/CD46<sup>+</sup> CD150<sup>+</sup> cells compared to 293T/CD46<sup>+</sup> cells (data not shown). Thus, the level of IFN- $\beta$  activation was correlated to virus transcription and/or to cytopathic effects.

To decipher how each of these factor could influence the IFN response, we took advantage of the availability of an FIP. FIP efficiently blocks MeV-induced syncytium formation without inhibiting the cell-to-cell virus spreading (19). The addition of FIP repressed both syncytium formation and IFN- $\alpha/\beta$  production in an MeV-infected 293T/CD46<sup>+</sup> cell culture without affecting the proportion of cells expressing MeV N protein (Fig. 1A, left). Whereas the fusion was totally inhibited by FIP, IFN- $\alpha/\beta$  production by day 3 (not shown) and day 7 p.i. (Fig. 1A, left) was inhibited by  $\sim 85$  to 96%. This residual IFN- $\alpha/\beta$  production was significant, since no IFN- $\beta$  could be detected in uninfected cells (data not shown). However, 293T cells expressing only MeV Ed-H and F glycoproteins readily fused into MGC but did not secrete any detectable IFN- $\alpha/\beta$  (data not shown). This indicates that cell-cell fusion, per se, does not activate the IFN- $\alpha/\beta$  response.

A recombinant chimeric virus, MGV, where the H and F genes have been substituted with that of the vesicular stomatitis virus G glycoprotein (72) infected and propagated more slowly in 293T/CD46<sup>+</sup> cells without inducing syncytium formation. Accordingly, it induced a low level of IFN- $\beta$  production, which was insensitive to FIP (Fig. 1A, right) and equivalent to that observed in FIP-treated MeV-infected 293T/CD46<sup>+</sup> cells. Thus, MGV triggered only a basal level of IFN- $\alpha/\beta$  response, in agreement with the observation of the low IFN- $\alpha/\beta$ -inducing ability of a nonfusogenic MeV variant (48). To confirm the enhancing effect of cell-cell fusion on the MeV-induced IFN- $\beta$  response, we compared the effect of expressing a fusing ( $H^{EdF}$ ) and a nonfusing ( $H^{K^A}F$ ) (79) glycoprotein combination in *trans* on the IFN- $\beta$  response induced by MGV infection. As expected, the expression of  $H^{K^A}F$  affected neither virus nor IFN- $\beta$  transcription (not shown). In contrast, compared to  $H^{K^A}F$ , the expression of  $H^{EdF}$  induced large syncytia into 293T/CD46<sup>+</sup> cells, a minor increase in viral transcription, and a significant increase in IFN- $\beta$  gene activation (Fig. 1B). Furthermore, the enhancing effect on the IFN- $\beta$  response was much more pronounced under conditions ensuring that every single got infected, i.e., at an MOI of 4, with a  $\sim 25$ -fold enhancement of IFN- $\beta$  mRNA accumulation compared to a limited 2.5-fold increase in virus transcript accumulation.

When 293T/CD46<sup>+</sup> cells were infected with fusogenic MeV at an MOI ranging from 0.01 up to 4 and analyzed at 30 h p.i., the viral transcription of the F messenger exhibited a dose-response curve between MOIs of 0.01 and 1 and then reached a plateau (Fig. 1C, top). The identical levels of viral transcription between MOIs of 1 and 4 suggested that some viral interference occurred. In addition, at an MOI higher than 1, a

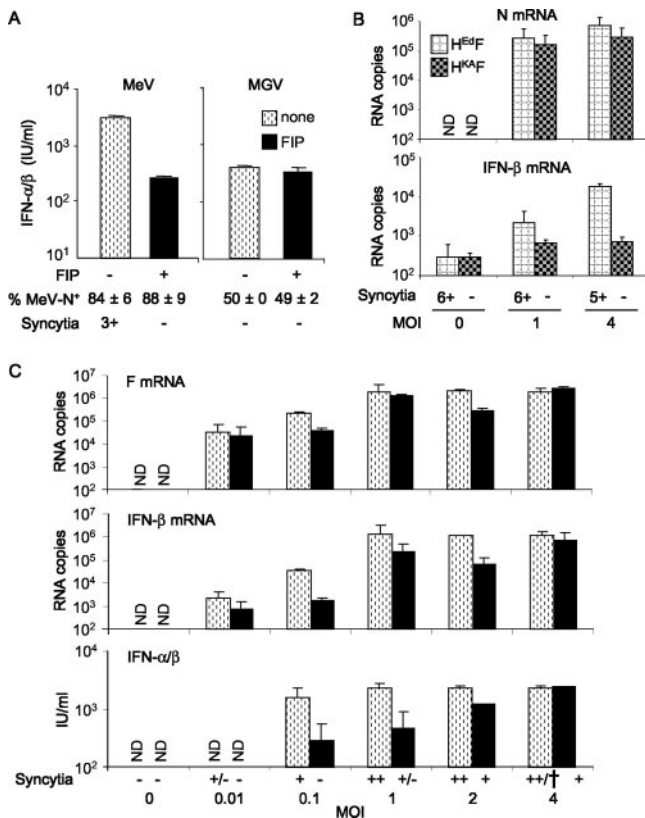


FIG. 1. Role of cell-cell fusion and MeV infection in the IFN- $\beta$  response. (A) Syncytium formation (scored as a minus sign [-] for no syncytium and from + to 6+, graded by integrating the numbers and sizes of live adherent syncytia plus floating dead syncytia) percentage of cells expressing the MeV N protein determined by flow cytometry, and IFN- $\alpha/\beta$  production at 7 days p.i. of 293T/CD46<sup>+</sup> cells with MeV (left) or recombinant chimerical MGV (right) in the absence (dotted columns) or presence (black columns) of 10  $\mu$ g/ml of FIP. (B) Syncytium formation and accumulation of MeV N (top) and IFN- $\beta$  (bottom) transcripts at 23 h p.i. in 293T/CD46<sup>+</sup> cells transiently expressing H<sup>EdF</sup> (grid columns) or H<sup>KAF</sup> (checked columns), respectively. 293T/CD46<sup>+</sup> cells were infected with MGV at different MOIs, and they were then transfected at 2 h p.i. (C) Dose-response relationship of MeV F transcription and IFN- $\beta$  mRNA accumulation at 30 h p.i. and IFN- $\alpha/\beta$  secretion at 3 days p.i. with the MOIs of MeV used to infect 293T/CD46<sup>+</sup> cells in the absence (dotted columns) or presence (black columns) of 10  $\mu$ g/ml FIP. Data are mean values  $\pm$  standard deviations (SD) from two to three independent experiments. ND, not detected. † indicates cell cytotoxicity.

cytotoxicity, increasing with the MOI used, was observed, which likely resulted in part from cell fusion from without (i.e., fusion between adjacent cells bridged by viral particles) (6), a reminder of virally induced hemolysis of CD46-expressing Vervet monkey red blood cells (59). Furthermore, syncytium formation was much reduced compared to that induced by a lower MOI, likely because of the strong down-regulation of CD46 upon contact with the large amount of hemagglutinin brought about by the high viral inoculum (39, 51). The level of IFN- $\beta$  transcription followed the same dose response between MOIs of 0.01 and 1 to reach a plateau at MOIs of 1, 2, and 4 (Fig. 1C, middle). This correlation between viral transcription and IFN- $\beta$  gene activation agrees with their parallel kinetics observed at an MOI of 1 (62). Surprisingly, the production of

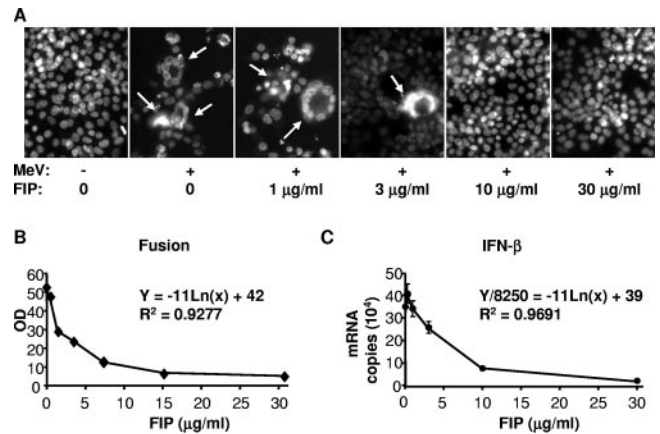


FIG. 2. Similar dose-dependent inhibition of cell-cell fusion and IFN- $\beta$  gene transcription by FIP. 293T/CD46<sup>+</sup> (A and C) or HeLa (B) cells were infected with MeV at an MOI of 1 prior to the addition of increasing amounts of FIP. (A) Micrographs of adherent cells stained with Hoechst 33342 (magnification,  $\times$ 400) at 72 h p.i. Cells containing more than three nuclei were considered to be syncytia (white arrows). (B) Dose-dependent inhibition of cell-cell fusion by FIP quantified by colorimetric  $\beta$ -Gal reporter gene expression assay. OD, optical density. (C) Dose-dependent inhibition of IFN- $\beta$  mRNA accumulation by FIP at 30 h p.i. Data are means  $\pm$  SD of triplicate experiments.

IFN- $\alpha/\beta$  in the supernatant measured at 3 days p.i. was almost identical between MOIs of 0.1 and 4 (Fig. 1C, bottom). At an MOI of 0.01, a small amount of IFN- $\alpha/\beta$  was detected only later, at 7 days p.i. (data not shown). The addition of FIP, which inhibited the formation of syncytia at all MOIs (Fig. 1C), had minimal effects on viral transcription but strongly inhibited IFN- $\beta$  gene transcription and protein secretion (Fig. 1C, black columns), except at an MOI of 4. Interestingly, in the presence of FIP, the amount of IFN released into the supernatant and the MOI correlated for MOIs between 0.1 and 2 (Fig. 1C and data not shown). At an MOI of 0.01, the level of released IFN detected at 7 days p.i. was also inhibited by FIP (not shown). The lack of an FIP effect at an MOI of 4 was likely reflecting the side effects of the too-high viral load mentioned above.

Furthermore, after infection at an MOI of 1, FIP inhibition of the cell-cell fusion observed at 30 h p.i. and 3 days p.i. was dose dependent, as assessed by nucleus staining with Hoechst 33342 (Fig. 2A and data not shown) and the quantification assay using  $\beta$ -Gal as a reporter gene for intercellular fusion (Fig. 2B). A similar inhibition curve was also observed for IFN- $\beta$  mRNA (Fig. 2C and not shown). Strikingly, the best mathematical equation describing these two dose-dependent responses had similar slopes ( $-11$ ) and ordinates at the origin ( $+42$  and  $+39$ ).

In summary, MeV replication triggers a basal IFN- $\beta$  response independently of H/F proteins, and MeV-induced cell-cell fusion robustly amplifies this response in a dose-dependent manner at both low and high MOIs.

**High morphological plasticity of MeV-induced MGC.** Virally induced fusion is usually correlated with apoptosis (13). As we observed an increased synthesis of IFN- $\beta$  in MGC, we further analyzed the morphological plasticity of these cells. Thirty hours p.i., syncytia were found to be metabolically active and able to convert MTT into intracellular formazan crystals, a

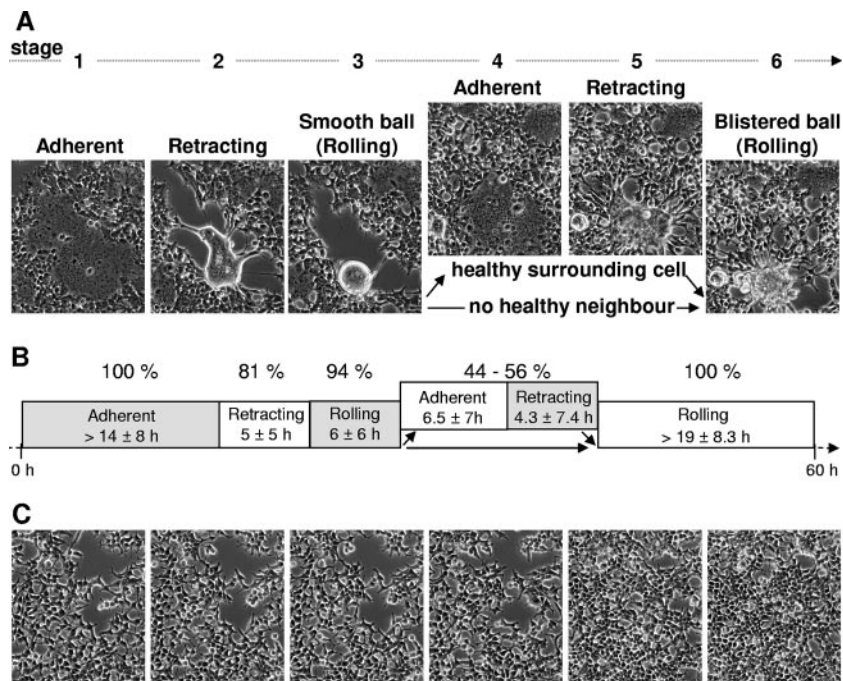


FIG. 3. MeV-induced syncytia are dynamic entities with an extended life span. MeV-infected 293T/CD46<sup>+</sup> cells were cultured overnight in the presence of FIP and then cultured in the absence (A and B) or the presence (C) of FIP (10  $\mu$ g/ml), with recorded imaging for the next 60 h by time lapse microscopy. Images at a magnification of  $\times 10$  (numerical aperture, 0.25) were extracted from Fig. S3A in the supplemental material and another video not shown at 12.83 h, 15 h, 16.66 h, 25.33 h, 32.5 h, and 35.33 h. (B) The duration of each stage was evaluated and expressed as means  $\pm$  SD of 17 microscopic areas from three to four separate experiments. The frequency was estimated and indicated as the proportion (percent) that underwent transition through a given stage.

hallmark of mitochondrial activity in viable epithelial cells (supplemental data may be found at [hal.archives-ouvertes.fr/hal-00169132](http://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00169132)).

Studies by time lapse microscopy of MeV-infected 293T/CD46<sup>+</sup> cells over 60 h showed the syncytia to be dynamic, exhibiting a morphology that varied with time (Fig. 3A and B) (see Fig. S3A in the supplemental material). In the first stage, the initial flat adherent syncytium increased in size and nucleus contents (Fig. 3A). Dynamic pseudopodia emerged from the syncytium to contact surrounding cells or syncytia. In a second stage, the adherent syncytium retracted into highly refringent smooth balls (third stage), where nuclei were no longer visible, except upon examination under confocal microscopy of *z* stacks after Hoechst staining (see below). Balls were highly mobile and rolled around. When they encountered surrounding healthy adherent mononuclear cells, they spread out into a secondary flat adherent syncytium with visible nuclei (fourth stage). The secondary adherent syncytium then retracted again (fifth stage) into an irregular ball with protruding blisters, giving it a cauliflower appearance (sixth stage), which rolled around. The duration of each stage was highly variable (see mean values in Fig. 3B), and most of the initial syncytia passed through stages 1, 2, and 3; half of them passed through stages 4 and 5 to reach stage 6; and another half directly passed from stage 3 to stage 6 (Fig. 3B). Of 17 initial syncytia recorded during three different experiments, none appeared to die before 60 h. Furthermore, when individual smooth or blistered balls were transferred onto a fresh uninfected 293T/CD46<sup>+</sup> monolayer, they readhered. This suggests that syncytia may

have an indefinite life span provided that they find a healthy cell monolayer within their vicinity (Fig. 3B and data not shown). In contrast, when transferred onto a plastic dish covered or not covered by collagen, both smooth and blistered balls became senescent and finally died, becoming floating and optically clear bubble-like structures (data not shown). Thus, MeV-induced syncytia are not prone to dying quickly; instead, they may remain a viable entity. As controls, cell-to-cell fusion was observed in neither uninfected nor FIP-treated MeV-infected 293T/CD46<sup>+</sup> cells, indicating that none of the observed syncytia was due to merging senescent 293T/CD46<sup>+</sup> cells (Fig. 3C and data not shown).

**Cell-cell fusion brings together both the danger activation signal and the IFN- $\beta$  gene to trigger IFN- $\beta$  induction.** We then studied whether MeV-induced fusion can trigger *trans* complementation using Huh7.5 cells and Vero cells that have disabled RIG-I (73) and lack the IFN- $\beta$  gene (11, 12), respectively. IFN- $\alpha/\beta$  was secreted and accumulated over time from both of the MeV-Huh7.5/Vero and MeV-Vero/Huh7.5 cell coculture combinations, as syncytia were observed (Fig. 4). Moreover, the addition of FIP completely blocked both cellular fusion and IFN- $\alpha/\beta$  production to undetectable levels. As expected, MeV infection of isolated Huh7.5 or Vero cells induced syncytia but did not trigger any IFN- $\alpha/\beta$  response. Thus, the RIG-I defect in human Huh7.5 cells and the IFN- $\beta$  gene defect in the simian Vero cells could be *trans*-complemented in fused cells, allowing the triggering of the human IFN- $\beta$  gene.

**The IRF-7 expression level is not influenced by MeV-induced fusion in epithelial cells.** We then investigated whether

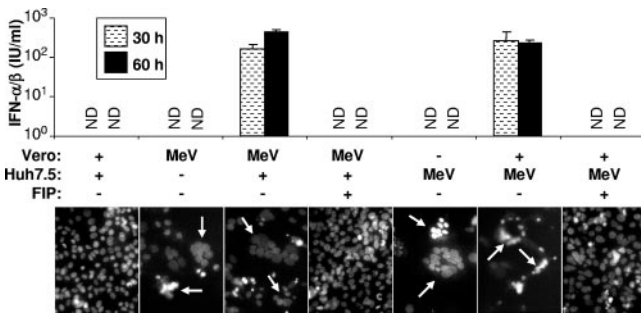


FIG. 4. Reciprocal *trans*-complementation of RIG-I- and IFN- $\beta$ -deficient cells by MeV-induced fusion. RIG-I-deficient Huh7.5 or IFN- $\beta$ -deficient Vero cells were infected with MeV at an MOI of 1 and cocultured 8 h later with uninfected Vero and Huh7.5 cells (ratio, 1:1), respectively. The cocultures were treated or not treated with 10  $\mu$ g/ml of FIP. Cell-free supernatants were collected at 30 and 60 h p.i. to measure IFN- $\alpha/\beta$  production. At the end of the coculture, the cell monolayers were stained for fluorescent nuclei (magnification,  $\times$ 400) for counting within every syncytium indicated by arrows. Data are from one representative experiment out of two. ND, not detected.

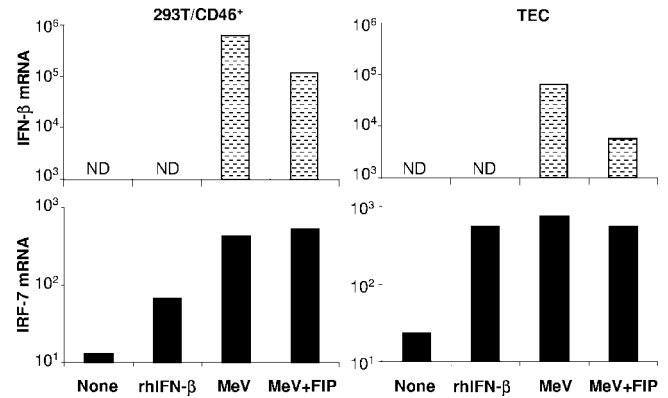


FIG. 5. Unlike the IFN- $\beta$  gene, IRF-7 gene expression does not correlate with cell-cell fusion. 293T/CD46<sup>+</sup> cells (left) and TEC (right) were either treated with 1,000 IU/ml of recombinant human IFN- $\beta$  or infected with MeV at an MOI of 1 and cultured in the absence or presence of FIP (10  $\mu$ g/ml). Expression of IFN- $\beta$  (top dotted histograms) and IRF-7 (bottom black histograms) mRNA was quantified at 30 h p.i. Data from one representative experiment out of two or three are shown. ND, not detected.

the enhancement of IFN- $\beta$  gene expression mediated by MeV-induced cell-cell fusion correlates with the up-regulation of IRF-7. To this end, the level of IRF-7 transcripts was analyzed in 293T/CD46<sup>+</sup> cells and in primary TEC, which are IFNAR competent, in the presence or absence of FIP (Fig. 5). In both of these cell types, MeV infection resulted in the activation of the IFN- $\beta$  and IRF-7 genes. However, the level of IRF-7 transcripts remained unchanged when syncytium formation was blocked by FIP treatment and did not correlate with the IFN- $\beta$  mRNA level. Thus, the amplification of IFN- $\beta$  activation by MeV-induced cell-cell fusion is not directly or solely controlled by the level of IRF-7 expression.

**MeV-induced cell-cell fusion amplifies IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  responses in human mDC but not iDC.** The phenomenon of the amplification of the IFN- $\alpha/\beta$  response by MeV-induced cell-cell fusion was then examined in human monocyte-derived DC. More than 95% of iDC and mDC were CD1a<sup>+</sup> and CD14<sup>-</sup> (data not shown). While the immature phenotype was confirmed by the low or negative expression of major histocompatibility complex class II, CD83, CD40, CD80, and CD86, mDC expressed high levels of these molecules (data not shown). In agreement with previous reports (17, 50), both iDC and mDC, which have CD46<sup>+</sup> CD150<sup>Low</sup> and CD46<sup>+</sup> CD150<sup>High</sup> phenotypes, respectively (Fig. 6A) (50), were sensitive to MeV infection, as shown by MeV F transcription (Fig. 6B). However, the sensitivity to infection differed between iDC and mDC. MeV replication was faster in mDC than in iDC, with  $\sim$ 230-fold-higher transcription at 3 days p.i. (Fig. 6B). While the iDC only poorly fused, the MeV-infected mDC contained numerous giant MGC (Fig. 6), which expressed both viral proteins and mDC markers (17) (data not shown). The addition of FIP to the cDC did not significantly affect MeV F transcription in the iDC and only partially reduced MeV F transcription in mDC (Fig. 6B), while FIP efficiently inhibited the formation of MGC (Fig. 6). We then investigated IFN- $\alpha/\beta$  production in cDC following MeV infection. MeV-infected iDC secreted significant levels of bioactive IFN- $\alpha/\beta$  (Fig. 6C) and IFN- $\alpha$  (Fig. 6D). No IFN- $\beta$  production was detected (Fig.

6E), even though IFN- $\beta$  transcripts were observed (Fig. 6F), because of either the limited sensitivity of the ELISA or the consumption of IFN- $\beta$  by MeV-infected iDC (25). According to the very low level of cell-cell fusion observed within MeV-infected iDC, the addition of FIP did not affect IFN- $\alpha/\beta$  production (Fig. 6C and D). MeV-infected mDC produced significant levels of bioactive IFN- $\alpha/\beta$ , IFN- $\alpha$ , and IFN- $\beta$  (Fig. 6C to E) and IFN- $\beta$  mRNA (Fig. 6F). Both MGC formation and IFN- $\alpha/\beta$  production by MeV-infected mDC were strongly inhibited in the presence of FIP (Fig. 6C to F). Thus, MeV infection induces IFN- $\alpha/\beta$  responses in both iDC and mDC. However, virus-induced cell-cell fusion amplifies both IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  production only in mDC. Interestingly, MeV infection induced an IRF-7 up-regulation in iDC but not in mDC (Fig. 6G). Furthermore, FIP did not significantly affect the expression of IRF-7 in both DC types (Fig. 6G).

As a control, the nonfusogenic chimeric MGCV was also used to infect iDC and mDC. MGCV induced, in both iDC and mDC, only a basal IFN response, which was not sensitive to FIP (supplemental data may be found at [hal.archives-ouvertes.fr/hal-00169132](http://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00169132)). We noticed that, contrary to MeV, MGCV replicated better in iDC than in mDC (supplemental data may be found at [hal.archives-ouvertes.fr/hal-00169132](http://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00169132)) and, accordingly, induced stronger IFN- $\beta$  gene transcription in iDCs. We speculate that the stronger endocytosis ability of iDC over mDC can favor MGCV entry, which relies on the acidic endosomal pathway mediated by the vesicular stomatitis virus G glycoprotein.

Thus, MeV infection induces IFN- $\alpha/\beta$  responses in both iDC and mDC. However, the virus-induced cell-cell fusion amplifies both IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  production only in mDC.

**Sustained nuclear translocation of IRF-3 in MeV-induced MGC derived from epithelial cells and mDC.** MeV infection induces the transactivation of the IFN- $\beta$  gene through the phosphorylation and nuclear translocation of IRF-3 (65). Therefore, we analyzed the changes in the subcellular IRF-3 localization using GFP-tagged IRF-3 (GFP-IRF-3) trans-

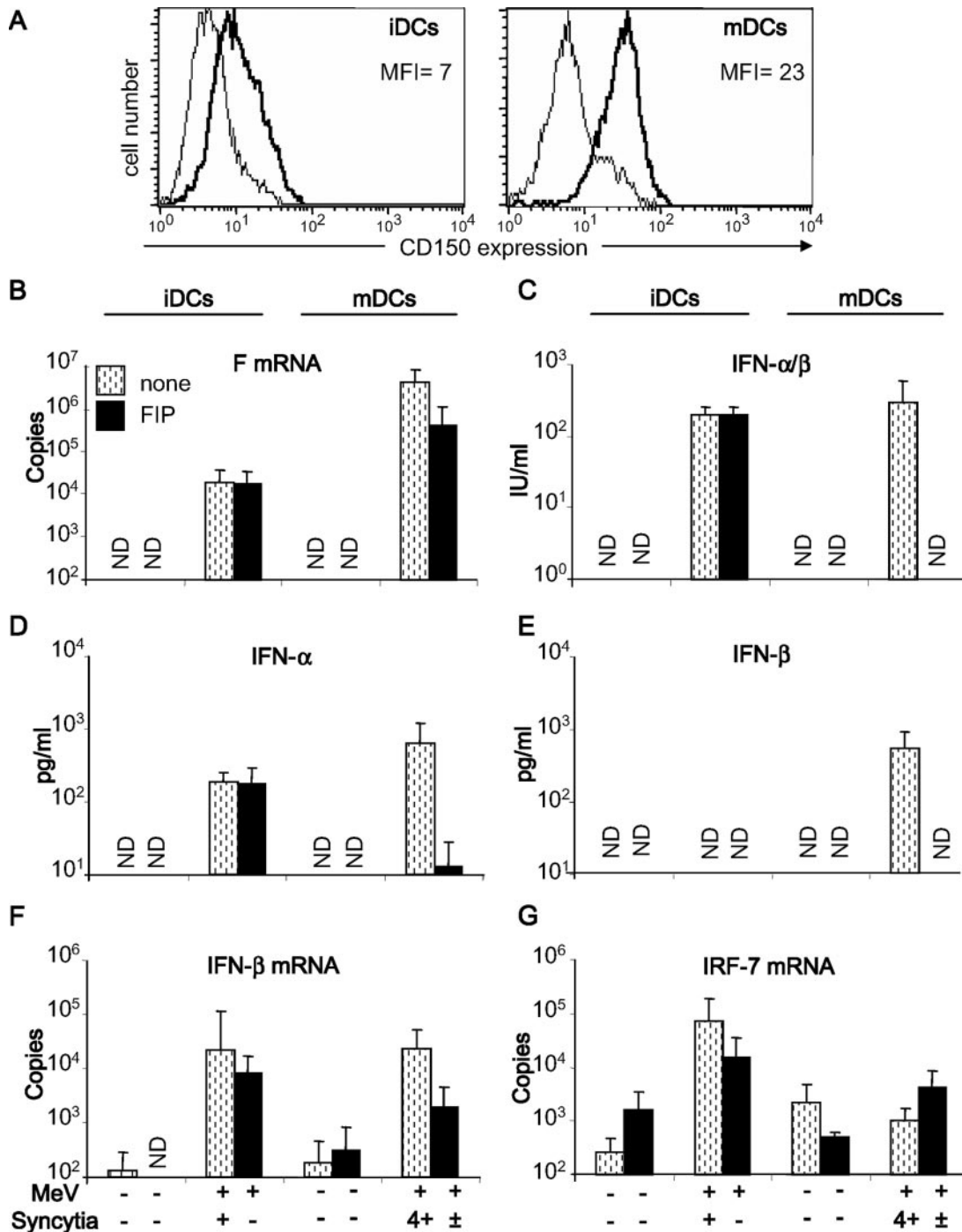
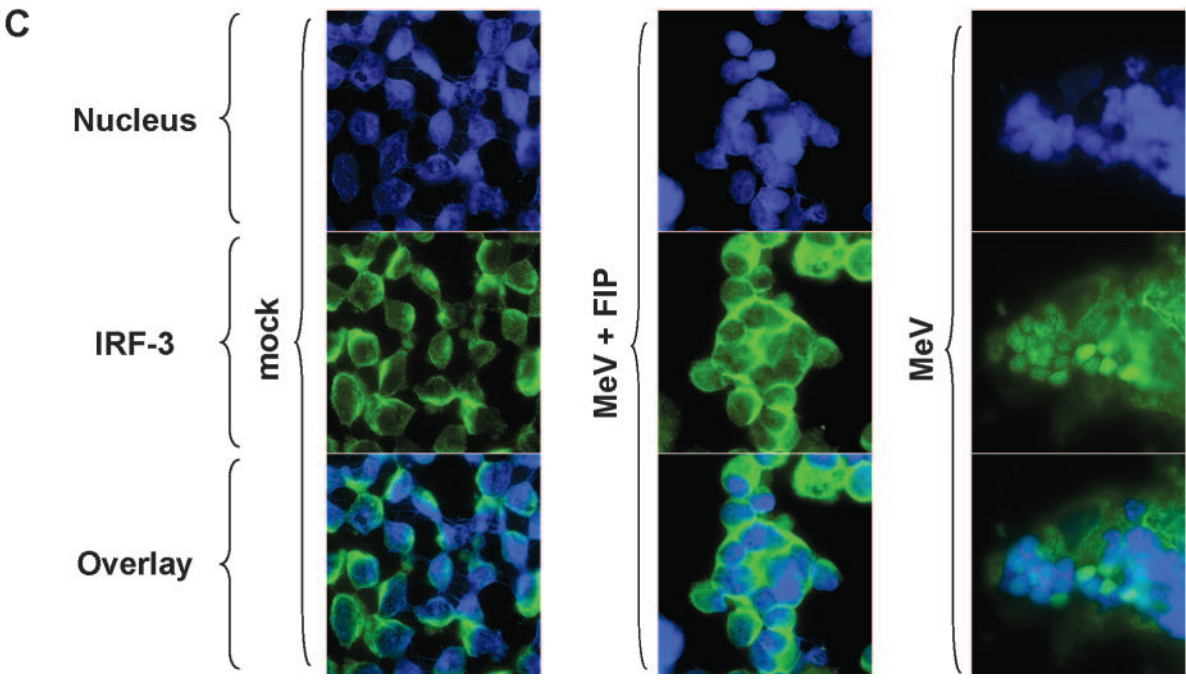
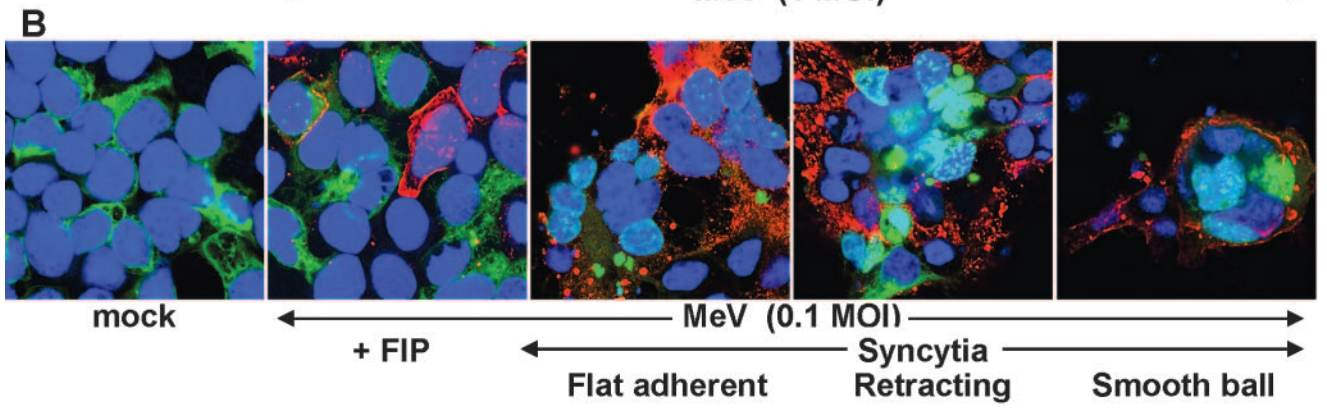
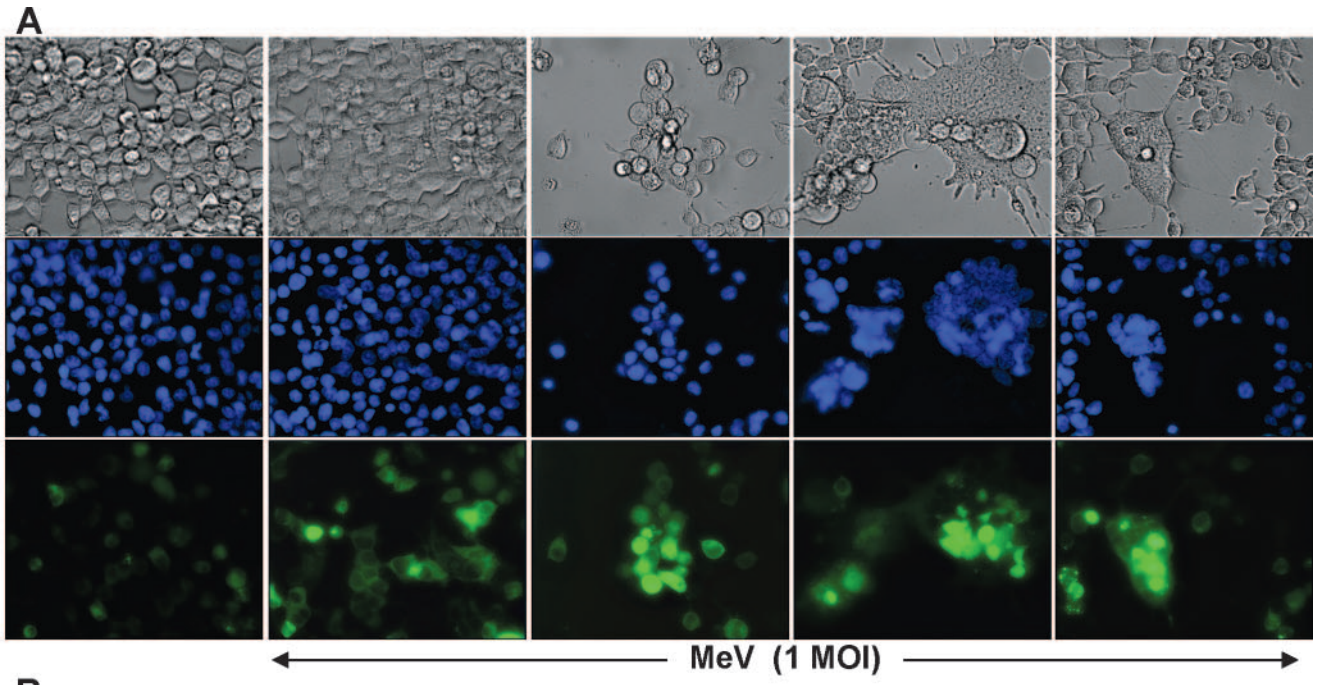


FIG. 6. Mature, but not immature, DC exhibit fusion-dependent amplification of IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  responses. iDC and mDC were mock infected or infected with MeV at an MOI of 0.1 in the absence (dotted columns) or the presence (black columns) of FIP (100  $\mu$ g/ml). Syncytium formation was scored for each condition as described in Fig. 1. (A) CD150 expression in iDC and mDC cultures was analyzed by flow cytometry. (B) MeV F transcript accumulation in iDC and mDC cultures was measured at 3 days p.i. (C) Secreted bioactive IFN- $\alpha/\beta$  in cell-free supernatants collected at 3 days p.i. (C and D) IFN- $\alpha$  (D) and IFN- $\beta$  (E) were measured by ELISA at 3 days p.i. (F and G) Accumulation of IFN- $\beta$  (F) and IRF-7 (G) transcripts at 3 days p.i. in cDC cultures in the absence or the presence of FIP (100  $\mu$ g/ml). Data are mean values from two to five separate experiments. ND, not detected; MFI, mean fluorescence intensity.

ected into 293T/CD46<sup>+</sup> cells. As expected (46), GFP-IRF-3 was localized exclusively within the cytoplasm of uninfected cells (Fig. 7A). After MeV infection, nuclei from a single syncytium exhibited a diverse level of GFP-IRF-3 staining,

thus looking asynchronous, and a large proportion of syncytia contained nuclear IRF-3 whatever their stage. In addition, few mononuclear MeV-infected cells surrounding outside MGC displayed nuclear localization of GFP-IRF-3 (not shown). In



the absence of FIP,  $50\% \pm 24\%$  of the nuclei belonging to MGC were labeled with GFP-IRF-3, whereas only  $6\% \pm 7\%$  of the small amount of single cells, which remained outside MGC, had their nuclei labeled (Fig. 7A). In the presence of FIP, although most cells were infected (Fig. 1A and 7B) (see supplemental data at [hal.archives-ouvertes.fr/hal-00169132](http://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00169132)), nuclear translocation of GFP-IRF-3 was observed in only  $4\% \pm 2\%$  of them ( $2\alpha = 0.01$ ) (Fig. 7A), compared to  $50\% \pm 24\%$  of nucleus labeling in the absence of FIP. In all cases, the nuclei were intact, including those in syncytia, as shown by Hoechst staining (Fig. 7A).

