



**HAL**  
open science

# Étude de l'infection par le métapneumovirus humain : facteurs de virulence et développement de vaccins vivants atténués

Julia Dubois

► **To cite this version:**

Julia Dubois. Étude de l'infection par le métapneumovirus humain : facteurs de virulence et développement de vaccins vivants atténués. Biologie cellulaire. Université de Lyon; Université Laval (Québec, Canada), 2018. Français. NNT : 2018LYSE1018 . tel-02291065v1

**HAL Id: tel-02291065**

**<https://theses.hal.science/tel-02291065v1>**

Submitted on 18 Sep 2019 (v1), last revised 20 Sep 2019 (v2)

**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.



**THESE  
de DOCTORAT en COTUTELLE**

**de**

**Université Claude Bernard  
Lyon1  
Lyon, France  
Ecole doctorale ED 341**

**Université Laval  
Québec, Canada  
Faculté de Médecine**

Soutenue à huis clos le 31/01/2018, par :

**Julia Dubois**

---

**Étude de l'infection par le  
métapneumovirus humain :**  
Facteurs de virulence et développement  
de vaccins vivants atténués

---

Devant le jury composé de :

Pr **Bruno Lina** – Université Claude Bernard Lyon 1  
Dr **Sylvie Pillet** – Université Jean Monnet  
Dr **Jean-François Eleouet** – Université Paris-Saclay  
Pr **Caroline Gilbert** – Université Laval  
Pr **Denis Leclerc** - Université Laval

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur

Dr **Manuel Rosa-Calatrava** –  
Université Claude Bernard Lyon 1  
Dr **Guy Boivin** –  
Université Laval

Directeur de thèse  
Directeur de thèse





N° d'ordre NNT : 2018LYSE0018

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**École Doctorale N° 341**  
**(Évolution Écosystèmes Microbiologie Modélisation)**

**Spécialité de doctorat** : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie  
**Discipline** : Virologie

Soutenue à huis clos le 31/01/2018, par :  
**Julia Dubois**

---

**Étude de l'infection par le**  
**métapneumovirus humain :**  
Facteurs de virulence et développement  
de vaccins vivants atténués

---

Devant le jury composé de :

Pr **Bruno Lina** – Université Claude Bernard Lyon 1  
Dr **Sylvie Pillet** – Université Jean Monnet  
Dr **Jean-François Eleouet** – Université Paris-Saclay  
Pr **Caroline Gilbert** – Université Laval  
Pr **Denis Leclerc** - Université Laval

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur

Dr **Manuel Rosa-Calatrava** –  
Université Claude Bernard Lyon 1  
Dr **Guy Boivin** –  
Université Laval

Directeur de thèse  
Directeur de thèse



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

<p><b>Président de l'Université</b></p> <p>Président du Conseil Académique</p> <p>Vice-président du Conseil d'Administration</p> <p>Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire</p> <p>Vice-président de la Commission Recherche</p> <p>Directrice Générale des Services</p>	<p><b>M. le Professeur Frédéric FLEURY</b></p> <p>M. le Professeur Hamda BEN HADID</p> <p>M. le Professeur Didier REVEL</p> <p>M. le Professeur Philippe CHEVALIER</p> <p>M. Fabrice VALLÉE</p> <p>Mme Dominique MARCHAND</p>
---	---

## **COMPOSANTES SANTE**

<p>Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard</p> <p>Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux</p> <p>Faculté d'Odontologie</p> <p>Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques</p> <p>Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation</p> <p>Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine</p>	<p>Directeur : M. le Professeur G.RODE</p> <p>Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON</p> <p>Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS</p> <p>Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA</p> <p>Directeur : M. X. PERROT</p> <p>Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT</p>
---	--

## **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

<p>Faculté des Sciences et Technologies</p> <p>Département Biologie</p> <p>Département Chimie Biochimie</p> <p>Département GEP</p> <p>Département Informatique</p> <p>Département Mathématiques</p> <p>Département Mécanique</p> <p>Département Physique</p> <p>UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives</p> <p>Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon</p> <p>Polytech Lyon</p> <p>Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique</p> <p>Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1</p> <p>Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education</p> <p>Institut de Science Financière et d'Assurances</p>	<p>Directeur : M. F. DE MARCHI</p> <p>Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD</p> <p>Directeur : Mme C. FELIX</p> <p>Directeur : M. Hassan HAMMOURI</p> <p>Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE</p> <p>Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV</p> <p>Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID</p> <p>Directeur : M. le Professeur J-C PLENET</p> <p>Directeur : M. Y.VANPOULLE</p> <p>Directeur : M. B. GUIDERDONI</p> <p>Directeur : M. le Professeur E.PERRIN</p> <p>Directeur : M. G. PIGNAULT</p> <p>Directeur : M. le Professeur C. VITON</p> <p>Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE</p> <p>Directeur : M. N. LEBOISNE</p>
--	--



# Résumé

Le métapneumovirus humain (hMPV) est un virus responsable d'infections aiguës des voies respiratoires telles que des bronchiolites, des bronchites ou des pneumonies, principalement chez les populations à risques que sont les jeunes enfants de moins de 5 ans, ainsi que les personnes âgées ou immunodéprimées. Découvert en 2001, ce virus et sa pathogénèse ne restent encore aujourd'hui que partiellement caractérisés. De ce fait et malgré les besoins, il n'y a aucun vaccin ou traitement thérapeutique spécifique et efficace contre le HMPV disponible sur le marché. Dans ce contexte, mon projet de thèse s'est articulé autour de deux axes principaux :

(i) L'étude de la protéine de fusion F du virus hMPV, protéine majeure antigénique de surface et responsable de l'entrée du virus dans la cellule cible. Elle a pour particularité d'induire de manière autonome la fusion membranaire *in vitro* et d'être associée à des effets cytopathiques variable selon les souches virales. De par son rôle clé pour le virus hMPV, la protéine F a déjà fait l'objet de plusieurs études structurales et fonctionnelles mais les déterminants de cette activité fusogénique ne sont pas encore entièrement caractérisés. Nous nous sommes donc intéressés à l'identification de déterminants du phénotype viral hyperfusogénique, localisés dans les domaines *heptad repeats* de la protéine F du hMPV.

(ii) L'atténuation de deux souches virales cliniques (CAN98-75 et C-85473) par délétion de gènes accessoires dans le but de développer des candidats vaccinaux adaptés aux enfants en bas âge. Différents virus ont été générés par génétique inverse et les délétions des gènes accessoires SH et G dans les deux fonds génétiques viraux ont été étudiées pour leur impact sur l'infectivité, la réplication et la pathogénèse virale *in vitro* et *in vivo* ainsi que leur contribution pour le développement de virus atténués candidats vaccinaux.

**Mots-clés :** Métapneumovirus humain, Pneumovirus, pneumonie virale, protéine de fusion, virus atténué, vaccin, génétique inverse



# Study of hMPV infection and virulence factors for live-attenuated vaccines development

## **Abstract**

Human metapneumovirus (hMPV) is a major pathogen responsible of acute respiratory tract infections, such as bronchiolitis or pneumonia, affecting especially infants, under five years old, elderly individuals and immunocompromised adults. Identified since 2001, this virus and its pathogenesis still remain largely unknown and no licensed vaccines or specific antivirals against hMPV are currently available. In this context, my research project was built over two main subjects:

(i) The study of the fusion F glycoprotein which is the major antigenic protein of hMPV and is responsible of viral entry into host cell. By its crucial role for the virus, the F protein has already been characterized in several structural and/or functional studies. Thus, it has been described that the hMPV F protein induces membrane fusion autonomously, resulting in variable cytopathic effects *in vitro*, in a strain-dependent manner. However, as the determinants of the hMPV fusogenic activity are not well characterized yet, we focused on identification of some of these, located in heptad repeats domains of the protein.

(ii) The evaluation of hMPV SH and G gene deletion for viral attenuation. Live-attenuated hMPV vaccine candidates for infants' immunization has been constructed thank to this deletion approach at the beginning of hMPV vaccine development efforts. Despite encouraging results, these candidates have not been further characterized and the importance of the viral background has not been evaluated.

**Keywords:** Human metapneumovirus, Pneumovirus, viral pneumonia, fusion protein, attenuated virus, vaccine, reverse genetics



# Remerciements

La réalisation de cette thèse a représenté de nombreux challenges pour moi. Ce fut un long parcours qui m'a construit autant professionnellement que personnellement et il n'aurait pas été possible sans le concours de ces personnes que je tiens à remercier vivement, à commencer par les membres de mon jury pour l'attention qu'ils ont portée à mon travail.

Je tiens à remercier particulièrement mes deux directeurs de thèse, le Dr Guy Boivin et le Dr Manuel Rosa-Calatrava, de m'avoir donné l'opportunité de ce doctorat, de m'avoir dirigée tous deux avec bienveillance et de m'avoir fait confiance ces dernières années. Je vous suis reconnaissante de m'avoir associée à tous ces projets scientifiques, auxquels j'ai toujours pris part avec plaisir ; j'ai apprécié l'autonomie que vous m'avez accordée et j'ai beaucoup appris à vos côtés. Merci aussi au Dr Olivier Terrier qui m'a encadrée dès mon stage de Master 2 et sur lequel j'ai toujours pu compter, merci pour ses conseils et les discussions que nous avons partagées.

Je tiens aussi à remercier l'équipe du Dr Boivin que j'ai eu la chance de côtoyer, Chantal, Clément, Coraline, Émilien, Jocelyne, Julie, Karima, Laetitia, Mariana, Marie-Ève, Marie-Hélène, Miguel, Nathalie, Rafik, Vuong, Yacine, et qui m'a accueillie chaleureusement à Québec. Je remercie aussi l'équipe du Dr Rosa-Calatrava, la VirTeam, Anais, Andrés, Aurélien, Blandine, Claire, Daniela, Laurent, Thomas, pour tous ces moments de convivialité et pour avoir supporté mon humour et mes plaintes journalières. Merci vraiment à tous de m'avoir accompagnée ces dernières années, d'avoir ri avec moi (et aussi parfois de moi), grâce à vous l'ambiance au quotidien était toujours stimulante et agréable.

Merci à mes amis, de France et d'ailleurs, et en particulier Anaïs, Clément, Joan et Laurine, les expatriés à Québec, qui se sont substitués à mon cocon familial et sans lesquels ces deux hivers à Québec auraient paru encore plus froids.

Merci surtout aux personnes les plus importantes de ma vie, ma famille, qui ont tout mis en œuvre pour moi et ont su m'accompagner malgré l'éloignement. Merci surtout à ma mère et à mon père, ils m'ont supportée, moi et mon caractère, et je sais que ce doctorat a été une épreuve pour eux aussi.

Merci à toutes ces personnes qui ont cru en moi, bien souvent plus que je n'ai cru en moi-même. Vous êtes mon moteur et ma motivation.

Une dernière pensée pour mon Papy qui m'a donné le gout du travail bien fait et qui croyait en moi et en mes compétences plus que tout autre. Il a été auprès de moi chaque jour.

# Avant-propos

Pendant ma deuxième année de Master de Recherche en France (correspondant à la Maîtrise au Québec), dans le cursus Infectiologie Fondamentale de l'Université Claude Bernard Lyon 1, j'ai été accueillie au Laboratoire Virpath, sous la direction des Drs. Manuel Rosa-Calatrava et Olivier Terrier, pour mener un travail de recherche focalisé sur les interactions fonctionnelles des virus influenza avec la cellule-hôte. Grâce à cette expérience en laboratoire de recherche, j'ai appris et acquis des techniques de virologie et de biologie cellulaire et moléculaire et j'ai surtout confirmé mon envie de travailler dans un domaine de recherche relatif à la virologie.

Consécutivement à cela, le Dr Manuel Rosa-Calatrava m'a proposé de réaliser une thèse en cotutelle avec l'une de ses équipes partenaires. L'équipe du Dr Guy Boivin, hébergée au Centre de Recherche en Infectiologie de Québec, partage certaines thématiques de recherche fondamentale et appliquée avec le laboratoire VirPath, telles que l'étude de la pathogénèse des virus respiratoires humains et le développement de stratégies thérapeutiques ou prophylactiques innovantes. Dans ce contexte, et sur le sujet plus précis de l'étude des mécanismes de fusion virale des Paramyxovirus, ces deux laboratoires avaient précédemment mis en place un échange d'étudiant en thèse. Ainsi, la formalisation d'un doctorat en cotutelle entre l'Université Claude Bernard Lyon 1 et l'Université Laval permettait de poursuivre et consolider le partenariat entre ses deux équipes.

Dans ce contexte, mon projet de recherche doctorale s'est ainsi articulé autour de deux thèmes complémentaires: **(i)** l'étude fonctionnelle de la protéine F de fusion du métapneumovirus humain (hMPV) et **(ii)** la caractérisation de souches virales recombinantes atténuées en vue du développement d'un candidat vaccin hMPV. Mes travaux dans ces domaines ont fait l'objet d'une publication d'un article scientifique (en premier auteur) dans le journal international *Journal of General Virology* (**Article 1**) (1) et d'un manuscrit en cours de finalisation (en premier auteur) qui sera soumis dans un journal international à comité de lecture (**Manuscrit 1**), après le dépôt prévu d'une demande de brevet d'invention, protégeant un candidat vaccinal hMPV atténué. Ces études ont fait suite à des travaux de recherche doctorale du Dr Laetitia Aerts dans l'équipe du Dr Boivin, auxquels j'ai aussi été associée et qui ont été publiés dans le journal *PloS One* (**Annexe, Article 3**) (2).

De plus, j'ai également pu poursuivre mon projet de recherche de Master 2 en rejoignant le laboratoire VirPath au cours de la dernière année de mon doctorat. La

réalisation de ce projet, en collaboration avec le Dr Olivier Terrier, a été concrétisée par la publication d'une revue scientifique (en premier auteur) dans le journal international *mBio* (**Article 2**) (3) et de deux articles scientifiques (en co-auteur) dans le journal international *Scientific Reports* (**Annexe, Articles 4 et 5**) (4, 5). Ces travaux ont également conduit à la soumission d'un manuscrit (en premier auteur) soumis dans un journal international à comité de lecture (**Manuscrit 2**).

De mon point de vue, cette thèse en cotutelle internationale entre l'Université Claude Bernard Lyon1 et l'Université Laval à Québec a constitué une belle opportunité professionnelle et personnelle pour de très nombreuses raisons. Pour n'en citer que quelques-unes, cette thèse m'a permis d'acquérir une expertise sur deux pathogènes viraux humains (hMPV et influenza), ainsi qu'une double expérience en expérimentations *in vitro* et animale. Personnellement, vivre cette expérience internationale a aussi été très valorisante et enrichissante humainement. Cela m'a permis de développer davantage mon autonomie, dans le travail mais aussi dans la vie, ainsi que mon ouverture aux autres, en côtoyant quotidiennement à Québec et à Lyon, des environnements riches en personnalités et en thématiques.

# Table des matières

Résumé .....	vii
Remerciements.....	xi
Avant-propos .....	xiii
Table des matières .....	xv
Table des illustrations .....	xix
Liste des tableaux.....	xxi
Abréviations.....	xxiii
Partie 1 : Introduction générale .....	1
1. Le métapneumovirus humain (hMPV) .....	2
1.1 Découverte du hMPV .....	2
1.2 Classification et taxonomie .....	3
1.3 Description de la particule virale.....	5
1.4 Organisation génomique .....	6
1.4.1 Les génotypes viraux et leurs variabilités.....	7
1.5 Epidémiologie et manifestations cliniques .....	8
1.5.1 Transmission, répartition géographique et saisonnière .....	9
1.5.2 Sérologie.....	10
1.5.3 L'infection hMPV chez l'enfant .....	10
1.5.4 L'infection HMPV chez l'adulte et la personne âgée.....	11
1.5.5 Facteurs de risque et de sévérité .....	11
1.6 Diagnostic.....	13
2. Les protéines virales et leur(s) fonction(s).....	13
2.1 Les protéines impliquées dans la réplication virale .....	14
2.1.1 La nucléoprotéine N .....	14
2.1.2 La phosphoprotéine P .....	15
2.1.3 La polymérase L.....	16
2.1.4 Les facteurs d'élongation et régulation de la synthèse d'ARN (M2-1 et M2-2).....	17
2.2 La protéine de matrice M.....	18
2.3 Les glycoprotéines de surface .....	20
2.3.1 La glycoprotéine de fusion F .....	20
2.3.2 La protéine d'attachement G .....	26
2.3.3 La petite protéine hydrophobe SH.....	28

3.	Le cycle viral du hMPV .....	30
3.1	L'attachement et la fusion .....	31
3.2	La transcription et la réplication du génome viral .....	31
3.3	La traduction des protéines virales .....	34
3.4	L'assemblage et le bourgeonnement.....	35
3.5	La formation de syncytia .....	36
4.	Modèles d'études de la pathogénèse des virus hMPV .....	36
4.1	Les modèles cellulaires <i>in vitro</i> .....	37
4.2	Les modèles animaux de l'infection HMPV.....	38
4.2.1	Les rongeurs .....	38
4.2.2	Les primates non humains .....	40
4.3	La réponse immune associée à l'infection par hMPV .....	40
4.3.1	La réponse cellulaire.....	41
4.3.2	Les réponses immunitaires innée et adaptative .....	44
4	Molécules prophylactiques et thérapeutiques .....	48
5.1	La ribavirine.....	50
5.2	Les immunoglobulines et anticorps monoclonaux .....	50
5.3	Les inhibiteurs de fusion .....	52
5.4	Les autres stratégies antivirales.....	53
5.4.1	Les glycosaminoglycanes sulfates .....	53
5.4.2	Les petits ARN interférents (ARNi).....	53
5.4.3	Les agents anti-inflammatoires et immunomodulateurs.....	54
5	Stratégies vaccinales .....	55
6.1	Problématiques de la vaccination des jeunes enfants.....	57
6.2	Vaccins sous-unitaires .....	58
6.3	Les vaccins à base de particules virales.....	60
6.3.1	Les vaccins inactivés .....	60
6.3.2	Les vaccins à base de particules pseudo-virales.....	60
6.3.3	Les vaccins vivants atténués.....	61
Partie 2 :	Objectifs de recherche et résultats.....	69
1.	Objectifs et planning de recherche .....	69
2.	Le système de génétique inverse hMPV .....	70
3.	Résultats .....	74
3.1	Étude de la protéine de fusion du hMPV .....	74
3.1.1	Introduction.....	74

3.1.3 Discussion et perspectives de ce travail.....	87
3.2 Étude de la contribution des protéines G et SH dans la pathogénèse du hMPV en vue du développement d'un virus hMPV vivant atténué comme candidat vaccin .....	91
3.2.1 Introduction.....	91
3.2.2 Manuscrit 1 .....	93
3.2.3 Résultats préliminaires <i>in vivo</i> , discussion et perspectives de ce travail .....	135
Partie 3 : Discussion et perspectives générales .....	141
Partie 4 : Projet complémentaire influenza .....	145
Avant-propos.....	145
1. Mise en contexte .....	146
1.1 Les virus influenza .....	146
1.1.1 Description du virus.....	146
1.1.2 Cycle viral et détournement des machineries cellulaires .....	147
1.2 La voie de signalisation p53 .....	149
1.2.1 Le facteur de transcription p53 et ses isoformes.....	150
1.2.2 Les rôles et les mécanismes de régulation de p53.....	151
2. Résultats .....	154
Article 2 : article de revue .....	157
Manuscrit 2 .....	163
Discussion et perspectives .....	224
Annexe : Contribution à d'autres publications scientifiques .....	227
Bibliographie.....	278



# TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1</b> : Classification des virus de la famille des Pneumoviridae	p. 4
<b>Figure 2</b> : La particule virale hMPV : observation microscopique et représentation schématique	p. 5
<b>Figure 3</b> : Organisation des génomes hMPV et hRSV	p. 7
<b>Figure 4</b> : Comparaison de la structure de la nucléoprotéine N de hMPV et celle de hPIV-5	p.15
<b>Figure 5</b> : Structure cristallographique du tétramère asymétrique formé par la protéine M2-1 du hMPV	p. 17
<b>Figure 6</b> : Structure de la protéine de matrice M du hMPV	p. 19
<b>Figure 7</b> : La protéine de fusion F de hMPV : localisation des domaines fonctionnels et des épitopes antigéniques	p. 21
<b>Figure 8</b> : Modèle de fusion des protéines de Classe I	p. 23
<b>Figure 9</b> : Différence de phénotypes in vitro induits par la protéine de fusion F de hMPV	p. 24
<b>Figure 10</b> : Le cycle viral des <i>Pneumoviridae</i>	p. 30
<b>Figure 11</b> : Schéma des étapes de transcription et réplication du génome viral du hMPV	p. 33
<b>Figure 12</b> : La réponse cellulaire face à l'infection hMPV et l'action immunomodulatrice de protéines virales	p. 42
<b>Figure 13</b> : Cibles cellulaires des principales molécules antivirales développées contre le virus hMPV	p. 49
<b>Figure 14</b> : Planning de mon travail de recherche doctorale	p. 70
<b>Figure 15</b> : Génération de virus recombinants hMPV par génétique inverse	p. 71
<b>Figure 16</b> : Schéma de la construction de plasmides anti-génomiques hMPV	p. 73
<b>Figure 17</b> : Evaluation <i>in vivo</i> des candidats vaccinaux atténués	p. 139
<b>Figure 18</b> : Perspective de construction vaccinale bivalente hMPV/hRSV	p. 142
<b>Figure 19</b> : Résultats préliminaires de production de virus hMPV en système cellulaire aviaire en suspension	p. 143
 <u>Projet complémentaire influenza :</u>	
<b>Figure 20</b> : Représentation de la particule virale Influenza A	p. 147
<b>Figure 21</b> : Cycle viral des virus Influenza et détournement des mécanismes	p. 148

cellulaires

**Figure 22** : Représentation du gène humain TP53 et des isoformes protéiques du facteur de transcription p53

**p. 150**

**Figure 23** : Modèle d'interactions des virus influenza avec la voie de signalisation p53

**p. 225**

# LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Identité de séquence d'acides aminés entre la séquence de hMPV 00-1 (A1) et d'autres virus de la même famille (%)	<b>p. 8</b>
<b>Tableau 2</b> : Les modèles d'étude de l'infection hMPV	<b>p. 36</b>
<b>Tableau 3</b> : Avantages et inconvénients des approches vaccinales en développement	<b>p. 56</b>
<b>Tableau 4</b> : Liste des virus hMPV vivants atténués en cours de développement	<b>p. 64</b>
<b>Tableau 5</b> : Liste des mutations de la protéine F du HMPV étudiées et leurs effets sur la fusogénicité et la pathogénèse virale	<b>p. 75</b>
<b>Tableau 6</b> : Contribution différente des protéines G et SH à la cytopathogénèse <i>in vitro</i> des virus hMPV en fonction de leur origine virale	<b>p. 136</b>



# ABRÉVIATIONS

aa	acide aminé
Ac	anticorps
ADN	acide désoxyribonucléique
aMPV	métapneumovirus aviaire
ARN	acide ribonucléique
ARNi	ARN interférent
ARNm	ARN messenger
bRSV	virus respiratoire syncytial bovin
bp	paire de bases nucléotidiques
CI50	concentration inhibitrice à 50 %
CTL	lymphocyte T CD8 cytotoxique
DC	cellules dendritiques
ECP	effet cytopathique
EVCI	espérance de vie corrigée de l'incapacité
F	glycoprotéine de fusion
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G	glycoprotéine d'attachement
GAG	glycosaminoglycanes
HAE	<i>human airway epithelium</i>
hMPV	métapneumovirus humain
hPIV	virus parainfluenza humain
HR	<i>heptad repeat</i>
hRSV	virus respiratoire syncytial humain
IAV	virus influenza A
ICTV	Comité International chargé de la Taxonomie des Virus
IFN	interféron
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
IRF	<i>IFN responsive factor</i>
IVIG	immunoglobulines injectées par voie intraveineuses
kb	kilobase
L	Polymérase virale ou <i>Large polymerase</i>
M	Protéine virale de matrice

M2-1	facteur d'élongation de l'ARN viral
M2-2	facteur de régulation de la synthèse de l'ARN viral
MAVS	<i>mitochondrial antiviral-signaling protein</i>
MDA5	melanoma differentiation-associated gene 5
Mev	virus de la rougeole, <i>measles virus</i>
MPV	virus de la pneumonie murine
MuV	virus des oreillons, <i>mumps virus</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response 88</i>
N	Nucléoprotéine
NIAID	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i>
NK	cellules <i>Natural Killer</i>
nt	nucléotide
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	Cadre de lecture ouvert
P	phosphoprotéine
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PAR	<i>protease activated receptor</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted</i>
RdRP	ARN polymérase ARN-dépendante
RIG-I	<i>Retinoic acid-Inducible Gene 1</i>
RLR	<i>RIG-I-Like Receptor</i>
vRNP	complexe ribonucléoprotéique viral
SH	petite glycoprotéine hydrophique virale
TCID50	dose infectieuse médiane en culture tissulaire
Th	Lymphocyte T <i>helper</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
Treg	Lymphocyte T régulateur
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
TSLP	<i>thymic stromal lymphopoietin</i>
VLP	particule pseudo-virale, <i>Virus-Like Particle</i>

*Certains acronymes ont leur signification dans leur terminologie anglaise.*

# PARTIE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les infections aiguës des voies respiratoires inférieures sont l'une des causes majeures de morbidité et de mortalité à l'échelle mondiale. Chez les enfants de moins de 5 ans en particulier, elles représentent notamment plus de 15 % de la mortalité selon les pays évalués, soit la deuxième cause de mortalité, d'après l'OMS (6). De ce fait, elles représentent également un impact socio-économique important, notamment en termes de nombre et de durée d'hospitalisations, ainsi qu'en nombre de journées de travail perdues. Le coût direct et indirect sur l'EVCI (espérance de vie corrigée de l'incapacité) des infections aiguës des voies respiratoires inférieures a été chiffré par exemple à plus de 43 milliards d'euros en Europe en 2011 (selon la *European Respiratory Society*). Le coût des atteintes respiratoires virales, non associées aux virus Influenza, a été estimé quant à lui, à près de 39,5 milliard de dollars aux Etats-Unis en 2001 (7).

La majorité des infections aiguës des voies respiratoires inférieures, associées à des pathologies variables allant du simple rhume à la pneumonie grave, sont notamment causées par des virus (8, 9), tels que ceux appartenant aux familles (i) des *Orthomyxoviridae* (comme les virus Influenza) ; (ii) des *Paramyxoviridae* (comme les virus parainfluenza humains ; hPIV ou respirovirus) ; (iii) des *Adenoviridae* (adénovirus) ; (iv) des *Picornaviridae* (notamment les rhinovirus) ; (v) des *Coronaviridae* et (vi) des *Pneumoviridae*, avec notamment le virus respiratoire syncytial humain (hRSV) et le métapneumovirus humain (hMPV). Alors que le hRSV est l'agent étiologique principal des bronchiolites et pneumonies chez les nourrissons de moins de 1 an, avec une incidence accrue en-dessous de 6 mois de vie, le virus hMPV est également prévalent dans cette population (10, 11). Selon les rapports de surveillance épidémiologique, celui-ci est considéré comme le second ou le troisième virus, après les virus hRSV et hPIV, responsable d'hospitalisations consécutives à une infection aiguë des voies respiratoires inférieures, en touchant particulièrement sévèrement les enfants entre 1 et 3 ans (12-15).

Dans cette introduction générale, je passerai en revue les principales connaissances acquises ces seize dernières années (depuis sa découverte) sur la biologie du virus hMPV, sa pathogénèse, les modèles d'étude associés et l'état d'avancement des thérapies curative et/ou vaccinale en cours de développement.

# 1. Le métapneumovirus humain (hMPV)

## 1.1 Découverte du hMPV

Le métapneumovirus humain (hMPV) est un virus respiratoire qui a été identifié pour la première fois en 2001 par l'équipe du Dr Osterhaus aux Pays-Bas (16). Ce virus a été isolé à partir de prélèvements naso-pharyngés de 28 enfants de moins de 5 ans, présentant les symptômes d'infections respiratoires similaires à une pathologie pouvant être causée par le hRSV, allant d'une simple infection des voies respiratoires supérieures à de graves bronchiolites et pneumonies, mais pour lesquels aucun agent étiologique n'avait jusqu'alors été identifié (16). C'est l'utilisation de technique de biologie moléculaire basée sur l'utilisation d'amorces aléatoires (*RNA Arbitrarily Primed-PCR*), à partir de culture virale *in vitro*, qui a permis l'identification de ce nouveau virus et sa distinction du hRSV et autres *Paramyxoviridae* (16).

Rétrospectivement, des sérums datant des années 50 ont pu être testés positifs pour le virus hMPV, prouvant ainsi sa circulation au sein de la population humaine bien plus ancienne (16). Par la suite, plusieurs autres groupes dans le monde ont détecté le virus hMPV parmi leurs cohortes de malades atteints d'affections pulmonaires. Parmi ces groupes, l'équipe du Dr Guy Boivin a été la première à identifier la présence de ce virus en Amérique du Nord et à en décrire les caractéristiques virologiques et les manifestations cliniques, non seulement chez les enfants, mais également dans toutes les autres classes d'âge (17, 18).

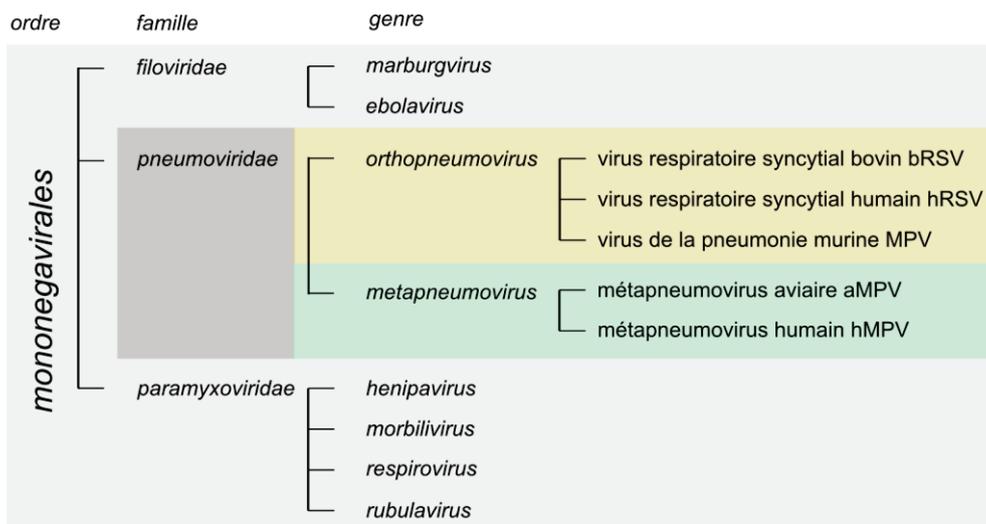
Cette caractérisation tardive du virus hMPV peut s'expliquer par sa difficulté de mise en culture *in vitro*. En effet, les effets cytopathiques (ECPs) sont tardifs et la permissivité des lignées cellulaires utilisées en routine (par exemple les cellules primaires de rein de singes RhMK, les cellules fibroblastiques humaines MRC-5 ou encore les cellules dérivées de carcinomes humains Hep-2 et A549) dans les services hospitaliers de diagnostic est faible pour le virus hMPV. De plus, il est nécessaire de supplémenter régulièrement les milieux de culture avec des protéases, telles que la trypsine, afin de permettre la propagation virale. Par ailleurs l'apparition des ECPs peut être très variable d'une souche virale à une autre et assimilable aux ECPs du hRSV dans certains cas, rendant ainsi la détection et l'identification du virus hMPV très délicate. Ainsi, depuis le développement des outils de biologie moléculaire, permettant l'amplification spécifique du génome du hMPV, la méthode la plus sûre pour détecter ce virus repose sur la technique de RT-PCR, basée principalement sur la détection des gènes viraux N ou F (19).

## **1.2 Classification et taxonomie**

Le virus hMPV possède un génome à ARN négatif simple brin et non segmenté, ce qui le range dans l'ordre des *Mononegavirales*, au même titre que d'autres virus mieux connus, tels que les virus de la rage (Rhabdovirus), de la rougeole (Morbillivirus), le virus Ebola (Filovirus) ou encore le hRSV (Pneumovirus) (**Figure 1**).

Suite aux observations morphologiques de la particule virale et au séquençage de son génome, le virus hMPV a d'abord été classé dans la famille des *Paramyxoviridae* (16). En effet, comme les Paramyxovirus, (i) le génome du hMPV est retrouvé exclusivement à l'intérieur d'une nucléocapside hélicoïdale résistante aux ARNases et dans laquelle est aussi présente la polymérase virale ; (ii) le génome est transcrit de manière linéaire et séquentielle de son extrémité 3' à l'extrémité 5', produisant ainsi un gradient d'ARN messagers (ARNm) viraux selon l'ordre de présentation des gènes ; (iii) son cycle de réplication est exclusivement cytoplasmique ; (iv) les particules virales sont enveloppées et bourgeonnent à partir de la membrane cytoplasmique de la cellule infectée ; enfin (v) les virus pénètrent la cellule cible *via* une fusion membranaire qui permet la libération du génome viral dans le cytoplasme de la cellule infectée. Dans la famille des *Paramyxoviridae*, le hMPV a été intégré à la sous-famille des Pneumovirus, à laquelle appartient aussi le virus hRSV. Cependant, l'absence de gènes non structuraux similaires à ceux codés par le génome du hRSV (NS1 et NS2), a conduit à créer un nouveau genre, celui des *Metapneumovirus*. Le seul autre membre de ce groupe phylogénétique est le métapneumovirus aviaire (aMPV, isolé en Afrique en 1978) (20).

Cependant, depuis 2016, les Pneumovirus ne sont plus une sous-famille des Paramyxovirus et ont été réassignés en tant que famille à part entière, modifiant ainsi la classification des virus hMPV et hRSV (**Figure 1**) (21, 22). Les raisons de cette séparation entre les familles *Paramyxoviridae* et *Pneumoviridae* sont dues principalement à plusieurs caractéristiques spécifiques des Pneumovirus : (i) une structure différente de la ribonucléoprotéine virale (vRNP), qui sera décrite dans le paragraphe 2.1 ; (ii) une distance phylogénétique par rapport aux *Paramyxoviridae* comparable à celle les séparant de la famille des *Filoviridae* ; et (iii) la présence et l'organisation de deux origines de transcription dans le gène M2, codant pour les protéines M2-1 et M2-2, qui servent à la régulation de la transcription et la réplication du génome viral. Ainsi, au sein de la nouvelle famille de *Pneumoviridae*, ont été créées les deux sous-familles des *Metapneumovirus*, comportant les métapneumovirus aviaire et humain, et les *Orthopneumovirus*, qui incluent les virus respiratoires syncytiaux bovin et humain et le virus de la pneumonie murine (MPV, **Figure 1**).



**Figure 1 - Classification des virus de la famille des *Pneumoviridae*.** Représentation des Pneumovirus ainsi que des autres familles phylogénétiquement proches, d'après la classification de l'ICTV (21, 22). Cette représentation ne tient pas compte de la distance génétique entre les virus cités.

Le hMPV étant le dernier membre décrit dans cette famille, relativement récemment, il n'est pas exclu que d'autres membres de la famille des *Pneumoviridae* soient identifiés dans les années futures et viennent enrichir cette nouvelle taxonomie. En exemple, un virus respiratoire canin a été décrit en 2011 et semble génétiquement très proche du virus de la pneumonie murine (23).

Malgré leurs divergences vis-à-vis des *Paramyxoviridae*, il faut toutefois noter que les Pneumovirus partagent avec eux de nombreuses similarités dans leur mécanisme de réplication, leur biologie cellulaire, ainsi qu'une forte homologie de structure de leur protéine de fusion, en particulier avec les virus hPIV.

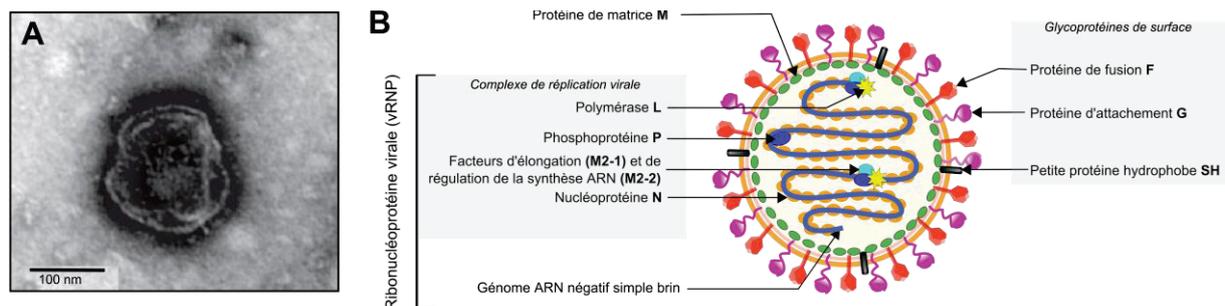
D'un point de vue phylogénétique, les plus proches virus pathogènes humains des virus hMPV restent les virus hRSV, auxquels ils ont toujours été comparés, que ce soit en termes d'organisation génomique, de fonction des protéines virales ou de pathogénèse. Pour autant, le aMPV est le virus le plus proche génétiquement du hMPV (particulièrement les aMPV du groupe C) et des analyses phylogénétiques estiment que le hMPV aurait dérivé de ce virus aviaire il y a plus de 200 ans (24).

### 1.3 Description de la particule virale

Les observations en microscopie électronique d'isolats infectieux cliniques de virus hMPV ont montré la présence de particules virales pléiomorphiques, de formes sphériques à filamenteuses, de manière similaire aux paramyxovirus (**Figure 2A**).

L'enveloppe extérieure présente un diamètre variant de 150 à 600 nm, avec une moyenne autour de 200 nm (17, 25), et elle protège le complexe ribonucléoprotéique interne (vRNP). Cette enveloppe est de type bicouche lipidique, dérivant de la membrane plasmique des cellules infectées ; elle est recouverte de nombreuses glycoprotéines virales de surface (F, G et SH, **Figure 2A**). Ces dernières forment des spicules pouvant mesurer de 13 à 17 nm de longueur, selon leur conformation (pour les formes pré- et post-fusion de la protéine F) et leur niveau de glycosylation qui est particulièrement variable pour les protéines SH et G. Chacune de ces protéines de surface seront plus longuement décrites dans le chapitre 2.3.

A l'intérieur de l'enveloppe du virus hMPV, la protéine de la matrice M tapisse la face interne de la bicouche lipidique et participe ainsi à la structure de la particule virale (**Figure 2B**). De manière similaire au hRSV, la longueur du complexe vRNP du hMPV varie de 200 à 1000 nm avec un diamètre de 13.5 nm (16, 26, 27). Ce complexe, organisant et protégeant le génome viral à ARN, est constitué de nucléoprotéines N, de protéines L (pour *Large polymerase*), de phosphoprotéines P et des protéines M2-1 et M2-2 (facteurs d'élongation et



**Figure 2 – La particule virale hMPV : observation microscopique et représentation schématique.** (A) Cliché d'une particule virale de hMPV observée en microscopie électronique. La particule est généralement de forme sphérique mais irrégulière. Sa surface est hérissée de glycoprotéines virales formant des spicules très denses aux électrons. Image tirée de Feuillet et al, 2012 (28). (B) Schéma de la particule virale hMPV avec les trois glycoprotéines de surface F, SH et G et les protéines M internes formant la matrice de la particule et protégeant le complexe ribonucléoprotéique viral (vRNP).

de régulation de la synthèse de l'ARN respectivement) (**Figure 2B**). Ces protéines sont aussi responsables de la réplication virale et seront décrites dans le paragraphe 2.1.

#### **1.4 Organisation génomique**

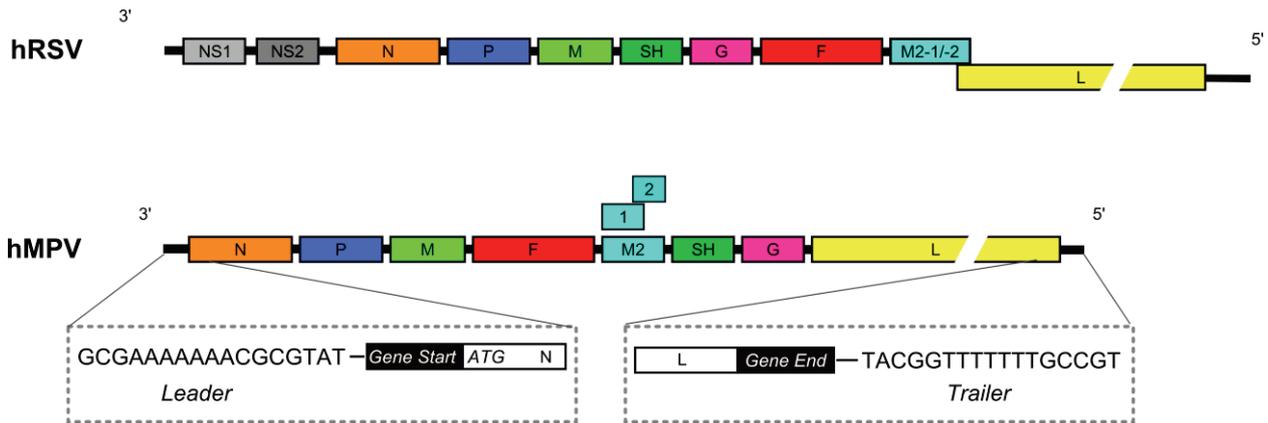
Le génome du hMPV est constitué d'une unique molécule d'ARN simple brin négatif d'un peu plus de 13 kilobases (kb). La longueur du génome du hMPV est variable selon la souche virale, contrairement aux *Paramyxovirus* dont la taille génomique est soumise à la « règle de six » (détaillée au paragraphe 2.1.1).

Le génome est composé de 8 gènes, organisés les uns à la suite des autres et codant pour 9 protéines (29). En effet, le gène M2 possède 2 cadres de lecture ouverts (ORFs) chevauchants et code pour les protéines M2-1 et M2-2. Les gènes sont orientés selon l'ordre N-P-M-F-M2-SH-G-L de l'extrémité 3' à l'extrémité 5' du génome (**Figure 3**). Cette organisation est strictement identique à celle du virus aMPV, mais elle diffère avec le génome du hRSV par l'absence de gènes non-structuraux NS1 et NS2 en début de génome (d'où une différence de taille génomique d'environ 2 kb), ainsi que par la position des gènes SH et G en aval du gène F plutôt qu'en amont chez hRSV (**Figure 3**) (30).

Chaque gène est encadré par des séquences consensus : (i) *Gene Start* en 3' (GGGACAA n TnnnAATG) pour l'initiation de transcription ; (ii) le signal de coiffe de l'ARNm ; et (iii) *Gene End en 5'* (AGTTA nnnAAAA) pour la terminaison de la transcription et la formation de la queue poly-adénylée des ARNm (31).

De part et d'autre du génome ont été décrites des séquences promotrices, partiellement complémentaires, nommées séquences *Leader* en amont du premier gène N et *Trailer* en aval du dernier gène L (**Figure 3**) (32). La région *Leader* contient le site d'initiation de la transcription des ARNm viraux et du brin d'ARN matrice de polarité positive. La région *Trailer*, sur le brin ARN positif, contient le promoteur pour la réplication du brin d'ARN génomique négatif qui sera ensuite encapsidé et incorporé lors du bourgeonnement des nouveaux virions hMPV. La transcription et la réplication virales seront davantage présentées dans le chapitre 3.2.

On considère que le génome du hMPV est compact car, en dehors de l'information codante, des séquences promotrices *Leader* et *Trailer* et des séquences *Gene Start* et *Gene End*, il existe très peu de séquences considérées comme non fonctionnelles ; les régions intergéniques étant généralement très courtes, de 1 à 34 nucléotides (nt), à l'exception des régions précédents les deux derniers gènes G et L qui sont plus longues, entre 117 et 190 nt (33).



**Figure 3 - Organisation des génomes hMPV et hRSV.** Les 8 gènes pour le hMPV (9 ORFs) et 10 gènes pour le hRSV sont ordonnés selon la représentation ci-dessus. Les régions 3' et 5', correspondant à l'origine et la terminaison du génome respectivement, sont détaillées pour le virus hMPV avec les séquences consensus *Leader* et *Trailer*, ainsi que la présence de séquences *Gene Start* et *Gene End* en début et fin de chaque gène (ici placées uniquement sur les gènes N et L de hMPV).

#### 1.4.1 Les génotypes viraux et leurs variabilités

L'analyse phylogénétique de portions des gènes F (nucléotides 780 à 1 221 de l'ORF de F) et G (nucléotides 657 à 708 de l'ORF de G) permet de diviser les virus hMPV en deux groupes principaux A et B, à l'image du hRSV (17, 18, 33-37), et de sous-diviser chacun de ces groupes en deux sous-groupes A1, A2, B1 ou B2 (38). En effet, l'homologie de séquence nucléotidique pour le gène F se situe entre 97-100% au sein d'un sous-groupe, entre 94-96% au sein d'un groupe et entre 84-86% entre les différents groupes. En revanche, le gène G présente beaucoup plus de variabilité, avec des homologies de séquence entre 93-100% au sein d'un sous-groupe, entre 76-83% au sein d'un groupe et entre 50-57% entre les différents groupes (36). De plus, l'analyse phylogénétique plus fine du gène F ainsi que d'un fragment du gène N (nucléotides 473 à 877 de l'ORF de N) permet aussi de différencier deux clusters phylogénétiques au sein du sous-groupe A2, nommés A2a et A2b (39).

Malgré cette variabilité protéique importante pour les glycoprotéines virales de surface, il n'a pas été démontré à ce jour que ces sous-groupes hMPV pouvaient représenter des groupes antigéniques distincts. En effet, plusieurs études démontrent une bonne reconnaissance croisée des anticorps neutralisants dirigés contre l'un ou l'autre de ces sous-groupes (36, 40).

L'alignement complet des génomes hMPV nous montre par ailleurs que les deux groupes A et B ont un fort pourcentage d'identité de séquence en acides aminés pour la plupart de leurs protéines (de 85 à 97% d'identité, **Tableau 1**), à l'exception des protéines SH et G (59% et 37% d'identité, respectivement) (29, 33, 35, 41). En comparaison, les protéines SH et G du hRSV montrent aussi une grande variabilité entre génotypes A et B, même si celle-ci est moins marquée avec 72 et 55% d'identité, respectivement (**Tableau 1**).

Des analyses récentes sur l'ensemble des séquences disponibles de génome complet de virus hMPV (103 séquences) ont estimé que l'ancêtre commun des cinq sous-groupes hMPV se situerait entre 220 à 470 ans, pouvant correspondre à la distance phylogénétique séparant le hMPV du aMPV C, comme précédemment avancé (24, 42). En effet, les virus hMPV partagent une plus grande homologie de séquence avec les virus aMPV du groupe C qu'avec les deux autres génotypes aMPV A et B (**Tableau 1**), ce qui suggère une plus grande proximité phylogénétique. D'après ces mêmes analyses, le sous-groupe A2b du hMPV est celui qui est apparu le plus récemment (42).

---

**Tableau 1 - Identité de séquence d'acides aminés entre la séquence de hMPV 00-1 (A1) et d'autres virus de la même famille (%)**

	N	P	M	F	M2-1	M2-2	SH	G	L
<b>hMPV B</b>	96	85	97	95	96	89	59	37	94
<b>aMPV A/B</b>	69	51-55	76-78	67	71-72	26-27	>20	-	64
<b>aMPV C</b>	88	68	87	81	84	56	28	27	80
<b>hRSV A/B</b>	41	23-24	37-38	33	35-36	>20	23	15	44

(-) pourcentage non déterminé. Tableau adapté de (29, 43, 44).

---

## **1.5 Épidémiologie et manifestations cliniques**

L'épidémiologie du hMPV présente de nombreuses caractéristiques communes avec celle du hRSV. Le virus cible préférentiellement les cellules ciliées de l'arbre respiratoire humain, ainsi les infections à hMPV symptomatiques induisent principalement des infections aiguës des voies respiratoires basses. Les signes cliniques sont variables (la toux, les

difficultés respiratoires et la fièvre) et les pathologies associées sont principalement la bronchiolite pédiatrique, le syndrome grippal chez l'adulte, ou encore la pneumonie grave chez les patients âgés ou immunodéprimés, ce qui complique le diagnostic et l'identification du hMPV (12-14, 18, 38, 45, 46).

### **1.5.1 Transmission, répartition géographique et saisonnière**

Le mode de transmission du hMPV n'a pas été clairement défini, mais il pourrait être similaire à celui du hRSV, c'est-à-dire une transmission par contact direct avec une personne infectée et/ou par la propagation aéroportée d'aérosols et/ou de gouttelettes salivaires (47). La période d'incubation du virus semble être de 4 à 9 jours et son excrétion s'étale sur une période de cinq jours à deux semaines après l'infection (48-52). En effet, dans une étude mettant en jeu des infections hMPV expérimentales chez l'Homme adulte, le pic de réplication virale a été mesuré entre 6 à 9 jours après l'inoculation du virus, correspondant à l'apparition de signes cliniques tels que des rhinorrhées chez les patients symptomatiques (53).

Après sa découverte en 2001, les infections à hMPV ont été décrites sur tous les continents (49, 54-68): Dans les pays tempérés, ces infections présentent une saisonnalité avec un pic d'incidence de la fin de l'hiver au début du printemps, généralement en léger retard par rapport au pic épidémique du hRSV (12, 18, 54, 69-76). Dans les pays à climat tropical et subtropical, les infections à hMPV (à l'image de celles à hRSV) suivent une saisonnalité plus variable, augmentant ainsi l'incidence des maladies respiratoires aiguës chez les nourrissons et jeunes enfants, avec notamment une activité plus importante au printemps et en début d'été (49, 55, 59, 60, 77).

Tous les rapports de surveillance épidémiologiques signalent communément la co-circulation de virus hMPV de tous les géotypes précédemment décrits, dépendamment de la zone géographique et des années (17, 46). De manière intéressante, depuis quelques années, le sous-groupe A2 (A2a et A2b) semble être prédominant par rapport au sous-groupe A1 (2, 34, 78, 79). Ce différentiel commence aussi à apparaître pour le sous-groupe B2 par rapport au sous-groupe B1, bien que moins marquée pour le moment (80). Ceci suggère que des caractéristiques (qu'il reste à déterminer) des souches A2 et B2 leur confèrent un avantage en terme de dissémination, mais cette hypothèse devra être confirmée dans le futur avec une surveillance épidémiologique plus détaillée.

### **1.5.2 Sérologie**

Les études indiquent une séropositivité de la population humaine de 80% à partir de 2 ans de vie et elle atteint près de 100 % entre 5 et 10 ans (56, 62, 63, 81-85). Ainsi la quasi-totalité de la population humaine possède des anticorps circulants pour lutter contre les ré-infections (86). Par ailleurs, ces anticorps seraient moins abondants chez les adultes à partir de 40 ans, donnant l'opportunité aux virus hMPV de provoquer à nouveau des pathologies respiratoires dans la classe d'âge plus haute (87). Les cas de ré-infections symptomatiques par le hMPV chez l'adulte, parfois graves, suggèrent également que la réponse immunitaire induite est imparfaite (18, 88).

### **1.5.3 L'infection hMPV chez l'enfant**

Le virus hMPV est une des causes majeures de bronchiolite pédiatrique, responsable de 5 à 15% des hospitalisations imputables aux infections des voies respiratoires basses aiguës chez les jeunes enfants (12, 13, 18, 64, 78, 89-94). Ces virus sont également les agents étiologiques responsables de 12-15 % des consultations pour infections des voies respiratoires hautes et basses des enfants non-hospitalisés (14, 65, 68, 91, 93). Les pathologies les plus rapportées chez les jeunes enfants sont la bronchiolite avec ou sans pneumonie associée. Les principaux symptômes de l'infection par le hMPV chez l'enfant comportent la rhinorrhée, la toux, la détresse respiratoire ou encore la fièvre, comme ceux induits par le hRSV (95, 96). Le hMPV peut aussi causer des infections des voies respiratoires supérieures, pouvant être associées à des otites, alors que les symptômes non respiratoires, tels que la diarrhée, les vomissements et l'apparition d'érythème, sont plutôt rares (46, 97-101).

L'âge moyen des enfants hospitalisés des suites d'une infection par le hMPV est de 6 à 12 mois, soit plus tard que celle provoquée par le hRSV, qui survient principalement entre 0 et 3 mois (12, 38, 82, 95, 96, 102, 103). Cependant, la présence des anticorps maternels contre hMPV ne permet pas d'expliquer ce délai. Ils sont détectables de manière similaire à ceux dirigés contre hRSV dans les premiers mois de vie et atteignent un titre minimal entre le 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> mois, avant que les nourrissons ne développent leurs propres anticorps (57, 81, 85). Ainsi, d'autres facteurs, pour l'instant non élucidés, doivent être responsables de ce délai de déclenchement de la pathologie associée à hMPV vis-à-vis de celle des virus hRSV.

#### **1.5.4 L'infection hMPV chez l'adulte et la personne âgée**

La part du hMPV dans les pathologies respiratoires chez les adultes est moins décrite par rapport à l'incidence des virus influenza, adénovirus ou rhinovirus par exemple. Cependant, certaines études ont pu identifier le virus hMPV chez 5 à 10% des adultes ou personnes âgées présentant une infection aiguë des voies respiratoires (104-107) et chez 3 à 5% des adultes ayant une exacerbation d'une pathologie pulmonaire chronique ou d'une pneumonie acquise en communauté (87, 108-110). Plusieurs études ont d'ailleurs rapportés des épidémies sévères au sein de centres de soin de moyen et long séjour (48, 88, 111, 112).

Chez les jeunes adultes, le virus hMPV est associé à des symptômes grippaux ou des rhumes (104, 105, 113) alors, qu'avec l'âge, des difficultés respiratoires telles que des dyspnées ou des respirations sifflantes sont plus souvent décrites (105). Des cas d'infections graves par le hMPV sont plus rarement décrits chez des adultes (88, 110-112, 114-118). Chez les personnes âgées, les infections à hMPV causent souvent des bronchites ou des pneumonies. Sur cette tranche d'âge, plus vulnérables aux ré-infections à cause de la sénescence du système immunitaire, de telles infections à hMPV ne sont pas anodines et, dans certains cas, elles peuvent s'avérer fatales (18, 87, 105).

De plus, chez l'adulte, certaines de ces données concernant la pathogénèse du virus hMPV ont pu être confirmées grâce à une étude clinique (NCT01109329), réalisant des infections expérimentales hMPV par voie intra-nasale chez des Hommes adultes et sains et séropositifs (119). Cette étude a ainsi démontré que : (i) plus de la moitié des individus infectés ne présentait pas de réplication virale (détection biomoléculaire négative à partir de 3 jours post-inoculation), confirmant la protection partielle de la population contre le hMPV ; (ii) seulement 20 à 30% des individus hMPV-positifs développaient des symptômes, de type rhinorrhée ; (iii) le pic de réplication virale, pour les individus concernés, se situait bien entre 7 et 9 jours après inoculation, sans distinction entre adultes symptomatiques ou non. Par ailleurs un panel de cytokines a également été caractérisé suite à l'infection, comportant notamment l'IL-10 et l'IFN- $\gamma$  chez les adultes malades (119).

#### **1.5.5 Facteurs de risque et de sévérité**

Depuis la découverte du hMPV, de nombreuses études ont tenté d'identifier les facteurs impliqués dans la sévérité de certaines infections par le hMPV. Cependant, en intégrant toutes les informations récoltées lors des études rétrospectives, il est encore difficile d'avoir une image claire des facteurs de risque et de sévérité associés au hMPV, que

ce soit en termes (i) d'âge; (ii) de sexe; (iii) de génotype viral; (iv) de présence de co-infections virale ou bactérienne ou (v) des conditions de santé de l'individu (15, 120-126).

L'âge médian des individus infectés par le hMPV est d'environ 17 mois, contre 7 mois pour le hRSV, mais le hMPV touche plus sévèrement les enfants entre 6 et 12 mois (126). Toutefois, étant donné cet âge, il apparaît que la prématurité à la naissance (avant la 36<sup>ème</sup> semaine de gestation) est un facteur aggravant de la maladie, dans le cas de ces deux virus (12, 93, 102, 127-132). Concernant le sexe des enfants atteints, il n'a pas été démontré de corrélation claire avec la sévérité des atteintes pulmonaires (125, 127). De même, l'implication du génotype viral et/ou de la charge virale dans la sévérité de la pathologie reste également sujette à controverse, du fait de plusieurs études contradictoires (126, 133-135).

En outre, le virus hMPV peut être détecté en combinaison avec d'autres pathogènes respiratoires viraux (hRSV, hPIV, bocavirus, rhinovirus, coronavirus, adénovirus ou virus influenza A / B) ou bactériens (*Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* ou *Chlamydia pneumoniae*) (136-143). Cependant, les interactions du hMPV avec ces pathogènes, de même que l'impact de la co-infection sur la sévérité de la maladie, sont mal décrits et reposent principalement sur l'analyse de cas isolés. Comme les saisonnalités du hMPV et du hRSV se chevauchent à la fin de l'hiver, la question se pose en particulier concernant les co-infections hMPV / hRSV, qui pourraient être corrélées aux cas d'infections respiratoires les plus sévères. Quelques études épidémiologiques ont montré une corrélation entre ces co-infections virales et la bronchiolite grave, s'opposant à d'autres études qui n'ont pas pu établir de lien concluant (12, 58, 123, 136, 142, 144-150). Ainsi, la co-détection de ces deux pathogènes viraux pourrait simplement résulter d'infections successives. Concernant les cas de co-infections bactériennes, quelques études établissent une corrélation entre hMPV et *S. pneumoniae*, en particulier. Par exemple, elles mettent en évidence un lien entre infection à *S. pneumoniae* et séroconversion hMPV chez le nourrisson ou prédisposition à l'infection hMPV *in vitro* (141, 151). Inversement, en modèle expérimental murin, il a aussi été montré qu'une première infection par le hMPV prédisposait à la sévérité de la pathologie associée à une infection secondaire à *S. pneumoniae* (152). Les « interactions » entre hMPV et *S. pneumoniae* semblent ainsi contribuer au développement d'insuffisances respiratoires sévères et constituent un facteur aggravant des pneumopathologies. Cependant, les mécanismes sous-jacents de cette co-infection ne sont pas connus pour l'instant.

Le contexte d'une maladie chronique, telle que l'asthme, les atteintes cardio-pulmonaires congénitales ou encore l'épilepsie, semble augmenter la susceptibilité de développer une infection grave liée au virus hMPV (12, 93, 102, 106, 127-132, 153-157). Une augmentation de la mortalité suite à une infection par le hMPV a aussi été rapporté chez

les malades ayant reçu une greffe d'organes solides (158) ou une greffe de cellules souches hématopoïétiques ( avec un taux de mortalité de plus de 40%) (159, 160).

Concernant les individus souffrant d'atteintes respiratoires chroniques, les études sont mitigées quant à l'impact du virus hMPV dans l'exacerbation de l'asthme (161). En effet, chez l'adulte, certaines analyses prospectives corrélient l'exacerbation de l'asthme avec des infections virales à rhinovirus, influenza, hPIV et hRSV principalement, mais le hMPV est rarement ou peu impliqué (14, 161-168). Par contre, chez les jeunes enfants (de moins de 24 mois en particulier), plusieurs études montrent l'importance des virus hMPV dans l'apparition d'atteintes asthmatiques pouvant conduire à l'hospitalisation, étant le virus majoritairement détecté dans ces cas avec une incidence de 3,9 à 22,6 % dépendamment des études, suivi des bocavirus, du hRSV et des rhinovirus (161, 169).

## **1.6 Diagnostic**

A ce jour, le diagnostic du hMPV peut être réalisé essentiellement par la culture cellulaire, par un test d'immunofluorescence directe ou par un test de biologie moléculaire, à partir d'aspirations naso-pharyngées (96). Étant donné la durée nécessaire à l'apparition des ECPs (environ deux semaines), la culture cellulaire n'est pas la méthode privilégiée pour le diagnostic du hMPV. Le test d'immunofluorescence directe consiste en la détection d'antigènes viraux à l'aide d'anticorps étiqueté d'un fluorophore. L'avantage de cette méthode est qu'elle est rapide (environ 2h) et qu'elle peut être utilisée en tests « multiplex » pour la détection simultanée d'un panel de pathogènes respiratoires. Toutefois, ces tests d'immunofluorescence directe sont moins sensibles que les tests de biologie moléculaire (170). Ces derniers consistent principalement en l'amplification de fragment des gènes N ou F par RT-qPCR (171). La limite de cette dernière méthode, associée à sa sensibilité et sa spécificité, est que la variabilité de la séquence génomique peut rendre difficile la mise au point d'un test universel pour tous les sous-groupes hMPV (172).

## **2. Les protéines virales et leur(s) fonction(s)**

Étant identifié depuis 2001, il reste de nombreuses lacunes concernant la compréhension de la biologie fondamentale et cellulaire du virus hMPV, et notamment des fonctions de ses protéines. Par leur proximité biochimique et phylogénétique avec les protéines du hRSV, les protéines du hMPV sont souvent assimilées à celles du hRSV, étudiées depuis plus longtemps. Ce faisant, la biologie du hMPV est généralement

représentée à l'image de celle du hRSV, mais c'est une approche qui est assez réductrice et des études plus approfondies sont nécessaires pour détailler les caractéristiques propres des virus hMPV et de leurs protéines.

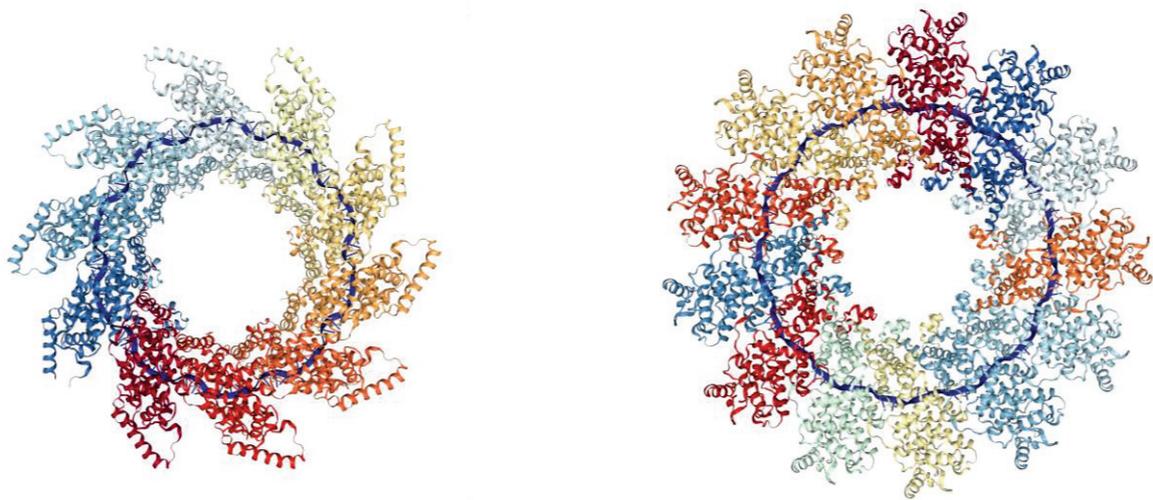
## **2.1 Les protéines impliquées dans la réplication virale**

Relativement peu de données concernant la machinerie de réplication virale du hMPV sont disponibles, en comparaison à celle du hRSV. Cette réplication implique cinq protéines virales qui sont la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la polymérase (L), ainsi que les facteurs accessoires M2-1 et M2-2 (32, 173, 174).

### **2.1.1 La nucléoprotéine N**

Le gène N du hMPV comporte 1185 nt et code pour une protéine de 394 acides aminés. La nucléoprotéine aurait plusieurs fonctions au sein de la particule virale hMPV: (i) encapsider le génome viral afin de le protéger des ARNases cellulaires ; (ii) guider la transcription du génome par la polymérase virale L et (iii) interagir avec la protéine M lors de l'assemblage des particules virales (175).

La structure cristallographique du complexe nucléoprotéique N-ARN est connue pour le virus hMPV (PDB 5FVC) et a permis notamment de bien différencier à ce niveau les *Pneumoviridae* des *Paramyxoviridae* (**Figure 4**) (176). À la différence des Paramyxovirus, dont la nucléocapside présente un diamètre de 17 à 20 nm selon les virus, la protéine N des Pneumovirus hRSV et hMPV est de taille plus petite et forme une nucléocapside plus étroite de 13,5 nm (27). Dix monomères de protéine N du hMPV constituent un des anneaux formant la nucléocapside, et chaque protéine N est capable d'interagir avec 7 nucléotides de l'ARN génomique (27) (**Figure 4**). Le génome des Pneumovirus est dans ce cas enroulé à l'extérieur de la nucléocapside, ce qui pourrait aussi permettre plus de variation de la taille génomique du virus. En revanche, chez les Paramyxovirus, treize protéines N composent un anneau de nucléocapside et chaque nucléoprotéine interagit avec 6 nucléotides de l'ARN génomique (177). Pour ces virus, le génome à ARN est enfermé au cœur de la nucléocapside où il est soumis à des contraintes d'interactions (1 protéine N pour 6 nt), ce qui explique l'existence de « la règle de six » d'après laquelle la taille du génome viral ne peut être qu'un multiple de six (178). Ainsi, la différence de structure de la nucléocapside formée par la N du hMPV permettrait d'expliquer pourquoi le génome des Pneumovirus n'est pas soumis à « la règle de six » conditionnant la longueur du génome viral des Paramyxovirus (26).



**Figure 4 - Comparaison de la structure de la nucléoprotéine N de hMPV et celle de hPIV-5.** À gauche, structure décimérique de la nucléoprotéine N de hMPV associée avec l'ARN viral (PDB 5FVC) et à droite, structure similaire de la nucléoprotéine du virus hPIV-5 composée de 13 sous-unités (PDB 4XJN).

---

Par ailleurs, il a été suggéré que cette nucléocapside subisse des torsions et des réarrangements pour rendre l'ARN génomique accessible au complexe polymérase au cours de la transcription virale (176). En cela, la nucléoprotéine pourrait servir de guide au complexe de la polymérase virale et favoriser son interaction avec la molécule d'ARN viral. Un autre élément en faveur de ce rôle proposé est que la nucléoprotéine peut adopter deux conformations : celle qui est liée à l'ARN viral et celle qui interagit avec le cofacteur de la polymérase, la phosphoprotéine P (27).

### 2.1.2 La phosphoprotéine P

Le gène P du hMPV est composé de 885 bp et code pour une protéine de 294 acides aminés. Dans la particule virale hMPV, la protéine P est retrouvée sous forme tétramérique (179). La phosphoprotéine P semble avoir deux rôles principaux, (i) celui de guider et maintenir l'interaction entre la polymérase L et la nucléocapside pour une réplication virale efficace, et (ii) celui d'aider au maintien de la structure de cette nucléocapside. Elle possède en effet deux domaines de liaison et peut interagir d'une part avec la polymérase L, comme un cofacteur, et d'autre part, avec la nucléoprotéine N (179).

Le site d'interaction de la phosphoprotéine avec la protéine L a été localisé pour les virus hRSV (180). Il s'agirait d'une courte portion, de moins de 30 résidus d'acides aminés, située dans la région C-terminale, juste en amont du domaine d'interaction avec N. Ce domaine protéique est riche en résidus hydrophobes et serait déterminant pour l'activité polymérasique de L.

L'interaction de P avec la nucléoprotéine N se fait *via* son extrémité C-terminale (riche en glutamate), et elle est supposée participer au maintien de la structure de la nucléocapside virale. En effet, des expérimentations ont montré que la nucléocapside, (complexe de protéines N et de la molécule d'ARN génomique), ne se formait de manière adéquate que lorsque la phosphoprotéine était co-exprimée (181, 182). Sur la base de la structure cristallographique des complexes formés par les protéines N et P, du virus de la stomatite vésiculaire (VSV), du virus Ebola ou encore du virus de la rougeole, plusieurs hypothèses peuvent être formulées concernant la liaison de la protéine P avec N qui permettrait également de garder disponibles les extrémités C-terminale et N-terminale de la nucléoprotéine pour son oligomérisation en nucléocapside (183-186).

Chez les Pneumovirus et le hRSV, il a aussi été suggéré que la protéine P participe au recrutement du facteur d'élongation M2-1 dans le complexe ribonucléoprotéique grâce à l'interaction de tétramères de protéines M2-1 avec ceux formés par la protéine P (187, 188).

### 2.1.3 La polymérase L

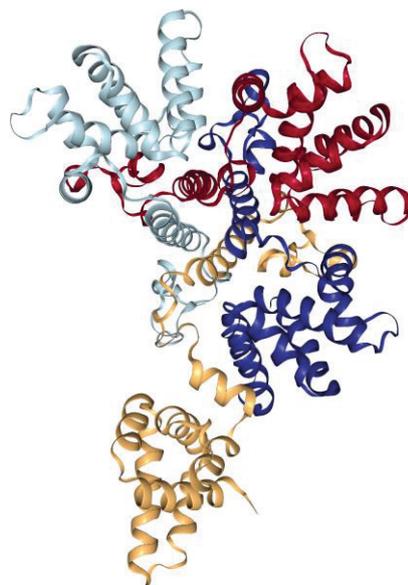
Le gène L (pour *large polymerase*) du hMPV est composé de 6018 bp (presque la moitié du génome complet du hMPV) et code pour une grande protéine de 2005 acides aminés. Par similitude de séquence et de positionnement dans le génome avec les autres Pneumovirus ou Paramyxovirus, le gène L correspond à la protéine responsable de l'activité ARN polymérase ARN-dépendante (RdRP) du virus hMPV (29).

Sa structure complète n'est pas connue, mais des prédictions bio-informatiques indiquent la présence dans la protéine L du hMPV de six domaines conservés entre les polymérases des *Mononegavirales*. Ces domaines prédits contiendraient les régions actives enzymatiquement pour la synthèse d'ARN et de la coiffe des ARNm (activités méthyltransférase et guanylyltransférase) (189, 190). Ces domaines fonctionnels de la protéine L auraient aussi un rôle dans sa conformation, ainsi que dans son interaction avec les protéines N et P et le brin matrice d'ARN viral pour former le complexe polymérase RdRP actif. Il a été proposé que les changements conformationnels de la polymérase associés à ses différentes activités seraient guidés par son interaction avec son cofacteur P, qui lui servirait ainsi de protéine chaperonne (179).

#### 2.1.4 Les facteurs d'élongation et régulation de la synthèse d'ARN (M2-1 et M2-2)

Le gène M2 du hMPV est unique aux Pneumovirus et est composé de deux cadres de lecture ouverts (ORFs) chevauchants, produisant les protéines M2-1 et M2-2 qui sont toutes les deux des cofacteurs de la polymérase virale L et qui régulent son activité (29, 173).

Pour le hMPV, la protéine M2-1 est constituée de 187 acides aminés. Elle est très conservée parmi les Pneumovirus, en particulier au niveau de sa région N-terminale. Elle s'organise en tétramère, de façon asymétrique, et sa structure cristallographique a été résolue pour le virus hMPV (PDB 4CS7, **Figure 5**) (187). Elle correspond au facteur d'élongation de la transcription virale et joue également un rôle important dans la réplication virale, en liaison avec la polymérase. En effet, la protéine M2-1 du hMPV serait capable d'augmenter la processivité du complexe RdRP en l'empêchant de se détacher entre chaque gène, et aurait ainsi la fonction de facteur d'anti-terminaison (187). La protéine M2-1 possède en effet des sites de liaison à la phosphoprotéine P ainsi qu'à l'ARN génomique de type domaine en doigt-de-zinc (187, 188). Il a été suggéré que ces domaines interagissent spécifiquement avec les régions consensus *Gene End*, et en particulier avec l'enchaînement des nucléotides adénosine dans ces régions, pour empêcher la dissociation du complexe RdRP à la fin de la



**Figure 5 – Structure cristallographique du tétramère asymétrique formé par la protéine M2-1 du hMPV. Chaque sous-unité protéique est représentée d'une couleur différente (PDB 4CS7).**

transcription de chaque gène, comme cela a aussi été décrit pour le hRSV (187, 191).

Le deuxième ORF du gène M2 est plus court et code une petite protéine M2-2 de 71 acides aminés. Celle-ci est décrite comme un facteur de régulation de la transcription d'ARN et serait impliquée dans le contrôle de la balance d'activité du complexe RdRP entre transcription des ARNm viraux et réplication de l'ARN génomique viral. Le mécanisme de ce processus n'est pas encore complètement élucidé, mais il serait dépendant de l'accumulation de protéines M2-2 et de la capacité de la protéine à interagir directement avec la polymérase L (192).

Pour le hRSV, il a été montré que la protéine M2-1 est nécessaire à la réplication virale à la différence de la protéine M2-2 qui, si elle semble favoriser la réplication virale, n'est pas indispensable (173). Pour le hMPV, une étude a démontré que les deux protéines M2-1 et M2-2 ne sont pas indispensables à la réplication du virus *in vitro*. En effet, des virus recombinants, générés par génétique inverse et possédant une délétion des gènes codant ces protéines, sont capables d'effectuer plusieurs cycles de réplication de manière efficace, même si une accumulation d'ARNm par rapport à l'ARN génomique a été observée dans le cas de la délétion de M2-2 ( $\Delta$ M2-2), démontrant ainsi le rôle de la protéine dans la balance de l'activité du complexe RdRP (173). Par ailleurs, la présence de la protéine M2-1 semble plus importante pour la réplication virale *in vivo*, alors que la protéine M2-2 reste complètement accessoire (173). Ces résultats soulignent le potentiel de ces ORFs et de leur ingénierie quant au développement de stratégies vaccinales, qui seront discutées dans le paragraphe 6.3.

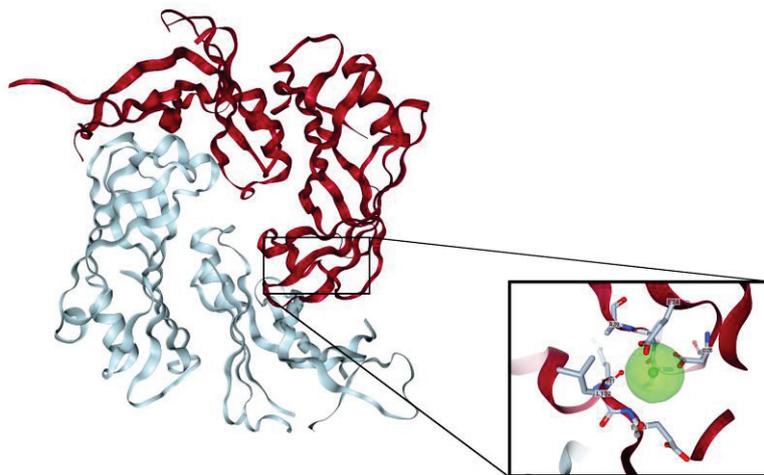
## **2.2 La protéine de matrice M**

Le gène M du hMPV, de 765 bp, code pour une protéine de 254 acides aminés (28kDa). La structure cristallographique de la protéine M, ainsi que celle des assemblages multimériques qu'elle est capable de former, a été résolue il y a quelques années (PDB 4LP7, **Figure 6**) (193). Une caractéristique de la protéine M du hMPV est qu'elle forme un homodimère de protéines comportant chacune un site de liaison au calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), ce qui stabilise sa structure dimérique (193, 194). Cette caractéristique est assez unique parmi les protéines virales de matrice décrites jusqu'à maintenant et permet aux dimères de protéines M de s'associer « spontanément » en assemblages plus complexes, telles que des structures filamenteuses à la surface des cellules infectées ou encore des protéines solubles

sécrétées dans le surnageant cellulaire (195, 196). A noter que la formation de ces structures filamenteuses de M, semble être impliquée *in vitro* dans le bourgeonnement et la propagation du virus hMPV (195).

Cette capacité d'assemblage de la protéine M illustre bien son rôle clé dans l'organisation et la structure de la particule virale. Notamment, chez les Paramyxovirus et le hRSV, il a été démontré que la protéine de matrice interagit avec la nucléoprotéine N, les domaines cytoplasmiques des glycoprotéines virales de surface F et G, ainsi que la bicouche lipidique de la membrane cellulaire, orchestrant ainsi l'assemblage de la particule virale (175, 197). Cette caractéristique a, par ailleurs, été exploitée avantageusement pour générer des particules pseudo-virales comme candidats vaccin (*Virus-Like Particles*, VLPs) (197-199).

Par ailleurs, un rôle immuno-modulateur a également été proposé pour la forme soluble de la protéine M. En effet, il a été décrit que cette forme était prise en charge par les cellules dendritiques et les macrophages activés et entrainerait ainsi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'interleukine 2 (IL-2) ou l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (196). Plus récemment, le rôle immuno-modulateur de la protéine M du hMPV a été confirmé par l'utilisation de protéines M comme adjuvant à la glycoprotéine de fusion F recombinante, en remplacement et/ou en combinaison avec l'alum, dans des tests d'évaluation de candidats vaccin sous-unitaires (200).



**Figure 6 - Structure de la protéine de matrice M du hMPV.** Représentation d'un dimère de protéine M (de couleur rouge ou gris pour chaque sous-unité). Dans le cadre est représenté un grossissement du domaine de liaison au calcium sur l'un des monomères (PDB 4LP7).

## **2.3 Les glycoprotéines de surface**

Les virus hMPV codent pour trois glycoprotéines (F, G et SH) qui sont fortement exprimées à la surface des cellules hôtes infectées, ainsi qu'à la surface des virions nouvellement produits (**Figure 2**).

### **2.3.1 La glycoprotéine de fusion F**

La glycoprotéine F est codée par un gène de 1620 bp et comporte 539 acides aminés. C'est une glycoprotéine transmembranaire de fusion de Classe I qui s'organise sous forme de trimères dans la bicouche lipidique membranaire (201). C'est une des protéines du virus hMPV qui est la plus conservée entre les groupes A et B (homologie de séquence supérieure ou égale à 95 %) (202). En revanche, la glycoprotéine F est assez peu conservée entre les Pneumovirus avec, par exemple, 33 – 34 % d'identité de séquence entre les virus hMPV et hRSV (**Tableau 1**).

La glycoprotéine F de fusion du virus hMPV a longtemps été représentée à l'image des protéines de fusion des Paramyxovirus, telles que celles des hPIV avec laquelle elle partage une forte homologie de structure. Néanmoins, elle présente une différence fondamentale avec les glycoprotéines F des Paramyxovirus, puisqu'elle est, comme celle du hRSV, capable de déclencher de manière autonome son changement de conformation qui mène à la fusion des membranes virale et cellulaire (203), à la différence des Paramyxovirus qui nécessitent l'action d'une protéine d'attachement coopératrice de F (204). De plus, il est admis que les glycoprotéines F des virus hMPV et hRSV possèdent également des propriétés intrinsèques d'attachement cellulaire et constituent de ce fait un déterminant viral clé de l'infection (205, 206). Il a d'ailleurs été décrit que la glycoprotéine F constituait également l'antigène majeur du virus hMPV, du fait de son importante exposition à la surface des virions et de ses propriétés antigéniques (207).

#### *2.3.1.1 Les domaines fonctionnels de la protéine F*

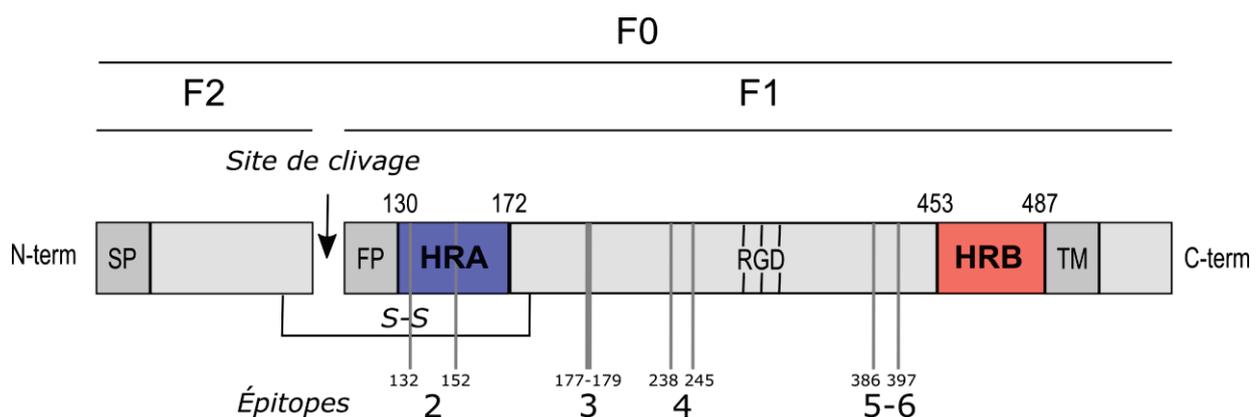
L'étude de la glycoprotéine de fusion F du hMPV s'est principalement faite par homologie avec celles des autres paramyxovirus, en particulier de la glycoprotéine F du virus hPIV-5 qui a longtemps servi de matrice pour la modélisation tridimensionnelle de la protéine F du hMPV.

Au cours du cycle viral, la protéine F est d'abord synthétisée sous la forme d'un précurseur F0. Pour être actif, ce précurseur doit être clivé par une ou des protéase(s) cellulaire(s), de type *furine* par exemple, en deux sous-unités F1 et F2 (**Figure 7**) (208). Le

site de clivage de la F du hMPV est un motif RQRS↓ (Arginine-Glutamine-Sérine-Arginine). Généralement, les protéines de fusion virales sont clivées dans l'espace intracellulaire et sont exportées à la membrane plasmique sous leur forme active (209). Cependant, en fonction des souches virales, la culture *in vitro* du hMPV requiert l'addition de protéase, telle que la trypsine, au milieu de culture, ce qui suggère que la F du hMPV est présente sous sa forme inactive F0 à la surface cellulaire et/ou que le site de clivage n'est pas optimal. En effet, une étude a montré qu'il était possible de modifier la susceptibilité à la trypsine de la protéine F du hMPV, par la mutagenèse de son site de clivage selon des séquences dérivées des virus aMPV A ou C, ou encore d'une séquence d'isolat clinique hMPV trypsine-indépendant (210, 211).

Les deux sous-unités F1 et F2 sont liées par un pont disulfure entre les résidus 60 et 182 (**Figure 7**). De l'extrémité N- à l'extrémité C-terminale, plusieurs domaines fonctionnels ont été identifiés (212), tel qu'illustré dans la **Figure 7** :

- un peptide de signal (SP) à l'extrémité N-terminale de la sous-unité F2 qui permet l'export de la protéine F0 à la membrane cytoplasmique à travers le Golgi;
- un peptide de fusion (FP) à l'extrémité N-terminale de la sous-unité F1, qui s'insère dans la membrane de la cellule cible;



**Figure 7 - La protéine de fusion F de hMPV : localisation des domaines fonctionnels et des épitopes antigéniques.** Schéma de l'organisation des domaines fonctionnels au sein de la protéine F du hMPV. Les épitopes antigéniques sont positionnés d'après Ulbrandt et *al.* 2008. SP : Peptide signal. FP : Peptide fusion. HR A / B : Domaines *Heptad Repeat* A/B. RGD : Domaine de liaison à l'intégrine (position 329 à 331). TM : Domaine Transmembranaire.

- deux domaines HRA et HRB (pour *heptad repeat* A et B), constitués d'enchainements de sept acides aminés qui s'organisent en hélice alpha. Ces deux régions sont primordiales pour les changements de conformation de la protéine F. Après repliement de la protéine, un domaine HRA interagit avec un domaine HRB pour former un assemblage de type *coiled-coil* (201, 213);
- un motif RGD (Arginine-Glycine-Aspartate) en position 329 à 331 entre les deux régions HR. C'est un domaine très conservé qui permet l'interaction avec des récepteurs de matrice extracellulaire, en particulier les intégrines  $\alpha V\beta 1$  (214);
- un domaine transmembranaire (TM) à l'extrémité C-terminale, qui permet l'ancrage de la protéine F dans la bicouche lipidique membranaire.

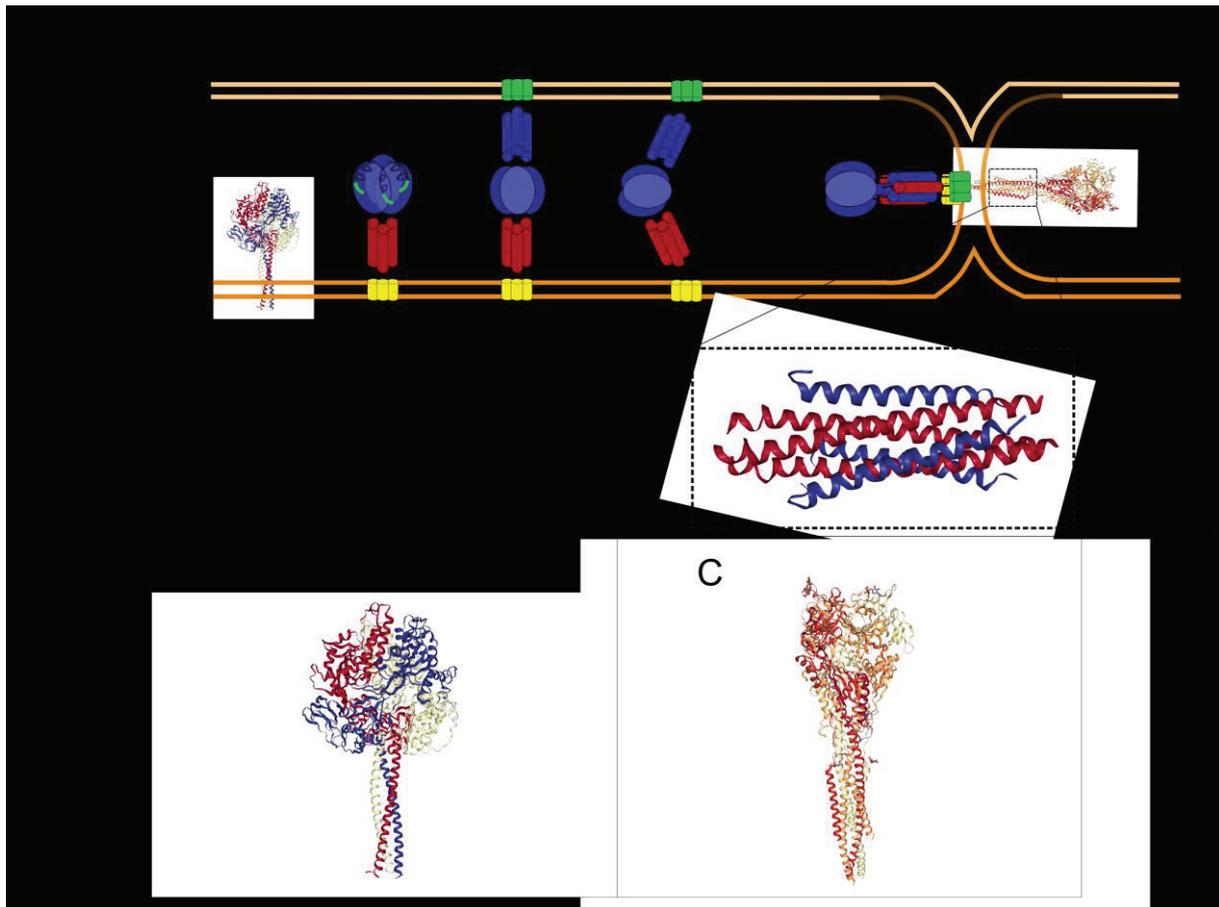
### 2.3.1.2 Le modèle du mécanisme de fusion des protéines virale de Classe I

Comme les protéines de fusion des virus hRSV ou influenza, le mécanisme de fusion médiée par la protéine F du hMPV suit le modèle des protéines de fusion de Classe I, représenté en **Figure 8**.

Dans le cas du virus hMPV, le trimère de protéines F est exprimé en surface membranaire (**Figure 8A. 1**) sous leur forme F<sub>0</sub>, avant d'être activées par l'action de protéase cellulaire de type furine ou trypsine (**Figure 8A. 2**). La protéine F prend alors une forme métastable de pré-fusion. Cette forme a été modélisée par homologie de structure sur le modèle de la protéine de fusion des virus hPIV5 (PDB 2B9B) et hRSV (PDB 5C69 ; **Figure 8B**). Cette activation de la protéine permet l'intégration du peptide de fusion dans la membrane lipidique cible (**Figure 8A. 3**). Cette étape implique très probablement l'interaction de la protéine F et/ou de la protéine d'attachement G avec des récepteurs cellulaires glycosaminoglycanes (GAGs) ou intégrines, afin de maintenir à proximité les membranes cellulaire et virale amenées à fusionner. À cette étape, le déploiement du peptide de fusion permet ainsi l'exposition des domaines HRA en hélices alpha, qui étaient jusque-là recroquevillés au sein de la tête globulaire de la protéine sous sa forme pré-fusion. L'homotrimère de protéine F va alors se remodeler une dernière fois pour adopter une conformation plus stable énergétiquement (**Figure 8A. 4**). Ainsi, les domaines HRA et HRB des trois monomères de F vont se rapprocher grâce au repliement de la partie centrale de chaque protéine, à l'image d'une charnière, et interagir par des liaisons hydrophobes et électrostatiques pour former une structure irréversible, dite de *6-helix-bundle* (6HB, **Figure 8A** dans l'encadré). La force exercée par ce repliement protéique permet alors de rapprocher les membranes lipidiques ce qui, associée à l'action d'autres protéines F à proximité, crée l'ouverture d'un pore de fusion (**Figure 8A. 5**). La forme tridimensionnelle stable de post-

fusion de la protéine F du hMPV (PDB 5L1X) a été résolue récemment et elle est représentée dans la **Figure 8C**.

L'élément déclencheur du processus de fusion médié par la protéine F n'est pas clairement identifié. De manière intéressante, les protéines F des virus hMPV et hRSV, n'ont pas besoin de l'action d'un cofacteur pour provoquer leur changement de conformation, ce

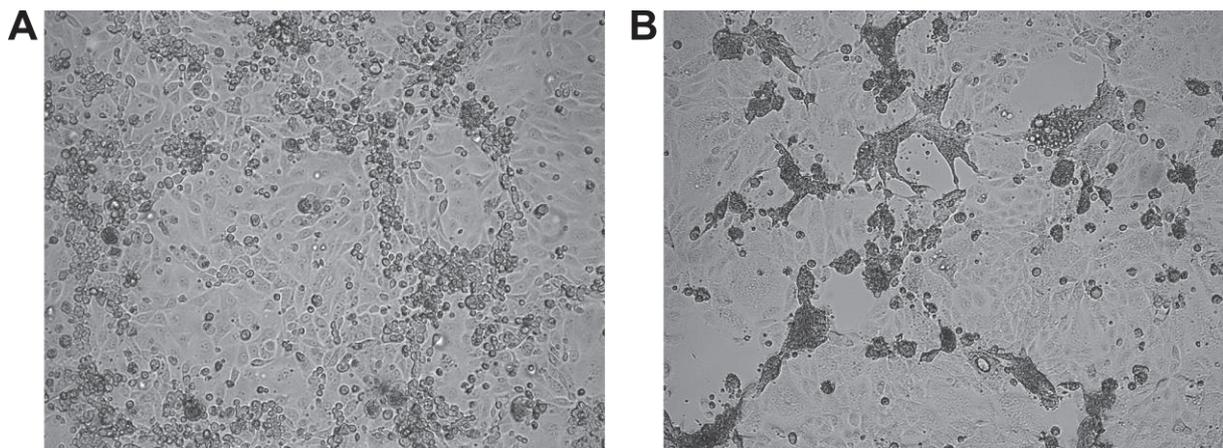


**Figure 8 - Modèle de fusion des protéines de Classe I (A)** Le modèle fait intervenir 5 étapes consécutives. 1 : la présentation de la F (F<sub>0</sub>) trimérique en surface membranaire. 2 : le clivage protéolytique de la forme pré-fusion, peu stable, permettant la libération du peptide fusion. 3 : l'incorporation du peptide fusion dans la membrane lipidique-cible. 4 : le changement de conformation de la F avec le rapprochement des domaines HRA et HRB jusqu'à la formation de la structure irréversible 6HB de post-fusion et l'ouverture du pore de fusion en étape 5. Dans l'encadré figure un grossissement de l'entrelacement des domaines coiled-coil HRA et HRB formant le 6HB. **(B)** Structure trimérique de la protéine F sous forme pré-fusion et modélisé à partir de la structure de la F du virus hPIV5 (PDB 2B9B). **(C)** Structure trimérique de la F de hMPV sous sa forme de post-fusion (PDB 5L1X).

qui suggère que l'échange d'énergie au sein de l'homotrimère de F est suffisant à lui seul, pour permettre le processus de fusion. Des études focalisées sur certaines protéines F de virus hMPV et aviaires, donc l'activité est susceptible au pH acide, proposent que la présence de clusters d'acides aminés chargés au sein de la protéine pourrait générer des répulsions électrostatiques assez importantes pour contribuer aux changements conformationnels de la protéine dans des conditions favorables de pH (212).

### 2.3.1.3 Les phénotypes induits par la protéine F *in vitro*

L'un des paramètres qui ont rendu difficile l'identification initiale du virus hMPV est sa variabilité en termes d'ECPs induits *in vitro*. En effet, il a été décrit par différentes équipes, dont celle du Dr Boivin, que les virus hMPV pouvaient induire des phénotypes cellulaires très variables avec soit (i) un arrondissement des cellules infectées, soit (ii) la formation de grandes cellules multi-nucléées. Pour le premier phénotype, les cellules infectées deviennent réfringentes, lorsqu'elles sont observées en microscopie optique, et se décollent individuellement du tapis cellulaire au cours de l'infection (**Figure 9A**). Le deuxième type d'ECPs observés correspond à un phénotype hyper fusogénique, caractérisé par la formation de syncytia, à l'image des ECPs induit par le hRSV (**Figure 9B**). Si les raisons de cette variété de phénotypes ne sont pas encore complètement élucidées et constituent un des enjeux de l'étude de la protéine F du hMPV, il semble probable qu'elles dépendent



**Figure 9 - Différence de phénotypes *in vitro* induits par la protéine de fusion F de hMPV.** Selon les souches virales, le hMPV peut induire la formation d'ECPs *in vitro*, ici sur des cellules de singe LLC-MK2, allant de (A) cellules arrondies (avec le virus B2/CAN98-75) à (B) la formation de cellules géantes multi nucléées ou syncytia (avec le virus A1/C-85473). Image modifiée de Aerts et al. (2).

principalement des propriétés intrinsèques de la protéine de fusion. Plusieurs études ont suggéré que le phénotype hyperfusogénique de certaines souches hMPV est une conséquence de la susceptibilité au pH de la protéine F, telle que pour la souche A2/CAN97-83 qui induit la formation de syncytia seulement à pH acide, bien que cela ne soit pas représentatif du mécanisme commun d'activation de la protéine (208, 215, 216).

#### 2.3.1.4 La fonction d'attachement de la protéine F

La présence d'un motif RGD (arginine – glycine - acide aspartique), reconnu par des intégrines et récepteurs d'adhésion cellulaires, est unique parmi les protéines de fusion des Pneumovirus et des Paramyxovirus (**Figure 7**). Il a été montré que le blocage de l'interaction RGD-intégrines cellulaires par l'utilisation d'EDTA, d'anticorps monoclonaux ou d'ARN interférents, inhibait jusqu'à 50 % de la liaison des virus hMPV aux cellules, avec pour conséquence une inhibition de l'infection *in vitro* (199, 212, 214).

Cependant, une autre étude a démontré que le domaine RGD n'était pas indispensable au mécanisme de fusion de la protéine F à la différence de l'interaction de la protéine F avec des glycosaminoglycanes de type héparane sulfate, qui aurait un rôle primordial dans l'attachement cellulaire de la protéine et de la fusion membranaire consécutive (217). Par ailleurs, la protéine G du virus hMPV, qui est considérée comme la protéine d'attachement, est aussi capable d'interagir avec les héparanes sulfates, il semble que ces récepteurs cellulaires sont importants dans les étapes précoces de l'infection par hMPV (218). Cependant, il faut noter que des virus recombinants délétés de leur protéine G sont tout à fait capables de se lier *in vitro* aux cellules-cible et d'initier la fusion membranaire concomitante, démontrant ainsi que la protéine F constitue l'unique facteur viral indispensable à la réalisation des premières étapes du cycle viral. Il a aussi été suggéré que, grâce à ses propriétés d'attachement, la protéine F pouvait contribuer au tropisme cellulaire des virus hMPV (205).

#### 2.3.1.5 Les propriétés antigéniques de la protéine F

Comme indiqué précédemment, la protéine F a rapidement été identifiée comme la protéine immunogénique principale du virus hMPV. Elle semble d'ailleurs la seule capable d'induire une protection efficace contre l'infection, bien que les deux autres glycoprotéines, G et SH, soient également exposées à la surface membranaire (40, 207). En effet, exprimée à la surface d'un vecteur viral répliatif hPIV-1, la protéine F de hMPV induit la production de titres élevés d'anticorps neutralisants contre le hMPV après l'immunisation intra-nasale de hamsters. Dans ce modèle, elle est également protectrice face à un challenge infectieux

avec un virus hMPV homologue, alors que les protéines SH et G, exprimées selon la même technique à la surface du vecteur hPIV-1, présentent des propriétés immunogéniques significativement plus faibles (207).

Cinq groupes d'épitopes antigéniques de la protéine F de hMPV, reconnus par des anticorps neutralisants, ont été caractérisés et sont positionnés en **Figure 7** (219, 220). Certains de ces épitopes sont conservés parmi les virus hMPV, et peuvent ainsi entraîner une protection croisée efficace entre différents sous-groupes viraux. D'autres le sont moins, à l'image de l'épitope 3 qui diverge fortement entre les groupes A et B. De manière intéressante, l'épitope 4 par exemple, correspond aussi à l'un des épitopes antigéniques de la protéine F du hRSV (région II). Cet épitope est reconnu par le seul anticorps monoclonal commercialisé et approuvé par la FDA en prophylaxie de l'infection hRSV, le palivizumab (Synagis®, MedImmune) (221). Cependant, il ne présente qu'une efficacité faible voire non significative contre l'infection par le hMPV. Ainsi, la connaissance plus approfondie de ces épitopes est un élément déterminant dans le développement de stratégies prophylactiques et vaccinales, basées sur le ciblage de la protéine F, avec comme perspective la possibilité d'une protection croisée contre les virus hMPV et les virus hRSV.

### 2.3.2 La protéine d'attachement G

Le gène G code pour une glycoprotéine de 217 à 241 acides aminés, du fait d'une extrémité C-terminale de longueur variable selon les souches virales. Sa masse moléculaire variable de 34 à 41 kDa, dépend également de son niveau de glycosylation (20 kDa environ pour la protéine non glycosylée) (222, 223). La protéine G est la plus variable des protéines de hMPV, avec une homologie de 29 à 37% entre virus des groupes A et B (**Tableau 1**) (222). Cependant, elle reste relativement bien conservée au sein de chaque sous-groupe (93 – 100%) (36, 222). Son extrémité N-terminale cytosolique et son domaine transmembranaire sont davantage conservés que son ectodomaine, région non structurée en C-terminaison (33, 222, 224, 225).

La protéine G est une protéine membranaire de type II avec une région transmembranaire qui a également la fonction de peptide signal (localisé entre les acides aminés en position 30 à 53) (35). Après l'acide aminé en position 53, la partie de protéine G qui est exposée à la surface extracellulaire, possède de très nombreux sites potentiels de glycosylation (29, 33, 225, 226). En effet, plus de 40 sites de O-glycosylation et 1 à 4 sites de N-glycosylation sont prédits pour une séquence composée à plus de 30 % en résidus sérine et thréonine (35, 226). De manière intéressante, une duplication de 180 nt au sein du gène G des souches récentes du sous-groupe A2b, à laquelle peut s'ajouter une duplication

de 111 nt, ont été décrites et ajoutent de ce fait 23 à 25 nouveaux sites accepteurs de O-glycosylation pour la protéine G (227-229). Bien que l'impact fonctionnel de ce polymorphisme ne soit pas encore caractérisé, cette duplication pourrait expliquer pourquoi les souches virales du sous-groupe A2b deviennent progressivement prépondérantes depuis 2013. La protéine G a aussi un taux élevé en proline (jusqu'à 10 % de sa composition) ce qui argumente également pour une structure hautement glycosylée de type mucine (29, 224, 225).

Malgré son exposition à la surface des membranes cellulaire et virale, il a été montré que la protéine G ne présente qu'un faible pouvoir immunogénique en comparaison de la protéine F (exprimée par des vecteurs hPIV ou alphavirus) et n'entraîne pas la production d'anticorps neutralisants ou protecteurs contre le hMPV dans différents modèle animaux (souris, rats des cotonniers ou hamsters) (207, 230, 231). Il a notamment été rapporté que l'immunisation des rats des cotonniers avec des protéines G solubles (dont les domaines N-terminaux et transmembranaires ont été tronqués), adjuvantés ou non, pouvait induire la production d'anticorps dirigés contre la protéine G, sans pour autant être associée à des propriétés neutralisantes ou protectrices (230).

La protéine G, en tant que protéine d'attachement, est capable d'interagir avec des glycosaminoglycanes cellulaires (GAGs) comme la protéine F (218). Cette reconnaissance des GAGs est non-spécifique et très variable d'une souche virale à l'autre, notamment du fait de la grande variabilité des protéines G de hMPV dans leur composition en résidus d'acides aminés et dans leur profil de glycosylation (37, 222, 232).

Par ailleurs, comme pour les autres Pneumovirus, la protéine G du hMPV ne possède aucune fonction d'hémagglutination ou de neuraminidase. Plusieurs études ont montré que la protéine G avait des propriétés modulatrices de la réponse immune, pouvant ainsi expliquer en partie le fait que les individus infectés développent une protection incomplète contre le hMPV et qu'ils puissent être sujet à des réinfections ultérieures au cours de leur vie (233-235). L'une des explications avancées est que la protéine G posséderait un pouvoir masquant de la protéine F antigénique grâce à son haut niveau de glycosylation (223). Alternativement, d'autres études ont démontré que la protéine G aurait aussi des propriétés intrinsèques de modulation de la réponse cellulaire. Par exemple, par son interaction directe avec le facteur cellulaire RIG-I, elle pourrait moduler la cascade de signalisation NF- $\kappa$ B / IRF-3 contrôlant l'expression des IFN  $\beta$  et de cytokines, comme RANTES ou IP-10, en cellules pulmonaires humaines A549 (236). La voie de signalisation activée consécutivement à l'engagement des récepteurs Toll-like 4 (TLR-4) des cellules dendritiques dérivées des monocytes (moDC) semble aussi être régulée par la protéine G avec, pour conséquence, la modulation de la production d'interféron de type I (IFN-I  $\alpha/\beta$ ), de cytokines et de chimiokines

(234, 237). Il a également été suggéré que la protéine G de hMPV serait capable de réguler la production d'IFN de type III (IFN  $\lambda$ s) de manière IRF-7 dépendante (238). Au contraire, une autre étude a rapporté que l'absence de la protéine G, tout comme celle de la protéine SH, diminuait l'internalisation du virus hMPV dans les cellules moDC et conduisait, de ce fait, à une activation moindre des lymphocytes T CD4+ (239). Finalement, ces données ont aussi été nuancées depuis par des approches utilisant des ARN interférents dirigés contre la protéine G dans les cellules A549 (240, 241). Dans ces études, l'inhibition de l'expression de la protéine G ne modifiait pas la réplication virale ni n'augmentait la production des IFN-I ( $\alpha/\beta$ ) en réponse à l'infection.

Globalement, les interrogations autour du ou des rôle(s) de la protéine G restent donc entières, en particulier du fait qu'elle soit, comme les protéines SH et M2-2, non indispensable à la réplication virale *in vitro* et *in vivo* (174, 242). Ce dernier point met ainsi en lumière l'intérêt de cette protéine pour la mise au point de modalités thérapeutiques et, en particulier, de vaccins vivants atténués hMPV.

### **2.3.3 La petite protéine hydrophobe SH**

Le gène SH du hMPV code pour une petite protéine hydrophobe, dont la taille varie de 177 à 183 acides aminés selon les souches de hMPV, et dont la similitude de séquence peut être assez faible (59%) entre sous-groupes viraux (33). Cette grande variabilité est comparable à celle des protéines SH des autres Pneumovirus, cependant il faut remarquer que la taille de la protéine SH de hMPV est près de trois fois supérieure à celle de la protéine SH du hRSV (65 aa). L'analyse de la séquence de SH révèle un profil de protéine transmembranaire de type II, mais ne permet pas d'identifier de domaine fonctionnel caractéristique. Le domaine transmembranaire (en position 31 à 53) délimite un ectodomaine constituant la plus grande partie de la protéine. La protéine SH du hMPV existe sous plusieurs formes selon son état de glycosylation (23 kDa si elle est non-glycosylée, de 25 à 30 kDa pour la forme N-glycosylée et de 80 à 220 kDa pour la forme hautement glycosylée) (174). De manière intéressante, il semblerait que la protéine SH soit moins incorporée dans la bicouche lipidique lorsque la protéine G n'est pas exprimée (242).

Outre ces informations, le rôle de la protéine SH de hMPV n'a pas été clairement élucidé, à l'image de son homologue chez les virus hRSV. Considérant ses propriétés d'oligomérisation à la membrane plasmique et de perméabilisation de la membrane, il est suggéré que la protéine SH adopte une structure de viroporine qui rappelle les canaux ioniques formés par la protéine M2 des virus influenza (243). Cette étude a en plus montré que la co-expression de SH, principalement son domaine extracellulaire, avec la protéine F

du hMPV entraînait la diminution de 90 % de la fusion membranaire médiée par F (243). La fusion induite par les protéines de fusion de hPIV-5 ou de virus Hendra était aussi partiellement réduite, démontrant un effet inhibiteur de fusion non spécifique de la F du hMPV (243).

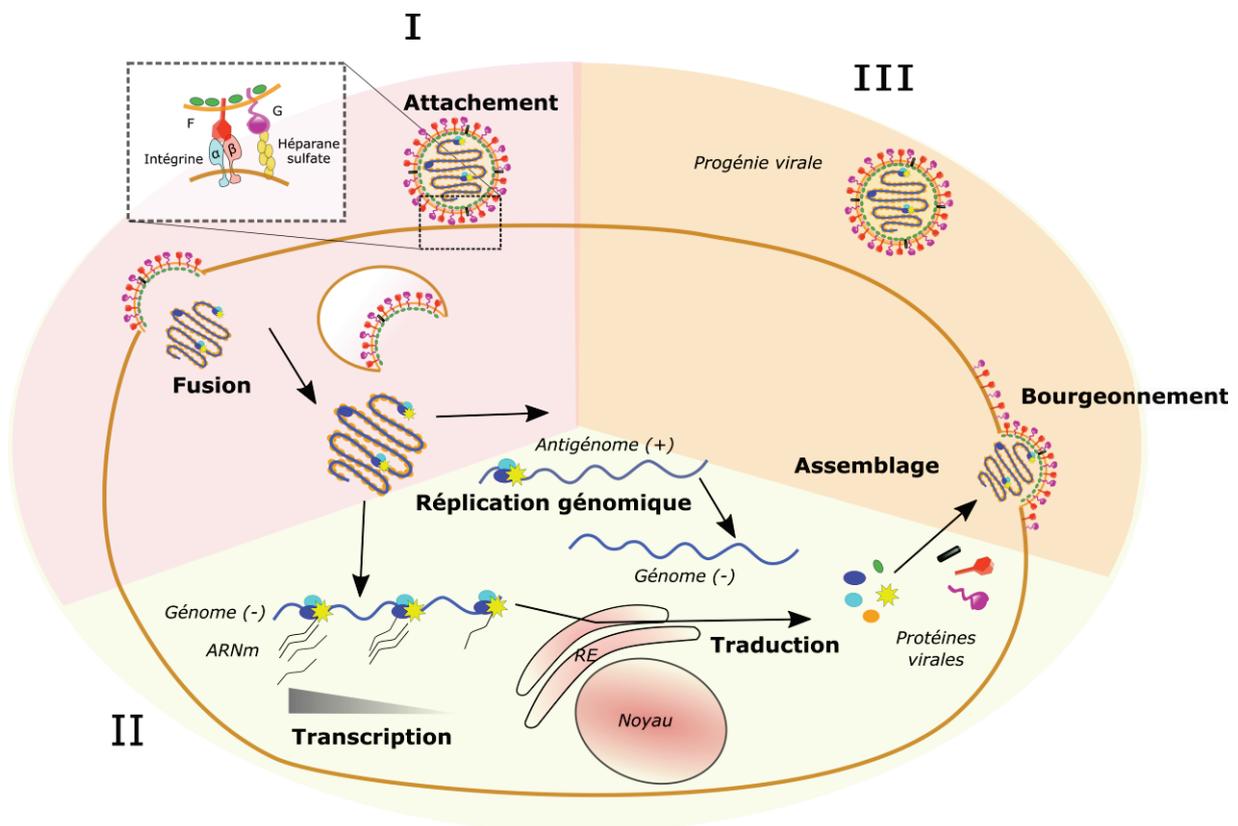
Une autre fonction a également été proposée pour la protéine SH, notamment parce qu'il a été décrit que celle-ci était aussi fortement présente dans certains compartiments cytoplasmiques des cellules infectées (243). La protéine pourrait ainsi bloquer l'activation du facteur de transcription cellulaire NF- $\kappa$ B en réponse à l'infection et, par conséquent, diminuer l'expression de cytokines et chimiokines comme l'IL-8 par exemple (244). Pour cela, la protéine SH inhiberait la phosphorylation de la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B et donc son activité transcriptionnelle pour empêcher l'apoptose cellulaire (244), à l'image des protéines SH des Paramyxovirus (245). Néanmoins, comme pour la protéine G, une analyse à haut débit de l'expression des gènes de cellules pulmonaires (A549) infectées par un virus hMPV sauvage ou délété de SH démontrait un profil similaire entre les deux infections, réfutant le rôle de SH dans la modulation de la réponse cellulaire (246). Comme autre piste, une étude portant sur hRSV a montré que la viroporine formée par sa protéine SH a une fonction dans l'activation de l'inflammasome, un rôle pour l'instant non documenté pour la SH du hMPV (247).

Par ailleurs, la technologie de génétique inverse a permis de démontrer que la délétion du gène SH n'impactait pas la réplication *in vitro* du virus hMPV (242), suggérant ainsi un statut accessoire pour la protéine. Il a d'ailleurs également été montré qu'après de multiples passages cellulaires du virus hMPV, des mutations ponctuelles apparaissent dans le gène SH conduisant généralement à une protéine SH tronquée, suggérant une adaptation de la protéine aux contraintes environnementales lors de la culture *in vitro* (248). En modèle animal hamster, des virus recombinants n'exprimant pas la protéine SH se répliquent même à un niveau supérieur à celui d'un virus sauvage, alimentant les questionnements concernant le rôle de SH (242).

Enfin, sur le volet immunogénique, la protéine SH, bien qu'exprimée à la surface des particules virales, n'induit pas la production d'anticorps neutralisant et protecteur contre l'infection hMPV (207). Globalement, les interrogations autour du ou des rôle(s) de la protéine SH restent donc également entières et méritent de plus amples études.

### 3. Le cycle viral du hMPV

L'ensemble des étapes du cycle réplcatif n'a pas encore été complètement caractérisé pour le virus hMPV. La communauté scientifique considère néanmoins que la biologie du hMPV est très proche des autres Pneumovirus (en particulier du hRSV), ainsi que des Paramyxovirus, du moins en ce qui concerne la réplcation de son génome à ARN négatif. Le cycle viral est cytoplasmique et peut être subdivisé en trois phases séquentielles : (I) la phase d'attachement et d'entrée du virus dans la cellule cible ; (II) la phase de transcription / réplcation du génome viral et de traduction des protéines virales dans le cytoplasme de la cellule infectée ; (III) l'assemblage de tous ces éléments néo-synthétisés en particules virales et leur bourgeonnement à la surface membranaire (**Figure 10**).



**Figure 10 - Le cycle viral des *Pneumoviridae*.** Le cycle viral comporte 3 phases : (I) L'attachement du virus à la cellule cible et la fusion de leur membrane respective pour permettre le relargage du génome viral dans le cytoplasme; (II) les étapes de transcription du génome pour synthétiser les ARNm puis les traduire en protéines et de réplcation du génome *via* la production de brin ARN matriciel (+); (III) l'encapsidation du génome viral et l'assemblage de la particule virale avant bourgeonnement à partir de la membrane cytoplasmique.

### **3.1 L'attachement et la fusion**

La première étape de l'infection consiste en l'attachement du virus à ses cellules cibles naturelles, les cellules épithéliales ciliées de l'arbre respiratoire humain. Comme présenté précédemment, l'attachement cellulaire des virus est médié par la protéine G qui interagit avec des GAGs cellulaires (de type héparane sulfate) et/ou par la protéine de fusion F qui peut également remplir cette fonction de liaison à la cellule hôte grâce à son site d'interaction aux intégrines  $\alpha/\beta$  et sa liaison aux GAGs cellulaires, *via* un site non encore déterminé (**Figure 10**). Le rapprochement des membranes cellulaire et virale permet ensuite à la protéine F d'enclencher le processus de fusion tel que représenté précédemment en **Figure 8**. La compréhension de ce mécanisme et de ces acteurs est importante pour le développement de stratégies antivirales basées sur l'inhibition de ces étapes initiales d'attachement et de fusion. Ainsi, des antagonistes des récepteurs héparane sulfate (249) ou des peptides inhibiteurs de fusion interagissant avec la protéine F ont été évalués ; ces derniers seront décrits en partie 5.3 de ce manuscrit.

Alors que pour les *Paramyxoviridae*, la fusion membranaire se déroule généralement en condition de pH neutre, il a été montré que le hRSV utilise également les voies d'endocytose, médiée par la clathrine, et de macropinocytose à pH acide pour réaliser sa phase d'entrée cellulaire (250, 251). En effet, il apparaît que la protéine F de hRSV subit un deuxième clivage protéolytique après internalisation dans le compartiment endosomal, ce qui permet la fusion des membranes virale et endosomale et la libération de matériel génétique viral dans le cytoplasme de la cellule infectée. Bien qu'il n'ait pas été décrit de second site de clivage dans le cas de la protéine F du hMPV, une étude a décrit que ce virus pouvait également utiliser la voie d'endocytose pour pénétrer dans les cellules-cible *in vitro* (cellules Vero et LLC-MK2) (252). Le rôle du pH acide pour faciliter l'entrée des virus hMPV reste cependant controversé, considérant un impact variable du pH selon les souches virales (216).

### **3.2 La transcription et la réplication du génome viral**

Après l'étape de fusion, le complexe vRNP génomique est libéré dans le cytoplasme de la cellule pour effectuer la seconde phase du cycle viral. À l'image des autres virus à ARN négatif non segmenté, la transcription des ARNm est menée de manière séquentielle, c'est-à-dire que la polymérase virale se déplace sur le brin génomique (négatif) et enchaîne des étapes d'initiation, d'élongation et d'arrêt de la transcription des ARNm, selon une série de séquences régulatrices en *cis*, tout le long du génome (**Figure 11**) (253, 254). Le complexe RdRP, constitué de la polymérase L et de son cofacteur P (187, 255), accède à l'ARN viral

en réorganisant le complexe vRNP par son interaction avec les nucléoprotéines N, au niveau du site unique d'initiation appelé séquence *Leader* à l'extrémité 3' du génome (**Figure 3**) (254).

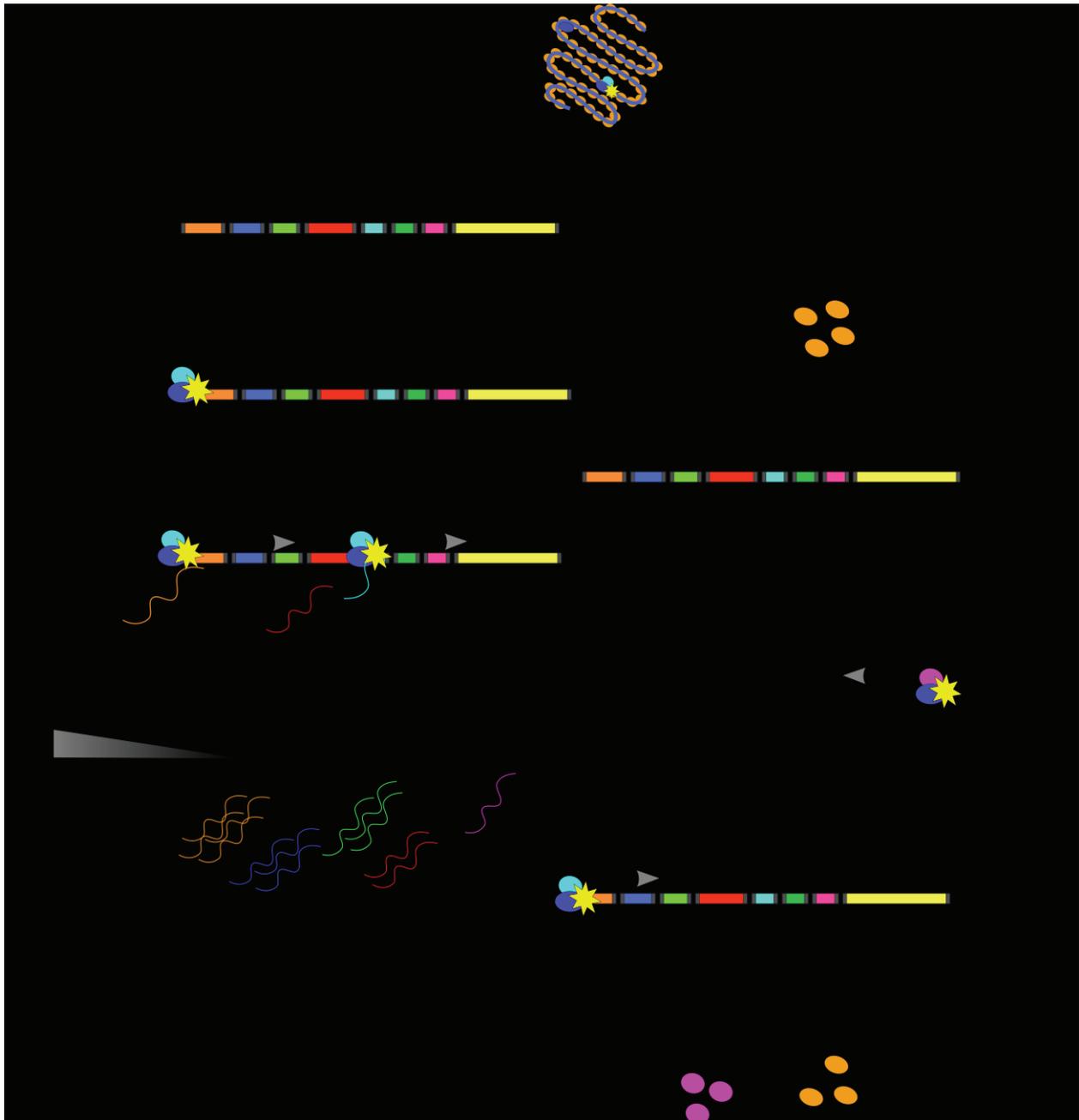
Chaque gène viral débute par une séquence *Gene Start* qui initie la transcription séquentielle d'ARNm. A la fin de chaque gène, la polymérase rencontre une séquence terminatrice, appelée *Gene End*, qui comporte une série de 4 à 7 uraciles servant de matrice pour la synthèse de la queue polyadénylée des ARNm. Lorsque le complexe RdRP rencontre le signal *Gene End*, l'ARNm synthétisé est alors libéré et la polymérase continue sa progression le long du génome pour initier la transcription de l'ORF suivante à partir de sa séquence *Gene Start* associée.

Entre les gènes se trouvent des séquences inter-géniques non codantes, généralement très courtes, ce qui évite à la polymérase de se dissocier de la matrice d'ARN génomique entre chaque ORF (256). Toutefois, il arrive que la polymérase se détache et que la transcription soit stoppée. Les motifs *Gene Start* et *Gene End* différents entre les gènes, contribuent également au décrochage de la polymérase. En conséquence, il s'établit un gradient décroissant d'expression des ARNm viraux selon l'ordre des gènes de l'extrémité 3' à l'extrémité 5' du génome ; les gènes proximaux étant transcrits en plus grande quantité (**Figure 11**) (254).

Par ailleurs, il est proposé que la RdRP possède la capacité de reculer sur le génome (256) et/ou de coupler les processus de transcription et de traduction (257), permettant ainsi la transcription des ORFs chevauchants, tels que M2-1 et M2-2 pour le hMPV ou M2 et L pour le hRSV.

Une autre particularité de la transcription des virus à ARN négatif non segmenté consiste en la synthèse d'ARNm polycistroniques, résultant d'une mauvaise reconnaissance des séquences *Gene End*. Il est ainsi suggéré que ces ARNm polycistroniques participent d'une part à l'optimisation de la transcription des gènes distaux et d'autre part, à la régulation de la transcription des ARNm proximaux (253). Concernant le hMPV, il a été décrit que des ARNm polycistroniques des gènes M2/SH étaient produits en grande quantité, et de surcroît majoritaires par rapport aux ARNm monocistronique de M2 (242, 258).

Après synthèse, les ARNm sont méthylés en 5' dans le cytoplasme pour constituer la coiffe de l'ARNm, sous la direction du signal *Gene Start* (259). La méthylation est aussi réalisée par la protéine L, grâce à la région CR VI, région conservée parmi les polymérases des virus à ARN simple brin négatif (260-262). Ce domaine a la particularité d'effectuer des méthylations guanine N-7 (G-N-7) et ribose 2'-O (190, 263). Ces deux types de méthylations



**Figure 11 – Schéma des étapes de transcription et répliation du génome viral du hMPV.** La polymérase virale synthétise séquentiellement les ARNm à partir de la séquence *Leader* (*Le*) en 3' du génome, suivant les séquences régulatrices *Gene Start* et *Gene End* (cassettes noires aux extrémités des gènes) rencontrées. Dans un deuxième temps, après accumulation des protéines virales du hMPV, elle synthétise le brin d'ARNm positif, toujours à partir du motif *Le*, servant de matrice à la nouvelle synthèse de brin génomique viral (négatif), cette fois effectuée à partir de la séquence *Trailer* (*Tr*) située en 3' de ce brin matrice.

différentes auraient un rôle dans l'efficacité de la traduction des ARNm viraux et dans l'évasion virale à la réponse interféron, respectivement (264, 265).

Les ARNm viraux sont ensuite traduits en protéines par la machinerie cellulaire hôte. Au fur et à mesure que sont synthétisées et que s'accumulent les protéines virales, la réplication du génome viral est initiée *via* la synthèse d'un brin intermédiaire matrice d'ARN positif (antigénome viral) à partir de la séquence *Leader* (**Figure 11**) (254). Il a été proposé que l'expression du facteur M2-2 et/ou l'accumulation de nucléoprotéines N constituent des signaux de transition entre les phases de transcription des ARNm et de réplication du génome viral (258, 266). La régulation moléculaire fine de ce mécanisme reste cependant à déterminer.

La polymérase reconnaît la région *Trailer* sur l'antigénome viral comme promoteur de réplication puis enclenche la synthèse *de novo* de génomes viraux de polarité négative. Les génomes viraux néosynthétisés s'associent aux protéines N (253) pour s'organiser en capsid de ribonucléoprotéines. L'encapsidation se fait aussi à partir des séquences *Leader* et *Trailer* (267). Outre le fait que cette encapsidation protège les ARN viraux de la dégradation, elle sert également à guider les différentes étapes de transcription et de réplication, *via* l'interaction de N avec les protéines P, et participe aussi à l'évitement de la réponse cellulaire initiée par la détection des ARN viraux par RIG-I ou MDA5 (268).

Récemment, il a été montré que les événements de transcription et réplication du génome viral se déroulaient au sein de corps d'inclusion cytoplasmiques (« *virus factory* »), structures présentes uniquement dans les cellules infectées et formées d'ARN viraux génomiques et d'ARN matrice associés à de grandes quantités de protéines P et N (269, 270). Ces structures ont aussi été décrites pour d'autres virus tels que les hRSV ou encore les Rhabdovirus ou les Filovirus (271-273).

### **3.3 La traduction des protéines virales**

Les protéines du complexe de polymérase virale (L, P, M2-1 et M2-2) ainsi que la nucléoprotéine N et la protéine de matrice M sont exprimées dans le cytoplasme, possiblement au sein des mêmes corps d'inclusion où sont formés les ARN messagers viraux, et au sein desquels elles pourront ensuite s'assembler pour former de nouveaux complexes ribonucléoprotéiques en s'associant à une molécule d'ARN négatif de génome viral.

Les glycoprotéines de surface SH, G et F sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique et trafiquent ensuite par l'appareil de Golgi afin de subir glycosylations et autres modifications post-traductionnelles, pour suivre ensuite la voie d'export vers la membrane plasmique. Il a été suggéré que ces glycoprotéines de surface se regroupent au niveau de radeaux lipidiques au sein de la membrane cellulaire pour faciliter le bourgeonnement des virions (274).

### **3.4 L'assemblage et le bourgeonnement**

Les mécanismes d'assemblage du complexe vRNP ainsi que des protéines de matrice à la membrane lipidique, enrichie en glycoprotéines virales, n'ont pas encore été décrits en détail (274).

L'initiation de la dernière étape de l'infection serait déclenchée par l'accumulation cellulaire de protéines M et des glycoprotéines de surface F, SH et G au niveau des radeaux lipidiques membranaires (275), comme cela a également été suggéré pour le hRSV (276). Les interactions entre les oligomères de M, les extrémités cytoplasmiques des glycoprotéines virales et le complexe vRNP guideraient ainsi la déformation de la membrane cellulaire, le bourgeonnement puis le relargage de la particule virale (274). La déformation de la membrane cellulaire pourrait notamment être dirigée par la formation des structures filamenteuse de protéine M (195). Parallèlement, dans un contexte de production de VLPs par expression protéique transitoire, il a été démontré que les protéines G sont co-localisées avec les protéines F dans les projections membranaires filamenteuses de protéine de matrice M, ce qui faciliterait la formation de VLPs (197). Pour le hRSV, une autre étude a aussi montré que les domaines C-terminaux des protéines P, F et M contribuent au bourgeonnement de filopodes pour le relargage efficace de VLPs (277). Il a également été proposé que ces filopodes et la propagation du hRSV sur cellules A549 font intervenir le facteur cellulaire ARP2 et le cytosquelette d'actine (278, 279). Concernant le hMPV, de récentes publications décrivent la présence de corps d'inclusion et de projections cellulaires dont la formation serait aussi en lien avec le cytosquelette d'actine, suggérant ainsi l'importance du cytosquelette cellulaire non seulement dans l'assemblage des particules virales des Pneumovirus, mais également dans la transmission de proche en proche de matériel génétique viral entre cellules (270, 275, 280).

A noter que les propriétés de la protéine de matrice M à lier un ion calcium et celle de la protéine transmembranaire SH à se structurer comme un canal ionique n'ont pas été associées à une fonction particulière, que ce soit dans les mécanismes d'assemblage, de bourgeonnement et/ou de relargage viral.

### **3.5 La formation de syncytia**

En parallèle du bourgeonnement des particules virales, la propagation du virus hMPV et la progression de l'infection serait également possible *via* la formation viro-induite de syncytia cellulaires, médiés par l'expression de la protéine F en surface des cellules infectées, et induisant ainsi la fusion membranaire avec les cellules adjacentes. Ce type de propagation virale est responsable des différences de phénotypes *in vitro* observées (**Figure 9**) et pourrait également participer à des mécanismes d'évasion du système immunitaire (281).

Cependant, il n'a jamais été encore décrit de formation *in vivo* de syncytia au niveau des cellules épithéliales pulmonaires infectées par le hMPV. Dans une précédente étude s'intéressant à ce phénomène, l'équipe du Dr Boivin n'a pas pu établir de corrélation significative entre l'acquisition de propriétés hyperfusogéniques de virus hMPV recombinants et une pathogénicité accrue *in vivo* (2). Aucun rapport épidémiologique concernant la proportion des virus hMPV hyperfusogéniques parmi les souches virales circulantes n'a également démontré un avantage de propagation virale. Les déterminants de fusogénicité de la protéine F restent cependant à déterminer afin de permettre une analyse rétrospective réelle. La question reste donc entière quant à l'impact de la fusogénicité *in vivo*, alors que la formation de syncytia par certaines souches hMPV est significative *in vitro*.

## **4. Modèles d'études de la pathogénèse des virus hMPV**

Plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo* ont été développés et exploités pour étudier la pathogénèse du virus hMPV (répertoriés dans le **Tableau 2**). Chacun de ces modèles est informatif, mais comporte des biais et des limitations, qui sont discutés ci-après.

<b>Tableau 2 – Les modèles d'étude de l'infection hMPV</b>		
<i>in vitro</i>		<i>in vivo</i>
Lignées cellulaires permissives	Lignées cellulaires peu permissives	
Cellules épithéliales de reins de singes LLC-MK2, Vero	Cellules humaines issues de carcinomes HEp-2, A549	Rongeurs souris, rats des cotonniers et hamsters
	Cellules épithéliales humaines normales BEAS-2B, SAEC, NHBE	Primates non-humains

#### **4.1 Les modèles cellulaires *in vitro***

Comme indiqué précédemment, la caractérisation tardive des virus hMPV est en partie due au fait que leur réplication est limitée en condition classique de culture cellulaire. En effet, peu de lignées cellulaires sont permissives aux virus hMPV et leur cytopathogénèse est très variable. La lignée LLC-MK2 (issue de rein de singe rhésus) est considérée comme la lignée la plus permissive à l'infection, mais elle est relativement peu utilisée en routine dans les laboratoires de diagnostic, qui préfèrent les cellules primaires de reins de singes (RhMK), les cellules fibroblastiques humaines (MRC-5) ou encore les cellules dérivées de carcinomes humains A549 ou Hep-2 (cellules humaines dérivées de carcinomes laryngés et utilisées pour la production du hRSV) (17, 18, 282). La lignée cellulaire Vero (cellules de rein du singe vert) est également permissive au hMPV, mais dans une moindre mesure (283). La variabilité de permissivité des cellules à l'infection n'est pas entièrement expliquée, mais elle pourrait dépendre de la différence d'équipement en récepteurs membranaires entre les lignées cellulaires épithéliales de reins de singe et de poumons humains. Par exemple, pour les virus aMPV B, il a été montré que la sur-expression transitoire d'intégrine à la surface de cellules non-permissives rétablissait l'infection aMPV *via* la liaison de la protéine F (284). De plus, une étude sur hRSV a aussi démontré une différence de permissivité dépendante non seulement des lignées cellulaires (BEAS ou cellules d'ovaires de hamster CHO sauvages ou déficientes en héparane sulfate), mais également des propriétés intrinsèques des souches virales, notamment de leur protéine d'attachement G lors des premières étapes du cycle viral (285).

En culture sur lignée LLC-MK2, les effets cytopathiques du hMPV n'apparaissent généralement qu'après 17 jours d'infection, lorsqu'il s'agit d'une première culture à partir d'aspiration clinique naso-pharyngée, obligeant ainsi plusieurs passages cellulaires en aveugle. Après 5 à 10 passages cellulaires, la durée du cycle viral est progressivement diminuée et les ECPs sont plus facilement observables, possiblement du fait de l'apparition de mutations d'adaptation. Dans ce contexte, il est donc plus rapide de détecter les virus hMPV par des tests de RT-PCR que par isolation virale en culture cellulaire, d'autant que les techniques biomoléculaires permettent le sous-typage viral, par l'amplification d'une portion du gène de N ou de F (19).

Malgré leur faible permissivité, différentes lignées cellulaires pulmonaires, telles que les cellules épithéliales humaines normales SAEC, NHBE, BEAS-2B ou A549 (des cellules issues de carcinomes pulmonaires) peuvent aussi être utilisées pour étudier la réponse cellulaire à l'infection hMPV dans des conditions plus physiologiques. Toutefois, ces lignées

produisent significativement moins de virus que les cellules LLC-MK2 ou Vero, d'où la difficulté de mener des études avec ces systèmes (286).

## **4.2 Les modèles animaux de l'infection HMPV**

Plusieurs modèles de petits mammifères (souris, rats des cotonniers, hamsters) et de primates non humains (macaques crabiers/cynomolgus, macaques rhésus, singes africains verts ou chimpanzés) constituent des modèles expérimentaux d'infection pour le hMPV (287, 288).

Depuis la découverte du virus hMPV, l'équipe du Dr. Boivin s'est notamment impliquée dans la caractérisation de modèles animaux expérimentaux permettant l'étude de la pathogénèse associée à l'infection *in vivo* par le hMPV, afin d'avoir des outils adaptés à l'évaluation de traitements thérapeutiques et/ou prophylactiques (52, 289, 290).

Un modèle expérimental idéal pour le virus hMPV devrait permettre une réplication efficace du virus, l'observation de modifications histopathologiques au niveau de l'arbre respiratoire, ainsi que le suivi du développement de l'infection par l'évolution de signes cliniques associés à la maladie. Chacun des modèles précédemment cités a démontré des caractéristiques permettant l'étude de l'infection hMPV *in vivo*, cependant toutes les conditions ne sont pas toujours réunies. En effet, leurs permissivités au virus sont encore une fois variables et seuls les modèles murins, macaques cynomolgus et chimpanzés, ce dernier étant le modèle mimant le plus fidèlement l'infection humaine, permettent l'observation de symptômes clairs de la pathologie associée au virus hMPV (287, 291).

### **4.2.1 Les rongeurs**

#### *4.2.1.1 Le modèle murin*

Les résultats de plusieurs études démontrent que la souris, en particulier le type BALB/c (plus permissif que les souris C57BL/6), s'avère être un bon modèle d'infection par le hMPV puisqu'il a été rapporté : (i) une importante réplication du virus dans les voies respiratoires des souris ; (ii) une inflammation pulmonaire prononcée et la détection d'un panel de cytokines et chimiokines représentatif de l'infection ; (iii) une perte de poids, ainsi que des signes cliniques visibles, tels que la dyspnée et le poil hérissé, associés à la sévérité de la pathologie (289, 290).

Les souris BALB/c infectées par le hMPV démontrent des signes précoces pathologiques dès les 2 premiers jours de l'infection, avec une obstruction des voies

respiratoires et une légère perte de poids (292). Ensuite, le pic de réplication virale intervient entre 3 et 5 jours, dépendamment des souches et de l'inoculum utilisés, et il est associé à une perte de poids importante. L'obstruction des voies respiratoires et l'hyperréactivité bronchique, ou broncho-spasmes, sont mesurées chez la souris par pléthysmographie et peuvent perdurer jusqu'à plus de 70 jours après l'infection (293). De plus, il est suggéré que le virus hMPV a une persistance longue dans les poumons des souris infectées ; le virus pouvant être détecté en PCR sur une durée supérieure à 5 mois (289, 293, 294). La séroconversion des souris infectées est observée à partir de 5 jours post-infection, avec la détection d'immunoglobulines G (IgG1 et IgG2) hMPV-spécifiques (292).

La souris présente une similitude importante avec l'Homme, notamment concernant la réponse cytokinique à l'infection. Pour ces raisons, le modèle expérimental murin est particulièrement adapté à la caractérisation de l'immunopathogénèse de l'infection hMPV. Ainsi, il a été décrit que le hMPV induit, entre-autre, la production de cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 et GM-CSF (le profil d'expression sera plus amplement décrit en paragraphe 4.3.2.1). De plus, le virus induit aussi dans ce modèle une inflammation pulmonaire interstitielle, péribronchiale et alvéolaire, associée à une infiltration de neutrophiles et de lymphocytes (292). Cette forte inflammation interstitielle est concordante avec la description de la pneumonie hMPV-induite chez l'Homme.

Le modèle expérimental murin est aussi intéressant pour étudier l'impact des co-infections virus-bactéries. Par exemple, grâce à ce modèle, il a été décrit que l'infection hMPV semble prédisposer aux infections sévères à *S. pneumoniae* (152, 295). Finalement, par sa facilité de manipulation ainsi que la possibilité d'expérimenter sur des lignées de souris consanguines, transgéniques ou *knock-out* pour l'expression d'un gène, impliqué dans la réponse immune par exemple, le modèle murin apparait comme le modèle expérimental le plus adapté pour l'investigation initiale de la pathogénèse des virus hMPV.

#### 4.2.1.2 Le modèle de rat des cotonniers et de hamster :

Le rat des cotonniers, ou *cotton rat*, est l'un des modèles principaux de rongeurs utilisés pour l'étude du hRSV (296, 297). Dans le cas de l'infection hMPV, ce modèle a aussi été démontré très permissif au virus, de même que le modèle de hamster. Les principaux avantages de l'utilisation de ces rongeurs sont la détection de titres viraux élevés, à la fois dans le tractus pulmonaire haut et bas (291), ainsi que la production importante d'anticorps neutralisants, ce qui en fait des modèles principalement utiles dans le test de candidats vaccinaux. De manière similaire au modèle murin, des changements histopathologiques importants lors de l'infection hMPV ont été caractérisés pour ces modèles, ainsi que la

production de cytokines viro-induites, telles RANTES, MIP1- $\alpha$ , MCP-1, IFN- $\gamma$ , IL-8 et IL-4, en association avec une inflammation chez les rats des cotonniers infectés par hMPV (290, 297). Cependant, ce sont des modèles animaux qui ne développent pas de signe clinique évident de l'infection, tels que la perte de poids ou les atteintes respiratoires.

#### **4.2.2 Les primates non humains**

Relativement peu d'études ont été publiées sur des primates non humains avec le hMPV. Du fait de leur proximité génétique avec les humains, ils constituent cependant des modèles animaux de choix pour étudier la pathogénèse virale et la mise en place de la réponse immune, notamment dans le cas de la vaccination. Actuellement, ces modèles sont principalement utilisés lors d'évaluations pré-cliniques de candidats vaccinaux vivants atténués ou sous-unitaires.

Le virus hMPV se réplique dans l'arbre respiratoire des macaques cynomolgus avec un pic maximal atteint au jour 4, et induit une pathologie de type rhinite (52). Par ailleurs, le singe vert africain (*African Green Monkeys*, AGM) infecté par le hMPV déclenche une réponse immunitaire humorale forte avec des titres élevés en anticorps neutralisants, ce qui en fait un modèle de choix pour l'analyse de l'efficacité des candidats vaccins (288, 298, 299). Bien que le virus hMPV se réplique aussi dans les poumons des macaques rhésus, ces derniers ne développent qu'une réponse humorale faible (288). Enfin, les chimpanzés infectés par le hMPV déclenchent une réponse immunitaire forte et présentent différents symptômes cliniques tels que des rhinorrhées, la production de mucus et/ou la perte d'appétit. De plus, le chimpanzé est le seul à présenter une séroprévalence importante pour le hMPV (ainsi que le hRSV), dans la nature (300) tout comme en captivité, avec une séropositivité de plus de 60% dans ce dernier cas (40), ce qui limite l'apparition des signes cliniques de la maladie. Ces résultats démontrent donc une susceptibilité naturelle des chimpanzés à l'infection hMPV et une transmission virale avec le réservoir humain (40, 300). La séropositivité au hMPV, antérieure aux expérimentations, ainsi que les considérations éthiques, sont des contraintes importantes à prendre en considération pour l'utilisation de ce modèle animal dans les tests de candidats vaccinaux.

#### **4.3 La réponse immune associée à l'infection par hMPV**

Comme pour les autres virus respiratoires humains, les cibles primaires des virus hMPV sont les cellules épithéliales de l'arbre respiratoire humain inférieur et supérieur (52, 117). Les études en modèles animaux ont permis de décrire un tropisme viral prépondérant

pour les cellules épithéliales ciliées des bronches, bronchioles et alvéoles pulmonaires (52). Ces cellules sont sensibles à l'infection et permissives à la réplication des virus hMPV (52, 174). De plus, il a également été montré que certaines populations de cellules myéloïdes, comme les macrophages alvéolaires ou les cellules dendritiques résidentes des poumons, sont aussi infectées par le hMPV. Si leur infection ne permet pas une réplication virale efficace, elles pourraient néanmoins participer à la mise en place des réponses immunes et inflammatoires (301) et/ou constituer un moyen de détournement de cette réponse par hMPV.

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo*, en particulier en modèle murin, constituent le socle de connaissances sur les réponses cellulaires et immunes à l'infection hMPV, même si celles-ci restent encore à davantage caractériser (302). La plupart des mécanismes de défense cellulaire qui ont été identifiés sont représentés en **Figure 12**. Dans cette figure, sont également décrites les protéines virales qui seraient impliquées dans l'immuno-modulation de la réponse cellulaire et l'évasion virale du hMPV.

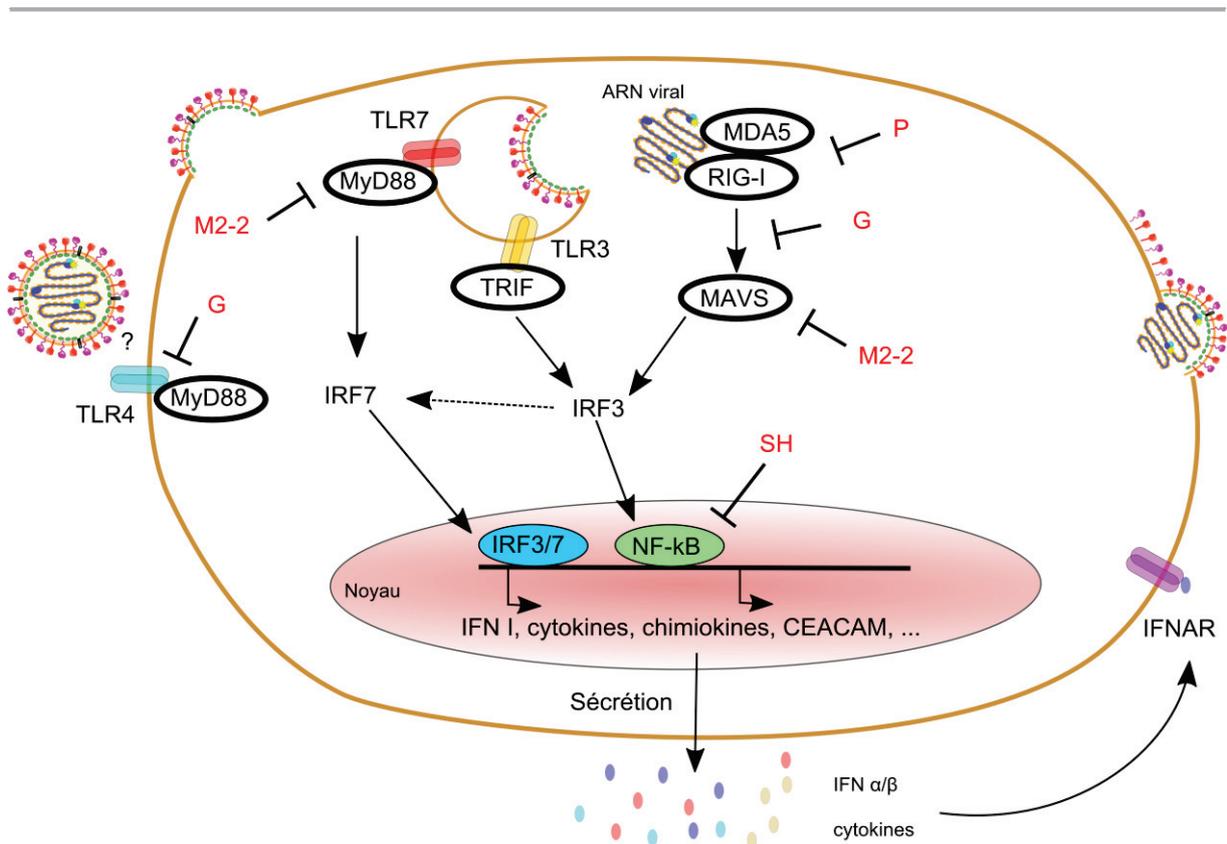
#### 4.3.1 La réponse cellulaire

Suite à la reconnaissance de motifs structuraux caractéristiques du pathogène (PAMPs), tels que le matériel génétique et les protéines virales, et l'engagement de leurs récepteurs cellulaires correspondants (PRRs), la réponse interféron (IFN) est mise en place comme première ligne de défense des cellules épithéliales contre les infections virales (303). Lorsqu'ils sont sécrétés par des cellules infectées, les IFN de type I (IFN I  $\alpha/\beta$ ) induisent un environnement antiviral par l'expression d'une panoplie de gènes (gènes inductibles par l'IFN) qui visent à bloquer la réplication virale et mettre en place la réponse immunitaire. Dans le cas du hMPV, deux voies d'activation de la réponse interféron sont particulièrement impliquées : la voie initiée par l'implication des PRRs (i) de la famille RIG-I (RLR), qui sont des ARN hélicases, et (ii) de la famille des récepteurs Toll (TLR) (234, 237, 303, 304).

L'ARN viral du hMPV est reconnu dans le cytosol des cellules épithéliales infectées par le récepteur RIG-I qui active en réponse la protéine de signalisation mitochondriale MAVS (**Figure 12**) (304). MAVS est ensuite capable d'activer le facteur de régulation IRF-3 qui va induire la sécrétion d'IFN de type I ainsi que l'activation des facteurs de transcription IRF-7 et NF- $\kappa$ B pour l'amplification de la réponse interféron (notamment par la sécrétion d'IFN de type III) et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (305). Cette voie est très rapidement activée après l'infection des cellules épithéliales, mais aussi lors de l'infection de cellules dendritiques (DC). Dans le cas de l'infection des DC, ce n'est pas le récepteur RIG-I qui est impliqué mais le facteur MDA5 qui active la même voie de signalisation en aval (**Figure 12**) (305). Récemment, une étude a démontré que l'activation du senseur RIG-I par

le virus hMPV entraîne aussi l'expression du récepteur cellulaire CEACAM1, *via* le facteur IRF-3 (306). L'expression du récepteur CEACAM1 pourrait ensuite participer à la restriction de la progression de l'infection, en bloquant la machinerie de traduction cellulaire de manière dépendante de la tyrosine phosphatase Shp-2 (ou PTPN11), protéine qui est aussi impliquée dans la réponse à l'infection par hRSV (306, 307).

La deuxième voie d'activation de la réponse interféron fait intervenir les récepteurs TLR endosomaux, en particulier les TLR3 et TLR7, qui vont respectivement induire l'activation de IRF-3 *via* la protéine adaptatrice TRIF et celle de IRF-7 *via* la protéine adaptatrice MyD88 (**Figure 12**) (308, 309). Lors de l'infection des cellules dendritiques, la voie dépendante d'IRF-7 est plus facilement activée, car c'est un facteur constitutivement exprimé par ces cellules, à la différence des cellules épithéliales où il n'est exprimé qu'en réponse à l'activation d'IRF-3. Il a été également proposé qu'un autre membre de la famille des TLR puisse être un senseur potentiel du hMPV. En effet, il a été démontré que le récepteur membranaire TLR4 est aussi engagé suite à l'infection des DC et contribue ainsi à



**Figure 12 – La réponse cellulaire face à l'infection hMPV et l'action immuno-modulatrice de protéines virales.** Inspiré de Cespedes et *al.*, 2016 (310).

la sécrétion de chimiokines et d'IFN. Ce mécanisme a pour l'instant été peu décrit, mais il semblerait que la glycoprotéine virale G puisse inhiber cette voie de transduction cellulaire (234).

Via l'activation de ces voies de transduction, la sécrétion des IFN  $\alpha$  et  $\beta$  par les cellules de l'épithélium respiratoire ou par les cellules myéloïdes résidentes se fait rapidement dans les heures suivant l'infection *in vivo* en modèle murin (311-313). Cependant, il a été suggéré que la réponse interféron et l'environnement pro-inflammatoire pulmonaire viro-induit participent à la pathogénicité du virus hMPV *in vivo*. En effet, chez des souris *knock-out*, l'absence de récepteurs IFNAR, répondant à la sécrétion de l'IFN  $\alpha$ , induit une pathologie et une atteinte pulmonaire moins sévères que chez des souris sauvages (314). D'autres récepteurs et protéines médiatrices de signal de transduction sont aussi impliqués dans la réponse à l'infection hMPV. Ainsi, les protéines JAK/TYK, STAT1 et STAT3, faisant partie de la cascade de transduction initiée par IL-6, ont également été décrites comme sous-régulées dans les cellules épithéliales pulmonaires infectées par hMPV (315-317). Par exemple, il est démontré que l'infection hMPV bloque l'activation des protéines JAK2 et STAT3 en empêchant leurs phosphorylations (316). Même si les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore caractérisés, ces données suggèrent que le virus hMPV a développé des mécanismes pour détourner la réponse cellulaire à son avantage, et permettre sa réplication et sa dissémination efficace dans les tissus infectés. Cela peut expliquer le défaut de clairance virale dans les poumons des souris plusieurs mois après l'infection, et aussi la tendance à une hyperréactivité bronchique, qui ont été décrites dans plusieurs publications (289, 293, 318, 319).

Des propriétés immuno-modulatrices ont été prêtées à certaines protéines virales, telles que SH, G, M2-2 ou encore P, qui participeraient ainsi à ces mécanismes d'évasion (**Figure 12**). Ainsi, la protéine M2-2 peut interférer avec la détection du virus par son interaction avec MyD88 et MAVS (320). De même, la phosphoprotéine P a été associée à l'inhibition des voies de signalisation dépendante de RIG-I et MAVS, mais d'une manière souche dépendante (uniquement la P de hMPV B1) (235, 304). Enfin, les glycoprotéines SH et G ont aussi démontré un possible rôle immuno-modulateur au cours de l'infection, *via* des mécanismes encore mal élucidés, mais qui pourraient aussi interférer avec la voie de RIG-I et inhiber la production d'IFN  $\beta$  (236). Dans le cas de virus recombinants, la délétion de ces protéines SH et G induit une augmentation de l'activation des IRFs et de l'activité transcriptionnelle du facteur cellulaire NF- $\kappa$ B, qui résultent en la sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires, telles que IL-6 ou IL-8 et en l'escalade de la réponse inflammatoire (236, 240, 244).

En conclusion, les données de la littérature semblent indiquer que (i) le virus hMPV active les voies dépendantes des TLRs et induit de ce fait la réponse inflammatoire, contribuant ainsi à sa pathogénèse, (ii) tout en détournant la voie des RLRs, pour moduler la réponse cellulaire antivirale, *via* l'action de plusieurs protéines virales. Néanmoins, ces observations restent très préliminaires et de plus amples investigations sont nécessaires, étant donné la variabilité et une non-reproductibilité des résultats en fonction des souches virales utilisées.

#### **4.3.2 Les réponses immunitaires innée et adaptative**

La réponse immunitaire se décompose en deux phases : (i) la réponse innée qui est la première ligne de défense à être sollicitée sur le site de l'infection puis (ii) la réponse adaptative qui est activée consécutivement en deuxième ligne de défense.

##### *4.3.2.1 Profil d'inflammation et de sécrétion de cytokines des infections hMPV*

L'expression des cytokines et chimiokines lors de l'infection dresse le profil des cellules immunitaires recrutées sur le site de l'infection et conditionne les réponses innée et acquise mises en place. D'une manière générale, il est considéré que les virus hMPV induisent moins la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires que les infections à hRSV ou à virus influenza (321). Chez l'homme, l'analyse de lavages broncho-alvéolaires d'enfants hospitalisés infectés par le hMPV montre l'expression d'IL-12, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , en quantités significativement plus faibles que dans le cas d'infection à hRSV (322, 323). De plus, il semble que la réponse à l'infection hMPV soit plutôt orientée vers une réponse de type Th2 (médiée par la production d'anticorps) chez les enfants infectés et plus particulièrement chez les enfants prématurés (323, 324). Une telle orientation de la réponse immunitaire se mesure principalement par le ratio d'IFN- $\gamma$  (cytokine représentative de la réponse Th1 ou immunité cellulaire) *versus* d'IL-4 ou d'IL-10 (cytokines représentatives de la réponse Th2). Des infections expérimentales effectuées chez des Hommes adultes ont également montré une sécrétion séquentielle des cytokines IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-13 et GM-CSF (précédant le pic de réplication), puis IL-10 et IFN- $\gamma$  (au pic de réplication virale) (53).

En modèle expérimental, des souris BALB/c infectées par hMPV produisent des cytokines pro-inflammatoires de type IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , G-CSF ou TSLP, des cytokines régulatrices telles que IL-4, IL-10, IL-12p70, IL-17 et des chimiokines de type CCL-5/RANTES, CCL3/MIP1 $\alpha$ , avec des taux plus faibles que ceux mesurés lors d'infections par le virus hRSV (290, 292, 321, 325). La sécrétion de ces cytokines permet ainsi le

recrutement et l'activation de cellules de l'immunité, dont les lymphocytes T, macrophages et neutrophiles, sur le site de l'infection. En revanche, les IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-18, CXCL1/KC sont davantage exprimés au cours de l'infection par les virus hMPV en comparaison de celle par hRSV et la cytokine IL-12p40, bien que faiblement exprimée, est également détectée sur une plus longue durée (321). Alternativement, une autre étude a montré que le virus hMPV induit de plus hauts niveaux d'expression de TNF- $\alpha$ , IL-6 et CCL-2/MCP-1 par rapport au virus hRSV (326). Ces discordances de résultats *in vivo* soulignent la nécessité de caractériser davantage les réponses immunitaires à l'infection par hMPV et suggèrent en particulier de prendre en compte la nature de la souche virale étudiée (souche de laboratoire A2/CAN97-83 pour l'étude de Guerrero-Plata et *al. versus* un isolat clinique A2a/D03-574 dans le cas de Huck et *al.*). Par ailleurs, l'infection hMPV semble aussi induire une réponse IFN- $\beta$  et IFN- $\lambda$ 2/3, plus importante que l'infection par hRSV en modèle murin (238), à la différence de la réponse IFN- $\gamma$  (326). Dans ce modèle, il a également été montré que l'infection hMPV induit d'abord une réponse immunitaire plutôt orientée Th1 qui, suite à la sécrétion d'importantes quantités d'IL-10, évolue vers une réponse Th2, qui semble inadaptée à la réponse antivirale et favoriserait de ce fait la persistance du hMPV dans les poumons des animaux infectés (294).

Dans ce contexte, la caractérisation du profil de sécrétion des cytokines et chimiokines induit par l'infection hMPV est primordiale pour une meilleure compréhension du fonctionnement des réponses innée et adaptative contre le virus hMPV et l'identification de ses déterminants ; celle-ci nécessite par conséquent, d'être davantage étudiée et de manière plus exhaustive, notamment au regard des différentes souches virales.