Confocal analysis of GFP-IRF-3 distribution in 293T/CD46<sup>+</sup> cells infected with MeV at MOIs of 1 and 2 confirmed the high rate of nuclear IRF-3 labeling in MGC compared to mononuclear cells and the presence of cytoplasmic N protein in all but rare cells (data not shown). At a lower MOI of 0.1, similar results were obtained. Upon confocal analysis, many nuclei within MGC were labeled with GFP-IRF-3, whereas GFP-IRF-3 remained excluded from the nuclei of noninfected cells (Fig. 7B and data not shown). When the fusion was prevented by the addition of FIP, only a few mononuclear cell nuclei displayed GFP-IRF-3 labeling, although most of them were clearly infected, as shown by cytoplasmic N labeling (Fig. 7B, red dots and patches, and data not shown). Again, GFP-IRF-3 was translocated into the nuclei of MGC at all stages of the adherent-ball cycle shown in Fig. 3 (Fig. 7B and data not shown). Interestingly, the distribution of both N and GFP-IRF-3 tended to change with the morphological stage of the MGC. When the syncytium was flat and adherent, GFP-IRF-3 showed a dotted and/or reticulated distribution in the nuclei, and the N protein had a dotted cytoplasmic distribution. When the syncytium underwent retraction into a smooth ball, the intensity of the nuclear GFP-IRF-3 labeling became stronger and more diffuse, and the N protein tended to aggregate further into larger patches at the periphery of the cytoplasm (Fig. 7B and data not shown). Thus, the amplification of IFN- $\beta$  production induced by MeV-mediated fusion correlates with a sustained and strong nuclear translocation of IRF-3 within MGC at all their morphological stages.

Localization of endogenous IRF-3 during infection of mDC was also studied. As expected, endogenous IRF-3 distributed exclusively within the cytoplasm of uninfected mDC (Fig. 7C, left). At 3 days p.i., IRF-3 (green) staining of many intact nuclei (blue stain) in syncytia of MeV-infected mDC was observed (Fig. 7C, right) (see Fig. S7C in the supplemental material). Interestingly, the distribution of endogenous IRF-3 in the nuclei of mDC-derived syncytia looked very similar to that

of GFP-IRF-3 in nuclei of 293T-derived syncytia (compare Fig. 7C with A and B and data not shown). The addition of FIP strongly inhibited both MeV-infected MGC from mDC and nuclear localization of endogenous IRF-3 (Fig. 7C, middle). Thus, endogenous IRF-3 tended to remain translocated in nuclei within MGC from MeV-infected mDC, in agreement with the finding of sustained nuclear translocation of exogenous GFP-IRF-3 within MGC derived from epithelial cells.

## DISCUSSION

We report here that MeV-induced MGC or syncytia derived from epithelial cells and mDC are metabolically active and long-living and display both sustained nuclear translocation of IRF-3 and enhanced activation of the IFN- $\beta$  gene. First, there is a correlation between the fusogenic activity of the MeV strain and IFN- $\beta$  production. Second, the fusion-enhancing effect is observed at both low and high MOIs. Third, the FIP inhibits, in a dose-dependent manner, both cell-cell fusion and IFN- $\beta$  production. Fourth, cell-cell fusion mediated by MeV H and F glycoproteins does not activate any IFN- $\beta$  response in the absence of viral infection but does it after infection with MGv, a nonfusogenic chimeric virus. Fifth, the cytosolic PRR RIG-I and the IFN- $\beta$  gene are *trans* complemented during the fusion process. Sixth, although both iDC and mDC are infected by MeV, only mDC undergo massive cell-cell fusion. In the mDC, robust IFN- $\alpha/\beta$  production is mediated by MeV-induced cell-cell fusion. Seventh, in both epithelial cells and mDC, the fusion-enhancing effect on the IFN- $\beta$  response appears to be mediated by a sustained nuclear IRF-3 localization but does not directly correlate with the up-regulation of IRF-7 expression. Finally, in response to MeV, iDC also produce IFN- $\alpha/\beta$  production, but it is independent of the fusion process and likely amplified via IRF-7. Altogether, our results indicate that MeV-induced MGC in epithelial cells and mDC are important sources of IFN- $\alpha/\beta$  and that the fusion can mediate an enhancement of IFN- $\alpha/\beta$  production without modulating the expression of IRF-7.

Cell-cell fusion is a hallmark of many viral infections, and the resulting MGC were thought to be short-lived. Indeed, syncytia induced by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein died by apoptosis by at least three different mechanisms: transient lipid exchange, activation of several kinases and transcription factors, and contagious apoptosis (58). Surprisingly, MeV-induced MGC from epithelial cells were found to be viable and dynamic entities capable of transducing intracellular signals throughout their morphological stage changes.

FIG. 7. Nuclear translocation of IRF-3 can be triggered within MeV-induced syncytia. (A) Nuclear translocation of GFP-IRF-3 within syncytia of 293T/CD46<sup>+</sup> cells infected by MeV at an MOI of 1. Microphotographs (magnification,  $\times 400$ ) show morphology (top panels), Hoechst-labeled nuclei (middle panels), and GFP-IRF-3-labeled nuclei (bottom panels) at 30 h p.i. Micrographs of uninfected cells (mock) and cells infected with MeV in the absence (MeV) or the presence (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (MeV + FIP) of FIP are shown. Data are from one representative experiment out of four. (B) Three-color overlays of confocal images showing the distribution of GFP-IRF-3 (green), N (red), and nuclei (Draq5) (blue) in 293T/CD46<sup>+</sup> cells infected or not infected with MeV at an MOI of 0.1 in the presence or absence of FIP and transfected with GFP-IRF-3. Syncytium images were taken at three morphological stages, flat adherent, retracting, and smooth ball, respectively. The whole set of one-color images used to build the overlays is shown in supplemental data at [hal.archives-ouvertes.fr/hal-00169132](http://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00169132). (C) Nuclear localization of endogenous IRF-3 in MGC derived from MeV-infected mDC. mDC were mock treated (left) (magnification,  $\times 630$ ) or infected with MeV at an MOI of 0.1 in the absence (middle) (magnification,  $\times 400$ ) or the presence (right) (magnification,  $\times 630$ ) of FIP (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). At 3 days p.i., mDC cultures were stained with anti-IRF-3 (green) (left) and with nucleus stain (Hoechst 33343) (blue). Cells were analyzed with an Axioplan microscope.



Thus, from our *in vitro* observations, we predict that the physiopathological MGC (WFC) observed in lymph nodes and thymus from MeV-infected children and primates should have a rather long life span *in vivo* (54, 76). However, as described by us and others (13, 58, 63, 82), syncytium apoptosis finally occurs, probably depending on cellular environment deprivation.

In nonpathological situations, the contents of a cell nucleus should be tightly regulated to ensure that every cell harbors a single nucleus. Notable exceptions are the fusion of cellular precursors undergoing a specific maturation process, such as myotubes, osteoclasts, and syncytiotrophoblasts. In the two latter cases, a survival program is turned on (15, 31). Whether such a mechanism occurs for the survival of MeV-induced MGC remains to be determined. Strikingly, both of the MeV-induced MGC and syncytiotrophoblasts need to recruit fresh mononuclear cells in order to survive (29). Furthermore, given that IFN- $\beta$  is used as retrocontrol feedback to limit the size of the osteoclasts by preventing further recruitment of new mononuclear cells (9), it could also regulate the dynamics of MGC formation induced by MeV, as observed for other viruses (53, 80, 81, 86).

MeV-induced cell-cell fusion results in MGC harboring an important function in innate immunity, and it could be questioned if the fusion *per se* acts as an activation signal. Indeed, the artificial fusion of a human cell line with chicken erythrocytes results in the activation of both human and chicken IFN- $\beta$  (23), with the latter being indicative of a reactivation of the dormant chicken erythrocyte nucleus. MeV-induced cell-cell fusion is mediated by H binding to the CD46 or CD150 cellular receptor, which results in the activation of the fusion F protein (19). H binding to CD46 has been reported to activate the IFN- $\beta$  response and NO $\cdot$  production in murine macrophages expressing human CD46 (33). In human epithelial cells, the H/F- and CD46-mediated fusion, *per se*, was unable to trigger the IFN- $\beta$  response, which required virus transcription (62). Likewise, we can exclude that the interaction of H with TLR2 is involved in IFN- $\beta$  activation since (i) the signaling downstream of TLR2 occurred independently of the F glycoprotein, (ii) the use of a wild-type MeV strain with the H protein unable to bind to CD46 and TLR2 (4) gave similar results (not shown), and (iii) the TLR2 signaling pathway is not linked to IFN- $\alpha/\beta$  production. Altogether, MeV-induced cell-cell fusion in human epithelial cells is not directly sensed as a danger signal by the innate cellular machinery.

MeV infection of human epithelial cells triggers the production of IFN- $\beta$ , which is differentially regulated in mononuclear cells and MGC. At the beginning of viral infection, the activation of IFN- $\beta$  occurs in MeV-infected mononuclear cells, where cytosolic RIG-I is activated upon recognition of the 5'-triphosphate end of MeV leader RNA (62), and this results in the activation of IRF-3. IRF-3 then undergoes phosphorylation, homo- or heterodimerization, nuclear translocation, fixation on IFN-sensitive responsive elements, and degradation by the ubiquitin-proteasome pathway (3, 65). In a later phase, the amplification of IFN- $\beta$  production in MeV-infected mononuclear epithelial cells can be mediated by classical IFNAR/IRF-7-dependent positive feedback, as described previously for other viruses (27), since IRF-7 is up-regulated after MeV infection. In contrast, the robust IFN- $\beta$  production mediated

by MGC from epithelial cells could not be explained solely by IRF-7 up-regulation, because the latter was poorly sensitive to the fusion process. As described previously for infection with respiratory syncytial virus, IRF-3 nuclear translocation occurs early, within a few hours after infection, and it then drops rapidly within 15 h because of the anti-IFN activity of nonstructural proteins (71). Therefore, the presence of a high level of IRF-3 nuclear translocation within MGC at a late time (30 h *p.i.*) of MeV infection is unexpected and supports an essential role for IRF-3 in the MGC-mediated amplification of IFN- $\beta$  production. It is possible that MeV proteins with IFN antagonist activity are diluted out upon fusion of MGC with uninfected cells, thus allowing stronger and more sustained IFN production. It remains to be determined if the sustained IRF-3 nuclear localization within MGC occurs as phosphorylated IRF-3 homodimers or IRF-3/IRF-7 heterodimers.

What could the mechanism that enables cell fusion to boost IFN- $\beta$  activation be? At low MOIs (virus-to-cell ratio of <1), we propose the following model. Since the RIG-I and IFN- $\beta$  gene loci are *trans* complemented during cell-cell fusion, syncytium formation can boost IFN- $\beta$  transcription by bringing uninfected cells into contact with viral pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). At a given time, the level of IFN- $\beta$  activation results from the balance between available trigger viral RNA (PAMPs), RIG-I (PRR), pathway components (i.e., IRF-3), and viral IFN antagonists. The sustained nuclear localization of IRF-3 in the nuclei within syncytia at low MOIs is compatible with the continuous recruitment of noninfected cells, which can result in a weakening concentration of viral antagonists and/or the recruitment of "naive" RIG-I/pathway component molecules by MeV leader RNA, which would be produced in excess over the amount of RIG-I/pathway components available in a single cell. At a high MOI, an alternative model should be made, since all individual cells get infected prior to the fusion event, and the fusion-mediated amplification of the IFN- $\beta$  response is even higher (Fig. 1B). IRF-3 nuclear translocation could be sustained within MeV-induced MGC because of a synergistic activity such as the stabilization of phosphorylated IRF-3 by the activation of the DNA-dependent protein kinase (32). This will require further investigations. Presently, our data thus argue for two nonexclusive mechanisms involved in the fusion-enhancing effect on IFN- $\beta$  activation: one, evidenced at a low MOI, is the recruitment of noninfected cells to MeV-infected MGC, and the other, at a high MOI, is a synergistic effect of cell fusion and virus infection. In both cases, there is a sustained nuclear translocation of IRF-3 within MGC, the underlying mechanism of which remains to be more deeply examined. In every case, the amplification of the IFN- $\beta$  response by MGC derived from MeV-infected epithelial cells upgrades the alert level of the innate immune response against viral infection in peripheral tissues.

During natural infection, MeV infects lung epithelial cells and/or resident iDC in epithelia and mucosa and likely induces local IFN- $\alpha/\beta$  production, which could limit MeV replication (45). Infected iDC can then migrate and disseminate the virus to the draining lymph nodes. There, they can be stimulated via CD40L by encountering naive T lymphocytes and become activated and more permissive to MeV replication, as shown experimentally (66). Because mDC are prone to fuse with

surrounding cells, they form MGC, which could correspond to the WFC found in lymphoid organs. This results in a high level of virus progeny, which can propagate throughout the body. There are several examples of IFN- $\alpha/\beta$  production by human or mouse iDC (2, 34, 35) infected in vitro by a few viruses, including MeV (38). Here, we demonstrate that upon MeV infection, both iDC and mDC produce IFN- $\beta$  and IFN- $\alpha$  in vitro. iDC display low permissiveness to MeV infection and rapidly produce high levels of IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  independently of cell-cell fusion, probably through IFNAR/IRF-7 signaling, as judged by the up-regulation of IRF-7 expression. Since IFN- $\alpha/\beta$  is quickly produced and secreted by iDC after infection with MeV (not shown), IFN- $\alpha/\beta$  can protect cells against the propagation of MeV and strongly limit the formation of MGC. As iDC are present in peripheral tissues and secrete IFN- $\alpha/\beta$ , they can contribute to the establishment of the innate antiviral state by enhancing the cytotoxicity of NK cells and activating macrophages (10, 40). In addition, iDC constitute a critical link between innate and adaptive immunity (44, 67). Indeed, IFN- $\alpha/\beta$  induces the up-regulation of costimulatory molecules CD80, CD86, and CD40 on cDC (24) and the expression of TRAIL on iDC, which become cytotoxic (83). Thus, the IFN- $\alpha/\beta$  produced by MeV-infected iDC is a signal that upgrades the alarm level of cellular innate immunity for detecting the invasion of a possible pathogen.

In contrast to iDC, mDC are highly susceptible to MeV infection, form large MGC, and produce high levels of IFN- $\alpha/\beta$ . IFN- $\alpha/\beta$  is therefore less efficient in limiting MeV growth and MGC formation within mDC than within iDC. The opposite phenotypes of iDC and mDC could originate from different relative kinetics of infection and the innate antiviral response. Indeed, when the strength of the initial activation of IFN- $\beta$  is too low compared to the virus growth kinetics, the rapid accumulation of MeV-encoded anti-IFN V and possibly C proteins can block the intracellular IFNAR signaling pathway (55, 69), and this paves the way for unlimited virus growth. We therefore favor that MGC can be promoted or repressed according to the respective speed and strength of virus growth and IFN- $\alpha/\beta$  production. Upon infection, mDC produce IFN- $\alpha/\beta$  mostly from MGC, without any IRF-7 up-regulation. This suggests that the IFNAR/IRF-7 feedback loop is not directly involved. These data are in agreement with the down-regulation of IFNAR in cDC upon their maturation (68). As for epithelial cells, the robust production of IFN- $\alpha/\beta$  by MeV-mediated MGC from mDC also correlated with the sustained activation of IRF-3. However, the induction of IFN- $\alpha$  independently of IRF-7 up-regulation in MGC is questionable, and the mechanism remains to be determined. The IFN- $\alpha/\beta$  produced by MGC from MeV-infected mDC could rather be involved in the establishment of MeV-specific adaptive immune responses in the secondary lymph nodes. By providing a high viral antigen load and IFN- $\alpha/\beta$ -dependent enhancement of the cross-priming to T cells (43), the paradoxical accumulation of virus and IFN- $\alpha/\beta$  within MeV-mediated MGC probably contributes to the stimulation of the MeV-specific adaptive immune response, which will finally clear the virus from the organism. Finally, because of the different abilities of various laboratory, vaccine, and wild-type MeV strains to counteract cellular innate immunity, the virus strain dependency of cell fusion-mediated amplification of the IFN- $\alpha/\beta$  response is also currently under investigation.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Servet for helpful discussions and C. Chamontin, C. Bella, F. Simian-Lermé, and C. Lionnet (Flow Cytometry and PLATIM platforms of IFR128) for their helpful technical assistance. This work benefited from the technical facilities of the CeCIL platform of IFR62. This work would not have been possible without MABs, plasmids, recombinant virus, and/or cell lines kindly provided by M. Billéter, C. Rice, M. L. Toribio, K. Takeuchi, A. Garcia-Sastre, J. Hiscott, Y. Yanagi, E. Berger, and Schering-Plough (Dardilly, France).

This work was supported in part by grants from ANR (DG, ANR-MIME), INSERM, INCA-Canceropole, and ARC 3637. D.L., F.H., J.D., T.D., and S.P. were supported by a fellowship from MENRT, ARC, and DGA, respectively.

We have no conflicting financial interests.

## REFERENCES

- Asselin-Paturel, C., G. Brizard, K. Chemin, A. Boonstra, A. O'Garra, A. Vicari, and G. Trinchieri. 2005. Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J. Exp. Med.* **201**:1157-1167.
- Barchet, W., A. Krug, M. Cella, C. Newby, J. A. Fischer, A. Dzionek, A. Pekosz, and M. Colonna. 2005. Dendritic cells respond to influenza virus through TLR7- and PKR-independent pathways. *Eur. J. Immunol.* **35**:236-242.
- Bibeau-Poirier, A., S. P. Gravel, J. F. Clement, S. Rolland, G. Rodier, P. Coulombe, J. Hiscott, N. Grandvaux, S. Meloche, and M. J. Servant. 2006. Involvement of the IkappaB kinase (IKK)-related kinases Tank-binding kinase 1/IKKi and cullin-based ubiquitin ligases in IFN regulatory factor-3 degradation. *J. Immunol.* **177**:5059-5067.
- Bieback, K., E. Lien, I. M. Klagge, E. Avota, J. Schneider-Schaulies, W. P. Duprex, H. Wagner, C. J. Kirschning, V. Ter Meulen, and S. Schneider-Schaulies. 2002. Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates Toll-like receptor 2 signaling. *J. Virol.* **76**:8729-8736.
- Bonjardim, C. A. 2005. Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses—and viruses counteract IFN action. *Microbes Infect.* **7**:569-578.
- Bratt, M. A., and W. R. Gallaher. 1969. Preliminary analysis of the requirement for fusion from within and from without by Newcastle disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **64**:537-543.
- Christiansen, D., P. Devaux, B. Reveil, A. Evtashev, B. Horvat, J. Lamy, C. Rabourdin-Combe, J. H. Cohen, and D. Gerlier. 2000. Octamerization enables soluble CD46 receptor to neutralize measles virus in vitro and in vivo. *J. Virol.* **74**:4672-4678.
- Coccia, E. M., M. Severa, E. Giacomini, D. Monneron, M. E. Remoli, I. Julkunen, M. Cella, R. Lande, and G. Uze. 2004. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **34**:796-805.
- Coelho, L. F., G. Magno de Freitas Almeida, F. J. Mennechet, A. Blangy, and G. Uze. 2005. Interferon-alpha and -beta differentially regulate osteoclastogenesis: role of differential induction of chemokine CXCL11 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:11917-11922.
- Dalod, M., T. Hamilton, R. Salomon, T. P. Salazar-Mather, S. C. Henry, J. D. Hamilton, and C. A. Biron. 2003. Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. *J. Exp. Med.* **197**:885-898.
- Diaz, M. O., S. Ziemin, M. M. Le Beau, P. Pitha, S. D. Smith, R. R. Chilcote, and J. D. Rowley. 1988. Homozygous deletion of the alpha- and beta 1-interferon genes in human leukemia and derived cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:5259-5263.
- Emeny, J. M., and M. J. Morgan. 1979. Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *J. Gen. Virol.* **43**:247-252.
- Esolen, L. M., S. W. Park, J. M. Hardwick, and D. E. Griffin. 1995. Apoptosis as a cause of death in measles virus-infected cells. *J. Virol.* **69**:3955-3958.
- Esolen, L. M., B. J. Ward, T. R. Moench, and D. E. Griffin. 1993. Infection of monocytes during measles. *J. Infect. Dis.* **168**:47-52.
- Feng, X. 2005. Regulatory roles and molecular signaling of TNF family members in osteoclasts. *Gene* **350**:1-13.
- Fernandez, E., A. Vicente, A. Zapata, B. Brera, J. J. Lozano, C. Martinez, and M. L. Toribio. 1994. Establishment and characterization of cloned human thymic epithelial cell lines. Analysis of adhesion molecule expression and cytokine production. *Blood* **83**:3245-3254.
- Fugier-Vivier, I., C. Servet-Delprat, P. Rivautier, M. C. Rissoan, Y. J. Liu, and C. Rabourdin-Combe. 1997. Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J. Exp. Med.* **186**:813-823.
- Gerlier, D., and N. Thomasset. 1986. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods* **94**:57-63.
- Gerlier, D., H. Valentin, D. Laine, C. Rabourdin-Combe, and C. Servet-

- Delprat.** 2006. Subversion of the immune system by measles virus: a model for the intricate interplay between a virus and the human immune system, p. 225–292. *In* P. J. Lachman and M. B. A. Oldstone (ed.), *Microbial subversion of host immunity*. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom.
20. **Gitlin, L., W. Barchet, S. Gilfillan, M. Cella, B. Beutler, R. A. Flavell, M. S. Diamond, and M. Colonna.** 2006. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyriboctyidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:8459–8464.
  21. **Goodbourn, S., L. Didcock, and R. E. Randall.** 2000. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* **81**:2341–2364.
  22. **Grosjean, I., C. Caux, C. Bella, I. Berger, F. Wild, J. Banchereau, and D. Kaiserlian.** 1997. Measles virus infects human dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* **186**:801–812.
  23. **Guggenheim, M. A., R. M. Friedman, and A. S. Rabson.** 1968. Interferon: production by chick erythrocytes activated by cell fusion. *Science* **159**:542–543.
  24. **Honda, K., S. Sakaguchi, C. Nakajima, A. Watanabe, H. Yanai, M. Matsumoto, T. Ohteki, T. Kaisho, A. Takaoka, S. Akira, T. Seya, and T. Taniguchi.** 2003. Selective contribution of IFN- $\alpha$ /beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:10872–10877.
  25. **Honda, K., A. Takaoka, and T. Taniguchi.** 2006. Type I interferon [sic] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* **25**:349–360.
  26. **Honda, K., H. Yanai, T. Mizutani, H. Negishi, N. Shimada, N. Suzuki, Y. Ohba, A. Takaoka, W. C. Yeh, and T. Taniguchi.** 2004. Role of a transcriptional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:15416–15421.
  27. **Honda, K., H. Yanai, H. Negishi, M. Asagiri, M. Sato, T. Mizutani, N. Shimada, Y. Ohba, A. Takaoka, N. Yoshida, and T. Taniguchi.** 2005. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**:772–777.
  28. **Hornung, V., J. Ellegast, S. Kim, K. Brzozka, A. Jung, H. Kato, H. Poeck, S. Akira, K. K. Conzelmann, M. Schlee, S. Endres, and G. Hartmann.** 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**:994–997.
  29. **Huppertz, B., C. Bartz, and M. Kokozidou.** 2006. Trophoblast fusion: fusogenic proteins, syncytins and ADAMs, and other prerequisites for syncytial fusion. *Micron* **37**:509–517.
  30. **Izaguirre, A., B. J. Barnes, S. Amrute, W. S. Yeow, N. Megjugorac, J. Dai, D. Feng, E. Chung, P. M. Pitha, and P. Fitzgerald-Bocarsly.** 2003. Comparative analysis of IRF and IFN- $\alpha$  expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* **74**:1125–1138.
  31. **Juriscovica, A., J. Detmar, and I. Caniggia.** 2005. Molecular mechanisms of trophoblast survival: from implantation to birth. *Birth Defects Res. C Embryo Today* **75**:262–280.
  32. **Karpova, A. Y., M. Trost, J. M. Murray, L. C. Cantley, and P. M. Howley.** 2002. Interferon regulatory factor-3 is an in vivo target of DNA-PK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:2818–2823.
  33. **Katayama, Y., A. Hirano, and T. C. Wong.** 2000. Human receptor for measles virus (CD46) enhances nitric oxide production and restricts virus replication in mouse macrophages by modulating production of alpha/beta interferon. *J. Virol.* **74**:1252–1257.
  34. **Kato, H., S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, S. Uematsu, K. Matsui, T. Tsujimura, K. Takeda, T. Fujita, O. Takeuchi, and S. Akira.** 2005. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* **23**:19–28.
  35. **Kato, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, K. Matsui, S. Uematsu, A. Jung, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Yamaguchi, K. Otsu, T. Tsujimura, C. S. Koh, C. Reis e Sousa, Y. Matsuura, T. Fujita, and S. Akira.** 2006. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**:101–105.
  36. **Kawai, T., and S. Akira.** 2006. Innate immune recognition of viral infection. *Nat. Immunol.* **7**:131–137.
  37. **Kawai, T., S. Sato, K. J. Ishii, C. Coban, H. Hemmi, M. Yamamoto, K. Terai, M. Matsuda, J. Inoue, S. Uematsu, O. Takeuchi, and S. Akira.** 2004. Interferon- $\alpha$  induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat. Immunol.* **5**:1061–1068.
  38. **Klagge, I. M., V. ter Meulen, and S. Schneider-Schaulies.** 2000. Measles virus-induced promotion of dendritic cell maturation by soluble mediators does not overcome the immunosuppressive activity of viral glycoproteins on the cell surface. *Eur. J. Immunol.* **30**:2741–2750.
  39. **Krantic, S., C. Gimenez, and C. Rabourdin-Combe.** 1995. Cell-to-cell contact via measles virus haemagglutinin-CD46 interaction triggers CD46 down-regulation. *J. Gen. Virol.* **76**:2793–2800.
  40. **Krug, A., A. R. French, W. Barchet, J. A. Fischer, A. Dzionek, J. T. Pingel, M. M. Orihuela, S. Akira, W. M. Yokoyama, and M. Colonna.** 2004. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* **21**:107–119.
  41. **Kumar, H., T. Kawai, H. Kato, S. Sato, K. Takahashi, C. Coban, M. Yamamoto, S. Uematsu, K. J. Ishii, O. Takeuchi, and S. Akira.** 2006. Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. *J. Exp. Med.* **203**:1795–1803.
  42. **Lapenta, C., S. M. Santini, M. Spada, S. Donati, F. Urbani, D. Accapezzato, D. Franceschini, M. Andreotti, V. Barnaba, and F. Belardelli.** 2006. IFN- $\alpha$ -conditioned dendritic cells are highly efficient in inducing cross-priming CD8(+) T cells against exogenous viral antigens. *Eur. J. Immunol.* **36**:2046–2060.
  43. **Le Bon, A., N. Etchart, C. Rossmann, M. Ashton, S. Hou, D. Gewert, P. Borrow, and D. F. Tough.** 2003. Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat. Immunol.* **4**:1009–1015.
  44. **Le Bon, A., and D. F. Tough.** 2002. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr. Opin. Immunol.* **14**:432–436.
  45. **Leopardi, R., T. Hyypia, and R. Vainionpaa.** 1992. Effect of interferon- $\alpha$  on measles virus replication in human peripheral blood mononuclear cells. *APMIS* **100**:125–131.
  46. **Lin, R., C. Heylbroeck, P. M. Pitha, and J. Hiscott.** 1998. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol. Cell. Biol.* **18**:2986–2996.
  47. **McChesney, M. B., C. J. Miller, P. A. Rota, Y. D. Zhu, L. Antipa, N. W. Lерche, R. Ahmed, and W. J. Bellini.** 1997. Experimental measles. I. Pathogenesis in the normal and the immunized host. *Virology* **233**:74–84.
  48. **McCullough, K. C.** 1983. Characterization of a non-syngyotigenic autonomously replicating variant of measles virus. *J. Gen. Virol.* **64**:749–754.
  49. **Mrkic, B., B. Odermatt, M. A. Klein, M. A. Billeter, J. Pavlovic, and R. Cattaneo.** 2000. Lymphatic dissemination and comparative pathology of recombinant measles viruses in genetically modified mice. *J. Virol.* **74**:1364–1372.
  50. **Murabayashi, N., M. Kurita-Taniguchi, M. Ayata, M. Matsumoto, H. Ogura, and T. Seya.** 2002. Susceptibility of human dendritic cells (DCs) to measles virus (MV) depends on their activation stages in conjunction with the level of CDw150: role of Toll stimulators in DC maturation and MV amplification. *Microbes Infect.* **4**:785–794.
  51. **Naniche, D., T. F. Wild, C. Rabourdin-Combe, and D. Gerlier.** 1993. Measles virus haemagglutinin induces down-regulation of gp57/67, a molecule involved in virus binding. *J. Gen. Virol.* **74**:1073–1079.
  52. **Naniche, D., A. Yeh, D. Eto, M. Manchester, R. M. Friedman, and M. B. Oldstone.** 2000. Evasion of host defenses by measles virus: wild-type measles virus infection interferes with induction of alpha/beta interferon production. *J. Virol.* **74**:7478–7484.
  53. **Nishida, J., H. Yoshikura, T. Okabe, A. Urabe, and F. Takaku.** 1985. Interferons inhibit syncytia-forming ability and in vitro transmission of human T-cell leukemia virus. *Jpn. J. Cancer Res.* **76**:249–252.
  54. **Nozawa, Y., N. Ono, M. Abe, H. Sakuma, and H. Wakasa.** 1994. An immunohistochemical study of Warthin-Finkeldey cells in measles. *Pathol. Int.* **44**:442–447.
  55. **Ohno, S., N. Ono, M. Takeda, K. Takeuchi, and Y. Yanagi.** 2004. Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction. *J. Gen. Virol.* **85**:2991–2999.
  56. **Panne, D., T. Maniatis, and S. C. Harrison.** 2007. An atomic model of the interferon-beta enhancosome. *Cell* **129**:1111–1123.
  57. **Paz, S., Q. Sun, P. Nakhaei, R. Romieu-Mourez, D. Goubau, I. Julkunen, R. Lin, and J. Hiscott.** 2006. Induction of IRF-3 and IRF-7 phosphorylation following activation of the RIG-I pathway. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-Grand)* **52**:17–28.
  58. **Perfettini, J. L., M. Castedo, T. Roumier, K. Andreau, R. Nardacci, M. Piacentini, and G. Kroemer.** 2005. Mechanisms of apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *Cell Death Differ.* **12**(Suppl. 1):916–923.
  59. **Peries, J. R., and C. Chany.** 1960. Hemagglutinating and hemolytic activity of the measles virus. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **251**:820–821. (In French.)
  60. **Pichlmair, A., O. Schulz, C. P. Tan, T. I. Naslund, P. Liljestrom, F. Weber, and C. Reis e Sousa.** 2006. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**:997–1001.
  61. **Plumet, S., and D. Gerlier.** 2005. Optimized SYBR green real-time PCR assay to quantify the absolute copy number of measles virus RNAs using gene specific primers. *J. Virol. Methods* **128**:79–87.
  62. **Plumet, S., F. Herschke, J. M. Bourhis, H. Valentin, S. Longhi, and D. Gerlier.** 2007. Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of measles virus as activator of the RIG I-mediated interferon response. *PLoS ONE* **2**:e279.
  63. **Scheller, C., and C. Jassoy.** 2001. Syncytium formation amplifies apoptotic signals: a new view on apoptosis in HIV infection in vitro. *Virology* **282**:48–55.
  64. **Schulz, O., S. S. Diebold, M. Chen, T. I. Naslund, M. A. Nolte, L. Alexopoulou, Y. T. Azuma, R. A. Flavell, P. Liljestrom, and C. Reis e Sousa.** 2005. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* **433**:887–892.
  65. **Servant, M. J., B. ten Oever, C. LePage, L. Conti, S. Gessani, I. Julkunen, R. Lin, and J. Hiscott.** 2001. Identification of distinct signaling pathways leading to the phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J. Biol. Chem.* **276**:355–363.
  66. **Servet-Delprat, C., P. O. Vidalain, H. Bausinger, S. Manie, F. Le Deist, O.**

- Azocar, D. Hanau, A. Fischer, and C. Rabourdin-Combe. 2000. Measles virus induces abnormal differentiation of CD40 ligand-activated human dendritic cells. *J. Immunol.* **164**:1753–1760.
67. Servet-Delprat, C., P. O. Vidalain, H. Valentin, and C. Rabourdin-Combe. 2003. Measles virus and dendritic cell functions: how specific response co-habits with immunosuppression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **276**:103–123.
68. Severa, M., M. E. Remoli, E. Giacomini, J. Ragimbeau, R. Lande, G. Uze, S. Pellegrini, and E. M. Coccia. 2006. Differential responsiveness to IFN-alpha and IFN-beta of human mature DC through modulation of IFNAR expression. *J. Leukoc. Biol.* **79**:1286–1294.
69. Shaffer, J. A., W. J. Bellini, and P. A. Rota. 2003. The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology* **315**:389–397.
70. Shingai, M., N. Inoue, T. Okuno, M. Okabe, T. Akazawa, Y. Miyamoto, M. Ayata, K. Honda, M. Kurita-Taniguchi, M. Matsumoto, H. Ogura, T. Taniguchi, and T. Seya. 2005. Wild-type measles virus infection in human CD46/CD150-transgenic mice: CD11c-positive dendritic cells establish systemic viral infection. *J. Immunol.* **175**:3252–3261.
71. Spann, K. M., K. C. Tran, and P. L. Collins. 2005. Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and proinflammatory cytokines. *J. Virol.* **79**:5353–5362.
72. Spielhofer, P., T. Bachi, T. Fehr, G. Christiansen, R. Cattaneo, K. Kaelin, M. A. Billeter, and H. Y. Naim. 1998. Chimeric measles viruses with a foreign envelope. *J. Virol.* **72**:2150–2159.
73. Sumpter, R., Jr., Y. M. Loo, E. Foy, K. Li, M. Yoneyama, T. Fujita, S. M. Lemon, and M. Gale, Jr. 2005. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J. Virol.* **79**:2689–2699.
74. Sun, Q., L. Sun, H. H. Liu, X. Chen, R. B. Seth, J. Forman, and Z. J. Chen. 2006. The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity* **24**:633–642.
75. Tailor, P., T. Tamura, and K. Ozato. 2006. IRF family proteins and type I interferon induction in dendritic cells. *Cell Res.* **16**:134–140.
76. Tajima, M., and S. Kudow. 1976. Morphology of the Warthin-Finkeldey giant cells in monkeys with experimentally induced measles. *Acta Pathol. Jpn.* **26**:367–380.
77. Takeda, M., S. Ohno, F. Seki, K. Hashimoto, N. Miyajima, K. Takeuchi, and Y. Yanagi. 2005. Efficient rescue of measles virus from cloned cDNA using SLAM-expressing Chinese hamster ovary cells. *Virus Res.* **108**:161–165.
78. Takeuchi, K., N. Miyajima, N. Nagata, M. Takeda, and M. Tashiro. 2003. Wild-type measles virus induces large syncytium formation in primary human small airway epithelial cells by a SLAM(CD150)-independent mechanism. *Virus Res.* **94**:11–16.
79. Tatsuo, H., N. Ono, K. Tanaka, and Y. Yanagi. 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **406**:893–897.
80. Tomita, Y., and T. Kuwata. 1981. Suppressive effects of interferon on cell fusion by Sendai virus. *J. Gen. Virol.* **55**:289–295.
81. Tomita, Y., and T. Kuwata. 1979. Suppressive effects of interferon on syncytium formation by RD-114 virus in human transformed cells. *J. Gen. Virol.* **43**:111–117.
82. Valentin, H., O. Azocar, B. Horvat, R. Williams, R. Garrone, A. Evlashev, M. L. Toribio, and C. Rabourdin-Combe. 1999. Measles virus infection induces terminal differentiation of human thymic epithelial cells. *J. Virol.* **73**:2212–2221.
83. Vidalain, P. O., O. Azocar, H. Yagita, C. Rabourdin-Combe, and C. Servet-Delprat. 2001. Cytotoxic activity of human dendritic cells is differentially regulated by double-stranded RNA and CD40 ligand. *J. Immunol.* **167**:3765–3772.
84. Vidalain, P. O., D. Laine, Y. Zaffran, O. Azocar, C. Servet-Delprat, T. F. Wild, C. Rabourdin-Combe, and H. Valentin. 2002. Interferons mediate terminal differentiation of human cortical thymic epithelial cells. *J. Virol.* **76**:6415–6424.
85. Volckaert-Vervliet, G., H. Heremans, M. De Ley, and A. Billiau. 1978. Interferon induction and action in human lymphoblastoid cells infected with measles virus. *J. Gen. Virol.* **41**:459–466.
86. Wells, D. E., S. Chatterjee, M. J. Mulligan, and R. W. Compans. 1991. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1-induced cell fusion by recombinant human interferons. *J. Virol.* **65**:6325–6330.
87. Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira, and T. Fujita. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* **5**:730–737.