#### 4.3.2.2 La réponse innée

La réponse innée est activée par la reconnaissance des PAMPs du hMPV, telle que décrit précédemment. Les cellules épithéliales pulmonaires, constituant la première barrière de réponse au virus, mais aussi les cellules phagocytaires résidentes du poumon (cellules dendritiques, macrophages alvéolaires, neutrophiles ou cellules *natural killer* NK), sont les principales populations cellulaires participant à la réponse innée, *via* la sécrétion de cytokines inflammatoires et donc le recrutement des autres cellules immunitaires sur le site de l'infection.

Le rôle des cellules présentatrices d'antigènes, en particulier les cellules dendritiques (DC), est primordial pour l'initiation et le développement ultérieur de la réponse immunitaire adaptative. Après la détection du virus, les DC vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines ainsi que des molécules co-stimulatrices, nécessaires pour

leurs maturations. Les DC matures vont ensuite présenter efficacement les antigènes viraux à leur surface et pouvoir ainsi induire l'activation des lymphocytes T de l'immunité adaptative (327). En effet, l'activation des DC par l'infection hMPV *in vivo* induit principalement la sécrétion de cytokines IL-6, IFN  $\alpha/\beta$  et TNF- $\alpha$  (328). La population des DC recrutées décroît après la troisième semaine d'infection, jusqu'à retrouver son niveau basal dans les 8 semaines. Par ailleurs, les DC sont des cellules susceptibles à l'infection *in vitro* (311) et *in vivo* (328, 329) par le hMPV. Or, il a été montré que l'infection réduisait la capacité des DC à activer les lymphocytes T, altérant de fait la réponse cellulaire à l'infection ainsi que la réponse mémoire (311, 312, 329). En revanche, il a également été démontré que la protéine M du hMPV favorise la maturation des DC naïves (196) et que la protéine M2-2 induit la sécrétion d'IFN  $\alpha$  par les DC plasmacytoïdes (330).

Concernant les macrophages alvéolaires, cellules résidentes pulmonaires et source importante de cytokines immuno-modulatrices (331), il a été rapporté que leur présence augmente la réplication virale dans les poumons des souris infectées par le hMPV. En effet, la déplétion de cette population de macrophages semble diminuer les titres viraux pulmonaires, ainsi que la perte de poids et l'inflammation des souris infectées. Cet effet est notamment associé notamment à une diminution de la sécrétion des IFN-I, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, GM-CSF, G-CSF ou encore CCL4 (301). En revanche, d'autres cytokines, telles que CCL3, CCL5 et IL-12p40, sont exprimées en plus grandes quantités et le recrutement des lymphocytes T CD4 semble être altéré dans ces conditions de déplétions. Les macrophages alvéolaires pourraient aussi être impliqués dans le phénomène d'hyperréactivité bronchique hMPV-induite *via* la sécrétion de taux élevés d'IFN  $\gamma$  (319). Ces mécanismes d'interaction entre le virus hMPV et les macrophages alvéolaires ne sont pas encore complètement compris et nécessitent d'être approfondis. Notamment à la lumière de résultats contraires obtenus avec le virus hRSV, dont la réplication virale et les symptômes cliniques associés sont amplifiés dans des conditions de déplétion des macrophages (301).

La population de cellules NK (*Natural Killer*) est aussi particulièrement présente dans les poumons infectés par le hMPV. Différentes études contradictoires ont démontré soit peu d'effet des NK sur la réplication virale en souris C57BL/6 (332) soit, au contraire, un rôle protecteur des NK contre l'infection hMPV en souris BALB/c (294, 333). Dans ces dernières études, il a été démontré que les cellules pulmonaires infectées par le hMPV exprimaient un ligand, pour l'instant non identifié, pour un récepteur exprimé par les cellules NK (récepteur NKp46 chez l'Homme et NCR1 chez la souris), qui favoriserait leur recrutement sur le site de

l'infection (333). Ce fort recrutement de cellules NK activées (présentant des marqueurs caractéristiques NKG2D, CD43, CD27, KLRG1 et CD69) a également été observé dans les poumons des souris sauvages infectées alors que des souris déficientes en récepteur NCR1 étaient plus gravement atteintes par l'infection hMPV (333), confirmant ainsi le rôle protecteur des cellules NK dans la pathogénèse hMPV. De même, la déplétion des cellules NK en souris BALB/c résulte également en l'augmentation des titres viraux pulmonaires, jusqu'à 60 jours après l'infection (294), suggérant que les cellules NK participent aux mécanismes de clairance virale.

Enfin, les neutrophiles constituent aussi une population cellulaire importante pour lutter contre l'infection hMPV. Par exemple, il a été démontré qu'elle était la population prédominante recrutée sur le site de l'infection (290, 334). Récemment, une étude a montré que le recrutement très précoce des neutrophiles semble être dépendant de la réplication virale et en particulier, de la production *de novo* de protéine G (335). De plus, la déplétion des neutrophiles en modèle murin entraîne le développement d'une pathologie hMPV plus sévère et associée à un niveau élevé de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, ainsi qu'à des dommages histologiques pulmonaires plus importants (336). En effet, cette absence de neutrophiles entraînerait l'accumulation d'une population de lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans les poumons et la mise en place d'une inflammation accrue, sans toutefois affecter la réplication virale, ni même la clairance virale pulmonaire (336).

#### 4.3.2.3 La réponse adaptative

L'activation de la réponse innée a pour conséquence la mise en place de la réponse adaptative qui consiste essentiellement en l'action synergique des lymphocytes T CD8 cytotoxiques (CTL) et des lymphocytes T CD4 *helper* (CD4 Th), producteurs importants de cytokines, qui vise à amplifier la réponse des macrophages d'une part et à permettre, d'autre part, l'activation des lymphocytes B et la production des immunoglobulines protectrices. Suite à la présentation des antigènes viraux, par les DC principalement, ainsi que la sécrétion d'IFN- $\alpha$ , les cellules CTL s'accumulent dans les poumons, à partir de 7 jours après l'infection (314).

Lors d'une infection primaire hMPV, il a été montré que la déplétion des cellules CD4 Th ou CTL induisait une diminution de l'inflammation et de la perte de poids des souris infectées, tout en réduisant la clairance du virus (334). De plus, lors d'une ré-infection par le hMPV, l'absence des cellules CTL, seules ou avec les CD4 Th, diminue l'hyperréactivité bronchique, alors que la déplétion des CD4 seules altère de manière importante la réponse

humorale (334). Cependant, ces souris déplétées en CD4 sont tout de même compétentes et capables de réagir efficacement à une ré-infection par le hMPV, suggérant ainsi que la population des cellules CTL est suffisante à la mise en place de l'immunité acquise contre hMPV. Une autre étude a également souligné l'importance des CTL en rapportant que les virus hMPV, comme d'autres virus, entraînent une réponse CTL altérée. Celle-ci serait corrélée à l'expression du récepteur inhibiteur de l'apoptose PD-1 par les CTL ayant pour conséquence la diminution de leurs fonctions de dégranulation et de production de cytokines (337, 338).

Concernant les lymphocytes B, il est décrit que cette population cellulaire est recrutée dans les poumons, à l'image des CTL, entre 5 et 14 jours après l'infection (294). Ainsi, les immunoglobulines (IgG) hMPV-spécifiques ne sont détectables que tardivement, à partir de 14 jours post-infection (294). Par ailleurs, il a été montré que l'injection de ces anticorps neutralisants à des individus naïfs est efficace pour limiter l'infection. En revanche, en modèle murin, l'administration d'anticorps neutralisant ne diminue pas la persistance virale pulmonaire, démontrant ainsi une protection insuffisante (289). Bien que la protection contre l'infection hMPV soit communément associée et mesurée par la production d'anticorps neutralisants, il existe peu d'information concernant la mécanistique de cette réponse à l'infection par les lymphocytes B, soulignant la nécessité de documenter davantage ce sujet.

Finalement, étant donné la complexité et la variété des mécanismes de la réponse antivirale, la littérature reste encore trop peu documentée pour comprendre pleinement la réponse immunitaire en réponse à l'infection, de même que les moyens d'évasion virale mis en place par le virus hMPV. Ces connaissances sont pourtant primordiales pour le développement futur de stratégies thérapeutiques et prophylactiques contre ces virus, sur la base d'une meilleure caractérisation des déterminants de la pathogénèse virale.

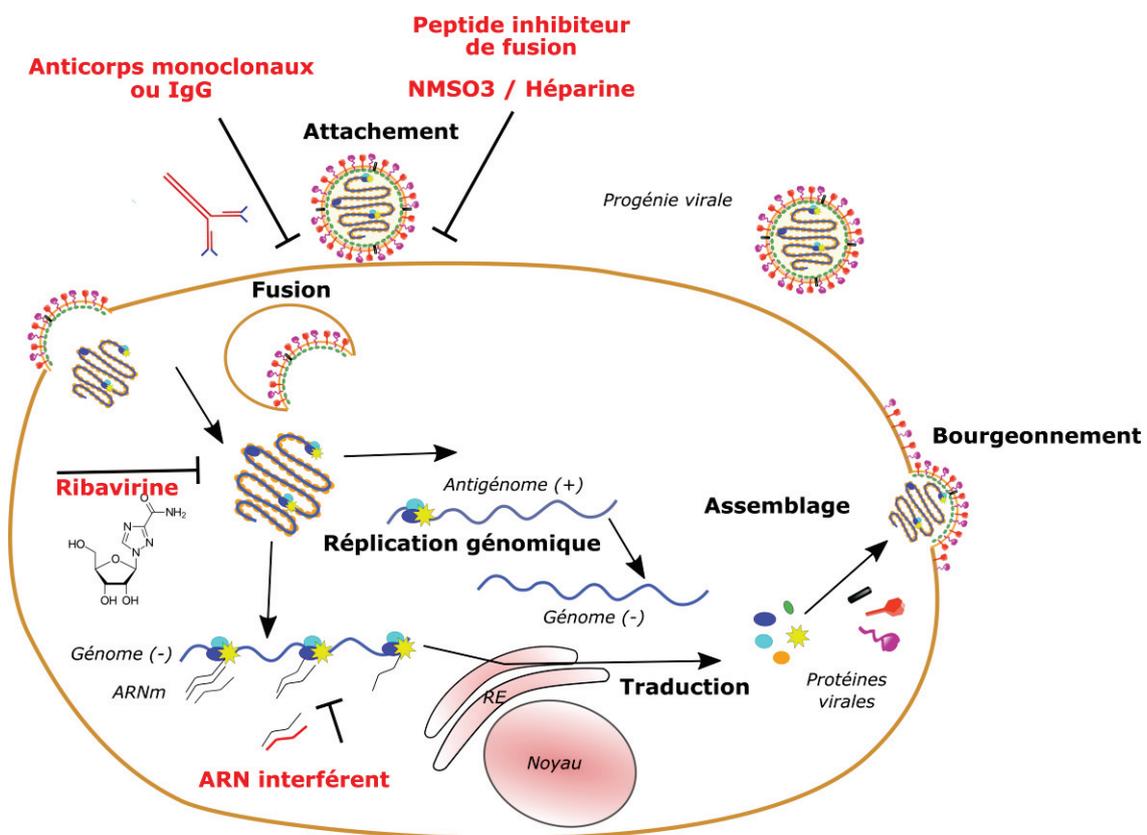
## **4 Molécules prophylactiques et thérapeutiques**

Il n'existe aujourd'hui sur le marché aucun traitement prophylactique ou thérapeutique efficace et spécifique à l'infection par le hMPV. La ribavirine, non exempt d'effets indésirables, ou encore les immunoglobulines intraveineuses, très onéreuses, peuvent être utilisées ponctuellement pour le traitement de cas graves d'infections par hMPV, tout comme par hRSV (339). Cependant, la démarche clinique privilégiée usuellement consiste à traiter

surtout les symptômes de l'infection, en mettant les patients sous assistance respiratoire (administration d'oxygène ou ventilation mécanisée) et en leur administrant des bronchodilatateurs, corticostéroïdes et/ou antibiotiques pour traiter les surinfections bactériennes (68, 124, 127, 340-342).

Il existe donc aujourd'hui un réel besoin en termes de développement de traitements spécifiques et efficaces, pouvant prévenir et/ou traiter les infections causées par les Pneumovirus humains de manière générale, et le hMPV en particulier. L'équipe du Dr Boivin travaille depuis plusieurs années dans ce domaine et elle a d'ailleurs obtenu plusieurs résultats significatifs *in vitro* et *in vivo*, notamment avec l'évaluation d'une molécule inhibitrice de fusion (343) ou d'ARN interférents ciblant les ARNm viraux (344).

Dans ce chapitre seront ainsi répertoriés les différents traitements antiviraux contre hMPV ; (i) ceux déjà sur le marché, (ii) ceux en phase d'évaluation clinique ou (iii) encore en phase de développement pré-clinique. Les différentes stratégies antivirales proposées ciblent différentes étapes du cycle viral et, en particulier, celles de liaison et de fusion membranaire ou encore de réplication génomique (**Figure 13**) (343).



**Figure 13 – Cibles cellulaires des principales molécules antivirales développées contre le virus hMPV.**

## **5.1 La ribavirine**

La ribavirine (ou 1-β-D-ribofuanosyl-1,2,4 triazol-3-carboxamide) est un analogue de la guanosine et son activité antivirale contre plusieurs virus à ARN a été décrite historiquement (345-351). Il a été montré que cette molécule avait une activité antivirale *in vitro*, d'efficacité similaire contre le hRSV et le hMPV, avec une concentration inhibitrice médiane équivalente (CI50 de 88 ± 55 μM pour le hRSV et de 74 ± 35 μM pour le hMPV en cellules LLC-MK2) (339). L'administration de la ribavirine en traitement oral ou par inhalation, est aussi efficace pour réduire la réplication virale, ainsi que l'inflammation associée à l'infection. Cet effet a été montré dans le modèle murin d'infection par hMPV avec une réduction significative de la charge virale pulmonaire des souris infectées et une diminution globale de l'inflammation pulmonaire, lorsque les souris étaient traitées à la ribavirine seule ou en combinaison avec des corticostéroïdes (352).

Synthétisée en 1972 pour la première fois (353), la ribavirine inhibe de manière directe le mécanisme de coiffe en 5' des ARNm viraux et la réplication du génome viral par le complexe RdRP *via* une compétition avec les nucléotides G cellulaires, et favoriserait ainsi l'apparition de mutations létales pour le virus (354). La ribavirine est aussi un puissant inhibiteur de l'enzyme IMP déhydrogénase qui est responsable de la formation des guanosines monophosphate, précurseurs indispensables à la synthèse des nucléotides guanosine triphosphate (GTP). La disponibilité en GTP est nécessaire à la réplication des virus en général, ce qui explique son activité contre de nombreux virus, mais également sa cytotoxicité importante.

En conclusion, la ribavirine a un large spectre d'activité antivirale, cependant, ses propriétés intrinsèques en font une molécule à la toxicité significative pour les cellules traitées, avec un possible pouvoir tératogène démontré chez les rongeurs. D'un point de vue pratique, ces caractéristiques ont ainsi limité son utilisation en clinique à des cas graves d'infection chez les enfants prématurés, ou encore des patients transplantés, dont le pronostic vital était engagé (156, 355, 356).

## **5.2 Les immunoglobulines et anticorps monoclonaux**

Les immunoglobulines intraveineuses (IVIG) sont une préparation d'immunoglobulines circulantes (principalement IgG avec peu d'IgA ou IgM) purifiées à partir d'un pool de plasmas humains, issus de plus de 1000 donneurs sains (357). Le rôle du traitement IVIG est de compenser l'absence ou le faible taux d'anticorps anti-hMPV chez les patients (357). La dose d'IVIG utilisée est très importante, autour de 0,5 g / kg (358) et constitue de ce fait un traitement très coûteux. Toutefois, les immunoglobulines ont montré

une bonne efficacité pour traiter les infections à hMPV *in vitro* (339) et *in vivo*, par injection intraveineuse en combinaison avec un traitement oral à la ribavirine, dans des cas d'infections sévères chez des patients greffés de cellules souches hématopoïétiques (356) ou des enfants immuno-déficients (153, 156, 359).

De manière complémentaire, les anticorps monoclonaux ont aussi démontré un grand potentiel prophylactique contre les infections à Pneumovirus, notamment avec le palivizumab contre le hRSV. Le palivizumab (Synagis™, MedImmune) est un anticorps monoclonal humanisé qui reconnaît un épitope conservé de la protéine F du hRSV (région II) et qui possède une puissante activité neutralisante et d'inhibition de fusion (339, 360). Utilisé en prévention chez les populations à haut risque de développer une infection grave à hRSV, tels que des nourrissons prématurés ou de jeunes enfants présentant des pathologies pulmonaires graves ou des cardiopathies congénitales, il a été démontré qu'il diminuait le taux d'hospitalisation et d'admission en unité de soins intensifs de plus de 55 % (et jusqu'à une réduction d'hospitalisation de 78% pour les nourrissons prématurés) (361). La FDA a autorisé sa mise sur le marché en 1998, cependant, son coût reste très élevé et ne permet pas son utilisation en routine, mais uniquement pour certains cas cliniques sélectionnés.

Par contre, le palivizumab n'étant pas efficace contre le hMPV, plusieurs équipes se sont intéressées au développement d'anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement la protéine F du hMPV (219, 362). Par exemple, l'anticorps neutralisant 54G10, ayant une très grande affinité pour cette protéine, a été décrit comme efficace *in vitro* et *in vivo* (en modèle murin) contre les 4 sous-groupes hMPV. De plus, de manière intéressante, il a aussi démontré une activité neutralisante contre le hRSV, puisque l'épitope ciblé correspond à un site antigénique partagé par la protéine F de hRSV (363). Ces résultats prometteurs, quant à la possibilité de mettre au point un anticorps monoclonal arborant une réactivité croisée envers différents sous-groupes de hMPV et le hRSV, ont conduit à de nombreuses études pour essayer d'identifier les épitopes responsables de cette réactivité croisée (364). Différents autres anticorps monoclonaux ont donc été décrits, tels que les anticorps 101F, MPE8 et 25P13, par exemple (365-369), qui demeurent pour l'instant en phase de développement. D'autant que vient s'ajouter à cela, la problématique de la conformation protéique de F la plus immunogénique. En effet, plusieurs études discutent de l'intérêt de l'immunisation avec des protéines F de hMPV (368) et de hRSV (370) sous leurs formes de pré-fusion et/ou de post-fusion, sans pour l'instant clairement statuer à ce sujet.

### **5.3 Les inhibiteurs de fusion**

Considérant l'importance de l'étape initiale de fusion membranaire pour le cycle infectieux, une des stratégies antivirales s'est focalisée sur le développement de composés peptidiques capables d'inhiber spécifiquement l'action des protéines virales de fusion. Cette stratégie d'inhibition repose sur de petits peptides analogues en séquence des régions *heptad repeat* (HR) des protéines virales de fusion, et dont l'action va limiter le repliement de ces protéines vers leur forme de post-fusion. L'utilisation de tels inhibiteurs dans l'espace extracellulaire peut, en outre, limiter leurs effets cytotoxiques éventuels et leurs impacts potentiels sur la biologie de la cellule. La première molécule antivirale de cette famille à avoir été commercialisée, est l'enfurvitide (ou Fuzeon), un peptide inhibant l'entrée du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1) (371, 372). De tels peptides ont aussi été évalués pour de nombreux autres virus, comme les virus influenza ou les Paramyxovirus, et certains candidats ont montré une relativement bonne efficacité antivirale *in vitro* (373, 374).

Pour les Pneumovirus, les inhibiteurs de fusion ont d'abord montré des résultats prometteurs contre l'infection par le hRSV (375). La même approche a été testée contre le hMPV ; l'équipe du Dr Boivin a notamment pu démontrer que des peptides de synthèse homologues aux domaines HRA ou HRB de la protéine F du hMPV, étaient capables d'inhiber efficacement la fusion membranaire virale dans des expérimentations non seulement *in vitro* (343, 376), mais également *in vivo* en modèle murin (par administration intra-nasale des peptides en pré-traitement de l'infection) (343). Dans ces études, les analogues peptidiques de HRA présentaient notamment une meilleure efficacité que les peptides ciblant le domaine HRB contre plusieurs sous-groupes viraux hMPV testés *in vitro* (343). De manière intéressante, le meilleur candidat testé (CI50 de 2,1 nM pour le peptide le plus efficace et jusqu'à 3.3 µM pour les autres candidats) induisait une diminution de la pathologie, en termes de mortalité et de symptômes cliniques, et l'absence de charge virale pulmonaire après 5 jours d'infection (au moment du pic de réplication virale), lorsque le candidat HRA était administré simultanément à l'infection hMPV (343). En revanche, le traitement 24 heures après l'infection n'a pas montré d'effet protecteur, soulignant ainsi la limite de cette stratégie pour une utilisation thérapeutique. En revanche, l'activité protectrice en prétraitement de ces peptides permet d'envisager leur utilisation en prévention chez les populations à risque de développer une infection grave, telles que les nourrissons ou des personnes vulnérables, qui seraient en contact avec une personne infectée. Toutefois, il faut noter que la formulation et la conservation de ces peptides de nature hydrophobe constituent une limite importante à leur développement clinique et industriel.

## **5.4 Les autres stratégies antivirales**

### **5.4.1 Les glycosaminoglycanes sulfates**

L'héparine et le lipide sialyl-sulfate NMSO<sub>3</sub>, ont aussi démontré de bonnes capacités à inhiber les infections par les virus hRSV et hMPV *in vitro* et *in vivo* (377, 378). Ces composés présentent surtout une efficacité en traitement préventif de par leur mode d'action qui prévient l'attachement et l'entrée des virus dans la cellule cible, par compétition avec leurs récepteurs cellulaires. Dans un modèle de souris infectées par le hMPV, ces composés permettent de réduire significativement la perte de poids, la réplication virale et l'inflammation pulmonaire, ainsi que la production de cytokines viro-induites (378, 379).

### **5.4.2 Les petits ARN interférents (ARNi)**

L'interférence à l'ARN permet la modulation des mécanismes cellulaires chez les eucaryotes *via* l'expression de petits ARN non codants qui ciblent spécifiquement des ARNm et ainsi interfèrent avec leur traduction cellulaire (380). Plusieurs ARNi ont été évalués comme candidats antiviraux. Par exemple, l'utilisation d'un ARNi visant à prévenir l'expression de la protéine N du hRSV, a montré une bonne efficacité antivirale contre hRSV en modèle de souris BALB/c dans des conditions de traitement simultané à l'infection, associé notamment à une réduction des titres viraux mais sans pour autant induire une diminution de la réponse immunitaire (381). Ce candidat ALN-RSV01 (Alnylam Pharmaceuticals) administré par voie intra-nasale sous forme d'aérosol, semble être bien toléré chez l'adulte, ainsi que chez les patients transplantés pulmonaires. Ce traitement (actuellement en Phase IIb) semble efficace pour lutter contre le syndrome de la bronchiolite oblitérante causé par l'infection hRSV (382, 383).

Concernant le hMPV, sa réplication peut également être inhibée efficacement *in vitro* par des ARNi spécifiques, ciblant les ARNm viraux N (CI<sub>50</sub> du siRNA45 < 0.078 nM) ou P (CI<sub>50</sub> du siRNA60 entre 0.090 et <0.078 nM) et identifiés à partir d'une librairie de plus de 200 ARNi potentiels (344). Les expérimentations animales en modèle murin n'ont cependant pas été complètement concluantes avec ces candidats thérapeutiques qui n'ont pas permis de diminuer les symptômes cliniques ni de réduire significativement la charge virale pulmonaire (1/2 log) (344, 384). Cette stratégie très prometteuse reste ainsi encore en phase d'évaluation et d'optimisation (385-387).

### 5.4.3 Les agents anti-inflammatoires et immunomodulateurs

Pour le hRSV, dont les effets pro-inflammatoires induits sont similaires à ceux du hMPV, il a été montré que l'inhibition de cytokines telles que MIP-1 $\alpha$ , IL-4 ou RANTES en modèle murin, induisait une réduction de l'inflammation pulmonaire viro-induite (388). Aussi, l'utilisation de molécules anti-inflammatoires, comme par exemple le Resveratrol, peuvent aider à limiter l'évolution de la pathologie et contribuer à une guérison plus rapide (389).

Dans le cas des infections hMPV, le virus induit un état inflammatoire persistant, qui participe à la pathologie infectieuse (293). Cependant, il n'y a pour l'instant aucune donnée précise sur l'intérêt d'utiliser des anti-inflammatoires pour traiter l'infection par hMPV. Dans ce contexte, l'équipe du Dr Boivin a montré que l'ajout de corticostérone, seul ou en combinaison avec de la ribavirine, n'a pas d'effet significatif pour limiter l'infection par le hMPV en modèle murin, bien que le traitement diminue l'inflammation alvéolaire et interstitielle (352). Par ailleurs, une étude a montré que l'administration d'IFN de type I n'était pas efficace pour lutter contre l'infection par le hMPV *in vitro* (390). En revanche, en modèle murin, il a été suggéré que le traitement par l'IFN- $\lambda$  confère une protection contre l'infection hMPV, réduisant la sévérité de la pathologie et les titres viraux pulmonaires (238).

Parallèlement, l'équipe du Dr Boivin a aussi récemment démontré l'effet antiviral d'une molécule antagoniste du récepteur PAR1 sur l'infection hMPV (327). En effet, le traitement de souris avec ces molécules pendant 3 à 5 jours suivant l'infection a montré une réduction de la perte de poids et de l'inflammation pulmonaire induites par l'infection hMPV (327). PAR1 est un récepteur cellulaire ubiquitaire qui est impliqué dans de multiples mécanismes dont l'inflammation (391, 392). Ainsi, les molécules ciblant ce récepteur PAR, et d'autres membres de la même famille, gagnent en importance par leur potentiel immuno-modulateur, mais nécessitent de plus amples études pour être validés (393-396).

En conclusion, la panoplie de molécules prophylactiques et/ou thérapeutiques disponibles pour lutter contre le hMPV est assez restreinte. Quelques-unes sont utilisables en clinique mais, du fait de leur coût important et/ou de leurs effets secondaires non négligeables, ces composés restent limités dans leur utilisation aux cas les plus graves et aux individus les plus à risque. D'autres traitements plus sécuritaires et efficaces sont actuellement en développement et démontrent des résultats encourageants, comme l'approche de ARNi, mais nécessitent encore de plus amples évaluations et optimisations. Toutefois, ces stratégies ne peuvent pas remplacer entièrement l'approche vaccinale qui reste indispensable pour la mise en place d'une réponse immunitaire protectrice et mémoire chez les populations les plus à risque de développer une pathologie sévère due au hMPV.

## 5 Stratégies vaccinales

Les populations ciblées principalement par le hMPV étant les nourrissons, les jeunes enfants et les personnes âgées, il est crucial de pouvoir disposer rapidement de vaccins efficaces et sécuritaires, afin de réduire les atteintes respiratoires sévères qui ont un impact dramatique dans ces tranches d'âge. Comme c'est le cas avec l'infection hRSV, la mise au point d'un vaccin contre le hMPV représente donc non seulement un enjeu sanitaire majeur, mais également un réel enjeu socio-économique avec l'objectif de (i) réduire les coûts importants des traitements et d'hospitalisations associés à ces infections, et (ii) diminuer l'utilisation d'antibiotiques dans le contexte des surinfections bactériennes et ainsi limiter l'émergence de résistances.

Les différentes stratégies vaccinales développées aujourd'hui sont listées dans le **tableau 3**, qui précise leurs avantages et inconvénients, ainsi que les populations cibles privilégiées respectives.

**Tableau 3 – Avantages et inconvénients des approches vaccinales en développement**

TYPE DE VACCIN	AVANTAGES	INCONVÉNIENTS	POPULATION CIBLE
<b>VACCIN SOUS-UNITAIRE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Non infectieux</li> <li>• Non transmissible, absence de matériel génétique viral</li> <li>• Favorise la réponse immune contre un antigène particulier et limite la compétition antigénique</li> <li>• Possibilité d'ingénierie de l'antigène pour optimiser son immunogénicité</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nécessité de protéines purifiées, correctement conformées et possédant les modifications post-traductionnelles requises</li> <li>• Adjuvants généralement nécessaires pour augmenter l'immunogénicité de la préparation</li> <li>• Risques de réponse immune exacerbée</li> </ul>	<p>Boost des populations précédemment vaccinées Personnes âgées ou femmes enceintes</p>
<b>VACCIN À ADN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilisation de système cellulaire adapté pour produire l'antigène conformé comme dans la particule native, à partir d'un vecteur à ADN</li> <li>• Possibilité d'ingénierie de l'antigène pour optimiser son immunogénicité</li> <li>• Non transmissible</li> <li>• Stable</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Réponse immune limitée chez l'humain, alors qu'ils présentent une bonne efficacité en modèle animal</li> <li>• Risque d'induction de tolérance à l'antigène</li> <li>• Risque théorique d'intégration au génome de la cellule</li> <li>• Nécessité d'optimisation des vecteurs ADN</li> </ul>	<p>Encore à déterminer Primo-vaccination associé à un boost avec un vaccin sous-unitaire</p>
<b>VIRUS INACTIVÉ</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Risque d'infection pratiquement nul</li> <li>• Particules virales entières présentant les épitopes protecteurs et immunogènes</li> <li>• Facilité de production</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immunisation parentérale induisant peu de production d'IgA sécrétoires</li> <li>• Faible stimulation de la réponse CTL primaire</li> <li>• Méthode d'inactivation pouvant produire des groupements carbonyle sur les antigènes et favoriser une réponse allergique</li> <li>• Développement possible d'une réponse immune exacerbée suite à une infection virale secondaire</li> <li>• Maladie plus sévère suite à une exposition chez des sujets naïfs</li> </ul>	<p>Boost d'individus précédemment vaccinés</p>
<b>PARTICULE PSEUDO-VIRALE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Particules non répliquatives, absence théorique de matériel génétique viral</li> <li>• Présentation et conformation des épitopes antigéniques de manière similaire au virus natif</li> <li>• Stratégie alternative dans le cas de virus difficile à produire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Absence de réplication donc réponse immune induite incomplète</li> <li>• Coûts élevés de développement et de production</li> <li>• Difficulté de purification</li> </ul>	<p>Sécuritaire pour toutes les cibles</p>
<b>VACCIN VIVANT ATTENUÉ</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activation de tous les acteurs du système immunitaire, mimant l'infection avec un virus entier</li> <li>• Réponse contre plusieurs antigènes du pathogène</li> <li>• Induction plus durable et plus efficace de l'immunité</li> <li>• Inoculation efficace au niveau des muqueuses</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Risques de contamination pendant le processus de production</li> <li>• Transmission virale possible et peut induire une pathologie légère</li> <li>• Risques de réversion de l'atténuation (en fonction de la nature des mutations)</li> <li>• Instabilité de la préparation vaccinale selon stockage et transport (température)</li> </ul>	<p>Primo-vaccination, plutôt pour des enfants naïfs et immunocompétents</p>

CTL = Lymphocyte T cytotoxique ; Ig = immunoglobuline

Plusieurs stratégies vaccinales ont été évaluées contre le hMPV ces dernières années (397). Certaines stratégies sont exclues pour certaines populations fragiles du fait de leur danger potentiel (vaccin inactivé induisant un syndrome de « *enhanced disease* ») ; d'autres apparaissant très prometteuses en termes de protection et de sécurité pour ces populations (vaccins vivants atténués et/ou vaccins sous-unitaires protéiques) (398). Différentes approches innovantes, basées sur des virus recombinants chimériques et la mise au point de peptides de synthèse ou encore de pseudo-particules virales (VLP), ont également été évaluées en modèles animaux. Malgré ces efforts, un seul candidat vaccin à ce jour, un virus hMPV vivant atténué, a poursuivi son développement jusqu'en essai clinique de phase I (**Tableau 4**) (399).

### **6.1 Problématiques de la vaccination des jeunes enfants**

Dans le cas du virus hMPV, comme pour hRSV, l'une des problématiques majeures du développement de candidats vaccin réside en la complexité de la vaccination des très jeunes enfants. En effet, l'incidence du hMPV se situe principalement entre 6 à 12 mois de vie, ce qui signifie qu'il faut mettre en place une vaccination très précoce dans cette population. Une des stratégies vaccinales la plus adaptée est basée sur l'approche de vaccin vivant atténué, considérée comme plus à même d'induire une protection complète et durable (400). Ce type de vaccin pourrait être administré à partir du deuxième mois de vie, lorsque le système immunitaire devient compétent à produire ses propres anticorps. De plus, l'administration de vaccin vivant atténué par voie intra-nasale semble permettre d'éviter l'interférence de l'immunisation avec les anticorps maternels circulants (401). Cependant, pour la vaccination hRSV, le contexte est plus compliqué car l'incidence maximale du hRSV se situe entre 0 à 6 mois de vie et donc la vaccination par virus vivant atténuée pourrait être trop tardive ou incomplète au moment de l'infection des nourrissons. Aussi, comme les anticorps maternels transmettent une protection humorale au bébé durant 3 à 6 mois, l'approche vaccinale privilégiée pour le hRSV serait davantage une vaccination des femmes enceintes (402). Dans ce cas, il s'agirait de provoquer une stimulation du système immunitaire de la mère (qui a certainement déjà développé une immunité contre le hRSV au cours de sa vie) avec un vaccin de type sous-unitaire, considéré comme le plus sécuritaire chez cette population cible très particulière (**Tableau 3**). Cette stratégie permettrait ainsi de produire un taux élevé d'anticorps maternels pouvant être transmis *in utero*. Pour cette approche, plusieurs candidats vaccinaux à base de protéine F sont en essais cliniques de Phase I à III, menés par GlaxoSmithKline ou MedImmune (402).

## **6.2 Vaccins sous-unitaires**

Un vaccin sous-unitaire est constitué d'une partie ou de la totalité d'une protéine virale d'intérêt. Il peut être produit en système cellulaire ou même synthétisé biochimiquement, ce qui en réduit les étapes de purification. Ce type de vaccin est relativement plus facile à développer d'un point de vue réglementaire et les risques infectieux sont inexistant; ils sont de ce fait particulièrement bien adaptés pour la vaccination des femmes enceintes. C'est aussi une modalité vaccinale de choix pour la réactivation immunitaire chez les personnes âgées.

Les vaccins sous-unitaires hMPV sont basés principalement sur la protéine F, du fait de son important pouvoir immunogénique. En effet, des études ont montré qu'un vaccin à base de protéine F soluble, administré par injection intra-musculaire, était capable d'induire la production d'anticorps neutralisants contre différents sous-groupes de virus hMPV en modèle de rongeurs, validant ainsi le potentiel de protection croisée de tel candidat vaccin (403). Il est à noter que deux études ont rapporté récemment que la conformation tridimensionnelle de la protéine F sous sa forme post-fusion serait également très immunogénique, de manière comparable à sa forme pré-fusion (368, 404). Ces nouvelles données mettent en lumière les différences de la protéine F de hMPV vis-à-vis de celle de hRSV, dont il a été rapporté que la stabilisation de sa forme de pré-fusion était plus avantageuse pour l'induction de titres élevés d'anticorps neutralisants (405). Ces données apportent ainsi de nouvelles perspectives sur l'utilisation vaccinale de la protéine F et l'optimisation de candidats sous-unitaires pour la vaccination hMPV (368).

Une autre approche pour générer des vaccins sous-unitaires consiste à prédire les épitopes viraux qui peuvent être reconnus par les lymphocytes T (Th et CTL) ou lymphocytes B et d'en synthétiser des fragments peptidiques (406, 407). C'est une approche très intéressante et qui semble prometteuse, notamment si les épitopes prédits concernent des protéines hautement conservées parmi les sous-groupes viraux. Par exemple, la vaccination par des épitopes de synthèse, correspondant aux protéines M et N du hMPV, permet de réduire les titres viraux pulmonaires, la perte de poids ainsi que l'immunopathologie pulmonaire de souris infectées par hMPV, *via* l'activation des CTL (408). Cette étude a également rapporté que la réponse immunitaire cellulaire et les cytokines associées (IFN- $\gamma$  et IL-12) étaient aussi plus élevées, alors que la réponse humorale, avec la sécrétion des cytokines IL-10 et IL-4, était plus restreinte (407). Une autre étude portant sur le design de peptide multi-

épitopes hMPV (409, 410), a montré que cette stratégie était efficace pour stimuler à la fois une réponse cellulaire et une réponse humorale neutralisante en activant les lymphocytes T et B (411).

Malgré tout, quelque soit la préparation antigénique utilisée, un peptide synthétique ou une protéine virale recombinante, l'immunogénicité et les propriétés protectrices de ces candidats vaccins sous-unitaires restent relativement faibles et des adjuvants doivent être utilisés afin de stimuler plus efficacement et favoriser la réponse immune de l'hôte. L'adjuvant le plus communément utilisé dans les préparations vaccinales autorisées est l'Alum. Ce composé chimique est dérivé de l'aluminium hydroxyde ou aluminium phosphate et participe, sous forme de gel, à agréger les antigènes vaccinaux, contribuant ainsi à une meilleure présentation antigénique aux cellules immunitaires (412). Cependant, il a été montré que, malgré son utilisation dans de nombreuses préparations vaccinales, l'Alum a tendance à introduire un biais de la réponse immunitaire vers une réponse humorale, de type Th2. De plus, il pourrait être impliqué dans l'activation de l'inflammasome (413), ce qui affecterait son efficacité et la sécurité des préparations vaccinales. Ainsi, pour mieux contrôler l'immunisation, il est important de développer de nouvelles méthodes d'adjuvantation et de les caractériser au mieux pour les adapter à la stratégie vaccinale choisie (414).

Dans cette perspective, l'équipe du Dr Boivin a notamment démontré que la combinaison d'une protéine recombinante F soluble avec la protéine M du hMPV soluble, alors utilisée comme adjuvant alternatif, potentialisait l'immunisation contre hMPV chez des souris. En comparaison avec l'ajout d'Alum, seul ou en combinaison avec la protéine M, l'étude a permis de démontrer un effet immunomodulateur intéressant de la protéine M qui participe à la mise en place d'une réponse immune plus équilibrée, cellulaire et humorale (200).

De manière alternative, une immunisation à partir de vecteur plasmidique à ADN, exprimant fortement la protéine F soluble de hMPV, est capable d'induire la production d'anticorps neutralisants et de diminuer les titres viraux nasaux en modèle de rats des cotonniers infectés (415). Cependant, pour le moment, c'est une approche qui reste trop peu immunogénique chez l'Homme et sur laquelle de nombreux efforts d'optimisation, en termes de construction du vecteur à ADN, d'expression protéique, de méthode d'administration, sont nécessaires avant d'envisager des tests cliniques plus poussés chez l'Homme (416).

## **6.3 Les vaccins à base de particules virales**

### **6.3.1 Les vaccins inactivés**

Les premiers essais de vaccination contre le hRSV dans les années 1960 ont été réalisés avec des virus préalablement inactivés à la formaline (417, 418). Suite à cette immunisation, il a été rapporté que les enfants vaccinés avaient été par la suite davantage susceptibles à développer des pathologies exacerbées (fièvre élevée, broncho-pneumonie, respiration sifflante) en cas d'infections par le hRSV et conduisant à un taux anormalement élevé d'hospitalisations (syndrome de « *enhanced disease* ») (417). Ces essais ont d'ailleurs conduit au décès de deux des enfants immunisés, mettant un terme au développement de ce type de vaccination contre hRSV, basé sur des virus inactivés (417). Cette pathologie accrue a été associée à l'exacerbation de la réponse inflammatoire et immunitaire de type Th2, avec une infiltration importante de cellules de type neutrophile, macrophage, lymphocyte et éosinophile dans le milieu péri-bronchial, et une hyperréactivité bronchique (419). Cette exacerbation induite par la vaccination a d'ailleurs également été observée avec le vaccin de la rougeole inactivé à la formaline (420).

Dans ce contexte, la prudence a donc été de mise concernant des approches similaires basée sur des virus hMPV inactivés. Des tests menés en modèles animaux ont effectivement démontré, de manière similaire à hRSV, une augmentation dramatique de l'inflammation interstitielle dans les poumons et une hyper-sécrétion de mucus lors d'une infection secondaire hMPV, consécutive à la vaccination, et ce malgré la production d'anticorps neutralisants (421-423). Les mécanismes à l'origine de cette réponse immune exacerbée semblent impliquer différentes composantes du système immunitaire, telles que les cellules éosinophiles et les lymphocytes T CD4, anormalement recrutés au niveau pulmonaire au cours de cette infection secondaire. Les lymphocytes CTL, à l'inverse, ne semblent pas être impliqués (424).

Les raisons de ce syndrome d'exacerbation de la réponse immunitaire suite à la vaccination ne sont pas encore complètement déterminées, mais constituent un enjeu important pour la compréhension des écueils actuels des stratégies vaccinales en cours de développement.

### **6.3.2 Les vaccins à base de particules pseudo-virales**

Les particules pseudo-virales (VLPs) sont générées par auto-assemblage des protéines virales qui vont provoquer le bourgeonnement de particules non infectieuses

(sans matériel génétique viral) à partir de la surface membranaire des cellules. C'est une approche qui a connue de grandes avancées ces dernières années, et plusieurs préparations vaccinales sont d'ailleurs sur le marché, telles que le Gardasil ou le Cervarix pour la vaccination contre le papillomavirus humain (425).

De nombreuses stratégies et systèmes d'expression de VLPs existent. Concernant les VLPs hMPV, nous pouvons citer :

- des VLPs exprimant les protéines F et G et générées à partir d'un vecteur d'expression rétroviral en système cellulaire 293-T (426). L'équipe du Dr Boivin a montré que ces VLPs, inoculées de manière intra-péritonéale, induisent la production d'anticorps neutralisants et une protection croisée contre les souches virales homologues (A) et hétérologues (B), en modèle murin.

- des VLPs exprimant les protéines F et M générées par transfection de cellules en suspension 293-F (198). Cette étude a montré que la co-expression cellulaire de M et F est suffisante pour induire la production de VLPs hMPV. Il a également été rapporté que ces VLPs, administrées à des souris par voie intra-péritonéale, induisent une réponse humorale et cellulaire de type CD8 et dirigée contre la protéine F.

Ces approches vaccinales permettent une protection contre l'infection hMPV, mais les VLPs nécessitent d'être adjuvantées pour induire une réponse plus forte (427). Dans le cas des VLPs F+M hMPV, l'utilisation des adjuvants TiterMax Gold ou  $\alpha$ -galactosylceramide a en effet montré une amélioration de la réponse humorale avec des titres d'anticorps neutralisants plus élevés. L'étude a par contre indiqué une diminution de la réponse cellulaire CTL dans ces conditions d'adjuvantation.

Cette stratégie semble être intéressante pour la vaccination contre le virus hMPV, mais elle nécessite d'être davantage optimisée pour induire une réponse immunitaire plus complète, en particulier si elle doit être utilisée pour la vaccination des jeunes enfants (**Tableau 3**). Aucun essai clinique n'a été mené jusqu'à aujourd'hui sur la base de cette stratégie utilisant des VLPs.

### **6.3.3 Les vaccins vivants atténués**

#### *6.3.3.1 Principe et historique*

Le principe des vaccins vivants atténués repose sur l'utilisation de virus faiblement répliquatifs qui miment une infection classique, mais associée à une pathogénèse très réduite. Ces virus ont traditionnellement été obtenus par de multiples passages cellulaires jusqu'à l'émergence de mutations d'adaptation, qui peuvent

résulter en un ou plusieurs défauts de leur cycle répliatif chez l'Homme. Cette stratégie vaccinale permet d'induire une réponse immunitaire équilibrée, à la fois humorale et cellulaire, pour une durée plus importante par rapport aux autres modes de vaccination (428). Cependant, le fait que ces vaccins soient infectieux, impliquent des contraintes réglementaires très importantes et les disqualifie pour la vaccination des individus immuno-déprimés et/ou des femmes enceintes.

La mise au point des techniques et outils de génétique inverse (32, 429) a permis de générer plus efficacement et à façon des virus hMPV recombinants atténués. En effet, cette technologie a de nombreux avantages dont (i) la possibilité de modifier le génome par l'insertion de mutations ou la délétion de gènes (242); (ii) la possibilité ainsi de créer des virus chimériques, c'est-à-dire utiliser un virus comme vecteur pour l'expression d'une protéine virale hétérologue, dans le but d'atténuer le virus et/ou de créer des vaccins polyvalents (298, 299); et (iii) de générer des virus atténués par l'introduction de combinaisons de mutations sur plusieurs gènes et/ou la délétion de gènes ou de portion de gènes, afin de minimiser les risques de réversion du phénotype d'atténuation (**Tableau 4**). Cette technologie de génétique inverse, que j'ai exploitée dans mes travaux de recherche doctorale, sera d'ailleurs plus amplement décrite en Partie 2.4 de ce manuscrit.

Des vaccins vivants atténués pour les virus de la rougeole, des oreillons, de la rubéole, de la varicelle (vaccin MMRV, ProQuad aux États-Unis) ou encore de la maladie de Newcastle (NDV) dans le champ vétérinaire, sont actuellement sur le marché. En revanche aucun vaccin de ce type contre les virus respiratoires n'est actuellement approuvé par les instances réglementaires, bien que plusieurs candidats soient actuellement évalués en essais cliniques. Par exemple, le vaccin *rcp45* est une version recombinante du virus hPIV-3 portant une combinaison de 15 mutations de thermosensibilité (mutations situées dans les gènes L, N, C, M, F et HN) qui confèrent une atténuation virale (430). Ce candidat a été évalué en essai clinique de phase I sur des nourrissons et jeunes enfants (NCT00308412) (431). C'est une souche virale suffisamment atténuée et immunogène, dont les mutations semblent être stables ; néanmoins de plus amples études cliniques vont être nécessaires concernant l'évaluation des doses et des conditions d'inoculation, avant son approbation de mise sur le marché.

### 6.3.3.2 Les différentes approches de vaccins atténués hMPV

En ce qui concerne les vaccins atténués hMPV, plusieurs candidats ont été évalués et sont listés dans le **Tableau 4** et détaillés ci-après.

- **Les virus thermo-sensibles (hMPV-ts).** Historiquement, ces virus ont été générés par l'accumulation de mutations au cours de multiples passages cellulaires successifs en cellules Vero et en diminuant progressivement la température jusqu'à 25°C (432). Ces mutations de thermo-sensibilité (*ts*) sont réparties dans tout le génome à l'exception des gènes SH et N. À la manière du candidat vaccin *rcp45* de hPIV-3, des virus recombinants hMPV, portant jusqu'à 11 des mutations *ts* identifiées, ont été générés par génétique inverse. Ces virus hMPV-*ts* se sont révélés très atténués dans l'arbre respiratoire du modèle de hamster, tout en étant inducteurs d'une production de titres élevés d'anticorps protecteurs, suite à une seconde infection par hMPV. Ces premières expérimentations ont ainsi fait la preuve de concept pour l'utilisation de virus hMPV atténués à des fins vaccinales, mais n'ont pas fait l'objet d'évaluation en primates non humains, ni d'essai clinique chez l'Homme.

- **Les virus mutés sur des sites protéiques fonctionnels clé.** Il a été décrit que des mutations dans le gène F du hMPV (433, 434) ou dans le site de phosphorylation de la protéine M2-1 (435) induisent une atténuation virale. De même, les mutations introduites dans le site méthyltransférase de la polymérase L entraînent aussi une atténuation *in vitro* et *in vivo*, en diminuant le taux de synthèse des ARN viraux (436, 437). Pour les trois différentes mutations ponctuelles testées, des effets réduits mais variables ont été observés sur l'inflammation des poumons de hamsters infectés, avec une infiltration interstitielle (mutation G1700A) ou une infiltration mononucléaire (mutations G1696A et D1755A).

Cependant, si ces virus sont atténués *in vitro* et/ou *in vivo* et induisent une protection efficace chez les souris et/ou les rats des cotonniers, les risques de réversion sont cependant élevés, sachant que l'atténuation ne dépend que d'un nombre faible de mutations. Ces raisons justifient pourquoi ces virus atténués n'ont pas été davantage développés ni évalués en clinique jusqu'à maintenant.

- **Les virus atténués par délétion de gène(s).** La délétion de gène(s) est une alternative intéressante qui permet de diminuer les risques de réversions des virus

**Tableau 4 – Liste des virus hMPV vivants atténués en cours de développement**

Stratégie	Nom du virus	Description	Atténuation <i>in vitro</i>	Atténuation <i>in vivo</i>	Ac neutralisants protecteurs	Test Clinique	Réf.
Mutations	<b>cp-HMPV M11</b> (B1/NL/1/99)	Insertion de 11 mutations aa parmi les 17 induites par des passages sur cellules Vero à température décroissante (jusqu'à 25°C)	✓ Vero > 39°C	✓ H	✓ H	(432)	
	<b>cp-HMPV HRSV3</b> (B1/NL/1/99)	4 mutations cp de hRSV	✓ Vero > 37°C	✓ H	✓ H	(432)	
	<b>rhMPV-R329K</b> <b>rhMPV-D331A</b> (A1/NL/1/00)	Mutations dans le domaine de liaison à l'intégrine de la protéine F	✓ LLC-MK2	✓ CR	✓ CR	(434)	
	<b>HMPV M2</b> (A1/NL/1/00)	Suppression du site de N-glycosylation (aa 172) de la protéine F	✓ Vero.	✓ M ✓ M SCID	✓ M	(438) (433)	
	<b>HMPV-MTase</b> (A1/NL/1/00)	Mutations du site méthyltransférase de la polymérase L (G1696A, G1700A, and D1755A)	✓ LLC-MK2	✓ CR	✓ CR	(190)	
Déletion de gènes)	<b>HMPV-ΔSH</b> (A2/CAN97-83)	Déletion du gène SH	Ø LLC-MK2	Ø H ✓ Ch	✓ H ✓ Ch	(242) (174)	
	<b>HMPV-ΔG</b> (A2/CAN97-83)	Déletion du gène G	Ø LLC-MK2	✓ H à 3 jours Ø H > 3 jours ✓ Ch	✓ H ✓ Ch	(242) (174)	
	<b>HMPV-ΔSH/ΔG</b> (A2/CAN97-83)	Déletion des gènes SH et G	Ø LLC-MK2	✓ H à 3 jours. Ø H > 3 jours	✓ H	(242)	
	<b>HMPV-ΔM2-2</b> (A2/CAN97-83)	Mutations codon initiation + codon stop	Ø Vero	✓ H ✓ Ch	✓ H ✓ Ch	(173) (174) (258)	
	<b>HMPV-ΔM2-1</b> (A2/CAN97-83)	Mutation codon stop	Ø Vero	Ø H	Ø H	(173)	
Virus chimérique	<b>HMPV-ΔM2-1/ΔM2-2</b> (A2/CAN97-83)	Déletion du gène M2 complet	Ø Vero	Ø H	Ø H	(173)	
	<b>HMPV-Pa</b> (A2/CAN97-83)	Fond génétique du virus HMPV (SH stabilisé) Echange du gène P avec l'homologue aMPV C	Ø Vero	✓ H ✓ AGM	✓ H ✓ AGM	Phase I NCT01255410 (299) (399)	
	<b>HMPV Na</b> (A2/CAN97-83)	Fond génétique du virus HMPV (SH stabilisé) Echange du gène N avec l'homologue aMPV C	Ø Vero	✓ H à 3 jours. Ø H > 3 jours ✓ AGM	✓ H ✓ AGM	(299)	
	<b>b/hPIV3/hMPV F2</b> (A1/NL/1/00)	Fond génétique PIV-3 bovin Echange des gènes F et HN avec leurs homologues de hPIV-3	-	Ø H Ø AGM	✓ H ✓ AGM (hMPV/hPIV)	(439) (298)	
	<b>SeV-MPV-Ft</b> (A2/CAN00-16)	Ajout du gène F de hMPV en 2 <sup>ème</sup> position sur le génome Fond génétique du virus SeV Ajout gène F hMPV tronqué pour son domaine TM	-	✓ Rh séronégatif	✓ CR	(440)	

Sont considérés atténués *in vitro* les virus dont la capacité répliquative est diminuée par rapport au virus sauvage (WT), ou qui forme des ECPs plus restreints. Sont considérés atténués *in vivo* les virus qui se répliquent à un titre maximal plus faible et/ou qui induisent une pathologie moins sévère (en termes de perte de poids et/ou de profil inflammatoire et/ou d'atteintes histopathologiques) que le virus WT.

cp = cold *passaging*; Δ : déletion totale du gène. Ø = pas d'atténuation ou avantage répliquatif. TM = domaine transmembranaire. PIV = Virus parainfluenza. SeV = Virus Sendai. Modèles d'études *in vivo* : M pour *Mouse*; H pour *hamster*; CR pour *Cotton Rat*; CM pour *Cynomolgus Macaque*; AGM pour *African Green Monkey*; Ch pour *Chimpanzee*; Rh pour *Rhesus*. SCID pour *Severe Combined ImmunoDeficiency*.

atténués candidats vaccinaux. Parmi les protéines virales des virus hMPV, les protéines G, SH et M2-2 sont accessoires et peuvent être délétées du génome viral (délétion de séquence et/ou introduction de codon-stop précoce). Il a en effet été décrit que ces délétions de gènes avaient un fort potentiel d'atténuation virale, tout en permettant la production et la viabilité des virus délétés recombinants. Il a ainsi été montré que des virus délétés de SH ( $\Delta$ SH), de G ( $\Delta$ G) ou des deux gènes ( $\Delta$ SH/G) induisent la production d'anticorps neutralisants et permettent une protection en modèle animal (hamster) d'infection par un virus hMPV sauvage (242). Par ailleurs, seul les virus ayant une délétion  $\Delta$ G, combinée ou non à une délétion de SH, sont associés à une réplication virale atténuée dans les poumons des modèles animaux infectés, même si celle-ci n'est plus significative après 3 jours d'infection chez le hamster (**Tableau 4**) (242). A l'inverse, la délétion seule du gène SH est associée à une réplication virale 40 fois plus importante que celle du virus recombinant sauvage (242). De plus, l'utilisation de ces virus recombinants *in vitro* (cellules A549), a permis de mettre en évidence le rôle immuno-modulateur des protéines G et SH. Par exemple, dans l'étude de Bao et *al.*, le virus  $\Delta$ G-hMPV induit l'expression de 4 à 7 fois plus d'IFN  $\alpha$  et de 13 à 20 fois plus d'IFN  $\beta$  que le virus sauvage en cellules A549 (236). Cependant, il faut noter que le profil pro-inflammatoire de ces virus en modèle animal n'a pas été décrit et qu'ils n'ont pas fait l'objet de test clinique chez l'Homme.

Alternativement, la délétion du cadre de lecture ouvert de M2-2 ( $\Delta$ M2.2) induit également l'atténuation du virus hMPV *in vivo*, en modèles de hamster et chimpanzés, alors qu'elle n'a qu'un effet minime *in vitro* en cellules Vero (**Tableau 4**) (174, 258). De manière intéressante, l'immunisation préalable par ce virus recombinant induit la production d'anticorps neutralisants à des niveaux comparables à ceux mesurés lors d'une infection classique, ainsi qu'une protection quasi-complète contre une seconde infection hMPV (174). Toutefois, la protéine M2-2 étant impliquée dans la régulation de la transcription du génome, sa délétion induit un taux de mutations plus important lors de la réplication virale, ce qui entraîne une instabilité du virus et rend difficile son utilisation à des fins vaccinales (258). Du fait de ce risque en termes de sécurité, ce candidat vaccinal atténué n'a pas été évalué en test clinique.

- **Les virus chimériques.** Différentes constructions ont été testées, telles que des vaccins chimériques hMPV/aMPV ou hMPV/hPIV-3. Les avantages à utiliser ces virus sont (i) leur proximité génomique avec hMPV et leur tropisme pulmonaire ; (ii) la

possibilité de manipuler et d'augmenter la taille de leur génome, jusqu'à 5 kb supplémentaire pour les paramyxovirus (en tenant compte de « la règle de six » pour la taille du génome viral) ; et (iii) le fait que le remplacement d'un gène par celui correspondant du hMPV induit l'atténuation du virus chimérique en question (298, 299, 439, 441).

En effet, bien que proche phylogénétiquement des virus aMPV de type C, il a été démontré que l'échange de gènes du complexe de polymérase virale du virus hMPV avec leur homologue aviaire C induit une atténuation du virus chimérique, bien qu'il soit répliquatif, à l'inverse de virus hMPV dans lesquels les gènes auraient été changé par ceux des virus aviaires A ou B ou hPIV-3 (441). Dans cette étude, un virus hMPV exprimant le gène P aviaire (rhMPV-Pa) a démontré une atténuation significative avec une diminution des titres viraux dans tout l'arbre respiratoire en modèle de hamster et une protection contre le hMPV, avec la production d'anticorps neutralisant en quantité équivalente à celle mesurée après une infection hMPV naturelle (**Tableau 4**) (299). Ce candidat est le seul des candidats vaccinaux hMPV atténués à avoir été évalué en essai clinique de Phase I chez des adultes et des enfants (NCT01255410, programme de recherche du *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*). Cependant, il est apparu que ce virus rhPMV-Pa était trop atténué chez les enfants séro-négatifs avec une répllication insuffisante pour permettre une immunisation efficace (399). Ainsi, cette étude souligne l'importance du choix de la modalité d'atténuation virale lors des étapes de développement de candidats et légitime l'évaluation d'autres types de candidats, tels que les virus  $\Delta$ SH ou  $\Delta$ G, dont l'atténuation semble moindre en modèle animal (174).

De manière intéressante, la vaccination à base de *Virus-Replicon-Particle* (VRP), est une approche parallèle à celles des virus vivants atténués et des VLPs. Ces pseudo-particules virales sont infectieuses et se répliquent au sein des cellules cible, sans être capables de générer de nouvelles particules virales du fait de la délétion d'un des gènes structuraux. Celui-ci est alors apporté en complément dans le système de production des VRPs (231). Dans le cas de la vaccination hMPV, l'alphavirus de l'encéphalite équine a ainsi été utilisé comme vecteur d'expression de la protéine F du hMPV. Les immunisations en modèles de souris et de rats des cotonniers, et plus récemment en primates non humains, ont montré de bons résultats de protection après un challenge infectieux, avec la production d'anticorps neutralisants sériques, ainsi que d'IgA dans les sécrétions muco-sales pulmonaires (**Tableau 4**) (231, 442).

Bien que plusieurs stratégies d'atténuation prometteuses aient été menées ces seize dernières années, peu de candidats vaccins ont atteint une évaluation en modèle de primates non humains et/ou en essais cliniques. Les candidats vaccin atténués hMPV doivent en effet idéalement présenter les caractéristiques suivantes : (i) une immunogénicité optimale tout en conservant (ii) une atténuation virale mesurée et (iii) une stabilité des antigènes et de la préparation vaccinale. En intégrant les connaissances récentes sur le virus, ainsi que les différentes approches d'atténuations (**Tableau 4**), il serait donc intéressant et utile de ré-évaluer les premiers candidats vaccins créés, comme suggéré par Karron et *al.* à la suite de l'échec du premier test clinique d'un vaccin hMPV (399), et d'en tester différentes constructions optimisées. De plus, grâce à la génétique inverse, la construction de vaccins atténués plurivalents pourrait constituer une piste d'amélioration significative pour les vaccins ciblant les Pneumovirus. Un vaccin bivalent hMPV/hRSV a par exemple, été mis au point avec l'introduction d'épitope de la F de hRSV en place d'épitopes de la protéine F du hMPV. Cependant, ce candidat vaccinal n'a induit la production d'anticorps dirigés uniquement contre le virus hMPV (443). Bien qu'innovante, c'est une stratégie qui nécessite encore de nombreux efforts de développement et une meilleure connaissance des épitopes viraux.

En conclusion, les approches de vaccins vivants atténués sont privilégiées pour la vaccination pédiatrique à la différence de celles des vaccins sous-unitaires ou à base de pseudo-particules virales, qui sont plutôt adaptées à une immunisation maternelle et des personnes âgées (402, 406). Les vaccins vivants atténués présentent de nombreux avantages car ils peuvent être administrés par voie intranasale et mimer la voie d'entrée naturelle des virus sauvages, induisant ainsi une réponse immunitaire assez similaire de celle physiologique à une infection hMPV. De plus, c'est une stratégie qui n'a jamais été décrite comme associée à une réaction inflammatoire exagérée (telle qu'observée avec les vaccins inactivés), et qui ne nécessite par l'ajout d'adjuvants. Néanmoins, une meilleure caractérisation et une optimisation de ces candidats vaccinaux hMPV vivants atténués restent nécessaires pour la mise en place de nouveaux essais cliniques chez l'Homme.



# PARTIE 2 : OBJECTIFS DE RECHERCHE ET RÉSULTATS

## 1. Objectifs et planning de recherche

Globalement, la biologie du hMPV présente encore de nombreuses zones d'ombre et relativement peu d'équipes de recherche s'intéressent à l'étude de ce virus, notamment du fait de sa découverte relativement récente (2001) et de ses difficultés de culture et de production *in vitro*. Parmi ces équipes, celle du Dr. Boivin s'investit depuis 2001 dans l'étude des mécanismes de virulence du hMPV et le développement de stratégies thérapeutiques et vaccinales. Rejointe en 2011 par l'équipe du Dr Manuel Rosa-Calatrava, une partie des travaux menés s'est inscrite dans une perspective de développement et d'optimisation de candidats vaccinaux contre les virus hMPV, et c'est dans ce contexte collaboratif que je me suis intéressée en particulier à deux thématiques de recherche durant mon doctorat :

- **Projet 1.** L'identification des acides aminés déterminant les propriétés fusogéniques de la protéine F du hMPV et associés à différents phénotypes *in vitro* (résultats décrits dans cette partie, **article 1**) ;

- **Projet 2.** L'évaluation de la contribution des protéines G et SH dans la pathogénicité des virus hMPV, et ceci dépendamment de la souche virale, dans la perspective de développer et de proposer de nouveaux candidats vaccinaux vivants atténués (résultats décrits dans cette partie, **manuscrit 1**).

Pour atteindre ces objectifs, mon travail de thèse en cotutelle s'est organisé selon le planning présenté en **Figure 14**, et s'est appuyé sur le transfert croisé de technologies et d'outils entre les deux laboratoires partenaires.

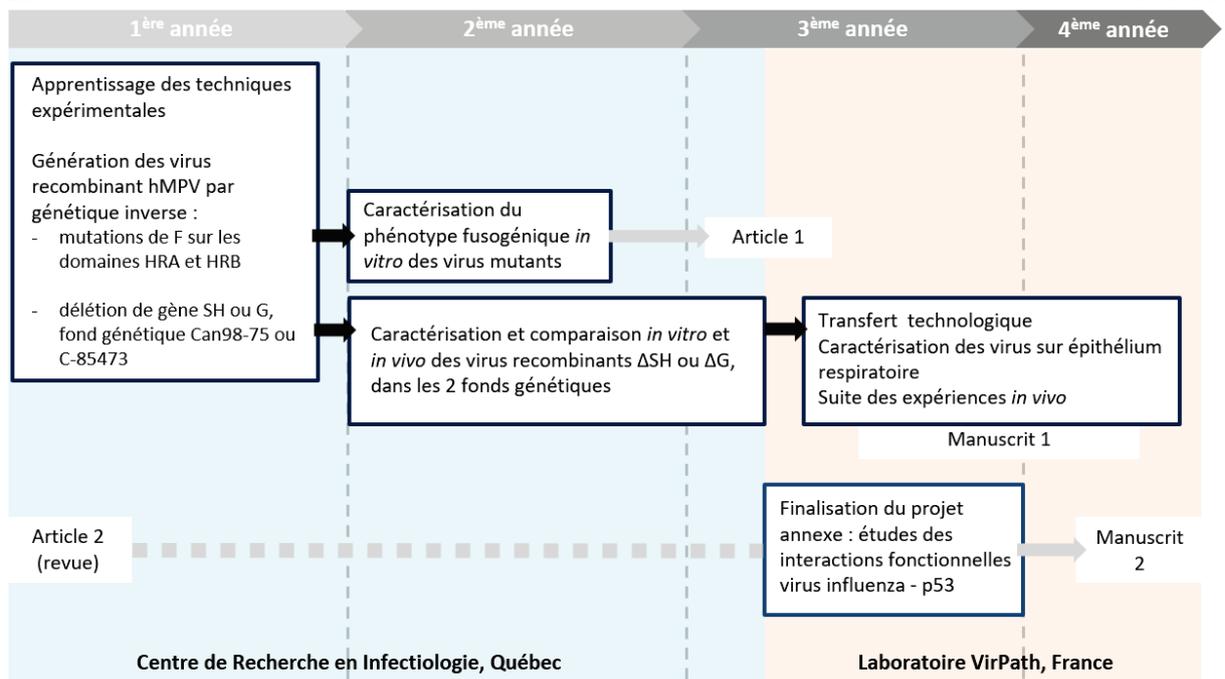


Figure 14 – Planning de mon travail de recherche doctorale.

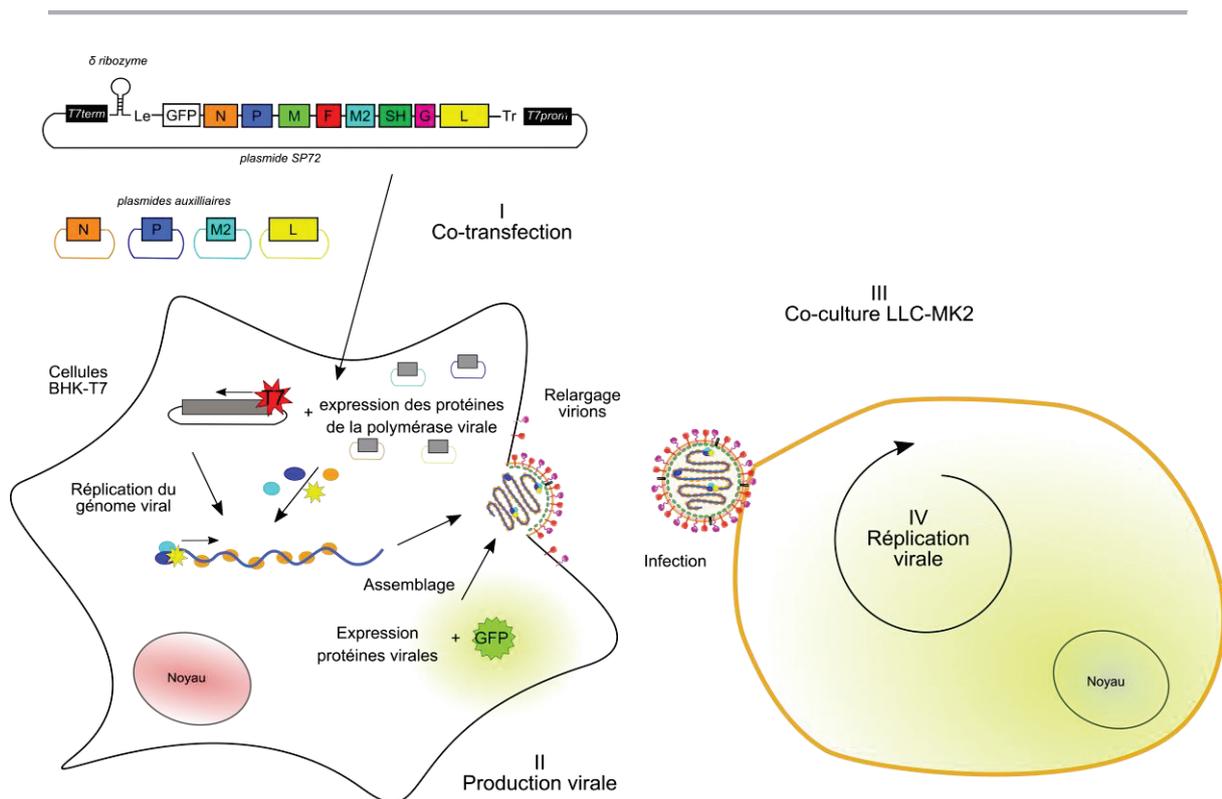
## 2. Le système de génétique inverse hMPV

D'un point de vue technologique, mes deux axes de recherche se sont basés principalement sur l'exploitation et la modification des systèmes de génétique inverse des souches virales hMPV B2/CAN98-75 et A1/C-85473, tels que :

- la substitution par mutagenèse dirigée de cinq acides aminés dans le domaine HRA et/ou de deux aa dans le domaine HRB de la souche CAN98-75 (mutations inspirées de la séquence protéique de la F du virus A1/C-85473) (**Projet 1**) ;
- la délétion des gènes G ou SH par amplification PCR, dans les deux fonds génétiques viraux B2/CAN98-75 et A1/C-85473 (**Projet 2**).

Le premier système de génétique inverse du virus hMPV a été décrit en 2004 (32, 429). Ce système est constitué de cinq éléments plasmidiques : un plasmide codant l'antigénome du virus hMPV et 4 plasmides « satellite », codant pour les protéines virales de la machinerie de transcription (L, P, N et M2-1) (**Figure 15**). Le principe de cette technologie, qui permet la production de virus hMPV recombinants, repose sur l'utilisation d'une lignée cellulaire de rein de hamster (BHK-21) modifiée

pour exprimer constitutivement l'ARN polymérase du bactériophage T7 (T7pol) (cellules BHK-T7 ou BSR-T7/5) (444). Ainsi, après co-transfection du plasmide antigénomique hMPV et des quatre plasmides « satellite », un brin d'ARN correspondant au brin génomique viral (brin d'ARN négatif), est transcrit par la T7pol à partir de son promoteur, T7prom (**Figure 15**) (32, 429). Les quatre protéines impliquées dans la transcription virale du hMPV sont également exprimées par les cellules transfectées pour constituer un complexe RdRP actif. Cette polymérase virale fonctionnelle transcrit ainsi l'ARN génomique en ARNm viral puis le réplique en de nouvelles molécules d'ARN génomique viral, *via* la transcription de brins matrice. La traduction et l'assemblage des protéines virales avec l'ARN génomique permettent ainsi le bourgeonnement de particules infectieuses hMPV à partir de la membrane cytoplasmique des cellules BHK-T7 transfectées. Ensuite, l'amplification des virus recombinants est permise grâce à l'ajout en co-culture de cellules LLC-MK2 (ATCC CCL-7), permissives à l'infection (**Figure 15**).



**Figure 15 - Génération de virus recombinants hMPV par génétique inverse.** (I) co-transfection du plasmide génomique ainsi que de 4 plasmides « satellite » exprimant les protéines du complexe RdRP (N, L, P, M2-1) dans les cellules BHK-T7 ; (II) production des virus recombinants par les cellules BHK-T7 ; (III) mise en co-culture des cellules BHK-T7 avec des cellules LLC-MK2 ; (IV) infection des cellules LLC-MK2 puis réplique virale.

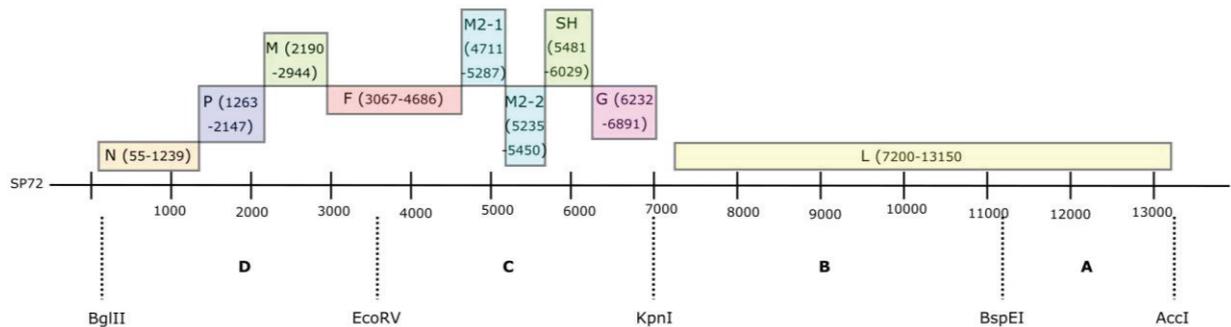
Bien que très puissante, il faut noter que cette technologie de génétique inverse présente un certain nombre de limitations qu'il faut prendre en compte : (i) l'introduction de modifications génomiques peut être trop délétère pour le virus. Par exemple, certaines mutations de la protéine F décrites dans la littérature et listées dans le **Tableau 5 (Partie 2, 3.1.1)**, ainsi que des mutations hydrophobes que nous avons essayé d'introduire dans les domaines HRA et HRB, ne permettent pas de générer de virus recombinants viables ; (ii) la présence dans le génome viral de nombreuses séquences répétées, et/ou riches en nucléotides A et T, constituent également des éléments de complexité dans la manipulation et l'amplification des génomes ; (iii) la taille du génome du hMPV est limitée, même si celle-ci n'a pas été clairement établie. Ainsi, l'introduction de gènes d'intérêt supplémentaires rend non seulement difficile la manipulation du plasmide génomique, mais peut également limiter, voire rendre impossible, la réplication de virus recombinants.

Basé sur la méthodologie de Biacchesi et *al.* (429), l'équipe du Dr Boivin a cloné séparément les ORFs des gènes L, P, N ou M2-1, amplifiés à partir du génome du virus B2/CAN98-75, dans des vecteurs plasmidiques pT<sub>N</sub>T (Promega) pour générer les quatre plasmides « satellite ». Avec ces plasmides, l'expression des quatre protéines de la machinerie de polymérase virale est dirigée par la polymérase du bactériophage T7. D'autre part, les antigénomes des deux souches B2/CAN98-75 et A1/C-85473 ont été clonés dans un plasmide pSP72 (Promega) dans lequel la cassette T7 Terminateur -  $\delta$  ribozyme - T7 Promoteur a été préalablement insérée. Le clonage du génome viral dans cette cassette a été réalisé par l'assemblage (par la méthode Gibson, New England Biolabs (445)) de 3 à 4 portions du génome viral (nommées de A à D en **Figure 16**), encadrées par différents sites unique de restriction, tel que décrit dans la publication de Aerts et *al.* (2). Chaque portion de génome avait précédemment été clonée dans un plasmide intermédiaire pJET (Thermo Scientific), nécessitant plusieurs étapes pour le clonage du génome du virus A1/C-85473 (portions A1, A2, A3 et C1, C2, C3). Le détail des fragments intermédiaires du clonage est représenté en **Figure 16** (2). Le gène de la protéine fluorescente GFP a ensuite été ajouté (par l'insertion de sites unique de restriction) à l'extrémité 3' du génome, entre la séquence *Leader* et le premier gène N (**Figure 16**) (2). Les séquences *Gene Start* du gène N et *Gene End* du gène F ont été ajoutées de part et d'autre du gène GFP pour permettre sa transcription par la polymérase virale. Étant donné la difficulté de détection et de production du virus hMPV, la présence de ce gène rapporteur est très

utile pour aider au suivi de l'infection, notamment dans les premières étapes du processus de « sauvetage » des virus hMPV recombinants.

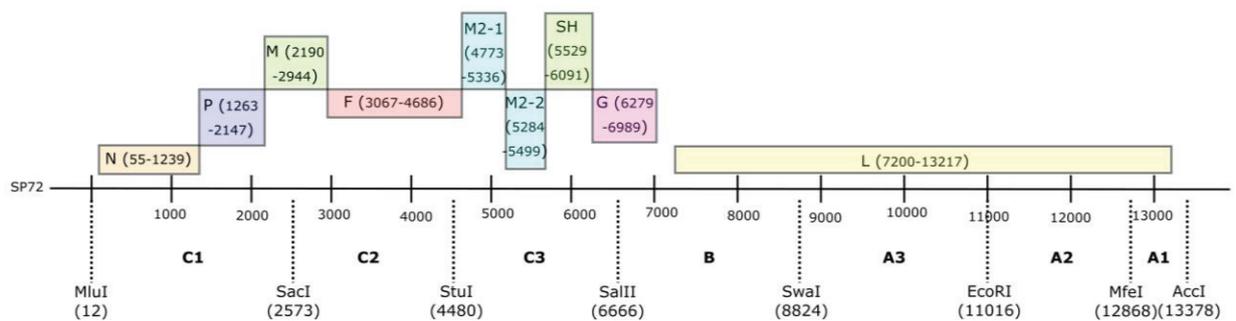
(a)

**HMPV CAN98-75**



(b)

**HMPV C-85473**



**Figure 16 – Schémas de la construction des plasmides antigénomiques hMPV** (souches B2/CAN98-75 et A1/C-85473). Les plasmides antigénomiques hMPV B2/CAN98-75 et A1/C-85473 ont été assemblés par la méthode Gibson, à partir des portions de génome flanquées de sites de restriction, selon le schéma présenté. Chaque plasmide antigénomique s'organise selon l'ordre suivant : séquence terminatrice de l'ARN polymérase du phage T7 (*T7term*) ; séquence delta( $\delta$ )-ribozyme du virus HDV (structure qui va provoquer le décrochage de la polymérase) ; séquence *Leader* du hMPV, qui marque le début du génome viral hMPV ; séquence codante de la protéine GFP; séquence complète de l'antigénome du hMPV, du gène N au gène L ; séquence *Trailer* du virus hMPV en fin de génome ; séquence promotrice de la transcription par l'ARN polymérase du phage T7 (*T7prom*). Figure adaptée de Aerts et *al.*, 2015

## 3. Résultats

### 3.1 Étude de la protéine de fusion du hMPV

#### 3.1.1 Introduction

Plusieurs publications ont rapporté les effets de mutations ponctuelles dans la protéine F sur sa fonctionnalité et en particulier sur le phénotype viral fusogénique *in vitro*, associées ou non à des effets cytopathiques variables et/ou responsables de la viabilité des virus hMPV recombinants générés. En revanche, l'impact des propriétés fusogéniques du virus hMPV sur la pathogénicité virale *in vivo*, est toujours sujet à débat et reste à caractériser. Ces mutations ponctuelles de la protéine F décrites dans la littérature sont listées dans le **Tableau 5**.

L'équipe du Dr Guy Boivin s'est attachée à l'étude de deux souches virales hMPV, isolées à partir d'échantillons cliniques, et dont les phénotypes fusogéniques sont radicalement différents : le virus B2/CAN98-75 qui est peu ou pas fusogène et le virus A1/C-85473 qui présente un phénotype hyperfusogène *in vitro*. Nous avons pu démontrer, grâce à la construction par génétique inverse de virus hMPV chimériques, que cette différence de phénotype *in vitro* était dépendante de l'origine virale (B2/CAN98-75 ou A1/C-85473) de la protéine F (**Article 3 en Annexe**) (2). En modèle murin, il a été également observé que l'inversion des protéines F dans le fond génétique des deux souches en question, entraînait des modifications de réplication virale, de production de cytokines, d'effets histo-pathologiques et de pathogénicité, sans toutefois rétablir complètement le phénotype spécifique de la souche dont les protéines F étaient issues (2). Ainsi, bien que la pathogénicité du hMPV *in vivo* soit significativement affectée par l'origine de la protéine F, ces résultats ont démontré que d'autres déterminants viraux étaient très probablement impliqués.

**Tableau 5 – Liste des mutations de la protéine F du HMPV étudiées et leurs effets sur la fusogénicité et la pathogénèse virale**

Souches virales	Région	Mutation(s)	Effets <i>in vitro</i>	Dépendance au pH acide	Effets <i>in vivo</i>	Réf
A1/NL/1/00	F1	S101P	Clivage trypsine-indépendant	Non évalué	Aucun	(210)
	F1 Site RGD	R329 A/D	Fusion diminuée Mutation létale pour le virus	oui	-	(434)
		R329K	Atténuation		Atténuation	
		G330 A/S	Atténuation		-	
		D331R/E	Fusion augmentée		Inflammation réduite	
		D331A	Atténuation		Atténuation	
	F2 (N-gl)	N57E	Légère atténuation	Non évalué	Aucun	(446)
	F1 (N-gl)	N172E	Atténuation		Atténuation	
	F1-F2 (N-gl)	N57E-N172E				
	F1 (N-gl)	N353E	Mutation létale pour le virus		-	
B1/NL/1/99	F1	294-296-396-404 ENWP	Hyperfusogénicité	non	Non testé	(215) (447)
		294-296-396-404 GNWP / GKWP	Fusion très réduite	non		
294-296-396-404 GKRP / GKRN		Hyperfusogénicité	oui			
A1/NL/1/00		294-296-396-404 GKRN	Hyperfusogénicité	oui		
		294-296-396-404 ENWP	Hyperfusogénicité	non		
A2/CAN97-83	F2	E51 A/K	Fusion très réduite	non	Non testé	(448)
		D54A	Hyperfusogénicité	oui		
		E56A				
	HRA	K166A				
	F1	H435 R/K	Fusion réduite			
		H435 D/Q				

Une atténuation *in vitro* correspond à une capacité répliquative et/ou une taille des ECPs diminuées de manière significative. Une atténuation *in vivo* correspond à une diminution significative des titres viraux pulmonaires (modèle animal hamster uniquement dans les 2 études concernées).

Nomenclature selon le Code International des acides aminés.

N-gl = site de N-glycosylation

Dans la continuité de ce premier travail, nous avons cherché à identifier les déterminants des protéines F pouvant être responsables de ces différences de fusogénicité, par une analyse comparative des séquences entre les souches virales B2/CAN98-75 et A1/C-85473, par ailleurs homologues à 96%. Nous avons ainsi analysé ces séquences à la lumière des mutations rapportées dans la littérature comme affectant la fusogénicité des protéines F de hMPV (**Tableau 5**). Cette analyse ne nous a pas permis d'identifier de telles substitutions dans nos souches d'intérêt, d'autant plus que leurs phénotypes fusogéniques respectifs sont indépendants des variations de pH, à la différence de nombreuses des mutations décrites dans la littérature (**Tableau 5**).

Parallèlement, le laboratoire VirPath a également développé une expertise dans l'étude des protéines virales de fusion, en particulier les protéines F des Paramyxovirus hPIV-5 et hPIV-2 (449, 450). Par ingénierie de ces protéines, les Drs Olivier Terrier et Manuel Rosa-Calatrava ont ainsi identifié différents déterminants viraux qui confèrent (i) une activité de fusion autonome (les virus hPIV ont normalement besoin d'un co-facteur de fusion, la glycoprotéine HN) et (ii) un phénotype hyperfusogène aux protéines de fusion des virus hPIV-5 et hPIV-2 (449). Ces mutations d'hyperfusogénicité, en l'occurrence l'insertion d'acides aminés hydrophobes supplémentaires dans les régions *heptad repeat* A et B (HRA et HRB) de la protéine F du virus hPIV-5, ont permis de renforcer les interactions entre ces domaines et ainsi favoriser le processus de fusion membranaire.

Dans ce contexte, une collaboration a été mise en place entre les équipes du Dr Boivin et du Dr Manuel Rosa-Calatrava avec l'objectif d'étudier l'impact de telles mutations dans les domaines HRA et HRB (similaires à celles étudiées sur les virus hPIV) de la protéine F du hMPV, pour ainsi contribuer (i) à une meilleure compréhension des phénotypes divergents de nos souches cliniques d'intérêt (B2/CAN98-75 ou A1/C-85473) et (ii) au développement potentiel de stratégies antivirale et/ou vaccinale basées sur la protéine F. En première approche (initiée par un doctorant m'ayant précédé), la stratégie de remplacement d'acides aminés des domaines HRA ou HRB par des résidus hydrophobes a ainsi été privilégiée. Bien que les résultats aient été prometteurs en conditions d'expression transitoire cellulaire des protéines F modifiées, il ne m'a pas été possible de générer par génétique inverse de

virus recombinants hMPV viables portant ces mutations hyperfusogéniques et ce, malgré plusieurs tentatives (résultats non publiés).

À partir de ce constat, mon objectif de recherche a été recentré sur la caractérisation des résidus différentiels entre les souches cliniques B2/CAN98-75 et A1/C-85473, avec un focus particulier sur les domaines HRA et HRB, et d'en étudier l'impact éventuel sur le phénotype viral fusogénique *in vitro*.

Basé sur les techniques de mutagenèse dirigée et de génétique inverse, ce projet a nécessité la mise au point de tests d'évaluation de la fusion cellulaire, induite par la protéine F des virus hMPV recombinants. Outre le long processus de production de ces virus, ce projet a constitué un vrai défi du fait du peu d'outils disponibles pour l'étude de la protéine F du hMPV en condition d'infection.

### 3.1.2 Article 1

Ce chapitre présente la publication intitulée « **Mutations in the fusion protein heptad repeat domains of human metapneumovirus impact on the formation of syncytia** », dont les auteurs sont Julia Dubois, Marie-Hélène Cavanagh, Olivier Terrier, Marie-Ève Hamelin, Bruno Lina, Rong Shi, Manuel Rosa-Calatrava et Guy Boivin. Cet article a été publié le 14 Juin 2017 dans le journal international à comité de lecture en langue anglaise Journal of General Virology. DOI : 10.1099/jgv.0.000796.

#### **Résumé**

Le métapneumovirus humain (hMPV) est un agent étiologique important des infections respiratoires virales. Le mécanisme par lequel sa protéine de fusion F est responsable de la variété d'effets cytopathiques *in vitro* reste non élucidé à ce jour. Dans cette étude, nous avons aligné les séquences des protéines F de deux souches cliniques B2/CAN98-75 et A1/C-85473, dont les phénotypes, faiblement fusogénique et hyperfusogénique respectivement, ont été décrit dans une publication précédente (2). Nous avons ainsi identifié les résidus amino-acides divergents au niveau des domaines fonctionnels *heptad repeats* A et B (HRA et HRB). Par génétique inverse, nous avons ensuite généré des virus recombinants en insérant les mutations N135T-G139N-T143K-K166E-E167D dans le domaine HRA, et/ou K479R-N482S dans le domaine HRB, correspondant aux séquences du virus C-85473 interchangeées par mutagenèse dans le fond génétique du virus CAN98-75. Nous avons ainsi cherché à connaître l'impact de ces substitutions sur le phénotype et la fusogénicité des virus recombinants *in vitro*. Nous avons démontré que les 5 substitutions dans le domaine HRA augmentaient la fusogénicité du virus CAN98-75, en restaurant quasiment le phénotype du virus sauvage C-85473, alors que les substitutions générées dans le domaine HRB n'affectaient pas significativement la fusion cellulaire induite par l'infection. En conclusion, nos résultats soutiennent l'importance du domaine HRA pour la fusion amorcée par la protéine F du hMPV, nous avons identifié cinq résidus clés pour la formation de syncytia cellulaires, dont certains (K166E et/ou E167D) semblent contribuer particulièrement à l'instabilité de la forme pré-fusion, d'après notre modélisation *in silico*.

## Mutations in the fusion protein heptad repeat domains of human metapneumovirus impact on the formation of syncytia

Julia Dubois,<sup>1,2</sup> Marie-Hélène Cavanagh,<sup>1</sup> Olivier Terrier,<sup>2</sup> Marie-Ève Hamelin,<sup>1</sup> Bruno Lina,<sup>2,3</sup> Rong Shi,<sup>4,5</sup> Manuel Rosa-Calatrava<sup>2</sup> and Guy Boivin<sup>1,\*</sup>

### Abstract

Human metapneumovirus (HMPV) is an important cause of respiratory tract infections. The mechanism by which its fusion (F) protein is responsible for variable cytopathic effects *in vitro* remains unknown. We aligned the F sequences of the poorly fusogenic B2/CAN98-75 strain and the hyperfusogenic A1/C-85473 strain and identified divergent residues located in the two functional heptad repeats domains (HRA and HRB). We generated recombinant viruses by inserting the mutations N135T–G139N–T143K–K166E–E167D in HRA and/or K479R–N482S in HRB, corresponding to swapped sequences from C-85473, into CAN98-75 background and investigated their impact on *in vitro* phenotype and fusogenicity. We demonstrated that the five HRA mutations enhanced the fusogenicity of the recombinant rCAN98-75 virus, almost restoring the phenotype of the wild-type rC-85473 strain, whereas HRB substitutions alone had no significant effect on cell–cell fusion. Altogether, our results support the importance of the HRA domain for an HMPV-triggered fusion mechanism and identify key residues that modulate syncytium formation.

Human metapneumovirus (HMPV) is an important respiratory pathogen affecting children and immunocompromised and elderly individuals [1]. HMPV belongs to the *Pneumoviridae* family and is classified into two main lineages (A and B), each of which is divided into two or three sublineages (A1, A2a, A2b, B1 and B2) [2–6]. The clinical signs associated with HMPV are similar to those associated with another pneumovirus, the human respiratory syncytial virus (HRSV), ranging from mild respiratory problems to bronchiolitis and pneumonia, even though little is known about factors associated with disease severity [7–9]. There are currently no specific antiviral agents or vaccines approved for this pathogen, despite the fact that several promising strategies are under evaluation [10].

The HMPV fusion (F) protein is responsible for viral entry into host cells through an autonomous fusion mechanism [11, 12]. *In vitro*, the HMPV F protein also promotes the cell–cell fusion that results in variable cytopathic effects (CPE), from HRSV-like syncytia to focal cell rounding, depending on the HMPV strains [13]. As a class I viral

fusion protein, the function of HMPV F protein implies an important refolding from a trimeric metastable active pre-fusion form to an irreversible post-fusion conformation, which depends on the interaction between the two functional domains, heptad repeats A and B (HRA and HRB) [14, 15]. Indeed, starting from a spring-loaded structure in a globular head of pre-fusion form, the HRA refolds completely to interact with the HRB helix located in the rod-like stalk. The resulting six-helix bundle structure (6HB), which is characteristic of activated F protein in post-fusion conformation, leads to the formation of the fusion pore [11, 14]. We do not fully understand why some HMPV strains produce large syncytia *in vitro* whereas others do not and, more broadly, the role of HMPV F HR functional domains in the fusion mechanism is still poorly characterized compared to that of other class I viral fusion proteins.

We previously identified two HMPV strains (A1/C-85473 and B2/CAN98-75, GenBank accession numbers KM408076.1 and AY145289.1) that respectively induce or do not induce the formation of large syncytia, and we

Received 17 February 2017; Accepted 30 March 2017

**Author affiliations:** <sup>1</sup>Centre de Recherche en Infectiologie de the Centre Hospitalier Universitaire de Québec and Université Laval, Québec, Canada; <sup>2</sup>Laboratoire de Virologie et Pathologie Humaine – VirPath Team, Centre International de Recherche en Infectiologie CIRI, Inserm U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France; <sup>3</sup>Hospices Civils de Lyon, Centre National de Référence Virus Influenzae France Sud, Laboratoire de Virologie, Groupement Hospitalier Nord, F-69317, Lyon, France; <sup>4</sup>Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS), Université Laval, Pavillon Charles-Eugène-Marchand, Québec, Canada; <sup>5</sup>Département de Biochimie, de Microbiologie et de Bio-informatique, PROTEO, Université Laval, Québec, Canada.

\*Correspondence: Guy Boivin, guy.boivin@crchul.ulaval.ca

**Keywords:** human metapneumovirus; fusion protein; heptad repeat; cell fusion.

**Abbreviations:** CPE, cytopathic effects; HRA, heptad repeat A; HRB, heptad repeat B; HMPV, human metapneumovirus; HRSV, human respiratory syncytial virus.

further demonstrated by generating chimeric recombinant viruses that swapping of the F genes was sufficient to alter or restore the respective fusogenic phenotype of these two strains *in vitro* [16]. In addition, it has already been reported in several studies on paramyxoviruses and pneumoviruses, including ours, that the energy threshold required to trigger conformational changes of fusion proteins depends on key residues within HR domains and their proximal regions, especially those interacting with the F2 subunit in the pre-fusion conformation or interacting in the 6HB in the post-fusion conformation [17, 18]. In consequence, few mutations could impact greatly on F fusogenic capacity [19, 20]. Some amino acids in the F2 subunit (residues 51, 54 and 56) or between the two HR domains (residues 294, 296, 396, 404 and 435) have been reported to influence HMPV fusogenicity, altering electrostatic interactions or histidine protonation, but this could not explain the divergent fusogenic phenotype of our two HMPV strains CAN98-75 and C-85473, as their respective sequences are identical at those positions [18, 20–22].

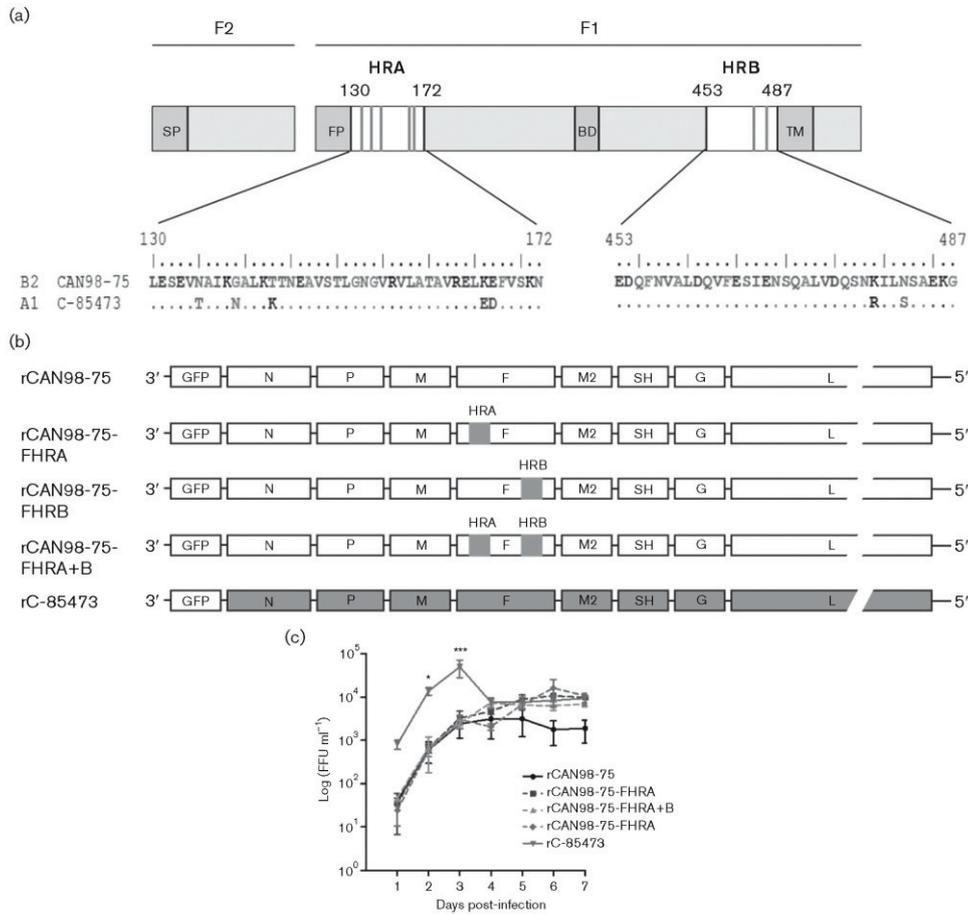
In the current study, we identified a few divergent amino acids in the HR regions between the two viruses B2/CAN98-75 and A1/C-85473 (Fig. 1a) and aimed to characterize their implication in the HMPV fusogenic phenotype. The overall amino acid sequence identity between HMPV members of the A and B lineages is greater than 90%, with identities of 90.7 and 92.9% for the HRA and HRB regions, respectively [23–25]. Of the 29 amino acid differences in the F protein sequence between these two HMPV strains, five substitutions are located in the HRA and two are located in the HRB (Fig. 1a). Consequently, by reverse genetics we generated three recombinant HMPV viruses based on the CAN98-75 viral background, expressing constitutively the GFP protein, in which the HRA or/and HRB domains of the F gene were mutated according to the sequence of the highly fusogenic C-85473 strain (Fig. 1b). All recombinant viruses were successfully generated by site-directed mutagenesis of rCAN98-75 full-length genomic plasmids and recovered as previously described by Aerts *et al.* [16]. Three constructions were obtained: rCAN98-75-FHRA with the mutations N135T–G139N–T143K–K166E–E167D, rCAN98-75-FHRB with the mutations K479R–N482S and rCAN98-75-FHRA+B with all seven of these mutations.

Firstly, we investigated the *in vitro* replicative capacity of all recombinant HMPV viruses in LLC-MK2 cells (ATCC CCL-7) as previously described [16]. All end-point supernatants were titrated in fluorescent focus units (f.f.u.) ml<sup>-1</sup> using GFP expression as an infection reporter, similarly to Meng and Hotard [26]. The recombinant viruses rCAN98-75-FHRA, rCAN98-75-FHRB and rCAN98-75-FHRA+B replicated similarly to the wild-type (WT) rCAN98-75 virus, as titres increased at the same rate until day 4 but then peaked at a higher titre on day 6 ( $1 \times 10^4$ ,  $1.6 \times 10^4$  and  $6 \times 10^3$  f.f.u. ml<sup>-1</sup>, respectively), whereas the WT rCAN98-75 reached a plateau at  $2.5 \times 10^3$  f.f.u. ml<sup>-1</sup> (Fig. 1c). These results suggest that the modifications of the HRA and/or

HRB domains in CAN98-75 background affect the viral replicative capacity. On the other hand, the WT rC-85473 replicated rapidly at higher levels on days 2 and 3 post-infection [peak titre of  $4.9 \times 10^4$  f.f.u. ml<sup>-1</sup> at day 3,  $P < 0.001$  (Fig. 1c)], followed by a titre drop-off at day 4 as the cell monolayer was completely destroyed, in accordance with our previous published results [16].

We then investigated the impact of the sets of mutations on the *in vitro* fusogenicity by infecting LLC-MK2 cells at an m.o.i. of 1 with each HMPV recombinant virus. After a 1.5 h incubation at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, the infection medium was replaced by semi-solid medium (OptiMEM, 0.8% methylcellulose and 0.0002% trypsin). At day 3 or 4 post-infection, before infected cells completely detached, cells were fixed in paraformaldehyde, washed and permeabilized with 0.1% Triton X-100. Nuclei were stained with DAPI and representative pictures were taken using fluorescent microscopy (Fig. 2a). The rCAN98-75-FHRA and rCAN98-75-FHRA+B viruses differed visibly from their respective WT counterparts as they induced large syncytia formation at day 4. In contrast, the rCAN98-75-FHRB virus induced more rounding cells as CPE than syncytia on day 4 (Fig. 2a). On the other hand, the hyperfusogenic WT rC-85473 virus rapidly induced the fusion of infected cells, resulting in earlier formation of massive syncytia on day 3 (Fig. 2a).

Additionally, the cell–cell fusion extent was quantified by counting the number of nuclei per infected cells. LLC-MK2 cells were infected with each HMPV recombinant virus at an m.o.i. of 0.1. On day 3 post-infection, when CPE were visible and before cells began to detach, the cells were fixed and DAPI-stained in order to count at least  $10^3$  nuclei included in infected cells. The mean number of nuclei per cell was  $2.5 \pm 0.15$  for the WT rCAN98-75 strain and  $6.9 \pm 0.9$  for the WT rC-85473 virus, whereas it was  $4.1 \pm 0.48$ ,  $3.9 \pm 0.39$  and  $2.2 \pm 0.16$  for rCAN98-75-HRA, rCAN98-75-HRA+B and rCAN98-75-FHRB, respectively, confirming that mutations in the HRA region, combined or not combined with mutations in HRB, enhanced the fusogenicity of CAN98-75, while HRB mutations alone had no effect on cell–cell fusion (Fig. 2b). We also sorted infected cells by syncytium categories (1; 2–10; 11–25; 26–50 and more than 50 nuclei/syncytium). Similarly to rC-85473 (58.3%), the percentage of mono-nucleated cells was reduced in rCAN98-75-HRA (58.5%) and rCAN98-75-HRA+B (56.8%) compared to WT rCAN98-75 (88%) (Fig. 2c). Accordingly, syncytia composed of 26 to 50 nuclei and those including more than 50 nuclei were also more abundant with rCAN98-75-HRA (3.8 and 0.4%, respectively) and rCAN98-75-HRA+B (1.4 and 1.2%, respectively) viruses, although they did not reach the extent of the WT rC-85473 strain, with 5.4 and 4.0%, respectively (Fig. 2c). In comparison, rCAN98-75-HRB exhibited a similar profile to WT rCAN98-75, with predominantly mono-nucleated cells (90.2%) and small syncytia of 2–10 nuclei (8.2%) (Fig. 2c). We report here that the small number of modifications in

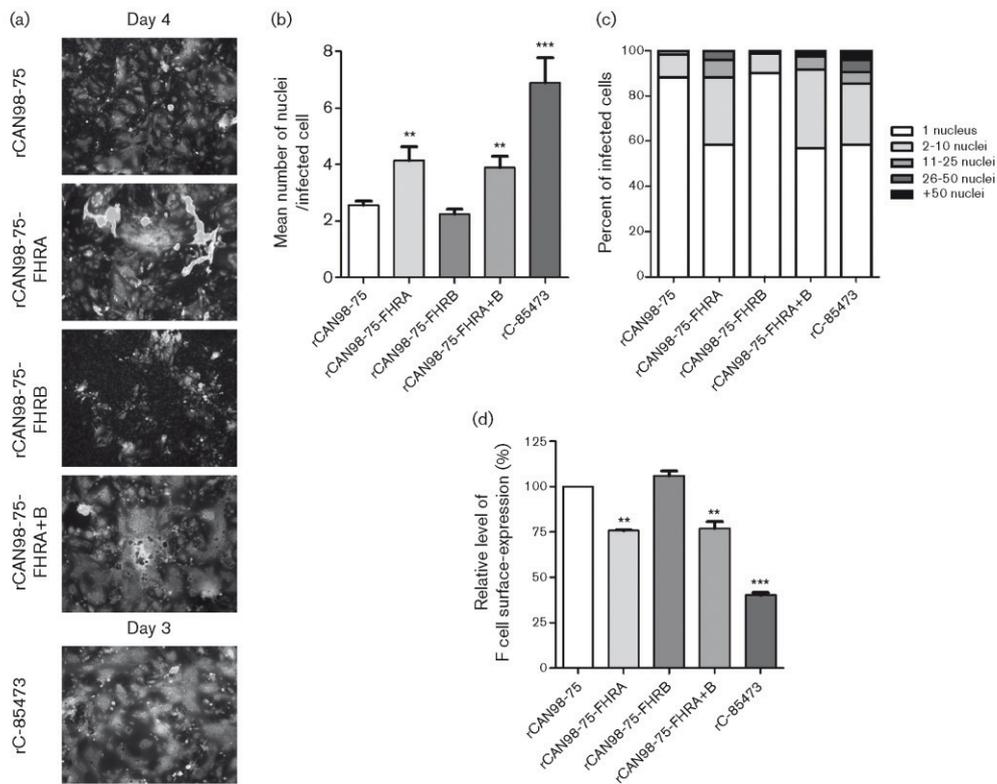


**Fig. 1.** Construction of recombinant HMPV viruses and characterization. (a) Schematic representation of HMPV F protein and amino acid substitutions within heptad repeat domains A (HRA) and B (HRB). HRA and HRB were predicted with LearnCoil-VMF online (<http://groups.csail.mit.edu/cb/learncoil-vmf/>) [32] and amino acid sequences of HMPV B2/CAN98-75 and A1/C-85473 were aligned using the ClustalW algorithm of BioEdit software v7.2.5. SP, signal peptide; FP, fusion peptide; TM, transmembrane domain. (b) Schematic genome representation of the five recombinant-GFP-expressing HMPV viruses used in this study: rCAN98-75 and rC-85473 are the wild-type strains; rCAN98-75-FHRA and rCAN98-75-FHRB represent the chimeric CAN98-75 strain in which the HR domains of the F gene have been replaced by those of C-85473 HRA (N135T–G139N–T143K–K166E–E167R) or HRB (K479R–N482S) domains, respectively. The rCAN98-75-FHRA+B strain represents the recombinant virus with both HR domains from C-85473. (c) *In vitro* growth of recombinant HMPV strains. LLC-MK2 monolayers in 24 well plates were infected with recombinant HMPV strains (rCAN98-75, rCAN98-75-FHRA, rCAN98-75-FHRB, rCAN98-75-FHRA+B or rC-85473) at an m.o.i. of 0.01. After 1.5 h of adsorption, inocula were replaced by fresh infection medium. Supernatants were harvested in triplicate on a daily basis for 7 days, frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ , sonicated and titrated in f.f.u. ml<sup>-1</sup> onto LLC-MK2 cells. Statistical analyses were performed to compare all viruses to rCAN98-75 using repeated measure two-way ANOVA; \*,  $P < 0.05$  and \*\*\*,  $P < 0.001$ .

the HRA domain restores, to a large extent, the fusogenic capacity of the syncytium-producing strain C-85473, whereas the two mutated residues in HRB do not contribute substantially to the syncytium formation.

Finally, we investigated the impact of these mutations on F expression at the cell surface of infected LLC-MK2 cells.

After 16 h of infection, cells were harvested, washed and blocked before immunostaining with monoclonal F-antibody (HMPV24, Bio-Rad Antibodies) previously labelled using the Alexa Fluor 647 Antibody Labeling Kit (ThermoFisher Scientific), following the manufacturer's instructions. The mean fluorescence intensities of GFP, constitutively expressed by recombinant viruses, and the



**Fig. 2.** *In vitro* fusogenic phenotype and F cell surface expression differ between recombinant HMPV strains. (a) LLC-MK2 monolayers in 24 well plates were infected with rCAN98-75, rCAN98-75-FHRA, rCAN98-75-FHRB, rCAN98-75-FHRA+B or rC-85473 at an m.o.i. of 1. The infection medium was removed after 1.5 h of adsorption and changed for semi-solid medium before incubation at 37 °C. On day 3 or 4 post-infection for rC-85473 or rCAN98-75 viruses, respectively, cells were fixed and DAPI-stained. Representative images of CPE caused by each virus were taken using fluorescent microscopy (10x magnification). (b, c) Quantification of nuclei per infected cells was performed on LLC-MK2 cells infected with rCAN98-75, rCAN98-75-FHRA, rCAN98-75-FHRB, rCAN98-75-FHRA+B or rC-85473 at an m.o.i. of 0.1, as done previously. On day 3 post-infection, cells were fixed and stained with DAPI. Random pictures were taken using fluorescent microscopy (20x magnification) in three different wells and the number of nuclei per GFP-expressing cell was counted. For each virus, the mean number of nuclei per rHMPV-infected cell was calculated ( $>10^3$  total number of nuclei) (b) and the infected cells were sorted in terms of number of nuclei by categories: 1, 2–10, 11–25, 26–50 and more than 50 nuclei per cell (c). (d) Relative levels of F expressed at the surface of HMPV-infected LLC-MK2 cells were measured by flow cytometry after immunostaining with anti-F monoclonal AlexaFluor647-labelled antibody. Ratios of mean fluorescence for A647 and GFP (constitutively expressed by infected cells) were calculated after 16 h of infection for each rHMPV virus and normalized to the expression level of WT rCAN98-75 F protein. The mean fluorescence intensity was measured in duplicate on more than 500 cells. Statistical analyses were performed to compare all viruses to rCAN98-75 using one-way ANOVA and Dunnett's post-test. \*\*,  $P < 0.01$  and \*\*\*,  $P < 0.001$ .

AlexaFluor647 of the infected cells were measured by flow cytometry using a Becton Dickinson FACSCanto II analyzer with FACSDiva software. The data were analyzed using FlowJo software (Tree Star, Inc.) and we calculated the A647/GFP fluorescence intensity ratios for each recombinant virus, normalized to the WT rCAN98-75 values. Our results showed that HMPV F protein was significantly underexpressed at the cell surface for rCAN98-75-FHRA and rCAN98-75-FHRA+B viruses, with relative expression

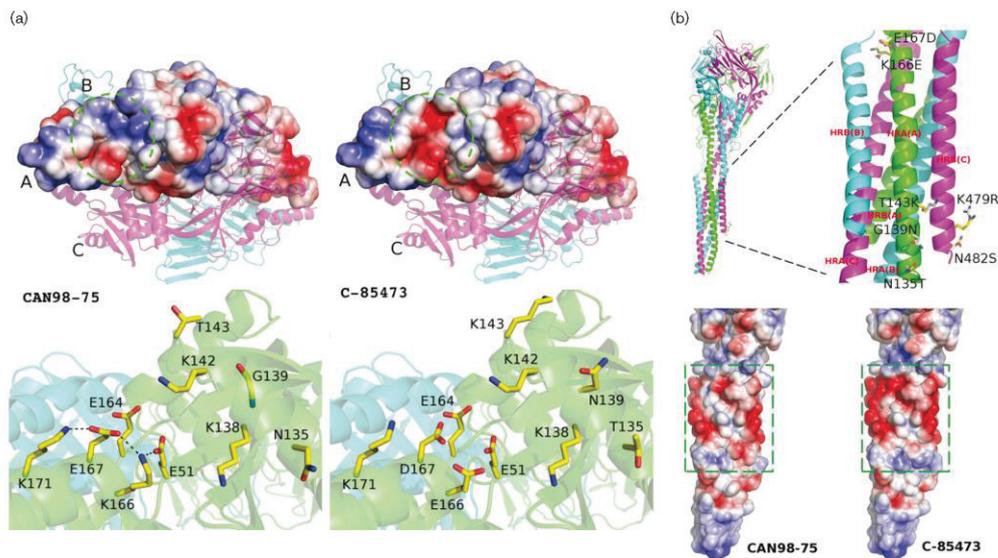
of  $0.76 \pm 0.01$  ( $P < 0.01$ ) and  $0.76 \pm 0.05$  ( $P < 0.01$ ), respectively. In contrast, rCAN98-75-FHRB had similar F expression ( $1.05 \pm 0.03$ ) compared to WT rCAN98-75 (Fig. 2d). On the other hand, the F protein of the hyperfusogenic rC-85473 virus was also underexpressed compared to rCAN98-75 ( $0.40 \pm 0.02$ ,  $P < 0.001$ ) (Fig. 2d), even though it had a better replicative capacity (Fig. 1c), highlighting the importance of other viral proteins in HMPV replication and pathogenesis. Considering this, the underexpression of the F protein at

the cell surface could be the result of protein destabilization induced by the substitutions in the HRA domain, leading to improper folding and inefficient export of the HMPV pre-fusion F to the cell membrane. Another explanation for the poor cell surface expression of the fusogenic viruses is the possibility that the antibody we used does not recognize the different forms of F (pre- and post-fusion) equally.

Altogether, our results suggest that one or a combination of several amino acids among the five residues 135, 139, 143, 166 and 167 in the HRA domain could have a critical role in HMPV F structure to facilitate the transition from pre- to post-fusion conformation and promote the fusogenic *in vitro* phenotype. Indeed, the HRA region undergoes a drastic structural rearrangement during the fusion process and it is probable that slight perturbations in the HRA domain could have important consequences for overall protein stabilization, as has already been demonstrated for other paramyxoviruses [12, 17, 18, 27]. To better understand the impact of the HRA mutations, we built homology models for both pre-fusion and post-fusion forms of HMPV F proteins (CAN98-75 and C-85473) through the SWISS-

MODEL workspace (<https://swissmodel.expasy.org>) [28] using human RSV F protein (PDB 5C69) as the template for the pre-fusion form or slightly modifying the crystal structure of the recently published HMPV F protein post-fusion conformation (PDB 5L1X) [29]. The electrostatic potential of the protein surface was analysed with the aid of the APBS tools in PyMOL.

In pre-fusion form, the inspection of the HRA local environment indicated that this region is likely less stable in C-85473 compared to in CAN98-75 (Fig. 3a). Indeed, the residue K166 neutralizes the negative charges E51 and E167 via salt-bridge interactions in CAN98-75, whereas these stabilizing interactions are lost in C-85473 with the introduction of E166 and D167. This results in a cluster of four negatively charged residues (E51, E164, E166 and D167) in this small patch, which is very likely the major driving force to destabilize the pre-fusion form (Fig. 3a). Interestingly, one previous report also demonstrated the importance of charged residue clusters in the case of RSV F fusogenicity. Indeed, the change of residue 66 in proximity to positively charged R30, K65, K68, K80 and K87 led to a positive fusogenicity,



**Fig. 3.** Model of HMPV F protein. The trimeric models were built through the SWISS-MODEL workspace and the DeepView project mode using PDB 5C69 and PDB 5L1X for the pre- and post-fusion forms, respectively. (a) The pre-fusion form of HMPV F. The trimer of F is shown in the top panel, whereas the residues discussed in the text are shown in the bottom panel. Subunit A is displayed as a surface representation with its electrostatic potential shown (calculated through APBS in PyMOL). The red surface represents negatively charged residues, while the blue is for positive ones. Subunits B (coloured in cyan) and C (coloured in magenta) are shown as cartoons. The patch discussed in the text is indicated by the green dotted circle. The salt-bridge interactions are represented by black dotted lines in the bottom panel. The relevant residues are shown in stick mode and subunit A (in green) is displayed in a cartoon. (b) The post-fusion form of HMPV F. The overall trimeric structure and the six-helix bundle are shown in a cartoon (top panel). The residues discussed in the text are labelled and shown in stick. The residue code before the number is for CAN98-75, whereas the one after is for C-85473. The electrostatic potential of the helix bundle is shown in the bottom panel. The region represented by the green dashed rectangle indicates increased hydrophilicity for C-85473.

whereas a change to a negative-residue Glu induced small syncytia formation [30]. These results, in addition to ours, underline the impact of amino acid charges on the triggering of fusion protein conformational rearrangement and their consecutive effect on fusogenic activity. Therefore, it would be interesting to investigate the influence of non-polar or positively charged residues at position 166 or 167 in HMPV F protein to have a better understanding of the interactions triggering HMPV fusion. Regarding HRA residue conservation between HMPV subtypes, it is interesting to note that residue K166 is highly conserved in all HMPV strains except for 2 of the 742 HMPV F sequences available on Virus Pathogen Resource (ViPR, <https://www.viprbrc.org>), including the highly fusogenic C-85473 strain (with a Lys to Glu mutation at this position).

In post-fusion form, after the major structural rearrangement, it is shown that the mutated HRA residues do not participate in the internal hydrophobic interactions at the coil-coiled interface of HRA and HRB, except for residue 166, which corresponds to a position that stabilizes the 6HB structure through electrostatic binding. Thus, the residue changes in the HRA region are unlikely to impact strongly on direct interactions with HRB, but it seems that they should render the external part of the 6HB more hydrophilic, per the image of C-85473 (Fig. 3b). This could contribute to a favourable environment towards 6HB conformation, with an overall stabilization effect that is potentially more significant than shown, owing to the trimeric nature of F protein. It is of note that, similarly to our previous work with parainfluenza viruses type 2 and 5, we attempted to generate recombinant HMPV strains carrying mutations that strengthen the hydrophobic interactions between the coiled-coil HR domains [19, 31]. However, we were unable to recover recombinant viruses with equivalent mutations by reverse genetics (data not shown), suggesting that, in the case of HMPV viruses, mutations are barely tolerated in the internal cores of HRA and HRB and could drastically impair viral replication, in contrast to parainfluenza viruses.

In this study, we have shown that mutations located in the HRB domain (K479R-N482S) had no effect on cell–cell fusion *in vitro*, i.e. the rCAN98-75-FHRB virus had a similar fusogenic activity to that of the WT rCAN98-75 and rCAN98-75-FHRA+B had a similar phenotype to rCAN98-75-FHRA (Fig. 2). In fact, these mutations are not drastic, considering their electrostatic potential and polarity. Given their location in the rod-shaped stalk close to the transmembrane domain, it is possible that they are the result of protein variability in the C-terminal extremity, which is the less conserved part of the F protein. In fact, these two residues are found in all sequences of lineage A HMPV F protein (based on the alignment of 740 partial F sequences from ViPR).

One of the challenges of resolving which amino acids are involved in the fusion mechanism is the fact that, until now, very few HMPV strains have been studied and the results

cannot be generalized to all HMPV strains. Our study showed that a set of residues (T135–N139–K143–E166–D167) found in the HRA region of the hyperfusogenic A1/C-85473 HMPV virus significantly improves the fusogenicity *in vitro* when inserted into B2/CAN98-75 F protein. Very likely, the destabilization of the pre-fusion form, together with the stabilization of the post-fusion form, both contribute to the enhanced fusogenicity observed for the two recombinant HMPV rCAN98-75-FHRA and rCAN98-75-FHRA+B, similar to C-85473. These results contribute to our understanding of the HMPV-F-induced fusion mechanism and highlight the role of a few key residues in the HRA domain, which impact on syncytia formation.

#### Funding information

This study was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (to G.B.; no. 273261) and the Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France. J.D. received support from the Région Auvergne-Rhône-Alpes (grant CMIRA ExploRADOC) and the Consulat Général de France à Québec (Programme Frontenac).

#### Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### References

- Panda S, Mohakud NK, Pena L, Kumar S. Human metapneumovirus: review of an important respiratory pathogen. *Int J Infect Dis* 2014;25:45–52.
- van den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology* 2002;295:119–132.
- Peret TC, Boivin G, Li Y, Couillard M, Humphrey C *et al*. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *J Infect Dis* 2002;185:1660–1663.
- Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Boivin G, Hanson CT, Murphy BR *et al*. Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology* 2003;315:1–9.
- van den Hoogen BG, Herfst S, Sprong L, Cane PA, Forleo-Neto E *et al*. Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerg Infect Dis* 2004;10:658–666.
- ICTV ICoToV. 2015. Elevation of the paramyxoviral subfamily *Pneumovirinae* to family status as family *Pneumovirinae* in the order mononegavirales; and renaming of one pneumoviral genus. <https://talk.ictvonline.org/ICTV/proposals/2015.011a-iM.A.v2>. *Pneumoviridae.pdf*.
- Hamelin ME, Abed Y, Boivin G. Human metapneumovirus: a new player among respiratory viruses. *Clin Infect Dis* 2004;38:983–990.
- Papenburg J, Boivin G. The distinguishing features of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol* 2010;20:245–260.
- Feuillet F, Lina B, Rosa-Calatrava M, Boivin G. Ten years of human metapneumovirus research. *J Clin Virol* 2012;53:97–105.
- Le Bayon JC, Lina B, Rosa-Calatrava M, Boivin G. Recent developments with live-attenuated recombinant paramyxovirus vaccines. *Rev Med Virol* 2013;23:15–34.
- Chang A, Dutch RE. Paramyxovirus fusion and entry: multiple paths to a common end. *Viruses* 2012;4:613–636.
- Cox RG, Williams JV. Breaking in: human metapneumovirus fusion and entry. *Viruses* 2013;5:192–210.
- Schwalter RM, Smith SE, Dutch RE. Characterization of human metapneumovirus F protein-promoted membrane fusion: critical roles for proteolytic processing and low pH. *J Virol* 2006;80:10931–10941.
- Lamb RA, Jardetzky TS. Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus F. *Curr Opin Struct Biol* 2007;17:427–436.

15. Harrison SC. Viral membrane fusion. *Virology* 2015;479-480:498–507.
16. Aerts L, Cavanagh MH, Dubois J, Carbonneau J, Rhéaume C et al. Effect of *in vitro* syncytium formation on the severity of human metapneumovirus disease in a murine model. *PLoS One* 2015;10: e0120283.
17. Luque LE, Russell CJ. Spring-loaded heptad repeat residues regulate the expression and activation of paramyxovirus fusion protein. *J Virol* 2007;81:3130–3141.
18. Chang A, Hackett BA, Winter CC, Buchholz UJ, Dutch RE. Potential electrostatic interactions in multiple regions affect human metapneumovirus F-mediated membrane fusion. *J Virol* 2012;86:9843–9853.
19. Terrier O, Durupt F, Cartet G, Thomas L, Lina B et al. Engineering of a parainfluenza virus type 5 fusion protein (PIV-5 F): development of an autonomous and hyperfusogenic protein by a combinatorial mutagenesis approach. *Virus Res* 2009;146:115–124.
20. Mas V, Herfst S, Osterhaus AD, Fouchier RA, Melero JA. Residues of the human metapneumovirus fusion (F) protein critical for its strain-related fusion phenotype: implications for the virus replication cycle. *J Virol* 2011;85:12650–12661.
21. Herfst S, Mas V, ver LS, Wierda RJ, Osterhaus AD et al. Low-pH-induced membrane fusion mediated by human metapneumovirus F protein is a rare, strain-dependent phenomenon. *J Virol* 2008;82:8891–8895.
22. Schowalter RM, Chang A, Robach JG, Buchholz UJ, Dutch RE. Low-pH triggering of human metapneumovirus fusion: essential residues and importance in entry. *J Virol* 2009;83:1511–1522.
23. Boivin G, Mackay I, Sloots TP, Madhi S, Freymuth F et al. Global genetic diversity of human metapneumovirus fusion gene. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1154–1157.
24. Deffrasnes C, Hamelin ME, Prince GA, Boivin G. Identification and evaluation of a highly effective fusion inhibitor for human metapneumovirus. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:279–287.
25. Papenburg J, Carbonneau J, Isabel S, Bergeron MG, Williams JV et al. Genetic diversity and molecular evolution of the major human metapneumovirus surface glycoproteins over a decade. *J Clin Virol* 2013;58:541–547.
26. Meng J, Hotard AL, Currier MG, Lee S, Stobart CC et al. Respiratory syncytial virus attachment glycoprotein contribution to infection depends on the specific fusion protein. *J Virol* 2015;90: 245–253.
27. Gardner AE, Dutch RE. A conserved region in the F(2) subunit of paramyxovirus fusion proteins is involved in fusion regulation. *J Virol* 2007;81:8303–8314.
28. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* 2014;42: W252–W258.
29. Más V, Rodríguez L, Olmedillas E, Cano O, Palomo C et al. Engineering, structure and immunogenicity of the human metapneumovirus F protein in the postfusion conformation. *PLoS Pathog* 2016; 12:e1005859.
30. Lawlor HA, Schickli JH, Tang RS. A single amino acid in the F2 subunit of respiratory syncytial virus fusion protein alters growth and fusogenicity. *J Gen Virol* 2013;94:2627–2635.
31. Le Bayon JC, Terrier O, Cartet G, Lina B, Rosa-Calatrava M. Characterization of a key residue for hyperfusogenic phenotype in human parainfluenza virus type 2 (hPIV-2) fusion glycoprotein. *Virus Genes* 2013;47:365–369.
32. Singh M, Berger B, Kim PS. LearnCoil-VMF: computational evidence for coiled-coil-like motifs in many viral membrane fusion proteins. *J Mol Biol* 1999;290:1031–1041.

**Five reasons to publish your next article with a Microbiology Society journal**

1. The Microbiology Society is a not-for-profit organization.
2. We offer fast and rigorous peer review – average time to first decision is 4–6 weeks.
3. Our journals have a global readership with subscriptions held in research institutions around the world.
4. 80% of our authors rate our submission process as 'excellent' or 'very good'.
5. Your article will be published on an interactive journal platform with advanced metrics.

**Find out more and submit your article at [microbiologyresearch.org](http://microbiologyresearch.org).**



### 3.1.3 Discussion et perspectives de ce travail

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer les différences *in vitro* de phénotypes fusogènes des virus hMPV, telles que la dépendance au pH acide ou encore l'instabilité structurale de certaines protéines F. Si la susceptibilité au pH est discutable et pour le moins dépendante du type de souche virale (215), quelques études ont démontré l'implication de certains résidus chargés dans le mécanisme de fusion induit par la protéine F (**Tableau 5**).

Nos résultats suggèrent que les résidus 135, 139, 143, 166 et 167 du domaine HRA sont responsables de la différence de phénotype observée entre les souches CAN98-75 et C-85473, alors que les résidus 479 et 482 du domaine HRB n'ont que peu d'influence sur les propriétés fusogènes de la protéine F. Sans modifier la capacité répliquative *in vitro*, la substitution de ces résidus dans le fond CAN98-75 (virus CAN98-75-FHRA) induit en effet une augmentation de la fusogénicité du virus de près de 2 fois, alors que la détection en surface cellulaire des protéines F est réduite. Dans notre précédente publication, la génération de virus chimériques CAN98-75/C-85473 pour la protéine F entraînait une inversion complète des phénotypes *in vitro* en termes de fusogénicité, mais aussi en termes de capacité répliquative (2). Ainsi, la substitution des cinq résidus spécifiques dans le domaine HRA nous a permis de dissocier le gain de fusogénicité de celui répliquatif, suggérant ainsi que d'autres acides aminés et/ou domaines de la protéine F seraient impliqués dans cet avantage répliquatif viral, contribuant également à l'hyperfusogénicité du virus C-85473.

De manière complémentaire, la modélisation tridimensionnelle des formes de pré-fusion et de post-fusion de la protéine F de hMPV, nous a permis d'émettre l'hypothèse que les résidus identifiés du domaine HRA de la souche hyperfusogénique C-85473 pourraient être impliqués dans la déstabilisation de la forme de pré-fusion de la protéine. Cet effet pourrait être induit par la création d'oppositions de charges électrostatiques dans une région qui semble à l'inverse, être stabilisée *via* des liaisons hydrogènes dans le cas du virus CAN98-75. En revanche, il semble que la substitution de ces résidus d'intérêt n'entraînerait que peu de changements en termes de structure, d'hydrophobicité et/ou d'interactions au niveau de la forme post-fusion de la protéine F.

De manière intéressante, une précédente étude, basée initialement sur une modélisation tridimensionnelle de la protéine F sous sa forme pré-fusion et la prédiction de région enrichie en acides aminés chargés, avait également rapporté l'importance de certaines interactions et contraintes électrostatiques pour expliquer

l'apparition de phénotype hyperfusogénique du hMPV (448). Cette étude de Chang et *al.* mettait particulièrement en avant trois acides aminés, en position 51, 54 et 56 dans la sous-unité F2 (**Tableau 5**). D'après le modèle tridimensionnel, ces résidus se situent au sein d'une cavité hydrophobe de la tête globulaire de la protéine dans sa conformation de pré-fusion et se positionnent à proximité d'autres acides aminés chargés du domaine HRA, notamment ceux que nous avons identifiés en position 163 et 166. Il a été proposé que ce regroupement tridimensionnel d'acides aminés de la sous-unité F2 et du domaine HRA permette d'établir des interactions électrostatiques qui participeraient à la stabilité de la conformation de pré-fusion de la protéine F. Toutefois, dans cette étude, l'évaluation de l'impact des résidus 163 et 166 de HRA sur le phénotype hyperfusogénique n'avait pas été réalisée. Les auteurs avaient considéré, qu'étant donné le rôle du domaine HRA dans le repliement protéique de la F (**Figure 8**), les résultats obtenus avec ces résidus 163 et 166 ne pourraient pas être clairement corrélés à une instabilité de la forme de pré-fusion et/ou à l'induction de la formation de la structure 6HB, responsable de la conformation post-fusion. Ainsi, de manière complémentaire à cette étude, nous avons confirmé l'impact du domaine HRA et des résidus d'intérêt identifiés dans l'instabilité de la forme de pré-fusion, à laquelle est associé le phénotype hyperfusogène des virus hMPV. De plus, la modélisation de nos mutants nous a permis d'identifier également le résidu 166 comme étant le ou un des acides aminés clé de ce phénotype hyperfusogène.

Nos travaux ont ainsi contribué à construire un modèle d'étude pour mieux comprendre le mécanisme de fusion des protéines F des Paramyxovirus (hPIV) et Pneumovirus (hMPV), en mettant notamment en exergue l'importance structurale et fonctionnelle du domaine HRA pour le phénotype fusogénique *in vitro* de ces virus (1, 2, 449, 450). Au regard de nos résultats et de la littérature concernant les capacités fusogéniques variables des protéines F en fonction de leur origine virale, plusieurs questions fondamentales restent cependant encore sans réponse:

- **Quel est l'effet *in vivo* de l'hyperfusogénicité de certains virus hMPV ?**

Comme rapporté dans la partie introductive 3.5, la corrélation entre la pathogénicité *in vivo* de certaines souches hMPV (mais aussi hRSV) et leur potentiel de fusion cellulaire n'a pas été établie, d'autant que peu d'études *in vivo* ont été menées sur des souches cliniques hyperfusogéniques (**Tableau 4**). Dans notre

précédente étude publiée, nous avons démontré en modèle murin des différences de pathogénicité entre les virus chimériques pour leur protéine F, associées à des différences concordantes en termes de gain répliatif pulmonaire, de perte de poids et de profil histopathologique et d'induction de cytokines (2). Cependant, nous avons constaté que le remplacement de la protéine F avait non seulement un impact sur la fusogénicité virale mais également sur sa capacité répliative *in vitro*. Aussi, nous pouvons proposer d'utiliser le virus CAN98-75 portant les cinq mutations hyperfusogéniques dans le domaine HRA (sans gain répliatif associé), afin d'en étudier l'impact sur la pathogénicité en modèle murin, en comparaison du virus sauvage faiblement fusogène. Ces expérimentations pourront alors permettre de réunir d'autres éléments de réponse sur le lien entre hyperfusogénicité et pathogénicité *in vivo*.

**- L'instabilité de la protéine F, du moins sa forme de pré-fusion, a-t-elle un impact sur son immunogénicité ?**

Un des enjeux de l'étude de la protéine F du hMPV, en tant qu'antigène principal de surface, consiste en la caractérisation structure-fonction de cette protéine, afin de mettre au point des stratégies vaccinales les plus efficaces possibles. Concernant le virus hRSV, plusieurs études ont démontré que la forme de pré-fusion de la protéine F permet d'induire les titres les plus élevés d'anticorps neutralisants en modèles animaux (souris, hamsters et *cotton rats*) (405, 451). En revanche, pour le virus hMPV, il semblerait que cette forme de pré-fusion ne soit pas aussi déterminante pour la mise en place de la réponse immunitaire. En effet, une étude très récente suggère que la spécificité des anticorps hMPV-neutralisants est divergente de celle des anticorps contre le hRSV et qu'ils semblent reconnaître indifféremment des épitopes des formes de pré-fusion et de post-fusion (404). Etant donné la similitude de structure entre les protéines F du hMPV et du hRSV, ce différentiel est assez surprenant et nécessite d'être et déjà d'être étudié plus précisément, afin de mieux caractériser les déterminants spécifiques de l'immunogénicité de la protéine F de hMPV. Toutefois, ces éléments pourraient suggérer que l'instabilité protéique apportée par la substitution des résidus HRA (135, 139, 143, 166 et 167) dans notre étude ne modifierait pas significativement l'immunogénicité de la protéine F. Néanmoins, ceci devra être confirmé, par exemple, par des tests de microneutralisation dans le cadre d'expériences d'infection du modèle murin avec le virus CAN98-75-FHRA.



## **3.2 Étude de la contribution des protéines G et SH dans la pathogénèse du hMPV en vue du développement d'un virus hMPV vivant atténué comme candidat vaccin**

### **3.2.1 Introduction**

Comme décrit précédemment en Partie 1, plusieurs stratégies vaccinales ont été envisagées contre le virus hMPV, dont la grande majorité demeure aujourd'hui encore à l'étape du développement pré-clinique (**Tableau 4**). L'ensemble des données accumulées à ce jour semble indiquer que la stratégie vaccinale basée sur les virus vivants atténués est la plus prometteuse, en particulier pour cibler les jeunes enfants.

Malgré des résultats intéressants, notamment avec l'approche de la délétion de gènes viraux, il est nécessaire d'approfondir nos connaissances et d'explorer différentes voies d'optimisation des candidats vaccinaux en question, afin de développer et valider une stratégie non seulement la plus efficace, mais également la plus sécuritaire possible. C'est dans cet objectif que s'est inscrit la deuxième partie de mon travail de recherche doctorale. Il apparaît de manière évidente qu'une grande partie des études menées sur les approches d'atténuation des virus hMPV (la totalité des études en ce qui concerne l'approche de délétion de gènes viraux) a été restreinte jusqu'à aujourd'hui à l'utilisation d'une seule souche virale : la souche A1/CAN97-83 (**Tableau 4**). Bien que les premiers résultats obtenus dès 2004 en modèle animal aient démontré qu'il était possible d'utiliser un tel virus hMPV atténué, il n'y a pas eu depuis d'évaluation clinique de candidats vaccinaux délétés.

Par ailleurs, et depuis ces travaux, de nombreuses études ont mis en évidence une grande variabilité génotypique et phénotypique entre les souches hMPV, notamment entre les lignages A et B (**Tableau 1**), sans que l'on comprenne pour l'instant l'impact d'une telle variabilité sur la pathogénèse des hMPV. Les questionnements portent en particulier sur les protéines SH et G qui sont des protéines non essentielles au hMPV, et dont les rôles exacts restent à définir. Il faut d'ailleurs noter la faible homologie de séquence de ces protéines entre les virus hMPV du groupe A et B (de 59 et 37 % respectivement), suggérant la possibilité de propriétés fonctionnelles très différentes pour ces protéines, selon les sous-types viraux.

Dans ce contexte, la construction et la validation des systèmes de génétique inverse des souches cliniques B2/CAN98-75 et A1/C-85473 par l'équipe du Dr Boivin, en collaboration avec l'équipe du Dr Manuel Rosa-Calatrava, m'ont permis de mener une étude comparative de la délétion des gènes SH ou G entre les deux fonds

génétiques d'intérêt. Les objectifs de mon travail étaient donc de déterminer l'impact de la délétion de ces gènes sur (i) les effets cytopathiques *in vitro* et (ii) la pathogénèse *in vivo*, dépendamment du lignage viral, et selon les résultats obtenus, (iii) de proposer un (ou des) candidat(s) vaccinal(aux) atténué(s) à évaluer en modèle animal. Pour se faire, j'ai ainsi généré des virus recombinants délétés du gène SH ( $\Delta$ SH) ou G ( $\Delta$ G), que j'ai évalué en utilisant deux modèles d'études *in vitro* (cellules LLC-MK2 et épithéliums respiratoires humains reconstitués), tels que décrits dans le **manuscrit 1** présentés ci-après. Des expérimentations *in vivo* (souris BALB/c) sont en cours de finalisation, et les résultats déjà obtenus seront également présentés et discutés à la suite du manuscrit 1.

### 3.2.2 Manuscrit 1

Ce chapitre présente le manuscrit intitulé « **The strain-dependent differential impact of G and SH deletion provides new insight for the development of live-attenuated HMPV vaccine candidates** », dont les co-auteurs sont Julia Dubois, Andrés Pizzorno, Marie-Hélène Cavanagh, Blandine Padey, Bruno Lina, Marie-Ève Hamelin, Olivier Terrier, Manuel Rosa-Calatrava et Guy Boivin. Cet article est actuellement en cours de rédaction, dans l'attente de résultats expérimentaux de protection et de challenge infectieux en modèle animal, et sera soumis dans un journal international à comité de lecture en langue anglaise.

#### **Résumé**

Etant donné la part importante du hMPV comme agent étiologique des infections aiguës des voies respiratoires, particulièrement chez les nourrissons, il est important de développer et de caractériser des modalités vaccinales efficaces contre le hMPV. Dans cette optique, les virus atténués, en particulier par la délétion de gènes viraux accessoires, tels que G ou SH, représentent une approche prometteuse, mais dont le développement n'a pas encore abouti en l'évaluation clinique de candidats vaccinaux.

D'autre part, les rôles des protéines G et SH ne sont pas encore complètement élucidés. De plus, ces 2 protéines sont faiblement conservées entre les groupes hMPV A et B, laissant présager des fonctions divergentes selon la souche virale considérée. Aussi, dans cette étude, nous avons délété les gènes G et SH du génome de 2 virus hMPV de sous-groupes différents (B2/CAN98-75 et A1/C-85473) et nous avons comparé leurs effets sur différentes caractéristiques virales dont leurs capacités (i) répliquatives, (ii) à lier et (iii) à pénétrer les cellules cibles et (iv) à induire la production de cytokines. Pour cela, nous avons utilisé les cellules LLC-MK2, couramment utilisées pour la production et l'étude du hMPV, mais aussi un modèle d'épithélium respiratoire humain reconstitué *in vitro*, utilisé pour la première fois dans le contexte de l'infection hMPV, à notre connaissance. Ce dernier modèle physiologique nous fournit des conditions expérimentales plus proches de celles de l'infection humaine avec les avantages d'un système *in vitro* et nous permet d'appréhender nos futures expérimentations d'immunisation en modèle animal murin avec les candidats vaccinaux sélectionnés dans cette étude.



**Title:** The strain-dependent differential impact of G and SH deletion provides new insight for the development of live-attenuated HMPV vaccine candidates.

**Authors:** Julia Dubois<sup>1,2</sup>, Andrés Pizzorno<sup>2</sup>, Marie-Hélène Cavanagh<sup>1</sup>, Blandine Padey<sup>2</sup>, Bruno Lina<sup>2,3</sup>, Marie-Ève Hamelin<sup>1</sup>, Olivier Terrier<sup>2</sup>, Manuel Rosa-Calatrava<sup>2\*</sup> and Guy Boivin<sup>1\*</sup>

**Author affiliations:**

<sup>1</sup> Centre de Recherche en Infectiologie of the Centre Hospitalier Universitaire de Québec and Université Laval, Québec, Canada

<sup>2</sup> Laboratoire de Virologie et Pathologie Humaine - VirPath Team, International Research Center for Infectious Diseases, Inserm U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

<sup>3</sup> Laboratoire de Virologie, Centre National de Référence des virus Influenza, Institut des Agents Infectieux, Groupement Hospitalier Nord, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

\*MR-C and GB are co-last authors

**Word count:**

Abstract: 249

**Inserts:** 5 figures, 1 table

1 supporting figure, 1 supporting table

## Abstract

Human metapneumovirus (HMPV) is a major pediatric respiratory pathogen causing mild to severe acute lower respiratory tract disease in children. Contrary to what has been observed for the fusion (F) protein, the two other viral surface proteins (small hydrophobic (SH) and attachment (G)) are not essential for viral replication. Still, G-deleted ( $\Delta$ G) HMPV recombinant viruses have been shown to induce partial attenuation *in vivo*, hence suggesting a potential as live-attenuated vaccine candidate. We previously described two HMPV strains issued from clinical samples (A1/C-85473 and B2/ CAN98-75), which differ in both their *in vitro* fusogenic phenotype and *in vivo* pathogenicity, in a partially F-dependent manner. In this study, we hypothesized that SH or G deletion could have a strain-dependent differential impact on virus biology. We thus generated recombinant wild type (WT),  $\Delta$ SH or  $\Delta$ G HMPV viruses in both A1/C-85473 and B2/CAN98-75 backgrounds and compared their growth kinetics, cell binding and entry in LLC-MK2. We finally evaluated their infectivity and cytokine/chemokine induction profile in *in vitro* reconstituted 3D human airway epithelium. We observed that SH protein deletion differentially affects HMPV replicative capacity, pathogenicity and cytokine secretion depending of the viral background. On the other hand, G protein deletion induced significant deleterious effects on both CAN98-75 and C-85473 viruses, mainly in the physiologically adapted *in vitro* human airway epithelium model. Despite its attenuated phenotype, the  $\Delta$ G-C-85473 recombinant still induced activation of the cellular response, raising the interest for further *in vivo* investigations to determine its potential as an HMPV live-attenuated vaccine candidate.

## **Introduction**

Human metapneumovirus (HMPV) is an important respiratory pathogen and a worldwide leading cause of acute respiratory tract infections (ARTI) among children, the elderly and immunocompromised individuals [1,2]. The clinical presentation of HMPV infections shares many features with that of another member of the Pneumoviridae family, the human respiratory syncytial virus (HRSV), ranging from mild respiratory clinical signs to severe bronchiolitis and pneumonia [3,4]. Although the seasonal morbidity, hospitalization rate, and even mortality associated with local outbreaks of respiratory viruses prompted the WHO to issue a directive prioritizing the development of novel vaccination strategies to prevent these ARTI, no licensed vaccines or specific antivirals against HMPV are currently available.

HMPV viruses are phylogenetically divided into two main lineages (A and B), both of which are further divided into at least 2 sub-lineages (A1, A2a / A2b, B1 and B2) [5-8]. The HMPV genome is composed of a negative single stranded RNA molecule approximately 13 kb in length, containing eight genes that code for nine different proteins [9,10], three of which (F, G, SH) are surface glycoproteins. Whereas the F glycoprotein leads to both attachment and fusion of viral particles to the target cell [11], the exact role of the two remaining glycoproteins, G and SH, is still a matter of debate. Indeed, the HMPV F protein has been shown to bind not only the cellular integrin  $\alpha V\beta 1$  receptor but also glycosaminoglycans (GAGs) such as heparane sulfate, hence being able to substitute the virus GAG-mediated attachment function once exclusively attributed to the G protein [12-15]. Nonetheless, a role of the G protein in modifying the host cell response to infection has also been suggested [16-18], given, for example, the increased stimulation of the retinoid-acid inducible gene 1 (RIG-I) signaling pathway observed as a result of infection with a recombinant HMPV virus lacking G protein

( $\Delta$ G), leading to increased NF- $\kappa$ B activation and enhanced cytokine secretion [16]. On the other hand, the SH protein has been shown to impact the NF- $\kappa$ B pathway during infection [19], and also to form a viroporin complex at the cell membrane, although the purpose of such a structure is not yet clear [20].

The G and SH proteins have long been considered as “accessory” proteins for not being essential for HMPV viral replication [21], as shown by recombinant HMPV viruses lacking either G, SH or both of these proteins that replicate efficiently *in vitro* and *in vivo* [22]. Moreover, the weak contribution of G and SH to viral antigenicity, as well as the viral attenuation induced by the deletion of the G protein but not in the case of SH led to the consideration of these modified viruses as potential live-attenuated vaccine candidates [21,23]. However, the reach and significance of the conclusions issued from these reverse genetics studies is nuanced by the fact that they are all based on the same prototypical HMPV backbone, notably CAN97-83 from A2 sub-lineage. In that regard, many HMPV subtypes co-circulate each year worldwide, bearing high genetic diversity among strains of the A and B subtypes, particularly in the case of the least conserved viral proteins G and SH, with approximately 37 % and 59 % and amino acid sequence homology, respectively [5,9].

We previously demonstrated that modifications in the HMPV F protein yielded divergent results in terms of *in vitro* phenotype and *in vivo* pathogenesis, depending on the viral genetic background evaluated [24,25]. Considering this, we used in this study reverse genetics and gene deletion approaches to compare the functional impact of the deletion of G and SH on two HMPV strains belonging to the A1 or B2 subtypes, C-85473 or CAN98-75, respectively. The observed differences in viral replicative capacity, binding and entry properties *in vitro*, as well as in infectivity and pathogenesis in human reconstituted airway epithelium, provide new insight on the importance of

both genetic background and specific surface glycoprotein in the pathogenesis and protective potential of attenuated HMPV strains.

## **Materials and methods**

### **Cells**

LLC-MK2 cells (ATCC CCL-7) were maintained in minimal essential medium (MEM) (Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Wisent) and 10 mM HEPES (Sigma). BSR-T7/5 cells (a gift from Dr Ursula Buchholz at the NIAID in Bethesda, MD) were cultured in MEM supplemented with 10% FBS, 1% Non-essential amino acids (NEAA) (Life Technologies), 10 mM HEPES (Sigma), 1% penicillin/streptomycin (Wisent) and 0.2 mg/ml geneticin (G418, Life Technologies) to select T7 polymerase expressing cells.

### **Recombinant viruses rescue**

pSP72 plasmids (Promega) encoding the full-length genomic cDNA of HMPV B2/CAN98-75 or A1/C-85473 strains (GenBank accession numbers: AY145289.1 and KM408076.1, respectively) were constructed as previously described [24]. Briefly, cDNA was generated using the Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies) and integrated in a pSP72 plasmid in which T7 terminator, hepatitis delta virus (HDV) ribozyme and T7 promoter were added. To monitor viral rescue, the GFP gene was integrated in 3'-end of HMPV antigenome, between the antigenomic Leader sequence and the N gene, flanked by the N gene start region and the F gene end region of the respective strains. The N, P, L, and M2-1 ORFs of CAN98-75 were cloned in the multiple cloning site of pTNT vector (Promega) to create supporting protein plasmids for the virus rescue. BSR-T7 cells were co-transfected with the HMPV antigenome constructions plus the 4 supporting plasmids using Lipofectamin 2000 (Life Technologies) for 7 h, then the medium was replaced by OptiMEM (Life Technologies) + 1% NEAA. Transfected cells were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> until GFP

expression was observed using fluorescent microscopy. At this point, LLC-MK2 cells were added to the transfected BSR-T7 cells and co-cultured for 2 to 3 days at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> with the addition of fresh trypsin (0.0002%) after two days. When green cells appear, cells were harvested, sonicated and centrifuged. The supernatant was then diluted into infection medium (OptiMEM + 0.0002% of trypsin) and inoculated onto confluent LLC-MK2 monolayers. The virus was cultured until cytopathic effects (CPE) appeared and several passages were done the same way for virus amplification. The recombinant GFP-expressing viruses (rHMPV) were finally concentrated by centrifugation for 2 h at 100 000 x g at 21°C using a Beckman-Coulter Optima L-90K ultracentrifuge, resuspended in OptiMEM and stored at -80°C. Viral stocks were titrated in Focus Fluorescent Unit (FFU) per ml, as described in [25] or by 50% tissue culture infectious doses (TCID<sub>50</sub>) / ml [26].

To generate G- or SH-deleted recombinant viruses, the plasmid corresponding to B2/CAN98-75 or A1/C-85473 HMPV antigenome were amplified with Phusion DNA polymerase (New England Biolabs) using primers designed to match with the 3' and 5' region of either SH or G gene, taking care to conserve an intergenique sequence between flanking genes (as represented in **Figure 1**). The primers used are listed in **Table 1**. After amplification, linear DNA was phosphorylated and ligated by T4 Ligase to obtain the shortened HMPV antigenome. All plasmids were sequenced completely prior to further use. Reverse genetics were done as previously described to generate  $\Delta$ SH-C-85473,  $\Delta$ G-C-85473,  $\Delta$ SH-CAN98-75 and  $\Delta$ G-CAN98-75 HMPV viruses.

### ***In vitro* replication kinetics assay**

Confluent monolayers of LLC-MK2 cells in 24-wells plates were washed twice with PBS, infected with recombinant HMPV viruses at an MOI of 0.01 and incubated at

37°C for 1.5 h. Inoculum was then removed and replaced by fresh infection medium. Supernatants of three infected wells were harvested every 24 h for 7 days and stored at -80°C. Trypsin (0.0002%) was added in remaining infected wells every other day. End-point titrations were performed on all samples to determine viral titers reported as TCID<sub>50</sub>/ml.

### ***In vitro* virus-cell binding assay**

LLC-MK2 cells were seeded in 48-wells plate a day prior use. The day of infection, cells were washed with cold phosphate-buffered saline (PBS) and placed on ice. Recombinant viruses were then inoculated at MOI 0.5 during 3h, 2h, 1h and 30 min before inoculum removal and replacement by fresh infection medium. The plate was then incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. After 24 h, cells were detached using trypsin, centrifuged and fixed using 2% formaldehyde for 30 min. The percentage of GFP positive cells over  $1 \times 10^4$  total cells, meaning that virus had time to bound to the cell, was measured by flow cytometry using a Becton Dickinson FACSCantoII analyzer with FACSDiva software. Data were analyzed using FlowJo software (Tree Star, Inc.) and values were normalized to virus inoculum for each virus.

### ***In vitro* virus cell entry assay**

Adapted from [27], confluent LLC-MK2 cells in 48-wells plate were placed on ice for 5 min and washed once with cold PBS before addition of virus at an MOI of 0.5. Binding of virus to cells proceeded for 2 h on ice until the inoculum was removed and replaced by fresh infection medium. Cells were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> to allow virus entry into cell for indicated times (5 min, 30 min, 1 h or 2 h) and, at the end of each time period, medium was removed and then 250 ul of citrate buffer was added to each well

(40 mM sodium citrate dihydrate, 10 mM potassium chloride, 135 mM sodium chloride, pH 3.0) during 2 min to inactivate any remaining extracellular virus. Cells were then washed by PBS at room temperature once before addition of new infection medium and incubated as described earlier for 24 h. Infected cells were counted by GFP detection in flow cytometry, similar to the binding assay protocol described. As binding capacity of SH-/G- deleted virus has been shown in this study to be different, values were normalized for each virus to a condition where we did not inactivate bound viruses (corresponding to a maximal binding condition).

### **Infection of reconstituted human airway epithelium**

*In vitro* MucilAir™ healthy human airway epithelium (HAE) was purchased from Epithelix. Prior to infection, the air-liquid interface of HAE was cautiously washed in PBS. Then,  $10^3$  FFU (MOI: 0.1) were added onto ciliated cells and incubated for 1 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> before inoculum was removed. After 5 days of infection, we captured images of infected epithelium in fluorescent microscopy. The air-liquid interface was cautiously washed with 100 ul of OptiMEM to perform titration of viruses excreted by the epithelium and the basal medium was also collected for the quantification of 27 cytokines and chemokines using BioPlex Pro kit assay (BioRad). At the same time, the epithelium was lysed in RLT buffer and scraped to extract total RNA with RNeasy minikit (Qiagen).

### **Real-time RT-PCR**

The total RNA extracted from infected HAE lysates was randomly reverse transcribed using SuperScriptII RT (Invitrogen) at 42°C. Then, amplification of HMPV N gene was performed by quantitative PCR using SYBR Green qPCR Master Mix (Agilent, Santa

Clara, CA, USA). The forward primer was 5'-AGAGTCTCAATACACAATAAAAAGAGATGTAGG-3' and the reverse primer was 5'-CCTATCTCTGCAGCATATTTGTAATCAG-3'. The calibration of HMPV N copies quantification was assessed by amplification of a plasmid kindly provided by Dr Ab Osterhaus.

### **Statistical analysis**

Two-way ANOVA's with Dunnett post-tests were used to compare data of recombinant  $\Delta$ SH and  $\Delta$ G HMPV to their corresponding WT virus. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.

## Results

### Generation and *in vitro* replication of G- or SH-deleted HMPV recombinant viruses.

We used the same reverse genetics strategy described in our previous study comparing the HMPV B2/CAN98-75 and hyperfusogenic A1/C-85473 clinical strains [24], to generate six new GFP-expressing recombinant viruses, including three A1 strain-derived (rC-85473-WT,  $\Delta$ G-C-85473 and  $\Delta$ SH-C-85473) and three B2 strain-derived (rCAN98-75-WT,  $\Delta$ G-CAN98-75 and  $\Delta$ SH-CAN98-75). All six viruses were successfully rescued in co-cultured BSR-T7/5 and LLC-MK2 cell (**Figure 1**).

We then assessed the replicative capacity of each recombinant virus in LLC-MK2 cells (MOI 0.01) over a 7-day period (**Figure 2**). While the rCAN98-75-WT virus peaked at  $8.95 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml on day 4 post infection (pi), the  $\Delta$ SH-CAN98-75 counterpart showed reduced replication from as early as day 2 pi, with a 24 h delay to reach peak titers ( $1.95 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml). This attenuated phenotype was even more evident for the  $\Delta$ G-CAN98-75 virus, for which the highest viral titer measured was  $5.7 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml on day 7 pi (**Figure 2A**). This differential replication among the three CAN98-75 variants were clearly visible by fluorescent microscopy on day 3 pi, notably considering both the extent of viral spread and the number of CPE-characteristic rounded cells (**Figure 2B**). Of note, the important deficiency in viral spread and replication of the  $\Delta$ G-CAN98-75 virus, constituted a major limitation to our ability to produce concentrated virus stock preparations, which required a higher number of passages in cell culture.

On the other hand, no significant differences were observed in the replicative capacities of the three C-85473-derived recombinant viruses (**Figure 2C**). While peak viral titers of  $\sim 1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml were reached for both the C-85473-WT and  $\Delta$ SH-C-85473

viruses at day 4 pi and sustained until day 6 pi, maximum values remained slightly lower in the case of the  $\Delta$ G-C-85473 virus ( $3.88 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml). In terms of viral spread and CPE, both the  $\Delta$ SH-C-85473 and  $\Delta$ G-C-85473 viruses were comparable to the C-85473-WT by fluorescent microscopy, with the three of them showing the hyperfusogenic phenotype already associated with the C-85473 background (**Figure 2D**) [24,25].

Altogether, these results indicate a differential effect of G and SH deletion on viral replication, depending on the HMPV strain. Whereas these deletions seem to have low impact on the C-85473 strain,  $\Delta$ G-CAN98-75 HMPV and, to a lesser extent  $\Delta$ SH-CAN98-75 HMPV, are significantly attenuated in LLC-MK2 cells.

### **Both viral binding and entry to host cells are differently affected by G and SH deletions depending on the HMPV background**

Considering the role of “attachment protein” previously attributed to the G protein, we next evaluated the impact of its deletion -and also that of SH- on the binding and entry of the recombinant viruses to LLC-MK2 cells (MOI 0.5) through the detection of viral GFP by flow cytometry over the first 3 hpi (**Figure 3**). While the rCAN98-75-WT virus showed progressive binding kinetics, with 15 %, 25 %, 42 % and 68 % GFP-positive cells at 30, 60, 120 and 180 min after contact, respectively,  $\Delta$ SH-CAN98-75 showed faster binding in the first 60 min, yet achieving a *plateau* of 47 % by 60-120 min. Not surprisingly, the deletion of the G protein significantly hampered the binding capacity of the  $\Delta$ G-CAN98-75 virus, with a mean of 10 % GFP-positive cells all throughout the duration of the experiment (**Figure 3A**). As in the case of replicative capacities described above, no significant differences were observed among the three C-85473-derived viruses, which overall showed binding curves comparable to that of the

CAN98-75-WT virus, yet with lower maximum values at 180 min : 43 % for rC-85473-WT, 57 % for  $\Delta$ SH- and 54 % for  $\Delta$ G-C-85473 vs 68 % for rCAN98-75-WT viruses (**Figure 3B**).

We then used a similar approach to investigate potential differences in the capacity of the recombinant viruses to enter LLC-MK2 cells (**Figure 4**). Considering the reduced binding capacity of SH- and G-deleted CAN98-75 viruses, measured values were normalized to those of the condition in which maximum binding for each virus is achieved. While only 13 % and 43 % of attached virions effectively infected the cells 60 and 120 min after removal of the non-attached inoculum, respectively, in the case of CAN98-75-WT, only 8 % and 24 % of  $\Delta$ SH-CAN98-75 viruses were detected at the same time points. Conversely, the  $\Delta$ G-CAN98-75 virus was able to infect 25 % of cells within the first 5 min, compared with <5 % for the WT and  $\Delta$ SH counterparts at the same time, reaching a *plateau* of 40 % by 30 min (**Figure 4A**).

Viral entry did not seem to represent a major a limiting factor for the three C-85473-derived viruses, which showed comparable kinetics in the first 60 min (**Figure 4B**). However, although the tendency of the entry curves was still comparable for the last 60 min,  $\Delta$ SH and  $\Delta$ G showed significantly improved relative entry values compared to the WT (66 % and 79 % vs 58 %, respectively).

Altogether, our results suggest a detrimental impact of SH and G deletion on both virus binding and entry in the recombinant CAN98-75 HMPV background, which is in accordance with attenuated viral replication observed in **Figure 2A**. Conversely, SH and G deletion seemed to induce a mild beneficial effect on both parameters for the C-85473 strain, hence highlighting once again the strain-dependent differential effect of the viral surface proteins.