## **ARTICLE 4**

IFN- $\alpha/\beta$  production induced by measles virus infection of human dendritic cells is virus strain, activation state and donor-dependent

F. Herschke, O. Azocar, **J. Druelle**, D. Waku-Kouomou, T. Duhon, S. Plumet, Claire Naulleau, C. Delprat, F. T. Wild, C. Rabourdin-Combe, D. Gerlier, and H. Valentin

**Manuscrit soumis**

## Contribution

En écho aux expériences que j'ai réalisées, l'équipe de Denis Gerlier, en collaboration avec Chantal Rabourdin-Combe a mis en évidence le rôle des récepteurs viraux et du polymorphisme génétique humain dans l'induction de la réponse IFN suite à l'infection rougeoleuse. Au cours de ces travaux, j'ai réalisé les titrations d'IFN de type I, participé à l'analyse des séquences génétiques et mené des expériences supplémentaires (sur les pDCs par exemple).

## IFN- $\alpha/\beta$ production induced by measles virus infection of human dendritic cells is virus strain, activation state and donor-dependent

F. Herschke<sup>1</sup>, O. Azocar<sup>2</sup>, J. Druelle<sup>3</sup>, D. Waku-Kouomou<sup>3</sup>, T. Duhén<sup>2</sup>, S. Plumet<sup>1</sup>, Claire Naulleau<sup>1</sup>, C. Delprat<sup>2</sup>, F. T. Wild<sup>3</sup>, C. Rabourdin-Combe<sup>2</sup>, D. Gerlier<sup>1†</sup>, and H. Valentin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Interactions virus cellule-hôte; CNRS; Université de Lyon 1; FRE3011, IFR 62 Laennec, 69372 Lyon Cedex 08 – France <sup>2</sup>Interaction virus-système immunitaire; INSERM; U851, IFR128 BioSciences Lyon-Gerland, Université de Lyon 1, UCBL1 (Lyon, F 69003) ; Hospices Civils de Lyon (Lyon, F-69002); 21 Avenue Tony Garnier, 69365 Lyon Cedex 07 – France <sup>3</sup>Immunobiologie des infections virales; INSERM; U758, IFR128 BioSciences Lyon-Gerland ; CNR Rougeole ; Université de Lyon 1; 21 Avenue Tony Garnier, 69365 Lyon Cedex 07 – France

**Corresponding author:** Phone: (+33) 4 78 77 86 18

Fax: (+33) 4 78 77 87 54 E Mail: [denis.gerlier@univ-lyon1.fr](mailto:denis.gerlier@univ-lyon1.fr)

The propagation, syncytia formation and interferon- $\alpha/\beta$  (IFN- $\alpha/\beta$ ) response of wild type (wt), wt-Vero-adapted, and vaccine measles virus (MeV) strains was compared in human epithelial and monocyte-derived conventional dendritic cells (cDC). In epithelial cells, syncytia formation and viral replication governed by cellular receptors correlated with IFN- $\beta$  production. In cDC, the IFN- $\alpha/\beta$  production was very heterogeneous according to the virus strain, the activation state of the DC, and the donor origin of cDC. In contrast, MeV transcription was relatively insensitive to these parameters in cDC. While the presence of defective-interfering particles did not correlate with the IFN- $\alpha/\beta$  response induced by the various MeV strains, mutations found in P/V/C proteins after adaptation to grow into epithelial cells could explain, at least in part, the variability in IFN- $\alpha/\beta$  response. Our results highlight the modulation of the IFN- $\alpha/\beta$  response by multiple parameters, which likely include a human polymorphism of this arm of the innate immunity.

Measles virus (MeV) is an enveloped virus with a single-stranded negative-sense RNA genome. MeV initially spreads to local lymphoid tissue, probably via conventional dendritic cells (cDC) (de Swart et al., 2007, Mrkic et al., 2000, Shingai et al., 2005, Yanagi et al., 2006). To date, MeV entry can be mediated by at least three distinct cellular receptors, which are able to bind to the H protein and allow the fusion of viral and cellular membranes: CD150, expressed on activated immune cells (Tatsuo et al., 2000), a postulated epithelial receptor enabling infection of a subset of polarized epithelial cells from the basolateral site (Andres et al., 2003, de Swart et

al., 2007, Hashimoto et al., 2002, Hsu et al., 1998, Kouomou & Wild, 2002, Takeda et al., 2007, Takeuchi et al., 2003, Yanagi et al., 2006), and the ubiquitously expressed CD46 (Dorig et al., 1993, Nanche et al., 1993). Wild type (wt) isolates and vaccine MeV strains differ in their cellular tropism, according to the cellular receptor usage. Wt isolates use CD150 and the epithelial receptor, but not or maybe very weakly CD46 (Erlenhofer et al., 2002, Johnston et al., 1999, Manchester et al., 2000, Masse et al., 2004, Masse et al., 2002, Santiago et al., 2002, Schneider et al., 2002). In contrast, the vaccine MeV strains indifferently use CD150, the epithelial receptor and



CD46 (Santiago et al., 2002, Schneider et al., 2002, Yanagi et al., 2006). The receptor usage also determines the efficiency of MeV spreading and its fusogenic potential via the fusion protein F *in vitro*. Primary isolates, efficiently growing in cells expressing both CD150 and CD46 receptors, can be adapted to grow into CD46<sup>+</sup>CD150<sup>-</sup> Vero epithelial cells after few blind passages. The virus outcome can gain (Kobune et al., 1990, Rima et al., 1997, Shibahara et al., 1994, Takeda et al., 1998) or not (Kouomou & Wild, 2002, Miyajima et al., 2004, Takeuchi et al., 2000) amino acid mutations in H proteins enabling the use of CD46 as cellular receptor.

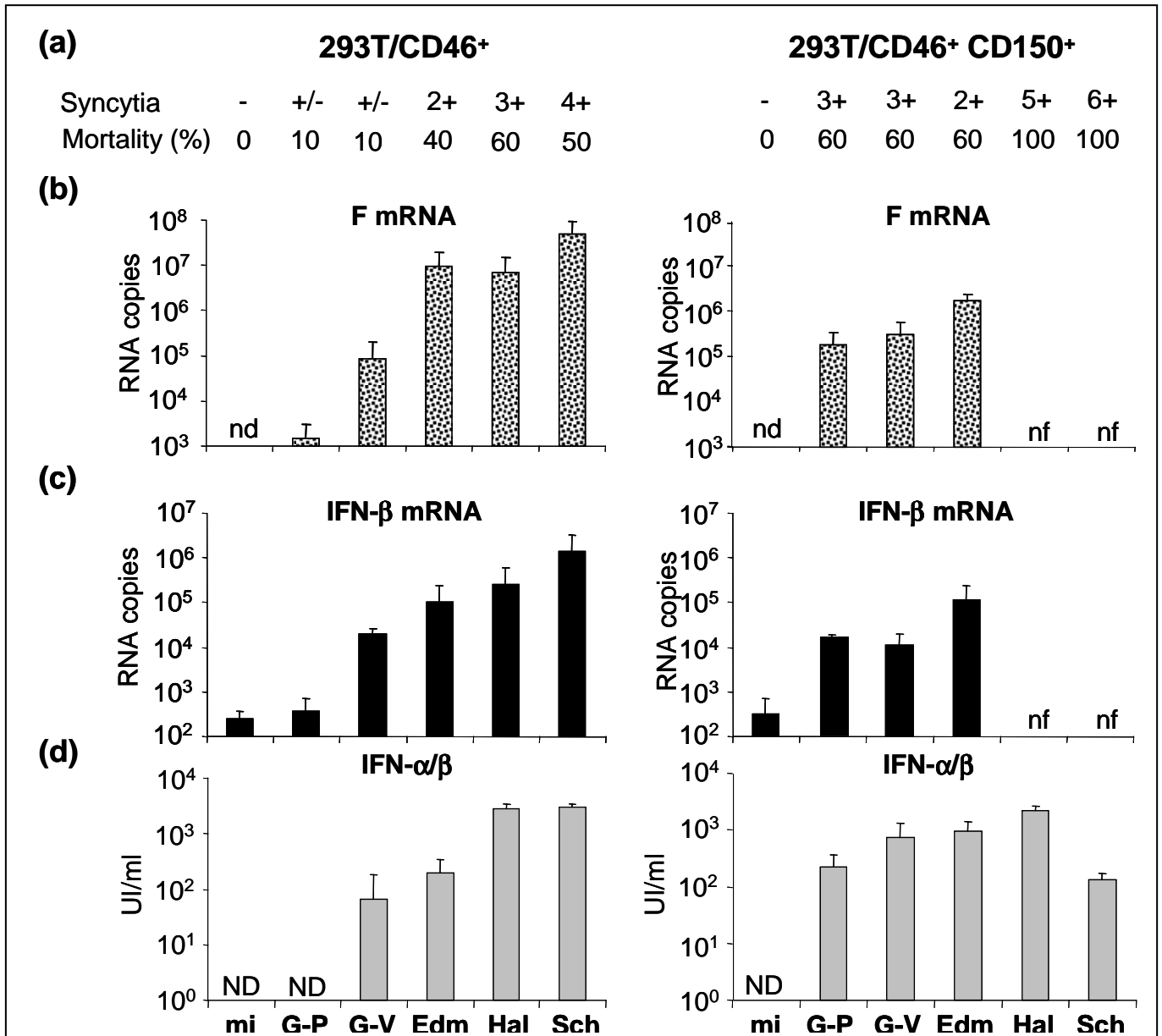
Though MeV induces a profound immunosuppression, both of the innate and the adaptive immune responses are triggered, leading to the viral clearance in 90-95% of the naturally infected humans within two weeks, and to a protective immune response against re-infection (see (Gerlier et al., 2006, Griffin, 2001) for review). Type I interferon (IFN- $\alpha/\beta$ ) is detected in the serum from 7-11 days after vaccination (Petralli et al., 1965), and high production of IFN- $\alpha/\beta$  has been found after *in vitro* laboratory/vaccine MeV strain infection of various human cell types including epithelial, endothelial, and glial cells (Naniche et al., 2000, Vidalain et al., 2002, Volckaert-Vervliet et al., 1978) and mature cDC (mDC) (Herschke et al., 2007). The level of gene activation as determined by measuring IFN- $\beta$  mRNA parallels that of the viral transcription, and results from the detection of 5'-tri-phosphate end of uncapped MeV RNA transcripts by the cytosolic retinoic acid inducible gene I (RIG-I) (Plumet et al., 2007). Defective-interfering (DI) particles content of viral stocks also seems to contribute to the IFN- $\beta$  production (Shingai et al., 2007). The cell-to-cell fusion induced by a laboratory strain amplifies the IFN- $\alpha/\beta$  production via a sustained accumulation of the IFN regulatory factor 3 (IRF-3) in the nucleus of

syncytia (Herschke et al., 2007). *In vitro*, wt MeV isolates can produce 10-80 fold less IFN- $\alpha/\beta$  than vaccine/laboratory strains in peripheral blood lymphocytes (PBL) and cDC (Naniche et al., 2000, Shingai et al., 2007). Converse results were reported in plasmacytoid DC (pDC) using other MeV strains than those used in either PBMC or PBMC depleted from pDC and T lymphocytes or enriched CD3<sup>+</sup> T cells (Druelle et al., 2008).

So far the influence of each of the above parameters on the MeV-induced IFN- $\alpha/\beta$  response was studied separately. Our aim was to better delineate their respective impact, by performing a multifactorial analysis. The IFN- $\alpha/\beta$  response was studied in epithelial cells and cDC infected by arbitrarily chosen MeV strain which can be representative of each type, i.e. wt, Vero-adapted wt, laboratory and vaccine strains. These were the wt G954 MeV propagated on PHA-stimulated PBMC (G-P), its Vero adapted counterpart for 12 passages (G-V) (Kouomou & Wild, 2002), the laboratory Hallé (Hal) and Edmonston ATCC-VR24 (Edm) strains maintained into Vero cells, and the vaccine Schwarz strain (Rouvax ®, Sch) maintained on chicken embryo fibroblasts (Escoffier & Gerlier, 1999).

**Correlation of IFN- $\beta$  response with virus transcription and permissiveness of epithelial cells governed by CD46 and CD150 cellular receptors.** To determine the impact of CD46 and/or CD150 in the virus replication and IFN- $\beta$  production, we used human kidney epithelial 293T/17 cells (ATCC) expressing huCD46 (293T/CD46<sup>+</sup>), or expressing both huCD46 and huCD150 (293T/CD46<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>) (Takeda et al., 2005). Cells were seeded at  $8.5 \times 10^4$  cells.cm<sup>-2</sup> for 24 h, and then infected at MOI 1, as previously described (Herschke et al., 2007).

In 293T/CD46<sup>+</sup> cells, the laboratory Edm and Hal or the vaccine Sch strains replicated very well as demonstrated by the accumulation of the viral F



**Figure 1. Role of MeV cellular receptors in IFN- $\alpha/\beta$  production according to MeV strain in epithelial cells. (a)** Syncytium formation scored as (-) for no syncytium, and (+/-) to (6+) graded by integrating both their number and size, and cell mortality. Accumulation of **(b)** MeV-F, **(c)** IFN- $\beta$  transcripts and **(d)** secreted IFN- $\alpha/\beta$  at 3 d.p.i. after infection. 293T epithelial cells expressing CD46 (293T/CD46<sup>+</sup>CD150<sup>-</sup>, left) or CD46 plus CD150 (293T/CD46<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>, right) were infected with wt (G-P), wt-Vero adapted (G-V), laboratory (Edm, Hal) and Vaccine (Sch) MeV strains at 1 MOI. Data are mean of two to five distinct experiments. mi: mock infected. ND: not detected. n.f.: not feasible because of cell death.

transcript measured by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) (Plumet et al., 2005, Plumet & Gerlier, 2005) and the high level of syncytia formation. They also activated the IFN- $\beta$  gene (Fig. 1a-c, left), and produced large amounts of IFN- $\alpha/\beta$  determined using a bioassay (Herschke et al., 2007, Vidalain et al., 2002). As expected, G-P strain very poorly replicate in 293T/CD46<sup>+</sup> as shown by minimal virus transcription, and lack of syncytium (Fig. 1a,b left). Accordingly, the IFN- $\beta$  gene was minimally activated and there was no IFN- $\alpha/\beta$  production. The infection by the Vero adapted G-V strain resulted in an intermediate phenotype between wt and vaccine MeV strains (Fig. 1a-c, left). Similar results were obtained with human thymic epithelial cells (data not shown).

The expression of CD150 enabled the replication of wt G-P as shown by the high accumulation of viral F mRNA and syncytium formation in 293T/CD46<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup> cells (Fig. 1a, right). Accordingly, the wt G-P isolate induced an IFN- $\beta$  response at both mRNA and protein levels in 293T/CD46<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup> cells (Fig. 1b-d, right). CD150 had a major effect on viral transcription, syncytium formation and the IFN- $\alpha/\beta$  production induced by G-V (Fig. 1a-d, right). Adding CD150 as an alternate cellular receptor for mediating the entry of the Edm, Hal and Sch laboratory/vaccine strains had no major effect on virus transcription and IFN- $\alpha/\beta$  response (Fig. 1 b-d, right and not shown) albeit the formation of syncytia was accelerated and resulted in an early destruction of the cell monolayer (Fig. 1a).

Thus, the ectopic expression of CD150 in epithelial cells favored the transcription of wt MeV strains, the induction of syncytia, and the IFN- $\beta$  response, indicating that both of the CD46 and CD150 MeV receptors can indirectly amplify the IFN- $\beta$  production by allowing a higher virus entry and a higher cell-cell fusion in agreement with previous data (Herschke et al., 2007, Plumet et al., 2007).

**Homogeneity of viral transcription and fusogenic activity in cDC contrasts with heterogeneity IFN- $\alpha/\beta$  activities according to the cDC maturation state and donors.** Because *in vivo* the cDC are likely a major player in both supporting and disseminating the MeV infection and in the elicitation of the immune response, the replication of MeV strains and the induction of IFN- $\alpha/\beta$  production were also analysed in 95% pure iDC and mDC, which were derived from monocyte as detailed elsewhere (Fugier-Vivier et al., 1997, Herschke et al., 2007).

The *in vitro* CD40-induced maturation of iDC into mDC increased the expression of CD150 by ~6-fold, as previously observed (Herschke et al., 2007, Murabayashi et al., 2002), and that of CD46 by ~3-fold (Fig. 2a). This major change in the expression levels of both of these MeV receptors correlated with a higher permissiveness to all MeV strains as revealed by viral transcription and syncytia formation after infection at MOI 0.1 for every MeV strains (Fig. 2b, mean bars). The levels of MeV transcription were found to vary somehow up to 2 logs between the cDC donors. However, they were very similar between MeV strains in both iDC and mDC, except for the difference between the Hal and Sch strains in iDC and for the higher transcription in mDC than in iDC.

In comparison, the ability of MeV strains to induce an IFN- $\alpha/\beta$  response was much more heterogeneous between the strains in both iDC and mDC, but not to the same extent for all virus strains. At 3 d.p.i., the MeV strains ranked G-P>G-V>Edm $\geq$ Hal>Sch in their ability to activate the IFN- $\beta$  transcription in iDC, but ranked differently in mDC with Hal $\geq$ G-V>G-P>Sch>Edm (Fig. 2b, IFN- $\beta$  mRNA, mean bars). As determined by ELISA (Herschke et al., 2007, Vidalain et al., 2002), the IFN- $\beta$  production induced by MeV strains ranked G-P>Edm>Hal=Sch>G-V, and G-P=Hal>G-V>Sch>Edm in iDC and mDC, respectively (Fig. 2b, IFN- $\beta$ , mean bars). The IFN- $\beta$  production and the IFN- $\beta$  transcript

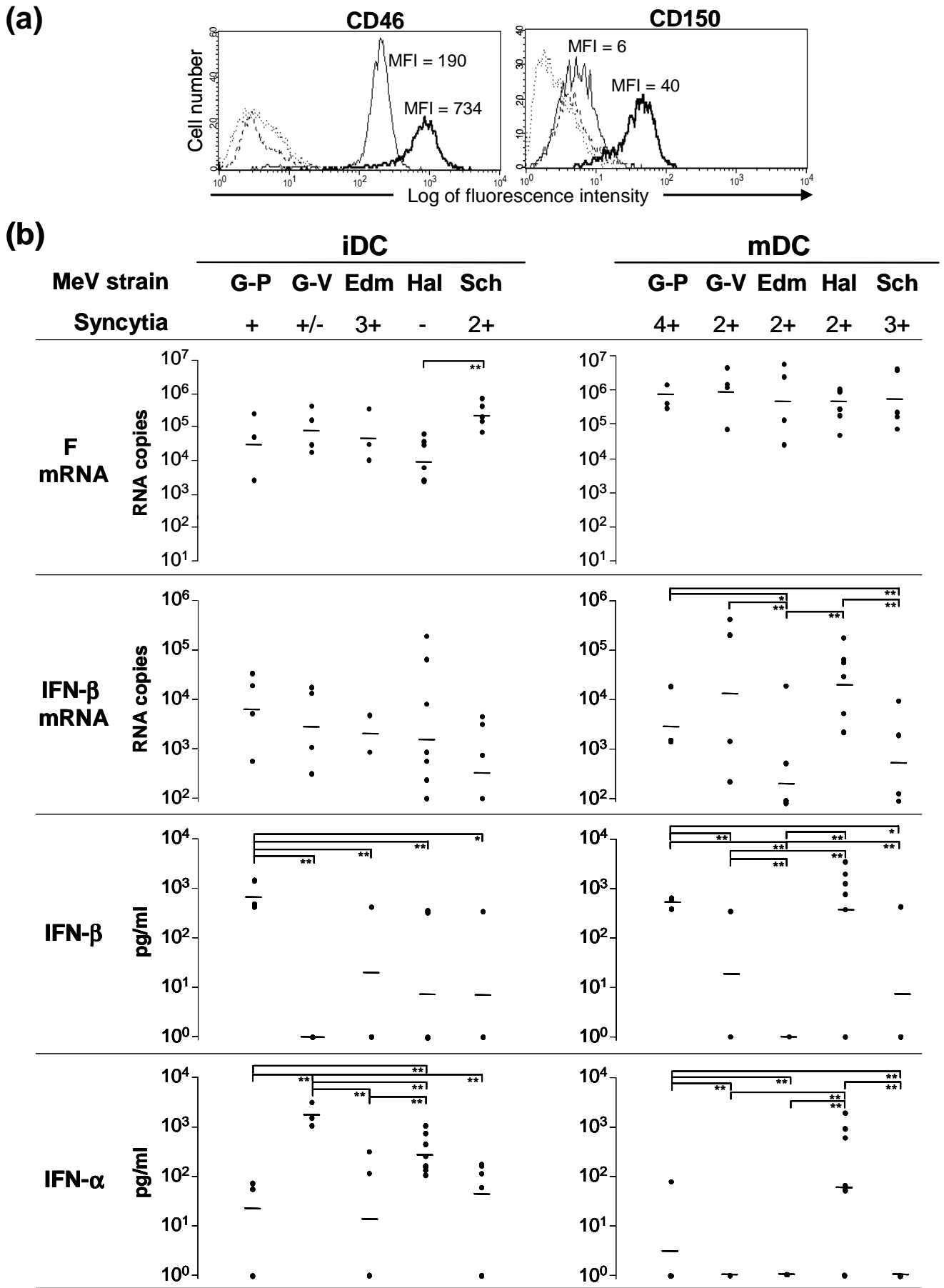


Figure 2

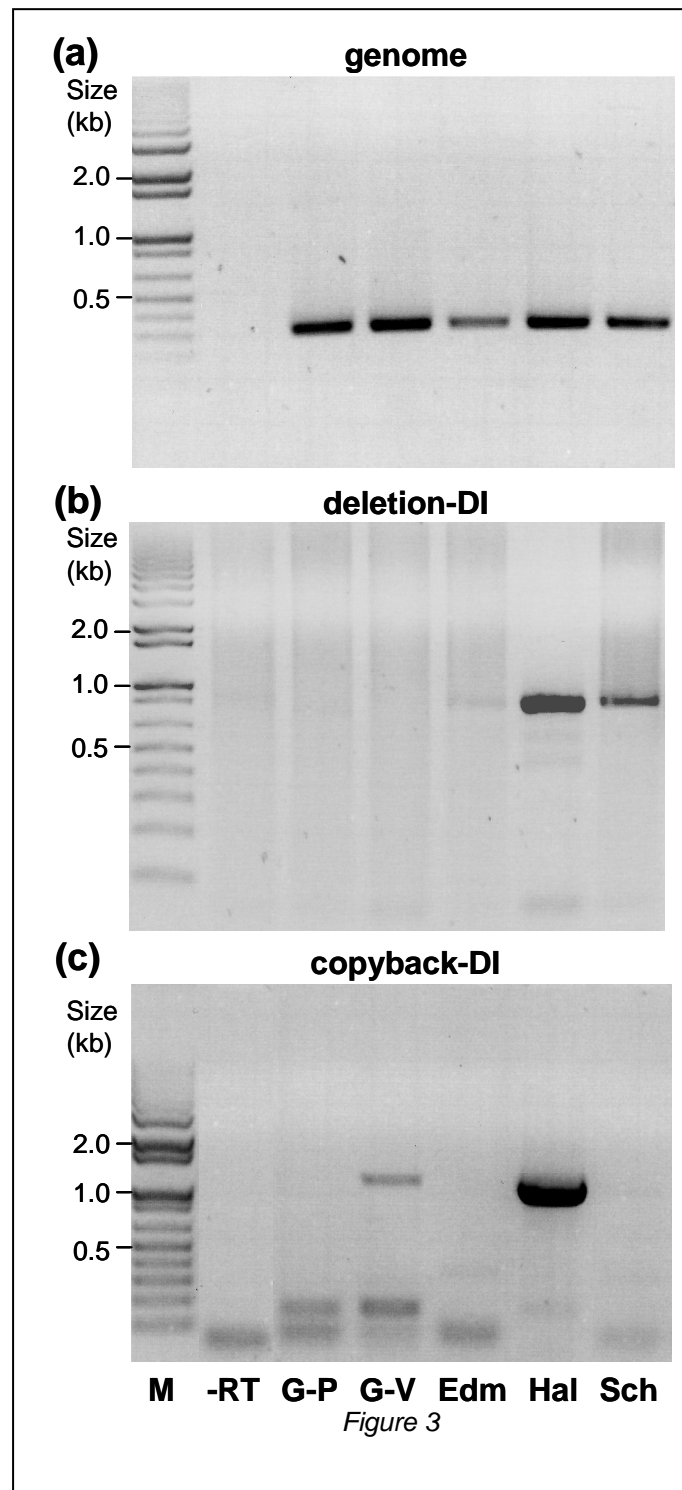
**Figure 2. Cellular receptor expression, syncytia formation, viral transcription, and IFN- $\alpha/\beta$  production in iDC and mDC infected by wt and laboratory/vaccine MeV strains.** (a) CD46 and CD150 expression (plain line) on iDC (thin line) and mDC (bold line) uninfected cultures. The mean of fluorescence intensity (MFI) is indicated for each cell type and isotypic control by dotted line. (a) iDC (left) and mDC (right) were mock treated or infected with wt, partially wt-adapted, or laboratory/vaccine MeV strains at MOI of 0.1. At 3 d.p.i. Accumulation of MeV-F transcripts and secreted IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  in cell-free cDC culture supernatants were measured by RT-qPCR and ELISA, respectively. Dots represent one cDC donor and bars indicated the geometric mean value. Note that the values for mock treated iDC and mDC were below or at the lowest limit shown within each graph. Statistical analysis between groups done using the non parametric Wilcoxon U-test

as observed previously in cDC (Herschke et al., 2007), likely because mRNA and protein accumulations obey to different half-life and/or consumption by surrounding cells (Honda et al., 2006). However, it is remarkable that the statistical differences observed for the IFN- $\beta$  transcript levels between MeV strains are confirmed and enlarged when IFN- $\beta$  protein has been measured as expected since the latter reflects a signal accumulation over a longer incubation time than the former. For IFN- $\alpha$  production determined by ELISA, they ranked differently with G-V>Hal>Sch>G-P=Edm and Hal>G-P>G-V=Edm=Sch in iDC and mDC, respectively (Fig. 2b, IFN- $\alpha$ , mean bars). Most of these divergent IFN- $\alpha/\beta$  responses between the virus strains were statistically significant as detailed in Fig. 2b.

The host cell and MeV cross-talk can be sensitive to DI content of viral stocks (Shingai et al., 2007) and/or to difference in viral protein sequences (see (Gerlier et al., 2006) for review, (Fontana et al., 2008)). Therefore, the DI contents of the virus stocks were firstly determined. From analysis by RT-PCR according to (Shingai et al., 2007) and modified as detailed in the legend of Fig. 3, G-P was found to be devoid of both deletion and copyback DI. G-V, Edm, Hal and Sch strains were contaminated with variable levels of DIs, Hal being the most contaminated and the only strain with both type of DI (Fig. 3). The IFN- $\beta$  response did not directly correlate with the presence and/or the amount of contaminating DI in the virus

stock for both epithelial cells and cDC (compare Fig.3 free G-P MeV strain or by the DI-rich MeV Hal strain produced a similar level of IFN- $\beta$  (Fig. 2b). Secondly, the coding sequence of G-P and G-V strains were verified and found to be those recently published (Druelle et al., 2008), except that the mutations in F and M were inconsistently recovered likely reflecting to quasi species variations in G-P or G-V sub-strains during consecutive passages in PBMC and Vero cells. As a consequence the different ability of G-P and G-V in inducing an IFN- $\alpha/\beta$  response in cDC may be related to the few mutations observed in P, V and C proteins. Indeed, in every case where the sequences of full-length genomes from wt strains and their Vero adapted counterparts available in Genbank could be compared, at least one mutation affects each of the P, V and C proteins focusing to an appropriate combinatorial change in P/V/C protein sequences as a requirement for adaptation to grow in Vero cells as previously suggested (Bankamp et al., 2007, Takeda et al., 1998, Takeuchi et al., 2000). Thus, mutations in P/V/C proteins may explain the heterogeneity of the IFN- $\alpha/\beta$  responses of iDC and mDC.

Altogether, our results indicate that each viral strain generates its own specific pattern of IFN- $\alpha/\beta$  response in cDC, in line with the variability of MeV strains for their sensitivity to IFN- $\alpha/\beta$  (Fontana et al., 2008). Although, we don't know why the IFN- $\alpha/\beta$  responses are homogenous in epithelial cells and



**Figure 3. DI contents of virus stocks by RT-PCR. (a)** Detection of 299 nt genomic fragment using MV-DI-St-s (CGAGAATCTCAAGTCCGG) and MV-DI-St-CB-as (ACCAGACAAAGCTGGGAAT) primers. **(b)** Detection of deletion DI using MV-DI-St-s and MV-lead72-s (AATCTGCTCTTGTCCCTGA) primers. **(c)** Detection of copy-back DI using MV-DI-CB-as (CGAAGATATTCTGGTGTAAAG) and MV-DI-St-CB-as primers. Ø = PCR done with primers alone or RT-PCR done on mock infected cells (both gave negative results, not detailed). Note that the diffused bands lower than ~200 nt are probably artifacts since there is a minimal DI length for stable amplification using a recombinant helper virus artificially optimized for DI amplification in another related *Paramyxovirus* (Salinas & Roux, 2005). The RT-PCR assay was performed according to (Shingai et al., 2007) except for the additional primer combination to detect deletion DI. M: markers.

heterogeneous in cDC, this suggests that the cellular innate immunity programs in cDC and epithelial cells are differently regulated.

Last, but not least, both iDC and mDC from individual donors showed very large variations in the ability to respond to MeV infections, with DC from individual donors exhibiting a different pattern of IFN- $\alpha/\beta$  response to the various MeV strains (Fig. 1b, individual dots, and not shown). This indicates that the MeV-induced IFN response is controlled at least in part by host factors that are variable among individual donors. Of interest, the IFN- $\beta$  production by iDC and mDC infected by wt G-P was the least sensitive to donor variations, contrary to the much more variable response after infection with the vaccine Sch strain. Accordingly, IFN- $\alpha/\beta$  responses after *in vitro* infection of human PBMC and pDC with wt G-P and vaccine Sch strains were also found to be variable between individual donors (J. Druelle, data not shown). This strongly supports that the human population may be very heterogeneous in the ability of their DC and activated lymphoid cells to respond to viral invasion and could contribute to the heterogeneity of humans towards measles disease intensity and/or to measles vaccination response (Dhiman et al., 2007), an observation mimicked experimentally in monkeys (de Swart et al., 2007). The personal history of recent pathogen encountering prior to the blood donation could account for this heterogeneity. Alternatively, this would point out to a polymorphism of the genes that control IFN- $\alpha/\beta$  production. The IFN- $\alpha/\beta$  response has high complexity and is tightly regulated with involvement of a dozen of PRR (Kawai & Akira, 2007), half a dozen of transduction signalling cascades (Kawai & Akira, 2007, O'Neill & Bowie, 2007, Yoneyama & Fujita, 2007), increasing number of regulators (Zhong et al., 2006), and multiple transcription factors, which are themselves submitted to tight regulatory processes (Honda & Taniguchi, 2006, Ozato et al., 2007). Thus,

a polymorphism of the corresponding genes or combination of genes in the human population is not unlikely, as supported by the few polymorphisms already reported (Dideberg et al., 2007, Kozyrev & Alarcon-Riquelme, 2007, Lazarus et al., 2002). Because, any defect in the IFN- $\alpha/\beta$  response can be critical in the control of a virus infection both in experimentally deficient mice (Levy & Garcia-Sastre, 2001) and in humans (Dupuis et al., 2003, Zhang et al., 2007), such a polymorphism could explain, at least partially, variations in the individual susceptibility to MeV (and other viral) infection and, possibly, in the strength of the adaptive immune response to vaccination (Dhiman et al., 2007).

In conclusion, the innate cellular response appears to be very sensitive to variations of multiple parameters, including the MeV strain (wt versus Vero-adapted/vaccine, sequence of P/V/C proteins), the cell type (epithelial cells versus cDC), the maturation state of cDC and likely the polymorphism of the cDC donors.

**ACKNOWLEDGMENTS.** We thank C. Morel and C. Bella (Flow cytometry platform of IFR128) for their technical assistance and D. Laine for discussion. This work benefited from the technical facilities of the CeCIL platform of IFR62. Plasmids, mAbs, recombinant virus and/or cell lines were kindly provided by M. L. Toribio, K. Takeuchi, Y. Yanagi, Schering-Plough (Dardilly, France) and Pasteur-Mérieux Connaught. This work was supported in part by grants from ANR (DG, ANR-MIME), INSERM, INCA-Canceropole 2004-2005 and ARC 3637. F.H., J.D., T.D., and S.P. were supported by a fellowship from MENRT, ARC and DGA, respectively. The authors have no conflicting financial interests.