### **G- and SH-deleted viruses harbor different replicative properties in reconstituted human airway epithelium (HAE)**

To further characterize the G- and SH-deleted viruses in more biologically relevant conditions, we performed experimental infection in a 3D reconstituted airway epithelium model derived from human primary bronchial cells (MucilAir® 3D, Epithelix). This model is well adapted to the physiology of the human airway epithelium, given its stratified architecture, differentiation level, air-liquid interphase, and mucociliar activity. Infections with the recombinant viruses were performed at MOI 0.5, and the progress of infection was followed-up by GFP observation in fluorescence microscopy. Irrespective of the viral background (CAN98-75 or C-85473), differences between the G- and SH-deleted viruses and their WT counterparts were clearly visible by day 5 pi (**Figure 5A-B**). Interestingly, the  $\Delta$ SH-CAN98-75 virus appeared to infect HAE more efficiently than CAN98-75-WT, whereas, on the other hand, the  $\Delta$ G-CAN98-75 showed only few scattered infected cells, then exacerbating the attenuated phenotype previously observed in LLC-MK2 cells (**Figure 5A**). These observations were in line with a differential loss of epithelial barrier integrity, indirectly measured by the trans-epithelial electric resistance (TEER) values, which were reduced by 40 % in the  $\Delta$ SH-CAN98-75, compared to the CAN98-75-WT (**Supplementary Table 1**). The  $\Delta$ SH-C-85473 also seemed to better infect HAE than its WT counterpart, although the visual difference is less evident than in the case of CAN98-75-derived viruses (**Figure 5B**). Moreover, the  $\Delta$ G-C-85473 virus was significantly attenuated in terms of its infectivity in HAE, which had not been observed during replication kinetics experiments in LLC-MK2 cells. Interestingly, measured TEER values showed a greater loss of epithelial integrity induced by C-85473-WT virus infection than by  $\Delta$ SH-C-

85473 and  $\Delta$ G-C-85473 viruses, which respectively induced little and no integrity decrease (**Supplementary Table 1**).

To validate the fluorescence microscopy observations and TEER measurements, we next quantified the replication of the HMPV recombinant viruses in the HAE model by measuring the N gene copy numbers in apical surface washes and also within infected cells, recovered after inducing the lysis of the whole HAE on day 5 pi (**Figure 5C-D**). In accordance with our observations, apical HAE washes showed increased viral release in both  $\Delta$ SH viruses compared to their respective WT counterparts, with more than 1-log increase in N gene copy numbers for CAN98-75 ( $p < 0.001$ ) and 2.7-fold increase for C-85473 ( $p < 0.05$ ) (**Figure 5C**). Although not statistically significant, we also measured higher N gene copy numbers in the apical surface of HAE infected with the  $\Delta$ G-CAN98-75 virus, compared to the CAN98-75-WT (**Figure 5C**), which is not in line with fluorescence microscopy observations and may suggest the presence of a high level of non-infectious viruses or viral genetic material “trapped” in the HAE surface. On the contrary, the number of  $\Delta$ G-C-85473 N gene copies in apical HAE washes was below the detection limit (**Figure 5C**). Finally, mean N gene copy numbers in lysed infected HAE were overall 1-3-log higher than those measured in apical washes, with relative differences among viruses being conserved for 5 out of the 6 recombinants tested (**Figure 5D**). In the case of  $\Delta$ G-CAN98-75, N copy numbers were significantly reduced in cell lysates, compared to the WT, in line with the fluorescent microscopy observation, which might suggest a reduced infectivity of HAE and concomitant low replication level in cells.

### **G- and SH-deleted viruses differentially induce cytokine and chemokine secretion in reconstituted HAE**

As a complement to viral replication, we used a multiplexed bead assay to investigate the cytokine and chemokine secretion profile of the recombinant viruses, released at the basal pole of the HAE (**Figure 5E** and **Supplementary data 1**). Overall, infections with either of the WT recombinant viruses showed an almost identical cytokine/chemokine expression profile, exemplified by a strong secretion of, among others, IP-10 (also CXCL10), RANTES (also CCL5), MCP-1 (or CCL2), IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1Ra, IFN- $\gamma$  and GM-CSF. Interestingly, SH or G deletion induced specific cytokine/chemokine expression profiles, depending on the genetic background. Both  $\Delta$ G viruses systematically showed reduced cytokine/chemokine expression levels than their WT counterparts, except for TNF- $\alpha$  and IL-1Ra (comparable levels) and GM-CSF (significant increase) in the case of the  $\Delta$ G-C-85473 recombinant, which seemed to activate the cellular response despite its attenuated phenotype. Of note, mean expression levels were very low (and even undetectable) in the case of  $\Delta$ G-CAN98-75, probably related to its quite limited infection rate in HAE. Moreover, SH deletion induced lower RANTES, MCP-1, IL-8 and IFN- $\gamma$  expression levels in both genetic backgrounds, and also reduced IP-10 and TNF- $\alpha$  and increased GM-CSF for the  $\Delta$ SH-CAN98-75 recombinant, compared to their WT counterparts. This reduction on IP-10 and TNF- $\alpha$  is rather surprising, considering the increased infectivity of the  $\Delta$ SH-CAN98-75 variant in HAE, and that they are the two most highly expressed cytokines following infection with both WT HMPV viruses. IL-1Ra expression levels were not affected by SH deletion. Of note, although we would have expected to see differences in other cytokines such as IL-2 or IL-12, which have been previously shown to be induced by HMPV infection, the expression level of these cytokines in the HAE model were quite

low, hence hampering appropriate comparison (**Supplementary data 1**). In total, our results put in evidence the role of the viral genetic background on the differential host cell responses to infection with G- or SH-deleted HMPV viruses.

## Discussion

Although HMPV and HRSV represent an important public health burden mainly in pediatric patients, neither a vaccine nor an effective antiviral is currently available. After the enhanced disease syndrome induced by the inactivated HRSV vaccine [28], the failure of the formalin-inactivated HMPV vaccine in animal models [29], and the recent report of over-attenuation of a chimeric HMPV-Pa vaccine in seronegative children [30], live-attenuated vaccines have shown interesting and promising outcomes, particularly when it comes to attenuation conferred by G or SH gene deletion [21,31]. However, certain knowledge gaps in the biology of these potential candidates underscore the need for a more extensive evaluation.

Considering the variability among G and SH genes of different HMPV lineages and the very limited data on the specific function of these two surface glycoproteins, we sought to compare the strain-related contribution of G and SH to HMPV infectivity and pathogenesis, and discuss the potential implications for the design of vaccine candidates. We therefore used reverse genetics to generate HMPV recombinant WT viruses from the A1/C-85473 and B2/CAN98-75 genetic background as well as variants in which the G or SH genes were deleted. We observed that viral replication in LLC-MK2 cells was significantly diminished when G, and to a lesser extent SH, were deleted from the CAN98-75 virus (**Figure 2A**). Conversely, no significant attenuation was observed as a result of G or SH deletion in the C-85473 genetic background (**Figure 2C**), in line with a previous study demonstrating the “accessory role” of these two genes for the *in vitro* replication of another A lineage virus, A2/CAN97-83 [21]. This initial observation of a distinct phenotype between A and B viruses (A1/C-85473 and A2/CAN97-83 vs B2/CAN98-75) suggests that HMPV genetic background might play a role on the impact of gene deletion on viral fitness.

Although multiple studies have shown that the HMPV F protein is fully able to perform cell binding and virus entry when G glycoprotein is absent [11,14,15], the latter is still considered the viral attachment protein. In that regard, we investigated the binding and entry abilities of the four deleted recombinant viruses and compared them to those of their WT counterpart. As anticipated after *in vitro* growth assays, we confirmed that G deletion strongly impaired the binding ability of the CAN98-75 virus (**Figure 3A**), yet without compromising its capacity to penetrate into the host cell (**Figure 4A**). These results confirm the major role of the G protein for cellular attachment of the CAN98-75 virus, which cannot be efficiently overtaken by the F protein. On the other hand, results obtained in the C-85473 background clearly demonstrated the negligible effect of G or SH deletions both in terms of replicative capacity and virus-cell binding/entry (**Figure 3B-4B**). We previously described that one major difference between the two HMPV strains CAN98-75 and C-85473 resided in their *in vitro* fusogenic phenotype, with the F protein being identified as the main responsible for this divergent fusogenicity profile [24,25]. We then believe that while the less fusogenic CAN98-75 virus is more dependent on its G protein for virus-cell attachment, the enhanced fusogenicity of the C-85473 F protein probably buffers the functional impact of the lack of the G protein on the viral envelope. Indeed, the differential profile exhibited by the two WT viruses, with an improved capacity of the CAN98-75 virus to bind LLC-MK2 cells (**Figure 3**) but enhanced penetration in the case of the C-85473 virus (**Figure 4**), strengthens our hypothesis.

Since the specific function of the SH protein remains a matter of debate, characterizing its impact on HMPV pathogenesis constitutes a considerable challenge. Although the deletion of SH had a mild effect on virus-cell binding or entry in both C-85473 and CAN98-75 backgrounds (**Figure 3-4**), a fast binding yet with limited entry was

observed for the  $\Delta$ SH-CAN98-75 virus. A possible explanation for this observation could be that the deletion of the SH gene entails a shift of the G gene upstream the viral genome transcriptional gradient, with the resulting increased gene expression. If the excess G protein synthesis compared to the WT virus disrupts the balance between the attachment function of the G and the comparatively low fusogenicity of the F protein at the viral surface, this could negatively affect the early stages of the CAN98-75 viral cycle. Likewise, we cannot rule out a more “steric” negative effect of the SH deletion on the G-F interaction.

The evaluation of the G- and SH-deleted viruses in a more physiological context such as the reconstituted HAE yielded interesting differences in terms of infectivity when compared to the profiles observed in LLC-MK2 cells, especially in the case of the  $\Delta$ G-C-85473 virus. Indeed, despite its apparent unaffected replication in LLC-MK2 cells, the spread of the  $\Delta$ G-C-85473 recombinant in the HAE was much more restricted to focal area than those of the WT or  $\Delta$ SH-C-85473 viruses (**Figure 5B**). A recent HRSV study showed a similar divergence on the contribution of the G protein to virus-cell binding between the prototype A2 subtype strain and a currently circulating virus one, and also when comparing infections in different cell lines [27]. The authors further demonstrated that this difference was due to the specific viral F protein and cellular GAG configuration. We therefore propose that the stratified nature and surface receptor configuration of the reconstituted HAE, combined with the presence of cilia and mucus, impose a significantly more limiting environment for an effective infection with a G-deleted HMPV virus.

The enhanced replication and spread in HAE displayed by both  $\Delta$ SH viruses, compared to the respective WT counterparts, contrasts with the mildly attenuated phenotype of the  $\Delta$ SH-CAN98-75 in LLC-MK2 cells. Although the significantly enhanced virulence of

this virus is clearly evidenced by fluorescent microscopy with steep decrease of HAE integrity (TEER) after infection, the latter is not evident in C-85473 background. Further characterization studies on the specific function of SH are necessary to explain these observations.

We also demonstrated the utility of the HAE infection model to provide further insights on the pathogenicity of HMPV strains. Overall, while G and SH deletion negatively affected IFN- $\gamma$ , MCP-1 and IL-8 secretion compared to infection with the WT strains, TNF- $\alpha$  and IL-1R $\alpha$  induction remained unchanged. These two cytokines are therefore associated to the host cell response to an effective HMPV infection, regardless of the virus G and SH configuration and the extent of infection. As for strain-related differences, the viral attenuation induced by SH deletion in the C-85473 virus does not seem to affect IP-10 or RANTES secretion, as observed in the CAN98-75 background (**Figure 5**), which may suggest a role of the F protein in this specific response. The GM-CSF expression profile is also worth mentioning, since it is the only cytokine that is significantly over-expressed in relation to the respective WT viruses, notably in the case of  $\Delta$ SH-CAN98-75 and  $\Delta$ G-C-85473. Although usually associated with the recruitment and maturation of macrophages [32], a few contradictory studies have recently discussed its potential role in the exacerbation of inflammation [33-35].

To conclude, our study provides compelling evidence on the variable function of HMPV G and SH proteins and its dependence on the viral background. More specifically, our results highlight the interest of the G deletion strategy in an hyperfusogenic background like C-85473 for live-attenuated vaccine development, given not only the immunogenic potential coupled with the marked attenuation in HAE of the  $\Delta$ G-C-85473 recombinant, but also its effective replication in the LLC-MK2 production cell line. Whereas further evaluation in animal models will constitute the

next step in the validation of  $\Delta G$  (and/or  $\Delta SH$ ) live-attenuated vaccine candidates, the use of reconstituted HAE from donors affected with asthma or chronic respiratory illnesses could also be of interest to investigate the role of comorbidities as risk factors for HMPV severity.

### **Acknowledgments**

We thank services of microscopy and flow cytometry: Plateforme of Bio-Imagerie of CRI in Québec and Centre d'Imagerie Quantitative Lyon-Est (CIQLE) in Lyon.

### **Funding informations**

This study was supported by a grant from Canadian Institutes of Health Research (No. 273261) to GB and Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France. Julia Dubois received the support of the Région Auvergne-Rhône-Alpes (grant CMIRA ExploRA'DOC) and of the Consulat Général de France à Québec (Programme Frontenac).

## References

1. van den Hoogen BG, Herfst S, Sprong L, Cane PA, Forleo-Neto E, et al. (2004) Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerg Infect Dis* 10: 658-666.
2. Feuillet F, Lina B, Rosa-Calatrava M, Boivin G (2012) Ten years of human metapneumovirus research. *J Clin Virol* 53: 97-105.
3. Papenburg J, Boivin G (2010) The distinguishing features of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol* 20: 245-260.
4. ICTV ICoToV (2015) Elevation of the paramyxoviral subfamily Pneumovirinae to family status as family Pneumoviridae in the order Mononegavirales; and renaming of one pneumoviral genus.
5. Papenburg J, Carbonneau J, Isabel S, Bergeron MG, Williams JV, et al. (2013) Genetic diversity and molecular evolution of the major human metapneumovirus surface glycoproteins over a decade. *J Clin Virol* 58: 541-547.
6. Huck B, Scharf G, Neumann-Haefelin D, Puppe W, Weigl J, et al. (2006) Novel human metapneumovirus sublineage. *Emerg Infect Dis* 12: 147-150.
7. Peret TC, Boivin G, Li Y, Couillard M, Humphrey C, et al. (2002) Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *J Infect Dis* 185: 1660-1663.
8. Boivin G, Mackay I, Sloots TP, Madhi S, Freymuth F, et al. (2004) Global genetic diversity of human metapneumovirus fusion gene. *Emerg Infect Dis* 10: 1154-1157.
9. Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Boivin G, Hanson CT, Murphy BR, et al. (2003) Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology* 315: 1-9.
10. van den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA (2002) Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology* 295: 119-132.

11. Cox RG, Williams JV (2013) Breaking in: human metapneumovirus fusion and entry. *Viruses* 5: 192-210.
12. Adamson P, Thammawat S, Muchondo G, Sadlon T, Gordon D (2012) Diversity in glycosaminoglycan binding amongst hMPV G protein lineages. *Viruses* 4: 3785-3803.
13. Cox RG, Livesay SB, Johnson M, Ohi MD, Williams JV (2012) The human metapneumovirus fusion protein mediates entry via an interaction with RGD-binding integrins. *J Virol* 86: 12148-12160.
14. Chang A, Masante C, Buchholz UJ, Dutch RE (2012) Human metapneumovirus (HMPV) binding and infection are mediated by interactions between the HMPV fusion protein and heparan sulfate. *J Virol* 86: 3230-3243.
15. Cseke G, Maginnis MS, Cox RG, Tollefson SJ, Podsiad AB, et al. (2009) Integrin  $\alpha\beta 1$  promotes infection by human metapneumovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 1566-1571.
16. Bao X, Liu T, Shan Y, Li K, Garofalo RP, et al. (2008) Human metapneumovirus glycoprotein G inhibits innate immune responses. *PLoS Pathog* 4: e1000077.
17. Kolli D, Bao X, Liu T, Hong C, Wang T, et al. (2011) Human metapneumovirus glycoprotein G inhibits TLR4-dependent signaling in monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 187: 47-54.
18. Bao X, Kolli D, Ren J, Liu T, Garofalo RP, et al. (2013) Human Metapneumovirus Glycoprotein G Disrupts Mitochondrial Signaling in Airway Epithelial Cells. *PLoS ONE* 8: e62568.
19. Bao X, Kolli D, Liu T, Shan Y, Garofalo RP, et al. (2008) Human metapneumovirus small hydrophobic protein inhibits NF-kappaB transcriptional activity. *J Virol* 82: 8224-8229.

20. Masante C, El Najjar F, Chang A, Jones A, Moncman CL, et al. (2014) The human metapneumovirus small hydrophobic protein has properties consistent with those of a viroporin and can modulate viral fusogenic activity. *J Virol* 88: 6423-6433.
21. Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Yang L, Lamirande EW, Tran KC, et al. (2004) Recombinant human Metapneumovirus lacking the small hydrophobic SH and/or attachment G glycoprotein: deletion of G yields a promising vaccine candidate. *J Virol* 78: 12877-12887.
22. Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Tran KC, Murphy BR, Collins PL, et al. (2004) Recovery of human metapneumovirus from cDNA: optimization of growth in vitro and expression of additional genes. *Virology* 321: 247-259.
23. Skiadopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ, Amaro-Carambot E, Surman SR, et al. (2006) Individual contributions of the human metapneumovirus F, G, and SH surface glycoproteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity. *Virology* 345: 492-501.
24. Aerts L, Cavanagh MH, Dubois J, Carbonneau J, Rheume C, et al. (2015) Effect of in vitro syncytium formation on the severity of human metapneumovirus disease in a murine model. *PLoS One* 10: e0120283.
25. Dubois J, Cavanagh MH, Terrier O, Hamelin ME, Lina B, et al. (2017) Mutations in the fusion protein heptad repeat domains of human metapneumovirus impact on the formation of syncytia. *J Gen Virol* 98: 1174-1180.
26. Hamelin ME, Yim K, Kuhn KH, Cragin RP, Boukhvalova M, et al. (2005) Pathogenesis of human metapneumovirus lung infection in BALB/c mice and cotton rats. *J Virol* 79: 8894-8903.

27. Meng J, Hotard AL, Currier MG, Lee S, Stobart CC, et al. (2015) Respiratory Syncytial Virus Attachment Glycoprotein Contribution to Infection Depends on the Specific Fusion Protein. *J Virol* 90: 245-253.
28. Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, et al. (1969) Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol* 89: 422-434.
29. Hamelin ME, Couture C, Sackett MK, Boivin G (2007) Enhanced lung disease and Th2 response following human metapneumovirus infection in mice immunized with the inactivated virus. *J Gen Virol* 88: 3391-3400.
30. Karron RA, San Mateo J, Wanionek K, Collins PL, Buchholz UJ (2017) Evaluation of a Live Attenuated Human Metapneumovirus Vaccine in Adults and Children. *J Pediatric Infect Dis Soc*.
31. Biacchesi S, Pham QN, Skiadopoulos MH, Murphy BR, Collins PL, et al. (2005) Infection of nonhuman primates with recombinant human metapneumovirus lacking the SH, G, or M2-2 protein categorizes each as a nonessential accessory protein and identifies vaccine candidates. *J Virol* 79: 12608-12613.
32. Ushach I, Zlotnik A (2016) Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J Leukoc Biol* 100: 481-489.
33. Rosler B, Herold S (2016) Lung epithelial GM-CSF improves host defense function and epithelial repair in influenza virus pneumonia-a new therapeutic strategy? *Mol Cell Pediatr* 3: 29.
34. Saha S, Doe C, Mistry V, Siddiqui S, Parker D, et al. (2009) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression in induced sputum and bronchial mucosa in asthma and COPD. *Thorax* 64: 671-676.

35. Hamilton JA (2015) GM-CSF as a target in inflammatory/autoimmune disease: current evidence and future therapeutic potential. *Expert Rev Clin Immunol* 11: 457-465.

## Figures legend

**Figure 1: Construction of recombinant HMPV viruses.** Schematic representation of the genome of the 6 recombinant GFP-expressing viruses: rCAN98-75 is the wild-type strain from which we made SH deletion ( $\Delta$ SH-CAN98-75) or G deletion ( $\Delta$ G-CAN98-75). A similar procedure was followed with the strain rC-85473 and its corresponding deletants  $\Delta$ SH-C-85473 and  $\Delta$ G-C-85473. A focus was represented on rCAN98-75 genome to locate the position of primers (arrow, Table 1) used for deletion strategy. GS: Gene Start. GE: Gene End. IG: intergenique sequence.

**Figure 2: *In vitro* replicative capacity of recombinant HMPV strains.** LLC-MK2 monolayers in 24 well-plates were infected with 6 rHMPV strains (A-B with CAN98-75 viruses ; C-D with C-85473 viruses) at an MOI of 0.01. Supernatants were harvested every 24 h for 7 days, frozen, sonicated and titrated as TCID<sub>50</sub> / ml on LLC-MK2 cells. (A-C) Growth curves represent titrations of 2 independent experiments, each time point titrated in triplicate. (B-D) Observations of infected monolayers with fluorescent microscopy at 3 days post-infection. Statistical analysis was performed using Repeated Measures Two-way ANOVA and compared each  $\Delta$ SH/  $\Delta$ G virus to its WT strain. \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*,  $p < 0.001$ .

**Figure 3: SH and G proteins contribute differently in binding of recombinant CAN98-75 and C-85473 HMPV.** Binding kinetics of WT,  $\Delta$ SH and  $\Delta$ G HMPV from CAN98-75 (A) and C-85473 (B) backgrounds in LLC-MK2 cells as determined by GFP detection in flow cytometry. Values were normalized to virus inoculum for each virus. \*,  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*,  $p < 0.001$  comparing each  $\Delta$ SH/  $\Delta$ G virus to its WT

strain using Repeated Measures Two-way ANOVA. Data are shown as means  $\pm$  SEM and represent the combined results of duplicate in two independent experiments.

**Figure 4: Contribution of SH and G protein in entry of recombinant CAN98-75 and C-85473 HMPV.** Entry kinetics of WT,  $\Delta$ SH and  $\Delta$ G HMPV from CAN98-75 (A) and C-85473 (B) backgrounds in LLC-MK2 cells were determined by GFP detection in flow cytometry, using an acid wash protocol as described in Materials and Methods. Values were normalized to maximum bound viruses for each condition. \*,  $p < 0.05$ , \*\*\*,  $p < 0.001$  comparing each  $\Delta$ SH/  $\Delta$ G virus to its WT strain using Repeated Measures Two-way ANOVA. Data are shown as means  $\pm$  SEM and represent the combined results of duplicate in two independent experiments.

**Figure 5: Reconstituted airway epithelium infected by recombinants HMPV strains differed in infectivity, viral growth and cytokines secretion profiles.** MucilAir™ epitheliums from healthy donors were infected with rHMPV strains at an MOI of 0.1. (A-B) Photographs of infected ciliated cells were done by fluorescent microscopy 5 days pi. Viruses from epithelium wash (C) and cell lysates (D) were quantified by RT-qPCR following the protocol described in Material and Methods. (E) Human cytokines / chemokines detection was performed from basal medium of each infected epithelium using a multiplex assay. Results of selected cytokines, i.e. the more expressed ones amongst 27 detected, are shown. \*,  $p < 0.05$ , \*\*\*,  $p < 0.001$  comparing each  $\Delta$ SH /  $\Delta$ G virus to its WT strain using Repeated Measures Two-way ANOVA. Data are shown as means  $\pm$  SEM and represent experimental duplicate. Others cytokines results are shown in Supplementary Figure 1.

**Supplementary figure 1. *In vitro* reconstituted HAE infected by recombinant HMPV strains differed cytokine secretion profiles.**

# Figures

## Figure 1

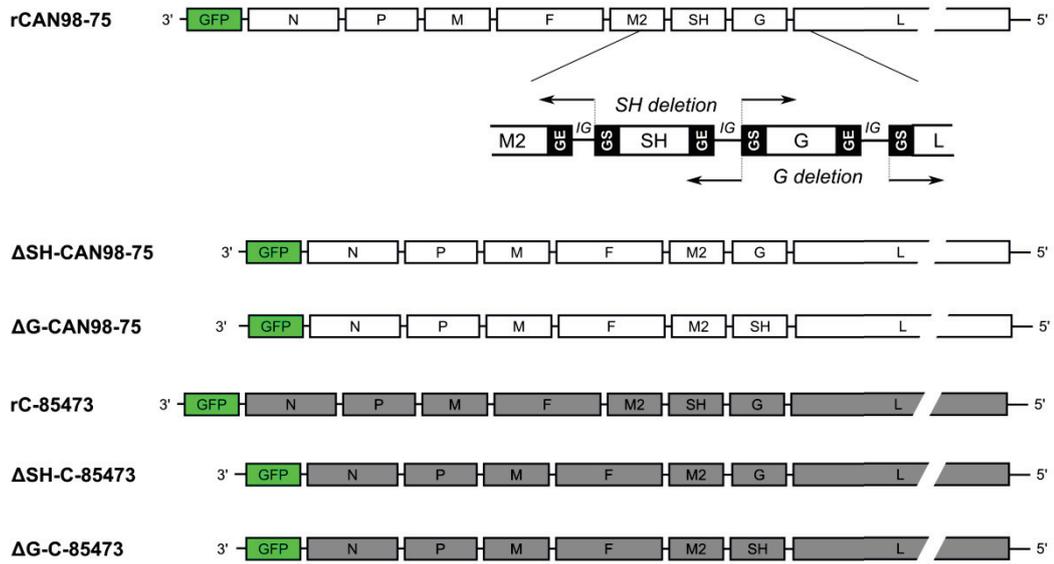


Figure 2

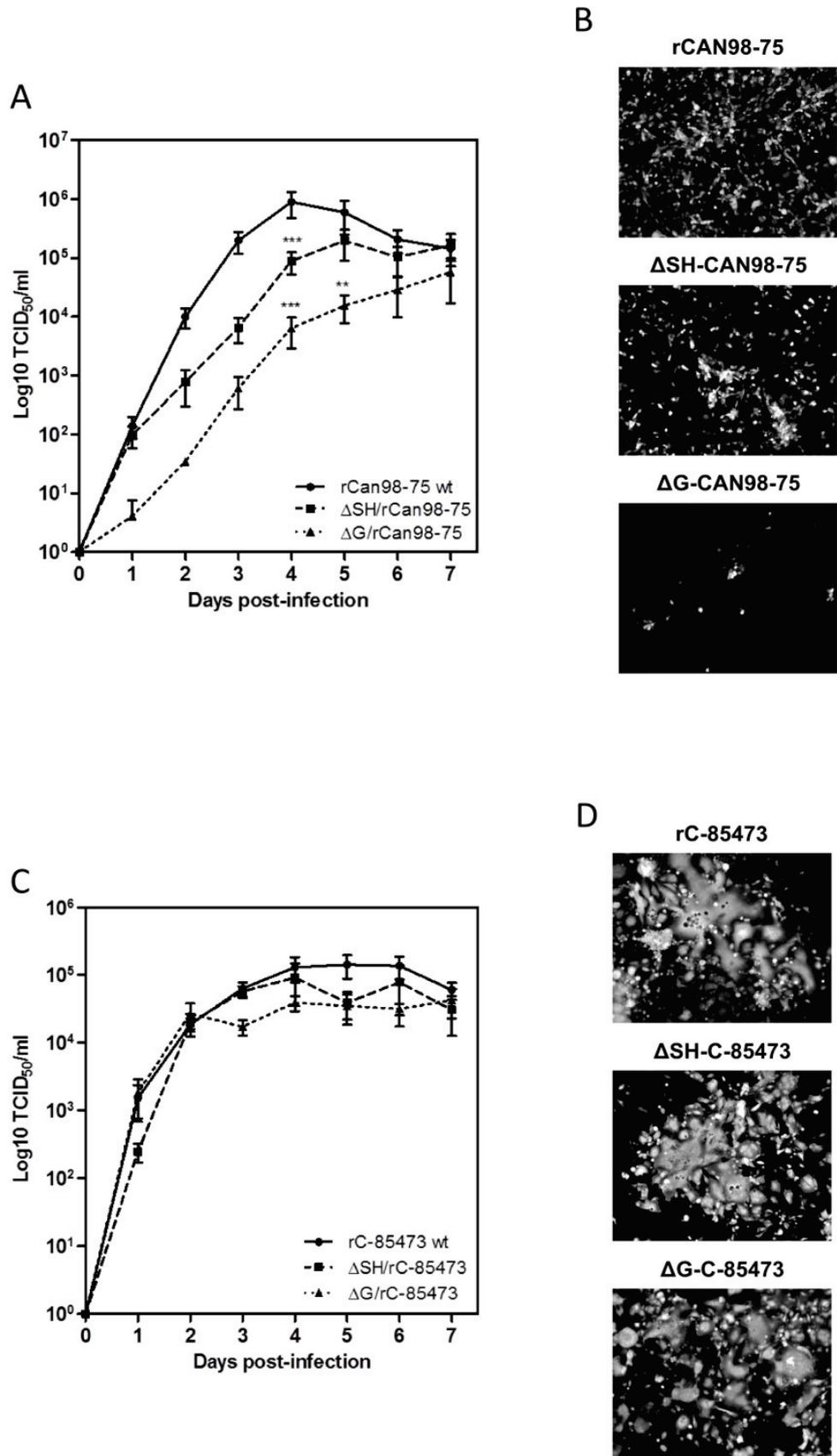
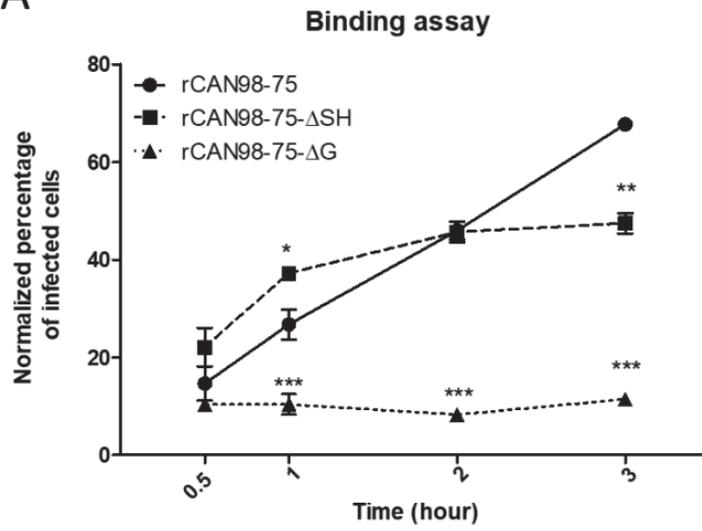


Figure 3

A



B

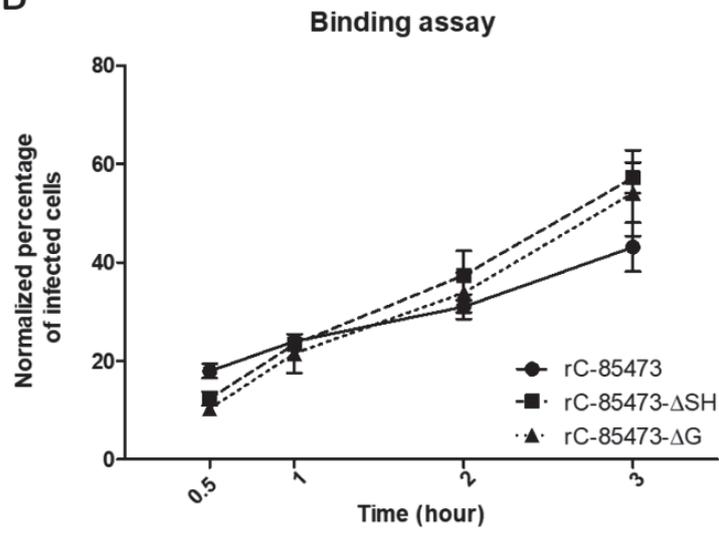


Figure 4

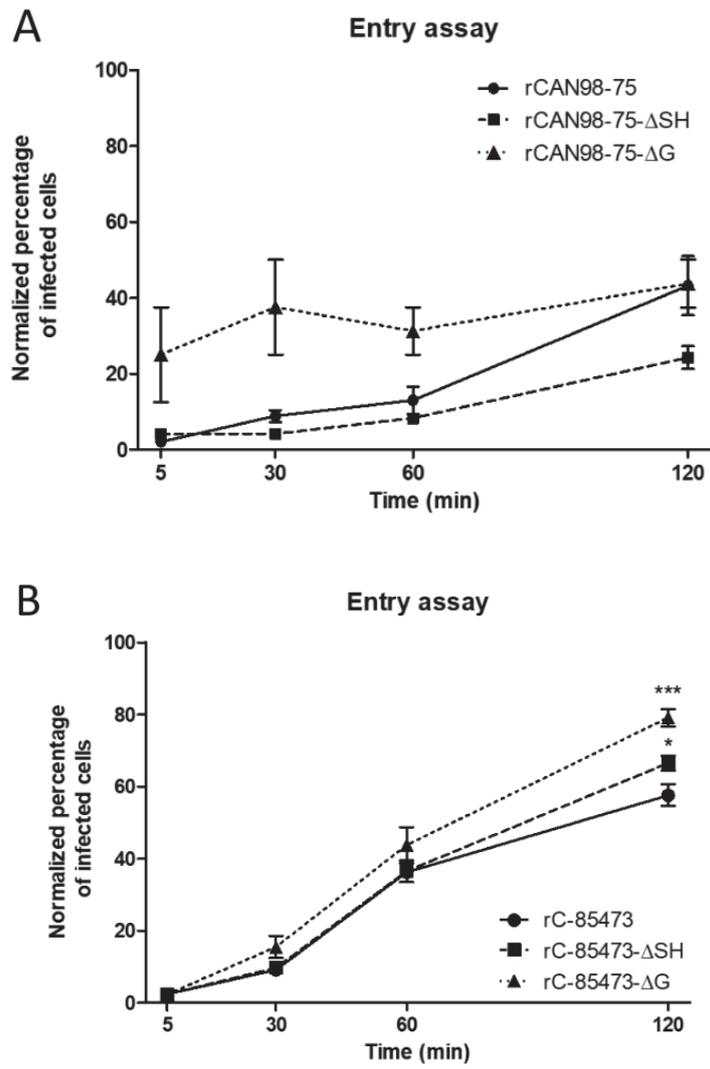


Figure 5

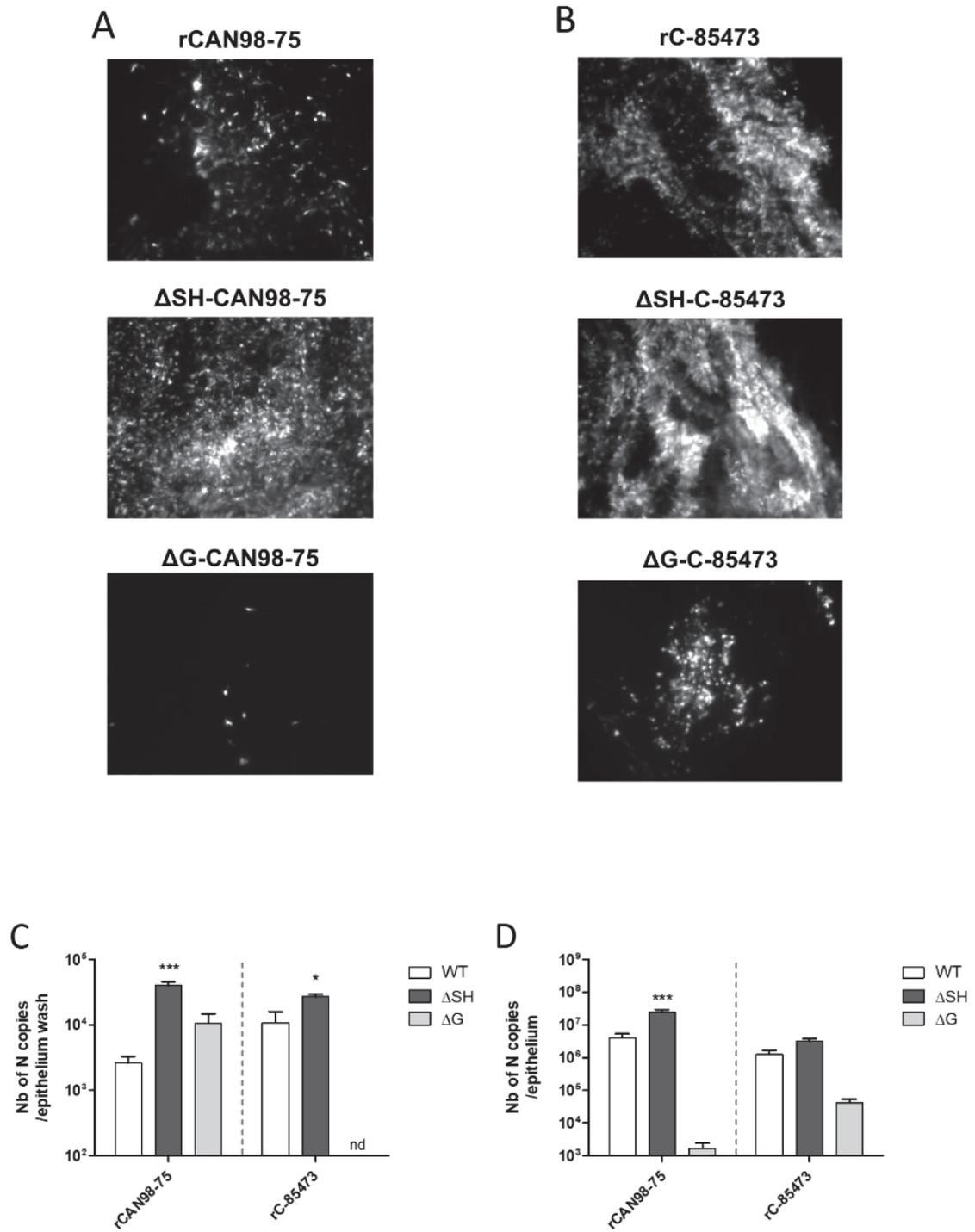
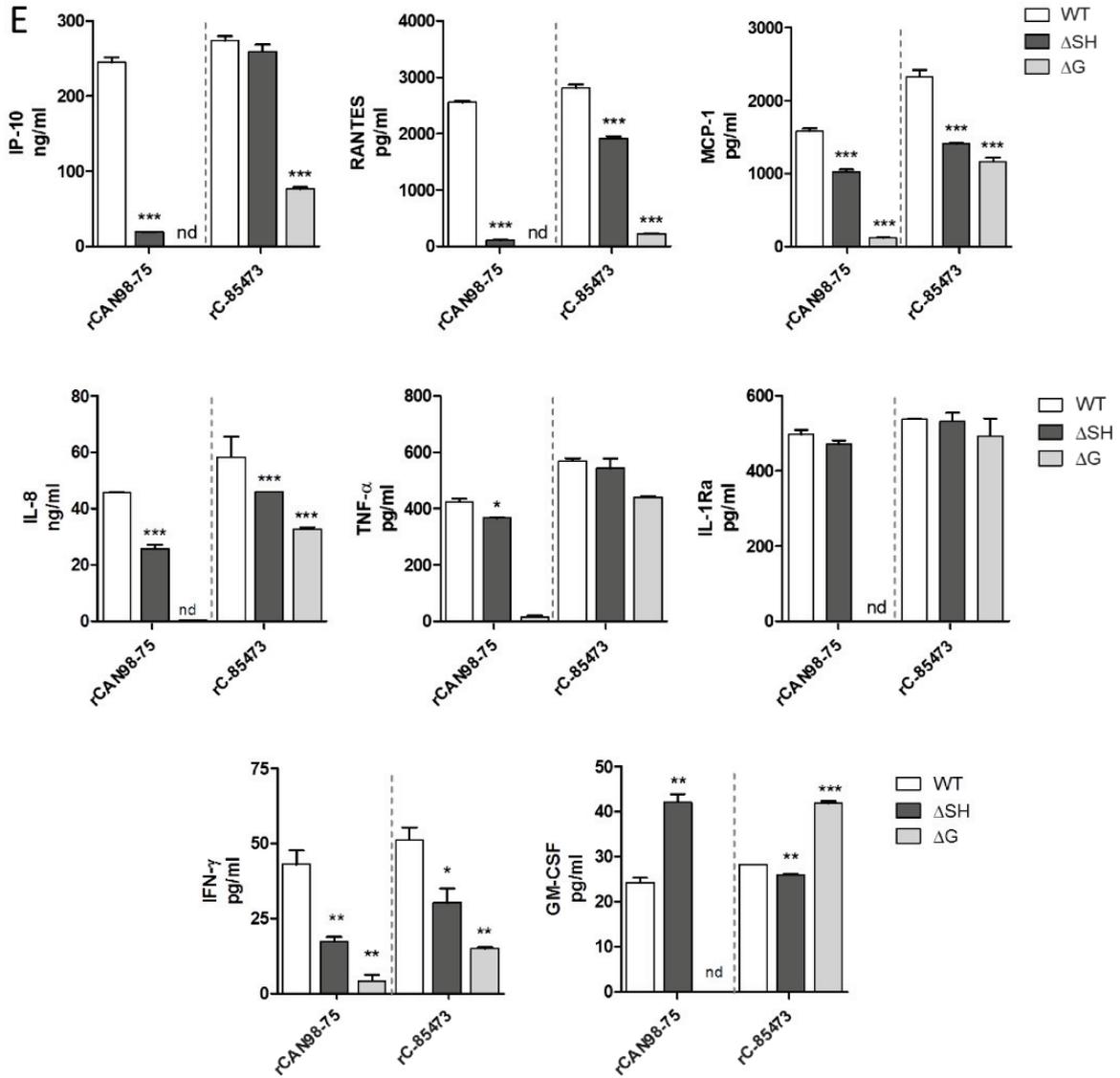


Figure 5 (suite)



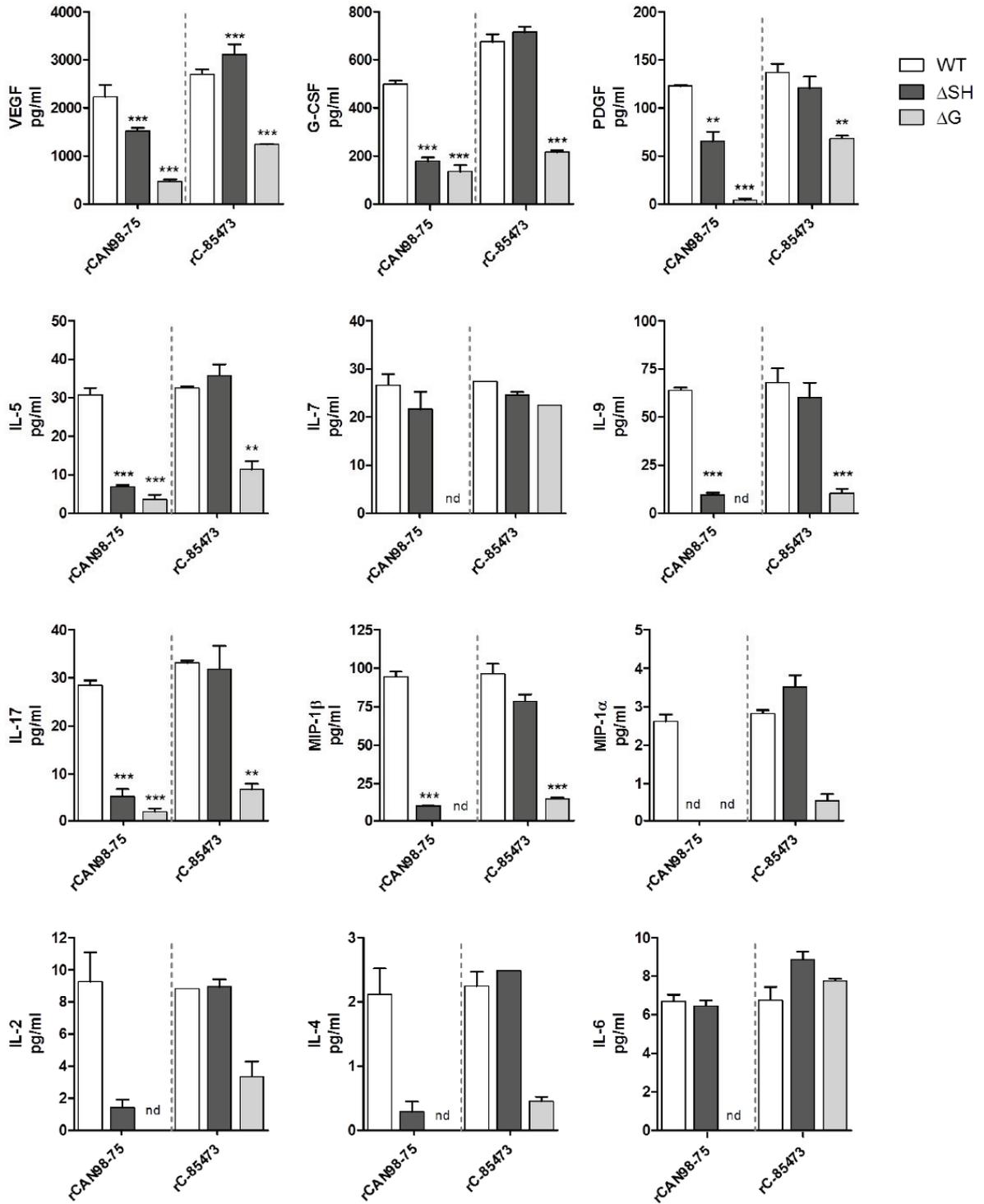
**Table 1 – List of primers used for gene deletion**

Gene deletion	Virus background	5' – 3' Forward	5' – 3' Reverse
ΔSH	A1/C-85473	GGGACAAGTAGTTATGGA	ACTCTGATGTGTTTTTACTAAC
ΔSH	B2/CAN98-75	GGGACAAGTGGCCATG	ATTCTATTTATTTTTTACTAACTT AAGTAAGCTT
ΔG	A1/C-85473	GAGACAAATAACAATGGAT C	ATATTATTGTTTTTACTTCTTAA ATT
ΔG	B2/CAN98-75	GGGACAAATAACAATGGAT CCGTTTGTGAATCC	ATTTTCTTGTTTTGTATTACTCAG TGATTG

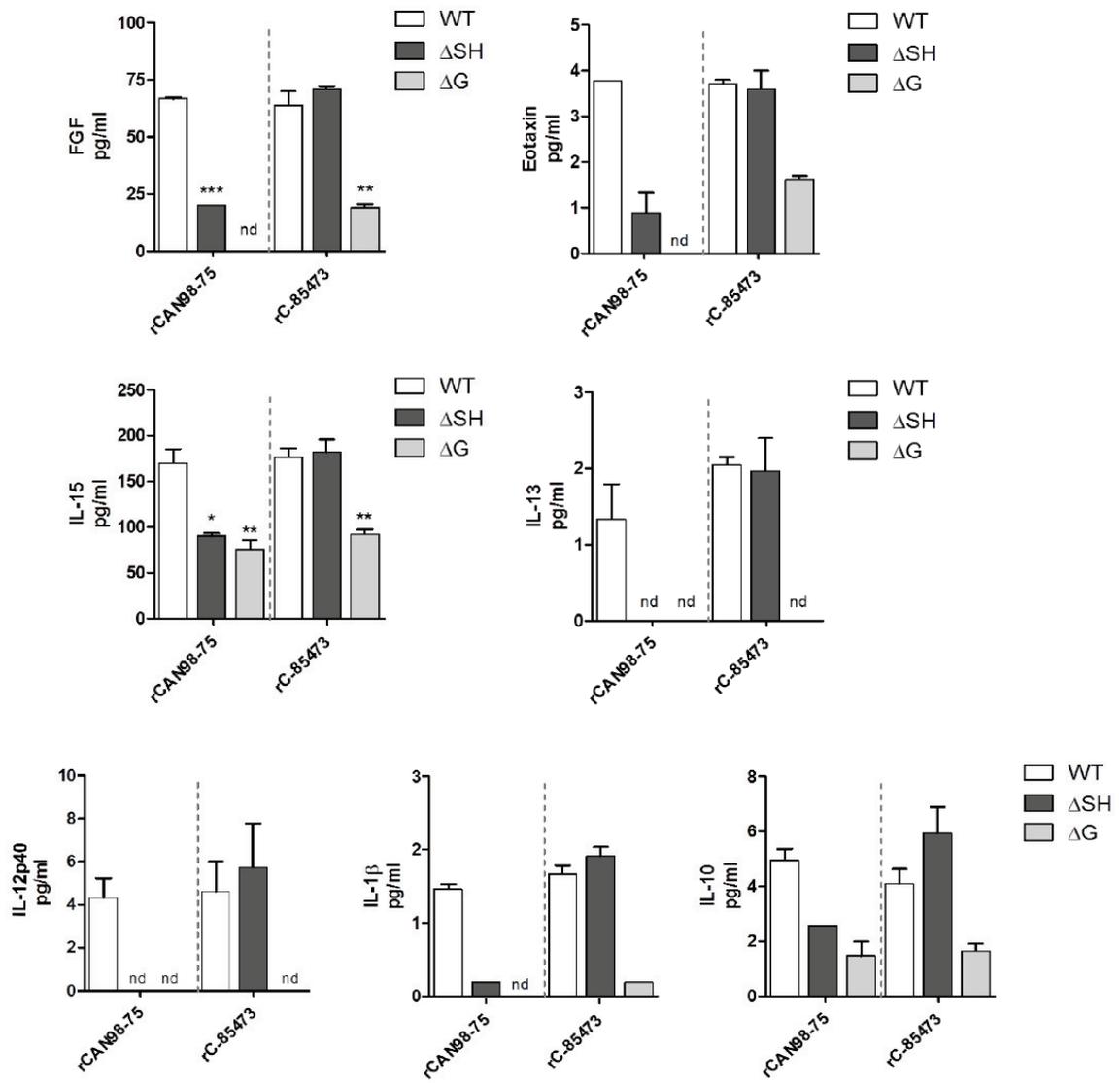
## Supplementary materials

<b>Supplementary Table 1 – Trans-epithelial electric resistance (TEER) values of infected HAE (day 5)</b>	
Recombinant virus	TEER value ( $\Omega$ )
CAN98-75-WT	1112
$\Delta$ SH-CAN98-75	683
$\Delta$ G- CAN98-75	1266
C-85473-WT	730
$\Delta$ SH-C-85473	1058
$\Delta$ G-C-85473	1293

Supplementary figure 1



Supplementary figure 1 (suite)



### 3.2.3 Résultats préliminaires *in vivo*, discussion et perspectives de ce travail

Comme mentionné dans la partie 1, les glycoprotéines G et SH des virus hMPV et leurs fonctions ont été peu décrites dans la littérature jusqu'à maintenant. Des études ont cependant démontré (i) qu'elles sont très peu conservées entre les groupes viraux ; (ii) qu'elles ne présentent pas de propriété immunogénique suffisante pour une immunisation efficace contre hMPV ; (iii) qu'elles sont accessoires pour la réplication virale *in vitro* et *in vivo* et que (iv) leur délétion peut conférer une atténuation virale *in vivo*, dans le cas de la protéine G (207, 242). D'autres études ont par ailleurs suggéré que ces protéines G et SH auraient un rôle immuno-modulateur (235, 236, 452). Ainsi, rétrospectivement, il est assez surprenant qu'aucune étude jusqu'ici n'ait été consacrées à l'évaluation du rôle des protéines G et SH dans la pathogénèse virale, en fonction des souches virales.

Dans ce contexte, nous avons comparé dans notre étude les effets *in vitro* de la délétion des gènes G ou SH entre les virus B2/CAN98-75 et A1/C-85473 et nos résultats montrent des effets cytopathogènes différents entre les deux virus, que ce soit en modèles cellulaires LLC-MK2 ou en modèle d'épithélium respiratoire humain reconstitué (MucilAir™). Les propriétés respectives de ces virus (réplication, attachement, entrée cellulaire et induction de cytokines) sont présentées en **Tableau 6**.

Il apparait que la délétion de la protéine G du virus CAN98-75 induit un retard important de réplication virale en cellules LLC-MK2, dû à un défaut d'attachement de la particule virale à la cellule cible, alors qu'elle n'affecte pas celle du virus C-85473. En revanche, dans le modèle d'infection MucilAir™, la délétion de G pour les deux virus CAN98-75 et C-85473 entraîne une diminution de la réplication et de la propagation virale, associée à une pathogénicité réduite en termes d'atteinte à l'intégrité de l'épithélium (mesurée par la mesure de la TEER) et d'induction de cytokines.

A partir de ces résultats et de ceux que nous avons publiés concernant l'hyperfusogénicité du hMPV (1, 2), nous avons émis l'hypothèse que la différence de contribution de la protéine G dans l'attachement et l'entrée cellulaire virale (en système LLC-MK2) pourrait être liée aux propriétés spécifiques de la protéine de fusion F selon la souche virale. L'hyperfusogénicité *in vitro* de la protéine F du virus C-85473 (1, 2), combinée à ses propriétés intrinsèques d'attachement cellulaire (199), pourrait ainsi

**Tableau 6 : Différentes contributions des protéines G et SH à la cytopathogénèse in vitro des virus hMPV en fonction de leur origine virale**

		Délétion de G		Délétion de SH	
		B2/CAN98-75	A1/C-85473	B2/CAN98-75	A1/C-85473
LLC-MK2	Réplication virale (Titres TCID <sub>50</sub> /ml)	Diminuée	Non affectée	Retardée	Non affectée
	Capacité d'attachement	Diminuée de 90%	Non affectée	Diminuée	Non affectée
	Capacité d'entrée	Élevée (considérant la quantité de virus attachés)	Augmentée	Diminuée	Augmentée
MucilAir™ (HAE)	Réplication virale (Titres TCID <sub>50</sub> /ml)	Fortement diminuée	Fortement diminuée	Augmentée	Légèrement augmentée
	Propagation virale	Fortement diminuée	Fortement diminuée	Augmentée	Augmentée
	Intégrité de l'épithélium	Non affectée	Non affectée	Très affectée	Peu affectée
	Sécrétion de cytokines	Absente	Fortement diminuée	Diminuée *	Diminuée *

MucilAir™ sont des épithéliums respiratoires humains reconstitués (HAE) fournis par Epithelix.

\* Certaines cytokines telles que RANTES, MCP-1, IL-8 ou IFN- $\gamma$ , fortement exprimées suite à l'infection avec le virus sauvage, sont diminuées alors que d'autres, telles que TNF- $\alpha$ , IL-1Ra, IL-7, sont faiblement affectées.

compenser l'absence de la protéine d'attachement G dans l'étape d'entrée virale et expliquer la différence de phénotype observée entre les deux virus. Cependant, bien qu'hyperfusogène en cellules LLC-MK2, le virus  $\Delta$ G-C-85473 démontre une atténuation importante en modèle d'infection MucilAir™. Ces différences de profil de cytopathogénèse selon le modèle cellulaire nous questionnent sur l'équipement cellulaire en surface respectif de ces modèles d'étude. En effet, il semble que la protéine F du virus  $\Delta$ G-C-85473 soit capable de se lier à des récepteurs présents en surface des cellules LLC-MK2, et ainsi permettre les premières étapes du cycle viral, à la différence des récepteurs de surface du modèle MucilAir™. Aussi, les divergences de phénotype des virus  $\Delta$ G-CAN98-75 (atténué) et  $\Delta$ G-C-85473 (non atténué) en modèle LLC-MK2 par rapport à leur souche sauvage respective, pourraient également

être expliquées par une reconnaissance différentielle des récepteurs cellulaires de surface.

En ce qui concerne la protéine SH, nos résultats montrent que sa délétion n'affecte pas ou peu la réplication des deux virus CAN98-75 et C-85473 en cellules LLC-MK2. Par contre, en modèle d'épithélium respiratoire humain, nous avons observé que cette délétion augmente de manière significative la réplication et la propagation virale. Cette augmentation de capacité répliquative est associée à une cytopathogénèse accrue dans le cas du virus CAN98-75, avec une atteinte importante de l'intégrité de l'épithélium, alors que dans le fond génétique C-85473, la délétion de SH n'induit qu'une diminution limitée du TEER. Parallèlement, nos mesures ont indiqué une diminution globale de la production de cytokines par les épithéliums infectés par les virus délétés de SH, en comparaison des virus sauvages respectifs.

Nos résultats semblent plutôt contradictoires avec ceux des deux études précédemment publiées qui rapportent le rôle immunomodulateur des protéines G et SH. Dans ces études, les délétions de G et SH entraînent une augmentation de la production de cytokines en lignée cellulaire pulmonaire humaine A549, potentiellement en réponse à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (236, 452). De nouveau, ces divergences de résultats s'expliquent probablement par l'utilisation de souches virales différentes (souche A2/CAN97-83 *versus* B2/CAN98-75 et A1/C-85473 dans notre étude) et de modèles cellulaires d'infection différents (lignée A549 *versus* lignée simienne LLC-MK2 et épithélium respiratoire humain MucilAir™). Cette discordance de résultats souligne également le manque de connaissance sur la protéine SH des virus hMPV, alors que celle-ci semble être impliquée dans la cytopathogénèse virale en modèle MucilAir™, d'après nos résultats.

Si ceux-ci étaient confirmés en modèle animal, l'approche de délétion de SH serait à proscrire dans le développement d'un vaccin vivant atténué hMPV. En revanche, le virus recombinant  $\Delta$ G-C-85473 semble constituer une base intéressante pour le développement d'un tel candidat vaccin :

- il est en effet fortement atténué en modèle d'épithélium respiratoire humain, avec notamment une restriction de propagation et de réplication, ainsi qu'une limitation dans la sécrétion induite de cytokines. Ces résultats préliminaires laissent d'ailleurs présager une possible atténuation significative *in vivo* pour ce virus recombinant ;

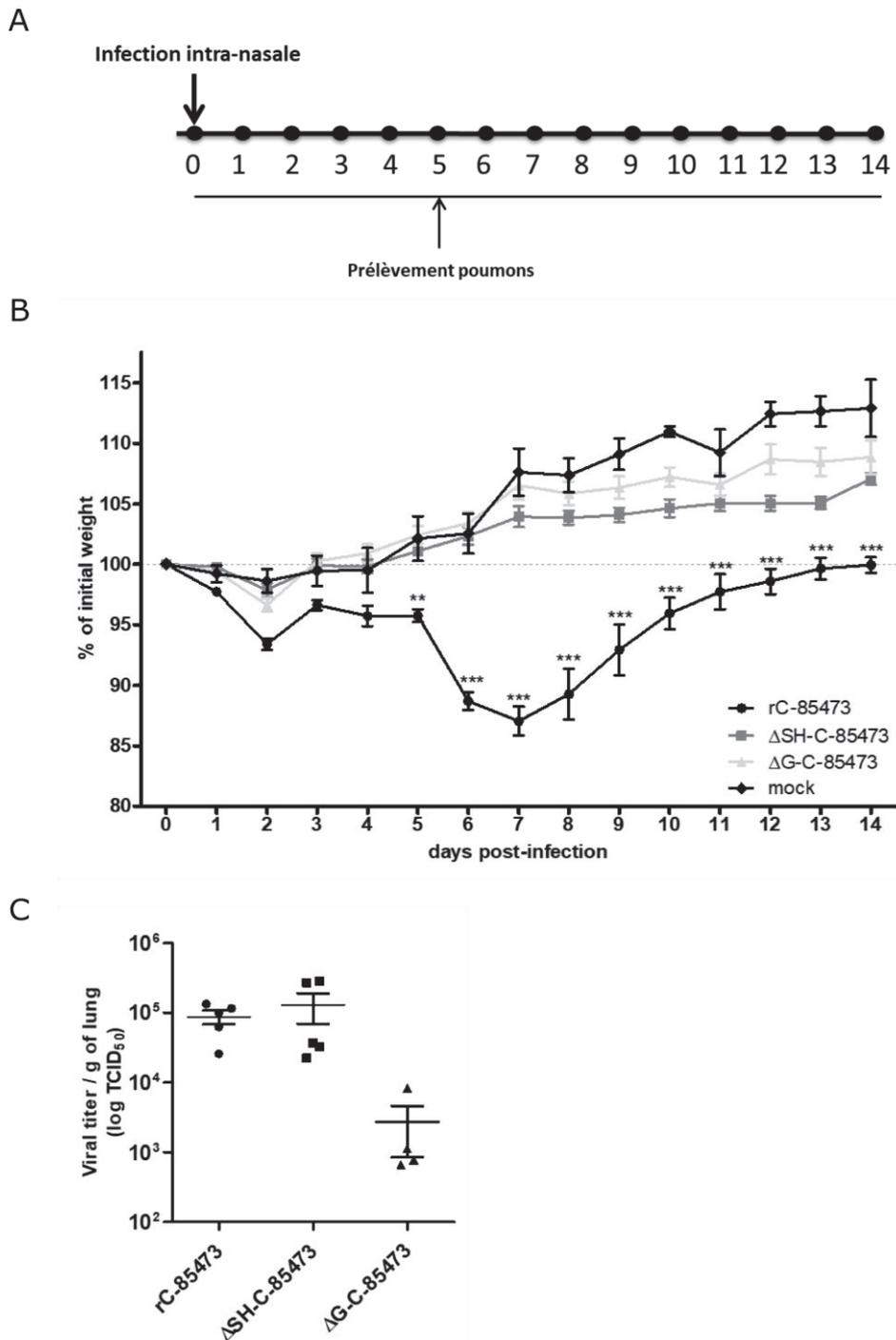
- il présente une réplication *in vitro* performante en lignée cellulaire LLC-MK2, ce qui permet d'envisager des capacités industrielles de production d'un tel candidat vaccin.

D'après la littérature, des infections expérimentales en modèle de hamster ont révélé que les virus hMPV SH- et G-délétés (basés sur la souche CAN97-83) présentent des propriétés immunogéniques intéressantes. Ce modèle d'infection a également montré que la délétion du gène SH entraîne une augmentation de la réplication virale pulmonaire, alors que la délétion du gène G l'atténue (242). Cependant, comme les hamsters ne développent pas d'infection symptomatique par le hMPV, l'utilisation de ce modèle rend difficile la caractérisation de la pathogénèse viro-induite *in vivo*. Pour cette raison, nous avons choisi de mener une première campagne d'expérimentation en modèle murin (souris BALB/c qui permettent une infection symptomatique par hMPV). L'objectif de cette expérience préliminaire était de caractériser notre potentiel candidat vaccinal  $\Delta$ G-C-85473 et de le comparer aux virus C-85473 sauvage et  $\Delta$ SH en termes de suivi de perte de poids (survie) et de mesure de titres viraux pulmonaires (**Figure 17**).

À la suite de l'inoculation intra-nasale de  $10^5$  virus, nous avons effectué un suivi journalier du poids et de l'état de santé général des souris infectées (**Figure 17**). Nos résultats semblent confirmer que les virus  $\Delta$ G-C-85473 et  $\Delta$ SH-C-85473 ont une pathogénicité atténuée *in vivo* car les souris infectées n'ont pas montré de perte de poids significative durant les 14 jours de suivi, à l'inverse des souris infectées par le virus C-85473 sauvage (**Figure 17 B**). Aucun symptôme physique évident de la maladie, tel que le pelage ébouriffé, n'a également été observé. D'autre part, les titres infectieux obtenus à partir des poumons de souris récoltés après 5 jours d'infection (pic théorique de réplication du virus C-85473 (2)) nous montrent que le virus  $\Delta$ G-C-85473 se réplique plus faiblement que le virus sauvage (bien que non significatif) et le virus  $\Delta$ SH-C-85473 (**Figure 17 C**).

Ces résultats préliminaires *in vivo* semblent cohérents avec ceux obtenus en modèle *in vitro* MucilAir™ quant aux capacités répliquatives de nos virus recombinants. Cela souligne entre autre la relevance physiologique du modèle MucilAir™ (suivi de l'intégrité épithéliale, de la mobilité ciliaire, de la propagation virale et de la sécrétion de cytokines/chimiokines) pour l'étude de l'infection hMPV en complément et/ou en préalable du modèle murin.

Sur la base de ces résultats, une nouvelle campagne d'expérimentation animale est programmée afin de (i) confirmer ces données préliminaires et (ii) de les compléter par l'évaluation de la réponse en anticorps neutralisants, du profil de



**Figure 17- Evaluation *in vivo* des candidats vaccinaux atténués.** (A) Des souris BALB/c de 4-6 semaines ont été inoculées avec  $10^5$  FFU des virus recombinants WT, ΔSH- or ΔG- C-85473. Le groupe contrôle négatif a reçu du milieu de culture OptiMEM. Les animaux ont été suivis pendant 14 jours pour leur perte de poids (B) et l'apparition de symptômes liés à l'infection. Au 5<sup>ème</sup> jour, au moment du pic de réplication virale théorique, 5 souris de chaque groupe ont été sacrifiées pour récolter leurs poumons et réaliser une titration virale (C). Les résultats obtenus avec les virus ΔSH / ΔG ont été comparé à ceux obtenus avec le virus WT par le test statistique ANOVA2. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

sécrétion pulmonaire de cytokines/chimiokines et l'analyse histopathologique pulmonaire des souris infectées par les virus C85473 sauvage,  $\Delta$ SH et  $\Delta$ G.

En fonction des résultats obtenus, un troisième protocole expérimental comparatif d'immunisation par les virus  $\Delta$ G-C-85473 et  $\Delta$ SH-C-85473 sera mené, suivi d'un challenge infectieux par le virus C-85473 sauvage (dose élevée) afin d'évaluer la protection éventuelle induite par notre candidat vaccin atténué  $\Delta$ G-C-85473.

En conclusion de cette étude, nous avons démontré que les protéines G et SH contribuaient de manière différente à la pathogénèse virale selon les souches hMPV considérées. Plus particulièrement, nous avons montré que le virus recombinant  $\Delta$ G-C-85473, dérivé d'une souche hyperfusogénique, présente des caractéristiques intéressantes d'atténuation en épithélium respiratoire humain cultivé in vitro, tout en conservant une capacité répliquative efficace en système cellulaire de production virale. Les expérimentations préliminaires d'infection en modèle murin semblent aussi prometteuses pour l'utilisation de ce virus  $\Delta$ G-C-85473 comme base de développement d'un candidat vaccin atténué hMPV. Les campagnes d'expérimentations animales programmées, en particulier de protection, permettront de statuer sur son potentiel vaccinal.

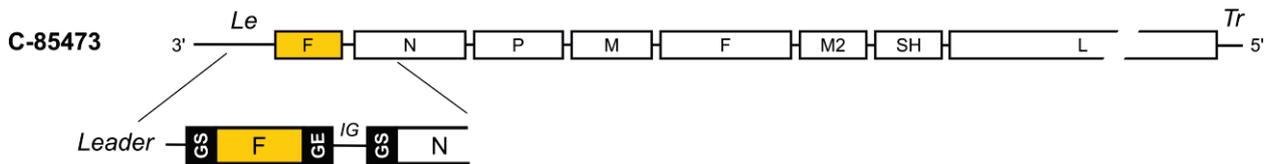
## PARTIE 3 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES GÉNÉRALES

Découvert récemment (2001), le virus hMPV a fait l'objet de relativement peu d'études en comparaison d'autres virus. Or, considérant l'impact sanitaire de ce pathogène, il est nécessaire d'enrichir nos connaissances sur ce virus et ses facteurs de virulence, notamment avec l'objectif de développer des stratégies vaccinales non seulement efficaces et sécuritaires, mais également adaptées aux différentes populations ciblées.

Dans cette dynamique, mes travaux de recherche de doctorat ont permis :

- D'identifier des déterminants-clé de la fusogénicité virale dans la glycoprotéine F du virus hMPV ;
- De mettre en évidence les contributions différentes des glycoprotéines G et SH dans la pathogénèse du hMPV, en fonction de leur souche virale d'origine,

De plus, les résultats préliminaires obtenus avec le virus recombinant  $\Delta G-C-85473$  permettent d'envisager de développer un nouveau candidat vaccin vivant atténué, qui pourrait également servir de plateforme d'expression à d'autres antigènes viraux, à l'image du Paramyxovirus recombinant chimérique PIV3 bovin/humain (rB/HPIV3) (405, 439). En l'occurrence, pour faire écho aux recommandations de l'OMS pour la mise au point d'un vaccin contre les virus hRSV, nous proposons d'adapter nos méthodologies de mutagénèse et notre système de génétique inverse pour générer un vecteur  $\Delta G-C-85473$  chimérique (sans gène rapporteur GFP) exprimant la protéine F de hRSV (**Figure 18**). Le fait (i) que ces deux virus soient phylogénétiquement et biologiquement proches ; (ii) que plusieurs études ont déjà démontré la faisabilité d'ajout de séquences codantes supplémentaires au génome d'hMPV, tout en conservant la viabilité des virus recombinants générés (429) ; et (iii) que ces virus touchent des populations de même tranche d'âge, fait qu'il serait intéressant d'évaluer cette approche de vaccins bivalents hMPV/hRSV sur la base de notre vecteur candidat  $\Delta G-C-85473$  (**Figure 18**).

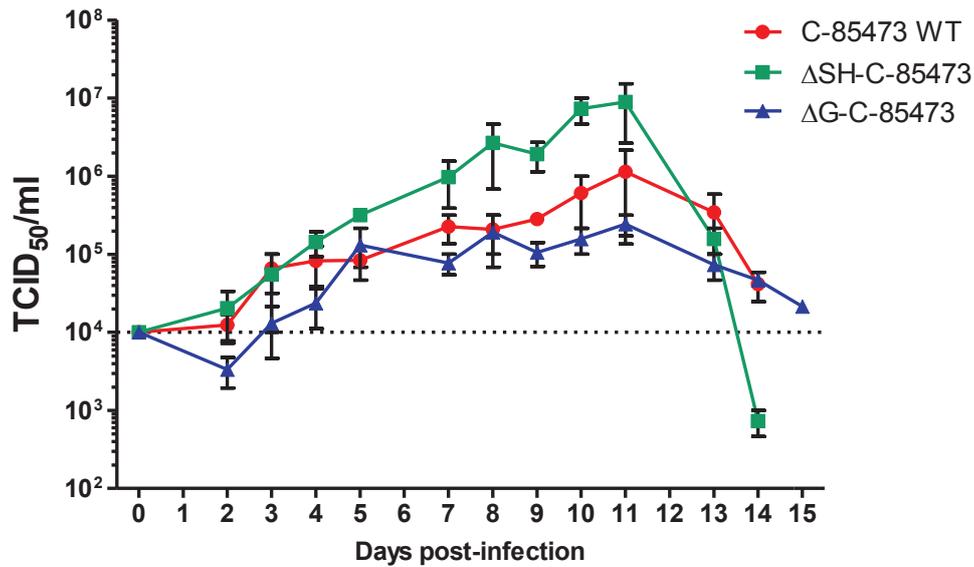


**Figure 18- Perspective de construction vaccinale bivalente hMPV/hRSV.** Le génome du candidat vaccinal bivalent serait constitué du génome du virus hMPV recombinant  $\Delta$ G-C-85473, dans lequel la séquence codante de la F du virus hRSV serait insérée à son extrémité 3' (entre la séquence *Leader* et le gène N) et flanqué de régions régulatrices Gene Start (GS) et Gene End (GE).

Ce type de construction nécessitera une évaluation exhaustive en termes de (i) stabilité et de conservation de l'atténuation *in vitro* et *in vivo* du vecteur vaccinal ; (ii) d'expression efficace des antigènes viraux hMPV et hRSV et (iii) d'efficacité d'immunisation et de protection contre les deux pathogènes viraux ciblés. A noter que la séquence codante de la protéine F de hRSV pourra être optimisée pour son expression (optimisation de codon) et sa stabilisation sous sa forme de pré-fusion (453). Cette approche pourrait être également utilisée pour exprimer d'autres antigènes viraux, tel que la protéine F des virus hPIV, pour lesquels aucune stratégie vaccinale n'est actuellement disponible.

Une autre problématique à laquelle se heurtera le développement d'un tel vaccin vivant atténué concerne son étape de production. En effet, les virus hMPV, et d'autant plus sous leur forme atténuée, se produisent difficilement dans les systèmes cellulaires, ce qui constitue un frein à leur développement industriel. Bien que notre candidat sélectionné  $\Delta$ G-C-85473 ne semble pas présenter de caractéristique d'atténuation *in vitro* sur cellules LLC-MK2 (cellules couramment utilisées pour la production hMPV à fins expérimentales), il serait intéressant de posséder une plateforme cellulaire de production plus adaptée à une échelle industrielle.

Dans ce contexte, j'ai participé au cours de mon doctorat à l'évaluation d'une lignée cellulaire aviaire en suspension, les cellules DuckCelt<sup>TM</sup>-T17. C'est une lignée de cellules pulmonaires de canard, développées par la société Transgene et qui est actuellement optimisée par le laboratoire VirPath pour la production de vaccins influenza (454). Concernant le virus hMPV, nos résultats préliminaires suggèrent qu'elle pourrait également constituer une plateforme de production, du fait de sa



**Figure 19 - Résultats préliminaires de production de virus hMPV en système cellulaire aviaire en suspension.** Les cellules DuckCelt™-T17 en suspension dans 10 mL de milieu de culture ont été infectées à une MOI de 0,01. Les titres viraux en milieu de culture ont été déterminés par TCID<sub>50</sub>/mL sur cellules LLC-MK2.

permissivité et de ces capacités d'amplification de nos virus recombinants C-85473 sauvage, ΔSH et ΔG (**Figure 19**). Notre candidat vaccinal ΔG-C-85473 semble se répliquer plus faiblement qu'un virus ΔSH-C-85473, ou C-85473 WT, mais des tests d'optimisation du procédé, notamment concernant l'inoculum viral, la cinétique virale, les conditions de récolte ou la composition du milieu, sont en cours.

En conclusion finale, nos résultats apportent de nouvelles perspectives au développement de candidats vaccinaux atténués contre hMPV. De plus, la caractérisation de ces candidats devrait contribuer à documenter davantage nos connaissances sur la pathogénèse des virus hMPV et la contribution de leurs glycoprotéines de surface (F, G et SH) dans la virulence des virus hMPV et la réponse immunitaire de l'hôte.



# PARTIE 4 : PROJET COMPLÉMENTAIRE INFLUENZA

## Avant-propos

L'étude des interactions fonctionnelles entre la cellule hôte et les pathogènes viraux respiratoires, tels que les virus influenza ou le métapneumovirus humain, constitue un des axes principaux de recherche du Laboratoire Virpath. Un focus particulier a été fait sur les dérégulations viro-induites de la voie de signalisation p53, gardienne de l'homéostasie cellulaire. Dans ce contexte, j'ai initié un projet d'étude sur les interactions fonctionnelles entre les virus influenza et les mécanismes d'épissage alternatif de p53 lors de mon stage de deuxième année de master, projet que j'ai poursuivi à mon retour au laboratoire Virpath (troisième année de thèse), en parallèle de mon projet principal sur le virus hMPV.

La réalisation de ce projet m'a tout d'abord donné l'opportunité d'écrire une revue (en premier auteur) publiée dans le journal scientifique *mBio* (**Article 2**), traitant de l'importance des mécanismes d'épissage cellulaire pour le cycle réplicatif des virus influenza. Ensuite, mes travaux, qui décrivent en particulier un nouveau facteur d'épissage cellulaire impliqué dans la régulation de l'expression des isoformes de p53, m'ont permis de rédiger un manuscrit (en premier auteur), qui a été soumis dans un journal international à comité de lecture, et que je présente dans cette partie 4 de mon manuscrit de thèse (**Manuscrit 2**). J'ai également eu l'opportunité de présenter mes travaux en communication orale dans un congrès international spécialisé sur les isoformes de p53 (*3rd international p53 isoform workshop*, à Bergen, Norvège, en juin 2017).

Enfin, sur la thématique des virus influenza, j'ai également contribué à l'avancement de deux projets, dont les résultats ont été publiés (**Annexe, Articles 4 et 5**) (4, 5) dans le journal *Scientific report*.

Etant donné que ce projet de recherche, bien que conséquent, ne soit que complémentaire à mon projet doctoral centré sur les virus hMPV, je ne présenterai ci-après qu'une introduction basique de la thématique d'étude des virus influenza.

# 1. Mise en contexte

## 1.1 Les virus influenza

Les virus influenza appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae*. Ils sont répartis en trois types, A, B et C, mais seuls les virus influenza de type A et B sont pathogènes pour l'Homme. Ce sont les agents étiologiques de la grippe saisonnière, provoquant des pathologies respiratoires légères à graves chez les populations à risque. En plus de leur capacité épidémique, les virus influenza de type A (IAV) font l'objet d'une surveillance particulièrement accrue, du fait de l'émergence et de la réémergence récurrente de souches réassortantes à l'origine d'épisodes pandémiques (H5N1, H1N1pdm09, H7N9) (455).