## REFERENCES

Andres, O., Obojes, K., Kim, K. S., ter Meulen, V. & Schneider-Schaulies, J. (2003). CD46- and CD150-

- independent endothelial cell infection with wild-type measles viruses. *J Gen Virol* **84**, 1189-97.
- Bankamp, B., Hodge, G., McChesney, M. B., Bellini, W. J. & Rota, P. A. (2007). Genetic changes that affect the virulence of measles virus in a rhesus macaque model. *Virology*.
- de Swart, R. L., Ludlow, M., de Witte, L., Yanagi, Y., van Amerongen, G., McQuaid, S., Ksel, S., Geijtenbeek, T. B. H., Duprex, W. P. & Osterhaus, A. D. M. E. (2007). Predominant Infection of CD150<sup>+</sup> Lymphocytes and Dendritic Cells during Measles Virus Infection of Macaques. *PLoS Pathogens* **3**, e178.
- Dhiman, N., Ovsyannikova, I. G., Cunningham, J. M., Vierkant, R. A., Kennedy, R. B., Pankratz, V. S., Poland, G. A. & Jacobson, R. M. (2007). Associations between measles vaccine immunity and single-nucleotide polymorphisms in cytokine and cytokine receptor genes. *J Infect Dis* **195**, 21-9.
- Dideberg, V., Kristjansdottir, G., Milani, L., Libioulle, C., Sigurdsson, S., Louis, E., Wiman, A. C., Vermeire, S., Rutgeerts, P., Belaiche, J., Franchimont, D., Van Gossum, A., Bours, V. & Syvanen, A. C. (2007). An insertion-deletion polymorphism in the interferon regulatory Factor 5 (IRF5) gene confers risk of inflammatory bowel diseases. *Hum Mol Genet* **16**, 3008-16.
- Dorig, R. E., Marciel, A., Chopra, A. & Richardson, C. D. (1993). The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* **75**, 295-305.
- Druelle, J., Sellin, C. I., Waku-Kouomou, D., Horvat, B. & Wild, F. T. (2008). Wild Type Measles Virus Attenuation Independent of type I IFN. *Virology* **5**, 22.
- Dupuis, S., Jouanguy, E., Al-Hajjar, S., Fieschi, C., Al-Mohsen, I. Z., Al-Jumaah, S., Yang, K., Chappier, A., Eidschenk, C., Eid, P., Al Ghonaium, A., Tufenkeji, H., Frayha, H., Al-Gazlan, S., Al-Rayes, H., Schreiber, R. D., Gresser, I. & Casanova, J. L. (2003). Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet* **33**, 388-91.
- Erlenhofer, C., Duprex, W. P., Rima, B. K., ter Meulen, V. & Schneider-Schaulies, J. (2002). Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus. *J Gen Virol* **83**, 1431-6.
- Escoffier, C. & Gerlier, D. (1999). Infection of chicken embryonic fibroblasts by measles virus: adaptation at the virus entry level. *J Virol* **73**, 5220-4.
- Fontana, J. M., Bankamp, B., Bellini, W. J. & Rota, P. A. (2008). Regulation of interferon signaling by the C and V proteins from attenuated and wild-type strains of measles virus. *Virology*.
- Fugier-Vivier, I., Servet-Delprat, C., Rivallier, P., Rissoan, M. C., Liu, Y. J. & Roubardin-Combe, C. (1997). Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J Exp Med* **186**, 813-23.
- Gerlier, D., Valentin, H., Laine, D., Roubardin-Combe, C. & Servet-Delprat, C. (2006). Subversion of the immune system by measles virus: a model for the intricate interplay between a virus and the human immune system. In *Microbial Subversion of Host Immunity*, pp. 225-292. Edited by P. J. Lachman & M. B. A. Oldstone. Norwalk, UK: Caister Academic Press.
- Griffin, D. E. (2001). Measles virus. In *Fields Virology*, pp. 1401-1441. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Hashimoto, K., Ono, N., Tatsuo, H., Minagawa, H., Takeda, M., Takeuchi, K. & Yanagi, Y. (2002). SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. *J Virol* **76**, 6743-9.
- Herschke, F., Plumet, S., Duhon, T., Azocar, O., Druelle, J., Laine, D., Wild, T. F., Roubardin-Combe, C., Gerlier, D. & Valentin, H. (2007). Cell-cell fusion induced by measles virus amplifies the type I interferon response. *J Virol* **81**, 12859-12871.
- Honda, K., Takaoka, A. & Taniguchi, T. (2006). Type I interferon [correction of inteferon] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* **25**, 349-60.
- Honda, K. & Taniguchi, T. (2006). IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* **6**, 644-58.
- Hsu, E. C., Sarangi, F., Iorio, C., Sidhu, M. S., Udem, S. A., Dillehay, D. L., Xu, W., Rota, P. A., Bellini, W. J. & Richardson, C. D. (1998). A single amino acid change in the hemagglutinin protein of measles virus determines its ability to bind CD46 and reveals another receptor on marmoset B cells. *J Virol* **72**, 2905-16.
- Johnston, I. C., ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, J. & Schneider-Schaulies, S. (1999). A recombinant measles vaccine virus expressing wild-type glycoproteins: consequences for viral spread and cell tropism. *J Virol* **73**, 6903-15.
- Kawai, T. & Akira, S. (2007). Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J Biochem (Tokyo)* **141**, 137-45.
- Kobune, F., Sakata, H. & Sugiura, A. (1990). Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus. *J Virol* **64**, 700-5.
- Kouomou, D. W. & Wild, T. F. (2002). Adaptation of wild-type measles virus to tissue culture. *J Virol* **76**, 1505-9.
- Kozlyev, S. V. & Alarcon-Riquelme, M. E. (2007). The genetics and biology of Irf5-mediated signaling in lupus. *Autoimmunity* **40**, 591-601.
- Lazarus, R., Vercelli, D., Palmer, L. J., Klimecki, W. J., Silverman, E. K., Richter, B., Riva, A., Ramoni, M., Martinez, F. D., Weiss, S. T. & Kwiatkowski, D. J. (2002). Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: abundant variation and potential role in complex human disease. *Immunol Rev* **190**, 9-25.
- Levy, D. E. & Garcia-Sastre, A. (2001). The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine Growth Factor Rev* **12**, 143-56.
- Manchester, M., Eto, D. S., Valsamakis, A., Liton, P. B., Fernandez-Munoz, R., Rota, P. A., Bellini, W. J., Forthal, D. N. & Oldstone, M. B. (2000). Clinical isolates of measles virus use CD46 as a cellular receptor. *J Virol* **74**, 3967-74.
- Masse, N., Ainouze, M., Néell, B., Wild, T. F., Buckland, R. & Langedijk, J. P. M. (2004). Measles Virus (MV) Hemagglutinin: Evidence that Attachment Sites for MV Receptors SLAM and CD46 Overlap on the Globular Head. *J. Virol.* **78**, 9051-9063.
- Masse, N., Barrett, T., Muller, C. P., Wild, T. F. & Buckland, R. (2002). Identification of a second major site for CD46 binding in the hemagglutinin protein from a laboratory strain of measles virus (MV): potential consequences for wild-type MV infection. *J Virol* **76**, 13034-8.
- Miyajima, N., Takeda, M., Tashiro, M., Hashimoto, K., Yanagi, Y., Nagata, K. & Takeuchi, K. (2004). Cell tropism of wild-type measles virus is affected by amino acid substitutions in the P, V and M proteins, or by a truncation in the C protein. *J Gen Virol* **85**, 3001-6.
- Mrkic, B., Odermatt, B., Klein, M. A., Billeter, M. A., Pavlovic, J. & Cattaneo, R. (2000). Lymphatic dissemination



- and comparative pathology of recombinant measles viruses in genetically modified mice. *J Virol* **74**, 1364-72.
- Murabayashi, N., Kurita-Taniguchi, M., Ayata, M., Matsumoto, M., Ogura, H. & Seya, T. (2002). Susceptibility of human dendritic cells (DCs) to measles virus (MV) depends on their activation stages in conjunction with the level of CDw150: role of Toll stimulators in DC maturation and MV amplification. *Microbes Infect* **4**, 785-94.
- Naniche, D., Varior-Krishnan, G., Cervoni, F., Wild, T. F., Rossi, B., Roubourdin-Combe, C. & Gerlier, D. (1993). Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* **67**, 6025-32.
- Naniche, D., Yeh, A., Eto, D., Manchester, M., Friedman, R. M. & Oldstone, M. B. (2000). Evasion of host defenses by measles virus: wild-type measles virus infection interferes with induction of Alpha/Beta interferon production. *J Virol* **74**, 7478-84.
- O'Neill, L. A. & Bowie, A. G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **7**, 353-64.
- Ozato, K., Tailor, P. & Kubota, T. (2007). The interferon regulatory factor family in host defense: mechanism of action. *J Biol Chem* **282**, 20065-9.
- Petralli, J. K., Merigan, T. C. & Wilbur, J. R. (1965). Circulating Interferon After Measles Vaccination. *N Engl J Med* **273**, 198-201.
- Plumet, S., Duprex, W. P. & Gerlier, D. (2005). Dynamics of viral RNA synthesis during measles virus infection. *J Virol* **79**, 6900-8.
- Plumet, S. & Gerlier, D. (2005). Optimized SYBR green real-time PCR assay to quantify the absolute copy number of measles virus RNAs using gene specific primers. *J Virol Methods* **128**, 79-87.
- Plumet, S., Herschke, F., Bourhis, J. M., Valentin, H., Longhi, S. & Gerlier, D. (2007). Cytosolic 5'-Triphosphate Ended Viral Leader Transcript of Measles Virus as Activator of the RIG I-Mediated Interferon Response. *PLoS ONE* **2**, e279.
- Rima, B. K., Earle, J. A., Baczko, K., ter Meulen, V., Liebert, U. G., Carstens, C., Carabana, J., Caballero, M., Celma, M. L. & Fernandez-Munoz, R. (1997). Sequence divergence of measles virus haemagglutinin during natural evolution and adaptation to cell culture. *J Gen Virol* **78** (Pt 1), 97-106.
- Salinas, Y. & Roux, L. (2005). Replication and packaging properties of short Paramyxovirus defective RNAs. *Virus Res* **109**, 125-32.
- Santiago, C., Bjorling, E., Stehle, T. & Casasnovas, J. M. (2002). Distinct kinetics for binding of the CD46 and SLAM receptors to overlapping sites in the measles virus hemagglutinin protein. *J Biol Chem* **277**, 32294-301.
- Schneider, U., von Messling, V., Devaux, P. & Cattaneo, R. (2002). Efficiency of measles virus entry and dissemination through different receptors. *J Virol* **76**, 7460-7.
- Shibahara, K., Hotta, H., Katayama, Y. & Homma, M. (1994). Increased binding activity of measles virus to monkey red blood cells after long-term passage in Vero cell cultures. *J Gen Virol* **75** (Pt 12), 3511-6.
- Shingai, M., Ebihara, T., Begum, N. A., Kato, A., Honma, T., Matsumoto, K., Saito, H., Ogura, H., Matsumoto, M. & Seya, T. (2007). Differential Type I IFN-Inducing Abilities of Wild-Type versus Vaccine Strains of Measles Virus. *J Immunol* **179**, 6123-33.
- Shingai, M., Inoue, N., Okuno, T., Okabe, M., Akazawa, T., Miyamoto, Y., Ayata, M., Honda, K., Kurita-Taniguchi, M., Matsumoto, M., Ogura, H., Taniguchi, T. & Seya, T. (2005). Wild-type measles virus infection in human CD46/CD150-transgenic mice: CD11c-positive dendritic cells establish systemic viral infection. *J Immunol* **175**, 3252-61.
- Takeda, M., Kato, A., Kobune, F., Sakata, H., Li, Y., Shioda, T., Sakai, Y., Asakawa, M. & Nagai, Y. (1998). Measles virus attenuation associated with transcriptional impediment and a few amino acid changes in the polymerase and accessory proteins. *J Virol* **72**, 8690-6.
- Takeda, M., Ohno, S., Seki, F., Hashimoto, K., Miyajima, N., Takeuchi, K. & Yanagi, Y. (2005). Efficient rescue of measles virus from cloned cDNA using SLAM-expressing Chinese hamster ovary cells. *Virus Res* **108**, 161-5.
- Takeda, M., Tahara, M., Hashiguchi, T., Sato, T. A., Jinnouchi, F., Ueki, S., Ohno, S. & Yanagi, Y. (2007). A Human Lung Carcinoma Cell Line Supports Efficient Measles Virus Growth and Syncytium Formation via SLAM- and CD46-Independent Mechanism. *J Virol*.
- Takeuchi, K., Miyajima, N., Kobune, F. & Tashiro, M. (2000). Comparative nucleotide sequence analyses of the entire genomes of B95a cell-isolated and vero cell-isolated measles viruses from the same patient. *Virus Genes* **20**, 253-7.
- Takeuchi, K., Miyajima, N., Nagata, N., Takeda, M. & Tashiro, M. (2003). Wild-type measles virus induces large syncytium formation in primary human small airway epithelial cells by a SLAM(CD150)-independent mechanism. *Virus Res* **94**, 11-6.
- Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K. & Yanagi, Y. (2000). SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **406**, 893-7.
- Vidalain, P. O., Laine, D., Zaffran, Y., Azocar, O., Servet-Delprat, C., Wild, T. F., Roubourdin-Combe, C. & Valentin, H. (2002). Interferons mediate terminal differentiation of human cortical thymic epithelial cells. *J Virol* **76**, 6415-24.
- Volckaert-Vervliet, G., Heremans, H., De Ley, M. & Billiau, A. (1978). Interferon induction and action in human lymphoblastoid cells infected with measles virus. *J Gen Virol* **41**, 459-66.
- Yanagi, Y., Takeda, M. & Ohno, S. (2006). Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol* **87**, 2767-79.
- Yoneyama, M. & Fujita, T. (2007). Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity. *J Biol Chem* **282**, 15315-8.
- Zhang, S. Y., Jouanguy, E., Ugolini, S., Smahi, A., Elain, G., Romero, P., Segal, D., Sancho-Shimizu, V., Lorenzo, L., Puel, A., Picard, C., Chappier, A., Plancoulaine, S., Titeux, M., Cognet, C., von Bernuth, H., Ku, C. L., Casrouge, A., Zhang, X. X., Barreiro, L., Leonard, J., Hamilton, C., Lebon, P., Heron, B., Vallee, L., Quintana-Murci, L., Hovnanian, A., Rozenberg, F., Vivier, E., Geissmann, F., Tardieu, M., Abel, L. & Casanova, J. L. (2007). TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* **317**, 1522-7.
- Zhong, B., Tien, P. & Shu, H. B. (2006). Innate immune responses: crosstalk of signaling and regulation of gene transcription. *Virology* **352**, 14-21.

**ARTICLE 5**

Immunopathogenesis of measles virus paradox: parallel induction of virus-specific immune response and FOXP3<sup>+</sup> regulatory cells

Caroline I. Sellin, **Johan Druelle**, Jean-François Jégou, T. Fabian Wild,  
Julien C. Marie, Branka Horvat

Manuscrit soumis

## Contribution

Au sein du laboratoire, une lignée de souris transgénique pour la molécule CD150, un des récepteurs du VR avait été caractérisée par C.Sellin. Afin de mieux appréhender le paradoxe immunitaire induit par ce virus, l'infection de souris SLAM a été suivie sous un angle immunologique. J'ai participé au suivi des souris, l'isolement des organes et l'extraction des ARN viraux et réalisé la mesure des titres de séroneutralisation.

## Immunopathogenesis of measles virus paradox : induction of virus specific immune response and FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells <sup>1</sup>

Caroline I. Sellin<sup>2</sup>, Johan Druelle<sup>2</sup>, Jean-François Jégou<sup>2</sup>, T. Fabian Wild, Julien C. Marie, Branka Horvat<sup>2</sup>

Immunobiology of viral infections; Inserm, U758, Lyon, F-69365 France; Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, F-69007 France; IFR128 BioSciences Lyon-Gerland Lyon-Sud, University of Lyon 1; 21 Avenue Tony

Garnier, 69365 Lyon Cedex 07 – France

Measles is a highly contagious childhood disease associated with an intriguing immunological paradox: although a strong virus-specific immune response results with the virus clearance and the establishment of a life-long immunity, measles infection is followed by an acute and profound immunosuppression leading to an increased susceptibility to secondary infections and high infant mortality. To better understand this phenomenon, we have analyzed the generation of the immune response in infected transgenic mice expressing the human receptor CD150, which are highly susceptible to intranasal infection with wild-type measles virus. Similarly to what has been observed in children with measles, infection of suckling transgenic mice leads to a robust activation of both T and B lymphocytes, generation of virus-specific cytotoxic T cells and antibody responses. Interestingly, Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells are highly enriched following infection, both in the periphery and in the brain, where the virus intensively replicates. Although specific anti-viral responses developed in spite of increased frequency of regulatory T cells, the capacity of T lymphocytes to respond to virus-unrelated antigens was strongly suppressed. These results reveal that measles virus affects regulatory T-cell homeostasis *in vivo* and elucidate the immunological mechanism of the measles paradox as an interplay between virus-specific effector responses and regulatory T cells.

**Keywords :** T cells, viral infection, CD150

Measles is a highly contagious childhood disease resulting in an acute respiratory infection, followed in certain cases by neurological complications. Measles Virus (MV) still infects over 40 million people worldwide every year, causing around 500 000 deaths (1). MV infection induces an effective immune response, leading to viral clearance and a life-long immunity against re-infections (2, 3). In addition, MV infection gives rise to a non-specific activation of the immune system characterized by a spontaneous proliferation of PBMC, and an up-regulation of activation-associated cell-surface

markers and soluble cellular products (4)(5). Along with this immune activation, MV induces a transient but severe immunosuppression, which increases the susceptibility of patients with measles to secondary bacterial and viral infections, leading to high infant morbidity and mortality. Immune abnormalities include the disappearance of the delayed types of hypersensitivity responses (6, 7), an impaired proliferation of peripheral blood lymphocytes (8) as well as allospecific cytotoxicity (9). In experimentally infected monkeys, both activation of the immune

response and immunosuppression have been observed (10). However, the immunological mechanism responsible for this apparent measles paradox remains elusive.

Measles was the first disease recognized to be a cause of virus-induced immunodeficiency for several weeks following the rash (6). During past several decades, multiple mechanisms have been advocated to explain this immunosuppression. Type 2 polarization of cytokine responses occurs during the late stages of measles with an increase in the secretion of interleukin 4 (IL-4) and a decrease of IL-2 and interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (11). The production of the pro-inflammatory cytokine IL-12 is also markedly suppressed in patients with measles (12) and the anti-inflammatory cytokine IL-10 increased (13). Furthermore, the importance of different MV proteins in the induction of immunosuppression has been demonstrated: MV glycoproteins could induce a surface-contact-mediated signaling, leading to the disruption of Akt kinase activation and inhibition of cell proliferation (14). Moreover, the interaction of MV nucleoprotein with Fc $\gamma$  receptor on antigen-presenting cells is implicated in the suppression of cell-mediated responses, (15, 16) and in the induction of the T regulatory immune response, following the chronic exposure (17).

The generation of T cell immunity is subject of regulation by multiple cellular and molecular events. During the past years, the role of Foxp3-expressing CD4<sup>+</sup> T regulatory cells (Tregs) has become more evident, not only in the prevention of autoimmunity, but also in the control of antimicrobial immune responses, especially against pathogens that induce persistent infection (18). However, the influence of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs in response to acute virus infection, particularly in the case of measles, is largely unknown. We have, therefore, analyzed the immunopathogenesis of an acute MV infection in mice transgenic for the human CD150 molecule, a receptor for both vaccine and wild-type MV strains (19). Suckling CD150 transgenic mice are highly susceptible to intranasal MV infection and develop clinical signs of neurological disease shortly after the infection

(20). We show here that following its natural route of infection, wild-type MV induces a strong and broad activation of the immune system, the generation of MV-specific humoral and cellular anti-viral response, accompanied by an increase in the frequency of regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells. Although their suppressive function was not altered *in vitro*, the increased frequency of Tregs observed after infection correlated with the significant suppression of T cell response in the mixed lymphocyte reaction (MLR). These results demonstrate the capacity of an acute MV infection to affect Foxp3<sup>+</sup> Treg homeostasis and shed a new light on the immunological basis of measles paradox, where the strong anti-viral reaction is associated with a profound suppression of responses to unrelated antigens.

## MATERIALS AND METHODS

**Infection of mice.** CD150 transgenic mice in C57BL/6 background (20) and their littermate controls, as well as CD150 transgenic mice crossed into Foxp3-GFP background (21) were bred at the institute's animal facility (PBES) and infected at the age of 1 week. Protocols were approved by the Regional ethical committee (CREEA). Mice were infected intranasally (i.n.) with 10 $\mu$ l of wild type MV G954 (20) (from 500 to 1000 PFU) which gives in 75% of transgenic mice clinical symptoms (ataxia, seizures, weight loss) starting on 8 dpi.

**Cytofluorometric analysis.** Peridinin chlorophyll protein (PerCP)-, FITC, PE and allophycocyanin-conjugated monoclonal antibodies to CD4, CD8 $\alpha$ , CD25, CD62L, CD69, CD44, CD19, GTR and ICOS were purchased from BD Biosciences and eBioscience. Intracellular staining for Foxp3 was performed using APC anti-mouse Foxp3 staining set (eBioscience). Cells were analyzed on a FacsCalibur flow cytometer (Becton Dickinson).

**Determination of MV specific antibodies in serum.** Sera were tested for anti-N specific IgG antibodies by ELISA as previously described (20). To determine the neutralizing antibody titers, serum dilutions were incubated with 200 pfu of MV for 1h at 37°C, and transferred to plates

with a confluent Vero-CD150 cell monolayers. The plates were read after 4 days by methylenblue staining and the dilution of serum reducing 50% of the virus was recorded.

**MV N-specific CTL assay.** Splenocytes from infected or non infected mice ( $10^7$  per well) were cultured in 24-well culture plates (Falcon) with Mitomycin C (Sigma) (40  $\mu\text{g/ml}$ ) treated-P815-N cells (22) ( $10^6$  per well) in RPMI 1640 medium, supplemented as described (20). Viable lymphocytes were harvested 7 days later by density gradient medium using Lympholyte M (Cedarlane laboratories). P815-N and P815 cells were labeled by a 13 min incubation at  $37^\circ\text{C}$  with 7,5  $\mu\text{mol}$  5- (and -6)-Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) per  $2.10^7$  cells and 100  $\mu\text{l}$  of various dilutions of effector cells suspensions were mixed with target cells, P815-N or P815 ( $2.10^4$  cells/100 $\mu\text{l}$ ). After 4h incubation, cells were analyzed on a Facscan flow cytometer (Becton Dickinson). The percentage of dying cells among CFSE<sup>+</sup> cells was determined using 0,4  $\mu\text{g/ml}$  propidium iodide. The specific cytotoxicity was calculated by subtracting the percentage of non-specific lysis obtained with P815 cells from the P815-N percentage of lysis.

**Immunohistochemistry.** Anesthetized mice were perfused with PBS and brains were snap-frozen in cold isopentane. Sections (10  $\mu\text{m}$ ) were fixed in ice-cold acetone, dried and blocked with 1% BSA/PBS. Biotin and avidin binding sites were blocked using Biotin/Avidin Kit (Vector Laboratories), before incubation with either rat anti-mouse CD4, rat anti-mouse CD8 (Serotec) or rat anti-mouse Foxp3 (eBioscience) and an anti-MV N protein mouse monoclonal Cl.120 biotinylated antibody overnight at  $4^\circ\text{C}$ . The specific labelling was revealed by rhodamine-conjugated streptavidin and a FITC-conjugated donkey anti-rat antibody (Jackson Immunoresearch) for 1h at  $37^\circ\text{C}$ . Slides were viewed using a Axiovert 200 M micro scope (Zeiss) and analyzed with the Axiovision software (Zeiss).

**Isolation of lymphocytes from the brain.** Brains were harvested after perfusion with PBS. Lymphocytes were obtained from brain tissue as described previously (23). Briefly, brains were diced, mashed and washed with DMEM and 7 ml of supernatant was mixed with 3ml of 90% Percol (in PBS; Amersham, Pharmacia Biotech) and layered on 1ml of 70% Percol (in DMEM). After a centrifugation at 1300g, 30 min on  $20^\circ\text{C}$ , the interface was transferred to a new tube, washed and used for the immunostaining.

**In vitro suppression assay.** CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells were purified using the isolation kits (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's recommendations. CD4<sup>+</sup> cells were used as APC. Purity of all cell preparations was determined by flow cytometry.

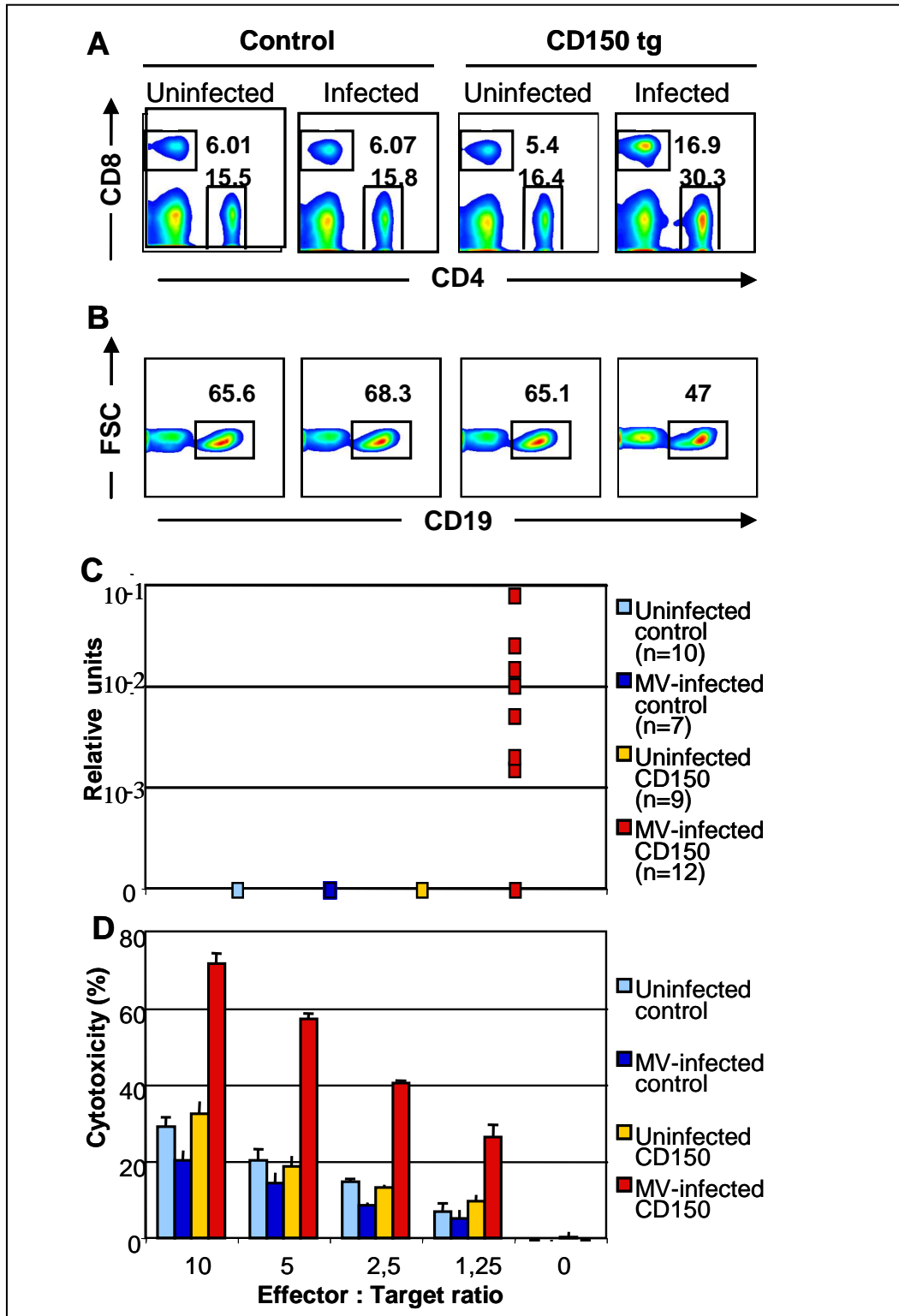
CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells ( $2.10^4$  cells/well) were stimulated for 72h with 1  $\mu\text{g/ml}$  of Con A (Sigma) in the presence of irradiated (1800 rad) CD4<sup>-</sup> cell splenocytes (APCs) ( $10^5$ /well) with indicated numbers of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells and pulsed with 10  $\mu\text{Ci/well}$  of [<sup>3</sup>H]thymidine for the final 12h of culture. Data are shown as the percentage of inhibition of proliferation in triplicate cultures +/-SD.

**Mixed lymphocyte reaction.** Splenocytes harvested from MV-infected transgenic and nontransgenic littermate mice ( $5 \times 10^5$ /well) were stimulated in MLR culture with the same number of irradiated (1800 rad) splenocytes obtained from either Balb/c or C57Bl/6 mice, in complete RPMI medium. Cell proliferation was assessed on day 4 by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation for 18h. Results are expressed as proliferation indices: (cpm of lymphocytes cultured with Balb/c spleen cells)/(cpm of lymphocytes cultured with C57Bl/6 spleen cells).

## RESULTS

### Measles virus infection induces a strong activation of the immune system in CD150 transgenic mice.

We have generated transgenic mice expressing the MV receptor CD150, which are highly sensitive to MV infection (20). In contrast to nontransgenic mice, intranasal inoculation of suckling CD150 transgenic mice with wild-type MV strains induces an acute neurological syndrome, followed with high mortality. Here, we analyzed the immune response in these mice after MV infection. Similarly to the severe lymphopenia observed in children (3, 24), MV infection of suckling CD150 transgenic mice strongly reduces the number of peripheral lymphoid cells: the number of splenocytes 10-14 days after infection (dpi) was regularly lower in infected transgenic mice ( $4,7 \pm 2,1$ ) than in nontransgenic littermates ( $9,2 \pm 3,6$ ). In spite of this reduction in



**Figure 1. MV infection induces a strong activation of the immune response in CD150 transgenic mice.** CD150 transgenic mice and nontransgenic littermates (control) were inoculated intranasally with MV or culture medium (uninfected). Spleens were harvested 13 dpi and splenocytes were analyzed by flow cytometry **A**. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, **B**. CD19<sup>+</sup> B lymphocytes. **C**. Production of anti-MV nucleoprotein (N) antibodies (IgG) was measured in serum by ELISA. Titers are expressed as relative units. **D**. To analyze cellular anti-viral response, splenocytes were harvested and restimulated with target cells expressing MV N gene (P815-N) for one week (3 to 8 pooled mice per group). Cytotoxic activity was measured as described in Methods and results are expressed as the percentage of N-specific cytotoxic activity. The data are from one representative experiment out of three.

Table 1 Measles Virus induced activation of lymphocytes in CD150 transgenic mice

Percentage*		wild type		CD150	
		Uninfected	infected	Uninfected	infected
CD4 <sup>+</sup>	CD69 <sup>+</sup>	2,77±0,44	3,51±0,40	3,37±0,76	8,93±2,39****
	CD62L <sup>+</sup>	86,55±2,57	83,63±1,45	83,60±2,89	71,42±11,42**
	CD44 <sup>high</sup>	9,57±1,37	9,05±0,93	7,27±0,31	8,67±0,88
CD8 <sup>+</sup>	CD69 <sup>+</sup>	2,08±0,46	2,53±0,42	2,90±1,10	10,05±6,87**
	CD62L <sup>+</sup>	76,88±4,15	83,18±2,17	7378±3,84	60,54±8,24***
	CD44 <sup>high</sup>	16,30±1,08	16,27±2,06	15,73±3,09	9,59±5,95
CD19 <sup>+</sup>	CD69 <sup>+</sup>	1,83±0,22	2,11±0,23	2,33±0,92	9,77±5,60***
	CD80 <sup>+</sup>	1,43±0,13	1,46±0,56	1,20±0,15	2,77±0,83

\*Mice were inoculated intra-nasally with either MV (500 to 1000 PFU) or with culture medium (uninfected). Splenocytes were prepared 13 days post-infection, stained with indicated antibodies and analyzed by flow cytometry. Results are expressed as mean percentage of positive cells (CD69<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD44<sup>high</sup> or CD80<sup>+</sup>) in a given cell subset (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> or CD19<sup>+</sup>) +/- SD (4 to 6 mice per group). These results are from one experiment representative out of three. \*\*p<0,1, \*\*\*p<0.05; \*\*\*\*p<0.01, Student T-test, when CD150 infected mice are compared with the three other groups of mice.

number, an important activation of the T cell-compartment of immune system was observed, characterized by a two-fold increase in the percentage of CD4<sup>+</sup> T cells and a three-fold increase in CD8<sup>+</sup> T cells percentage (Fig. 1A). An increase in the percentage of T cells correlated with the higher severity of clinical symptoms (weight loss, ataxia, seizures). In contrast, a moderate but reproducible decrease in the percentage of B cells was observed (-30%) (Fig. 1B).

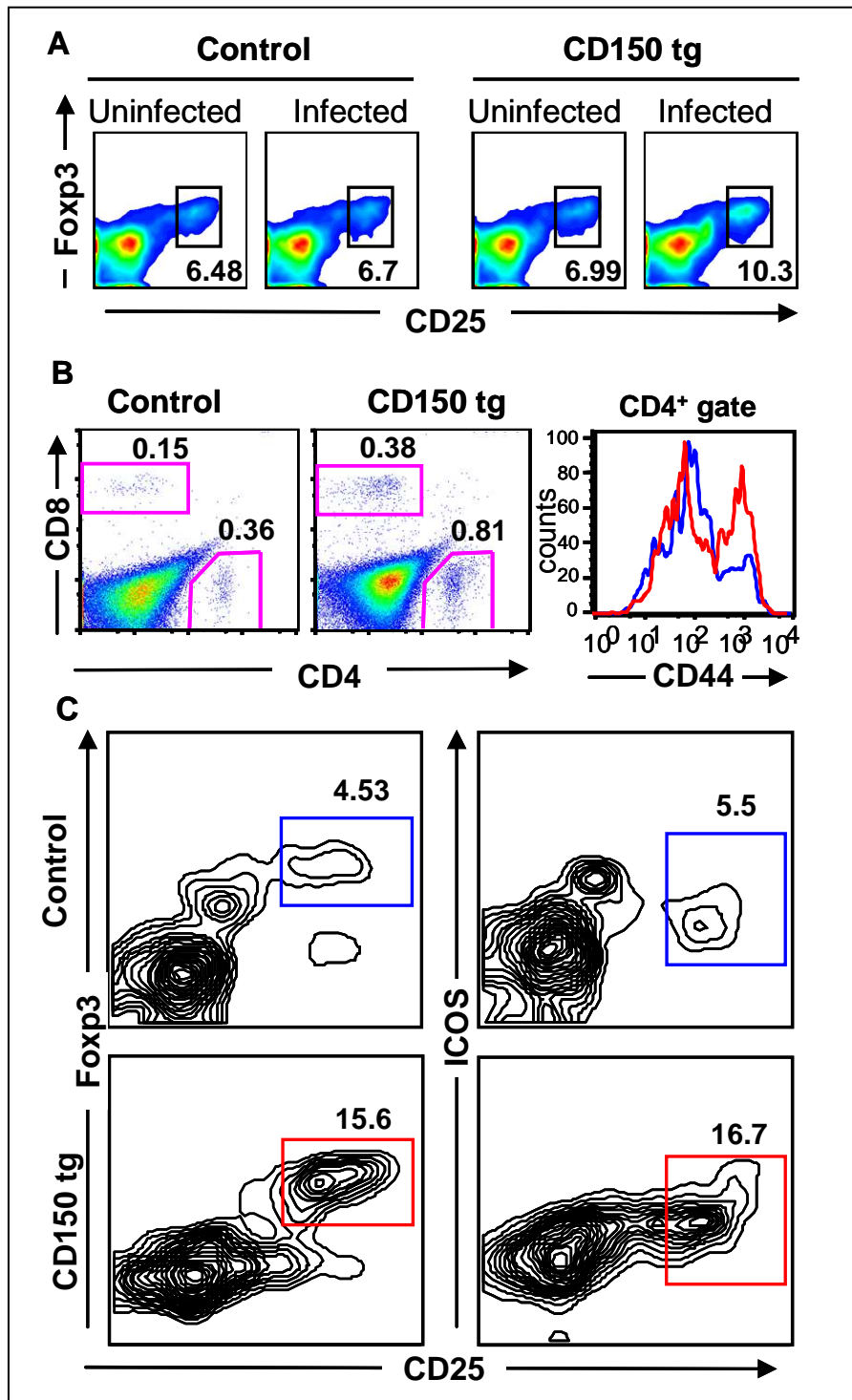
Numerous studies have reported that MV infection in humans strongly activates the immune system, including both T (4, (25) and B lymphocytes (26). We therefore analyzed different activation markers in MV-infected transgenic mice and observed highly activated phenotypes of both T and B lymphocytes. The proportion of CD69<sup>+</sup> cells in CD4<sup>+</sup>T cell subset was three-fold increased in infected CD150 transgenic mice (Table 1). The activation phenotype was even more pronounced in the CD8<sup>+</sup> T cell subset, with a four-fold increase in the expression of activation-associated marker CD69<sup>+</sup> cells, without modulation in the expression of CD44 expression. This was associated with a significant decrease in CD62L expression, cell surface molecule implicated in

lymphocytes homing to peripheral tissue, suggesting the migration of lymphocytes from the spleen. Finally, B cells, even less numerous, were strongly activated in infected CD150 transgenic mice based on CD69 and CD80 expression (Table 1).