### 1.1.1 Description du virus

Les IAV sont des virus enveloppés composés de 8 segments génomiques d'ARN monocaténaire de polarité négative et organisés en complexe ribonucléoprotéique (vRNP) (**Figure 20**). Ces vRNP constituent des entités autonomes de transcription et de réplication. A ce jour, il a été décrit que le génome des IAV pouvait coder jusqu'à 15 protéines différentes *via* différents mécanismes de régulation, tels que l'épissage ou le décalage de cadre de lecture (456) :

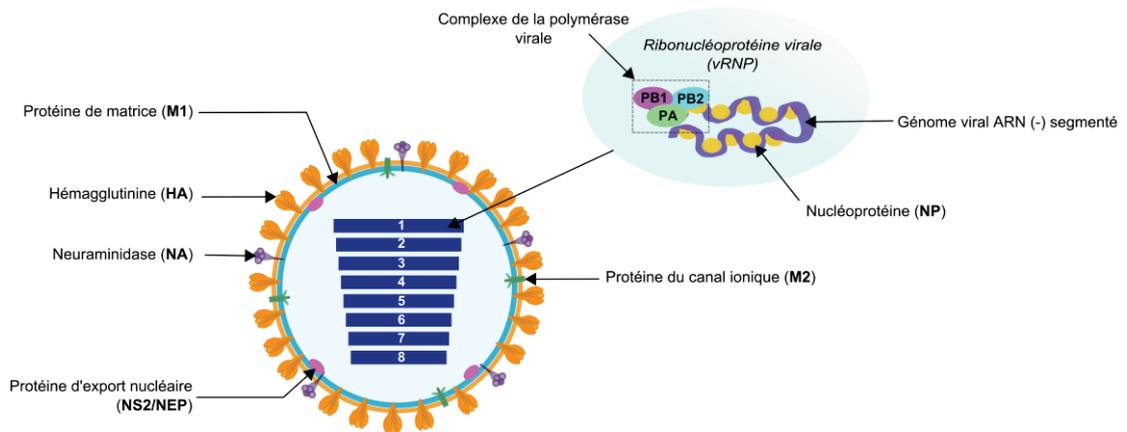
- les protéines de la machinerie polymérasique virale dont (i) PB2 (activité de vol de coiffes des ARNm cellulaires), issue du segment 1, (ii) PB1 (polymérase), codée par le segment 2 ; et (iii) PA (endonucléase), issue du segment 3. D'autres protéines dérivées de ces segments ont également été décrites, telles que PB1-F2, PB1-N40 (457, 458), PA-X et PA-X $\Delta$ 20 (459, 460) ;

- la nucléoprotéine NP (associée à l'ARN génomique) est produite à partir du segment 5 ;

- la protéine de matrice M1 (protéine de structure sous-jacente de la membrane virale), ainsi que les protéines M2 et M42 ayant des fonctions de canaux ioniques transmembranaires, sont issues du segment 7 (461) ;

- la protéine non-structurale et multifonctionnelle NS1 et le facteur d'export nucléaire de l'ARN viral NEP (produite par épissage) sont issues du segment 8 ;

- les glycoprotéines de surface hémagglutinine (HA) et neuraminidase (NA), sont issues des segments 4 et 6, respectivement. Ces protéines, impliquées dans les

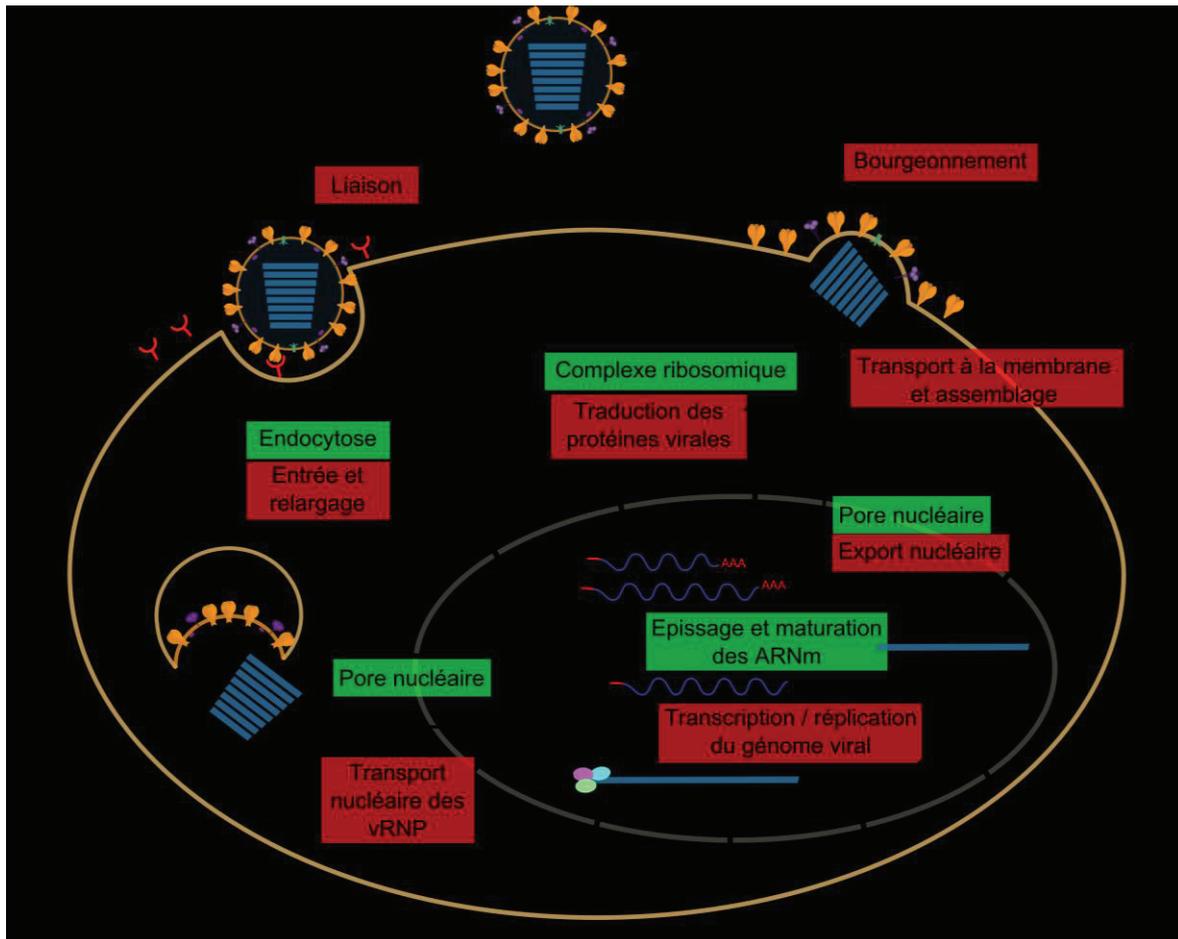


**Figure 20- Représentation de la particule virale influenza A.** Le virus enveloppé est recouvert à l'extérieur par les protéines de surface HA, NA et M2, et sur sa face interne membranaire, par la protéine de matrice M1. Le génome viral est composé de 8 segments d'ARN négatif organisés en complexes ribonucléoprotéiques (vRNP), qui sont composés de nucléoprotéines (NP) et des protéines du complexe polymérase PB1, PB2 et PA. Adapté de (3)

étapes d'entrée cellulaire et de bourgeonnement des virions néo-synthétisés, constituent également les antigènes des IAV, selon lesquels les virus sont classifiés en sous-types. A ce jour, il a été dénombré jusqu'à 18 variants de HA et 11 de NA (462, 463). Les combinaisons de ces glycoprotéines à la surface des virus conditionnent leur tropisme et leur fitness cellulaire pour leurs hôtes naturels, tels que les oiseaux aquatiques migrateurs, les porcs, les Hommes (H1, H2, H3 et N1, N2) ou encore les chevaux et les chauves-souris.

### 1.1.2 Cycle viral et détournement des machineries cellulaires

Comme les autres virus, les IAV parasitent leur cellule hôte et la réalisation de leur cycle de réplication dépend entièrement des machineries cellulaires qu'ils détournent à leur profit (**Figure 21**). Les approches haut débit de type transcriptomique et protéomique ont notamment permis de caractériser de très nombreux et complexes réseaux d'interactions fonctionnelles hôte-virus, en particulier avec les machineries cellulaires du métabolisme des ARNs (épissage, maturation et transport), de la traduction (étapes d'initiation et d'élongation) et de la modifications des protéines (phosphorylation, ubiquitinylation,...) (**Figure 21**) (464, 465).



**Figure 21- Cycle viral des virus influenza et détournement des mécanismes cellulaires.**

L'entrée du virus dans la cellule hôte est médiée par la HA qui s'attache aux acides sialiques à la surface cellulaire, entraînant l'endocytose du virus. L'acidification de la particule virale via le passage de protons à travers le canal ionique M2 provoque une dissociation des complexes ribonucléoprotéiques (vRNP) et leur relargage dans le cytoplasme de la cellule hôte. Les vRNP sont transportés vers le compartiment nucléaire où leur transcription et réplication ont lieu, utilisant le complexe de polymérase virale mais aussi des machineries cellulaires (transcriptosome) dont la régulation reste à caractériser. Les ARNm viraux sont coiffés en 3', polyadénylés en 5', puis exportés dans le cytoplasme pour leur traduction en protéines. De nouveaux segments génomiques viraux sont aussi synthétisés dans le noyau et exportés dans le cytoplasme pour être encapsidés par les protéines NP néosynthétisées, associés aux protéines polymérasiques, puis assemblés dans de nouvelles particules virales bourgeonnantes à la surface de la membrane cytoplasmique. Chaque étape du cycle viral (cadre rouge) est dépendante de mécanismes et de machineries cellulaires (cadre vert). Modifié de Dubois et al, 2014.

A la différence de la grande majorité des virus à ARN, les IAV effectuent leurs étapes de transcription et de réplication génomique dans le noyau des cellules infectées, ce qui leur permet un accès direct aux machineries nucléaires (**Figure 21**). Le détournement de la machinerie d'épissage cellulaire en particulier, constitue un enjeu important pour les IAV et notamment pour l'expression des protéines virales issues des segments 7 et 8, ainsi que pour l'inhibition de certaines réponses cellulaires à l'infection. Ces enjeux et les mécanismes viraux de détournement de l'épissage cellulaire ont été décrits dans la revue présentée en **article 2**.

D'une manière générale, l'étude approfondie des interactions fonctionnelles entre les IAV et les machineries cellulaires, dont ils dépendent pour leur cycle répliatif, est d'un d'intérêt grandissant, non seulement pour mieux comprendre la biologie fondamentale de ces virus, mais également avec un objectif de développer de nouvelles stratégies antivirales. A ce jour, peu de traitements sont disponibles pour lutter contre les infections à IAV. Or les molécules antivirales classiques sur le marché qui ciblent les déterminants viraux comme le canal ionique M2 (Amantadine, Rimantadine) (466) ou la neuraminidase NA (Oseltamivir, Zanamivir, Peramivir, Laninamivir) (467), présentent des limites importantes en termes d'efficacité (468), avec un risque récurrent d'émergence de virus résistants (469, 470). Dans ce contexte, une alternative serait de développer des molécules antivirales ciblant la cellule hôte et ses machineries moléculaires, afin d'induire un état cellulaire défavorable à l'infection (471). Plusieurs laboratoires, dont l'équipe du Dr Manuel Rosa-Calatrava en collaboration avec celle du Dr Guy Boivin, mènent de tels programmes de recherche et c'est dans cette perspective que mon travail sur les interactions entre les IAV et l'épissage de p53 s'est inscrit.

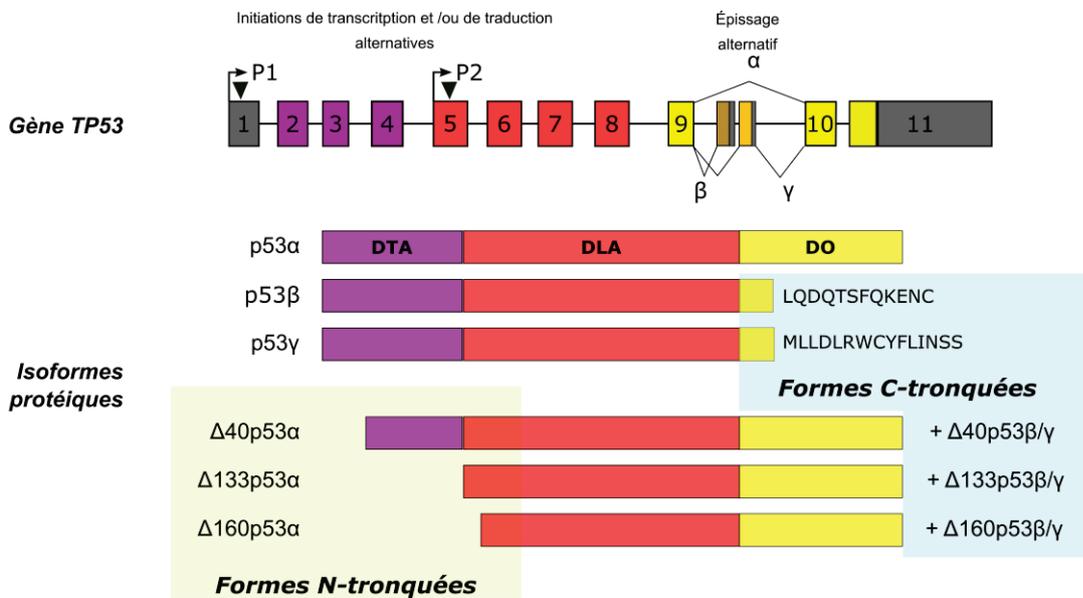
## **1.2 La voie de signalisation p53**

La réponse cellulaire face aux différents stress est médiée par une multitude de cascades intracellulaires de transduction du signal. Le facteur de transcription p53 est l'une des protéines cellulaires qui orchestrent et régulent la mise en place de telles réponses. En particulier, c'est son rôle prépondérant dans les réponses face aux dégâts de l'ADN cellulaire qui lui fait endosser le rôle de « gardien de l'intégrité du génome » (472).

### 1.2.1 Le facteur de transcription p53 et ses isoformes

Le gène *TP53* code pour le facteur de transcription p53 qui présente deux domaines de transactivation à son extrémité N-terminale, un domaine central de liaison à l'ADN et un domaine C-terminal qui permet son oligomérisation (**Figure 22**), en sa forme active tétramérique.

La forme canonique (p53, ou p53 $\alpha$ ) est une protéine de 53 kDa qui comporte la totalité des domaines fonctionnels cités précédemment. Pour autant, il a été décrit récemment qu'il existe une déclinaison d'au moins 12 isoformes de la protéine p53 (**Figure 22**). Celles-ci sont des formes tronquées en N-terminal (domaines de transactivation en partie amputés) et/ou tronquées en C-terminal (suppression du



**Figure 22- Représentation du gène humain *TP53* et des isoformes protéiques du facteur de transcription p53.** Représentation schématique du gène TP53 codant le facteur de transcription p53. Le gène TP53 est composé de 11 exons. La forme complète p53 $\alpha$ , issue du promoteur de transcription P1, est composée d'un domaine de trans-activation (DTA), d'un domaine de liaison à l'ADN (DLA) et d'un domaine d'oligomérisation (DO). L'ARNm transcrit à partir du promoteur P1 produit aussi la forme  $\Delta 40$  par l'utilisation d'un site secondaire d'initiation de traduction (triangle noir). De la même manière, les formes  $\Delta 133$  et  $\Delta 160$  sont produites à partir d'un deuxième promoteur de transcription P2 et d'un site d'initiation de traduction secondaire. Les formes tronquées en C-terminal sont issues d'un épissage alternatif entre l'exon 9 et 10. La forme complète ainsi que les formes en N-terminal se déclinent en formes épissées  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (adapté de Marcel et al, 2010).

domaine d'oligomérisation). Ces isoformes sont générées soit à partir de (i) différents promoteurs transcriptionnels du gène *TP53*, soit (ii) par l'utilisation de sites alternatifs d'initiation de la traduction, (iii) soit du fait d'évènements d'épissage alternatif entre l'exon 9 et 10 du gène *TP53*.

Le facteur de transcription p53 se lie de manière spécifique à des promoteurs de gènes grâce à la reconnaissance d'éléments de réponse, dont la séquence consensus est RRRCWWGYYY (473, 474). Jusqu'à 3661 gènes ont été identifiés par analyse à haut débit comme cibles théoriques de p53, parmi lesquels 340 gènes ont été étudiés et validés pour leur réponse au facteur p53 (475). Les mécanismes de transactivation spécifique en lien avec les isoformes et leur contribution dans la formation du tétramère actif de p53 sont encore mal décrits. Plusieurs études ont rapporté que certaines isoformes (p53 $\beta$  ou  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  notamment) présentent des activités spécifiques (476, 477), apportant ainsi une nouvelle complexité au modèle de régulation de l'activité transcriptionnelle de p53 et modifiant de fait, l'interprétation que nous avons du mode de fonctionnement de cette protéine (478).

### **1.2.2 Les rôles et les mécanismes de régulation de p53**

Quarante ans d'études et plus de 80 000 publications sur p53 illustrent bien l'importance mais également la complexité de ce facteur de transcription. D'abord décrit comme un oncogène dans les années 1980 (479, 480), puis ré-évalué comme suppresseur de tumeur par la suite (481), il est difficile de résumer ses rôles, tellement p53 est positionné au cœur d'un réseau cellulaire incroyablement dense, impliquant les mécanismes (i) de régulation de la réparation de l'ADN et du cycle cellulaire, (ii) de modulation de l'autophagie et de l'apoptose, (iii) de répression de la prolifération et de la pluri-potence cellulaire, (iv) de régulation de l'inflammation, ou encore (v) de régulation du métabolisme cellulaire (révisé en (482)).

Pour effectuer cette multitude de tâches, p53 est un facteur très finement régulé. Physiologiquement, son expression est maintenue à un niveau faible dans les cellules, notamment grâce à la présence de la protéine Mdm2, qui est une E3 ubiquitine ligase et qui agit comme inhibiteur spécifique de p53 en facilitant sa dégradation (483, 484). La protéine p53 peut aussi subir des modifications post-traductionnelles, dont des phosphorylations, des acétylations, des méthylations ou sumoylations ; autant de modifications qui participent à la variété d'actions et de niveaux d'activités de p53 (485). Il a été démontré que le facteur p53 peut être activé

par de très nombreux signaux de stress, aussi variés que les dégâts de l'ADN, l'hypoxie, l'activation d'oncogènes ou encore les infections bactériennes et virales (486, 487).

Les infections virales activent et détournent de nombreuses voies de transduction cellulaire, dont les plus couramment décrites, en particulier pour les IAV, sont celles de la phosphatidyl-inositol kinase 3 (PI3K/Akt), des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et IRF3 ou encore des TLR/RIG-I, ayant pour conséquence la mise en place d'une réponse antivirale efficace (488). Bien que moins étudiée, la voie de signalisation p53 est aussi l'une des voies de transduction impliquée dans la réponse cellulaire à l'infection, et en conséquence, de nombreux virus ont développé des stratégies de détournement et/ou de régulation de cette voie dans le but de favoriser leur réplication.

Initialement, la protéine p53 a d'ailleurs été décrite en 1979 en tant que protéine associée à un facteur viral, la protéine *Large T* du virus simien SV-40 (479, 480). Par la suite, p53 a été étudié dans le contexte de multiples infections virales, telles que celles des virus Herpes Simplex (489), papillomavirus (490), adénovirus (491) et des virus de l'hépatite B et C (492, 493). Dans le cas des IAV, plusieurs études ont mis en évidence des niveaux d'interactions directes et indirectes entre les IAV et la voie p53 (494, 495). Certaines de ces études ont été publiées par l'équipe du Dr Manuel Rosa-Calatrava qui a notamment démontré que la voie de signalisation de p53 est globalement réprimée par les IAV (496-499). Cette régulation se fait *via* l'implication de différentes protéines virales (NS1 et NP), dans le but de contrôler la balance entre la progression du cycle cellulaire et l'apoptose viro-induite d'une part, et de réguler la réponse interféron d'autre part.

De manière plus générale, ces études permettent de faire plusieurs constatations : (i) la voie de signalisation p53 est activée en cas d'infection et est impliquée dans la mise en place de la réponse cellulaire, dont la réponse interféron en cas d'infection virale ; (ii) les virus interagissent avec cette voie dans le but d'atténuer/détourner la réponse cellulaire et (iii) la voie p53 fait intervenir de très nombreux acteurs, interconnectés par des boucles de rétro-contrôle, et qui représentent autant de cibles potentielles des virus pour moduler cette voie de signalisation.

Dans ce contexte, il n'existe que très peu de publications relatives à la fonction des isoformes de p53 ; celles-ci demeurent encore peu étudiées et leurs rôles

fonctionnels sont encore discutés. Pour autant, de par leur activité modulatrice sur l'activité transcriptionnelle de la forme canonique p53 $\alpha$ , il est suggéré que la dérégulation de l'expression des isoformes de p53 puisse être impliquée dans la formation de tumeurs exprimant la protéine p53 sauvage (500). De plus, les isoformes p53 $\beta$ ,  $\Delta$ 40p53 et  $\Delta$ 133p53 en particulier, ont été corrélées au processus de tumorigénèse dans des cancers du sein, du colon ou encore des ovaires (501-504). Certaines études ont également suggéré que l'expression de ces isoformes puisse représenter un bio-marqueur de pronostic plutôt favorable des cancers (504).

Toutefois, la détection spécifique des isoformes est délicate, notamment les formes  $\beta$  et  $\gamma$  issues de l'épissage alternatif de p53, ce qui limite la description de leur impact dans les pathologies tumorales ou infectieuses. Aussi, les efforts consacrés à l'étude des isoformes de p53 pourraient mener non seulement à d'intéressantes avancées dans la compréhension globale de la voie de signalisation p53, mais également au développement de nouveaux outils de diagnostics et/ou thérapeutiques.

## 2. Résultats

Précédemment à mes travaux, le Laboratoire Virpath a décrit une inhibition globale de la voie de signalisation p53 par les IAV, associée à une sous-expression des ARNm de p53 et de plusieurs de ses gènes cibles (499). Consécutivement à cette étude, il a également été démontré que l'expression endogène des isoformes p53 $\beta$  et  $\Delta$ 133p53 est modulée au cours de l'infection IAV, et ce de manière variable selon les sous-types viraux (495). Par ailleurs, l'inhibition de l'expression endogène de ces deux isoformes induit un état cellulaire antiviral dépendant de la présence de la forme canonique p53 $\alpha$ . Ce résultat souligne d'ailleurs l'importance des isoformes dans la régulation globale de la voie p53 (495). Nous avons ensuite démontré que la protéine virale multifonctionnelle NS1 est capable d'interagir directement avec p53 pour en moduler son activité transcriptionnelle (494).

Basé sur ces résultats, mon projet avait pour objectif d'étudier les mécanismes viraux de dérégulation de l'épissage cellulaire (présenté en revue dans l'**Article 2**), en se focalisant en particulier sur les isoformes de p53 issues d'épissage alternatif. Une première piste de travail a été de s'intéresser à la protéine NS1, identifiée par l'équipe comme un interactant de p53 et connue pour interagir avec plusieurs composants de la machinerie d'épissage cellulaire (ou spliceosome), tels que les ribonucléoprotéines U2 et U6 (505), ainsi que de la machinerie de maturation/polyadénylation des ARNm, tel que la protéine CPSF4 (aussi nommée CPSF30) (506). Mes travaux ont conduit à l'identification de CPS4 comme nouveau facteur d'épissage cellulaire qui serait détourné par la protéine NS1 dans la dérégulation de l'expression endogène des isoformes de p53 au cours de l'infection par IAV. Ces travaux sont présentés ci-après dans le **manuscrit 2**.

Sont présentés dans ce chapitre :

- La revue scientifique (**Article 2**) intitulée « **Influenza A viruses and messenger RNA splicing: doing more with less** », écrit par Julia Dubois, Olivier Terrier et Manuel Rosa-Calatrava et publiée le 13 mai 2014 dans le Journal *mBio* 5(3):e00070-14 ; doi:[10.1128/mBio.00070-14](https://doi.org/10.1128/mBio.00070-14).
  
- Le **manuscrit 2** intitulé « **The non-structural NS1 protein of Influenza viruses modulates TP53 splicing through the host factor CPSF4** » et dont les auteurs sont Julia Dubois, Aurélien Traversier, Thomas Julien, Blandine Padey, Bruno Lina, Jean-Christophe Bourdon, Virginie Marcel, Guy Boivin, Manuel Rosa-Calatrava et Olivier Terrier. Ce manuscrit a été soumis à un journal international à comité de lecture.



MINIREVIEW

## Influenza Viruses and mRNA Splicing: Doing More with Less

Julia Dubois, Olivier Terrier, Manuel Rosa-Calatrava

Laboratoire de Virologie et Pathologie Humaine VirPath, Groupe VirCell, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France

J.D. and O.T. contributed equally to this work

**ABSTRACT** During their nuclear replication stage, influenza viruses hijack the host splicing machinery to process some of their RNA segments, the M and NS segments. In this review, we provide an overview of the current knowledge gathered on this interplay between influenza viruses and the cellular spliceosome, with a particular focus on influenza A viruses (IAV). These viruses have developed accurate regulation mechanisms to reassign the host spliceosome to alter host cellular expression and enable an optimal expression of specific spliced viral products throughout infection. Moreover, IAV segments undergoing splicing display high levels of similarity with human consensus splice sites and their viral transcripts show noteworthy secondary structures. Sequence alignments and consensus analyses, along with recently published studies, suggest both conservation and evolution of viral splice site sequences and structure for improved adaptation to the host. Altogether, these results emphasize the ability of IAV to be well adapted to the host's splicing machinery, and further investigations may contribute to a better understanding of splicing regulation with regard to viral replication, host range, and pathogenesis.

Influenza viruses A, B, and C (IAV, IBV, and ICV, respectively) belong to the family *Orthomyxoviridae*. Among these three types of viruses that infect humans, only IAV and IBV are pathogenic, with IAV being the most predominant worldwide. IAVs are classified into subtypes depending on their surface glycoproteins, hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) (e.g., H1N1, H3N2, etc.) (1, 2). Influenza viruses constitute a serious public health problem, causing severe illness and death within high-risk populations during seasonal epidemics and, more rarely but recurrently, IAV-related pandemics.

Influenza viruses contain a segmented genome of single-stranded negative-sense RNA. Each viral RNA (vRNA) segment is included in viral ribonucleoprotein complexes (vRNPs) that are encapsidated by viral nucleoproteins (NP) in association with a complex of three viral proteins (PB1, PB2, and PA for IAV/IBV and PB1, PB2, and P3 for ICV), forming the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (Fig. 1A) (3, 4). For all influenza viruses, after virus entry into the host cell, incoming vRNPs are transported toward the nucleus, where they are transcribed into viral mRNAs and replicated into new vRNAs by the viral polymerase with the support of the host RNA polymerase II and transcriptosome machinery (Fig. 1B) (5–7). Such a nuclear localization is uncommon for RNA viruses and highlights that influenza virus can directly interfere with the host nuclear machineries and their components. Evidence for this is illustrated during infection by a major remodeling of host nuclear ultrastructures (3, 8) and by multiple functional interactions between IAV and host nuclear factors, an example being the 5'-cap snatching from host pre-mRNAs to viral ones (reviewed in reference 9). Interestingly, influenza viruses have developed various strategies to optimize the coding potential of their segmented genome. Indeed, IAV and IBV possess eight vRNA segments, which have been shown to encode up to 17 and 11 proteins, respectively. ICV has seven vRNA segments that encode nine viral proteins (10, 11). In the case of IAV, segment 2 encodes the polymerase basic (PB) proteins PB1, PB1-F2, and PB1-N40 by using alternative translation initiation sites (12, 13); segment 3 encodes the polymerase acidic (PA) proteins PA and PA-X by a ribosomal frameshift, as well as two additional N-terminally truncated forms (PA-N155 and PA-N182) by using

alternative translation initiation sites (14, 15); and finally, segment 7 encodes the matrix (M) protein M1 and ion channel proteins M2 and M2e and segment 8 encodes the nonstructural (NS) protein NS1, nuclear export protein NS2/NEP, and NS3 by alternative mRNA splicing. Most knowledge about cellular and viral genome splicing comes from studies performed with adenoviral and retroviral models, which revealed the rich proteomic variety offered by a single viral genomic molecule (16, 17). In contrast, more limited data are available for other viral models, such as influenza virus.

In this review, we provide an overview of the current knowledge gathered on the interplay between influenza viruses and the cellular spliceosome, with a special focus on IAVs, which are better documented in the literature. While the splicing events of the two smallest IAV RNA segments were well described soon after the description of its genome, much remains unknown, and current studies working toward unraveling the fine regulation mechanisms of viral splicing are necessary to a better understanding of viral replication, host range, and pathogenesis mechanisms.

### CLASSICAL SIGNALS, EFFECTORS, AND REGULATORS OF PRE-mRNA SPLICING IN HUMANS

Splicing is an essential step for eukaryotic gene expression. To generate mature mRNAs for translation, introns/noncoding sequences have to be removed to allow exons, the genuine coding sequences, to be joined together accurately. Moreover, pre-mRNAs can undergo alternative splicing that provides a large assortment of mRNAs from the same nascent sequence and which contributes toward widening the proteomic diversity (18). The

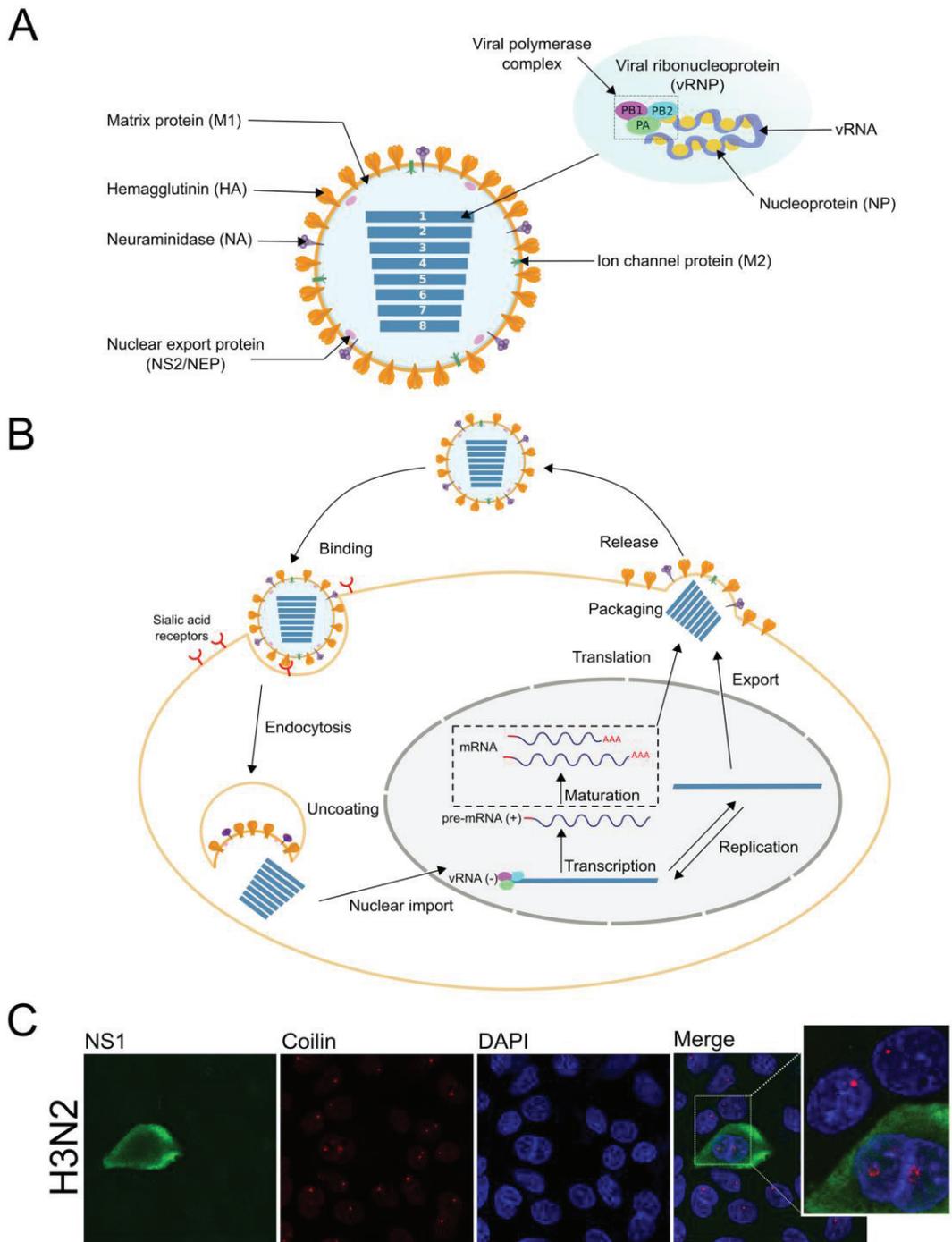
Published 13 May 2014

Citation Dubois J, Terrier O, Rosa-Calatrava M. 2014. Influenza viruses and mRNA splicing: doing more with less. *mBio* 5(3):e00070-14 doi:10.1128/mBio.00070-14.

Invited Editor Robert Krug, University of Texas at Austin Editor Peter Palese, Icahn School of Medicine at Mount Sinai

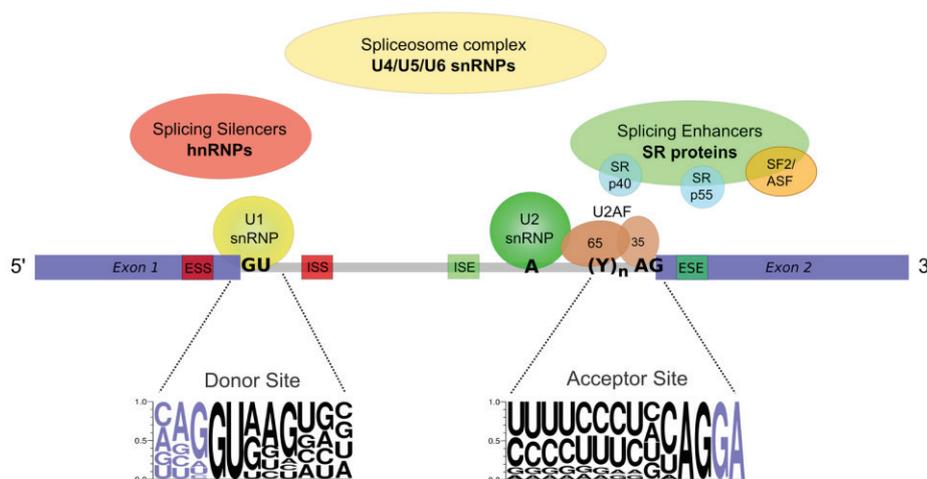
Copyright © 2014 Dubois et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported license, which permits unrestricted noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Address correspondence to Olivier Terrier, [olivier.terrier@univ-lyon1.fr](mailto:olivier.terrier@univ-lyon1.fr), and Manuel Rosa-Calatrava, [manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr](mailto:manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr).



**FIG 1** (A) Influenza A virus (IAV) particle. The IAV genome is composed of eight ribonucleoprotein complexes (vRNPs). Each one consists of single-stranded negative-sense viral RNA (vRNA) encapsidated by viral nucleoprotein (NP) and a viral polymerase complex (PA, PB1, and PB2) positioned at the extremity of the vRNA segment (depicted at top right). Three viral proteins are embedded within the viral membrane, hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA), and ion channel protein (M2). Matrix protein 1 (M1) underlies the viral envelope and holds the vRNPs inside the virion. NS2/NEP is involved in vRNP packaging into viral particles and remains inside, and it is associated with M1. (B) Influenza viral cycle. The viral particle binds to sialic acid receptors and enters the cell via

*(Continued)*



**FIG 2** Classical signals, effectors, and regulators of pre-mRNA splicing in human cells. Four intronic motifs are required for splicing of pre-mRNA: the donor site GU at the intronic 5' end (5' ss), the branch point A, the polypyrimidine tract (Y)<sub>n</sub> upstream from the acceptor site AG dinucleotide at the intronic 3' end, and the acceptor splice site (3' ss). The sequences surrounding both the donor and acceptor dinucleotides are highly conserved, as illustrated by the consensus sequence representations (20). For each sequence motif, the size of a nucleotide is proportional to its frequency at the given position obtained from sequence alignments. Colored nucleotides show the exon-intron boundaries. The spliceosome is composed of small nuclear RNAs and polypeptides in small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs), including the subunit U1, U2, U4, U5, and U6 snRNPs. In the first stages, U1 snRNP binds to the donor site, and then, with the help of splicing factors such as U2AF, the other subunits are recruited. The splicing process is also directed by the action of numerous regulators, which are serine-arginine-rich proteins (SR proteins), such as SRp40, SRp55, and SF2/ASF, and heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs). Splicing regulators recognize *cis* elements in the pre-mRNA sequence. SR proteins bind to enhancing signals, whereas hnRNPs recognize silencing ones (100). ESS, exonic splicing silencer; ISS, intronic splicing silencer; ISE, intronic splicing enhancer; ESE, exonic splicing enhancer.

splicing process is performed by the coordinated actions of a large ribonucleoprotein (RNP) complex known as the spliceosome, which is composed of five small nuclear RNAs (snRNAs) (U1, U2, U4, U5, and U6) in association with numerous regulating factors. The accurate activity of the spliceosome is supported by mRNA *cis*-acting classical signals that are specifically recognized by the ribonucleoprotein complex; these are the donor splice site (5' ss), the branch point site, the polypyrimidine tract, and the acceptor splice site (3' ss). Additional RNA motifs are also recognized by processing and splicing factors, including serine-arginine-rich (SR) proteins and heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) (Fig. 2) (19). SR proteins are characterized as splicing enhancers and act to stabilize the spliceosome assembly and modulate the selection of alternative 5' ss in a concentration-dependent manner. The best-characterized SR proteins, SF2/ASF, SC35, SRp40, and SRp55, are represented in Fig. 2 (20, 21). hnRNPs constitute a family of pre-mRNA-binding proteins that are associated with different functions, such as preventing the folding of pre-mRNA and exporting mRNA out of the nucleus (22).

Even though the major consensus motifs for classical splicing

signals in the human genome are now well established (Fig. 2), a complete picture of the integrated regulatory code that drives the splicing process remains to be deciphered (18, 20, 23–25). Indeed, splicing is considered one of the most complex processes occurring in the cell. Furthermore, this machinery is closely coupled with the transcriptosome, in which RNA polymerase II recruits splicing factors while nuclear export receptors are recognizing spliced mRNAs (reviewed in references 23 and 24). In this context, the ability of influenza viruses to hijack these processes demonstrates their impressive adaptation to their host.

#### ALTERATION OF HOST RNA MATURATION PROCESS BY INFLUENZA VIRUS

IAV interactions with the spliceosome are well illustrated by the delocalization of components within the nucleus, such as SC35 splicing factor and p80/coilin from speckle domains and Cajal bodies, respectively (Fig. 1C) (26). Such a remodeling makes it possible for IAV to alter cellular splicing and, thus, impact the biogenesis and maturation of host mRNAs. Indeed, numerous studies, including ours, have described a marked impact of influ-

#### Figure Legend Continued

receptor-mediated endocytosis. Acidification of the endocytic vesicles leads to virus uncoating mediated by the M2 ion channel. vRNPs are then released into the cytoplasm and transported into the nucleus. There, the viral RNA-dependent RNA polymerase complex snatches the host mRNA caps (red line) to initiate the negative vRNA [vRNA(-)] transcription. Transcribed vRNAs then need to undergo an mRNA maturation phase, including the pre-mRNA splicing (depicted in dotted-line box), before export to the cytoplasm to be translated. vRNAs are also replicated in the nucleus to generate new vRNPs in association with neosynthesized viral proteins. Progeny vRNPs are transported toward the cytoplasmic membrane with viral components to be packaged into new infectious particles which are formed by cellular envelope budding. Panels A and B are based on data from reference 3. (C) Coilin is used as an example to show IAV-induced modifications of host splicing factors in the nucleus. A549 cells were infected with influenza virus A/Moscow/10/99 (H3N2) at a multiplicity of infection of 0.1 for 24 h, fixed, and immunostained to study the localization of IAV NS1 (green) and coilin (red). DAPI was used to stain cell nuclei (blue). Coilin expression is strongly affected within infected cells compared with its expression in noninfected cells (well-defined spots).

enza virus infection on cellular gene expression (3, 27, 28). In addition to RdRp and cap-snatching activity, the other most influential viral factor contributing toward such an impact is suggested to be the NS1 protein, as it interacts with numerous cellular components through its RNA-binding and effector domains (29). Interestingly, NS1 can interact with several spliceosome subunits, including U2 and U6 snRNA in the classical complex but also U6atac, a U6 snRNA counterpart, in the case of minor donor-acceptor site combinations (Fig. 2) (30, 31). Thus, NS1 protein would appear to block cellular gene expression by inhibiting complete spliceosome recruitment and, therefore, the transition to an active splicing complex. However, as viral splice sites have been shown to match human consensus sequences, it was hypothesized that there is a mechanism that preferentially drives the splicing machinery toward viral mRNAs that need to be spliced, for which it would be worth considering the role that NS1 protein may have. Indeed, NS1 protein can efficiently bind the cellular 30-kDa subunit of CPSF (CPSF30), which is an essential component of the cellular 3'-end processing machinery (32). Through this interaction, NS1 protein globally inhibits the polyadenylation of cellular mRNA but not that of viral mRNA, which occurs independently of the cellular 3'-end processing machinery (33). In addition, NS1 also interacts with components of the mRNA export machinery, such as NXF1/Tap, p15, and Rae1, and with factors related to nuclear pores, like nucleoporin and Nup98, and has been shown to induce a blockage of host mRNA export (34).

Viral alteration of host RNA splicing and maturation steps is suggested to be a crucial point that balances cellular and viral expression throughout influenza virus infection, since it has been demonstrated that silencing of these cellular factors has a direct impact on viral production (35).

### SPlicing: A NECESSARY STEP FOR INFLUENZA REPLICATION

Among the classical stages of pre-mRNA transcription and maturation in eukaryotic cells, the influenza viruses have developed strategies to replace the host RNA polymerase II with a viral counterpart, as well as the 5' capping and 3' polyadenylation, but not the splicing process. Indeed, influenza virus mRNA splicing remains dependent on the host machinery.

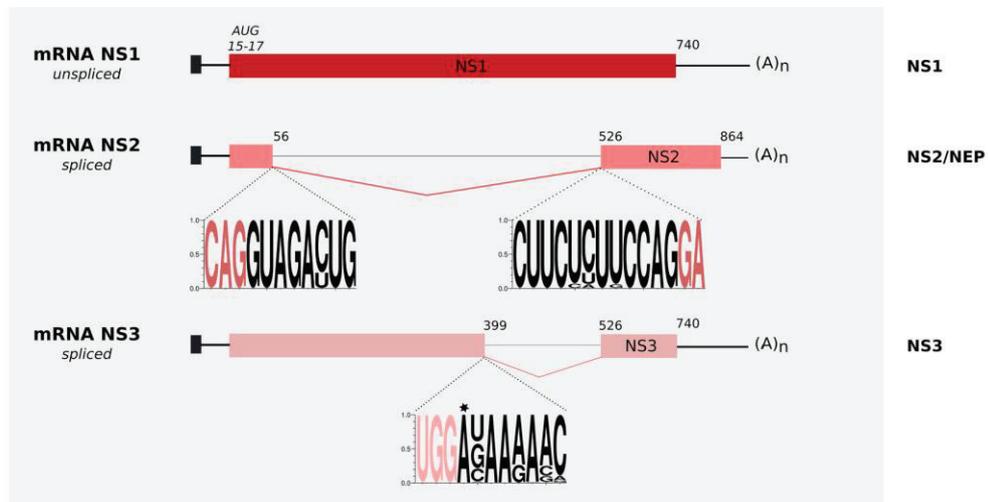
**Up to three overlapping coding sequences in the NS segment.** Splicing of IAV mRNA was first considered in the late 1970s after the discovery of a new 11-kDa viral polypeptide, named NS2 (also NEP), within influenza virus-infected cells (36). Using reassortant viruses and RNA hybridization techniques, Lamb and Choppin demonstrated that this ninth influenza virus protein was encoded by the NS segment, already known to encode NS1 (37). Further analyses, including S1 nuclease mapping of the NS segment, have highlighted its potential to produce two overlapping mRNAs from the same nascent sequence (38). Subsequent cloning and sequencing strategies then provided a more accurate understanding about these two distinct mRNAs (39). NS1 is encoded in the NS segment by a colinear transcript of 864 nucleotides (nt) in which the open reading frame (ORF) runs from codon position 15–17 to 738–740 in the A/Udorn/72 reference strain (Fig. 3A). The second mRNA, encoding the NS2 protein, is an interrupted transcript of 394 nt (Fig. 3A). The first section of the NS2 transcript (up to position 56) is identical to the NS1 transcript, and the second section corresponds with the end of the NS segment from position 526. At

this position, the ORF shifts to a different alignment, which leads to the translation of NS2/NEP.

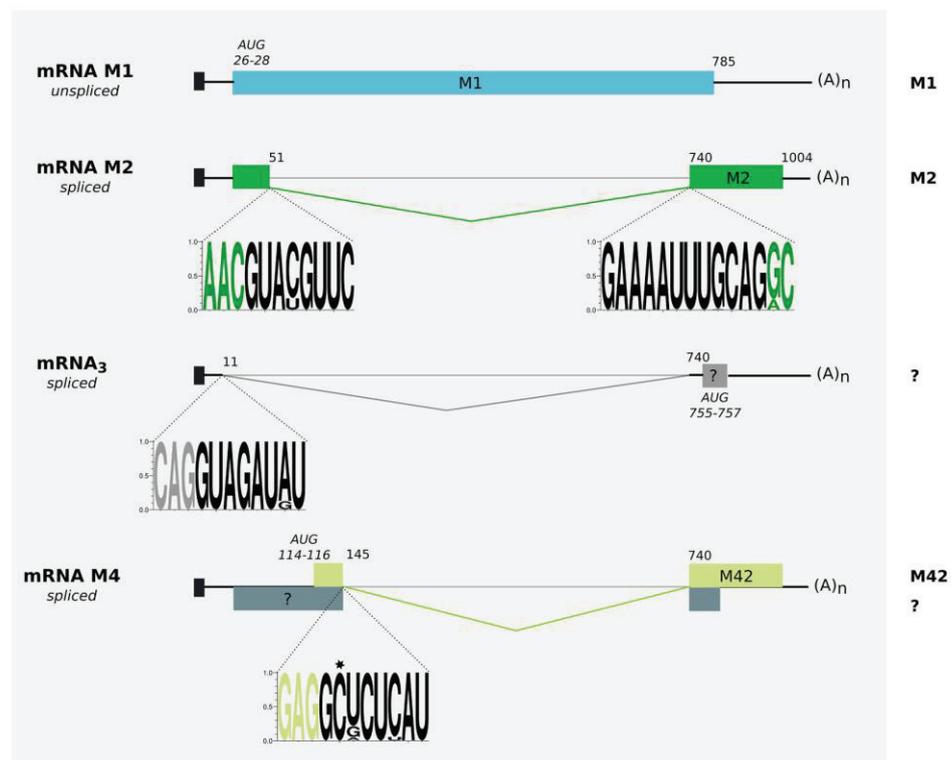
Further analysis of the interrupting sequence (positions 56 to 526) revealed similarities between the intervening sequences at both the 5' and 3' extremities and major cellular splicing consensus motifs. This provided support to the hypothesis for nuclear splicing of the NS transcript through recognition of joining sequences by the host spliceosome complex (39). This hypothesis was validated by Lamb and Lai through the construction of a simian virus 40 (SV40) recombinant vector with a chimeric NS/ $\beta$ -globin segment (40, 41). Using uninfected HeLa nuclear extracts *in vitro*, the NS segment was efficiently processed, proving that its joining sites were indeed splicing motifs that were recognized as classical cellular consensus motifs. However, a larger amount of spliced products was found upon the replacement of the NS 3' ss by its  $\beta$ -globin counterpart, indicating that the NS 3' ss was not optimal in the absence of infection (42). Based on the alignment of more than 500 complete NS sequences chosen from recent human and avian strains (2011 to 2012), we obtained the consensus motifs for both the 5' donor and 3' acceptor splice sites. The donor and acceptor dinucleotides (GU and AG motifs) and nucleotides in close proximity to these motifs were remarkably conserved (Fig. 3A) and very similar to the human consensus splice sites (Fig. 2). More recently, Selman and colleagues (43) have demonstrated the existence of a third NS transcript in the context of adaptation of a human virus (A/Hong Kong/1/1968 H3N2) within a mouse host. This viral transcript, encoding NS3, contains a novel 5' ss (GG/GUA) and the same 3' ss as NS2 mRNA. Nevertheless, the authors performed a bioanalysis of the Influenza Research Database and have only found this additional NS 5' splice site in a limited number of IAV strain sequences (43).

**One M segment template and four transcripts.** As with the NS segment, mapping strategies have been performed on the IAV M segment to confirm the description of three transcripts (mRNA M1, mRNA M2, and mRNA<sub>3</sub>) for only two expressed proteins, M1 and M2 (44, 45). The M1 protein is encoded by the M segment colinear transcript mRNA M1, in which the ORF runs from codon position 26–28 to 783–785 (Fig. 3B). The second protein (M2) is encoded by an interrupted M2 mRNA transcript that is similar to mRNA M1 until position 51. At this point, the sequence is interrupted up to position 740, resulting in an ORF shift during translation such as that described for the NS2 transcript (Fig. 3B). Based on the unraveling of the splicing process occurring for the NS segment, the extremities of the interrupting sequence of mRNA M2, AC/GUA in the 5' ss and CAG/G in the 3' ss, were described as matching well with human consensus splice site motifs (45). In addition to these two coding mRNAs, a third transcript, mRNA<sub>3</sub>, has been described for segment M (45). mRNA<sub>3</sub> consists of the first 11 nucleotides and the last part of the colinear sequence, from position 740 (Fig. 3B). The mRNA<sub>3</sub> 5' joining sequence (CAG/GUAGAU) is located upstream from the mRNA M2 counterpart and has been described to be a much better match to the human consensus 5' ss than the M2 5' ss (40). Although a potential initiation codon is localized at position 755–757, no corresponding protein product has ever been detected for mRNA<sub>3</sub>. The construction of chimeric M/ $\beta$ -globin sequences in a recombinant SV40 vector has confirmed that all of these viral sites undergo nuclear splicing using the host machinery in the absence of infection, similar to the results for the NS study (40). Additionally, a fourth mRNA product (mRNA M4) was later discovered in

A



B



**FIG 3** Splicing of influenza NS and M segments. (A) There are up to three overlapping coding sequences in the NS segment. A full-length NS transcript is usually 864 nucleotides (nt) long and is terminated by a short polyadenylation motif at the 3' extremity. NS1 protein is encoded by a colinear transcript from the initiation codon at position 27–29 to the termination codon at position 738–740. NS2/NEP protein is encoded by an interrupted transcript that is identical to the first section of the NS1 transcript (up to position 56), with a second section that is similar to the end of the NS segment from position 526 to 864. The black boxes at the 5' ends represent leader nonviral sequences of 10 or 11 nt. The viral transcript encoding NS3 contains a novel 5' ss (GG/GUA) and the same 3' ss as NS2 (Continued)

A/WSN/33 (H1N1) and in a limited number of other IAV strains (46). This mRNA M4 corresponds to the first 145 nt of the colinear transcript followed by the last part of mRNA M2 from position 740 to the poly(A) site and encodes M42 (Fig. 3B). Although a small peptide of 54 amino acids was expected from ORF1 initiation, it has never been detected in infected cells, but more recently, another coding sequence was predicted from an additional initiation codon at position 114–116 (Fig. 3B). Wise and colleagues have suggested that M42 could play the role of a functional alternative to the ion channel in M2-deficient strains (47).

Based on the alignment of more than 600 recently completed M sequences (2011 to 2012), we obtained the consensus motifs for all previously described 5' and 3' splice sites (Fig. 3B). Our analysis highlighted a marked conservation of the 3' ss motifs among the influenza virus sequences studied. This motif is, however, less closely matched to the human consensus 3' ss than its NS counterpart, with a notable G>>A polymorphism localized just after the acceptor site dinucleotide AG at the end of the 3' ss (Fig. 2 and 3B). The three distinct 5' ss present different levels of conservation, with the motif corresponding to mRNA M4 being the least conserved. Interestingly, the comparison of the 5' ss motifs for mRNA M2 and mRNA<sub>3</sub> with the human consensus sequences confirmed the observation made by Lamb and Lai indicating that the mRNA<sub>3</sub> 5' ss motif matches the human consensus 5' ss more closely than the M2 5' ss (40).

**Expression of the spliced NS and M products is highly regulated.** The amounts of cellular mRNAs and proteins from each spliced viral product evolve differently during IAV infection. Indeed, NS1 protein is detected early after the initial infection, and then M1 appears a little later, followed by the expression of NS2/NEP and M2 (48). More precisely, while it is assumed that the ratio of spliced to unspliced mRNA of the NS segment is maintained in cells at around 10% throughout the infection cycle, the quantity of NS1 protein increases continuously with time until the later stages of infection (49). Alternatively, it has been shown that higher levels of M1 mRNA are detected during the early stages of infection compared with the levels of M2 mRNA, the ratio of unspliced to spliced decreasing as M2 mRNA is more highly expressed later during infection (50). Wise and colleagues showed that strain-specific single-nucleotide changes in the 5' ss result in marked alterations of splice site usage (47). It is worth noting that the splicing efficiency seems to be strongly dependent on the virus strain considered. Indeed, Robb and Fodor reported a completely different pattern of the unspliced-to-spliced ratio with another influenza A virus strain, A/WSN/33 (51). In this case, the major

mRNA detected is the spliced M2 transcript, followed by mRNA<sub>3</sub> and mRNA M4, whereas M1 mRNA represents only 8% of the mRNA products from the M segment. Throughout infection, these viral proteins strongly affect the outcome of viral replication: NS2/NEP is required for nucleocytoplasmic transport of vRNPs, and M2 is an important factor in viral pathogenicity, as demonstrated by splice site mutations resulting in deficient viruses (52–54). Thus, the occurrence of an adapted and specific regulation of viral splicing in infected cells appears essential for viral replication.

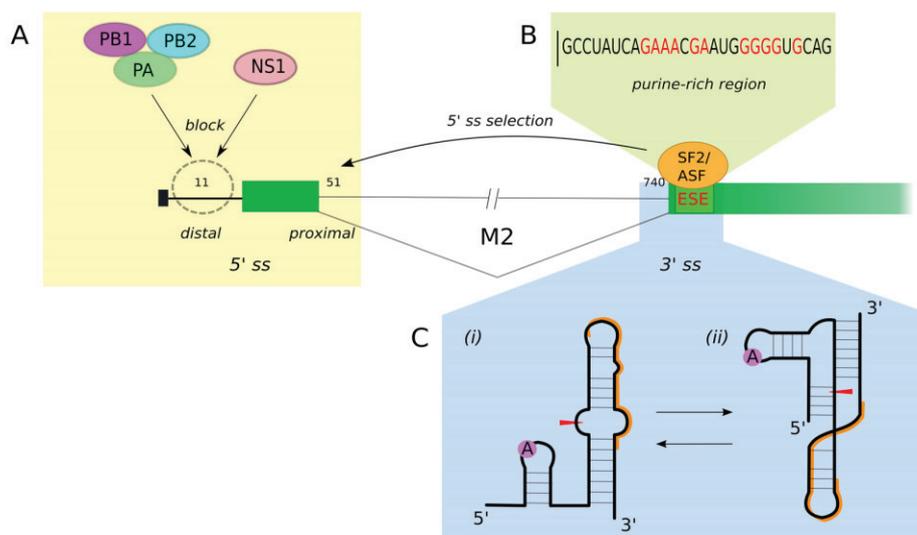
#### UNDERSTANDING THE MECHANISM AND REGULATION OF NS AND M SPLICING

Using actinomycin D-induced inhibition of RNA polymerase II, it has been determined that each viral mRNA has an equivalent half-life, and therefore, the possibility of regulation via a difference in their stability and fate in the cytoplasm can be ruled out (50). Several hypotheses remain and seem to differ according to the nature of the viral transcripts and the stage of infection; they include (i) direct regulation by *cis*- and/or *trans*-acting elements targeting the splicing process, (ii) indirect regulation via differential export of viral mRNA, and (iii) a combination of both.

**Clues for direct regulation of viral splicing.** The first studies investigating the regulation of viral splicing focused on the stability of the splicing complexes required for accurate viral processing. During splicing progression, the spliceosome dynamically recruits factors that form different complexes at each step of the process. The first one sediments at around 55S on a sucrose gradient and is considered a marker for efficient splicing. *In vitro* experiments in the absence of infection reported that the NS1 transcript can form more stable 55S complexes than cellular mRNAs and could therefore alter the dynamic progress of the machinery, resulting in low or absent production of NEP mRNAs (55). In fact, using a chimeric  $\beta$ -globin–NS transcript, a large intronic sequence has been identified as being responsible for such a blockage (56). Although this is not an inhibition dependent on the nature of the nucleotide sequence, it has been hypothesized that such a *cis* element would be necessary for regulating an mRNA conformation that resists spatial rearrangements and thereby interferes with splicing progression (56). In addition to their previous observations about the NS2 3' ss being less efficient than its  $\beta$ -globin counterpart, Nemeroff and Krug hypothesized that a secondary structure, including 3' ss, inhibits the splicing mechanism. However, this blockage is partially lifted during infection, as NS2 mRNA is produced in a 1:10 ratio, confirming that a virus-specific factor and/or infection context are involved, as previously

#### Figure Legend Continued

mRNA. This novel 5' ss was only observed in a limited number of IAV strain sequences. The noncoding and coding sequences are represented as thin lines and colored boxes, respectively. The positions and sequences of both splice sites are detailed. "A(n)" at the 3' extremity is the polyadenylation motif. Consensus motifs corresponding to the 5' ss and 3' ss were generated using weblogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>) (101) from a sequence alignment of 541 complete NS sequences (human and avian origin, 2011 to 2012) obtained from the Influenza Research Database (<http://www.fludb.org/>) (102). (B) One M segment template has four transcripts. The full-length M transcript is 1,004 nt. The M1 protein is encoded by the colinear transcript from the initiation codon at position 26–28 to the termination codon at position 782–784. The M2 protein originates from the interrupted mRNA M2, which has a sequence in common with that of the mRNA M1 until position 51 and then, at the 3' end, consists of the full-length transcript from position 740. mRNA M2 shares the same initiation codon with mRNA M1 but switches to another open reading frame (ORF) in the last part of the mRNA. mRNA<sub>3</sub> is interrupted from position 11 to 740, and mRNA M4 from position 145 to 740. Only mRNA M4 codes for a third protein (M42), using another initiation codon at position 114–116. Black boxes at the 5' ends represent nonviral leader sequences of 10 or 11 nt. The noncoding and coding sequences are represented as thin lines and colored boxes, respectively. The positions and sequences of all efficient splice sites are detailed. "A(n)" at the 3' extremity is the polyadenylation motif. Using the same methodology as described in the legend to panel A, consensus motifs for the different 5' ss and the 3' ss were obtained from sequence alignment of 669 complete M sequences (human and avian origin, 2011 to 2012) obtained from the Influenza Research Database. (A and B) Stars above the mRNA NS3 and mRNA M4 consensus sequences indicate the positions of mutations described in the literature. Nucleotide positions are based on A/Udm/72 (H3N2) sequences.



**FIG 4** Model of the regulation of segment M splicing. (A) Blocking of distal 5' ss. The switch from the distal mRNA<sub>3</sub> 5' ss (11 nt) to the proximal M2 alternative 5' ss (51 nt) by obstruction of the spliceosome binding by a viral product (viral polymerase complex or NS1 protein) is depicted. (B) Selection of the alternative 5' ss is obtained by stabilization of the SF2/ASF interaction in the 3' ss region. SF2/ASF recognizes an exonic splicing enhancer (ESE) composed of a purine-rich sequence (shown in red). (C) Stable secondary structures formed around the 3' ss region. (i) Hairpin conformation opens access to the branch point site (A, highlighted in purple) and 3' ss (red arrowhead) for the spliceosome assembly and to the ESE motif (orange line) for the SF2/ASF factor. (ii) Pseudoknot conformation tends to prevent 3' ss processing by the spliceosome.

suggested (57), and this factor is most likely a product from NS segment. Indeed, splicing can occur even if only an NS-expressing plasmid is transfected into cells, demonstrating that an NS element is sufficient to allow viral splicing but not to its full extent (55).

However, experiments using a vRNP reconstitution assay to mimic infection gave contradictory results. NS splicing was shown to be down-regulated by the NS1 protein via its RNA-binding domain (58). In contrast, another study using more sensitive detection methods demonstrated that the presence or absence of NS1 protein does not affect the levels of spliced and unspliced NS transcripts (49). Considering all of these findings, we can assume that these contradictory results may be due to the different experimental strategies used (transient expression versus infection) and the viral origin of genomic and proteomic materials. Nevertheless, further investigations will need to consider NS1 protein the obvious viral candidate involved in viral splicing regulation.

On the other hand, splicing regulation is assumed to be more complex for M mRNAs than for NS mRNAs. First, it is important to note that the mRNA<sub>3</sub> 5' ss is located prior to M2 mRNA on the colinear sequence (Fig. 3B). In this way, it could be considered to be the main 5' ss that best matches to the human consensus donor motifs, as illustrated by our sequence analysis (Fig. 3B). However, only the expression of M2 protein is relevant for viral replication, whereas the function of mRNA<sub>3</sub> remains unknown. Thus, it has been postulated that regulation in infected cells occurs to promote the use of M2 5' ss in preference to the distal 5' ss. The viral polymerase complex has been proposed by Shih and colleagues to fulfill this role, and this idea has been supported by more recent studies (59, 60). In fact, RdRp could interact with a specific sequence at the 5' end of the M transcript, blocking mRNA<sub>3</sub> 5' ss

recognition and directing the spliceosome onto the alternative M2 5' ss (Fig. 4A). However, as the viral polymerase can interact with all the viral RNAs to perform transcription and replication of the influenza virus genome, this interaction being shown to be relatively unsteady, this particular role for the polymerase complex has recently been challenged. Alternatively, Robb and Fodor have proposed that NS1 also has the ability to bind to the same region with increased stability and thus spatially obstruct the mRNA<sub>3</sub> 5' ss (Fig. 4A) (51), suggesting its main contribution in the regulation of M1 mRNA splicing.

While each interrupted M transcript has a different 5' ss, they all use the same 3' ss, thus highlighting this site as an important region to stabilize RNA splicing. Indeed, a purine-rich sequence located in this region corresponds to an exonic splicing enhancer (ESE) motif recognized by SF2/ASF, a well-known splicing factor belonging to the SR protein family (Fig. 4B) (61). In uninfected cells, SF2/ASF functions in a concentration-dependent manner to influence the selection of alternative competitive 5' ss (62, 63). To support this evidence, increasing levels of SF2/ASF *in vivo* are correlated with increased M2 mRNA during infection compared to the levels of other M transcripts (61). SF2/ASF thus seems to be an important factor for M splicing stabilization and could also play a role in establishing the rate of unspliced/spliced M products.

**Structural basis for regulation.** The importance of secondary structures in molecular mechanisms is now well described, most particularly for processes involving RNA, such as alternative splicing (64). Therefore, it is important to consider that structural conformation is an important element for the regulation of viral splicing. Interestingly, based on sequence analyses and thermodynamic stability studies, it has been predicted that there are regions

within IAV mRNAs that are unusually stable and conserved, particularly around M and NS segment 3' ss regions (65–67). From phylogenetic analysis coupled to biochemical and biophysical studies, a single-nucleotide substitution near the 3' splice site of the NS segment of H5N1 strains was shown to be critical for the equilibrium between (i) a hairpin and (ii) a pseudoknot conformation, with potential consequences for splicing regulation (68, 69). In the case of M segment transcripts, recent studies indicate that the region around the 3' ss can also switch between these two distinct secondary structures (Fig. 4C) (70, 71). The folding of this region into one or the other conformation changes the accessibility to multiple important sites for splicing, including the site of interaction with SF2/ASF, the 3' ss, and the branch point site previously discussed (Fig. 4C) (71). Considering the 3-dimensional structure, the hairpin conformation would reveal recognition sites for accurate spliceosome assembly, whereas the pseudoknot configuration would inversely inhibit 3' ss processing (71). Altogether, these recent developments illustrate the most-probably underestimated role of RNA secondary structures in influenza virus biology and, notably, in viral splicing regulation.

**Implication of nucleocytoplasmic transport.** To address the question of unbalanced viral transcript splicing, it is also important to consider indirect regulation via the export of viral mRNAs, as the nucleocytoplasmic export machinery is closely interlinked with pre-mRNA splicing (72). There are two distinct cases in term of IAV transcript export, (i) viral intronless transcripts (six of the eight viral RNA segments produce only colinear mRNA) and (ii) spliced viral mRNA, such as the NS2/NEP transcript. Thus, it would seem evident that the viral mRNAs that are spliced by the host machinery are favored and more rapidly transported into the cytoplasm than the intronless transcripts, on the basis of host transcript export. In any case, viral proteins derived from spliced transcripts are expressed in lower quantities than proteins from unspliced mRNAs. Several publications have highlighted interconnections with the host NFX1/Tap export system (reviewed in reference 73). Indeed, it has been shown that the coadaptor NFX1/ Tap, which facilitates the recruitment of mRNA to the nuclear pore complex (NPC), coimmunoprecipitates with the IAV mRNAs, and Read and Digard have shown that IAV mRNAs present differential dependence on the NFX1/ Tap pathway for their nuclear export (74). Moreover, silencing of NFX1/ Tap expression induces inefficient IAV replication, which provides conclusive evidence of the importance of this export system for IAV (74, 75). Different studies suggest that this phenomenon is possible thanks to the action of the multifunctional NS1 protein on the regulation of export. Indeed, NS1 protein can interact with NFX1/ Tap, p15, and Rae1, among other export coadaptors, components of the nuclear pore complex, such as nucleoporin Nup98, and several viral mRNAs, by its RNA-binding domain (34, 76). Moreover, by recognizing an NS2-specific sequence, NS1 protein also retains NS2 mRNA within the nucleus (77). Thus, the less efficient transport of NS2 spliced mRNA combined with a blockage of NS splicing by the *cis* element may be a consistent explanation for the small amount of and delay in NS2 protein expression during infection (78, 79). While the whole mechanism is not yet fully known, these results illustrate how IAV is able to differentially regulate nucleocytoplasmic export of viral mRNAs and, especially, the spliced one, which could permit host and viral protein expression regulation in time.

**Numerous host-splicing factors are necessary for influenza A virus infection.** As previously described, host factors, notably those interacting with NS1, would be involved in the global down-regulation of host cellular expression, while at the same time, they could allow the completion and regulation of viral splicing during infection. The characterization of host factors that interact with NS1 has highlighted a cellular protein named NS1-binding protein (NS1-BP) (80). In the absence of infection, this protein colocalizes with the SC35 factor in speckle domains, which are involved in spliceosome assembly. Upon infection, as NS1 contributes to a remodeling of the nuclear compartment, and notably, the speckle domains (26), the NS1-BP protein is dispersed inside the whole nucleus. If the physiological function of NS1-BP is unknown, it seems to achieve an important aim throughout influenza virus infection. Indeed, a recent study showed that nuclear proteins NS1-BP and hnRNP K have a privileged function in the regulation of M2 splicing (60). After infection of an NS1-BP-depleted cell line by an A/WSN/33 strain, in which the spliced M2 mRNA is the most highly represented, the M2-to-M1 mRNA ratio is strongly impaired, whereas it remains at steady state for the other M-derived transcripts. This effect is directly related to the presence of hnRNP K, which acts as an adaptor protein between M transcript and NS1-BP, which is unable to directly bind RNA (60). In this example, the presence of these two host factors is essential for the expression of viral M2 protein and, thus, for the viral replication.

In addition, over the past 5 years, several genome-wide screening studies have identified important host cell factors in the influenza virus replication cycle (35, 75, 81–83). In a short meta-analysis of hundreds of host factors identified based on these different strategies, we have highlighted up to 49 key host factors involved in RNA maturation and splicing processes (Table 1). Among them, several splicing factors appear to be essential for effective IAV infection, such as pre-mRNA processing factor 8 (PRPF8), splicing factor 3A (SF3A1), the 70-kDa small nuclear ribonucleoprotein (SNRP70), and polypyrimidine tract-binding protein 1 (PTBP1) (35, 81, 82). Interestingly, despite differences between the cellular and viral models used for these high-throughput studies (e.g., *Homo sapiens* versus *Drosophila* models), more than 18% (9/49) of splicing-associated factors were commonly identified in at least two studies (Table 1). The importance of these host factors was highlighted in particular in the genome-wide RNA interference (RNAi) screen published by Karlas and colleagues, in which gene ontology (GO) term enrichment analyses revealed that the U2-dependent spliceosome and the spliceosome were among the most enriched terms (35). This subclass of host factors may constitute a very interesting list of potential therapeutic targets for influenza A virus infection, as illustrated by the pioneering work from retroviral models (84).

#### WHAT ABOUT INFLUENZA B AND C VIRUSES?

Whereas most of our knowledge about the cellular and molecular biology of influenza viruses relies on studies dedicated to IAV, we know comparatively little about IBV and ICV. With both of their genomes composed of eight vRNA segments, IAV and IBV share numerous features. However, these viruses have weak percentages of homology between analogous proteins, reflecting divergent evolution, particularly concerning their coding strategy (11, 85). Actually, only the eighth segment of IBV, encoding its NS1 (B/NS1) and NS2/NEP (B/NS2) proteins, undergoes splicing in a way

TABLE 1 List of cellular splicing factors identified using high-throughput approaches that are important for viral replication

High-throughput approach(es) used	Cellular factor identified	Complete name	Influenza virus(es)—cellular model(s)	Reference
Genome-wide RNAi screening	AQR	Aquarius homolog (mouse)	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)—U2OS cells, modified A/WSN/33 (H1N1)—D-Mel2 <i>Drosophila</i> cells	75, 81
	BCAS2	Breast carcinoma amplified sequence 2	Modified A/WSN/33 (H1N1)—D-Mel2 <i>Drosophila</i> cells	75
	C19orf29	Cactin	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)—U2OS cells	81
	CLK1	CDC-like kinase 1	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)—U2OS cells, A/WSN/33 (H1N1)—A549 cells	35, 81
	CLK3	CDC-like kinase 3, dual-specificity protein kinase CLK3	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)—U2OS cells	81
	CRNKL1	Crooked neck pre-mRNA splicing factor-like 1 ( <i>Drosophila</i> )		
	CWC22	Pre-mRNA-splicing factor CWC22 homolog		
	DHX8	ATP-dependent RNA helicase DHX8		
	EFTUD2	Elongation factor Tu GTP binding domain containing 2		
	FUS	Fused in sarcoma (HNRNPP2)		
	HNRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	Modified A/WSN/33 (H1N1)—D-Mel2 <i>Drosophila</i> cells	75
	HNRNPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)—U2OS cells	81
	LSM2	LSM2 homolog, U6 small nuclear RNA associated		
	NHP2L1	NHP2 nonhistone chromosome protein 2-like 1	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)—U2OS cells, A/WSN/33 (H1N1)—A549 cells	81, 82
	POLR2H	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide H	A/WSN/33 (H1N1)—A549 cells	35
	POLR2L	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide L, 7.6 kDa		
	PPAN	Peter pan homolog ( <i>Drosophila</i> )	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)—U2OS cells	81
	PPWD1	Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat-containing 1	Modified A/WSN/33 (H1N1)—D-Mel2 <i>Drosophila</i> cells	75
	PRPF31	PRP31 pre-mRNA processing factor 31 homolog	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)—U2OS cells	81
	PRPF8	PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)—U2OS cells, A/WSN/33 (H1N1)—A549 cells	35, 81
	RBM5	RNA binding motif protein 5	A/WSN/33 (H1N1)—A549 cells	82
	RNPS1	RNA binding protein S1, serine-rich domain	Modified A/WSN/33 (H1N1)—D-Mel2 <i>Drosophila</i> cells	75
	SART1	Squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)—U2OS cells	81
	SF3A1	Splicing factor 3a, subunit 1, 120 kDa	A/WSN/33 (H1N1)—A549 cells, A/WSN/33 (H1N1)—A549 cells	35, 82
	SF3B1	Splicing factor 3b, subunit 1, 155 kDa	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)—U2OS cells, A/WSN/33 (H1N1)—A549 cells	35, 81
	SF3B14	Splicing factor 3b, 14-kDa subunit	A/WSN/33 (H1N1)—A549 cells	35
	SF3B2	Splicing factor 3b, subunit 2, 145 kDa	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)—U2OS cells	81
	SF3B3	Splicing factor 3b, subunit 3, 130 kDa		
	SLU7	Pre-mRNA-splicing factor SLU7		
	SNRPF0	Small nuclear ribonucleoprotein 70-kDa polypeptide (RNP antigen)	A/WSN/33 (H1N1)—A549 cells, A/WSN/33 (H1N1)—A549 cells	35, 82
	SNRPA1	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A'	A/WSN/33 (H1N1)—A549 cells	82
	SNRPB	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)—U2OS cells	81
	SNRPC	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide C	Modified A/WSN/33 (H1N1)—D-Mel2 <i>Drosophila</i> cells	75
	SNRPD1	Small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide, 16 kDa		
	SNRPD2	Small nuclear ribonucleoprotein D2 polypeptide, 16.5 kDa	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)—U2OS cells	81
	SNRPD3	Small nuclear ribonucleoprotein D3 polypeptide, 18 kDa		
SNRPF	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide F	A/WSN/33 (H1N1)—A549 cells	35	
SNRPG	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G	Modified A/WSN/33 (H1N1)—D-Mel2 <i>Drosophila</i> cells	75	
THOC4	THO complex 4			
TXNL4A	Thioredoxin-like 4A	A/WSN/33 (H1N1)—A549 cells	35	
YTHDC1	Putative splicing factor YT521	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)—U2OS cells	81	

(Continued on following page)

TABLE 1 (Continued)

High-throughput approach(es) used	Cellular factor identified	Complete name	Influenza virus(es)—cellular model(s)	Reference
Genome-wide RNAi screening, random homozygous gene perturbation	PTBP1	Polypyrimidine tract-binding protein 1	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)—U2OS cells, A/Udorn/72 (H3N2)—MDCK cells	81, 83
Random homozygous gene perturbation	DDX17 LSM4	DEAD (Asp–Glu–Ala–Asp) box polypeptide 17 LSM4 homolog, U6 small nuclear RNA associated ( <i>S. cerevisiae</i> )	A/Udorn/72 (H3N2)—MDCK cells	83
Yeast two-hybrid system, siRNA screening	PAPOLA SF3A3 SNW1 UAP56	Poly(A) polymerase alpha Splicing factor 3a, subunit 3, 60 kDa SNW domain-containing 1 DEAD (Asp–Glu–Ala–Asp) box polypeptide 39B	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) HeLa Cells, A/Bratislava/79/H7N7 (H7N7)—A549 and 293T cells	103, 104

similar to its IAV counterpart (86, 87). Indeed, B/NS1 is encoded by a colinear transcript in an ORF running from position 43–45 to the termination codon at position 886–888 in IBV reference strain B/Lee/40, and B/NS2 is encoded by an interrupted transcript of nearly 360 nt (87). In contrast, the IBV segment 7 encodes two proteins, matrix protein M1 and ion channel protein BM2, via a translational stop-start mechanism in place of the IAV alternative splicing strategy (88).

The ICV genome is composed of only seven vRNA segments and has been described to go through a splicing mechanism in the case of segments 6 and 7. Whereas ICVs use a splicing strategy similar to that of IAV to express both NS1 and NS2 protein from its seventh segment, the processing of segment 6, which encodes the ICV M1 (C/M1) and C/M2, differs more (89, 90). Indeed, the C/M1 transcript needs to be spliced to introduce a termination codon (nucleotides 753, 754, and 983 for reference strain C/Yamagata/1/88), whereas C/M2 protein is produced after the cleavage of a P42 peptide encoded by an unspliced segment 6 transcript. In the case of ICV, it has been shown that the spliced M transcript is expressed predominantly compared to the unspliced one, which represents only 13% of the amount of spliced M1 mRNA (91–94).

As we have reported above, several studies presume a central role of the IAV NS1 protein (A/NS1) in the regulation of the viral and host splicing process. First, it is interesting to note that, despite the low percentage of identity between A/NS1 and B/NS1, many similar functions and interactions, such as type 1 interferon antagonism or inhibition of PKR kinase, have been described (11). Surprisingly, in contrast to A/NS1, little is known about the possible role of B/NS1 in splicing regulation. However, at early stages of infection, B/NS1 was found to colocalize with the splicing factor SC35 in nuclear speckles, suggesting a possible role in splicing (95).

Interestingly, influenza C virus NS1 protein (C/NS1) differs strongly from A/NS1, particularly in the C-terminal half of the protein. It seems that, in contrast to A/NS1, C/NS1 could upregulate the splicing of viral mRNAs in ICV-infected cells, which explains the higher rate of spliced mRNAs than of unspliced ones in this context. In addition, C/NS1 was also shown to facilitate the

splicing of IAV M transcripts *in vitro* (94). For now, there is no certainty about the mechanism used by C/NS1 to enhance viral splicing. Further studies are necessary for a better understanding of the nuclear function of C/NS1 and its possible role in spliceosome recruitment.

#### IS SPLICING A KEY DETERMINANT FOR VIRAL REPLICATION, HOST RANGE, AND PATHOGENESIS?

Recent studies have hypothesized that the splicing efficiency of the M and NS segments of IAV could be a determinant in their ability to replicate or to adapt to a new host, denoting an important concern for pathogenicity (79, 96). Chua and colleagues have recently demonstrated that suboptimal splicing of the NS segment plays a role as a “molecular timer” that coordinates the timing of infection (79). Moreover, results obtained by Backström Winquist and colleagues have shown that the splicing efficiency of M and NS mRNAs varies between different influenza viruses (96). For example, the NS segment from A/Brevig Mission/1919/1 (H1N1) has been shown to be inefficiently spliced compared to those of other influenza viruses, possibly due to the differential binding properties of cellular splicing factors (e.g., SR proteins), resulting in the production of higher levels of functional NS1. The authors hypothesized that this could have contributed to the pathogenicity of the 1918 pandemic Spanish influenza virus (96). Another argument in favor of the importance of splicing strategy for influenza virus fitness was brought forward by Selman and colleagues with the description of NS3 protein expression in response to mouse adaptation (43). Their study indicates that one of the features of the adaptation of the influenza virus genome to a new host is the creation of new splice sites and that, in consequence, the virus can produce a novel protein, possibly conferring an advantage for viral replication. As it is easy to conceive the potential for the modulation of splicing strategy to optimize the host range and pathogenicity of influenza viruses, it is actually too early to estimate the importance of this mechanism among others.