#### **MV-infected CD150 transgenic mice develop a specific humoral and cellular response.**

Observation of an important activation phenotype of B and T lymphocytes in MV-infected CD150 transgenic mice prompted us to analyze anti-MV antibody production and cytotoxic activity in these mice. MV intra-nasal infection induced the generation of nucleoprotein (N)-specific IgG antibodies in 60% of infected CD150 transgenic mice 13 dpi (Fig. 1C). If mice were infected with a lower dose of virus (200 pfu) to reduce the mortality observed in this model (20), all mice developed N-specific antibodies by one month post-infection and 5/7 sera had high neutralization titers (data not shown). Furthermore, in agreement with the high increase in expression in CD69 on T lymphocytes, a strong N-specific cytotoxic activity was detected in infected CD150 transgenic





**Figure 2. MV infection increases the proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs.** **A.** Splenocytes from CD150 or nontransgenic mice (control) inoculated i.n. with either MV or culture medium (uninfected), were harvested 13 dpi and stained for CD4 and CD25 followed by anti-Foxp3 intracellular staining and analyzed by flow cytometry. **B, C:** CD150 x Foxp3-GFP transgenic mice and Foxp3-GFP littermates (control) were inoculated i.n. with MV. Brains were harvested 8 dpi and analyzed by flow cytometry as described in Methods. **B.** Proportion of infiltrating CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the brain (two left panels); expression of the CD44 activation marker on CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (right panel, CD150 transgenic in red and nontransgenic control in blue). **C.** Tregs detected by the co-expression of Foxp3 and CD25 or ICOS. Results are representative of 4 different experiments, each involving 4-7 mice per group.

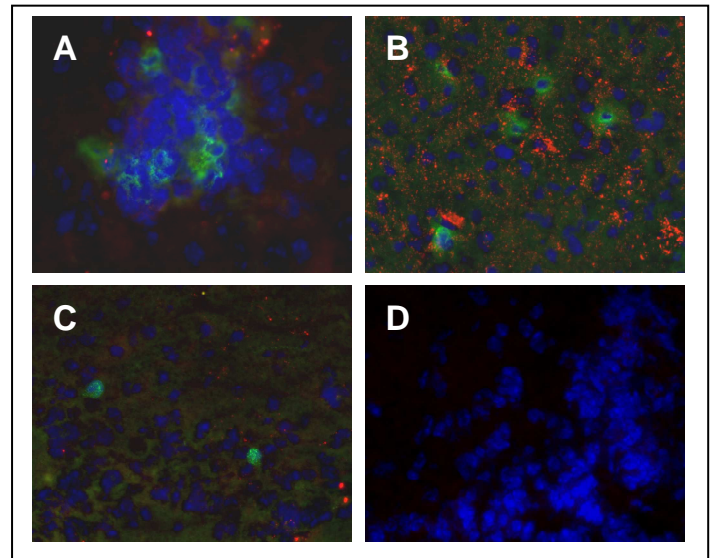
mice 13 dpi, showing that these mice developed a specific cellular anti-measles response (Fig. 1D). Thus, as observed in patients with measles, who developed both neutralizing antibody and cellular immune responses (2, 3), infected CD150 transgenic mice are completely capable of mounting both MV-specific humoral and cellular immune response.

### Enrichment of the Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell population after MV infection.

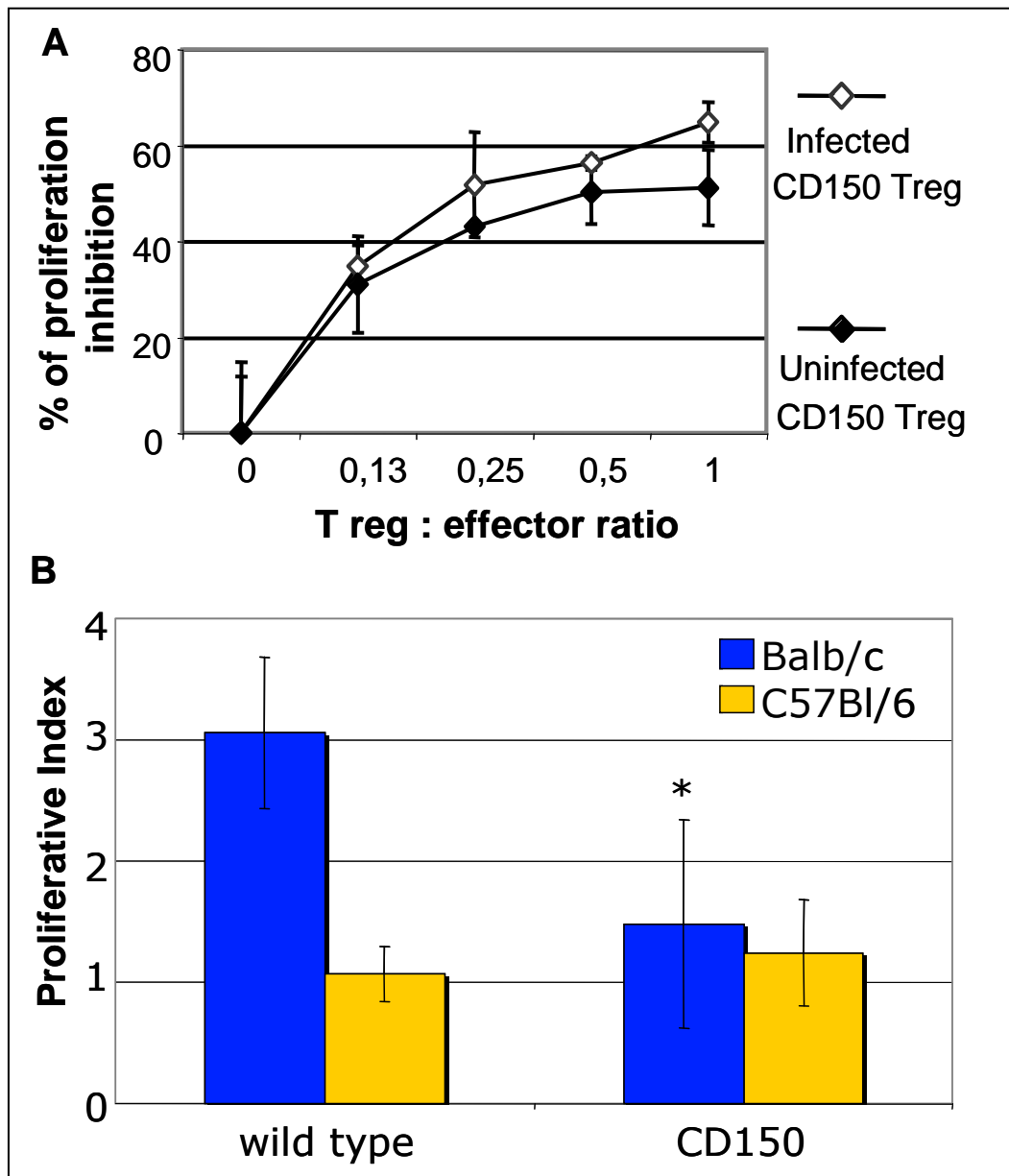
The intensive immune activation observed both in measles patients and infected CD150 transgenic mice may need to be controlled by Treg cells to avoid tissue damage. This cell population have been shown to regulate the outcome of the infection having either beneficial or detrimental role for the host (18). We therefore analyzed the Treg cell population after MV infection. Interestingly, we observed a high increase in the percentage of Treg in the spleen of infected transgenic mice (Fig. 2A). These cells presented a conventional phenotype, based on the expression of CD69, CD62L and GITR (data not shown).

As Tregs were known to be particularly enriched at the site of virus infection (18), we next analyzed the frequency of regulatory T cells (Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup>) in the brains of MV-infected mice, where virus intensively replicates (20). We crossed CD150 transgenic mice into Foxp3-GFP background (21) to facilitate the follow-up of Foxp3<sup>+</sup> Tregs. Although T lymphocytes represented a minority of the harvested cells from the brain, both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes were increased two-fold in infected transgenic brains (Fig. 2B). Infiltrating CD4<sup>+</sup> lymphocytes presented an activated phenotype, expressing a high level of CD44 marker, suggesting their recent migration to the inflamed tissue (Fig. 2B). Moreover, among CD4<sup>+</sup> cells, a high enrichment (3 fold) of CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup> T lymphocytes was observed (Fig. 2C). These CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T lymphocytes expressed ICOS (Fig. 3D) and GITR (data not shown). In addition, immunohistofluorescence experiments were carried out to analyze the localization of regulatory T cells in infected

brain parenchyma. In MV-infected CD150-transgenic mice, both infiltrating CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (Fig. 3A and 3B, respectively) were found in infected brain regions, detected a MV N-specific staining. These regions included mainly olfactory bulbs and nuclei, hypothalamus and, at a lesser extent, midbrain, brainstem and/or periventricular spaces (not shown). Interestingly, Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells were also detected at the site of MV infection (Fig. 3C). However, neither MV infection nor infiltrating lymphocytes were observed in brains from infected wild-type mice (Fig. 3D). Together, these results demonstrate that Tregs accumulate in the brain in the areas of MV infection.



**Figure 3. T lymphocyte infiltration at the sites of MV-brain infection.** Brain sections from suckling CD150-transgenic (A, B, C) and nontransgenic littermate mice (D) infected with MV were analyzed by immunohistofluorescence for N nucleoprotein localization (A, B, C, D, in red) and the presence of CD4<sup>+</sup> (A, in green), CD8<sup>+</sup> (B, in green) and Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells (C and D, in green). Cell nuclei were counterstained with DAPI (blue). Infiltrating T CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes were detected at the site of MV infection in brain from transgenic mice (A, B) but not in their nontransgenic littermates (not shown). Treg cells were found in transgenic mice brain sections (C) while they were undetectable in brain sections from nontransgenic mice, also negative for N-specific staining (D). Original magnification: 40X.



**Figure 4. Characterization of Treg function following MV infection.** **A.** Analysis of suppressor activity of Treg cells isolated from CD150 mice, inoculated with MV (open symbol) or culture medium (full symbol), in cocultures with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells from noninfected CD150 mice, in the presence of irradiated CD4<sup>+</sup> T cell-depleted splenic APCs and Con A (3 to 5 pooled mice per group). Proliferation of Tregs from either control or CD150 infected mice in response to Con A was ~300–600 cpm. The results are shown as mean percentage of proliferation inhibition in triplicate cultures  $\pm$  SD. Results are representative of three different experiments. **B.** Splenocytes isolated from either MV-infected CD150 mice (n=10) or their nontransgenic littermates (control) were stimulated with irradiated either Balb/c or C57Bl/6 splenocytes in MLR in triplicate cultures, as described in Methods. Proliferation is expressed as proliferation index and is representative from two independent experiments (\* P<0,01, Student t-test).

### Characterization of the Treg cell function.

To analyze the suppressor activity of Tregs, purified CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells from infected and non-infected CD150 transgenic mice were co-cultured with CD25<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> effector T cells in the presence of irradiated CD4<sup>+</sup> T cell-depleted antigen-presenting cells (APC) and Concanavalin A (ConA). No significant difference was observed in suppressor activity between MV-infected and non-infected transgenic Treg on effector cells purified from either uninfected (Fig. 4A) or infected (data not shown) CD150 transgenic mice. Thus, MV-infection increases the frequency of functionally efficient FoxP3<sup>+</sup> Tregs *in vivo*.

The hallmark of MV-induced immunosuppression is the strong inhibition of cellular immune responses to unrelated antigens. We therefore analyzed the capacity of T lymphocytes to respond to MV-unrelated antigens. As only suckling mice are susceptible to MV infection (20), limiting thus the specific antigens to be used for a challenge, we tested the capacity of T lymphocytes from MV-infected mice to proliferate in mixed lymphocyte reaction (MLR). This T cell response is a prototype of the immune reaction against virus unrelated antigens, shown to be under the control of regulatory T cells (27). Strikingly, T lymphocytes harvested from MV-infected transgenic mice were highly impaired in their response in MLR, compared with non-transgenic littermates, which are not susceptible to MV-infection (Fig 4B). Thus, MV infection of CD150 transgenic mice induces a severe suppression of immune responses to MV-unrelated antigens and the generation of this immunosuppression correlates with the increase of Tregs following infection.

### DISCUSSION

Similarly to what has been observed in patients with measles, MV infection in CD150 transgenic mice, leads to the generation of immunosuppression. Although MV infection could induce different and nonexclusive mechanisms that may contribute to the generalized immunosuppression, the modulation of Foxp3<sup>+</sup> Treg

homeostasis, showed in this study, may be an essential step. Indeed, an important role of Tregs was demonstrated in different viral infections, where the outcome of an infection has been shown to depend on the balance between T regulatory and effector immune functions (18). An excess number or function of Treg can inhibit the effector immune responses, and thus allow pathogen long-term persistence, up to host destruction, as in chronic hepatitis C virus infection in humans, which sometimes leads to massive liver damage (28). In contrast, in severe forms of an acute human infection with dengue virus the frequency of Treg seems to be insufficient to circumvent effector functions and development of immunopathology (29).

Virus may increase the frequency of host Foxp3<sup>+</sup> Treg cells by different mechanisms, including their expansion, longer survival, conversion, higher recruitment or retention at the site of infection or in the periphery and may involve either direct mechanisms via cell-cell contact or production of inhibitory cytokines such as IL-10 or TGF- $\beta$  (18). Although MV-induced increase of the frequency of Tregs was evident both in the brain and in periphery, the mechanisms still remain to be defined. Several studies have suggested the implication of dendritic cells (DC) in MV-induced immunosuppression: MV-infection causes the loss of the DC capacity to stimulate naïve CD4<sup>+</sup>T cells (30) and the acquisition of an active inhibitory function on CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation in response to allogeneic non-infected DC (30) or mitogens (31) *in vitro* as well as in transgenic model *in vivo* (32). DC play an important role in the induction of Treg (18) and may be involved in the modulation of Treg homeostasis, observed in this study. Increased secretion of IL-10, observed in patients (13), as well as in mice treated with MV nucleoprotein (17), may also be implicated in the induction of Tregs during MV infection.

It is likely that measles-induced immunosuppression is not beneficial for the virus, as

it does not prevent the generation of anti-viral immunity and virus clearance in majority of patients. We postulate that immunosuppression is generated as a consequence of the induction of the Treg system in host, in order to limit collateral tissue damage potentially provoked by a virus-induced vigorous activation of immune responses. This regulatory mechanism can not suppress already developed anti-viral reaction, as demonstrated clearly in measles (9), and therefore allows the generation of anti-measles immune response. However, it may prevent the initiation of new immune responses and consecutively, increase the susceptibility to opportunistic infections in patients. Altogether, these results help in better understanding of the immunological paradox known for a long time to be associated with MV infection.

Measles could be occasionally followed by the development of different forms of encephalitis, fatal in the majority of cases (2). The reasons why an individual preferentially develops persistent MV brain infection after an acute infection, in spite of anti-viral immune response, are currently unknown. It has been suggested that a transient phase of immune suppression preceding MV infection may allow later development of neurological complications, like subacute sclerosing panencephalitis (33). This transient immunosuppression may be as well achieved by MV-induced Tregs, following an acute infection, which if excessive, may favor a development of neuropathology. It is thus tempting to speculate that persistence of MV in the brain of some patients may be a price to limit brain immunopathology, induced by the immunomodulatory activity of Tregs recruited in the infected brain parenchyma.

Measles-induced enhancement of Treg frequency needs further confirmation in infected patients. Indeed, some previous studies have shown an increase in CD25<sup>+</sup> cells in measles (4). The utilization of new markers for this population, including Foxp3, will certainly help to elucidate molecular and cellular mechanisms of MV-induced induction of Tregs in humans and further studies should reveal the exact mode of action of these regulatory cells. Efficient manipulation of this cell

population may be of critical importance in the prevention and treatment of measles-induced immunosuppression.

#### **ACKNOWLEDGEMENT**

We are grateful to Prof. Alexander Y. Rudensky for the gift of Foxp3-GFP mice. This work benefited from technical facilities of the flow cytometry platform and PBES of IFR128. The work was supported by institutional grant from INSERM and Fondation pour la Recherche Medicale (FRM). CIS, JD and JFJ were supported respectively by FRM, MRT and ARSEP respectively.

#### **DISCLOSURES**

The authors have no financial conflict of interest.

## REFERENCES

1. WHO. 2006 Weekly Epidemiological report. World Health Organization. N°10, 10 march 2006, 2081, 2089-2096.
2. Griffin, D. E. 1995. Immune responses during measles virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 191:117-134.
3. Griffin, D. E., B. J. Ward, and L. M. Esolen. 1994. Pathogenesis of measles virus infection: an hypothesis for altered immune responses. *J Infect Dis* 170 Suppl 1:S24-31.
4. Griffin, D. E., T. R. Moench, R. T. Johnson, I. Lindo de Soriano, and A. Vaisberg. 1986. Peripheral blood mononuclear cells during natural measles virus infection: cell surface phenotypes and evidence for activation. *Clin Immunol Immunopathol* 40:305-312.
5. Griffin, D. E., B. J. Ward, E. Jauregui, R. T. Johnson, and A. Vaisberg. 1989. Immune activation in measles. *N Engl J Med* 320:1667-1672.
6. Von Pirquet, C. 1908. Das Verhalten der kutanen tuberculinreaktion während der mäsern. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 30:1297-1300.
7. Tamashiro, V. G., H. H. Perez, and D. E. Griffin. 1987. Prospective study of the magnitude and duration of changes in tuberculin reactivity during uncomplicated and complicated measles. *Pediatr Infect Dis J* 6:451-454.
8. Hirsch, R. L., D. E. Griffin, R. T. Johnson, S. J. Cooper, I. Lindo de Soriano, S. Roedenbeck, and A. Vaisberg. 1984. Cellular immune responses during complicated and uncomplicated measles virus infections of man. *Clin Immunol Immunopathol* 31:1-12.
9. Galama, J. M., J. Ubels-Postma, A. Vos, and C. J. Lucas. 1980. Measles virus inhibits acquisition of lymphocyte functions but not established effector functions. *Cell Immunol* 50:405-415.
10. Sato, H., F. Kobune, Y. Ami, M. Yoneda, and C. Kai. 2008. Immune responses against measles virus in cynomolgus monkeys. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 31:25-35.
11. Griffin, D. E., and B. J. Ward. 1993. Differential CD4 T cell activation in measles. *J Infect Dis* 168:275-281.
12. Atabani, S. F., A. A. Byrnes, A. Jaye, I. M. Kidd, A. F. Magnusen, H. Whittle, and C. L. Karp. 2001. Natural measles causes prolonged suppression of interleukin-12 production. *J Infect Dis* 184:1-9.
13. Moss, W. J., J. J. Ryon, M. Monze, and D. E. Griffin. 2002. Differential regulation of interleukin (IL)-4, IL-5, and IL-10 during measles in Zambian children. *J Infect Dis* 186:879-887.
14. Avota, E., A. Avots, S. Niewiesk, L. P. Kane, U. Bommhardt, V. ter Meulen, and S. Schneider-Schaulies. 2001. Disruption of Akt kinase activation is important for immunosuppression induced by measles virus. *Nat Med* 7:725-731.
15. Marie, J. C., J. Kehren, M. C. Trescol-Biemont, A. Evlashev, H. Valentin, T. Walzer, R. Tedone, B. Loveland, J. F. Nicolas, C. Roubardin-Combe, and B. Horvat. 2001. Mechanism of measles virus-induced suppression of inflammatory immune responses. *Immunity* 14:69-79.
16. Marie, J. C., F. Saltel, J. M. Escola, P. Jurdic, T. F. Wild, and B. Horvat. 2004. Cell surface delivery of the measles virus nucleoprotein: a viral strategy to induce immunosuppression. *J Virol* 78:11952-11961.
17. Ait-Oufella, H., B. Horvat, Y. Kerdiles, O. Herbin, P. Gourdy, J. Khallou-Laschet, R. Merval, B. Esposito, A. Tedgui, and Z. Mallat. 2007. Measles virus nucleoprotein induces a regulatory immune response and reduces atherosclerosis in mice. *Circulation* 116:1707-1713.
18. Belkaid, Y. 2007. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 7:875-888.
19. Tatsuo, H., N. Ono, K. Tanaka, and Y. Yanagi. 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406:893-897.
20. Sellin, C. I., N. Davoust, V. Guillaume, D. Baas, M. F. Belin, R. Buckland, T. F. Wild, and B. Horvat. 2006. High pathogenicity of wild-type measles virus infection in CD150 (SLAM) transgenic mice. *J Virol* 80:6420-6429.
21. Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, L. M. Williams, J. L. Dooley, A. G. Farr, and A. Y. Rudensky. 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22:329-341.
22. Beauverger, P., R. Buckland, and F. Wild. 1993. Establishment and characterisation of murine cells constitutively expressing the fusion, nucleoprotein and matrix proteins of measles virus. *J Virol Methods* 44:199-210.
23. Patterson, C. E., J. K. Daley, L. A. Echols, T. E. Lane, and G. F. Rall. 2003. Measles virus infection induces chemokine synthesis by neurons. *J Immunol* 171:3102-3109.
24. Okada, H., F. Kobune, T. A. Sato, T. Kohama, Y. Takeuchi, T. Abe, N. Takayama, T. Tsuchiya, and M. Tashiro. 2000. Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. *Arch Virol* 145:905-920.
25. Arneborn, P., and G. Biberfeld. 1983. T-lymphocyte subpopulations in relation to immunosuppression in measles and varicella. *Infect Immun* 39:29-37.
26. Arneborn, P., G. Biberfeld, M. Forsgren, and L. V. von Stedingk. 1983. Specific and non-specific B cell activation in measles and varicella. *Clin Exp Immunol* 51:165-172.
27. Godfrey, W. R., Y. G. Ge, D. J. Spoden, B. L. Levine, C. H. June, B. R. Blazar, and S. B. Porter. 2004. In vitro-expanded human CD4(+)CD25(+) T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures. *Blood* 104:453-461.
28. Cabrera, R., Z. Tu, Y. Xu, R. J. Firpi, H. R. Rosen, C. Liu, and D. R. Nelson. 2004. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+)

regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 40:1062-1071.

29. Luhn, K., C. P. Simmons, E. Moran, N. T. Dung, T. N. Chau, N. T. Quyen, T. T. Thao le, T. Van Ngoc, N. M. Dung, B. Wills, J. Farrar, A. J. McMichael, T. Dong, and S. Rowland-Jones. 2007. Increased frequencies of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in acute dengue infection. *J Exp Med* 204:979-985.

30. Grosjean, I., C. Caux, C. Bella, I. Berger, F. Wild, J. Banchereau, and D. Kaiserlian. 1997. Measles virus infects human dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 186:801-812.

31. Schnorr, J. J., S. Xanthakos, P. Keikavoussi, E. Kampgen, V. ter Meulen, and S. Schneider-Schaulies. 1997. Induction of maturation of human blood dendritic cell precursors by measles virus is associated with immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5326-5331.

32. Hahm, B., N. Arbour, and M. B. Oldstone. 2004. Measles virus interacts with human SLAM receptor on dendritic cells to cause immunosuppression. *Virology* 323:292-302.

33. Oldstone, M. B., S. Dales, A. Tishon, H. Lewicki, and L. Martin. 2005. A role for dual viral hits in causation of subacute sclerosing panencephalitis. *J Exp Med* 202:1185-1190.

## FOOTNOTES

<sup>1</sup> This work was supported by institutional grant from INSERM by FRM.

<sup>2</sup> CIS, JD and JFJ were respectively supported by Fondation pour la Recherche Medicale (FRM), MRT and ARSEP.

<sup>3</sup> Address correspondence and reprint requests to B. Horvat, INSERM U758, 21 Ave. Tony Garnier, 69365 Lyon, France. Phone: 33 4 37 28 23 92; Fax: 33 4 37 28 23 91; E-mail: [branka.horvat@inserm.fr](mailto:branka.horvat@inserm.fr)

<sup>4</sup> Abbreviations used in this paper: dpi, days post-infection; i.n., intra-nasal; MV, Measles Virus; Treg, regulatory T cell.

## **ARTICLE 6**

Immunosuppression caused by measles virus: role of viral proteins.

Kerdiles YM, Sellin CI, **Druelle J**, Horvat B.

[Rev Med Virol](#). 2006 Jan-Feb;16(1):49-63





## REVIEW



# Immunosuppression caused by measles virus: role of viral proteins

Yann M. Kerdiles, Caroline I. Sellin, Johan Druelle and Branka Horvat\*  
INSERM U404, IFR 128, Biosciences Lyon-Gerland, 21 Ave. Tony Garnier, 69365 Lyon, France

## SUMMARY

Measles virus (MV) causes transient but profound immunosuppression resulting in increased susceptibility to secondary bacterial and viral infections. Due to the development of these opportunistic infections, measles remains the leading vaccine-preventable cause of child death worldwide. Different immune abnormalities have been associated with measles, including disappearance of delayed-type hypersensitivity reactions, impaired lymphocyte and antigen-presenting cell functions, down-regulation of pro-inflammatory interleukin 12 production and altered interferon  $\alpha/\beta$  signalling pathways. Several MV proteins have been suggested to hinder immune functions: hemagglutinin, fusion protein, nucleoprotein and the non-structural V and C proteins. This review will focus on the novel functions attributed to MV proteins in the immunosuppression associated with measles. Here, we highlight new advances in the field, emphasising the interaction between MV proteins and their cellular targets, in particular the cell membrane receptors, CD46, CD150, TLR2 and Fc $\gamma$ RII in the induction of immunological abnormalities associated with measles. Copyright © 2005 John Wiley & Sons, Ltd.

Received: 11 July 2005; Revised: 1 September 2005; Accepted: 5 September 2005

## INTRODUCTION

Viruses have co-evolved with higher organisms in a constant interaction, leading to the development of different strategies to interfere with immune defence mechanisms. Induction of immunosuppression is an example of this interference and measles virus presents one of the main paradigms of transient virus-induced suppression of the immune response.

Measles virus (MV) is among the most contagious pathogens for humans, still infecting over 40 million people and causing the death of close

to 1 million persons each year mainly in the developing world [1,2]. MV is responsible for an acute childhood disease, which is among the primary causes of infant death in developing countries. Moreover, sporadic outbreaks of acute measles still occur in industrialised countries despite vaccination. Symptoms induced by MV range from respiratory infection, fever and rash, to less common infections of the nervous system, including acute encephalitis and SSPE. Patients with measles develop immunosuppression, which increases their susceptibility to secondary infections and is largely responsible for the high incidence of MV-induced mortality [3,4]. This immunosuppression can last up to 6 months after acute measles and presents an interesting and unique case of inducing a prolonged depression of the immune response in the absence of detectable virus.

During the incubation period, the virus replicates in the respiratory tract and then reaches local lymphoid tissue. Amplification of the virus in lymph nodes produces a primary viremia that results in the spread of virus to multiple lymphoid tissues and other organs, including the skin, kidney, gastrointestinal tract and liver, where it replicates in epithelial cells, endothelial cells and monocytes/macrophages [5]. Most of the infected

\*Corresponding author: Branka Horvat, INSERM U404, 21 Ave. Tony Garnier, 69365 Lyon, France.  
E-mail: horvat@cervi-lyon.inserm.fr

### Abbreviations used

CDKs, cyclin dependent kinases; CDV, canine distemper virus; CFSE, carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester; CYT, cytoplasmic tail; DC, dendritic cells; F, fusion; Hsp, heat shock protein; H, hemagglutinin; IFN, interferon; IL, interleukin; ITAM, Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif; ITIM, Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif; ITSM, immunoreceptor tyrosine-based switch motif; LT, T lymphocyte; MV, measles virus; N, nucleoprotein; NO, nitric oxide; PBL, peripheral blood lymphocytes; SCR, short consensus repeats; SLAM, signalling lymphocyte-activation molecule; STP, serine, threonine and proline-rich region; TIR, Toll/IL-1R; TLR, Toll-like receptor; TRAIL, tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; Tr1, T regulatory cells type 1; VSV, vesicular stomatitis virus.

cells in peripheral blood are monocytes [6], although T and B lymphocytes [7,8], as well as dendritic cells [9–11], support viral replication after activation *in vitro*.

### Measles virus structure

MV belongs to the *Morbillivirus* genus of the *Paramyxoviridae* family. It is a negative stranded, non-segmented RNA, enveloped virus, encoding six structural (Figure 1) and three non-structural proteins. The virus envelope consists of a lipid bilayer, derived from the cellular plasma membrane, with two inserted virus-encoded glycoproteins: hemagglutinin (H) protein and fusion (F) protein. The H protein is a type 2 glycoprotein (Mr 80 000), a disulphide-linked tetramer that mediates virus attachment to susceptible cells, and is responsible together with the F protein for fusion with the cell membrane [12]. The F is a type I glycoprotein, synthesised as a precursor protein (F<sub>0</sub>) activated after proteolytic cleavage by furin in the trans-Golgi compartment into a disulphide-bonded heterodimer, allowing the formation of the two subunits, F<sub>1</sub> (Mr 40 000) and F<sub>2</sub> (Mr 20 000) [13]. The matrix protein (M, Mr 37 000) supplies an interface between the envelope and virion core and is thought to interact with the cytoplasmic tails of envelope glyco-

proteins [14]. Virion RNA is packaged into a helical ribonucleoprotein or nucleocapsid by the nucleoprotein (N, Mr 60 000). The association between RNA and N is very stable and the function of N protein appears to be the packaging and protection of the viral genomic nucleic acid and participation in the formation of a replication complex. The second component of the replication complex is a virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, which consists of two subunits: the phosphoprotein (P, Mr 70 000) and the large protein (L, Mr 250 000) [15]. L is the catalytic component of the viral polymerase. The P protein is activated by phosphorylation and binds L, N and RNA to form the replicase complex [16]. The P gene of MV, like many members of the *Paramyxoviridae*, encodes, in addition to P, three other accessory non-structural proteins: C (Mr 21 000), V (Mr 46 000) and R (Mr 40 000), from overlapping open reading frames. The MV C protein is 186 aa in size and is encoded by an open reading frame that begins 22 nucleotides downstream of the P gene start codon. MV V protein is expressed from an edited mRNA. Its highly conserved 68 carboxyl terminal amino acids are translated from a different open reading frame accessed by the co-transcriptional insertion of a pseudo-templated G residue. MV R protein is a

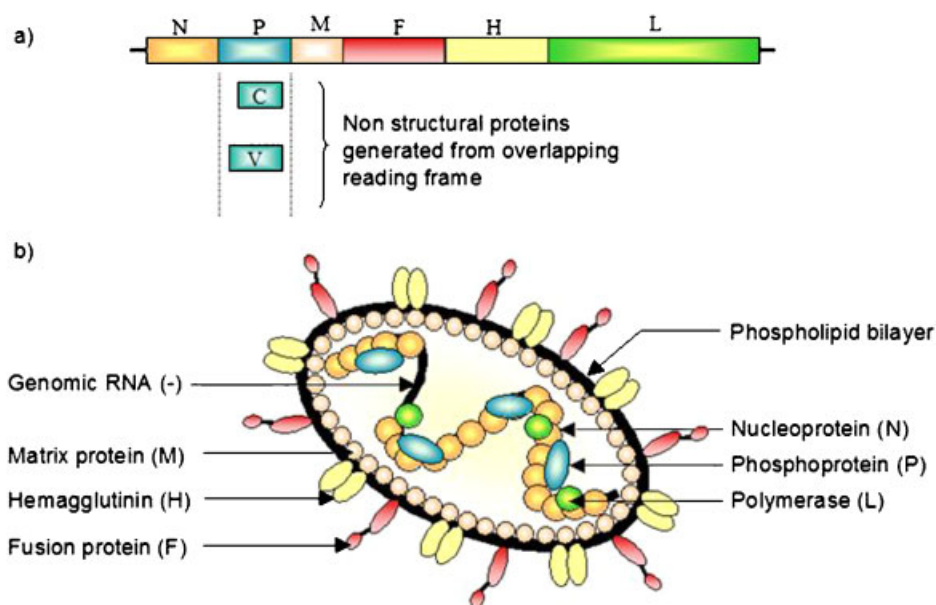


Figure 1. Schematic representation of measles virus genome with the position of two non-structural proteins, V and C (a) and the structure of measles virus particle (b)

truncated form of P that is produced by ribosomal frameshifting [17,18].

### Measles virus-induced immunopathology

It has been known for nearly a century that MV impairs the tuberculin skin test response of immune individuals for several weeks following the rash [19]. This transient MV-induced immunosuppression is of important clinical consideration, as it permits opportunistic infections to develop in infected children, leading to high infant morbidity and mortality. The immune abnormalities that are most evident in the cellular arm of the immune response include the ablation of delayed-type hypersensitivity responses [19,20], impaired proliferation of peripheral blood lymphocytes [21] and allospecific cytotoxicity [22]. MV infection is accompanied by a transient but extensive lymphopenia with a reduction in the number of CD4 and CD8 T lymphocytes [23,24]. Type 2 polarisation of cytokine responses occurs during late stages of measles: increase in the production of interleukin 4 (IL-4) and decrease of IL-2 and interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) [25]. Production of the pro-inflammatory cytokine IL-12 is markedly suppressed in patients with measles, providing a unifying mechanism for many of the immunological abnormalities associated with measles [26].

Several *in vitro* studies have demonstrated that MV infection of human dendritic cells (DC) affects their phenotype and functions and suggest that MV interference with DC function may represent an important mechanism in immunosuppression. Different types of DC including skin Langerhans cells [9], peripheral blood DC [11], CD34<sup>+</sup>-derived DC [9] and monocyte-derived DC [10] are permissive to MV infection. Viral infection induces formation of DC syncytia, followed by the loss of the DC capacity to stimulate naïve CD4<sup>+</sup>T cells [9,10] and acquisition of an active inhibitory function on CD4<sup>+</sup>T-cell proliferation in response to allogeneic non-infected DC [9] or mitogens [11]. Inhibition of T-cell functions could be mediated through either transmission of infectious virus to T cells, leading to a block in the cell cycle [27,28] and/or delivery of inhibitory signals via infected DC [9,29]. MV infection was shown to enhance apoptosis of DC and to inhibit their CD40 ligand-dependent terminal differentiation [30,31]. In

addition, it induced cytotoxic activity by activation of the tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synthesis in DC and monocytes [32]. Although the infection of DC is an attractive hypothesis to explain MV-induced immunosuppression, direct evidence for the presence of MV-infected DC in children during measles remains to be demonstrated.

Analysis of the presence of MV-infection in different cells of the immune system during measles suggests that the major mechanism for the induction of immunosuppression may not be a direct effect of virus replication in these cells. In fact, despite the small amount of virus-infected peripheral blood cells during measles (less than 1%), this severe suppression of the immune system can last for weeks [33]. Moreover, a number of immunological alterations during natural measles also occur to a lesser magnitude after vaccination with attenuated MV [34,35]. Therefore, it is likely that MV-induced immunosuppression is not induced only by direct viral replication in haematopoietic cells, but also by indirect immunopathogenic mechanisms. Indeed, numerous recent studies indicate that measles virus proteins are sufficient to induce different aspects of MV-induced immunosuppression [36–40]. In this review we shall focus on the role of different MV proteins in the induction of immunological abnormalities associated with measles.

### ROLE OF MV GLYCOPROTEINS

The envelope glycoproteins H and F participate directly in the entry of the virus into the host cell. H binds to its cellular receptor and induces conformational changes of F leading to its fusogenic activity and consequent fusion of the viral envelope with the cellular membrane [41]. During the viral cycle, H and F are then neo-synthesised and reach the cellular membrane to form the new virion envelope.

Two different cellular receptors have been identified at present: CD46, a regulatory complement glycoprotein expressed on all human nucleated cells [42,43] and CD150, a glycoprotein belonging to the immunoglobulin superfamily, expressed on haematopoietic cells [44] (Figure 2). The binding of MV to those two receptors seems to be largely influenced by the way the virus strains were isolated. MV strains isolated on B95a cells (CD150<sup>+</sup>, CD46<sup>-</sup>) use CD150 as

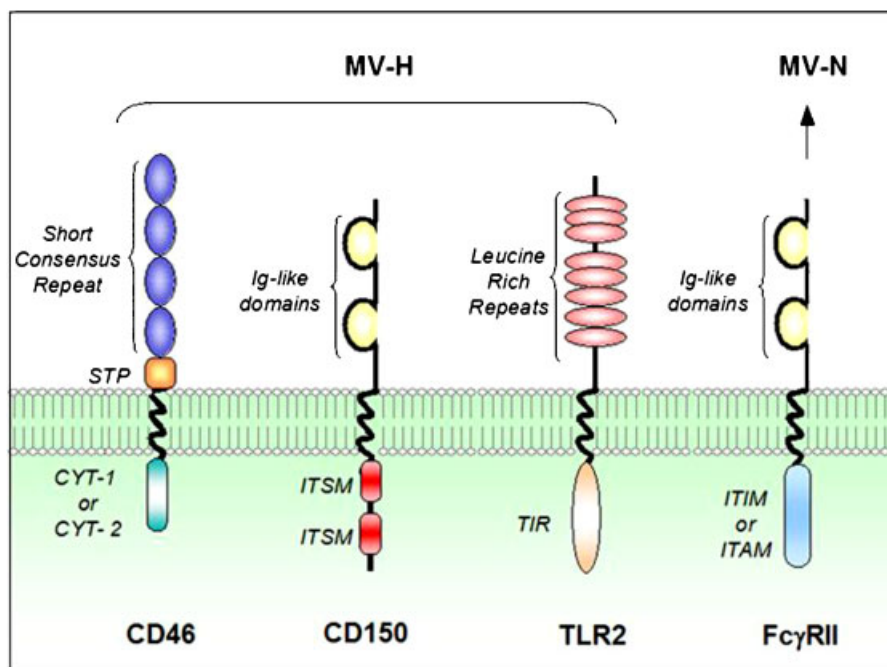


Figure 2. Schematic representation of identified receptors for MV proteins: three type I transmembrane proteins: CD46, CD150 and TLR2, shown to interact with MV H protein, and Fc $\gamma$ RII, as a receptor for MV N protein. CD46 exists in multiple isoforms, generated by alternative splicing of a single gene. The N-terminal extracellular domain consists of four short consensus repeats (SCR) containing three N-linked sugars and is followed by an alternatively spliced serine, threonine and proline-rich region (STP) that is heavily O-glycosylated. A transmembrane domain and one of two possible cytoplasmic tails (CYT-1 or CYT-2) completes the protein. CD150 (SLAM) comprises two highly glycosylated domains, a transmembrane segment and a cytoplasmic tail containing two immunoreceptor tyrosine-based switch motif (ITSM) responsible for recruitment of SH2-containing molecules. TLR2 presents structural features common to the mammalian TLR family: an extracellular portion composed of multiple leucine-rich repeats (18 to 20 for TLR2), a short transmembrane region, and a conserved cytoplasmic domain that contains a Toll/IL-1R (TIR) domain. Fc $\gamma$ RII represents a class of closely related receptors which can be divided into two different subfamilies: (1) activatory Fc $\gamma$ RII: Fc $\gamma$ RIIA and Fc $\gamma$ RIIC, characterised by the presence of an Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (ITAM) motif in their cytoplasmic tail; and (2) inhibitory Fc $\gamma$ RII, which consists of the two isoforms of Fc $\gamma$ RIIB (B1 and B2) and contains an Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif (ITIM). All these receptors are single chain receptors with two extracellular Ig-like domains of the V-type, a transmembrane domain, and an intracytoplasmic tail containing either one ITAM or one ITIM

receptor while the strains isolated on Vero cells (CD46<sup>+</sup>, CD150<sup>-</sup>) use both CD46 and CD150 [44]. Therefore, while vaccine MV strains can use CD46 and CD150, the wild type MV strains, propagated on human lymphocytes, preferentially use CD150, although low affinity binding to CD46 has been observed [45,46].

The relative importance of MV glycoproteins in the induction of immunosuppression has been suggested in several different studies. It was first proposed after the observation that proliferation of uninfected cells was inhibited after co-culturing with irradiated virus or infected lymphocytes and that this effect was abolished by anti-glycoprotein antibodies [47]. Then, the identification of the MV cellular receptors allowed the role of the interac-

tion of MV glycoproteins with CD46 or CD150 in the immunosuppressor effect to be addressed.

### Interaction with CD46

The role of CD46 in the modulation of T-lymphocyte functions was observed initially with human T cells *in vitro* [48,49]. As the CD46 receptor is not expressed in mice, except in the testis, the generation of transgenic mice for the human CD46 protein has been very useful in addressing the question of the interaction between MV glycoproteins and CD46. Injection of UV-inactivated recombinant Vesicular Stomatitis Virus (VSV), expressing MV-H was shown to modulate immune response in CD46 transgenic mice [50]. The inhibition of inflammatory reactions was

observed in mice, similarly to impaired delayed type hypersensitivity responses in MV-infected patients [19,20]. This suppression of the inflammatory response in mice is caused by direct interaction of H expressed on T lymphocytes with CD46 and is associated with impaired T-cell cytotoxicity [50]. Recently, a population of human CD4 T cells, generated after CD46 engagement *in vitro*, was identified as T regulatory cells type 1 (Tr1), presenting the capacity to suppress the proliferation of activated T lymphocytes by production of the inhibitory cytokine IL-10 [51]. Whether this population is involved in CD46-mediated suppression of inflammation in mice, remains to be determined. Interestingly, a differential effect of H-CD46 interaction was observed depending on the cytoplasmic CD46 domain expressed in transgenic mice. Due to the alternative splicing, different CD46 isoforms are found in human tissues associated with one of two different cytoplasmic domains, either CYT-1 (CD46-1) or CYT-2 (CD46-2). While H-CD46-1 interaction suppresses the inflammatory response similar to that observed in double transgenic CD46-1 × CD46-2 mice, engagement of CD46-2 had the opposite effect: increase of the inflammatory effect and T-cell cytotoxic activity [50]. Finally, the differential role of CD46 isoforms has been suggested to take place in macrophages in response to MV infection. Infection of murine macrophages expressing CD46-1 enhances nitric oxide (NO) production and restricts virus replication, modulating the production of IFN $\alpha/\beta$ ; in contrast, infection of murine macrophages expressing CD46-2 has the opposite effect [52,53]. As NO has potent immunomodulatory properties, including the induction of apoptosis of macrophages and DC [54,55], these results raised an interesting hypothesis as to whether NO could contribute to MV-induced immunosuppression. As the proportion of CD46-1 and CD46-2 may vary in different cell types [56] or potentially among different persons, it is tempting to speculate that this differential expression may be responsible for different susceptibility to MV-induced immunosuppression in the population.

In addition to the modulation of T-lymphocyte functions, interaction of MV-H with CD46 has been suggested to impair the capacity of dendritic cells and monocytes to produce IL-12, a pro-inflammatory cytokine important in the initiation

of the cellular immune response [10,38,57]. CD46 could interact with H expressed either in the context of viral particles or on the cell membrane [58], suggesting that MV-infected cells expressing H on the cell surface may play a role in H-CD46 induced immunomodulation in addition to free MV particles. Moreover, H-CD46 interaction increases the uptake and processing of MV antigens and leads to an enhanced MHC class II-restricted presentation of MV both *in vitro* [59] and *in vivo* [60], indicating a rather unique function of CD46 in receptor-mediated presentation, not observed with other ubiquitously expressed cellular receptors. As CD46 was recently suggested to play an important role in linking adaptive and innate immunity [50], altogether these data suggest that by selecting CD46 as a receptor, the virus could perturb different aspects of immune response.

### Interaction with CD150

Recent identification of CD150 (or SLAM, for Signalling Lymphocyte-Activation Molecule) as a receptor for all strains of MV [44] immediately suggested a critical role for this molecule in MV-induced immunosuppression. Initially, CD150 was identified as a human T-cell activation receptor [61] and further demonstrated to be expressed on different subsets of immune cells, potential targets of MV-immunosuppressive action: activated and memory T cells, immature thymocytes, T cell clones, activated B cells, mature dendritic cells and activated monocytes [61–65]. CD150 is differentially expressed in CD4<sup>+</sup> T cells, high levels being found in Th1 cells, whereas only small amounts are present on Th2 cells [66]. Studies using CD150<sup>-/-</sup> mice reveal that CD150 controls T cell and macrophage functions. It was observed that CD150-induced signal transduction decreased T-cell receptor-induced IFN- $\gamma$  production in CD8<sup>+</sup> cells, and to a lesser extent in CD4<sup>+</sup> cells and increased IL-4 production CD4<sup>+</sup> cells [67]. CD150 signalling negatively influenced IL-6 production and increased IL-12 secretion in macrophages. In addition, CD150<sup>-/-</sup> macrophages produced reduced amounts of NO upon stimulation with LPS. Therefore, changes in the cytokine profile, observed in patients with measles, may be explained by MV-CD150 interaction: measles starts with a predominant Th1 cytokine profile and converts to Th2 response later during infection.

*In vitro* studies have shown that stimulation of CD150 in T cells induces IFN- $\gamma$  production, which can redirect the Th2 phenotype of the helper T lymphocyte to a Th1 type [68]. It was hypothesised that the initial interaction of MV and CD150 produces a Th1 response. Then, down-regulation of the receptor, occurring during MV infection [69], may shift the immune response to the opposite direction to Th2 type. Moreover, it has been proposed that the interaction of MV with Th1 and memory T cells, expressing high levels of CD150 [66], may redirect them to the Th2 producing cytokine profile, resulting in a suppressed delayed-type hypersensitivity response [70]. Although these hypotheses are rather attractive to explain some aspects of MV-induced immunosuppression, no direct evidence exists so far to confirm that H-CD150 interaction induces intracellular signalling as observed with certain anti-CD150 mAb.

The finding that CD150 is also used as a receptor for the other morbilliviruses, like canine distemper virus (CDV) and rinderpest virus [71], led to the utilisation of ferrets, a natural host for CDV, to study CDV pathogenesis [72,73]. CDV-induced immunopathology in this model was shown to be dependent on the structure of CDV envelope proteins. Furthermore, as MV does not bind to murine CD150, transgenic mouse models expressing human CD150 have been created. In transgenic mice expressing human CD150 only on immature and mature T cells, *ex vivo* MV infection impaired mitogen-induced proliferation [74]. The expression of human CD150 on murine DC rendered them permissive to MV infection, impaired their antigen-presenting function and resulted in DC programmed cell death [75]. However, as UV-inactivated MV could not inhibit DC development [76], these results may be a consequence of MV replication in infected cells, rather than a result of H-CD150 interaction. Therefore, although it is highly likely that the interaction H-CD150 *in vivo* may be implicated in MV-induced immunosuppression, direct evidence is still lacking.

### Interaction with TLR2

Toll-like receptors have a crucial role in the detection of microbial infections, and consequent activation of inflammatory and anti-microbial immune responses [77]. Utilisation of reporter gene assays with Chinese hamster ovary cell lines expressing human or mouse Toll-like receptor 2 (TLR2),

revealed that ligation of MV-H glycoprotein from wild type strains activates the NF- $\kappa$ B signalling pathway [78]. Furthermore, interaction of wild type MV-H with TLR2 on human and murine primary monocytes/macrophages, induces chemokine-specific transcripts, promotes IL-6 release and triggers CD150 expression. Thus, in addition to binding to CD46 and CD150, these data show that H from wild-type strains is also able to interact and activate signalling pathways of TLR2 (Figure 2). Previously, TLR2 was shown to be involved in the recognition of a broad range of microbial products notably bacterial derived lipoproteins and glycolipids [79,80], leading to cell activation and the development of inflammatory and immune response. This function of TLR2 argues first in favour of immune stimulation consequent to wild-type MV-H binding. Nevertheless, it has already been reported that stimulation of TLR2 may be implicated in endotoxin tolerance, because a first stimulation of TLR2 leads to a desensitisation to further restimulation, even if agonists for different receptors like TLR4 are used [81]. It is tempting to speculate that a similar mechanism may take place following H ligation on TLR2 during MV infection. Furthermore, TLR2-induced expression of CD150 following ligation by agonists or wild type MV-H [78,82], shows that MV can trigger the expression of its own entry receptor. In humans, TLR2 expression has been reported at low levels in NK cells and T and B lymphocytes, and at high levels in monocytes and some subsets of dendritic cells [77,83]. Consequently, H-TLR2 interactions could play another important role in MV infection and immunopathology in increasing the expression of CD150 and thus enhancing the susceptibility of TLR2-expressing cells to MV infection.

### Interaction with a receptor other than CD46, CD150 or TLR2

MV glycoproteins expressed on the surface of infected cells and/or virus particles have been shown to inhibit mitogen-induced proliferation of uninfected peripheral blood lymphocytes (PBL) [37]. This was revealed using recombinant MV, in which the MV glycoproteins were replaced by the VSV G protein. Cells infected with this virus failed to inhibit proliferation. Additionally, the direct involvement of MV envelope glycoproteins was confirmed by the inhibitory activity of

fibroblasts transfected to express the MV H-F complex *in vitro*. This inhibition occurred independently of soluble mediators, complex glycosylation and the fusogenic activity of the effector H-F complex, but did require proteolytic processing of the F protein [84,85]. This *in vitro* anti-proliferation effect of MV glycoproteins is not restricted to  $\alpha\beta$  T cells but also occurred on  $\gamma\delta$  T cells. However, in contrast to  $\alpha\beta$  T cells, suppression of  $\gamma\delta$  T cells was only mediated by MV-infected T or monocyte cells and was overcome by monocytes conditioned with either B cells or dendritic cells [86]. However, neither CD46 nor CD150 appeared to be required for the induction of T-cell proliferative arrest, [37,87]. Although the first description of this MV-induced immunosuppressive effect was made 10 years ago, the cellular receptor utilised remains an enigma. Different aspects of the cellular signalling have been described for this system however. Membrane contact of the complex H-F with its as yet unknown receptor on lymphocytes did not induce apoptosis but rather an accumulation of cells at the G1-S-phase restriction point [11]. At the molecular level, MV H-F-induced cell cycle arrest was associated with restriction of the accumulation levels and activity of proteins essentially controlling S-phase entry, such as the regulatory and catalytic subunits of the cyclin dependent kinases (CDKs), as well as their inhibitor, p27kip1 [88]. IL-2 and IL-2 receptor signalling are known to be key players in the control of lymphocyte activation. Although the H-F complex did not interfere with IL-2-dependent activation of the JAK1/3-STAT3/5 pathway, IL-2-dependent activation of Akt kinase was shown to be disrupted after H-F contact with the putative receptor. In addition, expression of a constitutively active Akt kinase, by retroviral infection, strongly reduced the sensitivity of T cells to MV contact-mediated proliferative inhibition [39]. Since no known MV membrane proteins seem to be involved in this *in vitro* mechanism of MV immunosuppression, it has been proposed recently that the complex H-F on infected cells could interact with glycosphingolipid-enriched membrane microdomains (rafts) [89] on human primary T cells. This could alter recruitment and segregation of membrane proximal signalling components, avoiding thereby the recruitment of Akt into the raft region close to the T cell receptor [39]. Finally, MV glycoproteins have been shown to be implicated in the induction

of immunosuppression in a cotton rat model, which can be naturally infected intra-nasally by MV [90].

In summary, both MV glycoproteins, H and F, seem to be involved in inducing immunosuppression during measles. Utilisation of different cellular receptors may take place in this modulation of the immune response, some of them have been demonstrated, like CD46 and CD150, the MV entry receptors or TLR2, while others remain to be identified. Interaction with this array of different cell membrane receptors, all implicated in immunoregulation, may be responsible for the multiple immunological abnormalities seen in measles.

### ROLE OF THE MV NUCLEOPROTEIN

N is the most abundant of the viral proteins, synthesised on free ribosomes and folded in the cytoplasm, where it binds viral RNA and forms intracellular inclusions [91]. This protein has the capacity to self-assemble into nucleocapsids on cellular RNA, in the absence of any other MV gene products [92]. It has been demonstrated that N binds the receptor for the Fc portion of IgG, Fc gamma receptor type II (Fc $\gamma$ RII, CD32) (Figure 2). This protein is expressed by B lymphocytes and cells of the myeloid lineage and interaction of N with B cells has been shown to inhibit human antibody production *in vitro* [36] and to induce apoptosis in cell lines [93]. Moreover, study of immunosuppressive effects of recombinant N in mice demonstrated that this protein reduces hypersensitivity responses and impairs the function of dendritic cells *in vivo*. In addition, N-Fc $\gamma$  interaction decreased production of IL-12 by DC and induced a loss of antigen-specific T-cell proliferation *ex vivo* [38]. Thus, N has been suggested to play an important role in virus-induced inhibition of the immune response.

However, it has been difficult to understand how this cytosolic viral protein could leave an infected cell and then perturb the immune response. We have recently demonstrated that intracellular newly synthesised N, from both wild-type and vaccine MV strains, enters into the late endocytic compartment, where it recruits its cellular ligand, the Fc $\gamma$  receptor. N can then be expressed at the surface of infected leukocytes (Figure 3) associated with the Fc $\gamma$  receptor and/or is secreted in the extracellular compartment, allowing its interaction with the Fc $\gamma$  receptor on



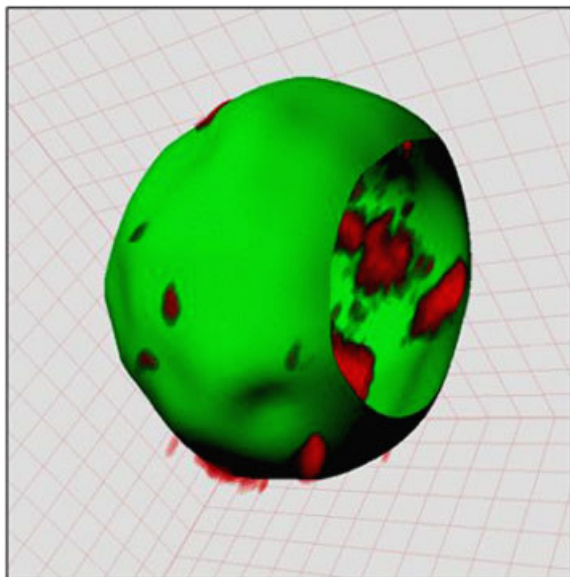


Figure 3. 3D reconstructions of a P815-N cell (murine mastocytoma cell line, stably transfected with MV-N gene) from a confocal Z-cut (LSM 510) with Imaris software (Bitplane<sup>®</sup>), after a deconvolution process using Huygens software (Bitplane<sup>®</sup>). Cells were marked with CFSE (Carboxy-Fluorescein diacetate Succinimidyl Ester) to stain cell volume in green and N was marked with biotinylated anti-N mAb cl.25, followed by rhodamine-streptavidin in red. The 3D representation shows localisation of N protein both inside and outside of the cell membrane (contributed by F. Saltel, CMU, Switzerland)

non-infected cells, both by cell contact and on the distant targets (Figure 4). Finally, cell-derived nucleoprotein inhibits secretion of IL-12 by human and murine macrophages and surface-derived N inhibits the generation of the inflammatory reaction [40]. These results revealed the N egress from infected cells as a novel strategy in measles-induced immunosuppression. The capacity of cytosolic N to translocate to the plasma membrane raises many intriguing questions concerning its intracellular transport mechanism. It is tempting to speculate that MV N translocates to the plasma membrane using a non-classical transport mechanism, as reported for some other virus proteins [94].

The existence of a soluble factor produced by infected PBLs or B-cell lines, capable of inhibiting lymphocyte proliferation has been proposed [95,96]. Whether N or its fragments may have some of the immunosuppressive effects seen in these studies, remains to be analysed. Recent studies showed that N in addition to Fc $\gamma$ RII interacts with an unidentified cell-surface receptor referred to as nucleoprotein receptor [97]. This protein

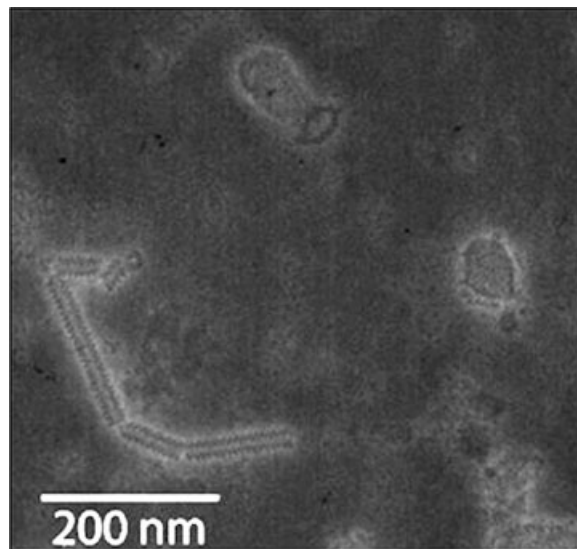


Figure 4. Electron micrograph of a negatively stained fraction obtained after differential centrifugation of P815-N cell supernatant (murine mastocytoma cell line, transfected with MV-N gene and cultured for 24 h with 100% cell viability). A tubular structure with herringbone appearance, typical for measles virus nucleoprotein is observed. Although N is regularly found in the cell supernatant, it is not associated with the microvesicles, exosomes, enriched in this fraction (contributed by R. Ruigrok, Univ. Grenoble I, France)

receptor seems to be expressed on a large variety of cell types in humans and mice; N could, in an Fc $\gamma$ -independent manner, induce suppression of cell proliferation by arresting cells in G0/G1 phase of the cell cycle [93,97]. However, the importance of the immunosuppressive function of this receptor has not yet been studied *in vivo*. Thus, interaction of N with its cell surface receptors might play a double role in MV-induced immunosuppression, allowing: (i) cell-membrane expression of N after its translocation from the endocytic compartment in the infected cell, and (ii) a direct immunosuppressive effect after binding of either membrane or secreted N to its cell receptors on non-infected cells. As infection with both wild type and vaccine strains of MV produces N capable of interacting with its receptors, this mechanism could play an important role in the immunological alterations observed during natural measles as well as after anti-measles vaccination.

Moreover, in addition to its binding to MV-P protein [98], N has also been reported to interact with the transcription factor IRF3 [99] and the

cellular chaperone heat shock protein Hsp72 [100]. IRF3 is well known to have a critical role in the antiviral immune response in controlling type I IFN responses [101], and Hsp proteins were recently implicated in the activation of the immune response [102]. Whereas the consequences of N interaction with these cellular proteins on the modulation of the immune response are poorly defined for the moment, it is tempting to speculate that they could play a role in MV-induced immunosuppression.

#### ROLE OF NON-STRUCTURAL MV C AND V PROTEINS

Non-structural MV C and V proteins have been extensively studied in the last few years to understand their function in measles pathogenesis. Recombinant MV deficient in V protein propagates efficiently in cultured cells [103], although C protein seems to be required for replication *in vitro* [104]. The role of V and C has been analysed in different animal models *in vivo*, such as macaques, CD46 transgenic mice, cotton rats or SCID mice engrafted with human thymus implants [104–107], where it was shown that they are important for virus virulence. These results have also suggested that MV C and V play an important role in the replication and pathogenicity of MV *in vivo*. However, V and C deficient MV was as capable as wild type MV of inhibiting mitogen-induced proliferation of peripheral blood lymphocytes [108] and V deleted MV had the same effect as wild type in the inhibition of DC development in a transgenic murine model [76].

As virus virulence is often related to the ability of viruses to interfere with the host interferon system, V and C proteins have been analysed for their ability to modulate either interferon type I production, or its signalling pathways. These studies demonstrated that C protein could inhibit IFN responses [109]. Other reports showed that V protein blocks signal transduction in response to IFN  $\alpha/\beta$ : V can interrupt Jak STAT signal transduction and impair dimerisation of STAT proteins and their nuclear localisation [110] or block the phosphorylation of STAT1 and STAT2 [111]. Type I interferons, consisting primarily of IFN $\alpha$  and IFN $\beta$ , are important components of the innate immune response. In addition to generating an anti-viral state in cells, IFN  $\alpha/\beta$  are known to have potent immunomodulatory effects, such as

enhancement of dendritic cell maturation, activation of macrophages and extension of T cell life span [112,113]. Therefore, it is highly probable that the interference of these non-structural MV proteins with IFN action *in vivo* may contribute to the inhibition of adaptive immune responses, although the precise mechanisms of their complex interactions remain to be elucidated.

#### CONCLUSIONS AND THERAPEUTIC PERSPECTIVES

Taken together, these results suggest a complex mechanism of MV induced immunosuppression, in which the interaction between several viral proteins and their different cellular targets may play a crucial role. Based on the experimental observations in a murine model [38,40,50] it is possible to draw a potential, although not exclusive, scheme of the mechanisms implicated in the inhibition of the inflammatory reactions of hypersensitivity, induced by MV proteins (Figure 5). Viral replication during MV infection or after vaccination could liberate MV proteins or their biologically active fragments, which may then interact with DC, leading to altered DC function and reduced IL-12 secretion. Additional viral replication in DC, as well as interaction of MV glycoproteins with their cell surface receptors, may contribute to this effect. Impaired antigen-presenting function is responsible for defective T cell priming, reducing their capacity to respond to foreign antigens and initiate the inflammatory response, which finally results in transient but profound immunosuppression.

In contrast to MV membrane glycoproteins, which express their immunosuppressive action only in the context of virus particles or infected cell-membrane, N can also be secreted and contribute to the immunosuppressive effect. In this manner, N can increase its accessibility to bind distant non-infected haematopoietic cells, like macrophages or dendritic cells, essential for the immune response and consequently perturb their function. Furthermore, circulation of the few MV-infected blood cells could be a way to allow N as well as H/F to interact with their cognate receptors on a wide number of non-infected cells and affect their functions.

The strong potential of MV proteins to modulate the immune response suggests possible therapeutic applications, opening new perspectives for

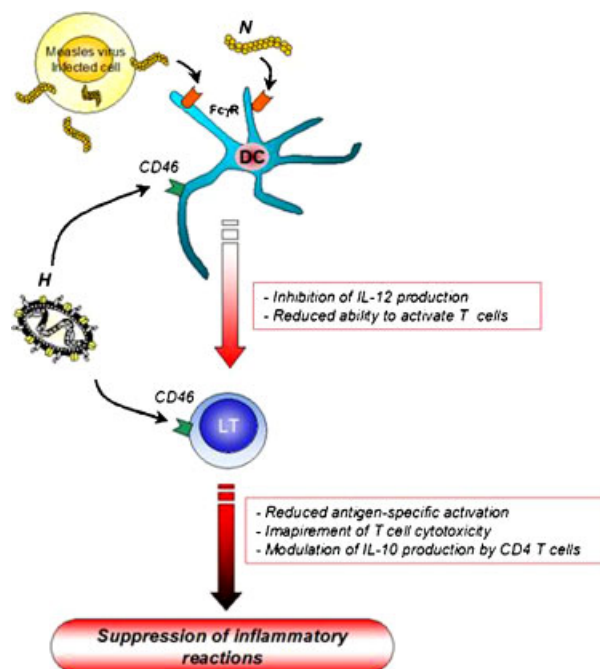


Figure 5. Proposed model of the role of MV proteins in the inhibition of inflammatory reactions, such as hypersensitivity, which are often observed to be impaired in patients with measles. Two MV proteins have been identified to play a role in this effect: 1. N, liberated from infected cells and/or expressed at their cell membrane and interacting with either Fc $\gamma$ R or potentially other receptors and 2. H, expressed on viral particles or infected cells and interacting with CD46 and potentially other cell surface receptors for H. Interaction between MV proteins and their cellular receptors leads to the inhibition of DC and T lymphocyte (LT) functions and suppression of the inflammatory reaction

clinical intervention. Indeed, a striking improvement in the symptoms of patients with atopic dermatitis during natural measles has often been observed [114–116]. Before the development of pharmacological corticosteroids, measles was exploited therapeutically in treatment of nephrotic syndrome [117,118] in spite of risks linked to the infection. Further study of the immunoregulatory role of recombinant MV proteins, particularly N, and identification of their biologically active fragments may open new avenues for their specific application in immunomodulatory protocols aimed at treating T-cell mediated inflammatory diseases.

#### ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by institutional grants from INSERM, FITT-Region Rhône-Alpes and

grant No 4450 from ARC (to BH). Y. Kerdiles is supported by Ligue contre le Cancer. We are grateful to Dr J.C. Marie for his helpful comments during the writing of the manuscript, to Drs F. Saltel for contributing the Figure 3 and R. Ruigrok for the Figure 4 to this review and to Drs R. Buckland and F. Wild for critical reading of the manuscript.

#### REFERENCES

1. Progress in reducing global measles deaths: 1999–2002. *Wkly Epidemiol Rec* 2004; **79**: 20–21.
2. Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study. *Lancet* 1997; **349**: 1269–1276.
3. Beckford AP, Kaschula RO, Stephen C. Factors associated with fatal cases of measles: a retrospective autopsy study. *S Afr Med J* 1985; **68**: 858–863.
4. Miller DL. Frequency of complications of measles, 1963. Report on a national inquiry by the public health laboratory service in collaboration with the society of medical officers of health. *Br Med J* 1964; **5401**: 75–78.
5. Moench TR, Griffin DE, Obriecht CR, Vaisberg RT, Johnson RT. Acute measles in patients with and without neurological involvement: distribution of measles virus antigen and RNA. *Journal of Infectious Diseases* 1988; **158**: 433–442.
6. Esolen LM, Ward BJ, Moench TR, Griffin DE. Infection of monocytes during measles. *J Infect Dis* 1993; **168**: 47–52.
7. Hyypia T, Korkiamaki P, Vainionpaa R. Replication of measles virus in human lymphocytes. *J Exp Med* 1985; **161**: 1261–1271.
8. Vydelingum S, Suryanarayana K, Marusyk RG, Salmi AA. Replication of measles virus in human monocytes and T cells. *Can J Microbiol* 1995; **41**: 620–623.
9. Grosjean I, Caux C, Bella C, *et al.* Measles virus infects human dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4+ T cells. *J Exp Med* 1997; **186**: 801–812.
10. Fugier-Vivier I, Servet-Delprat C, Rivailier P, Rissoan MC, Liu YJ, Roubourdin-Combe C. Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J Exp Med* 1997; **186**: 813–823.
11. Schnorr JJ, Xanthakos S, Keikavoussi P, Kampgen E, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. Induction of maturation of human blood dendritic cell precursors by measles virus is associated with immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 5326–5331.

12. Wild TF, Buckland R. Functional aspects of envelope-associated measles virus proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; **191**: 51–64.
13. Bolt G, Pedersen IR. The role of subtilisin-like proprotein convertases for cleavage of the measles virus fusion glycoprotein in different cell types. *Virology* 1998; **252**: 387–398.
14. Naim HY, Ehler E, Billeter MA. Measles virus matrix protein specifies apical virus release and glycoprotein sorting in epithelial cells. *Embo J* 2000; **19**: 3576–3585.
15. Horikami SM, Moyer SA. Structure, transcription, and replication of measles virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; **191**: 35–50.
16. Robbins SJ, Bussell RH. Structural phosphoproteins associated with purified measles virions and cytoplasmic nucleocapsids. *Intervirology* 1979; **12**: 96–102.
17. Liston P, Briedis DJ. Ribosomal frameshifting during translation of measles virus P protein mRNA is capable of directing synthesis of a unique protein. *J Virol* 1995; **69**: 6742–6750.
18. Bellini WJ, Rota JS, Rota PA. Virology of measles virus. *J Infect Dis* 1994; **170**: S15–S23.
19. Von Pirquet C. Das Verhalten der kutanen tuberculinreaktion während der mäsern. *Dtsch Med Wochenschr* 1908; **30**: 1297–1300.
20. Tamashiro VG, Perez HH, Griffin DE. Prospective study of the magnitude and duration of changes in tuberculin reactivity during uncomplicated and complicated measles. *Pediatr Infect Dis J* 1987; **6**: 451–454.
21. Hirsch RL, Griffin DE, Johnson RT, *et al.* Cellular immune responses during complicated and uncomplicated measles virus infections of man. *Clin Immunol Immunopath* 1984; **31**: 1–12.
22. Galama JMD, Ubels-Postma J, Vos A, Lucas CJ. Measles virus inhibits acquisition of lymphocyte functions but not established effector functions. *Cellular Immunology* 1980; **50**: 401.
23. Ryon JJ, Moss WJ, Monze M, Griffin DE. Functional and phenotypic changes in circulating lymphocytes from hospitalized zambian children with measles. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; **9**: 994–1003.
24. Okada H, Kobune F, Sato TA, *et al.* Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. *Arch Virol* 2000; **145**: 905–920.
25. Griffin DE, Ward BJ. Differential CD4 T cell activation in measles. *J Infect Dis* 1993; **168**: 275–281.
26. Atabani SF, Byrnes AA, Jaye A, *et al.* Natural measles causes prolonged suppression of interleukin-12 production. *J Infect Dis* 2001; **184**: 1–9.
27. McChesney MB, Altman A, Oldstone MB. Suppression of T lymphocyte function by measles virus is due to cell cycle arrest in G1. *J Immunol* 1988; **140**: 1269–1273.
28. Naniche D, Reed SI, Oldstone MB. Cell cycle arrest during measles virus infection: a G0-like block leads to suppression of retinoblastoma protein expression. *J Virol* 1999; **73**: 1894–1901.
29. Dubois B, Lamy PJ, Chemin K, Lachaux A, Kaiserlian D. Measles virus exploits dendritic cells to suppress CD4+ T-cell proliferation via expression of surface viral glycoproteins independently of T-cell trans-infection. *Cell Immunol* 2001; **214**: 173–183.
30. Servet-Delprat C, Vidalain PO, Azocar O, Le Deist F, Fischer A, Rabourdin-Combe C. Consequences of Fas-mediated human dendritic cell apoptosis induced by measles virus. *J Virol* 2000; **74**: 4387–4393.
31. Servet-Delprat C, Vidalain PO, Bausinger H, *et al.* Measles virus induces abnormal differentiation of CD40 ligand-activated human dendritic cells. *J Immunol* 2000; **164**: 1753–1760.
32. Vidalain PO, Azocar O, Lamouille B, Astier A, Rabourdin-Combe C, Servet-Delprat C. Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells. *J Virol* 2000; **74**: 556–559.
33. Borrow P, Oldstone MB. Measles virus-mononuclear cell interactions. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; **191**: 85–100.
34. Fireman P, Friday G, Kumate J. Effect of measles vaccine on immunologic responsiveness. *Pediatrics* 1969; **43**: 264–272.
35. Hussey GD, Goddard EA, Hughes J, *et al.* The effect of Edmonston-Zagreb and Schwarz measles vaccines on immune response in infants. *J Infect Dis* 1996; **173**: 1320–1326.
36. Ravanel K, Castelle C, Defrance T, *et al.* Measles virus nucleocapsid protein binds to FcγRII and inhibits human B cell antibody production. *J Exp Med* 1997; **186**: 269–278.
37. Schlender J, Schnorr JJ, Spielhoffer P, *et al.* Interaction of measles virus glycoproteins with the surface of uninfected peripheral blood lymphocytes induces immunosuppression in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 13194–13199.
38. Marie JC, Kehren J, Trescol-Biemont MC, *et al.* Mechanism of measles virus-induced suppression of inflammatory immune responses. *Immunity* 2001; **14**: 69–79.
39. Avota E, Avots A, Niewiesk S, *et al.* Disruption of Akt kinase activation is important for immunosuppression induced by measles virus. *Nat Med* 2001; **7**: 725–731.