#### CONCLUSION AND PERSPECTIVES

During their replication cycles, influenza viruses hijack the host splicing machinery to process their smallest segments. Influenza

viruses have developed accurate regulation mechanisms to utilize the host spliceosome to enable the expression of specific spliced influenza virus products throughout infection. Indeed, in the case of IAV, viral spliced segments contain splice sites that display high levels of similarity with human consensus splice sites, as well as interaction capacities evolved to best fit the host machinery. Our bioinformatic analysis, along with recently published studies, suggest both a conservation and a possible evolution of viral splice site sequences and structure for improved adaptation to the host (67, 70). Even though the mechanism of regulation of viral splicing is still not fully understood, the currently available data highlight some interesting potential applications. Such applications are particularly notable for the NS segment, encoding the multifunctional NS1 protein, which has been shown to affect a diversity of cellular mechanisms, including the cellular interferon type I response (29). In fact, the major role of the NS1 protein in cellular processes has been demonstrated by the modification of the NS segment to produce a truncated or deleted NS1 protein (97, 98). A recent study reported that the NS segment can be modified at the level of the 5' ss and 3' ss regions to induce efficient secretion of exogenous interleukin-2 cytokine in addition to NS products, in a vaccine based on an NS1-deficient viral vector (99). It highlights one of the interesting applications offered by exploiting IAV hijacking of the cellular nuclear machinery. Future studies are required to further explore and evaluate the biological significance of splicing of viral segments, notably in terms of viral replication, host range, and pathogenicity.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Juan Ortin (Centro Nacional de Biotecnología [CSIC], Madrid, Spain) for his help and his greatly appreciated comments. We also thank the two anonymous reviewers for their constructive remarks and suggestions.

#### REFERENCES

- Bouvier NM, Palese P. 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine* 26:D49–D53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.11.049>.
- Lamb RA, Krug R. 2001. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication, p 1487–1579. *In* Knipe DM and Howley PM (ed), *Fields virology*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Josset L, Frobert E, Rosa-Calatrava M. 2008. Influenza A replication and host nuclear compartments: many changes and many questions. *J. Clin. Virol.* 43:381–390. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2008.08.017>.
- Neumann G, Kawaoka Y. April 2011. Influenza viruses: molecular virology. *In* eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, United Kingdom. <http://www.els.net.gate1.inist.fr>. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470015902.a0001031.pub3>.
- Resa-Infante P, Jorba N, Coloma R, Ortin J. 2011. The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. *RNA Biol.* 8:207–215. <http://dx.doi.org/10.4161/rna.8.2.14513>.
- Engelhardt OG, Fodor E. 2006. Functional association between viral and cellular transcription during influenza virus infection. *Rev. Med. Virol.* 16:329–345. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.512>.
- Hutchinson EC, Fodor E. 2013. Transport of the influenza virus genome from nucleus to nucleus. *Viruses* 5:2424–2446. <http://dx.doi.org/10.3390/v5102424>.
- Terrier O, Moules V, Carron C, Cartet G, Frobert E, Yver M, Traversier A, Wolff T, Riteau B, Naffakh N, Lina B, Diaz JJ, Rosa-Calatrava M. 2012. The influenza fingerprints: NS1 and M1 proteins contribute to specific host cell ultrastructure signatures upon infection by different influenza A viruses. *Virology* 432:204–218. <http://dx.doi.org/10.1016/j.viro.2012.05.019>.
- Amorim MJ, Digard P. 2006. Influenza A virus and the cell nucleus. *Vaccine* 24:6651–6655. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.066>.
- Muraki Y, Hongo S. 2010. The molecular virology and reverse genetics of influenza C virus. *Jpn. J. Infect. Dis.* 63:157–165.
- Jackson D, Elderfield RA, Barclay WS. 2011. Molecular studies of influenza B virus in the reverse genetics era. *J. Gen. Virol.* 92:1–17. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.026187-0>.
- Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, Yewdell JW. 2001. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat. Med.* 7:1306–1312. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1201-1306>.
- Wise HM, Foeglein A, Sun J, Dalton RM, Patel S, Howard W, Anderson EC, Barclay WS, Digard P. 2009. A complicated message: identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J. Virol.* 83:8021–8031. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00826-09>.
- Jagger BW, Wise HM, Kash JC, Walters KA, Wills NM, Xiao YL, Dunfee RL, Schwartzman LM, Ozinsky A, Bell GL, Dalton RM, Lo A, Efsthathiou S, Atkins JF, Firth AE, Taubenberger JK, Digard P. 2012. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science* 337:199–204. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1222213>.
- Muramoto Y, Noda T, Kawakami E, Akkina R, Kawaoka Y. 2013. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *J. Virol.* 87:2455–2462. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02656-12>.
- Cavallari I, Rende F, D'Agostino DM, Ciminale V. 2011. Converging strategies in expression of human complex retroviruses. *Viruses* 3:1395–1414. <http://dx.doi.org/10.3390/v3081395>.
- Hoeben RC, Uil TG. 2013. Adenovirus DNA replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5:a013003. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a013003>.
- Wahl MC, Will CL, Lüthmann R. 2009. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136:701–718. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.009>.
- Sperling J, Azubel M, Sperling R. 2008. Structure and function of the pre-mRNA splicing machine. *Structure* 16:1605–1615. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2008.08.011>.
- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat. Rev. Genet.* 3:285–298. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg775>.
- Wu JY, Maniatis T. 1993. Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* 75:1061–1070. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90316-1](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(93)90316-1).
- Han SP, Tang YH, Smith R. 2010. Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochem. J.* 430:379–392. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20100396>.
- Mount SM. 1982. A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res.* 10:459–472. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/10.2.459>.
- Mount SM. 1983. RNA processing. Sequences that signal where to splice. *Nature* 304:309–310. <http://dx.doi.org/10.1038/304309a0>.
- Wang Z, Burge CB. 2008. Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA* 14:802–813. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.876308>.
- Fortes P, Lamond AI, Ortin J. 1995. Influenza virus NS1 protein alters the subnuclear localization of cellular splicing components. *J. Gen. Virol.* 76(Pt 4):1001–1007. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-76-4-1001>.
- Schmolke M, Viemann D, Roth J, Ludwig S. 2009. Essential impact of NF-kappaB signaling on the H5N1 influenza A virus-induced transcriptome. *J. Immunol.* 183:5180–5189. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0804198>.
- Terrier O, Josset L, Textoris J, Marcel V, Cartet G, Ferraris O, Nguyen C, Lina B, Diaz JJ, Bourdon JC, Rosa-Calatrava M. 2011. Cellular transcriptional profiling in human lung epithelial cells infected by different subtypes of influenza A viruses reveals an overall down-regulation of the host p53 pathway. *Virol. J.* 8:285. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-8-285>.
- Hale BG, Randall RE, Ortin J, Jackson D. 2008. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* 89:2359–2376. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.2008/004606-0>.
- Qiu Y, Nemeroff M, Krug RM. 1995. The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing. *RNA* 1:304–316.
- Wang W, Krug RM. 1998. U6atac snRNA, the highly divergent counterpart of U6 snRNA, is the specific target that mediates inhibition of AT-AC splicing by the influenza virus NS1 protein. *RNA* 4:55–64.
- Nemeroff ME, Barabino SM, Li Y, Keller W, Krug RM. 1998. Influenza

- virus NS1 protein interacts with the cellular 30-kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol. Cell* 1:991–1000. [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80099-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80099-4).
33. Noah DL, Twu KY, Krug RM. 2003. Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs. *Virology* 307:386–395. [http://dx.doi.org/10.1016/S0042-6822\(02\)00127-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0042-6822(02)00127-7).
  34. Satterly N, Tsai PL, van Deursen J, Nussenzweig DR, Wang Y, Faria PA, Levay A, Levy DE, Fontoura BM. 2007. Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:1853–1858. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0610977104>.
  35. Karlas A, Machuy N, Shin Y, Pleissner KP, Artarini A, Heuer D, Becker D, Khalil H, Ogilvie LA, Hess S, Mäurer AP, Müller E, Wolff T, Rudel T, Meyer TF. 2010. Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* 463:818–822. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08760>.
  36. Lamb RA, Etkind PR, Choppin PW. 1978. Evidence for a ninth influenza viral polypeptide. *Virology* 91:60–78. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(78\)90355-0](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(78)90355-0).
  37. Lamb RA, Choppin PW. 1979. Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76:4908–4912. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.76.10.4908>.
  38. Lamb RA, Choppin PW, Chanock RM, Lai CJ. 1980. Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77:1857–1861. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.77.4.1857>.
  39. Lamb RA, Lai CJ. 1980. Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned DNA coding for the two overlapping nonstructural proteins of influenza virus. *Cell* 21:475–485. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90484-5](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(80)90484-5).
  40. Lamb RA, Lai CJ. 1982. Spliced and unspliced messenger RNAs synthesized from cloned influenza virus M DNA in an SV40 vector: expression of the influenza virus membrane protein (M1). *Virology* 123:237–256. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(82\)90258-6](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(82)90258-6).
  41. Lamb RA, Lai CJ. 1984. Expression of unspliced NS1 mRNA, spliced NS2 mRNA, and a spliced chimera mRNA from cloned influenza virus NS DNA in an SV40 vector. *Virology* 135:139–147. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(84\)90124-7](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(84)90124-7).
  42. Plotch SJ, Krug RM. 1986. In vitro splicing of influenza viral NS1 mRNA and NS1-beta-globin chimeras: possible mechanisms for the control of viral mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83:5444–5448. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.83.15.5444>.
  43. Selman M, Dankar SK, Forbes NE, Jia J-J, Brown EG. 2012. Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing. *Emerg. Microbes Infect.* 1:e42. <http://dx.doi.org/10.1038/emi.2012.38>.
  44. Inglis SC, Brown CM. 1981. Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus. *Nucleic Acids Res.* 9:2727–2740. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/9.12.2727>.
  45. Lamb RA, Lai CJ, Choppin PW. 1981. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78:4170–4174. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.78.7.4170>.
  46. Shih SR, Suen PC, Chen YS, Chang SC. 1998. A novel spliced transcript of influenza A/WSN/33 virus. *Virus Genes* 17:179–183. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008024909222>.
  47. Wise HM, Hutchinson EC, Jagger BW, Stuart AD, Kang ZH, Robb N, Schwartzman LM, Kash JC, Fodor E, Firth AE, Gog JR, Taubenberger JK, Digard P. 2012. Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain. *PLoS Pathog.* 8:e1002998. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002998>.
  48. Inglis SC, Brown CM. 1984. Differences in the control of virus mRNA splicing during permissive or abortive infection with influenza A (fowl plague) virus. *J. Gen. Virol.* 65(Pt 1):153–164. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-65-1-153>.
  49. Robb NC, Jackson D, Vreede FT, Fodor E. 2010. Splicing of influenza A virus NS1 mRNA is independent of the viral NS1 protein. *J. Gen. Virol.* 91:2331–2340. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.022004-0>.
  50. Valcárcel J, Portela A, Ortín J. 1991. Regulated M1 mRNA splicing in influenza virus-infected cells. *J. Gen. Virol.* 72(Pt 6):1301–1308. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-72-6-1301>.
  51. Robb NC, Fodor E. 2012. The accumulation of influenza A virus segment 7 spliced mRNAs is regulated by the NS1 protein. *J. Gen. Virol.* 93:113–118. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.035485-0>.
  52. Cheung TK, Guan Y, Ng SS, Chen H, Wong CH, Peiris JS, Poon LL. 2005. Generation of recombinant influenza A virus without M2 ion-channel protein by introduction of a point mutation at the 5' end of the viral intron. *J. Gen. Virol.* 86:1447–1454. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.80727-0>.
  53. Chiang C, Chen GW, Shih SR. 2008. Mutations at alternative 5' splice sites of M1 mRNA negatively affect influenza A virus viability and growth rate. *J. Virol.* 82:10873–10886. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00506-08>.
  54. Hutchinson EC, Curran MD, Read EK, Gog JR, Digard P. 2008. Mutational analysis of *cis*-acting RNA signals in segment 7 of influenza A virus. *J. Virol.* 82:11869–11879. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01634-08>.
  55. Agris CH, Nemeroff ME, Krug RM. 1989. A block in mammalian splicing occurring after formation of large complexes containing U1, U2, U4, U5, and U6 small nuclear ribonucleoproteins. *Mol. Cell. Biol.* 9:259–267.
  56. Nemeroff ME, Utans U, Krämer A, Krug RM. 1992. Identification of *cis*-acting intron and exon regions in influenza virus NS1 mRNA that inhibit splicing and cause the formation of aberrantly sedimenting pre-splicing complexes. *Mol. Cell. Biol.* 12:962–970.
  57. Smith DB, Inglis SC. 1985. Regulated production of an influenza virus spliced mRNA mediated by virus-specific products. *EMBO J.* 4:2313–2319.
  58. Garaigorta U, Ortín J. 2007. Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleocytoplasmic transport of its own viral mRNA. *Nucleic Acids Res.* 35:4573–4582. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm230>.
  59. Shih SR, Nemeroff ME, Krug RM. 1995. The choice of alternative 5' splice sites in influenza virus M1 mRNA is regulated by the viral polymerase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:6324–6328. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.92.14.6324>.
  60. Tsai PL, Chiou NT, Kuss S, García-Sastre A, Lynch KW, Fontoura BM. 2013. Cellular RNA binding proteins NS1-BP and hnRNP K regulate influenza A virus RNA splicing. *PLoS Pathog.* 9:e1003460.
  61. Shih SR, Krug RM. 1996. Novel exploitation of a nuclear function by influenza virus: the cellular SF2/ASF splicing factor controls the amount of the essential viral M2 ion channel protein in infected cells. *EMBO J.* 15:5415–5427.
  62. Cáceres JF, Krainer AR. 1993. Functional analysis of pre-mRNA splicing factor SF2/ASF structural domains. *EMBO J.* 12:4715–4726.
  63. Krainer AR, Conway GC, Kozak D. 1990. The essential pre-mRNA splicing factor SF2 influences 5' splice site selection by activating proximal sites. *Cell* 62:35–42. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90237-9](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(90)90237-9).
  64. Warf MB, Berglund JA. 2010. The role of RNA structure in regulating pre-mRNA splicing. *Trends Biochem. Sci.* 35:169–178. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2009.10.004>.
  65. Gog JR, Afonso EDS, Dalton RM, Leclercq I, Tiley L, Elton D, von Kirchbach JC, Naffakh N, Escρίου N, Digard P. 2007. Codon conservation in the influenza A virus genome defines RNA packaging signals. *Nucleic Acids Res.* 35:1897–1907. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm087>.
  66. Moss WN, Priore SF, Turner DH. 2011. Identification of potential conserved RNA secondary structure throughout influenza A coding regions. *RNA* 17:991–1011. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.2619511>.
  67. Priore SF, Moss WN, Turner DH. 2012. Influenza A virus coding regions exhibit host-specific global ordered RNA structure. *PLoS One* 7:e35989. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035989>.
  68. Gultyaev AP, Heus HA, Olsthoorn RC. 2007. An RNA conformational shift in recent H5N1 influenza A viruses. *Bioinformatics* 23:272–276. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btl559>.
  69. Gultyaev AP, Olsthoorn RC. 2010. A family of non-classical pseudoknots in influenza A and B viruses. *RNA Biol.* 7:125–129. <http://dx.doi.org/10.4161/rna.7.2.11287>.
  70. Moss WN, Dela-Moss LI, Kierzek E, Kierzek R, Priore SF, Turner DH. 2012. The 3' splice site of influenza A segment 7 mRNA can exist in two conformations: a pseudoknot and a hairpin. *PLoS One* 7:e38323. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0038323>.

71. Moss WN, Dela-Moss LI, Priore SF, Turner DH. 2012. The influenza A segment 7 mRNA 3' splice site pseudoknot/hairpin family. *RNA Biol.* 9:1305–1310.
72. Reed R, Hurt E. 2002. A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* 108:523–531. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00627-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00627-X).
73. York A, Fodor E. 2013. Biogenesis, assembly and export of viral messenger ribonucleoproteins in the influenza A virus infected cell. *RNA Biol.* 10:1274–1282. <http://dx.doi.org/10.4161/rna.25356>.
74. Read EK, Digard P. 2010. Individual influenza A virus mRNAs show differential dependence on cellular NXF1/TAP for their nuclear export. *J. Gen. Virol.* 91:1290–1301. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.018564-0>.
75. Hao L, Sakurai A, Watanabe T, Sorensen E, Nidom CA, Newton MA, Ahlquist P, Kawaoka Y. 2008. Drosophila RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication. *Nature* 454:890–893. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07151>.
76. Wang W, Cui ZQ, Han H, Zhang ZP, Wei HP, Zhou YF, Chen Z, Zhang XE. 2008. Imaging and characterizing influenza A virus mRNA transport in living cells. *Nucleic Acids Res.* 36:4913–4928. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn475>.
77. Alonso-Caplen FV, Krug RM. 1991. Regulation of the extent of splicing of influenza virus NS1 mRNA: role of the rates of splicing and of the nucleocytoplasmic transport of NS1 mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 11:1092–1098.
78. Fortes P, Beloso A, Ortín J. 1994. Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. *EMBO J.* 13:704–712.
79. Chua MA, Schmid S, Perez JT, Langlois RA, Tenoever BR. 2013. Influenza A virus utilizes suboptimal splicing to coordinate the timing of infection. *Cell Rep.* 3:23–29.
80. Wolff T, O'Neill RE, Palese P. 1998. NS1-binding protein (NS1-BP): a novel human protein that interacts with the influenza A virus nonstructural NS1 protein is relocalized in the nuclei of infected cells. *J. Virol.* 72:7170–7180.
81. Brass AL, Huang IC, Benita Y, John SP, Krishnan MN, Feeley EM, Ryan BJ, Weyer JL, van der Weyden L, Fikrig E, Adams DJ, Xavier RJ, Farzan M, Elledge SJ. 2009. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell* 139:1243–1254. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.017>.
82. König R, Stertz S, Zhou Y, Inoue A, Hoffmann HH, Bhattacharyya S, Alamares JG, Tschernie DM, Ortigoza MB, Liang Y, Gao Q, Andrews SE, Bandyopadhyay S, De Jesus P, Tu BP, Pache L, Shih C, Orth A, Bonamy G, Miraglia L, Ideker T, García-Sastre A, Young JA, Palese P, Shaw ML, Chanda SK. 2010. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* 463:813–817. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08699>.
83. Sui B, Bamba D, Weng K, Ung H, Chang S, Van Dyke J, Goldblatt M, Duan R, Kinch MS, Li WB. 2009. The use of random homozygous gene perturbation to identify novel host-oriented targets for influenza. *Virology* 387:473–481. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2009.02.046>.
84. Tazi J, Bakkour N, Marchand V, Ayadi L, Aboufirassi A, Branlant C. 2010. Alternative splicing: regulation of HIV-1 multiplication as a target for therapeutic action. *FEBS J.* 277:867–876. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07522.x>.
85. Almond JW, Haymerle HA, Felsenreich VD, Reeve P. 1979. The structural and infected cell polypeptides of influenza B virus. *J. Gen. Virol.* 45:611–621. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-45-3-611>.
86. Briedis DJ, Lamb RA, Choppin PW. 1981. Influenza B virus RNA segment 8 codes for two nonstructural proteins. *Virology* 112:417–425. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(81\)90289-0](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(81)90289-0).
87. Briedis DJ, Lamb RA. 1982. Influenza B virus genome: sequences and structural organization of RNA segment 8 and the mRNAs coding for the NS1 and NS2 proteins. *J. Virol.* 42:186–193.
88. Horvath CM, Williams MA, Lamb RA. 1990. Eukaryotic coupled translation of tandem cistrons: identification of the influenza B virus BM2 polypeptide. *EMBO J.* 9:2639–2647.
89. Nakada S, Graves PN, Palese P. 1986. The influenza C virus NS gene: evidence for a spliced mRNA and a second NS gene product (NS2 protein). *Virus Res.* 4:263–273. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1702\(86\)90005-5](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1702(86)90005-5).
90. Alamgir AS, Matsuzaki Y, Hongo S, Tsuchiya E, Sugawara K, Muraki Y, Nakamura K. 2000. Phylogenetic analysis of influenza C virus non-structural (NS) protein genes and identification of the NS2 protein. *J. Gen. Virol.* 81:1933–1940.
91. Yamashita M, Krystal M, Palese P. 1988. Evidence that the matrix protein of influenza C virus is coded for by a spliced mRNA. *J. Virol.* 62:3348–3355.
92. Pekosz A, Lamb RA. 1998. Influenza C virus CM2 integral membrane glycoprotein is produced from a polypeptide precursor by cleavage of an internal signal sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:13233–13238. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.22.13233>.
93. Hongo S, Sugawara K, Nishimura H, Muraki Y, Kitame F, Nakamura K. 1994. Identification of a second protein encoded by influenza C virus RNA segment 6. *J. Gen. Virol.* 75(Pt 12):3503–3510. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-75-12-3503>.
94. Muraki Y, Furukawa T, Kohno Y, Matsuzaki Y, Takashita E, Sugawara K, Hongo S. 2010. Influenza C virus NS1 protein upregulates the splicing of viral mRNAs. *J. Virol.* 84:1957–1966. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01627-09>.
95. Schneider J, Wolff T. 2009. Nuclear functions of the influenza A and B viruses NS1 proteins: do they play a role in viral mRNA export? *Vaccine* 27:6312–6316. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.015>.
96. Backström Winquist E, Abdurahman S, Tranell A, Lindström S, Tingsborg S, Schwartz S. 2012. Inefficient splicing of segment 7 and 8 mRNAs is an inherent property of influenza virus A/Brevig Mission/1918/1 (H1N1) that causes elevated expression of NS1 protein. *Virology* 422:46–58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2011.10.004>.
97. Fernandez-Sesma A, Marukian S, Ebersole BJ, Kaminski D, Park MS, Yuen T, Sealfon SC, García-Sastre A, Moran TM. 2006. Influenza virus evades innate and adaptive immunity via the NS1 protein. *J. Virol.* 80:6295–6304. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02381-05>.
98. Haye K, Burmakina S, Moran T, García-Sastre A, Fernandez-Sesma A. 2009. The NS1 protein of a human influenza virus Inhibits type I interferon production and the induction of antiviral responses in primary human dendritic and respiratory epithelial cells. *J. Virol.* 83:6849–6862. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02323-08>.
99. Wolschek M, Sann E, Seper H, Sturlan S, Kuznetsova I, Schwager C, Khassidov A, Kittel C, Muster T, Egorov A, Bergmann M. 2011. Establishment of a chimeric, replication-deficient influenza A virus vector by modulation of splicing efficiency. *J. Virol.* 85:2469–2473. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01650-10>.
100. Krainer A (ed). 1997. Eukaryotic mRNA processing. *Frontiers in molecular biology*, vol 17. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
101. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 14:1188–1190. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.849004>.
102. Squires RB, Noronha J, Hunt V, García-Sastre A, Macken C, Baumgarth N, Suarez D, Pickett BE, Zhang Y, Larsen CN, Ramsey A, Zhou L, Zaremba S, Kumar S, Deitrich J, Klem E, Scheuermann RH. 2012. Influenza Research Database: an integrated bioinformatics resource for influenza research and surveillance. *Influenza Other Respir. Viruses* 6:404–416. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-2659.2011.00331.x>.
103. Momose F, Basler CF, O'Neill RE, Iwamatsu A, Palese P, Nagata K. 2001. Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J. Virol.* 75:1899–1908. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.75.4.1899-1908.2001>.
104. Wisskirchen C, Ludersdorfer TH, Müller DA, Moritz E, Pavlovic J. 2011. The cellular RNA helicase UAP56 is required for prevention of double-stranded RNA formation during influenza A virus infection. *J. Virol.* 85:8646–8655. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02559-10>.

## Manuscrit 2

### Résumé

Les virus influenza A (IAV) sont décrits pour leurs capacités à moduler et détourner de nombreux mécanismes de la cellule hôte, dont la machinerie d'épissage et de maturation des ARNs, dans le but d'altérer la réponse cellulaire à l'infection et permettre l'expression optimale des déterminants viraux au cours de l'infection. Plusieurs études ont pu démontrer un rôle des isoformes du facteur de transcription cellulaire p53, notamment celles issues de l'épissage alternatif du gène *TP53*, dans la modulation de son activité transcriptionnelle. Dans le contexte de l'infection par les IAV, plusieurs niveaux d'interactions fonctionnelles entre p53 et les virus, *via* en particulier leur protéine multifonctionnelle NS1, sont connus et ont un impact important sur la réponse antivirale. Dans cette étude, nous avons montré en utilisant un minigène imitant l'intron 9 du gène *TP53* que les IAV, *via* la protéine NS1, modulent l'expression des variants  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  de p53. De plus, nos résultats ont permis de mettre en évidence le rôle crucial du facteur cellulaire CPSF4 dans ce mécanisme de dérégulation de l'épissage et de dérégulation de l'activité transcriptionnelle de p53. En conclusion, nos résultats suggèrent un « ménage à trois » entre p53, CPSF4 et NS1 dont les interactions influencent l'expression endogène des isoformes de p53, et son activité transcriptionnelle dans la réponse cellulaire, et notamment de type interféron, face à l'infection IAV.

**Title:** The non-structural NS1 protein of Influenza viruses modulates *TP53* splicing through the host factor CPSF4

**Short Title:** Functional interactions between influenza NS1 and host factors p53/CPSF4.

**Authors:** Julia DUBOIS<sup>1,2</sup>, Aurélien TRAVERSIER<sup>1</sup>, Thomas JULIEN<sup>1</sup>, Blandine PADEY<sup>1</sup>, Bruno LINA<sup>1,3</sup>, Jean-Christophe BOURDON<sup>4</sup>, Virginie MARCEL<sup>5</sup>, Guy BOIVIN<sup>2</sup>, Manuel ROSA-CALATRAVA<sup>1\*</sup>, #Olivier TERRIER<sup>1\*</sup>

**Author affiliations:**

1. Virologie et Pathologie Humaine - VirPath team, Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France.

2. Centre de Recherche en Infectiologie of the Centre Hospitalier Universitaire de Québec and Université Laval, Québec, Canada.

3. Laboratoire de Virologie, Centre National de Référence des virus Influenza, Institut des Agents Infectieux, Groupement Hospitalier Nord, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

4. Division of Cancer Research, University of Dundee, Ninewells Hospital and Medical School, Dundee, United Kingdom.

5. Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM U1052, CNRS UMR5286, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, F-69373, France.

\*MR-C and OT are co-last authors

**#Corresponding author:** Olivier TERRIER, Virologie et Pathologie Humaine - VirPath team, Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), INSERM U1111, Faculté de Médecine Laennec, 11 Rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon cedex 08, Lyon, France. Telephone: 33(0)478771037; [olivier.terrier@univ-lyon1.fr](mailto:olivier.terrier@univ-lyon1.fr)

**Words count:**

Abstract: 213

Text count: 6700 words

**Inserts:** 8 figures, 2 supporting figures, 1 supporting table

**Keywords:** Influenza viruses; virus-host interactions; p53; CPSF4/CPSF30; splicing; antiviral response; IFN

## **Abstract**

Influenza A viruses (IAV) are known to modulate and to hijack several cellular host mechanisms, including splicing and RNA maturation machineries, to alter host cellular response and enable an optimal expression of viral products throughout infection. Previous studies have described the differential role of p53 isoforms, including spliced products, in the modulation of the full-length p53 protein transcriptional activity, which regulates the cell fate. In the context of influenza infection, the interplay between IAV and p53, in particular through the viral nonstructural protein NS1, has been described at multiple levels with consequent impact on the antiviral response. By the use of a *TP53* minigene mimicking intron 9 alternative splicing, we have shown in this study that IAV and its NS1 protein modulate the expression of spliced p53 isoforms. Furthermore, our results have demonstrated the key role of the cellular CPSF4 protein and its functional interaction with NS1 for the *TP53* alternative splicing and the p53 transcriptional activity regulation into p53-wt expressing cells. Altogether, we figured out mechanisms, cellular p53 and CPSF4 factors both with viral NS1 having crucial place, that allows IAV to interact and influence the expression of alternatively spliced p53 isoforms in order to control the cellular innate response, especially *via* the interferon secretion, and perform an efficient viral replication.

## **Introduction**

Influenza A viruses (IAV) constitute a major public health issue, causing illness and death in high-risk populations during seasonal epidemics or pandemics (1, 2). IAV belong to the family Orthomyxoviridae of enveloped viruses and contain a segmented genome of single-stranded negative RNA (3). In contrast with most RNA viruses, IAV have a nuclear infectious cycle, hence having direct access to numerous nuclear host factors and machineries, to successfully achieve their replication (4). These viruses have notably developed mechanisms to reassign the host spliceosome to simultaneously alter host cellular expression and enable an optimal expression of specific spliced viral products throughout infection (reviewed in (5)). Although the regulation of viral splicing has been extensively studied, the intricate interactions between IAV and the host spliceosome, as well as the host splicing regulators, remain to be further deciphered.

Among IAV proteins, the non-structural NS1 is known to be a key “multi-tool” protein by which virus can deeply alter the host-cell responses (6-9). Indeed, NS1 can counteract interferon (IFN) antiviral response using different mechanisms (6-8). In particular, NS1 acts as a modulator of numerous cellular host processes, including mRNA processing (5, 10), nuclear trafficking/export (11, 12) and translation (13, 14). These multiple accessory functions are well illustrated by the considerable number of NS1 host interactors (more than 50), and the numerous binding sites characterized within NS1 protein, that include for example binding sites for dsRNA (15, 16), p85 $\beta$  for activation of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) signaling (17), RIG-I to inhibit the induction of the type I interferon response (IFN-I) (18-20) or Cleavage and Polyadenylation Specific Factor 4 (CPSF4, also known as CPSF30) (21). Among the NS1 interactors, CPSF4 is a component of the CPSF complex involved in the last step

of mRNA maturation and polyadenylation (22, 23). It has been demonstrated that IAV NS1 interact with CPSF4 (also known as CPSF30), thus preventing CPSF4 binding to RNA and, consequently, inhibiting the 3' end cleavage and polyadenylation of host pre-mRNAs (21). It is assumed that this interaction contributes to the NS1-dependent regulation of several host genes and particularly to the inhibition of IFN response (24-27). Furthermore, it has been recently suggested that the CPSF complex could promote alternative splicing events. CPSF complex can be recruited as cofactor by known splicing regulators at distant place of the polyadenylation site simultaneously to its usual mRNA binding sites (28-30). Based on these data, the interaction between NS1 and CPSF4 could also impact host gene expression at another level of regulation, such as the mRNA host splicing.

The host p53 tumor suppressor is a master regulatory transcription factor that is activated in response to various cellular stresses and that regulates a broad range of biological processes, such as cell-cycle arrest, apoptosis or senescence (31, 32). An increasing number of reports suggest that p53 is also a key player in the regulation of immune, inflammatory and antiviral responses, including the one of influenza viruses (33-42). Our current understanding is that the IAV-induced modulation of p53 endogenous expression, and subsequently of p53 transcriptional activity, contributes to maintain a cellular state that favors viral replication during the time of infection (41, 43). We and others have indeed demonstrated that NS1 plays a major role in the functional interplay between IAV and the host p53 pathway (37, 42). For example, we have shown that NS1 interacts with the endogenous p53 protein and alters the binding of p53 to its responsive genes, in a promoter-dependent manner (37). However, the complete mechanisms of NS1-induced modulation of p53 activity are still not fully understood. In addition to the canonical full-length p53 protein (also named TAp53 $\alpha$  or

p53 $\alpha$ ), the TP53 gene expresses about twelve p53 protein isoforms that result from combinational use of alternative promoters, splicing sites and/or translational initiation sites (44, 45). In particular, three C-terminal variants have been described ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) that result from alternative splicing of TP53 intron 9 (TP53-i9). The p53 isoforms have been shown to contribute to the cell-fate decision in response to stress but also to the maintenance of cell homeostasis, mainly by regulating transcriptional activity of the full-length p53 $\alpha$  protein (44, 46, 47). We have notably demonstrated that increased expression of the C-terminal p53 $\beta$  and p53 $\gamma$  isoforms, resulting from fine control of the alternative splicing of TP53 intron 9, promotes G1 cell-cycle arrest and apoptosis in a p53 $\alpha$ -dependent manner (47). Interestingly, we reported that IAV differentially affect the endogenous expression of p53 isoforms at both transcriptional and post-transcriptional levels. In response to influenza infection, we observed an increased expression of p53 $\beta$  isoform, known to be generated by partial retention of TP53-i9 (46). Reciprocally, modulations of endogenous expression of p53 isoforms affect the viral replication in a p53 $\alpha$ -dependent manner (38).

Here, we further characterize the functional connections between IAV and the host p53 pathway at the level of C-terminal spliced p53 isoforms. Using a minigene construct, we demonstrated that TP53 splicing is strongly modulated during the time course of IAV infection. Additionally, we characterized the viral protein NS1 and the host factor CPSF4 as major partners involved in the IAV-induced modulation of the TP53 alternative splicing that was associated with a strong modulation of p53 transcriptional activity. Our study highlights for the first time a role for a cell factor, CPSF4, in the TP53 alternative splicing in response to viral infection, and identified a novel splicing regulator of TP53 alternative splicing in basal condition. In the context of IAV

infection, our results suggest that not only spliced p53 $\beta$  and p53 $\gamma$  isoforms but also CPSF4 may contribute to the p53-mediated antiviral IFN-response.

## Results

### **Influenza viral infection and NS1 protein modulates the alternative splicing of TP53 intron 9.**

To investigate the impact of infection on the alternative splicing of TP53 intron 9 (TP53-i9), we used a previously described minigene approach (38). This TP53-i9 minigene mimics alternative splicing of TP53 intron 9 and allows analyzing the exclusion and/or partial retention of intron 9 leading to the C-terminal  $\alpha$ ,  $\beta$  or  $\gamma$  variants, respectively (Fig. 1A). H1299 p53-null cells were transfected with TP53-i9 minigene plasmid for 36 hours then infected with two IAV strains (H1N1 and H3N2) at MOI 4 or 0.1 for 8 or 24 hours post-infection (hpi), respectively. IAV infection was validated by monitoring expression of NP and NS1 proteins by western blot (Fig. 1B). Relative spliced RNA levels of the exogenous  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  forms, reflecting the three C-terminal spliced p53 variants, were then quantified by RT-qPCR. We observed that both H1N1 and H3N2 infections affect the levels of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  forms in comparison to mock-infected cells (Fig. 1B). At 8 hpi (MOI 4), we observed a significant increase of the  $\gamma$  form levels respectively by 1.39 and 1.27-fold in cells infected by H1N1 and H3N2 in comparison to the mock condition. However, no significant change was observed for both  $\alpha$  and  $\beta$  forms. In the context of multiple viral cycles (MOI 0.1, 24 hpi), we observed a broader impact of infection on retention of TP53-i9. In addition to  $\gamma$  forms showing a significant 1.44- and 1.36-fold increase for H1N1 and H3N2 respectively,  $\beta$  forms were also significantly increased in IAV-infected cells compared to mock (1.43- and 1.60-fold increase for H1N1 and H3N2, respectively) (Fig. 1B). In contrast, the level of the major  $\alpha$  forms remains unaffected by H3N2 infection or slightly decreased by H1N1 infection. These results suggest that IAV infection promotes the retention of

TP53-i9 leading to the  $\beta$  and  $\gamma$  variants and thus, could explain the IAV-induced expression of p53 $\beta$  isoform previously described (38).

As the multifunctional NS1 protein is known to affect the host splicing machinery, we then investigated whether NS1 can modulate by itself the retention of TP53-i9. The TP53-i9 minigene plasmid was co-transfected with the wt NS1-expressing pCI plasmid, whose allows NS1 expression as verified by western blot (Fig. 1C, bottom panel). RT-qPCR analyses revealed that NS1 affects retention of TP53-i9. Indeed, NS1 expression was associated with a significant increase of both  $\beta$  and  $\gamma$  form levels compared to the empty plasmid transfection condition, the mean fold changes reaching 3.40 and 2.24, respectively (Fig. 1C, top panel). Similarly to what observed in the above context of infection, the level of  $\alpha$  forms remained unaffected by transient NS1 expression. As  $\beta$  and  $\gamma$  variants are known to be less expressed compared to the major  $\alpha$  variant in basal condition (36), we also determined the ratio of  $\beta$ + $\gamma$  form levels over the whole C-terminal p53 forms to considerate the relative part of intron 9 retention. NS1 expression induced a significant more than 2-fold increase of  $\beta$ + $\gamma$  ratio compared to empty condition (14.42 % versus 6.06 % respectively, Fig. 1C, bottom panel). Overall, these results indicate that IAV infection but also NS1 on its own can modulate the alternative splicing of TP53 intron 9, and favors the generation of  $\beta$  and  $\gamma$  forms.

#### **The CPSF4-binding domain of NS1 is critical to NS1-mediated modulation of TP53-i9 retention.**

The impact of different already described NS1 mutants on TP53-i9 retention was assessed using TP53-i9 minigene in H1299 p53-null cells to determine the mechanisms underlying NS1-induced retention of TP53-i9 (16, 17, 21). Three pCI plasmids were used to express NS1 mutants that are deficient in their binding with either PI3K p85 $\beta$

subunit (NS1-Y89F), RNA (NS1-R38A/K41A) or CPSF4 (NS1-CPSF4) that express detectable amount of the various NS1 proteins (Fig. 1D). In a similar way as wt NS1, a strong and significant 2-fold increase of the ratio  $\beta+\gamma$  was measured in NS1-Y89F or NS1-R38A/K41A mutants expressing cells, compared to the empty condition, (13.03 and 12.58 % versus 5%, respectively) (Fig. 1D and Supplementary Fig. 1A). These results suggest that both RNA-binding and p85 $\beta$ -binding domains of NS1 are not involved in the NS1-induced retention of TP53-i9. In contrast, the increased  $\beta+\gamma$  ratio observed in response to wt NS1 expression is abolished when NS1-CPSF4 mutant was expressed (Fig. 1D), suggesting that NS1 mutant protein deficient for CPSF4 interaction lost its capacity to induce TP53-i9 retention. Of note, the relative RNA levels of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  forms generated by TP53-i9 minigene were significantly lower in NS1-CPSF4 expressing cells compared to empty condition, indicating an additional layer of regulation in this in vitro system (Supplementary Fig. 1A).

Increasing amount of wt NS1 and NS1-CPSF4 expressing plasmids were then co-transfected with TP53-i9 minigene in H1299 cells. In wt NS1 condition, no dose-dependent effect was observed and even minimal quantities of wt NS1 plasmid, resulting in a barely detectable protein levels, were sufficient to increase significantly the exogenous  $\beta+\gamma$  ratio (Fig 1E and Supplementary Fig. 1B). In contrast, the generation of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  forms from TP53-i9 minigene was progressively reduced with NS1-CPSF4 mutant, while incrementing the plasmid quantity introduced (Supplementary Fig. 1B). In results, the augmentation of  $\beta+\gamma$  ratio was abolished at each NS1-CPSF4 dose used supporting a role of CPSF4 binding domain of NS1 in regulating TP53-i9 retention (Fig. 1E). At endogenous level, in A549 wt p53 cells, we observed concordant pattern of p53 $\beta$  protein augmentation with wt NS1 versus its absence with NS1-CPSF4, at least when low amount of plasmid is transfected (Supplementary Fig.1D), in accordance with

previous results (38). Altogether, these results suggest that the CPSF4-binding domain of NS1 is critical for the NS1-induced retention of TP53 intron 9.

### **IAV-mediated regulation of p53 expression is affected in CPSF4-mutant influenza virus.**

We then investigated the impact of NS1-CPSF4 mutant on spliced p53 isoforms expression in the context of IAV infection. Virus expressing NS1 mutant deficient in CPSF4 binding, was previously described as strongly attenuated for replication (48). To minimize such drawback, we used the reverse genetic system of the highly replicative A/PuertoRico/8/33 virus (H1N1, PR8) (49) to produce viruses expressing wt NS1 or NS1-CPSF4 mutant. Virus recovery from pHW2000 plasmids transfection was achieved and recombinant PR8/NS1-wt and PR8/NS1-CPSF4 viruses were generated and titrated. These two viruses presented similar growth kinetics and infectivity (data not shown). A549 cells expressing wt TP53 gene were infected with both viruses and endogenous expression of p53 isoforms was measured by RT-qPCR and western-blot. At 8 hpi, infection with the PR8/NS1-wt virus induced a significant 25% diminution of endogenous p53 total mRNA levels compared to mock infection, and a slight but not significant increase of  $\beta$  variant mRNA levels and p53 $\beta$  protein levels (Fig. 2A-B). Thus, infection with PR8/NS1-wt virus reproduced what observed on endogenous p53 isoform expression (38) and in H1299 NS1-transfected cells (Fig. 1C). In contrast to PR8/NS1-wt virus, no variation of p53 total mRNA levels was observed with PR8/NS1-CPSF4 virus at 8 hpi compared to mock-infection, while a significant 1.65-fold up-regulation of  $\beta$  mRNA variants and a slight increase of p53 $\beta$  protein levels was detected, suggesting that CPSF4-binding domain of NS1 has a role in modulating p53 isoforms expression (Fig. 2A-B). At 24 hpi, no changes were observed at mRNA levels

with PR8/NS1-wt virus, whereas a drastic and significant increase of  $\beta$  mRNA variants was induced by PR8/NS1-CPSF4 infection in comparison with mock-infection (Fig. 2C). However, this increase of mRNA levels was not clearly correlated at protein levels, as observed by western blot (Fig. 2D). This discrepancy can result from other regulations occurring during the several viral cycles taking place through the time course of 24hpi. Nevertheless, these data showed that endogenous p53 isoforms expression is differentially affected by influenza virus expressing either the wt NS1 or NS1-CPSF4 mutant protein, underlying the critical role of CPSF4 binding domain in NS1-induced modulation of p53 isoform expression.

Interestingly, we observed that CPSF4 itself affects spliced p53 isoforms expression in basal condition. We treated H1299 p53-null cells, previously transfected with the TP53-i9 minigene plasmid, with either a non-specific siRNA (si-ctrl) or a pool of siRNA targeting CPSF4 (si-CPSF4) (Fig. 3A). While in these conditions exogenous  $\gamma$  variant were barely detectable, we observed that the slight increase of  $\alpha$  variant mRNA was paralleled with a significant 40% reduction of  $\beta$  variant levels, suggesting that silencing of the cellular CPSF4 factor contributes to the exclusion of TP53-i9 favoring the expression of p53 $\alpha$  variant, the major form expressed by TP53 gene. More interestingly, similar observation was obtained at endogenous levels in A549 wt p53 cells. Indeed, compared to si-ctrl treated cells, si-CPSF4 treated cells showed an increase of total endogenous p53 mRNA levels without alteration of  $\beta$  forms mRNA expression (Fig. 3B).

Altogether, these results demonstrated that CPSF4-binding domain of NS1 is critical for the IAV-mediated regulation of p53 isoforms expression. Moreover, it suggests a role of the NS1 partner, CPSF4, in p53 isoforms expression in both mock and infected conditions.

**CPSF4, NS1 and the CPSF4-binding domain of NS1 protein play a critical role in p53 transcriptional activity.**

Since we observed that silencing of CPSF4 modulates p53 isoforms expression pattern in basal condition, we investigated the effect of CPSF4 silencing on p53 transcriptional activity in non-infected condition. We used a panel of luciferase reporter vectors that reflect either the intrinsic p53 transcriptional activity (pG13-Luc, a de novo generated promoter containing 13 consecutive p53 responsive elements) or promoter activity of well-characterized p53 target genes (MDM2-Luc, p21-Luc or Bax-Luc). Compared to si-ctrl, si-CPSF4 treatment increased pGL13-Luc luciferase activity, indicating that CPSF4 modulates p53 transcriptional activity (Fig. 3C). The increased p53 transcriptional activity in response to CPSF4 silencing was in accordance with the increased expression of total p53 observed above in si-CPSF4 treated cells (Fig. 3B). Moreover, a increase of luciferase activity was also observed with MDM2 promoter, but not with the ones of Bax or p21 (Fig. 3C). These results support that CPSF4 contributes to modulate the transcriptional activity of p53 in a promoter-dependent manner.

We then investigated whether the NS1-mediated modulation of p53 isoforms expression pattern affects p53 transcriptional activity and whether such modulation is dependent upon CPSF4-binding domain of NS1 (Fig. 4). Increasing amount of NS1-wt or NS1-CPSF4 mutant expressing vectors was co-transfected with one of these luciferase reporter vectors in A549 wt p53 cell line (NS1 expression was verified by western blot in Supplementary Fig. 1C). In wt NS1 transfected cells, we observed a slight decrease of the pG13-Luc luciferase activity together with significant increase of Bax and reduction of MDM2 and p21 promoter activities compared to empty control, suggesting that NS1 modulates p53 transcriptional activity (Fig. 4), in accordance with previously

published studies, including ours, demonstrating that NS1 modulates p53 transcriptional activity in a promoter-specific manner (37, 42). In cells expressing NS1-CPSF4 mutant, the pG13-Luc luciferase activity was significantly increased compared to control and NS1-wt conditions, resulting in dose-dependent increase of relative luciferase activity reaching a maximum of 6-fold induction. Such observation was supported by the observations that NS1-CPSF4 mutant differentially affected MDM2, p21 and Bax promoter activities compared to wt NS1 (Fig 4). These results indicate that the CPFS4-binding domain of NS1 plays a critical role in the regulation of p53 transcriptional activity NS1-induced.

Altogether, these data indicate that CPSF4-binding domain of NS1, but also CPSF4 itself, affect p53 transcriptional activity and p53-responsive promoters. In addition, the modulation of p53 isoforms expression pattern, resulting from alternative splicing of TP53-i9 and induced by NS1 through its CPSF4-binding domain or by CPSF4 itself, was paralleled with modulation of p53 transcriptional activity, suggesting a functional impact on viral replication.

### **The silencing of spliced p53 isoforms impairs the IAV replication.**

To support this hypothesis, we first determined whether a combined endogenous silencing of the TP53 intron 9 alternative spliced  $\beta$  and  $\gamma$  forms could affect IAV replication. We treated A549 p53 wt cells with either a non-specific si-RNA (si-ctrl) or a si-RNA targeting TP53-i9 retained by alternative splicing (si-P53i9) (Fig. 5A) prior infection with H3N2 influenza virus. First, we verified the silencing of spliced p53 isoforms in response to si-P53i9 treatment (Fig. 5C-D). In non-infected cells, si-P53i9 treatment decreased both  $\beta$  variant and p53 $\beta$  protein levels by about 40%. As previously described in infected cells (28), infection (si-ctrl condition) did not affect endogenous

p53 total mRNA levels but induced a significant and strong increase in endogenous  $\beta$  mRNA variant levels at 72hpi (4.23 and 6.80-fold increase compared to mock for MOIs 0.1 and 0.01 respectively) (Fig. 5C). Such induction was abolished in si-P53i9 treated cells, demonstrating the si-RNA treatment efficacy along the infection time-course. Secondly, we analyzed IAV cell titers in these conditions (Fig. 5B). Silencing of TP53-i9 spliced p53 isoforms was associated with a significant diminution in viral titers, particularly at 48 hpi with a 6.5 and 19-fold decreased production of influenza virus (MOIs 0.1 and 0.01 respectively), in comparison with si-ctrl treatment. Accordingly, viral expression of NP and NS1 proteins decreased in si-P53i9-treated cells compared to si-ctrl at 72 hpi, suggesting that spliced p53 isoforms have pro-viral activity (Fig. 5D). These data are in accordance with our previously published study, highlighting p53 $\beta$  as a pro-viral factor (38).

Interestingly, levels of p53 $\alpha$  protein were reduced in IAV infected cells in comparison with mock (si-ctrl condition), at both 48 and 72 hpi (Fig. 5D). Surprisingly, while si-P53i9 transfection did not change the level of p53 $\alpha$  protein in mock condition, we clearly observed more p53 $\alpha$  in infected and si-P53i9 transfected A549 cells compared to si-ctrl. Since these variations at protein levels were not observed at RNA levels, these observations suggest that C-terminal spliced p53 isoforms contribute to the IAV-reduction of p53 $\alpha$  regulation through a post-transcriptional mechanism (Fig. 5D).

Since CPSF4 affects spliced p53 isoform expression pattern and p53 transcriptional activity (Fig. 3) and since CPSF4 promoter contains p53-response elements (data not shown), we analyzed CPSF4 expression in these si-P53i9 conditions. Interestingly, silencing of the spliced  $\beta$  and  $\gamma$  variants was associated with an increase of CPSF4 protein, both in non-infected and infected conditions, while it decreased mRNA levels, suggesting a regulation of CPSF4 a transcriptional level and that the CPSF4 protein

stabilization in IAV-infected cells is dependent upon spliced p53 isoforms (Fig. 5D and Supplementary Fig. 2). These data suggest a regulatory loop between CPSF4 and p53 isoforms that could modulate IAV infection.

#### **The silencing of the CPSF4 factor also impacts the IAV replication.**

Due to the multilayer interplay between p53 isoforms and CPSF4, as well as between NS1 and CPSF4, we investigated the impact of cellular CPSF4 silencing on IAV replication. We first compared IAV growth kinetics in A549 wt p53 cells treated with si-CPSF4 or si-ctrl (Fig. 6A). When CPSF4 expression was drastically reduced by si-CPSF4 treatment, at mRNA and protein levels (Fig 6B-C), a significant increase of viral replication was observed in comparison to si-ctrl cells, with viral titers increased by up to 7 times at 72hpi (MOI 0.01) (Fig. 6A). Accordingly, viral expression of NP and NS1 proteins were increased in si-CPSF4 treated cells compared to si-ctrl cells (Fig. 6B). These data suggest that CPSF4 exhibits an anti-viral effect, on its own. Inversely, influenza virus (si-ctrl condition) decreased CPSF4 protein in A549 wt p53 cells while it increased CPSF4 mRNA levels, suggesting a regulation of CPSF4 at post-transcriptional levels in response to infection (Fig5D and Supplementary Fig. 2). Moreover, as expected regarding our previous results (Fig. 3B), the si-CPSF4 treatment induced alteration of endogenous p53 expression with enhancing levels of both p53 $\alpha$  and p53 $\beta$  proteins at 48 hours post-transfection (Fig. 6B).

Secondly, IAV growth kinetics were also performed in H1299 p53-null cells treated with si-CPSF4 or si-ctrl (Fig. 6D). In clear contrast with results obtained in A549 wt p53 cells, the si-CPSF4 treatment impacted neither viral growth nor viral expression (Fig. 6E). Interestingly, the increased CPSF4 mRNA levels in response to infection in wt p53 cells was inhibited in absence of endogenous p53 expression (si-ctrl conditions,

Fig. 6C versus 6F). However, at protein levels, CPSF4 protein remained elevated in p53-null cells both in non-infected and infected cells, suggesting that CPSF4 protein stability is dependent upon p53 (Fig. 6E). These results support a regulatory loop between CPSF4 and p53 during IAV infection and suggest that the CPSF4 anti-viral effect on IAV replication is p53- dependent.

**TP53 spliced p53 $\beta$  and p53 $\gamma$  isoforms together with CPSF4 contribute to p53-mediated IFN-response to IAV infection and extracellular stresses.**

Knowing that p53 is a key player in the regulation of innate immune responses (reviewed in (33)), and that the CPSF4-binding domain of NS1 has been recently associated to IFN regulation mechanism during infection (50), we wanted to further investigate the role of TP53 gene pathway, as well of CPSF4, on type I IFN responses in the context of infection, using a siRNA-based approach (Fig. 7). A549 p53 wt cells were transfected with either a pool of siRNA targeting all p53 isoforms (si-P53tot, Fig. 5A), siRNA targeting spliced p53 $\beta$  and p53 $\gamma$  isoforms (si-P53i9), CPSF4 (si-CPSF4) or a non-specific siRNA (si-ctrl). Transfected cells were then infected with influenza virus A/Moscow/10/99 (H3N2) at a MOI of 4. Supernatants were harvested at 24 hpi to monitor IFN  $\alpha$  and  $\beta$  levels (Fig. 7A) while the siRNA efficiency was controlled by western blot on cell lysates (Fig. 7C).

First, our results indicated that the knockdown of all p53 isoforms (including full-length p53 $\alpha$ ) strongly reduced the production of type I IFN, in comparison to cells treated with si-ctrl, with more than 50 and 40% reduction of IFN  $\alpha$  and IFN  $\beta$ , respectively (Fig. 7A). This result was in good agreement with previous reports and underlined the contribution of TP53 gene to the regulation of IFN antiviral response (51). Interestingly, we observed a very similar impact on IFN production in si-P53i9 condition, with around

50% reduction of IFN  $\alpha$  and IFN  $\beta$  (Fig. 7A). More importantly, since reduction of IFN was similar using either si-P53tot or si-P53i9, it suggested that the spliced  $\beta$  and  $\gamma$  variants are the major component, if not the only one, of the global p53-mediated regulation of IFN response. Regarding CPSF4, a significant decrease of 50% of IFN  $\alpha$  and  $\beta$  was observed in si-CPSF4 depleted cells compared to si-ctrl cells, suggesting CPSF4 is also an important player, by itself, in the regulation of IFN production. Noteworthy, the combination of si-P53i9 and si-CPSF4 also decreased the level of IFN production, however, in a similar range compared to single si-RNA treatments, without any additive effect. These observations were also supported by western blot, using the phosphorylation of STAT1 as an indicator of type I IFN response (Fig. 7C). Thus, these data suggest that both the spliced p53 $\beta$  and p53 $\gamma$  isoforms and CPSF4 are involved in promotion of type I IFN production in response to IAV infection, certainly through a common pathway.

To determine whether the CPSF4- and spliced p53 isoforms-induced IFN production occurs also in an extracellular stress context, different from IAV infection, we performed similar experiments in response to poly(I:C) treatment (Fig. 7B and D). Interestingly, we obtained similar results using our panel of siRNA, but only in the context of IFN  $\alpha$ . Indeed, compared to si-ctrl treated cells, only a limited but statistically significant reduction of IFN  $\beta$  was achieved in si-P53tot treated cells (Fig. 7B). These data suggest that both CPSF4- and spliced p53 isoforms-induced IFN production is mainly dependent upon IAV infection.

Altogether, these results clearly indicate that spliced p53 $\beta$  and p53 $\gamma$  isoforms are major contributor to the global p53-mediated regulation of type I IFN. Interestingly, our data suggest that CPSF4/spliced p53 isoforms are part of the same pathway, favoring IFN production during IAV infection.

## Discussion

During their replication cycle, IAV are known to hijack the host splicing machinery to process their smallest gene segments (M and NS). For this, they have developed accurate regulation mechanisms to hijack the host spliceosome to enable the expression of specific spliced IAV products throughout infection (5). Indeed, several genome-wide screening studies, dedicated to point important host factors for IAV replication, have highlighted a large number of cellular proteins involved in RNA maturation and splicing processes, including several splicing factors (5, 52-54). However, the impact of IAV infection on the regulation of splicing of host mRNAs has not been extensively investigated yet.

The transcription factor p53, also named “guardian of the genome” or “cellular gatekeeper” is most of the time – if it is not always – targeted by viruses during the time-course of infection (34, 55). This feature is a powerful way for viruses to modulate or hijack p53-mediated cellular functions, including those involved in the regulation of the immune and inflammatory responses (33, 39). In the context of IAV, we and others have demonstrated that IAV target p53 at several transcriptional and post-transcriptional regulatory levels (36-38, 40-42). Among these, we demonstrated a functional interplay between IAV viral production and p53 isoforms, notably with p53 $\beta$  isoform, known to be generated by partial retention of TP53-i9 (38, 56). In this study, we describe another layer of interplay, showing that IAV infection modulates the alternative splicing of TP53 at the level in intron 9, in favor of under-represented spliced forms such as p53 $\beta$ , in good agreement to that was previously observed (38). Interestingly, the non-structural protein NS1 appears to be a major player in this mechanism, as NS1 transient expression experiments recapitulated our initial observation on TP53 splicing in the context of infection (Fig. 1C). Among the multiple functions of NS1, we currently know

that NS1 interferes with several cellular signaling pathways, including p53, but also play an important role in the modulation of mRNA maturation and splicing (6, 7), and our results illustrate well how these different functions overlap during infection.

One striking result in our study was that the CPSF4-binding domain of NS1 is involved in the NS1-mediated modulation of TP53 intron 9 retention, as demonstrated by transient expression experiments (Fig. 1 and 4) and the use of NS1 recombinant viruses (Fig. 2). In addition, our results suggest a regulatory loop between IAV NS1, and host factors CPSF4/p53 during IAV infection (Fig. 5-7). Interestingly, a large part of literature dedicated to CPSF4 (CPSF30), originates from studies performed in the context of IAV infection (21). The first described role of CPSF4 is to participate to 3' end cleavage and polyadenylation of cellular pre-mRNAs. The binding of NS1 to CPSF4 was demonstrated to inhibit these activities, contributing to the NS1-mediated regulation of host gene expression and inhibition of interferon response (24, 25, 27, 57). In line with these features; our results indicate that CPSF4 contributes to the p53-mediated IFN-response to IAV infection (Fig. 7), supporting the hypothesis of a link between CPSF4 and the innate immune response. More recently, several reports have investigated the functional contribution of CPSF4 to the spliceosome machinery, acting as a cofactor for splicing regulators, such as RBFOX2 or HNRNPA1, suggesting that CPSF4 is more directly involved in the regulation of alternative splicing (28-30). Once again, our results are in good agreement with this emerging role for CPSF4. Indeed, we demonstrated that CPSF4 is involved in the regulation of TP53 splicing, showing that the use of a specific si-RNA targeting CPSF4 contributes to the exclusion of TP53-intron 9 in favor of the expression of p53 $\alpha$  variant, even in basal condition, outside of IAV infection context (Fig. 3A). Thus, we identified a novel splicing regulator of the TP53 alternative splicing at the level of its intron 9. Future investigations will be

necessary to understand if this CPSF4-mediated modulation of splicing is specific to TP53 (or to a subset of host genes) or rather results from a more global impact on host splicing.

Altogether, our combination of different experimental approaches revealed strong regulatory connections between NS1, CPSF4 and p53. To dress a complete picture of this virus-host trio, we also made interesting crossed observations focused on TP53 splicing and p53 transcriptional activity. First, we have demonstrated that CPSF4 modulates both TP53 splicing and p53 transcriptional activity (Fig.3). These two events are likely directly correlated, as we previously demonstrated that p53 spliced forms regulate p53 transcriptional activity (45, 46). In parallel, we have also demonstrated that NS1 modulates the alternative splicing of TP53 intron 9, in favor of  $\beta$  and  $\gamma$  forms, and that the CPSF4 binding domain of NS1 was involved in this modulation (Fig. 1). This NS1-mediated modulation of TP53 splicing was correlated with a modulation of p53 transcriptional activity, the latter being in agreement with previously published works (37, 42). In addition, several studies, including ours, performed in different physiological and pathological contexts, clearly indicate that alteration or disruption of the splicing machinery have a marked impact on p53 transcriptional activity and p53-mediated cellular responses, in a promoter-dependent manner, suggesting a role of the p53 spliced isoforms in these processes (47, 58). Our results obtained in the case of IAV infection, or in the experimental contexts of NS1 transient expression/silencing of CPS4, confirmed these observations, as we described a marked deregulation of TP53 splicing associated to a modulation of p53 transcriptional activity in a promoter dependent-manner (Fig. 1-4).

Finally, our results focused on viral production and p53-mediated regulation of type I IFN response complete our understanding of the underlying biological significance of

the NS1/CPSF4/p53 interplay. Using specific si-RNAs, we first demonstrated that p53 spliced  $\beta$  and  $\gamma$  forms have a pro-viral effect (Fig. 6), in line with our previous study (38). In parallel, we have also observed that silencing of CPSF4, which modulates TP53 splicing, significantly affects viral production, in a p53-dependent manner (Fig. 5). This latter experimental silencing of CPSF4 could be somewhat compared to that happens from early steps of IAV infection, with NS1 hampering CPSF4 functions. We can hypothesize that the role of CPFS4 in IAV infection may not only rely on the maturation of host pre-mRNAs (21-23), but also, on the modulation of TP53 splicing and p53-mediated responses, NS1 being involved in those two mechanisms. A converging point between known functions of CPSF4 and those of p53 is the regulation of IFN responses. Indeed, CPSF4 is involved in the NS1-dependent regulation of several host genes and particularly to the inhibition of IFN response (24-27). On the other side, p53 is known to constitute an amplification loop in the innate immune response, TP53 being part of the family of Interferon-stimulated genes (ISGs), and p53 regulating the expression of several genes involved in IFN response (reviewed in (33)). Our results confirmed these observations (Fig. 7), and suggest that spliced p53 $\beta$  and p53 $\gamma$  isoforms are major contributor to the global p53-mediated regulation of type I IFN, and that CPSF4 might be involved in the same regulatory loop.

Based on our results, we can propose the following model depicted in Fig.8. During IAV infection, NS1 inhibits p53 transcriptional activity via its interaction with p53, but also via the modulation of TP53 splicing – NS1 “buffering” the function of CPSF4 in mRNA maturation and splicing (Fig. 8). As a consequence, spliced p53 isoforms modulation of p53 transcriptional activity, and notably p53-mediated antiviral responses, coupled to the global impact of CPSF4 blockade, positively affect viral production. In presence of mutations in NS1 preventing its binding to CPSF4, this

regulation loop is impaired, and the antiviral response is increased, limiting viral production (Fig. 8). In future investigation, it will be interesting to investigate the presence of specific mutations in NS1 of IAV circulating strains that could interfere in this NS1/CPSF4/p53 trio, to evaluate a possible impact on strain pathogenesis and virulence.

In conclusion, our results have completed our understanding of the complex mechanisms of hijacking of the p53 pathway during IAV infection, but have also highlighted a particular virus-host trio NS1/CPSF4/p53 that is crucial for viral replication, at the crossroad of mRNA maturation and splicing and p53-mediated antiviral responses.

## **Methods**

### **Cells lines, influenza viruses and infection**

Human lung epithelial A549 (wild-type p53; ATCC CCL-185) and H1299 (p53 null; ATCC CRL-5803) cells were maintained at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies) supplemented with 10% (or 5% for H1299 cells) of heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) (Lonza), under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

Influenza viruses A/Moscow/10/99 (H3N2) and A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), obtained from the French national influenza monitoring network GROG (Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe, Lyon, France), were produced in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells (ATCC CCL-34) in Eagle's minimum essential medium (EMEM; Life Technologies). Viruses were titrated on confluent layers of MDCK cells in 96-well plates to determine the 50% tissue culture infectious dose by endpoint titration

(TCID<sub>50</sub>/mL), determined using the Reed and Muench statistical method (59). A549 and H1299 cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 or 4 TCID<sub>50</sub>/cell. After 1h of viral adsorption, cells were overlaid with DMEM supplemented of 2 mM L-glutamine, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and 0.5 µg/mL TPCK-trypsin (Roche diagnostics) and incubated at 37°C.

For viral growth kinetic assays, MDCK cells were infected at MOI of 10<sup>-1</sup> or 10<sup>-2</sup> TCID<sub>50</sub>/cell. After a 1-h viral adsorption period, cells were overlaid with Eagle's minimum elementary medium (EMEM, Lonza) supplemented with 1 µg/ml trypsin (Roche diagnostics) and further incubated at 34 °C. Harvested supernatants were centrifuged at 1500g for 10 min and stored at – 80 °C until analysis.

### **Plasmids and TP53-i9 minigene**

For transient expression of NS1, A549 and H1299 cells at 40% of confluence were transfected using TransIT-LT1 Reagent (Mirus), following manufacturer's instructions, with a panel of pCI plasmids empty or carrying wild-type or mutated NS1 sequences derived from the A/Moscow/10/99 (H3N2) strain. Wild-type pCI-NS1 (NS1 wt) is a kind gift of Dr Nadia Naffakh, Institut Pasteur, France. Three pCI-NS1 mutants (NS1-Y89F, NS1-R38A/K41A and NS1-CPSF4, mutated from amino acids 184 to 188, sequence RFLRY in place of GLEWN) were obtained by site-directed mutagenesis. Each plasmid was validated by sequencing.

For TP53 splicing assay, we advantageously used the pcDNA3-ASAI9 p53 minigene plasmid (named TP53-i9 minigene), which design and protocol were previously described (47). The pcDNA3-ASAI9 p53 minigene contains a portion of the TP53 gene that includes the 3' end of exon 9, the entire intron 9 and the beginning of exon 10, as pictured in Fig. 1A, as well as the neomycin-resistant gene used to assess transfection

efficiency. In infection experiments, cells were infected as described, 24-48h after TP53-i9 minigene transfection. In co-transfection experiments, the TP53-i9 minigene was transfected simultaneously with indicated quantities of pCI-NS1 expressing plasmid.

### **RNA analysis and real-time quantitative PCR**

Cells lysates were harvested at 8 hours post-infection (hpi, MOI 4) or at 24 hpi (MOI 0.1) and total RNAs were extracted using the RNeasy minikit (Qiagen), according to supplier protocol. Reverse transcription was performed on 1 $\mu$ g of total RNAs with SuperScriptII Reverse Transcriptase (Invitrogen) at 42°C followed by a quantitative PCR using SYBR Green qPCR Master Mix (Agilent, Santa Clara, CA, USA). In TP53-i9 minigene experiment, we used specific primers for each p53 spliced RNAs or neomycin-resistance gene, as previously described (47). For quantitation of endogenous p53 mRNA levels, qPCR was carried out using TaqMan 2X Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA) with specific sets of primers and probes: E8/9 primers for amplification of total p53 isoforms, p53 $\beta$  primers for amplification of  $\beta$  forms and Actin primers for normalization, as previously described (47). A complete list of primers and probes used in this study is available in Supplementary Table 1. The  $\Delta\Delta$ CT method was used to determine the fold change of mRNA levels using neomycin-resistance or actin expression level as a reference. Relative mRNA levels were quantified in triplicate, on three independent experiments at least, to perform statistical analyses. The ratio of  $\beta$ + $\gamma$  variants on total expression was measured dividing the sum of  $\beta$  and  $\gamma$  relative quantities, by the sum of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ , all forms being individually normalized onto neomycin. This ratio of  $\beta$ + $\gamma$  variants is used an indicator of the extent of splicing for comparison purpose.

### **Western-blotting**

Total proteins were extracted by scraping and syringing cells in 1X NuPAGE LDS buffer (Invitrogen). About 15–30 µg of proteins were loaded on 10 or 12% SDS gels and analyzed by immunoblotting using the following antibodies: sheep polyclonal antibody anti-total p53 isoforms (SAPU, Dundee, UK); rabbit polyclonal antibodies anti-NS1 (30F/31F, kind gift of Daniel Marc, INRA Tours, France), anti-NP (CDC/IVPS, 30AUG01) and anti-phosphorylated (Tyr701) STAT1 (#9167, Cell Signaling Technology); mouse monoclonal antibodies anti-p53 TA isoforms (DO-1, Dundee, UK), anti-NS1 (SantaCruz, sc-130568), anti-CPSF4 antibody (Santa-Cruz sc-393316), anti-STAT1 (#9176, Cell Signaling Technology) and anti-Ku80 (AbCam), used as loading control.

### **Transactivation assay**

A549 cells were transfected with 1µg of firefly luciferase reporter vectors corresponding to different p53-responsive elements. Cells were co-transfected with pCI-empty or NS1-expressing pCI plasmids and harvested at 48h post-transfection. Transfection efficiency was normalized using 100ng of Renilla luciferase plasmid. Luciferase activity was measured in whole cell extracts, in triplicate on two independent experiments, using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega), according to the manufacturer's instructions. The different reporter vectors used were pG13-luc with the luciferase gene under the control of thirteen copies of the p53-binding consensus sequence (5'- CCAGGCAAGTCCAGGCAGG- 3') and p21-luc, Mdm2-luc and Bax-luc with the luciferase gene under the control of the complete (p21) or partial (Mdm2 and Bax) promoter sequence of the corresponding genes (60-62).

### **Recombinant viruses**

Recombinant PR8/NS1 wt and PR8/NS1-CPSF4 viruses were generated by reverse genetic, as previously exemplified (63). Briefly, a pHW2000 plasmid containing NS sequence from A/Moscow/10/99 (49) was mutated to generate NS1-CPSF4 mutant (from amino acid 184 to 188, sequence RFLRY in place of GLEWN). Recombinant virus generation was performed by transfection of 293T cells using set of pHW2000 plasmids from PR8 system and pHW2000 plasmid containing NS wt or NS1-CPSF4 sequences from A/Moscow/10/99 coding. At 48 h post-transfection, viruses in the culture supernatant were harvested and used to infect layer of MDCK cells. Viral stocks were prepared after three passages on MDCK cells and titers were measured using standard TCID<sub>50</sub> methods. Full genomes of recombinant viruses were validated by sequencing.

### **si-RNA treatment**

A549 or H1299 cells (cell confluence, 50%), seeded in antibiotic-free medium, were transfected twice at 24h intervals with either 50 nM of nonspecific si-RNA (si-ctrl, catalog number 0R-0030-Neg05; Eurogentec), or a pool of si-RNA CPSF4 (on-Target plus Human CPSF4 #10898 siRNA smartpool, Dharmacon), specific si-RNAs targeting global p53 isoforms (si-P53tot) or p53 spliced  $\beta$  and  $\gamma$  forms (siP53-i9, Fig. 6A; Eurogentec based on sequences in (47)), using Oligofectamine (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Cells were then infected or treated 24h after the last si-RNA transfection. The efficiency of si-RNA mediated knockdown after treatment was evaluated by RT-qPCR and/or western blotting.

### **IFN- $\alpha$ / $\beta$ ELISA**

Twenty-four hours after si-RNAs transfection, A549 cells were infected with A/Moscow/10/99 (H3N2) at MOI 4 or alternatively treated with 50  $\mu$ g /mL of extracellular poly I:C (Sigma Aldrich). Forty-eight hours after transfection, type I IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  were quantified in supernatants using the VeriKine Human Interferon Alpha Multi-Subtype Serum ELISA Kit or the VeriKine-HSTM Human Interferon Beta Serum ELISA kit (PBL Assay Science, NJ, USA) respectively, following the manufacturer's protocol.

### **Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Paules C, Subbarao K. Influenza. *Lancet*. 2017.
2. Neumann G, Kawaoka Y. The first influenza pandemic of the new millennium. *Influenza and other respiratory viruses*. 2011;5(3):157-66.
3. Palese P. SM. Orthomyxoviridae. In: Knipe DM eae, editor. *Fields virology*, 6th ed Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA; 2013. p. 1151-85.
4. Watanabe T, Watanabe S, Kawaoka Y. Cellular networks involved in the influenza virus life cycle. *Cell host & microbe*. 2010;7(6):427-39.
5. Dubois J, Terrier O, Rosa-Calatrava M. Influenza viruses and mRNA splicing: doing more with less. *mBio*. 2014;5(3):e00070-14.
6. Marc D. Influenza virus non-structural protein NS1: interferon antagonism and beyond. *The Journal of general virology*. 2014;95(Pt 12):2594-611.
7. Krug RM. Functions of the influenza A virus NS1 protein in antiviral defense. *Current opinion in virology*. 2015;12:1-6.
8. Ayllon J, Garcia-Sastre A. The NS1 protein: a multitasking virulence factor. *Current topics in microbiology and immunology*. 2015;386:73-107.
9. Hale BG, Randall RE, Ortin J, Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *The Journal of general virology*. 2008;89(Pt 10):2359-76.
10. Ramos I, Carnero E, Bernal-Rubio D, Seibert CW, Westera L, Garcia-Sastre A, et al. Contribution of double-stranded RNA and CPSF30 binding domains of influenza virus NS1 to the inhibition of type I interferon production and activation of human dendritic cells. *Journal of virology*. 2013;87(5):2430-40.

11. Pereira CF, Read EKC, Wise HM, Amorim MJ, Digard P. Influenza A Virus NS1 Protein Promotes Efficient Nuclear Export of Unspliced Viral M1 mRNA. *Journal of virology*. 2017;91(15).
12. Mor A, White A, Zhang K, Thompson M, Esparza M, Munoz-Moreno R, et al. Influenza Virus mRNA Trafficking Through Host Nuclear Speckles. *Nature microbiology*. 2016;2016.
13. Panthu B, Terrier O, Carron C, Traversier A, Corbin A, Balvay L, et al. The NS1 Protein from Influenza Virus Stimulates Translation Initiation by Enhancing Ribosome Recruitment to mRNAs. *Journal of molecular biology*. 2017;429(21):3334-52.
14. de la Luna S, Fortes P, Beloso A, Ortin J. Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *Journal of virology*. 1995;69(4):2427-33.
15. Hatada E, Fukuda R. Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro. *The Journal of general virology*. 1992;73 ( Pt 12):3325-9.
16. Cheng A, Wong SM, Yuan YA. Structural basis for dsRNA recognition by NS1 protein of influenza A virus. *Cell research*. 2009;19(2):187-95.
17. Hale BG, Kerry PS, Jackson D, Precious BL, Gray A, Killip MJ, et al. Structural insights into phosphoinositide 3-kinase activation by the influenza A virus NS1 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(5):1954-9.
18. Guo Z, Chen LM, Zeng H, Gomez JA, Plowden J, Fujita T, et al. NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2007;36(3):263-9.

19. Opitz B, Rejaibi A, Dauber B, Eckhard J, Vinzing M, Schmeck B, et al. IFN $\beta$  induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein. *Cellular microbiology*. 2007;9(4):930-8.
20. Mibayashi M, Martinez-Sobrido L, Loo YM, Cardenas WB, Gale M, Jr., Garcia-Sastre A. Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *Journal of virology*. 2007;81(2):514-24.
21. Nemeroff ME, Barabino SM, Li Y, Keller W, Krug RM. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs. *Molecular cell*. 1998;1(7):991-1000.
22. Bienroth S, Keller W, Wahle E. Assembly of a processive messenger RNA polyadenylation complex. *The EMBO journal*. 1993;12(2):585-94.
23. Barabino SM, Hubner W, Jenny A, Minvielle-Sebastia L, Keller W. The 30-kD subunit of mammalian cleavage and polyadenylation specificity factor and its yeast homolog are RNA-binding zinc finger proteins. *Genes & development*. 1997;11(13):1703-16.
24. Das K, Ma LC, Xiao R, Radvansky B, Aramini J, Zhao L, et al. Structural basis for suppression of a host antiviral response by influenza A virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(35):13093-8.
25. Dankar SK, Miranda E, Forbes NE, Pelchat M, Tavassoli A, Selman M, et al. Influenza A/Hong Kong/156/1997(H5N1) virus NS1 gene mutations F103L and M106I both increase IFN antagonism, virulence and cytoplasmic localization but differ in binding to RIG-I and CPSF30. *Virology journal*. 2013;10:243.

26. Ayllon J, Domingues P, Rajsbaum R, Miorin L, Schmolke M, Hale BG, et al. A single amino acid substitution in the novel H7N9 influenza A virus NS1 protein increases CPSF30 binding and virulence. *Journal of virology*. 2014;88(20):12146-51.
27. Nogales A, Martinez-Sobrido L, Topham DJ, DeDiego ML. NS1 Protein Amino Acid Changes D189N and V194I Affect Interferon Responses, Thermosensitivity, and Virulence of Circulating H3N2 Human Influenza A Viruses. *Journal of virology*. 2017;91(5).
28. Misra A, Ou J, Zhu LJ, Green MR. Global analysis of CPSF2-mediated alternative splicing: Integration of global iCLIP and transcriptome profiling data. *Genomics data*. 2015;6:217-21.
29. Misra A, Green MR. From polyadenylation to splicing: Dual role for mRNA 3' end formation factors. *RNA biology*. 2016;13(3):259-64.
30. Martinson HG. An active role for splicing in 3'-end formation. *Wiley interdisciplinary reviews RNA*. 2011;2(4):459-70.
31. Kruiswijk F, Labuschagne CF, Vousden KH. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2015;16(7):393-405.
32. Lane D, Levine A. p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010;2(12):a000893.
33. Munoz-Fontela C, Mandinova A, Aaronson SA, Lee SW. Emerging roles of p53 and other tumour-suppressor genes in immune regulation. *Nature reviews Immunology*. 2016;16(12):741-50.
34. Sato Y, Tsurumi T. Genome guardian p53 and viral infections. *Reviews in medical virology*. 2013;23(4):213-20.