40. Marie JC, Saltel F, Escola JM, Jurdic P, Wild TF, Horvat B. Cell surface delivery of the measles virus nucleoprotein: a viral strategy to induce immunosuppression. *J Virol* 2004; **78**: 11952–11961.
41. Wild TF, Malvoisin E, Buckland R. Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *J Gen Virol* 1991; **72**(Pt 2): 439–442.
42. Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, *et al.* Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* 1993; **67**: 6025–6032.
43. Dorig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 1993; **75**: 295–305.
44. Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 2000; **406**: 893–897.
45. Manchester M, Eto DS, Valsamakis A, Liton PB, Fernandez-Munoz R, Rota PA, Bellini WJ, Forthal DN, Oldstone MB. Clinical isolates of measles virus use CD46 as a cellular receptor. *J Virol* 2000; **74**: 3967–3974.
46. Masse N, Barrett T, Muller CP, Wild TF, Buckland R. Identification of a second major site for CD46 binding in the hemagglutinin protein from a laboratory strain of measles virus (MV): potential consequences for wild-type MV infection. *J Virol* 2002; **76**: 13034–13038.
47. Sanchez-Lannier M, Guerin P, McLaren LC, Bankhurst AD. Measles virus-induced immunosuppression of lymphocyte proliferation. *Cellular Immunology* 1988; **116**: 367–381.
48. Astier A, Trescol-Biemont MC, Azocar O, Lamouille B, Rabourdin-Combe C. Cutting Edge: CD46, a New Costimulatory Molecule for T Cells, That Induces p120CBL and LAT Phosphorylation. *J Immunol* 2000; **164**: 6091–6095.
49. Zaffran Y, Destaing O, Roux A, *et al.* CD46/CD3 costimulation induces morphological changes of human T cells and activation of Vav, Rac, and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase. *J Immunol* 2001; **167**: 6780–6785.
50. Marie JC, Astier AL, Rivailler P, Rabourdin-Combe C, Wild TF, Horvat B. Linking innate and acquired immunity: divergent role of CD46 cytoplasmic domains in T cell induced inflammation. *Nat Immunol* 2002; **3**: 659–666.
51. Kemper C, Chan AC, Green JM, Brett KA, Murphy KM, Atkinson JP. Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* 2003; **421**: 388–392.
52. Hirano A, Yang Z, Katayama Y, Korte-Sarfaty J, Wong TC. Human CD46 enhances nitric oxide production in mouse macrophages in response to measles virus infection in the presence of gamma interferon: dependence on the CD46 cytoplasmic domains. *J Virol* 1999; **73**: 4776–4785.
53. Katayama Y, Hirano A, Wong TC. Human receptor for measles virus (CD46) enhances nitric oxide production and restricts virus replication in mouse macrophages by modulating production of alpha/beta interferon. *J Virol* 2000; **74**: 1252–1257.
54. Albina JE, Cui S, Mateo RB, Reichner JS. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 1993; **150**: 5080–5085.
55. Lu L, Bonham CA, Chambers FG, *et al.* Induction of nitric oxide synthase in mouse dendritic cells by IFN-gamma, endotoxin, and interaction with allogeneic T cells: nitric oxide production is associated with dendritic cell apoptosis. *J Immunol* 1996; **157**: 3577–3586.
56. Wang G, Liszewski MK, Chan AC, Atkinson JP. Membrane cofactor protein (MCP; CD46): isoform-specific tyrosine phosphorylation. *J Immunol* 2000; **164**: 1839–1846.
57. Karp CL. Measles: immunosuppression, interleukin-12, and complement receptors. *Immunol Rev* 1999; **168**: 91–101.
58. Krantic S, Gimenez C, Rabourdin-Combe C. Cell-to-cell contact via measles virus haemagglutinin-CD46 interaction triggers CD46 downregulation. *J Gen Virol* 1995; **76**(Pt 11): 2793–2800.
59. Gerlier D, Trescol-Biemont MC, Varior-Krishnan G, Naniche D, Fugier-Vivier I, Rabourdin-Combe C. Efficient major histocompatibility complex class II-restricted presentation of measles virus relies on hemagglutinin-mediated targeting to its cellular receptor human CD46 expressed by murine B cells. *J Exp Med* 1994; **179**: 353–358.
60. Rivailler P, Trescol-Biemont MC, Gimenez C, Rabourdin-Combe C, Horvat B. Enhanced MHC class II-restricted presentation of measles virus (MV) hemagglutinin in transgenic mice expressing human MV receptor CD46. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 1301–1314.
61. Cocks BG, Chang CC, Carballido JM, Yssel H, de Vries JE, Aversa G. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 1995; **376**: 260–263.
62. Sidorenko SP, Clark EA. Characterization of a cell surface glycoprotein IPO-3, expressed on activated human B and T lymphocytes. *J Immunol* 1993; **151**: 4614–4624.
63. Kruse M, Meinel E, Henning G, *et al.* Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on mature CD83+ dendritic cells and is

- up-regulated by IL-1 beta. *J Immunol* 2001; **167**: 1989–1995.
64. Bleharski JR, Niazi KR, Sieling PA, Cheng G, Modlin RL. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines. *J Immunol* 2001; **167**: 3174–3181.
65. Minagawa H, Tanaka K, Ono N, Tatsuo H, Yanagi Y. Induction of the measles virus receptor SLAM (CD150) on monocytes. *J Gen Virol* 2001; **82**: 2913–2917.
66. Hamalainen H, Meissner S, Lahesmaa R. Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) is differentially expressed in human Th1 and Th2 cells. *J Immunol Methods* 2000; **242**: 9–19.
67. Wang N, Satoskar A, Faubion W, *et al.* The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophage functions. *J Exp Med* 2004; **199**: 1255–1264.
68. Aversa G, Chang CC, Carballido JM, Cocks BG, de Vries JE. Engagement of the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) on activated T cells results in IL-2-independent, cyclosporin A-sensitive T cell proliferation and IFN-gamma production. *J Immunol* 1997; **158**: 4036–4044.
69. Tanaka K, Minagawa H, Xie MF, Yanagi Y. The measles virus hemagglutinin downregulates the cellular receptor SLAM (CD150). *Arch Virol* 2002; **147**: 195–203.
70. Yanagi Y, Ono N, Tatsuo H, Hashimoto K, Minagawa H. Measles virus receptor SLAM (CD150). *Virology* 2002; **299**: 155–161.
71. Tatsuo H, Ono N, Yanagi Y. Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J Virol* 2001; **75**: 5842–5850.
72. von Messling V, Milosevic D, Cattaneo R. Tropism illuminated: lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 14216–14221.
73. von Messling V, Springfield C, Devaux P, Cattaneo R. A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *J Virol* 2003; **77**: 12579–12591.
74. Hahm B, Arbour N, Naniche D, Homann D, Manchester M, Oldstone MB. Measles virus infects and suppresses proliferation of T lymphocytes from transgenic mice bearing human signaling lymphocytic activation molecule. *J Virol* 2003; **77**: 3505–3515.
75. Hahm B, Arbour N, Oldstone MB. Measles virus interacts with human SLAM receptor on dendritic cells to cause immunosuppression. *Virology* 2004; **323**: 292–302.
76. Hahm B, Trifilo MJ, Zuniga EI, Oldstone MB. Viruses evade the immune system through type I interferon-mediated STAT2-dependent, but STAT1-independent, signaling. *Immunity* 2005; **22**: 247–257.
77. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; **5**: 987–995.
78. Bieback K, Lien E, Klagge IM, *et al.* Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol* 2002; **76**: 8729–8736.
79. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; **2**: 675–680.
80. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001; **1**: 135–145.
81. Lehner MD, Morath S, Michelsen KS, Schumann RR, Hartung T. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol* 2001; **166**: 5161–5167.
82. Murabayashi N, Kurita-Taniguchi M, Ayata M, Matsumoto M, Ogura H, Seya T. Susceptibility of human dendritic cells (DCs) to measles virus (MV) depends on their activation stages in conjunction with the level of CDw150: role of Toll stimulators in DC maturation and MV amplification. *Microbes Infect* 2002; **4**: 785–794.
83. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, *et al.* Quantitative expression of toll-like receptor 1–10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; **168**: 4531–4537.
84. Weidmann A, Fischer C, Ohgimoto S, Ruth C, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. Measles virus-induced immunosuppression in vitro is independent of complex glycosylation of viral glycoproteins and of hemifusion. *J Virol* 2000; **74**: 7548–7553.
85. Weidmann A, Maisner A, Garten W, Seufert M, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. Proteolytic cleavage of the fusion protein but not membrane fusion is required for measles virus-induced immunosuppression in vitro. *J Virol* 2000; **74**: 1985–1993.
86. Bieback K, Breer C, Nanan R, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. Expansion of human gamma/delta T cells in vitro is differentially regulated by the measles virus glycoproteins. *J Gen Virol* 2003; **84**: 1179–1188.
87. Erlenhoefer C, Wurzer WJ, Löffler S, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but

- is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J Virol* 2001; **75**: 4499–4505.
88. Engelking O, Fedorov LM, Lilischkis R, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. Measles virus-induced immunosuppression in vitro is associated with deregulation of G1 cell cycle control proteins. *J Gen Virol* 1999; **80**(Pt 7): 1599–1608.
  89. Avota E, Muller N, Klett M, Schneider-Schaulies S. Measles virus interacts with and alters signal transduction in T-cell lipid rafts. *J Virol* 2004; **78**: 9552–9559.
  90. Niewiesk S, Eisenhuth I, Fooks A, *et al.* Measles virus-induced immune suppression in the cotton rat (*Sigmodon hispidus*) model depends on viral glycoproteins. *J Virol* 1997; **71**: 7214–7219.
  91. Gombart AF, Hirano A, Wong TC. Conformational maturation of measles virus nucleocapsid protein. *J Virol* 1993; **67**: 4133–4141.
  92. Spohner D, Kirn A, Drillien R. Assembly of nucleocapsidlike structures in animal cells infected with a vaccinia virus recombinant encoding the measles virus nucleoprotein. *J Virol* 1991; **65**: 6296–6300.
  93. Laine D, Bourhis JM, Longhi S, *et al.* Measles virus nucleoprotein induces cell-proliferation arrest and apoptosis through NTAIL-NR and NCORE-FcγRIIB1 interactions, respectively. *J Gen Virol* 2005; **86**: 1771–1784.
  94. Prochiantz A. Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others. *Curr Opin Cell Biol* 2000; **12**: 400–406.
  95. Fujinami RS, Sun X, Howell JM, Jenkin JC, Burns JB. Modulation of immune system function by measles virus infection: role of soluble factor and direct infection. *J Virol* 1998; **72**: 9421–9427.
  96. Sun X, Burns JB, Howell JM, Fujinami RS. Suppression of antigen-specific T cell proliferation by measles virus infection: role of a soluble factor in suppression. *Virology* 1998; **246**: 24–33.
  97. Laine D, Trescol-Biemont MC, Longhi S, *et al.* Measles virus (MV) nucleoprotein binds to a novel cell surface receptor distinct from FcγRII via its C-terminal domain: role in MV-induced immunosuppression. *J Virol* 2003; **77**: 11332–11346.
  98. Huber M, Cattaneo R, Spielhofer P, *et al.* Measles virus phosphoprotein retains the nucleocapsid protein in the cytoplasm. *Virology* 1991; **185**: 299–308.
  99. TenOever BR, Servant MJ, Grandvaux N, Lin R, Hiscott J. Recognition of the measles virus nucleocapsid as a mechanism of IRF-3 activation. *J Virol* 2002; **76**: 3659–3669.
  100. Zhang X, Glendening C, Linke H, *et al.* Identification and characterization of a regulatory domain on the carboxyl terminus of the measles virus nucleocapsid protein. *J Virol* 2002; **76**: 8737–8746.
  101. Sato M, Suemori H, Hata N, *et al.* Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-α/β gene induction. *Immunity* 2000; **13**: 539–548.
  102. Wallin RP, Lundqvist A, More SH, von Bonin A, Kiessling R, Ljunggren HG. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol* 2002; **23**: 130–135.
  103. Schneider H, Kaelin K, Billeter MA. Recombinant measles viruses defective for RNA editing and V protein synthesis are viable in cultured cells. *Virology* 1997; **227**: 314–322.
  104. Takeuchi K, Takeda M, Miyajima N, *et al.* Stringent requirement for the C protein of wild-type measles virus for growth both in vitro and in macaques. *J Virol* 2005; **79**: 7838–7844.
  105. Patterson JB, Thomas D, Lewicki H, Billeter MA, Oldstone MB. V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo. *Virology* 2000; **267**: 80–89.
  106. Valsamakis A, Schneider H, Auwaerter PG, Kaneshima H, Billeter MA, Griffin DE. Recombinant measles viruses with mutations in the C, V, or F gene have altered growth phenotypes in vivo. *J Virol* 1998; **72**: 7754–7761.
  107. Tober C, Seufert M, Schneider H, *et al.* Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. *J Virol* 1998; **72**: 8124–8132.
  108. Escoffier C, Manie S, Vincent S, Muller CP, Billeter M, Gerlier D. Nonstructural C protein is required for efficient measles virus replication in human peripheral blood cells. *J Virol* 1999; **73**: 1695–1698.
  109. Shaffer JA, Bellini WJ, Rota PA. The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology* 2003; **315**: 389–397.
  110. Palosaari H, Parisien JP, Rodriguez JJ, Ulane CM, Horvath CM. STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J Virol* 2003; **77**: 7635–7644.
  111. Takeuchi K, Kadota SI, Takeda M, Miyajima N, Nagata K. Measles virus V protein blocks interferon (IFN)-α/β but not IFN-γ signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation. *FEBS Lett* 2003; **545**: 177–182.
  112. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998; **67**: 227–264.
  113. Goodbourn S, Didcock L, Randall RE. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* 2000; **81**: 2341–2364.
  114. Boner AL, Valletta EA, Bellanti JA. Improvement of atopic dermatitis following natural measles virus

- infection. Four case reports. *Ann Allergy* 1985; **55**: 605–608.
115. Lin CY. Transient remission after intercurrent measles infection in a patient with hyperimmunoglobulin E syndrome. *Pediatr Res* 1986; **20**: 685–688.
116. Kondo N, Fukutomi O, Ozawa T, *et al.* Improvement of food-sensitive atopic dermatitis accompanied by reduced lymphocyte responses to food antigen following natural measles virus infection. *Clin Exp Allergy* 1993; **23**: 44–50.
117. Hutchins G, Janeway CA. Observations on the relationship of measles and remissions in the nephrotic syndrome. *Am J Dis Child* 1947; **73**: 242–243.
118. Blumberg RW, Cassady HA. Effects of measles on the nephrotic syndrome. *Am J Dis Child* 1947; **63**: 151–166.





# Bibliographie



**A<sub>1</sub>**

- Akira, S. and Takeda, K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, **4**: 499-511.
- Andrejeva, J., Childs, K.S., Young, D.F., Carlos, T.S., Stock, N., Goodbourn, S. and Randall, R.E. 2004. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**: 17264-9.
- Andres, O., Obojes, K., Kim, K.S., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, J. 2003. CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wild-type measles viruses. *J Gen Virol*, **84**: 1189-97.
- Auwaerter, P.G., Rota, P.A., Elkins, W.R., Adams, R.J., DeLozier, T., Shi, Y., Bellini, W.J., Murphy, B.R. and Griffin, D.E. 1999. Measles virus infection in rhesus macaques: altered immune responses and comparison of the virulence of six different virus strains. *J Infect Dis*, **180**: 950-8.
- Ayata, M., Kimoto, T., Hayashi, K., Seto, T., Murata, R. and Ogura, H. 1998. Nucleotide sequences of the matrix protein gene of subacute sclerosing panencephalitis viruses compared with local contemporary isolates from patients with acute measles. *Virus Res*, **54**: 107-15.
- Ayata, M., Shingai, M., Ning, X., Matsumoto, M., Seya, T., Otani, S., Seto, T., Ohgimoto, S. and Ogura, H. 2007. Effect of the alterations in the fusion protein of measles virus isolated from brains of patients with subacute sclerosing panencephalitis on syncytium formation. *Virus Res*, **130**: 260-8.

**B<sub>3</sub>**

- Baczko, K., Liebert, U.G., Billeter, M., Cattaneo, R., Budka, H. and ter Meulen, V. 1986. Expression of defective measles virus genes in brain tissues of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J Virol*, **59**: 472-8.
- Balicer, R.D. 2007. Modeling infectious diseases dissemination through online role-playing games. *Epidemiology*, **18**: 260-1.
- Ball, C.L., Gilchrist, M.A. and Coombs, D. 2007. Modeling within-host evolution of HIV: mutation, competition and strain replacement. *Bull Math Biol*, **69**: 2361-85.
- Barnes, B.J., Moore, P.A. and Pitha, P.M. 2001. Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon alpha genes. *J Biol Chem*, **276**: 23382-90.
- Baron, M.D. and Barrett, T. 2000. Rinderpest viruses lacking the C and V proteins show specific defects in growth and transcription of viral RNAs. *J Virol*, **74**: 2603-11.
- Barr, J.N., Whelan, S.P. and Wertz, G.W. 2002. Transcriptional control of the RNA-dependent RNA polymerase of vesicular stomatitis virus. *Biochim Biophys Acta*, **1577**: 337-53.
- Bazhan, S.I. and Belova, O.E. 1999. Interferon-induced antiviral resistance. A mathematical model of regulation of Mx1 protein induction and action. *J Theor Biol*, **198**: 375-93.
- Beauchemin, C. 2006. Probing the effects of the well-mixed assumption on viral infection dynamics. *J Theor Biol*, **242**: 464-77.
- Beauchemin, C., Dixit, N.M. and Perelson, A.S. 2007. Characterizing T cell movement within lymph nodes in the absence of antigen. *J Immunol*, **178**: 5505-12.
- Beauchemin, C., Samuel, J. and Tuszynski, J. 2005. A simple cellular automaton model for influenza A viral infections. *J Theor Biol*, **232**: 223-34.

- Bellini, W.J., Englund, G., Rozenblatt, S., Arnheiter, H. and Richardson, C.D. 1985. Measles virus P gene codes for two proteins. *J Virol*, **53**: 908-19.
- Berghall, H., Siren, J., Sarkar, D., Julkunen, I., Fisher, P.B., Vainionpaa, R. and Matikainen, S. 2006. The interferon-inducible RNA helicase, mda-5, is involved in measles virus-induced expression of antiviral cytokines. *Microbes Infect*.
- Bhella, D., Ralph, A. and Yeo, R.P. 2004. Conformational flexibility in recombinant measles virus nucleocapsids visualised by cryo-negative stain electron microscopy and real-space helical reconstruction. *J Mol Biol*, **340**: 319-31.
- Bieback, K., Lien, E., Klagge, I.M., Avota, E., Schneider-Schaulies, J., Duprex, W.P., Wagner, H., Kirschning, C.J., Ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, S. 2002. Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol*, **76**: 8729-36.
- Billeter, M.A., Baczkó, K., Schmid, A. and Ter Meulen, V. 1984. Cloning of DNA corresponding to four different measles virus genomic regions. *Virology*, **132**: 147-59.
- Blain, F., Liston, P. and Briedis, D.J. 1995. The carboxy-terminal 18 amino acids of the measles virus hemagglutinin are essential for its biological function. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **214**: 1232-1238.
- Blomberg, S., Eloranta, M.L., Magnusson, M., Alm, G.V. and Ronnblom, L. 2003. Expression of the markers BDCA-2 and BDCA-4 and production of interferon-alpha by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, **48**: 2524-32.
- Blumberg, B.M., Crowley, J.C., Silverman, J.I., Menonna, J., Cook, S.D. and Dowling, P.C. 1988. Measles virus L protein evidences elements of ancestral RNA polymerase. *Virology*, **164**: 487-497.
- Blumberg, B.M. and Kolakofsky, D. 1981. Intracellular vesicular stomatitis virus leader RNAs are found in nucleocapsid structures. *J Virol*, **40**: 568-76.
- Bohn, W., Rutter, G., Hohenberg, H., Mannweiler, K. and Nobis, P. 1986. Involvement of actin filaments in budding of measles virus: studies on cytoskeletons of infected cells. *Virology*, **149**: 91-106.
- Borges, M.B., Caride, E., Jabor, A.V., Malachias, J.M., Freire, M.S., Homma, A. and Galler, R. 2008. Study of the genetic stability of measles virus CAM-70 vaccine strain after serial passages in chicken embryo fibroblasts primary cultures. *Virus Genes*, **36**: 35-44.
- Bourhis, J.M., Canard, B. and Longhi, S. 2006. Structural disorder within the replicative complex of measles virus: functional implications. *Virology*, **344**: 94-110.
- Bourhis, J.M., Receveur-Brechot, V., Oglesbee, M., Zhang, X., Buccellato, M., Darbon, H., Canard, B., Finet, S. and Longhi, S. 2005. The intrinsically disordered C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein interacts with the C-terminal domain of the phosphoprotein via two distinct sites and remains predominantly unfolded. *Protein Sci*, **14**: 1975-92.



- Caignard, G., Guerbois, M., Labernardiere, J.L., Jacob, Y., Jones, L.M., Wild, F., Tangy, F. and Vidalain, P.O. 2007. Measles virus V protein blocks Jak1-mediated phosphorylation of STAT1 to escape IFN-alpha/beta signaling. *Virology*.
- Calain, P. and Roux, L. 1988. Generation of measles virus defective interfering particles and their presence in a preparation of attenuated live-virus vaccine. *J. Virol.*, **62**: 2859-2866.
- Castaneda, S.J. and Wong, T.C. 1989. Measles virus synthesizes both leaderless and leader-containing polyadenylated RNAs in vivo. *J Virol*, **63**: 2977-86.

- Cathomen, T., Buchholz, C.J., Spielhofer, P. and Cattaneo, R. 1995. Preferential initiation at the second AUG of the measles virus F mRNA: a role for the long untranslated region., *214*: 628-632.
- Cathomen, T., Mrkic, B., Spehner, D., Drillien, R., Naef, R., Pavlovic, J., Aguzzi, A., Billeter, M.A. and Cattaneo, R. 1998. A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *Embo J*, **17**: 3899-908.
- Cattaneo, R., Kaelin, K., Baczko, K. and Billeter, M.A. 1989. Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell*, **56**: 759-764.
- Cattaneo, R., Rebmann, G., Schmid, A., Baczko, K., ter Meulen, V. and Billeter, M.A. 1987. Altered transcription of a defective measles virus genome derived from a diseased human brain. *Embo J*, **6**: 681-8.
- Cevik, B., Smallwood, S. and Moyer, S.A. 2003. The L-L oligomerization domain resides at the very N-terminus of the sendai virus L RNA polymerase protein. *Virology*, **313**: 525-36.
- Cevik, B., Smallwood, S. and Moyer, S.A. 2007. Two N-terminal regions of the Sendai virus L RNA polymerase protein participate in oligomerization. *Virology*, **363**: 189-97.
- Chaperot, L., Bendriss, N., Manches, O., Gressin, R., Maynadie, M., Trimoreau, F., Orfeuvre, H., Corront, B., Feuillard, J., Sotto, J.-J., Bensa, J.-C., Briere, F., Plumas, J. and Jacob, M.-C. 2001. Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. *Blood*, **97**: 3210-3217.
- Chen, M., Cortay, J.C., Logan, I.R., Sapountzi, V., Robson, C.N. and Gerlier, D. 2005. Inhibition of ubiquitination and stabilization of human ubiquitin E3 ligase PIRH2 by measles virus phosphoprotein. *J Virol*, **79**: 11824-36.
- Ciupe, S.M., Ribeiro, R.M., Nelson, P.W., Dusheiko, G. and Perelson, A.S. 2007a. The role of cells refractory to productive infection in acute hepatitis B viral dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**: 5050-5.
- Ciupe, S.M., Ribeiro, R.M., Nelson, P.W. and Perelson, A.S. 2007b. Modeling the mechanisms of acute hepatitis B virus infection. *J Theor Biol*, **247**: 23-35.
- Colf, L.A., Juo, Z.S. and Garcia, K.C. 2007. Structure of the measles virus hemagglutinin. *Nat Struct Mol Biol*, **14**: 1227-8.
- Coombs, D., Gilchrist, M.A., Percus, J. and Perelson, A.S. 2003. Optimal viral production. *Bull Math Biol*, **65**: 1003-23.
- Coronel, E.C., Takimoto, T., Murti, K.G., Varich, N. and Portner, A. 2001. Nucleocapsid Incorporation into Parainfluenza Virus Is Regulated by Specific Interaction with Matrix Protein. *J Virol*, **75**: 1117-1123.
- Cruz, C.D., Palosaari, H., Parisien, J.P., Devaux, P., Cattaneo, R., Ouchi, T. and Horvath, C.M. 2006. Measles virus V protein inhibits p53 family member p73. *J Virol*, **80**: 5644-50.
- Curran, J. 1998. A role for the Sendai virus P protein trimer in RNA synthesis. *J Virol*, **72**: 4274-80.
- Curran, J., Boeck, R., Lin-Marq, N., Lupas, A. and Kolakofsky, D. 1995. Paramyxovirus phosphoproteins form homotrimers as determined by an epitope dilution assay, via predicted coiled coils. *Virology*, **214**: 139-49.
- Curran, J.A. and Kolakofsky, D. 1991. Rescue of a Sendai virus DI genome by other parainfluenza viruses : Implications for genome replication. *Virology*, **182**: 168-176.



- Dahari, H., Lo, A., Ribeiro, R.M. and Perelson, A.S. 2007a. Modeling hepatitis C virus dynamics: liver regeneration and critical drug efficacy. *J Theor Biol*, **247**: 371-81.
- Dahari, H., Major, M., Zhang, X., Mihalik, K., Rice, C.M., Perelson, A.S., Feinstone, S.M. and Neumann, A.U. 2005. Mathematical modeling of primary hepatitis C infection: noncytolytic clearance and early blockage of virion production. *Gastroenterology*, **128**: 1056-66.
- Dahari, H. and Perelson, A.S. 2007. Hepatitis C virus RNA kinetics: drug efficacy and the rate of HCV-infected cells loss. *World J Gastroenterol*, **13**: 3020-1.
- Dahari, H., Ribeiro, R.M., Rice, C.M. and Perelson, A.S. 2007b. Mathematical modeling of subgenomic hepatitis C virus replication in Huh-7 cells. *J Virol*, **81**: 750-60.
- Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M. and Stark, G.R. 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, **264**: 1415-21.
- Darzacq, X., Shav-Tal, Y., de Turriz, V., Brody, Y., Shenoy, S.M., Phair, R.D. and Singer, R.H. 2007. In vivo dynamics of RNA polymerase II transcription. *Nat Struct Mol Biol*, **14**: 796-806.
- de Witte, L., Abt, M., Schneider-Schaulies, S., van Kooyk, Y. and Geijtenbeek, T.B. 2006. Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection. *J Virol*, **80**: 3477-86.
- de Witte, L., Nabatov, A. and Geijtenbeek, T.B. 2008. Distinct roles for DC-SIGN<sup>+</sup>-dendritic cells and Langerhans cells in HIV-1 transmission. *Trends Mol Med*, **14**: 12-9.
- Delenda, C., Taylor, G., Hausmann, S., Garcin, D. and Kolakofsky, D. 1998. Sendai viruses with altered P, V, and W protein expression. *Virology*, **242**: 327-337.
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R. and Silverman, R.H. 1998. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 15623-8.
- Devaux, P. and Cattaneo, R. 2004. Measles virus phosphoprotein gene products: conformational flexibility of the P/V protein amino-terminal domain and C protein infectivity factor function. *J Virol*, **78**: 11632-40.
- Devaux, P., von Messling, V., Songsungthong, W., Springfield, C. and Cattaneo, R. 2007. Tyrosine 110 in the measles virus phosphoprotein is required to block STAT1 phosphorylation. *Virology*, **360**: 72-83.
- Dixit, N.M., Layden-Almer, J.E., Layden, T.J. and Perelson, A.S. 2004. Modelling how ribavirin improves interferon response rates in hepatitis C virus infection. *Nature*, **432**: 922-4.
- Dorig, R.E., Marcil, A., Chopra, A. and Richardson, C.D. 1993. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell*, **75**: 295-305.
- Druelle, J., Sellin, C.I., Waku-Kouomou, D., Horvat, B. and Wild, F.T. 2008. Wild type measles virus attenuation independent of type I IFN. *Virol J*, **5**: 22.
- Dzionic, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W. and Schmitz, J. 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol*, **165**: 6037-46.
- Dzionic, A., Inagaki, Y., Okawa, K., Nagafune, J., Rock, J., Sohma, Y., Winkels, G., Zysk, M., Yamaguchi, Y. and Schmitz, J. 2002. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum Immunol*, **63**: 1133-48.
- Dzionic, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Gunther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T., Okada, T., Vermi, W., Winkels, G., Yamamoto, T., Zysk, M., Yamaguchi, Y. and Schmitz, J. 2001. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med*, **194**: 1823-34.

**E<sub>1</sub>**

Enders, J.F. and Peebles, T.C. 1954. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc Soc Exp Biol Med*, **86**: 277-86.

Erlenhofer, C., Duprex, W.P., Rima, B.K., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, J. 2002. Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus. *J Gen Virol*, **83**: 1431-6.

Escoffier, C., Manie, S., Vincent, S., Muller, C.P., Billeter, M. and Gerlier, D. 1999. Nonstructural C protein is required for efficient measles virus replication in human peripheral blood cells. *J Virol*, **73**: 1695-8.

Etchart, N., Hennino, A., Friede, M., Dahel, K., Dupouy, M., Goujon-Henry, C., Nicolas, J.F. and Kaiserlian, D. 2007. Safety and efficacy of transcutaneous vaccination using a patch with the live-attenuated measles vaccine in humans. *Vaccine*, **25**: 6891-9.

**F<sub>4</sub>**

Feldman, S.A., Hendry, R.M. and Beeler, J.A. 1999. Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. *J Virol*, **73**: 6610-7.

Feldman, S.B., Ferraro, M., Zheng, H.M., Patel, N., Gould-Fogerite, S. and Fitzgerald-Bocarsly, P. 1994. Viral induction of low frequency interferon-alpha producing cells. *Virology*, **204**: 1-7.

Ferran, M.C. and Lucas-Lenard, J.M. 1997. The vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits transcription from the human beta interferon promoter. *J Virol*, **71**: 371-7.

Ferron, F., Longhi, S., Henrissat, B. and Canard, B. 2002. Viral RNA-polymerases – a predicted 2'-O-ribose methyltransferase domain shared by all Mononegavirales. *Trends Biochem Sci*, **27**: 222-4.

Flanagan, E.B., Schoeb, T.R. and Wertz, G.W. 2003. Vesicular stomatitis viruses with rearranged genomes have altered invasiveness and neuropathogenesis in mice. *J Virol*, **77**: 5740-8.

Fleischli, C., Sirena, D., Lesage, G., Havenga, M.J., Cattaneo, R., Greber, U.F. and Hemmi, S. 2007. Species B adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 35 share similar binding sites on the membrane cofactor protein CD46 receptor. *J Gen Virol*, **88**: 2925-34.

Fontana, J.M., Bankamp, B., Bellini, W.J. and Rota, P.A. 2008. Regulation of interferon signaling by the C and V proteins from attenuated and wild-type strains of measles virus. *Virology*, **374**: 71-81.

Frank, I., Kacani, L., Stoiber, H., Stossel, H., Spruth, M., Steindl, F., Romani, N. and Dierich, M.P. 1999. Human immunodeficiency virus type 1 derived from cocultures of immature dendritic cells with autologous T cells carries T-cell-specific molecules on its surface and is highly infectious. *J Virol*, **73**: 3449-54.

Frank, S.A. 2000. Within-host spatial dynamics of viruses and defective interfering particles. *J Theor Biol*, **206**: 279-90.

Funk, G.A., Jansen, V.A., Bonhoeffer, S. and Killingback, T. 2005. Spatial models of virus-immune dynamics. *J Theor Biol*, **233**: 221-36.



**G<sub>2</sub>**

- Galibert, L., Maliszewski, C.R. and Vandenabeele, S. 2001. Plasmacytoid monocytes/T cells: a dendritic cell lineage? *Semin Immunol*, **13**: 283-9.
- Garcia, M., Yu, X.F., Griffin, D.E. and Moss, W.J. 2005. In vitro suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by measles virus. *J Virol*, **79**: 9197-205.
- Gerlier, D., Garnier, F. and Forquet, F. 1988. Haemagglutinin of measles virus: purification and storage with preservation of biological and immunological properties. *J Gen Virol*, **69** (Pt 8): 2061-9.
- Gobl, A.E., Funa, K. and Alm, G.V. 1988. Different induction patterns of mRNA for IFN-alpha and -beta in human mononuclear leukocytes after in vitro stimulation with herpes simplex virus-infected fibroblasts and Sendai virus. *J Immunol*, **140**: 3605-9.
- Gombart, A.F., Hirano, A. and Wong, T.C. 1993. Conformational maturation of measles virus nucleocapsid protein. *J. Virol*, **67**: 4133-4141.
- Grandvaux, N., tenOever, B.R., Servant, M.J. and Hiscott, J. 2002. The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion. *Curr Opin Infect Dis*, **15**: 259-67.
- Griffin, D.E. 2006. Measles Virus. In Fields Virology 5th edition, pp. 1551-1585. D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, and S.E. Straus, Eds.
- Guedj, J., Thiebaut, R. and Commenges, D. 2007a. Maximum likelihood estimation in dynamical models of HIV. *Biometrics*, **63**: 1198-206.
- Guedj, J., Thiebaut, R. and Commenges, D. 2007b. Practical identifiability of HIV dynamics models. *Bull Math Biol*, **69**: 2493-513.

**H<sub>4</sub>**

- Hahm, B., Arbour, N., Nanche, D., Homann, D., Manchester, M. and Oldstone, M.B. 2003. Measles virus infects and suppresses proliferation of T lymphocytes from transgenic mice bearing human signaling lymphocytic activation molecule. *J Virol*, **77**: 3505-15.
- Hahm, B., Arbour, N. and Oldstone, M.B. 2004. Measles virus interacts with human SLAM receptor on dendritic cells to cause immunosuppression. *Virology*, **323**: 292-302.
- Halford, W.P., Halford, K.J. and Pierce, A.T. 2005. Mathematical analysis demonstrates that interferons-beta and -gamma interact in a multiplicative manner to disrupt herpes simplex virus replication. *J Theor Biol*, **234**: 439-54.
- Hall, W.W., Martin, S.J. and Gould, E. 1974. Defective interfering particles produced during the replication of measles virus. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, **160**: 155-64.
- Hancioglu, B., Swigon, D. and Clermont, G. 2007. A dynamical model of human immune response to influenza A virus infection. *J Theor Biol*, **246**: 70-86.
- Hasegawa, K., Hu, C., Nakamura, T., Marks, J.D., Russell, S.J. and Peng, K.W. 2007. Affinity thresholds for membrane fusion triggering by viral glycoproteins. *J Virol*, **81**: 13149-57.
- Hausmann, S., Garcin, D., Delenda, C. and Kolakofsky, D. 1999. The versatility of paramyxovirus RNA polymerase stuttering. *J Virol*, **73**: 5568-76.
- Heider, A., Santibanez, S., Tischer, A., Gerike, E., Tikhonova, N., Ignatyev, G., Mrazova, M., Enders, G. and Schreier, E. 1997. Comparative investigation of the long non-coding M-F genome region of wild-type and vaccine measles viruses. *Arch Virol*, **142**: 2521-8.

Helin, E., Vainionpää, R., Hyypia, T., Julkunen, I. and Matikainen, S. 2001. Measles virus activates NF-kappa B and STAT transcription factors and production of IFN-alpha/beta and IL-6 in the human lung epithelial cell line A549. *Virology*, **290**: 1-10.

Herschke, F., Plumet, S., Duhon, T., Azocar, O., Druelle, J., Laine, D., Wild, T.F., Roubourdin-Combe, C., Gerlier, D. and Valentin, H. 2007. Cell-cell fusion induced by measles virus amplifies the type I interferon response. *J Virol*, **81**: 12859-71.

Hirano, A., Ayata, M. and Wang, A.H. 1993. Functional analysis of matrix proteins expressed from cloned genes of measles virus variants that cause subacute sclerosing panencephalitis reveals a common defect in nucleocapsid binding. *J. Virol.*, **67**: 1848-1853.

Hoffman, S.J., Polack, F.P., Hauer, D.A., Singh, M., Billeter, M.A., Adams, R.J. and Griffin, D.E. 2003. Vaccination of rhesus macaques with a recombinant measles virus expressing interleukin-12 alters humoral and cellular immune responses. *J Infect Dis*, **188**: 1553-61.

Horikami, S.M., Smallwood, S., Bankamp, B. and Moyer, S.A. 1994. An amino-proximal domain of the L protein binds to the P protein in the measles virus RNA polymerase complex. *Virology*, **205**: 540-5.

Horikami, S.M., Smallwood, S. and Moyer, S.A. 1996. The Sendai virus V protein interacts with the NP protein to regulate viral genome RNA replication. *Virology*, **222**: 383-390.

Horvat, B., Rivaller, P., Varior-Krishnan, G., Cardoso, A., Gerlier, D. and Roubourdin-Combe, C. 1996. Transgenic mice expressing human measles virus (MV) receptor CD46 provide cells exhibiting different permissivities to MV infections. *J Virol*, **70**: 6673-81.

Howat, T.J., Barreca, C., O'Hare, P., Gog, J.R. and Grenfell, B.T. 2006. Modelling dynamics of the type I interferon response to in vitro viral infection. *J R Soc Interface*, **3**: 699-709.

Hu, A., Cattaneo, R., Schwartz, S. and Norrby, E. 1994. Role of N-linked oligosaccharide chains in the processing and antigenicity of measles virus haemagglutinin protein. *J. Gen. Virol.*, **75**: 1043-1052.

Hu, L., Wang, Z., Hu, C., Liu, X., Yao, L., Li, W. and Qi, Y. 2005. Inhibition of Measles virus multiplication in cell culture by RNA interference. *Acta Virol*, **49**: 227-34.

Huber, M., Cattaneo, R., Spielhofer, P., Orvell, C., Norrby, E., Messerli, M., Perriard, J.C. and Billeter, M.A. 1991. Measles virus phosphoprotein retains the nucleocapsid protein in the cytoplasm., **185**: 299-308.



Isaacs, A. and Lindenmann, J. 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **147**: 258-67.



Kang, D.C., Gopalkrishnan, R.V., Wu, O., Jankowsky, E., Pyle, A.M. and Fisher, P.B. 2002. mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**: 637-42.

Karlin, D., Longhi, S. and Canard, B. 2002a. Substitution of two residues in the measles virus nucleoprotein results in an impaired self-association. *Virology*, **302**: 420-32.

- Karlin, D., Longhi, S., Receveur, V. and Canard, B. 2002b. The N-terminal domain of the phosphoprotein of Morbilliviruses belongs to the natively unfolded class of proteins. *Virology*, **296**: 251-62.
- Kato, A., Kiyotani, K., Sakai, Y., Yoshida, T. and Nagai, Y. 1997. The paramyxovirus, Sendai virus, V protein encodes a luxury function required for viral pathogenesis. *Embo J*, **16**: 578-87.
- Katz, S.L., Milovanovic, M.V. and Enders, J.F. 1958. Propagation of measles virus in cultures of chick embryo cells. *Proc Soc Exp Biol Med*, **97**: 23-9.
- Kaur, A., Di Mascio, M., Barabasz, A., Rosenzweig, M., McClure, H.M., Perelson, A.S., Ribeiro, R.M. and Johnson, R.P. 2008. Dynamics of T- and B-lymphocyte turnover in a natural host of simian immunodeficiency virus. *J Virol*, **82**: 1084-93.
- Kerdiles, Y.M., Sellin, C.I., Druelle, J. and Horvat, B. 2006. Immunosuppression caused by measles virus: role of viral proteins. *Rev Med Virol*, **16**: 49-63.
- Kiley, M.P., Gray, R.H. and Payne, F.E. 1974. Replication of measles virus: distinct species of short nucleocapsids in cytoplasmic extracts of infected cells. *J Virol*, **13**: 721-8.
- Kobune, F., Sakata, H. and Sugiura, A. 1990. Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus. *J Virol*, **64**: 700-5.
- Kolakofsky, D. 1982. Isolation of vesicular stomatitis virus defective interfering genomes with different amounts of 5'-terminal complementarity. *J Virol*, **41**: 566-74.
- Kolakofsky, D., Roux, L., Garcin, D. and Ruigrok, R.W. 2005. Paramyxovirus mRNA editing, the "rule of six" and error catastrophe: a hypothesis. *J Gen Virol*, **86**: 1869-77.
- Kotenko, S.V., Gallagher, G., Baurin, V.V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N.K., Langer, J.A., Sheikh, F., Dickensheets, H. and Donnelly, R.P. 2003. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol*, **4**: 69-77.
- Kouomou, D.W. and Wild, T.F. 2002. Adaptation of wild-type measles virus to tissue culture. *J Virol*, **76**: 1505-9.
- Krakauer, D.C. and Komarova, N.L. 2003. Levels of selection in positive-strand virus dynamics. *J Evol Biol*, **16**: 64-73.
- Laine, D., Trescol-Biemont, M.C., Longhi, S., Libeau, G., Marie, J.C., Vidalain, P.O., Azocar, O., Diallo, A., Canard, B., Rabourdin-Combe, C. and Valentin, H. 2003. Measles virus (MV) nucleoprotein binds to a novel cell surface receptor distinct from FcγRIII via its C-terminal domain: role in MV-induced immunosuppression. *J Virol*, **77**: 11332-46.



- Lamb, R.A. and Takeda, M. 2001. Death by influenza virus protein. *Nat Med*, **7**: 1286-8.
- Landi, A., Mazzoldi, A., Andreoni, C., Bianchi, M., Cavallini, A., Laurino, M., Ricotti, L., Iuliano, R., Matteoli, B. and Ceccherini-Nelli, L. 2008. Modelling and control of HIV dynamics. *Comput Methods Programs Biomed*, **89**: 162-8.
- Langedijk, J.P.M., Daus, F.J. and van Oirschot, J.T. 1997. Sequence and structure alignment of Paramyxoviridae attachment proteins and discovery of enzymatic activity for a morbillivirus hemagglutinin. *J. Virol.*, **71**: 6155-6167.
- Lawrence, D.M., Vaughn, M.M., Belman, A.R., Cole, J.S. and Rall, G.F. 1999. Immune response-mediated protection of adult but not neonatal mice from neuron-restricted measles virus infection and central nervous system disease. *J Virol*, **73**: 1795-801.
- Lennert, K. and Remmele, W. 1958. [Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes.]. *Acta Haematol*, **19**: 99-113.

Liston, P. and Briedis, D.J. 1995. Ribosomal frameshifting during translation of measles virus P protein mRNA is capable of directing synthesis of a unique protein. *J. Virol.*, **69**: 6742-6750.

Luisi, P.L., Ferri, F. and Stano, P. 2006. Approaches to semi-synthetic minimal cells: a review. *Naturwissenschaften*, **93**: 1-13.

Lund, G.A., Tyrrell, D.L., Bradley, R.D. and Scraba, D.G. 1984. The molecular length of measles virus RNA and the structural organization of measles nucleocapsids. *J Gen Virol*, **65** ( Pt 9): 1535-42.



Mandl, J.N., Regoes, R.R., Garber, D.A. and Feinberg, M.B. 2007. Estimating the effectiveness of simian immunodeficiency virus-specific CD8+ T cells from the dynamics of viral immune escape. *J Virol*, **81**: 11982-91.

Manie, S.N., Debreyne, S., Vincent, S. and Gerlier, D. 2000. Measles virus structural components are enriched into lipid raft microdomains: a potential cellular location for virus assembly. *J Virol*, **74**: 305-11.

Masse, N., Ainouze, M., Neel, B., Wild, T.F., Buckland, R. and Langedijk, J.P. 2004. Measles virus (MV) hemagglutinin: evidence that attachment sites for MV receptors SLAM and CD46 overlap on the globular head. *J Virol*, **78**: 9051-63.

Masse, N., Barrett, T., Muller, C.P., Wild, T.F. and Buckland, R. 2002. Identification of a second major site for CD46 binding in the hemagglutinin protein from a laboratory strain of measles virus (MV): potential consequences for wild-type MV infection. *J Virol*, **76**: 13034-8.

Matthews, L. and Woolhouse, M. 2005. New approaches to quantifying the spread of infection. *Nat Rev Microbiol*, **3**: 529-36.

McLeod, B. and Burroughs, N. 2000. Defective deletion mutant amplification. *J Theor Biol*, **206**: 449-64.

Minagawa, H., Tanaka, K., Ono, N., Tatsuo, H. and Yanagi, Y. 2001. Induction of the measles virus receptor SLAM (CD150) on monocytes. *J Gen Virol*, **82**: 2913-7.

Mittler, J.E., Markowitz, M., Ho, D.D. and Perelson, A.S. 1999. Improved estimates for HIV-1 clearance rate and intracellular delay. *Aids*, **13**: 1415-7.

Mittler, J.E., Sulzer, B., Neumann, A.U. and Perelson, A.S. 1998. Influence of delayed viral production on viral dynamics in HIV-1 infected patients. *Math Biosci*, **152**: 143-63.

Mohler, L., Flockerzi, D., Sann, H. and Reichl, U. 2005. Mathematical model of influenza A virus production in large-scale microcarrier culture. *Biotechnol Bioeng*, **90**: 46-58.

Moynagh, P.N. 2005a. The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci*, **118**: 4589-92.

Moynagh, P.N. 2005b. TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol*, **26**: 469-76.

Mrkic, B., Odermatt, B., Klein, M.A., Billeter, M.A., Pavlovic, J. and Cattaneo, R. 2000. Lymphatic dissemination and comparative pathology of recombinant measles viruses in genetically modified mice. *J Virol*, **74**: 1364-72.

Murray, J.M., Kaufmann, G., Kelleher, A.D. and Cooper, D.A. 1998. A model of primary HIV-1 infection. *Math Biosci*, **154**: 57-85.

Murray, J.M., Wieland, S.F., Purcell, R.H. and Chisari, F.V. 2005. Dynamics of hepatitis B virus clearance in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**: 17780-5.

**N<sub>1</sub>**

- Naim, H.Y., Ehler, E. and Billeter, M.A. 2000. Measles virus matrix protein specifies apical virus release and glycoprotein sorting in epithelial cells. *Embo J*, **19**: 3576-85.
- Nakatsu, Y., Takeda, M., Ohno, S., Koga, R. and Yanagi, Y. 2006. Translational inhibition and increased interferon induction in cells infected with C protein-deficient measles virus. *J Virol*, **80**: 11861-7.
- Nakaya, T., Sato, M., Hata, N., Asagiri, M., Suemori, H., Noguchi, S., Tanaka, N. and Taniguchi, T. 2001. Gene induction pathways mediated by distinct IRFs during viral infection. *Biochem Biophys Res Commun*, **283**: 1150-6.
- Naniche, D., Varior-Krishnan, G., Cervoni, F., Wild, T.F., Rossi, B., Rabourdin-Combe, C. and Gerlier, D. 1993. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol*, **67**: 6025-32.
- Naniche, D., Yeh, A., Eto, D., Manchester, M., Friedman, R.M. and Oldstone, M.B. 2000. Evasion of host defenses by measles virus: wild-type measles virus infection interferes with induction of Alpha/Beta interferon production. *J Virol*, **74**: 7478-84.
- Nelson, G.W. and Perelson, A.S. 1995. Modeling defective interfering virus therapy for AIDS: conditions for DIV survival. *Math Biosci*, **125**: 127-53.
- Nishie, T., Nagata, K. and Takeuchi, K. 2007. The C protein of wild-type measles virus has the ability to shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *Microbes Infect*, **9**: 344-54.
- Norrby, E., Kristensson, K., Brzosko, W.J. and Kapsenberg, J.G. 1985. Measles virus matrix protein detected by immune fluorescence with monoclonal antibodies in the brain of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J Virol*, **56**: 337-40.
- Novella, I.S., Ball, L.A. and Wertz, G.W. 2004. Fitness analyses of vesicular stomatitis strains with rearranged genomes reveal replicative disadvantages. *J Virol*, **78**: 9837-41.
- Novella, I.S. and Ebendick-Corpus, B.E. 2004. Molecular basis of fitness loss and fitness recovery in vesicular stomatitis virus. *J Mol Biol*, **342**: 1423-30.

**O<sub>1</sub>**

- Ogino, T., Kobayashi, M., Iwama, M. and Mizumoto, K. 2005. Sendai virus RNA-dependent RNA polymerase L protein catalyzes cap methylation of virus-specific mRNA. *J Biol Chem*, **280**: 4429-35.
- Ohno, S., Ono, N., Seki, F., Takeda, M., Kura, S., Tsuzuki, T. and Yanagi, Y. 2007. Measles virus infection of SLAM (CD150) knockin mice reproduces tropism and immunosuppression in human infection. *J Virol*, **81**: 1650-9.
- Ohno, S., Ono, N., Takeda, M., Takeuchi, K. and Yanagi, Y. 2004. Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction. *J Gen Virol*, **85**: 2991-9.
- Oldstone, M.B., Lewicki, H., Thomas, D., Tishon, A., Dales, S., Patterson, J., Manchester, M., Homann, D., Naniche, D. and Holz, A. 1999. Measles virus infection in a transgenic model: virus-induced immunosuppression and central nervous system disease. *Cell*, **98**: 629-40.
- Ono, N., Tatsuo, H., Hidaka, Y., Aoki, T., Minagawa, H. and Yanagi, Y. 2001. Measles viruses on throat swabs from measles patients use signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as a cellular receptor. *J Virol*, **75**: 4399-401.



- Palosaari, H., Parisien, J.P., Rodriguez, J.J., Ulane, C.M. and Horvath, C.M. 2003. STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J Virol*, **77**: 7635-44.
- Parks, C.L., Lerch, R.A., Walpita, P., Wang, H.P., Sidhu, M.S. and Udem, S.A. 2001a. Analysis of the noncoding regions of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. *J Virol*, **75**: 921-33.
- Parks, C.L., Lerch, R.A., Walpita, P., Wang, H.P., Sidhu, M.S. and Udem, S.A. 2001b. Comparison of predicted amino acid sequences of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. *J Virol*, **75**: 910-20.
- Parks, C.L., Lerch, R.A., Walpita, P., Wang, H.P., Sidhu, M.S. and Udem, S.A. 2001c. Comparison of predicted amino acid sequences of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. *J Virol*, **75**: 910-20.
- Parks, C.L., Witko, S.E., Kotash, C., Lin, S.L., Sidhu, M.S. and Udem, S.A. 2006. Role of V protein RNA binding in inhibition of measles virus minigenome replication. *Virology*, **348**: 96-106.
- Patterson, J.B., Manchester, M. and Oldstone, M.B. 2001. Disease model: dissecting the pathogenesis of the measles virus. *Trends Mol Med*, **7**: 85-8.
- Patterson, J.B., Thomas, D., Lewicki, H., Billeter, M.A. and Oldstone, M.B. 2000. V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo. *Virology*, **267**: 80-9.
- Perelson, A.S. 1999. Viral kinetics and mathematical models. *Am J Med*, **107**: 49S-52S.
- Perelson, A.S., Essunger, P., Cao, Y., Vesanen, M., Hurley, A., Saksela, K., Markowitz, M. and Ho, D.D. 1997a. Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature*, **387**: 188-91.
- Perelson, A.S., Essunger, P. and Ho, D.D. 1997b. Dynamics of HIV-1 and CD4+ lymphocytes in vivo. *Aids*, **11 Suppl A**: S17-24.
- Perelson, A.S., Herrmann, E., Micol, F. and Zeuzem, S. 2005. New kinetic models for the hepatitis C virus. *Hepatology*, **42**: 749-54.
- Perelson, A.S., Neumann, A.U., Markowitz, M., Leonard, J.M. and Ho, D.D. 1996. HIV-1 dynamics *in vivo*: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*, **271**: 1582-1586.
- Permar, S.R., Klumpp, S.A., Mansfield, K.G., Kim, W.K., Gorgone, D.A., Lifton, M.A., Williams, K.C., Schmitz, J.E., Reimann, K.A., Axthelm, M.K., Polack, F.P., Griffin, D.E. and Letvin, N.L. 2003. Role of CD8(+) lymphocytes in control and clearance of measles virus infection of rhesus monkeys. *J Virol*, **77**: 4396-400.
- Permar, S.R., Rao, S.S., Sun, Y., Bao, S., Buzby, A.P., Kang, H.H. and Letvin, N.L. 2007. Clinical measles after measles virus challenge in simian immunodeficiency virus-infected measles virus-vaccinated rhesus monkeys. *J Infect Dis*, **196**: 1784-93.
- Plempner, R.K., Hammond, A.L. and Cattaneo, R. 2000. Characterization of a region of the measles virus hemagglutinin sufficient for its dimerization. *J Virol*, **74**: 6485-93.
- Plempner, R.K., Hammond, A.L. and Cattaneo, R. 2001. Measles virus envelope glycoproteins hetero-oligomerize in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **276**: 44239-46.
- Plempner, R.K., Hammond, A.L., Gerlier, D., Fielding, A.K. and Cattaneo, R. 2002. Strength of envelope protein interaction modulates cytopathicity of measles virus. *J Virol*, **76**: 5051-61.
- Plumet, S., Duprex, W.P. and Gerlier, D. 2005. Dynamics of viral RNA synthesis during measles virus infection. *J Virol*, **79**: 6900-8.

Plumet, S., Herschke, F., Bourhis, J.M., Valentin, H., Longhi, S. and Gerlier, D. 2007. Cytosolic 5'-Triphosphate Ended Viral Leader Transcript of Measles Virus as Activator of the RIG I-Mediated Interferon Response. *PLoS ONE*, **2**: e279.

Polack, F.P., Auwaerter, P.G., Lee, S.H., Nousari, H.C., Valsamakis, A., Leiferman, K.M., Diwan, A., Adams, R.J. and Griffin, D.E. 1999. Production of atypical measles in rhesus macaques: evidence for disease mediated by immune complex formation and eosinophils in the presence of fusion-inhibiting antibody. *Nat Med*, **5**: 629-34.

Prehaud, C., Megret, F., Lafage, M. and Lafon, M. 2005. Virus infection switches TLR-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon. *J Virol*, **79**: 12893-904.



Radecke, F. and Billeter, M.A. 1996. The nonstructural C protein is not essential for multiplication of Edmonston B strain measles virus in cultured cells., **217**: 418-421.

Rager, M., Vongpunsawad, S., Duprex, W.P. and Cattaneo, R. 2002. Polyploid measles virus with hexameric genome length. *Embo J*, **21**: 2364-72.

Rall, G.F., Manchester, M., Daniels, L.R., Callahan, E.M., Belman, A.R. and Oldstone, M.B.A. 1997. A transgenic mouse model for measles virus infection of the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**: 4659-4663.

Ravanel, K., Castelle, C., Defrance, T., Wild, T.F., Charron, D., Lotteau, V. and Rabourdin-Combe, C. 1997. Measles virus nucleocapsid protein binds to FcγRIII and inhibits human B cell antibody production. *J Exp Med*, **186**: 269-78.

Reddy, B. and Yin, J. 1999. Quantitative intracellular kinetics of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **15**: 273-83.

Regoes, R.R., Antia, R., Garber, D.A., Silvestri, G., Feinberg, M.B. and Staprans, S.I. 2004. Roles of target cells and virus-specific cellular immunity in primary simian immunodeficiency virus infection. *J Virol*, **78**: 4866-75.

Reuter, T., Weissbrich, B., Schneider-Schaulies, S. and Schneider-Schaulies, J. 2006. RNA interference with measles virus N, P, and L mRNAs efficiently prevents and with matrix protein mRNA enhances viral transcription. *J Virol*, **80**: 5951-7.

Reutter, G.L., Cortese-Grogan, C., Wilson, J. and Moyer, S.A. 2001. Mutations in the measles virus C protein that up regulate viral RNA synthesis. *Virology*, **285**: 100-9.

Revilla, T. and Garcia-Ramos, G. 2003. Fighting a virus with a virus: a dynamic model for HIV-1 therapy. *Math Biosci*, **185**: 191-203.

Richardson, C.D., Sarangi, F., Iorio, C. 2006. Studies towards the identification and characterization of a third receptor for measles virus on human and marmoset smooth airway epithelial cells. In: *XIII International Conference on Negative Strand Viruses*, Salamanca, Spain.

Riedl, P., Moll, M., Klenk, H.D. and Maisner, A. 2002. Measles virus matrix protein is not co-transported with the viral glycoproteins but requires virus infection for efficient surface targeting. *Virus Res*, **83**: 1-12.

Rima, B.K., Davidson, W.B. and Martin, S.J. 1977. The role of defective interfering particles in persistent infection of Vero cells by measles virus. *J Gen Virol*, **35**: 89-97.

Rima, B.K., Earle, J.A., Baczko, K., Rota, P.A. and Bellini, W.J. 1995. Measles virus strain variations. *Curr Top Microbiol Immunol*, **191**: 65-83.

Rouzine, I.M., Sergeev, R.A. and Glushtsov, A.I. 2006. Two types of cytotoxic lymphocyte regulation explain kinetics of immune response to human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**: 666-71.

Runkler, N., Dietzel, E., Moll, M., Klenk, H.D. and Maisner, A. 2008. Glycoprotein targeting signals influence the distribution of measles virus envelope proteins and virus spread in lymphocytes. *J Gen Virol*, **89**: 687-96.



Samuel, C.E. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev*, **14**: 778-809, table of contents.

Sandberg, K., Matsson, P. and Alm, G.V. 1990. A distinct population of nonphagocytic and low level CD4+ null lymphocytes produce IFN-alpha after stimulation by herpes simplex virus-infected cells. *J Immunol*, **145**: 1015-20.

Santak, M., Baricevic, M., Mazuran, R. and Forcic, D. 2007. Intra- and intergenotype characterization of D6 measles virus genotype. *Infect Genet Evol*, **7**: 645-50.

Santiago, C., Bjorling, E., Stehle, T. and Casasnovas, J.M. 2002. Distinct kinetics for binding of the CD46 and SLAM receptors to overlapping sites in the measles virus hemagglutinin protein. *J Biol Chem*, **277**: 32294-301.

Sato, H., Kobune, F., Ami, Y., Yoneda, M. and Kai, C. 2008. Immune responses against measles virus in cynomolgus monkeys. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **31**: 25-35.

Sato, H., Masuda, M., Kanai, M., Tsukiyama-Kohara, K., Yoneda, M. and Kai, C. 2007. Measles virus N protein inhibits host translation by binding to eIF3-p40. *J Virol*, **81**: 11569-76.

Schlender, J., Hornung, V., Finke, S., Gunthner-Biller, M., Marozin, S., Brzozka, K., Moghim, S., Endres, S., Hartmann, G. and Conzelmann, K.K. 2005. Inhibition of toll-like receptor 7- and 9-mediated alpha/beta interferon production in human plasmacytoid dendritic cells by respiratory syncytial virus and measles virus. *J Virol*, **79**: 5507-15.

Schmid, A., Spielhofer, P., Cattaneo, R., Baczko, K., ter Meulen, V. and Billeter, M.A. 1992. Subacute sclerosing panencephalitis is typically characterized by alterations in the fusion protein cytoplasmic domain of the persisting measles virus. *Virology*, **188**: 910-5.

Schneider-Schaulies, J., Meulen, V. and Schneider-Schaulies, S. 2003. Measles infection of the central nervous system. *J Neurovirol*, **9**: 247-52.

Schneider, H., Kaelin, K. and Billeter, M.A. 1997. Recombinant measles viruses defective for RNA editing and V protein synthesis are viable in cultured cells. *Virology*, **227**: 314-322.

Schrag, S.J., Rota, P.A. and Bellini, W.J. 1999. Spontaneous mutation rate of measles virus: direct estimation based on mutations conferring monoclonal antibody resistance. *J Virol*, **73**: 51-4.

Sellin, C.I., Davoust, N., Guillaume, V., Baas, D., Belin, M.F., Buckland, R., Wild, T.F. and Horvat, B. 2006. High pathogenicity of wild-type measles virus infection in CD150 (SLAM) transgenic mice. *J Virol*, **80**: 6420-9.

Shaffer, J.A., Bellini, W.J. and Rota, P.A. 2003. The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology*, **315**: 389-97.

Shingai, M., Ebihara, T., Begum, N.A., Kato, A., Honma, T., Matsumoto, K., Saito, H., Ogura, H., Matsumoto, M. and Seya, T. 2007. Differential Type I IFN-Inducing Abilities of Wild-Type versus Vaccine Strains of Measles Virus. *J Immunol*, **179**: 6123-33.

Shingai, M., Inoue, N., Okuno, T., Okabe, M., Akazawa, T., Miyamoto, Y., Ayata, M., Honda, K., Kurita-Taniguchi, M., Matsumoto, M., Ogura, H., Taniguchi, T. and Seya, T. 2005. Wild-



type measles virus infection in human CD46/CD150-transgenic mice: CD11c-positive dendritic cells establish systemic viral infection. *J Immunol*, **175**: 3252-61.

Sidhu, M.S., Crowley, J., Lowenthal, A., Karcher, D., Menonna, J., Cook, S., Udem, S. and Dowling, P. 1994. Defective measles virus in human subacute sclerosing panencephalitis brain. *Virology*, **202**: 631-41.

Siegel, F.P., Fitzgerald-Bocarsly, P., Holland, B.K. and Shodell, M. 2001. Interferon-alpha generation and immune reconstitution during antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus infection. *Aids*, **15**: 1603-12.

Siegel, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S. and Liu, Y.J. 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*, **284**: 1835-7.

Skiadopoulos, M.H., Surman, S., Tatem, J.M., Paschalis, M., Wu, S.L., Udem, S.A., Durbin, A.P., Collins, P.L. and Murphy, B.R. 1999. Identification of mutations contributing to the temperature-sensitive, cold-adapted, and attenuation phenotypes of the live-attenuated cold-passage 45 (cp45) human parainfluenza virus 3 candidate vaccine. *J Virol*, **73**: 1374-81.

Smallwood, S., Cevik, B. and Moyer, S.A. 2002. Intragenic complementation and oligomerization of the L subunit of the sendai virus RNA polymerase. *Virology*, **304**: 235-45.

Spielhofer, P., Bachi, T., Fehr, T., Christiansen, G., Cattaneo, R., Kaelin, K., Billeter, M.A. and Naim, H.Y. 1998. Chimeric measles viruses with a foreign envelope. *J Virol*, **72**: 2150-9.

Stittelaar, K.J., Boes, J., Kersten, G.F., Spiekstra, A., Mulder, P.G., de Vries, P., Roholl, P.J., Dalsgaard, K., van den Dobbelsteen, G., van Alphen, L. and Osterhaus, A.D. 2000a. In vivo antibody response and in vitro CTL activation induced by selected measles vaccine candidates, prepared with purified quil A components. *Vaccine*, **18**: 2482-93.

Stittelaar, K.J., de Swart, R.L., Vos, H.W., van Amerongen, G., Agafonov, A.P., Nechaeva, E.A. and Osterhaus, A.D. 2002a. Enteric administration of a live attenuated measles vaccine does not induce protective immunity in a macaque model. *Vaccine*, **20**: 2906-12.

Stittelaar, K.J., Vos, H.W., van Amerongen, G., Kersten, G.F., Osterhaus, A.D. and de Swart, R.L. 2002b. Longevity of neutralizing antibody levels in macaques vaccinated with Quil A-adjuvanted measles vaccine candidates. *Vaccine*, **21**: 155-7.

Stittelaar, K.J., Wyatt, L.S., de Swart, R.L., Vos, H.W., Groen, J., van Amerongen, G., van Binnendijk, R.S., Rozenblatt, S., Moss, B. and Osterhaus, A.D. 2000b. Protective immunity in macaques vaccinated with a modified vaccinia virus ankara-based measles virus vaccine in the presence of passively acquired antibodies. *J Virol*, **74**: 4236-43.

Sweetman, D.A., Miskin, J. and Baron, M.D. 2001. Rinderpest virus C and V proteins interact with the major (L) component of the viral polymerase. *Virology*, **281**: 193-204.



Tahara, M., Takeda, M., Seki, F., Hashiguchi, T. and Yanagi, Y. 2007a. Multiple amino acid substitutions in hemagglutinin are necessary for wild-type measles virus to acquire the ability to use receptor CD46 efficiently. *J Virol*, **81**: 2564-72.

Tahara, M., Takeda, M., Shirogane, Y., Hashiguchi, T., Ohno, S. and Yanagi, Y. 2008. Measles Virus Infects both Polarized Epithelial and Immune Cells by Using Distinctive Receptor-Binding Sites on Its Hemagglutinin. *J Virol*, **82**: 4630-7.

Tahara, M., Takeda, M. and Yanagi, Y. 2005. Contributions of matrix and large protein genes of the measles virus edmonston strain to growth in cultured cells as revealed by recombinant viruses. *J Virol*, **79**: 15218-25.

- Tahara, M., Takeda, M. and Yanagi, Y. 2007b. Altered interaction of the matrix protein with the cytoplasmic tail of hemagglutinin modulates measles virus growth by affecting virus assembly and cell-cell fusion. *J Virol*, **81**: 6827-36.
- Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, **21**: 335-76.
- Takeda, M., Nakatsu, Y., Ohno, S., Seki, F., Tahara, M., Hashiguchi, T. and Yanagi, Y. 2006. Generation of measles virus with a segmented RNA genome. *J Virol*, **80**: 4242-8.
- Takeda, M., Ohno, S., Seki, F., Nakatsu, Y., Tahara, M. and Yanagi, Y. 2005. Long untranslated regions of the measles virus M and F genes control virus replication and cytopathogenicity. *J Virol*, **79**: 14346-54.
- Takeda, M., Tahara, M., Hashiguchi, T., Sato, T.A., Jinnouchi, F., Ueki, S., Ohno, S. and Yanagi, Y. 2007. A human lung carcinoma cell line supports efficient measles virus growth and syncytium formation via a SLAM- and CD46-independent mechanism. *J Virol*, **81**: 12091-6.
- Takeuchi, K., Kadota, S.I., Takeda, M., Miyajima, N. and Nagata, K. 2003a. Measles virus V protein blocks interferon (IFN)-alpha/beta but not IFN-gamma signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation. *FEBS Lett*, **545**: 177-82.
- Takeuchi, K., Miyajima, N., Nagata, N., Takeda, M. and Tashiro, M. 2003b. Wild-type measles virus induces large syncytium formation in primary human small airway epithelial cells by a SLAM(CD150)-independent mechanism. *Virus Res*, **94**: 11-6.
- Takeuchi, K., Takeda, M., Miyajima, N., Ami, Y., Nagata, N., Suzaki, Y., Shahnewaz, J., Kadota, S. and Nagata, K. 2005. Stringent requirement for the C protein of wild-type measles virus for growth both in vitro and in macaques. *J Virol*, **79**: 7838-44.
- Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K. and Yanagi, Y. 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature*, **406**: 893-7.
- tenOever, B.R., Servant, M.J., Grandvaux, N., Lin, R. and Hiscott, J. 2002. Recognition of the measles virus nucleocapsid as a mechanism of IRF-3 activation. *J Virol*, **76**: 3659-69.
- Tober, C., Seufert, M., Schneider, H., Billeter, M.A., Johnston, I.C., Niewiesk, S., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, S. 1998. Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. *J Virol*, **72**: 8124-32.



- Valsamakis, A., Schneider, H., Auwaerter, P.G., Kaneshima, H., Billeter, M.A. and Griffin, D.E. 1998. Recombinant measles viruses with mutations in the C, V, or F gene have altered growth phenotypes *in vivo*. *J. Virol.*, **72**: 7754-7761.
- van Binnendijk, R.S., van der Heijden, R.W.J., van Amerongen, G., UytdeHaag, F.G.C.M. and Osterhaus, A.D.M.E. 1994. Viral replication and development of specific immunity in macaques after infection with different measles virus strains. *J. Inf. Dis.*, **170**: 443-448.
- Vincent, S., Gerlier, D. and Manie, S.N. 2000. Measles virus assembly within membrane rafts. *J Virol*, **74**: 9911-5.
- Vincent, S., Spehner, D., Manie, S., Delorme, R., Drillien, R. and Gerlier, D. 1999. Inefficient measles virus budding in murine L.CD46 fibroblasts. *Virology*, **265**: 185-95.

**W<sub>4</sub>**

- Watarai, H., Sekine, E., Inoue, S., Nakagawa, R., Kaisho, T. and Taniguchi, M. 2008. PDC-TREM, a plasmacytoid dendritic cell-specific receptor, is responsible for augmented production of type I interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**: 2993-8.
- Watari, E., Shimizu, M. and Takahashi, H. 2005. Langerhans cells stimulated by mechanical stress are susceptible to measles virus infection. *Intervirology*, **48**: 145-52.
- Waters, D.J. and Bussell, R.H. 1974. Isolation and comparative study of the nucleocapsids of measles and canine distemper viruses from infected cells. *Virology*, **61**: 74-9.
- Welstead, G.G., Iorio, C., Draker, R., Bayani, J., Squire, J., Vongpunsawad, S., Cattaneo, R. and Richardson, C.D. 2005. Measles virus replication in lymphatic cells and organs of CD150 (SLAM) transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**: 16415-20.
- Whalley, S.A., Murray, J.M., Brown, D., Webster, G.J., Emery, V.C., Dusheiko, G.M. and Perelson, A.S. 2001. Kinetics of acute hepatitis B virus infection in humans. *J Exp Med*, **193**: 847-54.
- Whistler, T., Bellini, W.J. and Rota, P.A. 1996. Generation of defective interfering particles by two vaccine strains of measles virus. *Virology*, **220**: 480-484.
- WHO 1999. Rapport sur les maladies infectieuses : faire tomber les obstacles au développement dans la santé, Organisation mondiale de la santé.
- Wick, W.D., Yang, O.O., Corey, L. and Self, S.G. 2005. How many human immunodeficiency virus type 1-infected target cells can a cytotoxic T-lymphocyte kill? *J Virol*, **79**: 13579-86.
- Wild, T.F. and Buckland, R. 1995. Functional aspects of envelope-associated measles virus proteins. *Curr Top Microbiol Immunol*, **191**: 51-64.
- Wild, T.F., Malvoisin, E. and Buckland, R. 1991. Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *J Gen Virol*, **72 ( Pt 2)**: 439-42.
- Witko, S.E., Kotash, C., Sidhu, M.S., Udem, S.A. and Parks, C.L. 2006. Inhibition of measles virus minireplicon-encoded reporter gene expression by V protein. *Virology*, **348**: 107-19.
- Wodarz, D. and Hamer, D.H. 2007. Infection dynamics in HIV-specific CD4 T cells: does a CD4 T cell boost benefit the host or the virus? *Math Biosci*, **209**: 14-29.

**X<sub>8</sub>**

- Xiao, X., Shao, S.H. and Chou, K.C. 2006. A probability cellular automaton model for hepatitis B viral infections. *Biochem Biophys Res Commun*, **342**: 605-10.
- Xu, O., Zhang, P., Hu, C., Liu, X., Qi, Y. and Liu, Y. 2006. Identification of amino acid residues involved in the interaction between measles virus Haemagglutinin (MVH) and its human cell receptor (signaling lymphocyte activation molecule, SLAM). *J Biochem Mol Biol*, **39**: 406-11.

**Y<sub>4</sub>**

- Yanagi, Y., Takeda, M. and Ohno, S. 2006a. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol*, **87**: 2767-79.
- Yanagi, Y., Takeda, M. and Ohno, S. 2007. [Measles virus entry and cellular receptors]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **52**: 1088-94.

Yanagi, Y., Takeda, M., Ohno, S. and Seki, F. 2006b. Measles virus receptors and tropism. *Jpn J Infect Dis*, **59**: 1-5.

Yokota, S., Okabayashi, T., Yokosawa, N. and Fujii, N. 2008. Measles virus P protein suppresses Toll-like receptor signal through up-regulation of ubiquitin-modifying enzyme A20. *Faseb J*, **22**: 74-83.

Yokota, S., Saito, H., Kubota, T., Yokosawa, N., Amano, K. and Fujii, N. 2003. Measles virus suppresses interferon-alpha signaling pathway: suppression of Jak1 phosphorylation and association of viral accessory proteins, C and V, with interferon-alpha receptor complex. *Virology*, **306**: 135-46.

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.M., Gale, M., Jr., Akira, S., Yonehara, S., Kato, A. and Fujita, T. 2005. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol*, **175**: 2851-8.

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. and Fujita, T. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol*, **5**: 730-7.



Zhang, P., Li, L., Hu, C., Xu, Q., Liu, X. and Qi, Y. 2005. Interactions among measles virus hemagglutinin, fusion protein and cell receptor signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) indicating a new fusion-trimer model. *J Biochem Mol Biol*, **38**: 373-80.

Zhang, X., Glendening, C., Linke, H., Parks, C.L., Brooks, C., Udem, S.A. and Oglesbee, M. 2002. Identification and characterization of a regulatory domain on the carboxyl terminus of the measles virus nucleocapsid protein. *J Virol*, **76**: 8737-46.