35. Yan W, Wei J, Deng X, Shi Z, Zhu Z, Shao D, et al. Transcriptional analysis of immune-related gene expression in p53-deficient mice with increased susceptibility to influenza A virus infection. *BMC medical genomics*. 2015;8:52.
36. Nailwal H, Sharma S, Mayank AK, Lal SK. The nucleoprotein of influenza A virus induces p53 signaling and apoptosis via attenuation of host ubiquitin ligase RNF43. *Cell death & disease*. 2015;6:e1768.
37. Terrier O, Diederichs A, Dubois J, Cartet G, Lina B, Bourdon JC, et al. Influenza NS1 interacts with p53 and alters its binding to p53-responsive genes, in a promoter-dependent manner. *FEBS letters*. 2013;587(18):2965-71.
38. Terrier O, Marcel V, Cartet G, Lane DP, Lina B, Rosa-Calatrava M, et al. Influenza A viruses control expression of proviral human p53 isoforms p53beta and Delta133p53alpha. *Journal of virology*. 2012;86(16):8452-60.
39. Munoz-Fontela C, Pazos M, Delgado I, Murk W, Mungamuri SK, Lee SW, et al. p53 serves as a host antiviral factor that enhances innate and adaptive immune responses to influenza A virus. *Journal of immunology*. 2011;187(12):6428-36.
40. Wang X, Deng X, Yan W, Zhu Z, Shen Y, Qiu Y, et al. Stabilization of p53 in influenza A virus-infected cells is associated with compromised MDM2-mediated ubiquitination of p53. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(22):18366-75.
41. Terrier O, Josset L, Textoris J, Marcel V, Cartet G, Ferraris O, et al. Cellular transcriptional profiling in human lung epithelial cells infected by different subtypes of influenza A viruses reveals an overall down-regulation of the host p53 pathway. *Virology journal*. 2011;8:285.
42. Wang X, Shen Y, Qiu Y, Shi Z, Shao D, Chen P, et al. The non-structural (NS1) protein of influenza A virus associates with p53 and inhibits p53-mediated

transcriptional activity and apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;395(1):141-5.

43. Turpin E, Luke K, Jones J, Tumpey T, Konan K, Schultz-Cherry S. Influenza virus infection increases p53 activity: role of p53 in cell death and viral replication. *Journal of virology*. 2005;79(14):8802-11.

44. Khoury MP, Bourdon JC. The isoforms of the p53 protein. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010;2(3):a000927.

45. Joruz SM, Bourdon JC. p53 Isoforms: Key Regulators of the Cell Fate Decision. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2016;6(8).

46. Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, et al. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes & development*. 2005;19(18):2122-37.

47. Marcel V, Fernandes K, Terrier O, Lane DP, Bourdon JC. Modulation of p53beta and p53gamma expression by regulating the alternative splicing of TP53 gene modifies cellular response. *Cell death and differentiation*. 2014;21(9):1377-87.

48. Noah DL, Twu KY, Krug RM. Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs. *Virology*. 2003;307(2):386-95.

49. Terrier O, Moules V, Carron C, Cartet G, Frobert E, Yver M, et al. The influenza fingerprints: NS1 and M1 proteins contribute to specific host cell ultrastructure signatures upon infection by different influenza A viruses. *Virology*. 2012;432(1):204-18.

50. Wang BX, Brown EG, Fish EN. Residues F103 and M106 within the influenza A virus NS1 CPSF4-binding region regulate interferon-stimulated gene translation initiation. *Virology*. 2017;508:170-9.
51. Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, Stoiber D, Negishi H, Kikuchi H, et al. Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature*. 2003;424(6948):516-23.
52. Karlas A, Machuy N, Shin Y, Pleissner KP, Artarini A, Heuer D, et al. Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature*. 2010;463(7282):818-22.
53. Konig R, Stertz S, Zhou Y, Inoue A, Hoffmann HH, Bhattacharyya S, et al. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature*. 2010;463(7282):813-7.
54. Watanabe T, Kawaoka Y. Influenza virus-host interactomes as a basis for antiviral drug development. *Current opinion in virology*. 2015;14:71-8.
55. Lazo PA, Santos CR. Interference with p53 functions in human viral infections, a target for novel antiviral strategies? *Reviews in medical virology*. 2011;21(5):285-300.
56. Terrier O, Bourdon JC, Rosa-Calatrava M. p53 protein isoforms: key regulators in the front line of pathogen infections? *PLoS pathogens*. 2013;9(4):e1003246.
57. Hale BG, Steel J, Medina RA, Manicassamy B, Ye J, Hickman D, et al. Inefficient control of host gene expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus NS1 protein. *Journal of virology*. 2010;84(14):6909-22.
58. Allende-Vega N, Dayal S, Agarwala U, Sparks A, Bourdon JC, Saville MK. p53 is activated in response to disruption of the pre-mRNA splicing machinery. *Oncogene*. 2013;32(1):1-14.

59. Moules V, Ferraris O, Terrier O, Giudice E, Yver M, Rolland JP, et al. In vitro characterization of naturally occurring influenza H3NA- viruses lacking the NA gene segment: toward a new mechanism of viral resistance? *Virology*. 2010;404(2):215-24.
60. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993;75(4):817-25.
61. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*. 1995;80(2):293-9.
62. Juven T, Barak Y, Zauberman A, George DL, Oren M. Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene. *Oncogene*. 1993;8(12):3411-6.
63. Essere B, Yver M, Gavazzi C, Terrier O, Isel C, Fournier E, et al. Critical role of segment-specific packaging signals in genetic reassortment of influenza A viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(40):E3840-8.

## Figures captions

**Figure 1 – Influenza viruses and the viral NS1 protein by itself modulate *TP53-i9* minigene alternative splicing.** (A) Picture of *TP53-i9* minigene. Intron 9 of p53 was inserted into pCDNA3 plasmids with part of exon 9 and 10 on both sides, transcription of mRNA corresponding to each spliced variants depending on CMV promoter (507). (B) Levels of mRNAs corresponding to p53 spliced variants  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  were measured in H1299 cells (p53 null) in which *TP53-i9* minigene plasmid was transfected 36 hours before mock infection or infections by A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) or A/Moscow/10/99 (H3N2). Cells lysates were harvested at 8hpi for infection at MOI 4 or at 24hpi for infection at MOI 0.1 and relative levels of mRNAs corresponding to  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  p53 spliced variants were measured by specific RT-qPCR. Expression of each variant was normalized onto neomycin-resistance gene, also expression by *TP53-i9* minigene. Viral protein expression (NP and NS1) was monitored by western blot. (C) The expression of variants  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  was measured in H1299 cells 48h after co-transfection of *TP53-i9* minigene and 1 $\mu$ g of pCI empty or pCI NS1 wt and was used to calculate  $\beta+\gamma$  ratio compared to total mRNA expression. Mean values +/- standard deviation for at least three independent experiments are presented and statistical tests compared each condition to its control condition using two-way ANOVA (\*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ). (D-E) In H1299 cells, *TP53-i9* minigene was co-transfected with 1 $\mu$ g of pCI empty, pCI NS1wt (results extracted from Figure 1C) or pCI NS1-Y89F, pCI NS1-R38A/K41A and pCI NS1-CPSF4 mutants (D) or with increasing amounts (0.1, 0.5 or 1 $\mu$ g) of pCI NS1 wt or pCI NS1-CPSF4 plasmids (E). Forty-eight hours after co-transfection, levels of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  mRNAs were measured (Supplementary 1) and used to estimate  $\beta+\gamma$  ratio. Efficacy of NS1 transient expressions was validated by western-blot.

Mean values +/- standard deviation from more than three independent experiments and statistical tests compared each condition to its control empty condition or NS1 wt condition using Student's t-test are presented (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  and \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

**Figure 2 – IAV-regulated p53 expression is affected by CPSF4-mutant.** A549 cells were mock- or infected with either recombinant IAV PR8/NS1 wt or PR8/NS1-CPSF4 viruses. Cells lysates were harvested at 8hpi (MOI 4, **A-B**) or 24hpi (MOI 0.1, **C-D**). Detection of total p53 and  $\beta$  forms was performed by RT-qPCR and western-blot (SAPU antibody). Viral proteins NP and NS1 were also detected. \* and \*\* indicate short and long exposure, respectively. Mean values +/- standard deviation of experimental duplicates are presented and statistical tests compared each condition to its control condition using two-way ANOVA and Dunnett's post-test (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  and \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

**Figure 3 – The silencing of cellular CPSF4 factor impacts TP53 splicing and p53 transcriptional activity.** CPSF4 silencing was performed by transfecting H1299 (p53-null) or A549 (p53wt) cells with either a non-specific siRNA (negative-control si-ctrl), or a pool of siRNAs targeting cellular CPSF4. **(A)** Twenty-four hours following siRNA treatment, H1299 cells were transfected with *TP53-i9* minigene plasmid and the relative expression of spliced  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  p53 variants was measured by RT-qPCR at 48 hpt. **(B)** Similar si-RNA treatment was performed on A549 cells and relative mRNAs levels of global p53 or  $\beta$  forms was measured and normalized on actin expression. **(C)** Twenty-four hours following siRNA treatment, A549 cells were transfected with pG13-luc, Mdm2-luc, Bax-luc or p21-luc reporter plasmids and relative luciferase activities were

measured 48h later. Mean values +/- standard deviation of experimental duplicates are shown and statistical tests compared each condition to the si-ctrl condition using two-way ANOVA and Dunnett's post-test (\*\*,  $p < 0.01$ ).

**Figure 4 – The CPSF4-binding domain of NS1 protein plays a crucial role in the alteration of p53 isoforms expression and p53 transcriptional activity.** A549 cells were transfected with pG13-luc, Mdm2-luc, Bax-luc or p21-luc reporter plasmids together with increasing concentrations of NS1 expressing plasmid (wt or NS1-CPSF4 mutant). Measures of p53 transactivation activity were made in triplicate on two independent experiments and expressed in relative luciferase unit (RLU) compared to empty condition. Mean values +/- standard deviation are represented and statistical tests compared each condition to empty condition using one-way ANOVA and Dunnett's post-test (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  and \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

**Figure 5 – Silencing of the *TP53* intron 9 alternative spliced forms  $\beta$  and  $\gamma$  impairs the IAV replication.** A549 cells were transfected twice with non-specific si-RNA (negative-control si-ctrl) or a specific si-RNA targeting the  $\beta$  and  $\gamma$  p53 spliced forms, as illustrated in (A). Twenty-four hours after the last treatment, cells were infected with A/Moscow/10/99 (H3N2) at MOI 0.1 or 0.01. Supernatants were harvested at 24h interval during 3 days and the viral replication was determined by endpoint TCID50 titration in MDCK cells (measured in quadruplicate in 2 independent experiments) (B). Cells lysates were harvested before infection (T=0) or at 72hpi to quantify p53<sub>total</sub> and p53 $\beta$  mRNA expression levels by RT-qPCR, normalized on actine expression (C). Cellular and viral proteins were detected in western-blot (D). \* and \*\* indicate short and long exposure respectively. Data represent independent experimental duplicates.

Mean values +/- standard deviation are represented and statistical tests compared each condition to si-ctrl T=0 condition using two-way ANOVA (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ).

**Figure 6 – The silencing of cellular CPSF4 factor impacts IAV replication, in a partially p53-dependent manner.** A549 (A-C) or H1299 (D-F) cells were treated twice with either a nonspecific siRNA (negative-control si-ctrl) or a pool of siRNAs targeting cellular CPSF4. Twenty-four hours after the last transfection, cells were infected with A/Moscow/10/99 (H3N2) at MOI 0.1 or 0.01. Supernatants were harvested at 24h interval during 3 days and the viral kinetics in A549 cells (A) or H1299 cells (D) were determined by endpoint TCID<sub>50</sub> titration in MDCK cells (measured in quadruplicate in 2 independent experiments). Cells lysates were harvested before infection (T=0) or at 72hpi and cellular p53 and CPSF4, together with viral NP and NS1 proteins were detected by western-blot (B and E). CPSF4 mRNA expression was also measured by RT-qPCR (normalized on GAPDH expression) at T=0 and 72 hpi (C-F). All data represent independent experimental duplicates. Mean values +/- standard deviation are represented and statistical tests compared each condition to si-ctrl one at T=0 using two-way ANOVA (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  and \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

**Figure 7 – TP53 spliced p53 $\beta$  and p53 $\gamma$  isoforms together with CPSF4 contribute to p53-mediated IFN-response to IAV infection and extracellular stresses.** A549 cells were treated twice with nonspecific si-RNA (si-ctrl), a siRNA targeting all p53 forms (si-P53tot, figure 5A), a specific siRNA targeting  $\beta/\gamma$  p53 spliced forms (si-P53i9, figure 5A), a pool of si-RNAs targeting CPSF4 (si-CPSF4) or a combination of si-P53i9 and si-CPSF4. Twenty-four hours later, we infected cells with A/Moscow/10/99 (H3N2) at MOI of 4 (left panel) or added extracellular poly I:C to induce a stress

through TLR3 activation (right panel). **(A-B)** Supernatants were harvested 24h later for IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  quantification and **(C)** cells lysates were also collected to monitor infection, si-RNA efficiency and IFN-response via STAT1 phosphorylation by western-blot. \* and \*\* indicate short and long exposure respectively with DO-1 antibody. Mean values +/- standard deviation of experimental duplicate are shown and two-way ANOVA test compared each condition to si-ctrl condition (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  and \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

**Figure 8 – Working model of interplay between IAV NS1 protein, cellular factor CPSF4 and *TP53* splicing.**

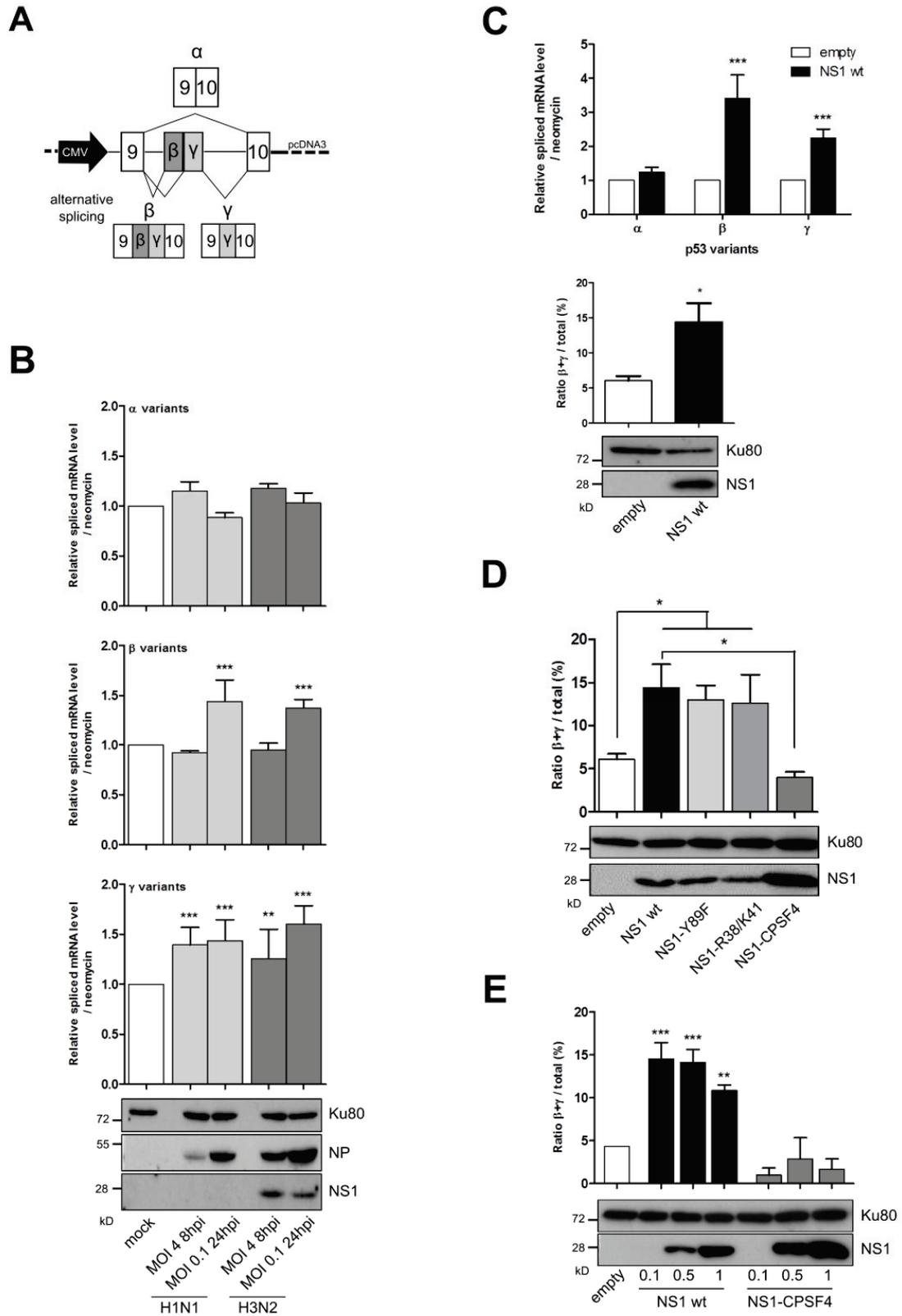
**Supplementary Figure 1. (A-B)** The expression of variants  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  was measured by RT-qPCR in H1299 cells 48h after co-transfection of *TP53-i9* minigene and 1 $\mu$ g of pCI empty, pCI NS1wt or pCI NS1-Y89F, pCI NS1-R38A/K41A and pCI NS1-CPSF4 mutants **(A)** or with increasing amounts (0.1, 0.5 or 1 $\mu$ g) of pCI NS1 wt or pCI NS1-CPSF4 plasmids **(B)**. Mean values +/- standard deviation for at least three independent experiments are presented and statistical tests compared each condition to its control condition using two-way ANOVA (\*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ). **(C)** A549 cells were transfected with 1 $\mu$ g of pCI plasmids (empty, NS1 wt or NS1-CPSF4) for 48 hours and endogenous expressions of global or  $\beta$  p53 forms were measured by RT-qPCR. Levels of mRNAs were measured in five independent experiments and normalized on the empty condition. **(D)** Increasing concentrations of NS1 expressing plasmids (wt or NS1-CPSF4 mutant) were transfected into A549 cells and p53 isoforms expression was detected by western-blot using SAPU antibody. \* and \*\* indicate short and long exposure respectively. Based on their size, we identified some of p53 isoforms. NS1 was also detected and Ku80 was used as loading control.

**Supplementary Figure 2. (A)** After si-P53i9 treatments, cells lysates were harvested before infection (T=0) and we quantified CPSF4 expression levels by RT-qPCR, normalized on GAPDH expression.

Relative Level of Protein (RLP) CPSF4 was measured by densitometry from western-blot of Figure 5F **(B)**, Figure 6B **(C)** and Figure 6E **(D)**.

# Figures

## Figure 1



**Figure 2**

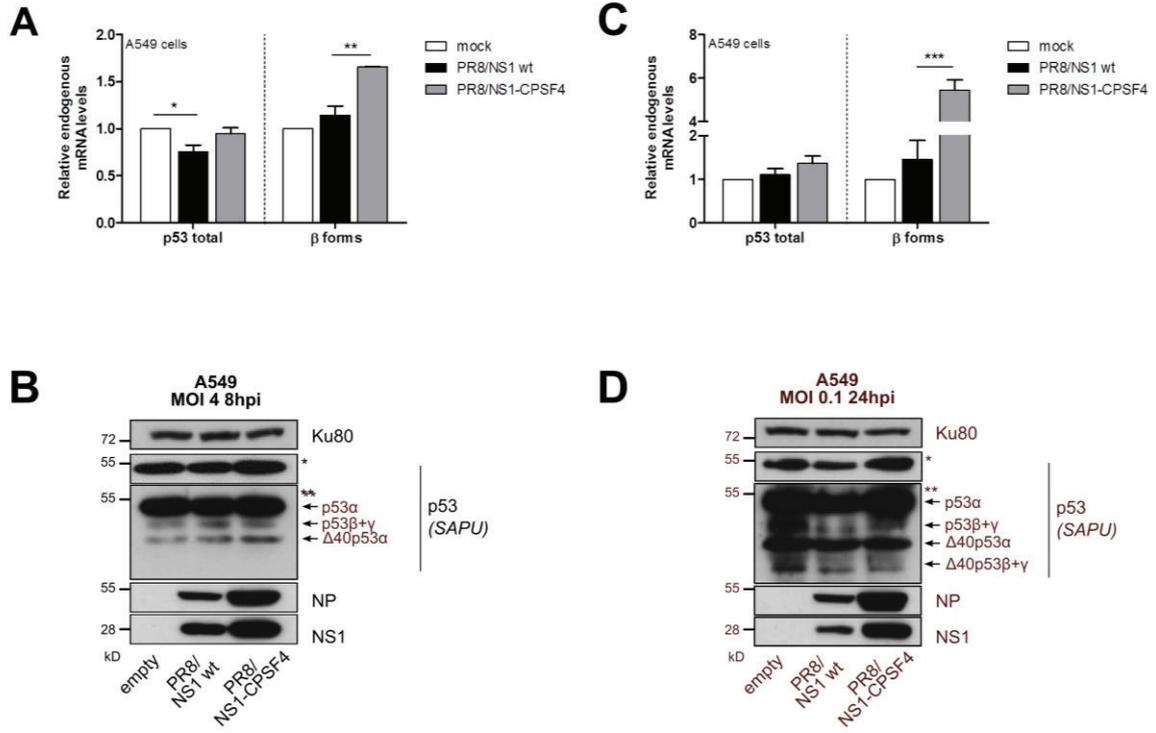


Figure 3

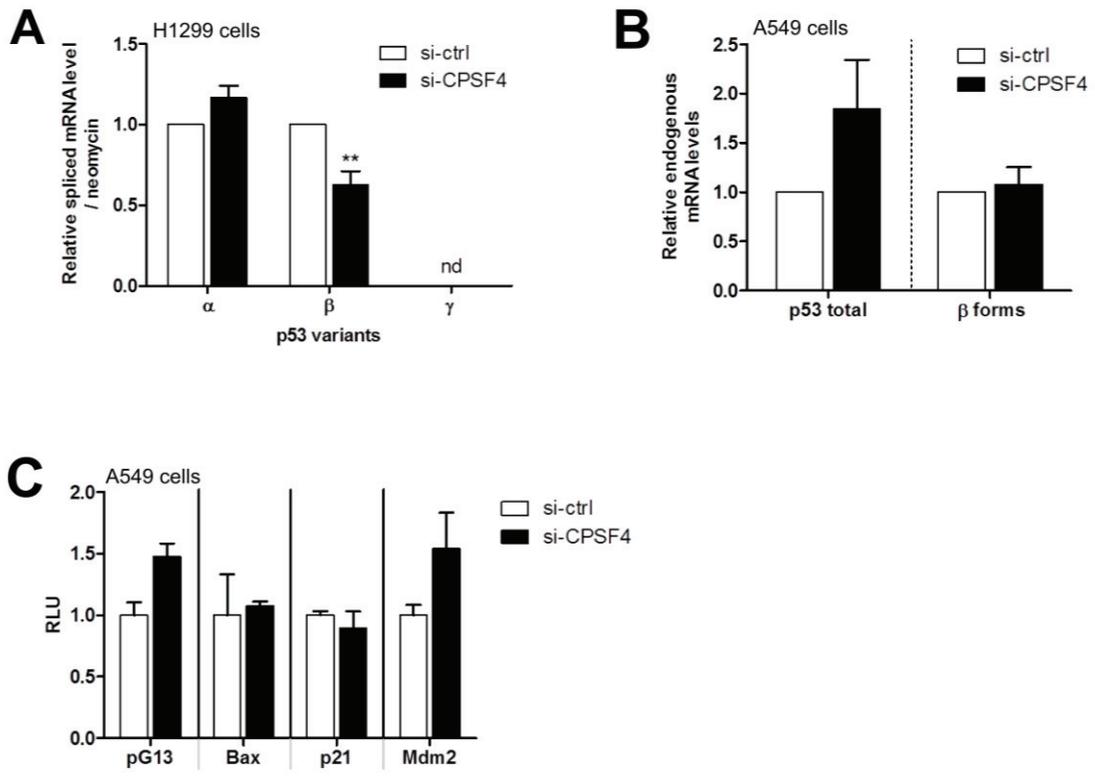
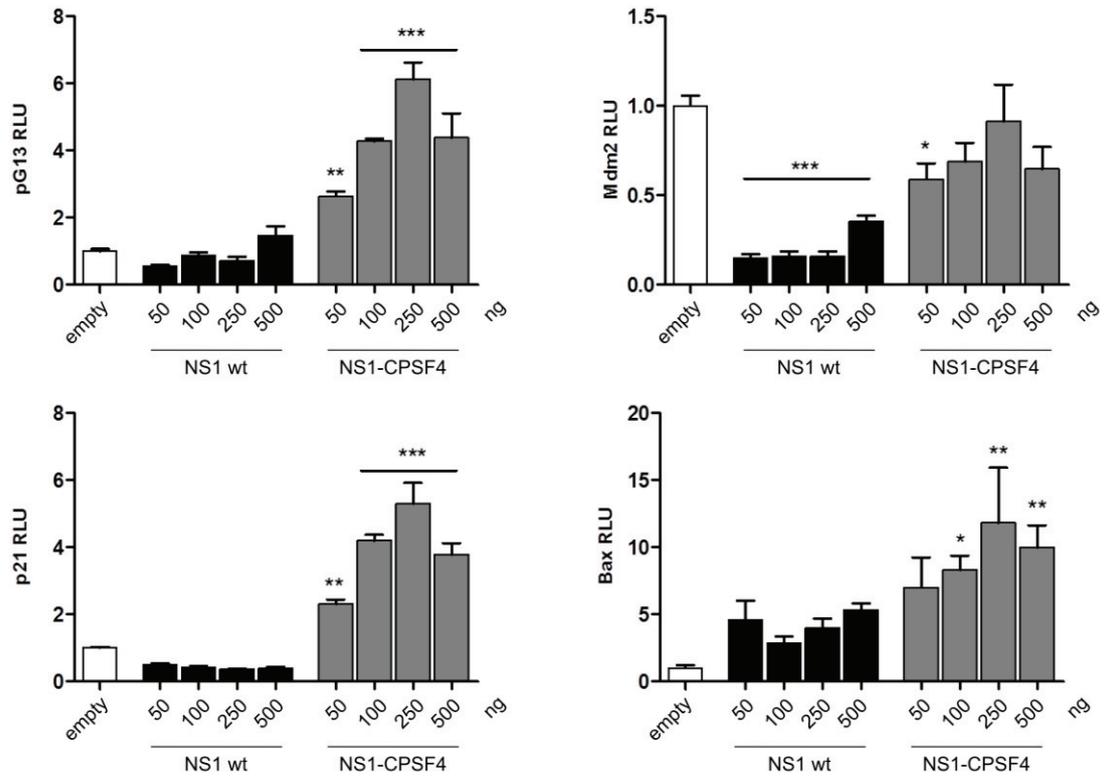
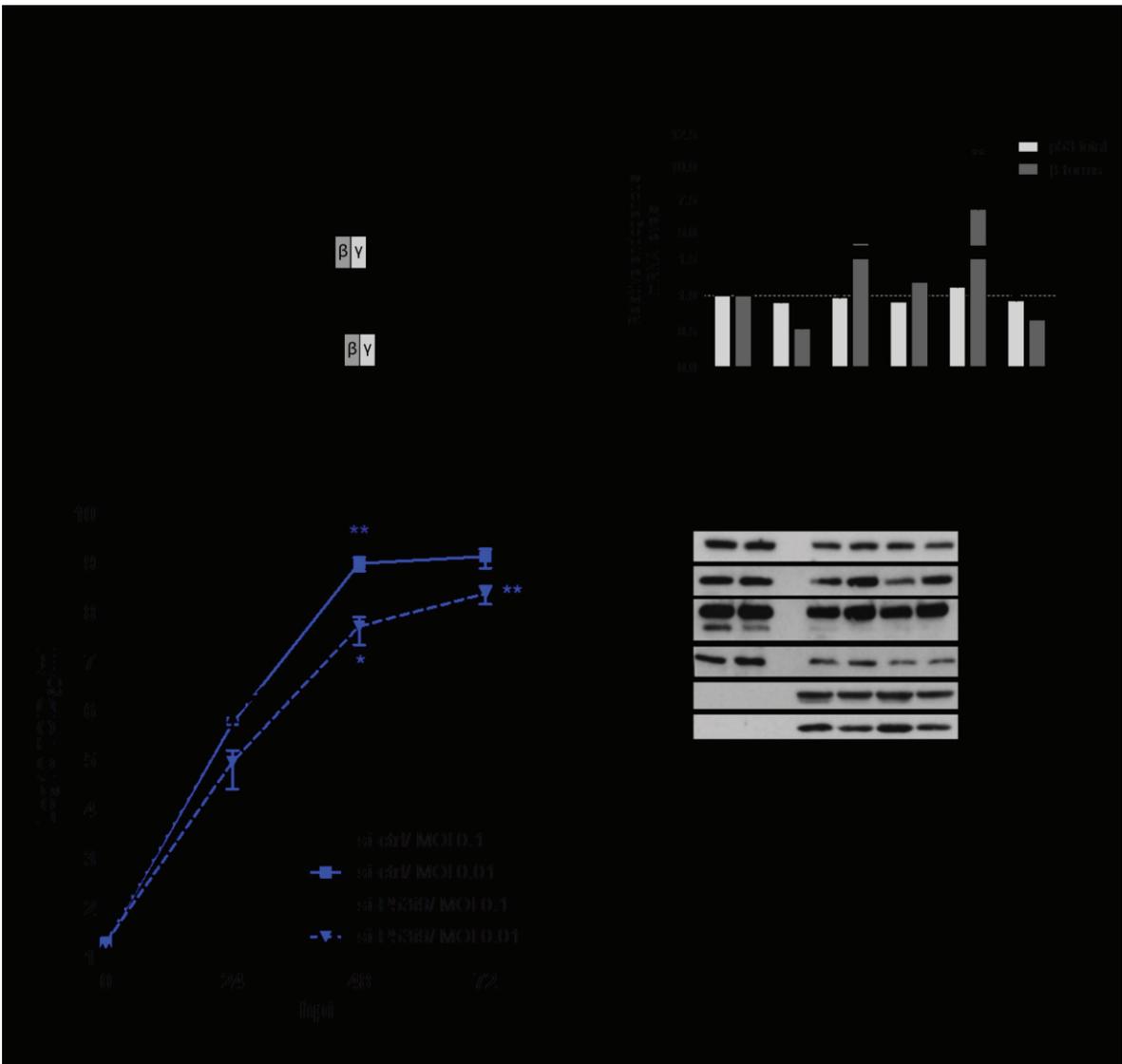
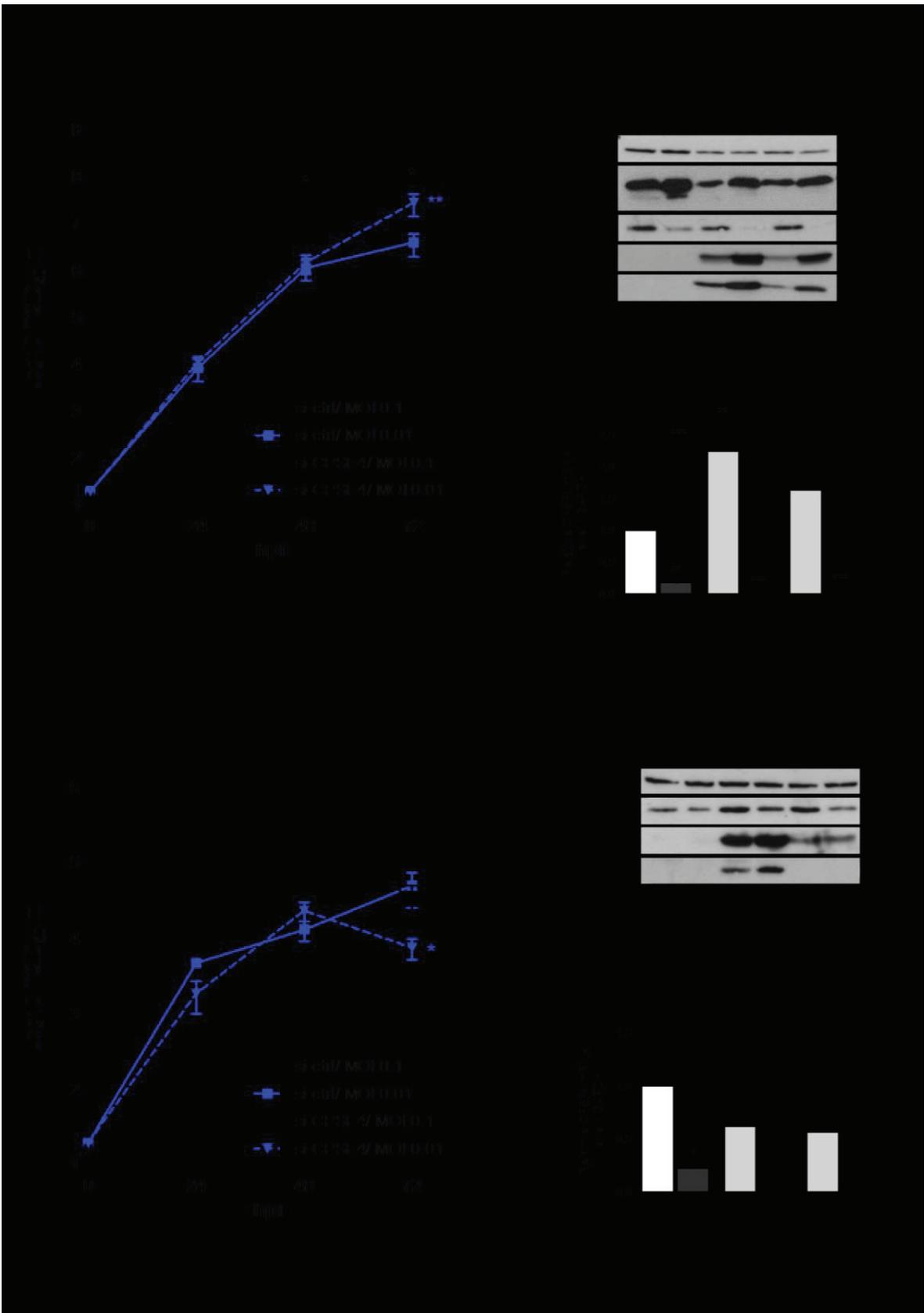


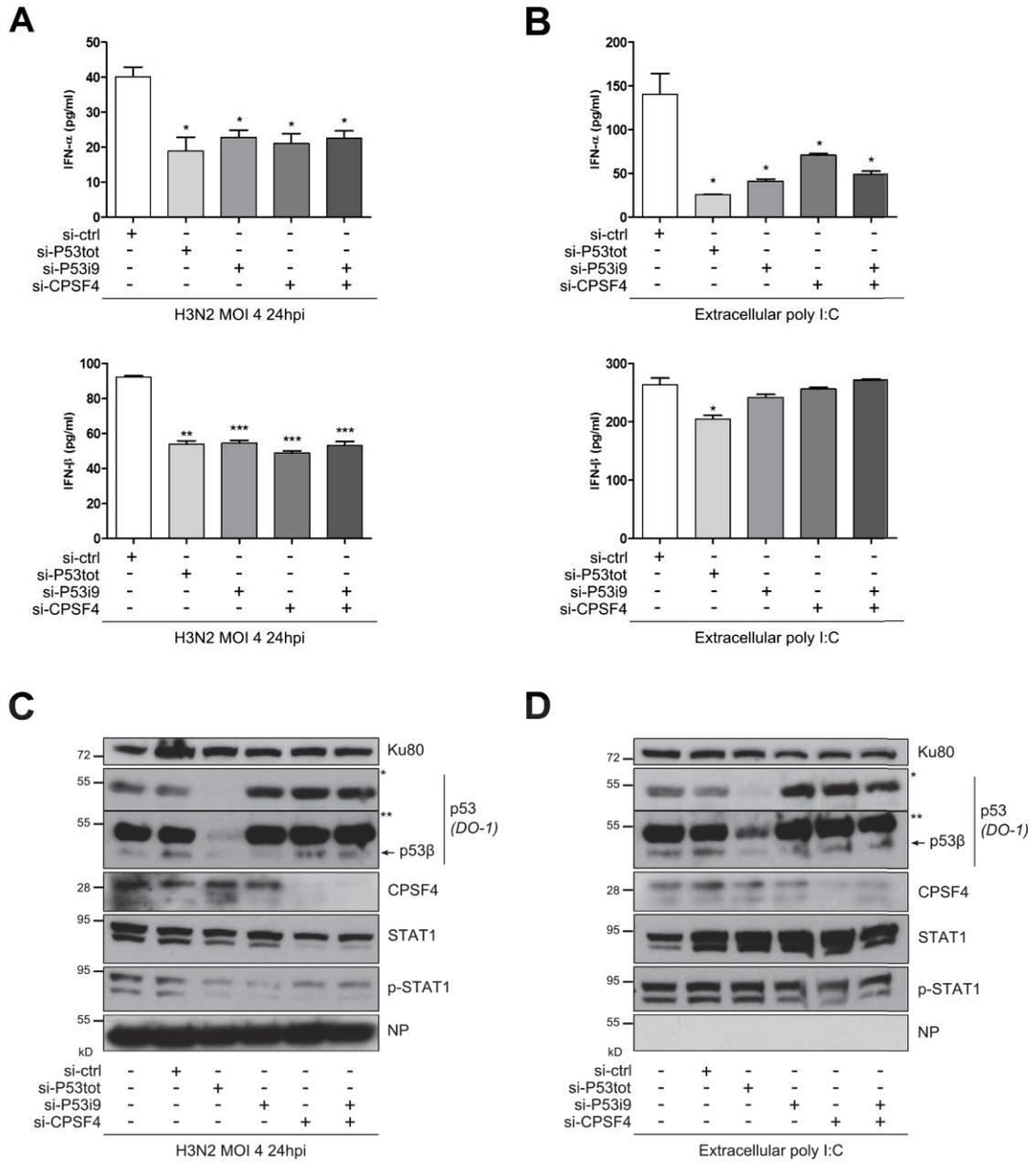
Figure 4





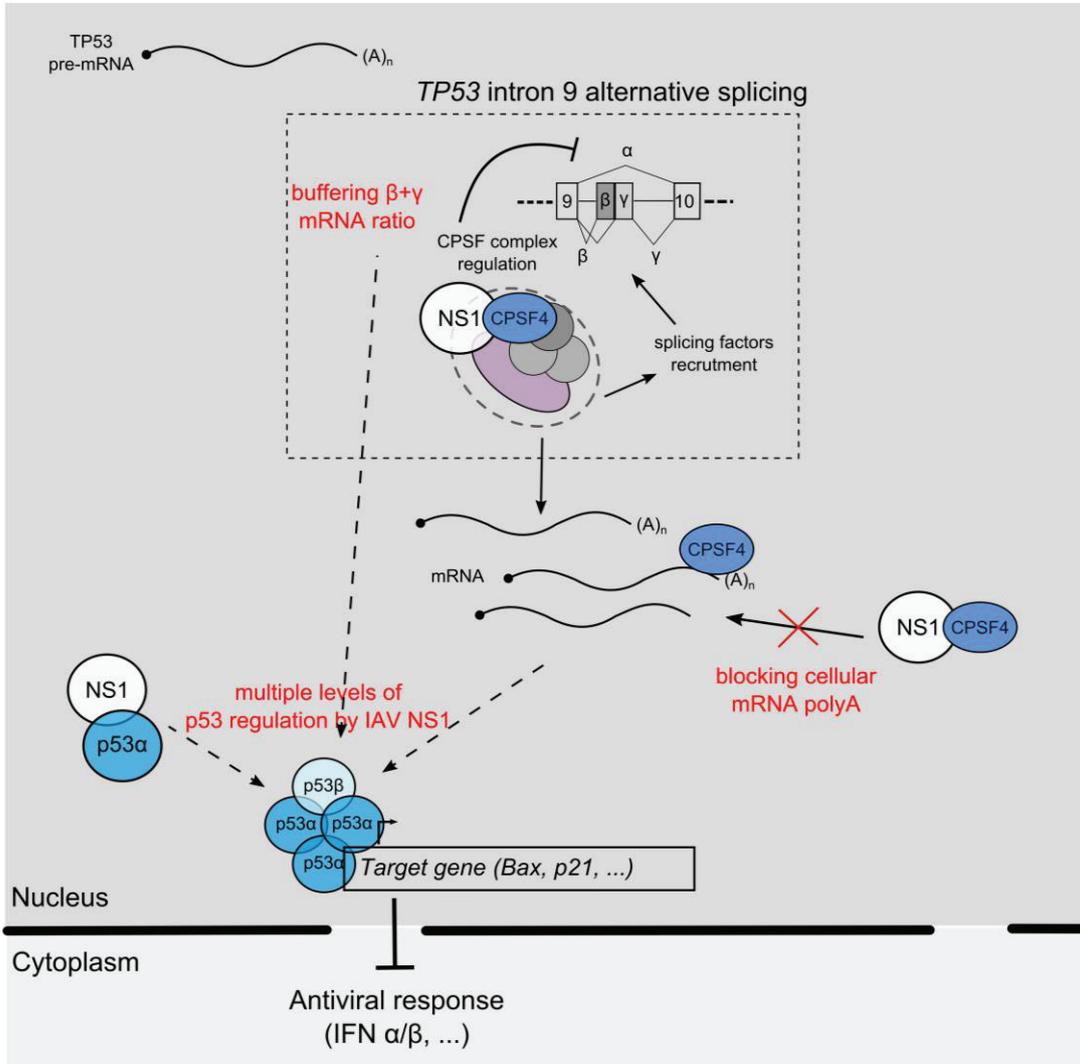


**Figure 7**



# Figure 8

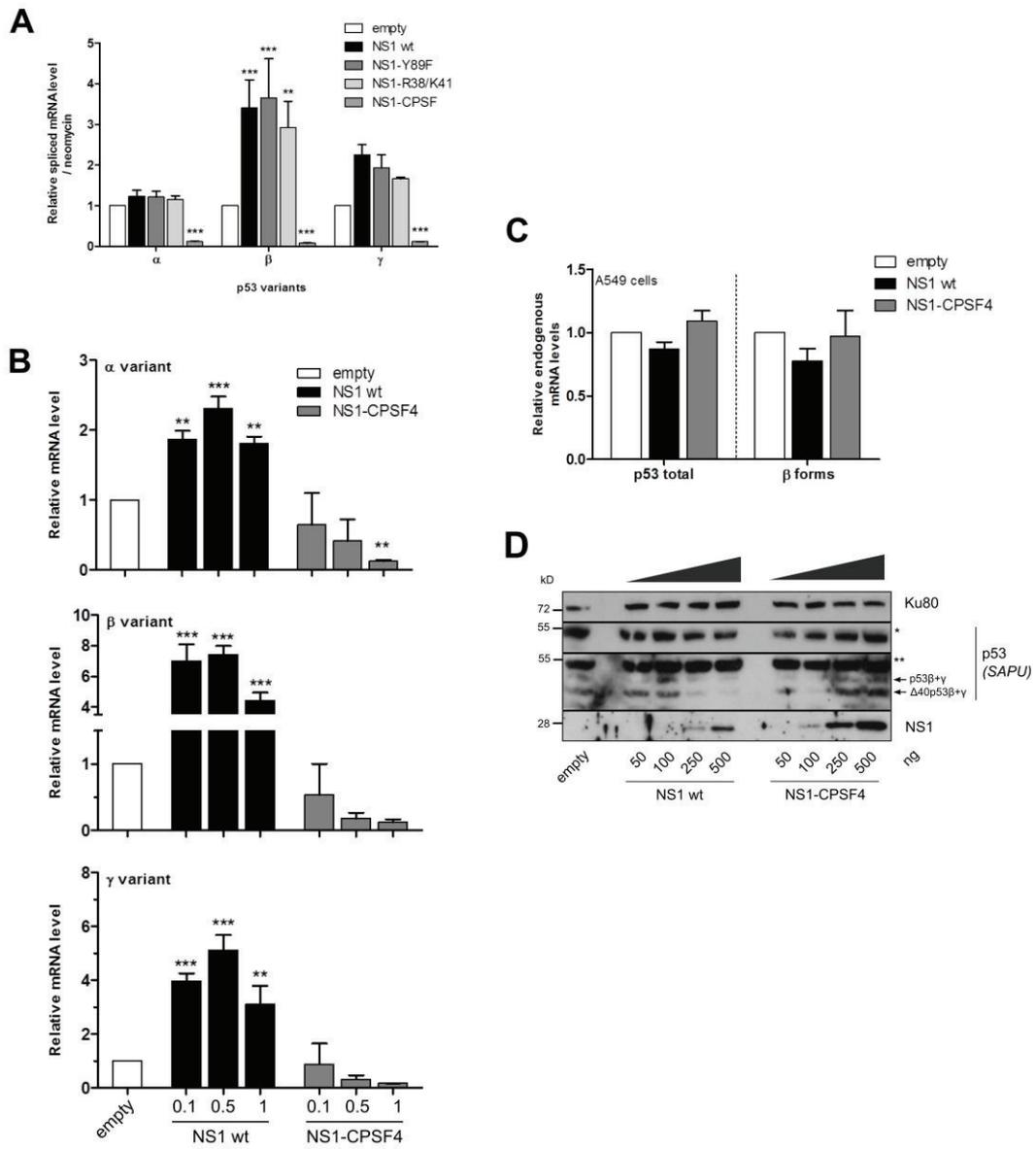
Working model



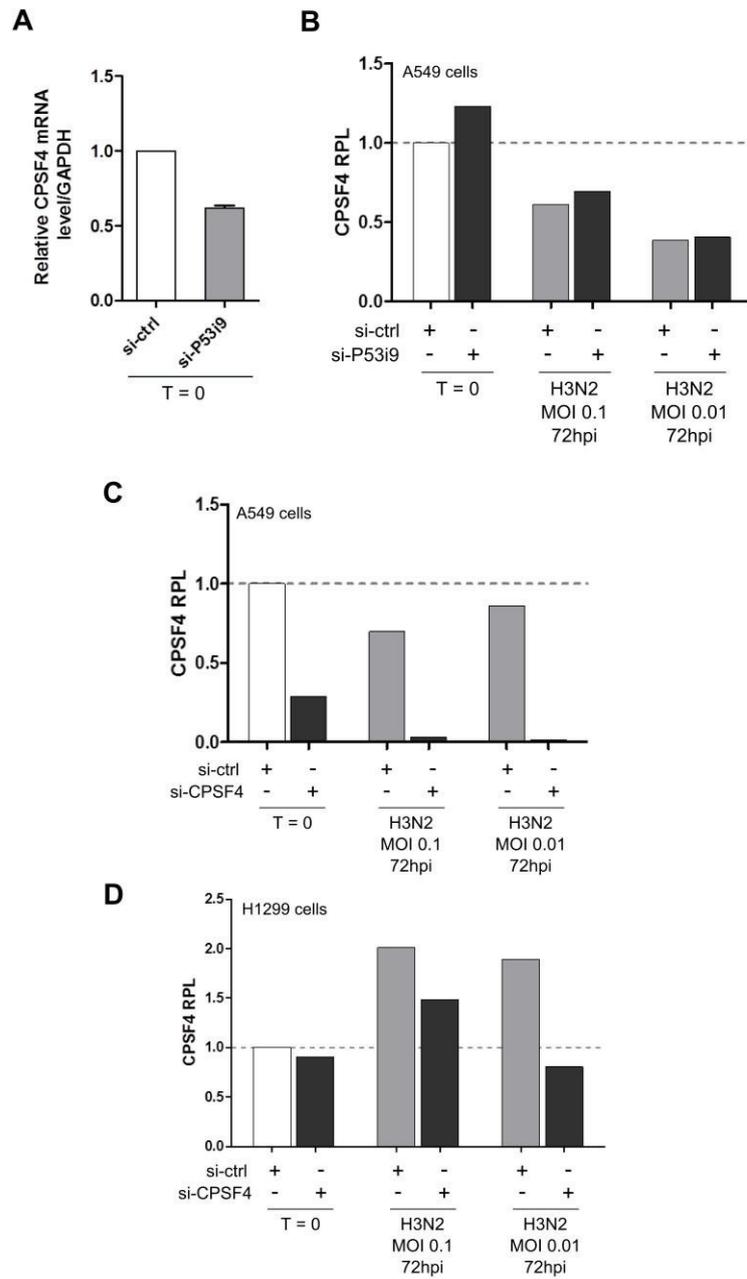
## Supplementary table and figures

<b>Supplementary table 1 – Complete list of qPCR primers used in this study</b>			
<i>Designation</i>	<i>5' – 3' Forward</i>	<i>5' – 3' Reverse</i>	<i>Manufacturer</i>
<b>SyBR Green</b>			
TP53i9 minigene $\alpha$	CTTCAGATCCGTGGGCGTGA	CTGCAGAATTCGCCCTTC TG	Eurogentec
TP53i9 minigene $\beta$	AAGAGAGCATGAAAATGGT TCTATGA		Eurogentec
TP53i9 minigene $\gamma$	CACCCTTCAGATGCTACTTG		Eurogentec
Neomycin	AGACAATCGGCTGCTCTGAT	CAATAGCAGCCAGTCCCT TC	Eurogentec
CPSF4	QuantiTect Primer Assay (product no 249900)		Qiagen
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAG	G TTCAGCTCAGGGATGAC C	Eurogentec
<b>TaqMan assays</b>			
P53 (Exon8/9)	GAAGAGAATCTCCGCAAGA AAGG	TCCATCCAGTGGTTTCTT CTTTG	Eurogentec
Probe P53 (Exon8/9)	AGCACTAAGCGAGCACTGCCCAACA		Eurogentec
p53 $\beta$	AACCACTGGATGGAGAATA TTTCAC	AAGAGAGCATGAAAATG GTTCTATGA	Eurogentec
Probe p53 $\beta$	CAGGACCAGACCAGCTTTCAAAAAGAAAATTGTT		Eurogentec
Actin	GGCACCCAGCACAAATGAAG	GCCGATCCACACGGAGT ACT	Eurogentec
Probe Actin	TCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC		Eurogentec

# Supplementary Figure 1



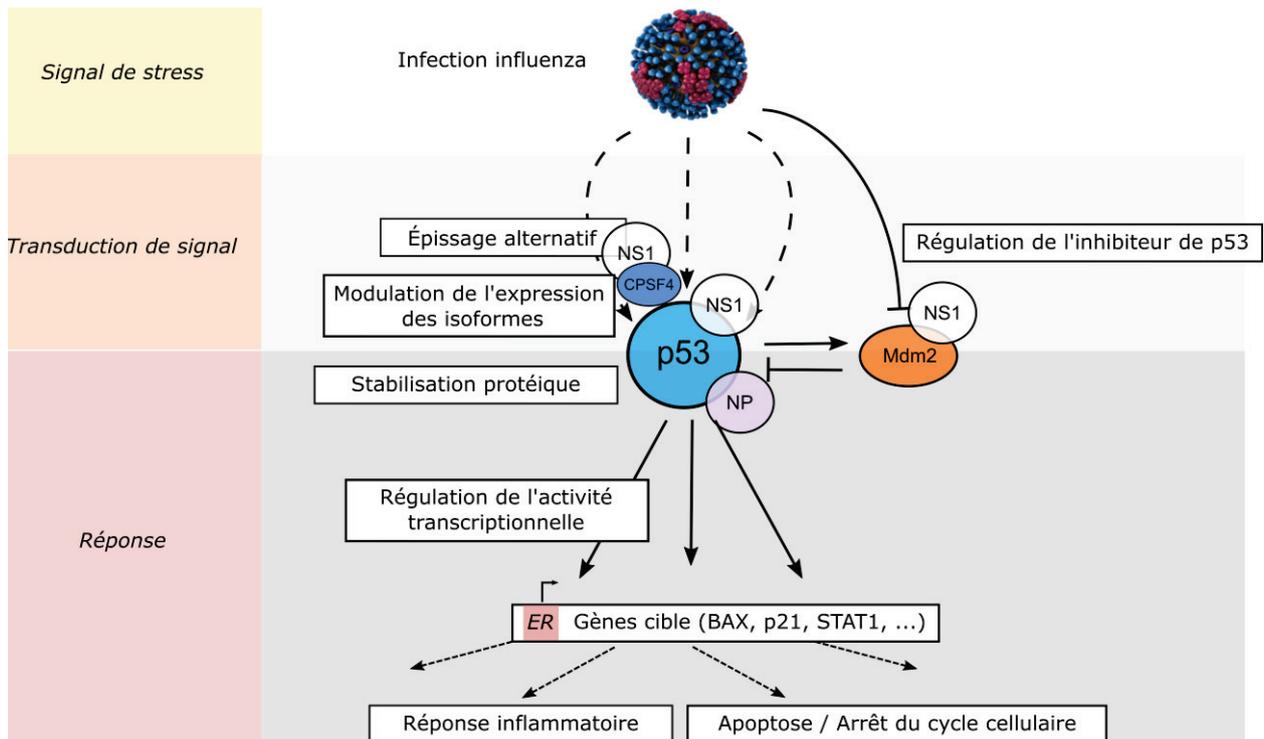
## Supplementary Figure 2



## Discussion et perspectives

Dans notre étude, nous avons tout d'abord démontré que l'infection par les IAV induit une modulation de l'épissage alternatif de p53. Par cette régulation, les IAV semblent induire l'expression des variants épissés de p53,  $\beta$  et  $\gamma$ , qui sont faiblement représentés par rapport à la forme principale  $\alpha$ , dans des conditions physiologiques sans infection. Cette modulation fait intervenir la protéine virale multifonctionnelle NS1, connue pour son rôle clé dans les mécanismes d'évasion virale et de détournement des machineries cellulaires (508, 509). Nos résultats en infection ont également montré que l'expression des isoformes et la modulation de l'activité transcriptionnelle de p53 qui en résulte, sont drastiquement différentes lorsque que la protéine NS1 est mutée sur son site de liaison au facteur cellulaire CPSF4 (506). Jusque-là, l'interaction entre NS1 et CPSF4 était uniquement documentée pour son rôle dans la régulation de l'expression des gènes cellulaires, dont ceux de la réponse interféron, *via* l'altération de la polyadénylation des ARNm cellulaires. Par cette étude, nous avons mis en évidence l'impact de CPSF4 sur la réplication virale, ainsi que sur l'épissage endogène de p53. Nous proposons ainsi que les interactions fonctionnelles entre NS1, CPSF4 et p53 constituent l'un des niveaux de régulation de la réponse interféron contre les IAV.

Ce modèle de régulation nécessite toutefois davantage d'investigations pour être complètement validé. En effet, il est délicat de tirer des conclusions définitives sur la modulation des isoformes épissées de p53 au cours de l'infection influenza, sachant que ce mécanisme est dynamique et sujet à de nombreux processus de rétrocontrôles. Néanmoins, notre étude nous permet de compléter le modèle d'interactions fonctionnelles des IAV avec la voie p53 (**Figure 23**), mettant en jeu plusieurs niveaux de régulation : (i) la stabilisation protéique de p53 et la modulation de son activité transcriptionnelle par les protéines virales NS1 et NP (494, 498) ; (ii) la modulation de l'expression des isoformes de p53 (495) *via* la dérégulation de la machinerie cellulaire d'épissage alternatif (**manuscrit 2**) ; et (iii) la régulation de p53 *via* son inhibiteur spécifique Mdm2 (5, 497).



**Figure 23 - Modèle d'interactions des virus influenza avec la voie de signalisation p53.**

D'un point de vue plus général et indépendamment du contexte infectieux, notre étude a permis d'identifier la protéine cellulaire CPSF4 comme un nouveau facteur d'épissage de p53. Jusque-là, cette protéine CPSF4 était principalement décrite comme un constituant du complexe CPSF, responsable de la polyadénylation des ARNm. Par ailleurs, il a été récemment démontré que les processus d'épissage, de maturation et de polyadénylation des ARNm seraient interconnectés (510). Ainsi, le complexe CPSF semble impliqué dans des événements d'épissage alternatif, même éloigné de l'extrémité 3' de l'ARNm sur laquelle il intervient pour la maturation, en participant directement au recrutement des facteurs d'épissage (511, 512). Avant notre étude, seulement deux autres facteurs d'épissage cellulaires de la famille des SR (pour *serin-arginin-rich protein*), SFRS1 et SFRS3, ont été décrit comme affectant l'expression des isoformes de p53 (507, 513). Ainsi, il est intéressant de constater que l'étude des relations hôte-pathogène permet, tel que cela a été le cas dans la découverte de p53, de caractériser davantage les voies cellulaires de signalisation.

D'un point de vue plus appliqué, connaître les effecteurs de la régulation de l'expression des isoformes épissées de p53 pourrait ouvrir des perspectives

intéressantes pour le développement de molécules thérapeutiques, en particulier dans le domaine du cancer, puisqu'il a été rapporté que l'expression des isoformes  $\beta$  et  $\gamma$  de p53 sont associée à des pronostics de rémission tumorale. C'est également une approche très intéressante pour le développement d'antiviraux. Notamment, plusieurs publications de l'équipe du Dr Kawaoka (464, 465) mettent en avant l'intérêt de l'étude des interactions hôte-IAV comme base de développement de nouvelles stratégies antivirales qui cibleraient des voies de signalisation cellulaire et/ou des facteurs cellulaires clé pour la réplication virale. Ces stratégies pourraient également être déclinées pour d'autres virus que les IAV, qui dérégulent également des voies cellulaires potentiellement dépendantes de p53, tels que les virus hRSV (514-516) ou hMPV (316, 517).

# ANNEXE : CONTRIBUTION À D'AUTRES PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Ce chapitre présente les publications scientifiques auxquelles j'ai contribué au cours de mon doctorat, en dehors de mes projets de recherche.

## *Article 3*

En projet préliminaire à mon étude des déterminants de la fusogénicité des protéines F de hMPV (**Article 1**), j'ai contribué à la réalisation de la publication intitulée « **Effect of In Vitro Syncytium Formation on the Severity of Human Metapneumovirus Disease in a Murine Model** » dont les auteurs sont Laetitia Aerts, Marie-Hélène Cavanagh, Julia Dubois, Julie Carbonneau, Chantal Rhéaume, Sophie Lavigne, Christian Couture, Marie-Ève Hamelin et Guy Boivin. Cet article a été publié le 24 mars 2015 dans le journal international à comité de lecture en langue anglaise *Plos ONE*. DOI : 10.1371/journal.pone.0120283.

Ma contribution à cette étude m'a permis de me familiariser avec la manipulation du virus hMPV et d'apprendre les techniques essentielles à la réalisation de mes projets de recherche, telles que la génétique inverse et l'utilisation du modèle murin.



RESEARCH ARTICLE

# Effect of *In Vitro* Syncytium Formation on the Severity of Human Metapneumovirus Disease in a Murine Model

Laetitia Aerts<sup>1</sup>, Marie-Hélène Cavanagh<sup>1</sup>, Julia Dubois<sup>1</sup>, Julie Carbonneau<sup>1</sup>, Chantal Rhéaume<sup>1</sup>, Sophie Lavigne<sup>2</sup>, Christian Couture<sup>2</sup>, Marie-Ève Hamelin<sup>1</sup>, Guy Boivin<sup>1\*</sup>

**1** Centre de Recherche en Infectiologie of the Centre Hospitalier Universitaire de Québec and Université Laval, Quebec, Canada, **2** Anatomopathologie et cytologie, Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec and Université Laval, Quebec City, QC, Canada

\* [Guy.Boivin@crchul.ulaval.ca](mailto:Guy.Boivin@crchul.ulaval.ca)



 OPEN ACCESS

**Citation:** Aerts L, Cavanagh MH, Dubois J, Carbonneau J, Rhéaume C, Lavigne S, et al. (2015) Effect of *In Vitro* Syncytium Formation on the Severity of Human Metapneumovirus Disease in a Murine Model. PLoS ONE 10(3): e0120283. doi:10.1371/journal.pone.0120283

**Academic Editor:** Steven M. Varga, University of Iowa, UNITED STATES

**Received:** December 12, 2014

**Accepted:** February 5, 2015

**Published:** March 24, 2015

**Copyright:** © 2015 Aerts et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** HMPV Fusion gene sequences are available at GenBank accession numbers AY145289.1 (CAN98-75) and KM408076.1 (C-85473).

**Funding:** This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research to GB (273261). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

Human metapneumovirus (HMPV) is an important cause of acute respiratory tract infections (ARTI) in children, elderly individuals and immunocompromised patients. *In vitro*, different HMPV strains can induce variable cytopathic effects ranging from large multinucleated syncytia to focal cell rounding. In this study, we investigated the impact of different *in vitro* phenotypes of two HMPV strains on viral replication and disease severity in a BALB/c mouse model. We first generated two recombinant GFP-expressing HMPV viruses: C-85473, a syncytium-inducing strain (rC-85473) belonging to the A1 subtype and CAN98-75, a focal cell rounding-inducing strain (rCAN98-75) of the B2 subtype. We subsequently exchanged the F genes of both strains to create the chimeric viruses rC-85473\_F and rCAN98-75\_F. We demonstrated that the F protein was the sole protein responsible for the syncytium phenotype and that viruses carrying a syncytium-inducing F protein replicated to significantly higher titers *in vitro*. *In vivo*, however, the virulence and replicative capacity of the different HMPV strains did not appear to be solely dependent on the F gene but also on the viral background, with the strains containing the C-85473 background inducing more weight loss as well as increased lung viral titers, pro-inflammatory cytokines and inflammation than strains containing the CAN98-75 background. In conclusion, the F protein is the main determinant of syncytium formation and replication kinetics *in vitro*, although it is not the only factor implicated in HMPV disease severity in mice.

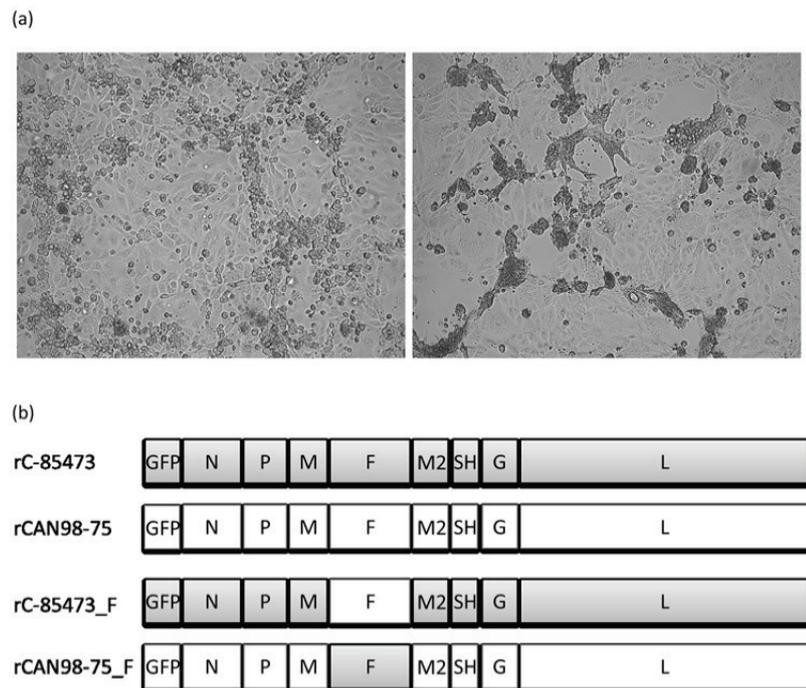
## Introduction

Human metapneumovirus (HMPV) is a major cause of acute respiratory tract infections (ARTI) in children, elderly individuals and immunocompromised patients [1]. For instance, HMPV accounts for 10 to 15% of all hospitalizations for ARTI in children [2]. Clinical signs associated with HMPV are similar to those associated with human respiratory syncytial virus

(HRSV), ranging from mild respiratory problems to bronchiolitis and pneumonia [3]. Based on phylogenetic analysis of the F and G genes, HMPV strains can be classified into two main lineages (A and B), each containing 2 or 3 sub-lineages (A1, A2a, A2b, B1 and B2) [4,5]. Whether these HMPV lineages are associated with different clinical outcomes remains unclear; some groups found no evidence for differential severity between HMPV lineages [6,7], whereas others suggested more severe clinical disease associated with HMPV-A [8] or HMPV-B [9,10] strains. However, a recent study by our group, suggested that viral load rather than HMPV lineage was an independent risk factor for severe disease [11].

HMPV culture is notoriously difficult. Viruses have to be cultured several weeks before cytopathic effects (CPE) occur and regular addition of exogenous trypsin is required. In addition, CPE differ greatly between strains ranging from typical HRSV-like syncytia to focal cell rounding in tertiary monkey kidney cells such as LLC-MK2 cells (Fig. 1a).

HMPV is a member of the *Pneumovirinae* subfamily within the *Paramyxoviridae* family [12]. Paramyxovirus entry into the host cells occurs through fusion of the cell membrane with the viral envelope. This fusion is mediated by viral surface glycoproteins. Membrane fusion of members of the *Pneumovirinae* subfamily (including HRSV and HMPV) is unique among paramyxoviruses, because the fusion (F) glycoprotein alone is sufficient for membrane fusion



**Fig 1. Cytopathic effects of HMPV strains and recombinant HMPV viruses.** (a) microscopic images of cytopathic effects induced by HMPV infection of LLC-MK2 monolayers. CAN98-75 (B2) induces focal cell rounding (left) whereas C-85473 (A1) induces multinucleated syncytia (right). Magnification = 10x. (b) Representation of the genomes of the 4 recombinant viruses used in this study; rC-85473 and rCAN98-75 represent the wild-type strains, rC-85473\_F represents the chimeric rC-85473 strain in which the F gene has been replaced with that of CAN98-75 and rCAN98-75\_F represent the chimeric rCAN98-75 in which the F gene has been replaced with that of C-85473.

doi:10.1371/journal.pone.0120283.g001

to occur without the requirement of an additional attachment glycoprotein [13,14]. The paramyxovirus F protein is synthesized as an inactive  $F_0$  precursor protein that requires proteolytic cleavage into 2 disulfide-linked subunits ( $F_1$  and  $F_2$ ) to be activated and capable of inducing membrane fusion. Proteolytic cleavage reveals a hydrophobic fusion peptide located at the N-terminus of the  $F_1$  subunit, which is inserted into target cell membranes to initiate folding of two heptad repeats within the  $F_1$  subunit, HRA and HRB, into an irreversible six-helix bundle. These conformational changes result in the formation of a fusion pore [15].

Although it is generally recognized that activated F protein-mediated cell-cell fusion is the cause of syncytium formation, the exact reasons why some strains induce large syncytia and others do not remain to be established. In addition, some HMPV strains are dependent on low-pH for membrane fusion *in vitro* [16]. Several studies have tried to elucidate which amino acids could be responsible for this pH-dependency. One group proposed that pH-dependency is dependent on the HMPV lineage [17]. Using 2 subtype A strains and 2 subtype B strains, they suggested that Gly<sub>294</sub> was responsible for pH-dependency of some subtype A viruses and that subtype A viruses carrying Glu<sub>294</sub> did not induce syncytium at any pH. On the other hand, both subtype B viruses with Glu at position 294 proved to induce syncytium in a pH-independent fashion. They proposed that a tetrad of variable amino acids at positions 294, 296, 396 and 404 was likely involved in protonation of conserved histidine residues at positions 368 and 435 in pH-dependent strains [18]. Chang et al, on the other hand, used the prototype pH-dependent strain CAN97–83 (A2) to propose that the tetrad at positions 294, 296, 396 and 438 was involved in destabilizing the histidine at position 435 [19]. However, due to the very limited number of strains analyzed in these studies, it is very difficult to generalize these results. More importantly, the relevance of pH-dependency or—independency on severity of HMPV infection remains unexamined.

Moreover, within our collection of HMPV isolates, we have encountered type A strains that do induce syncytium at neutral pH and type B strains that do not. By comparing the type A1 strain C-85473 (syncytium phenotype) and the type B2 strain CAN98–75 (focal cell rounding phenotype) (Fig. 1a), we initially observed increased replication kinetics *in vitro* and increased virulence in BALB/c mice with the former strain. We then generated the recombinant viruses from these strains containing GFP as a reporter gene and we further swapped the F genes in both viruses (Fig. 1b). Herein, we report that replacing the F gene of a focal cell rounding-inducing strain with that of a syncytium-forming strain, or vice versa, is sufficient to alter the phenotype of the strain *in vitro*. We also investigated replication kinetics of all 4 recombinant strains in cell culture and in the lungs of infected BALB/c mice. We found that HMPV strains carrying the syncytium-inducing F protein replicated to higher titers *in vitro* than non-syncytium F protein, but that the F protein was not the only contributing factor to HMPV disease severity in animals.

## Materials and Methods

### Cells and HMPV strains

LLC-MK2 cells (ATCC CCL-7) were maintained in minimal essential medium (MEM) (Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Wisent).

BSR-T7/5 cells (a gift from Dr Ursula Buchholz at the NIAID in Bethesda, MD) were cultured in MEM supplemented with 10% FBS (Wisent), 1% Non-essential amino acids (NEAA) (Life Technologies), 10 mM HEPES (sigma), 1% penicillin / streptomycin (Wisent) and 0.2 mg/ml geneticin (G418, Life Technologies). The HMPV group A strain C-85473 and group B strain CAN98–75 were grown on LLC-MK2 cells in OptiMEM (Life technologies)

supplemented with 0.0002% trypsin (Sigma). Virus stocks were concentrated on Amicon columns (Fisher Scientific) as previously described [20].

### Virus quantification

Viral titers were determined by 10-fold serial dilutions of recombinant virus or lung homogenates in 24-well plates containing LLC-MK2 cells as previously reported [21]. Virus titers were reported as 50% tissue culture infectious doses (TCID<sub>50</sub>) per ml. TCID<sub>50</sub> values were calculated by the Reed and Muench method.

Alternatively, the number of PFU/ml was calculated to determine the MOI for *in vitro* infection experiments (syncytium assay, real-time cell analysis, replication kinetics). Immunostaining of infected cells was performed with MAb 1017, a monoclonal antibody directed against the HMPV F protein (a gift from MedImmune), followed by peroxidase-labeled goat anti-hamster immunoglobulin (Cederlane) and TruBlue peroxidase substrate (KPL/Mandel) as previously described [22].

### Construction of antigenome- and supporting protein plasmids

A pSP72 plasmid (Promega) was used to generate the antigenome plasmids as previously reported [23]. Briefly, an NdeI to HpaI fragment was removed from plasmid pSP72 (Promega) and replaced by a T7 terminator, the hepatitis delta virus (HDV) ribozyme and a T7 promoter to yield pSP72-T7<sub>T</sub>- $\delta$ -T7<sub>P</sub>. cDNA was generated from viral RNA using the Superscript II reverse transcriptase (Life technologies). PCR was carried out using PFU turbo polymerase (Life Technologies). The cDNA encoding the antigenome of C-85473 or CAN98-75 was assembled from 3 or 4 PCR fragments, cloned into temporary pJET plasmids (Thermo Scientific) and sequenced before being cloned into the pSP72 plasmid. The GFP gene was flanked by the N gene start region and the F gene end region of the respective strains and inserted between the N gene and the antigenomic leader sequence using the restriction sites MluI and StuI for CAN98-75 and MluI and NheI for C-85473. Subsequently, the F genes were interchanged between the 2 strains by site-directed mutagenesis using the Phusion DNA polymerase (New England Biolabs) in the case of CAN98-75\_F and using the commercial Gibson Assembly Cloning Kit (New England Biolabs) in the case of C-85473\_F (S1 Fig.).

The N, P, L, and M2.1 ORFs of CAN98-75 were amplified by PCR using primers spanning the start and stop codons and flanked by XhoI and NotI restriction sites and were subsequently cloned in the multiple cloning site of the pT<sub>N</sub>T vector (Promega) to create supporting protein plasmids.

All plasmids were sequenced using the ABI 3730 DNA analyzer and analyzed using BioEdit, version 7.2.0 prior to further use.

### Recombinant virus rescue

BSR-T7 cells were co-transfected with the plasmid containing the antigenome and the 4 supporting protein plasmids using Lipofectamin 2000 (Life Technologies) for 5 h, after which time the medium was replaced by Optimem + 1% NEAA. Transfected cells were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> until GFP expression was observed using fluorescent microscopy. At this point, LLC-MK2 cells were added to the transfected BSR-T7 cells and co-cultured for 2 to 3 days at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> with the addition of fresh trypsin (0.0002%) every other day. When infection was observed, cells were harvested, sonicated and centrifuged. The supernatant was then used to infect confluent LLC-MK2 monolayers and virus was cultured until CPE appeared. After 2 passages in LLC-MK2 cells, the recombinant viruses were concentrated using Amicon columns

and an aliquot was used to verify the sequence of the F gene (GenBank accession numbers: KM408076.1 and AY145289.1 for C-85473 and CAN98–75, respectively).

### Syncytium quantification

Confluent monolayers of LLC-MK2 cells in black 24-well plates with flat and clear bottom (ibidi) were infected with each of the recombinant GFP-expressing HMPV viruses at an MOI of 0.01 in quadruplicate. Trypsine (0.0002%) was added every other day. Syncytium formation was evaluated on a daily basis using a fluorescent microscope. Three photographs were taken of each infected well at 20x magnification. In each field, 40 nuclei were counted and the number of nuclei per cell was calculated.

### Real time cell analysis

Real time cell analysis (RTCA) was performed using the xCELLigence System (ACEA). Fifty  $\mu$ l of cell culture medium was added to each well of a 96-well E-Plate (ACEA) to obtain background readings. LLC-MK2 cells were then added at 12 500 cells per well in 100  $\mu$ l of culture medium. The E-Plates were subsequently incubated for 30 min at room temperature and placed on the RTCA MP station (ACEA) located in an incubator (at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>). The Cell Index (CI) values were measured automatically every 30 min. When CI reached a plateau (24 h after seeding), cells were washed 2 times with 200  $\mu$ l of PBS and 6 wells were infected with 150  $\mu$ l of each of the recombinant HMPV viruses at an MOI of 0.01. Infected E-plates were placed back into the RTCA MP station and the CI values were measured automatically every 30 min for 7 days. Trypsin (0.0002%) was added every other day. Cell indexes were normalized to mock-infected wells and the time until CI was reduced by 50% was calculated for each virus.

### In vitro replication kinetics assay

Confluent monolayers of LLC-MK2 cells in 24-well plates were washed twice with PBS and infected with recombinant HMPV viruses at an MOI of 0.01. Trypsin (0.0002%) was added every other day. Three infected wells were harvested every 24 h for 7 days and supernatants were stored at -80°C. End-point titrations were performed on all samples to determine viral titers reported as TCID<sub>50</sub>/ml.

### Animal studies

Four week-old BALB/c mice (Charles River Laboratories) were housed in groups of three or four per micro-isolator cage. The mice were infected intranasally with  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> of clinical C-85473 and CAN98–75 HMPV strains or  $6 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> of recombinant rC-85473, rCAN98–75, rC-85473\_F and rCAN98–75\_F HMPV strains. The animals were monitored on a daily basis for weight loss and the presence of clinical signs such as reduced activity and ruffled fur. Animals were sacrificed when they reached 20% weight loss. For experiments with recombinant HMPV strains, four mice per group were euthanized on days 3 through 6 pi using sodium pentobarbital and lungs were removed for the evaluation of viral titers by cell culture and for the evaluation of cytokine levels using a bead-based multiplex immunoassay. Finally, on day 5 pi, four more mice per group were euthanized and lungs were removed for histopathological analysis. The animal studies were approved by the Animal Protection Committee of the Centre Hospitalier Universitaire de Québec according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

### In vivo replication kinetics assay

Lungs were removed on days 3 through 6 pi, weighed and homogenized in 1 ml of PBS then centrifuged at 2000 rpm for 10 min. The supernatant was used to determine viral titers reported as TCID<sub>50</sub>/g of lung.

### Cytokine analysis

An aliquot of 150  $\mu$ l of lung homogenates was added to 150  $\mu$ l of 50 mM KPO<sub>4</sub>, pH 6.0 buffer containing 0.2% CHAPS (Sigma) and 0.2% protease inhibitor cocktail (Sigma) and then stored at -20°C. On the day of the experiment, samples were centrifuged at 13,000  $\times$  g for 10 min at 4°C and then 50  $\mu$ l of the supernatant were used for cytokine quantification using a commercial multiplex mouse cytokine bead assay (Bio-Rad) according to the manufacturers' instructions. Experiments were performed in flat bottom 96-well plate and results were analyzed with the Luminex system (QIAGEN).

### Histopathological analysis

Lungs were removed on day 5 pi, and fixed with 4% buffered formalin. Fixed lungs were subsequently embedded in paraffin, sectioned in slices of 5  $\mu$ m, and stained with hematoxylin-eosin. Scoring of histologic parameters was performed by a medical biologist (SL) and an anatomic pathologist (CC), both with experience in pulmonary pathology, independently and blind to experimental data, on digitalized slides scanned at a resolution of 400X magnification (Nano-zoomer scanner and viewer, Hamamatsu, Japan). A semi-quantitative scale was used to score bronchial/endobronchial, peribronchial, perivascular, interstitial, pleural and intra alveolar inflammation, capillary vascular congestion and pulmonary edema [21].

### Statistical analysis

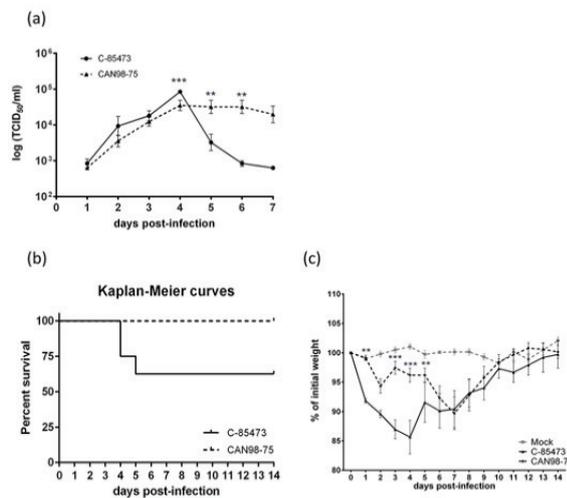
Repeated-Measure ANOVA's with tukey post-hoc tests were used to analyze all the data except those involving RTCA for which two-tailed Student t-tests were used. All statistical analyses were performed using Prism 6.

## Results

### *In vitro* and *in vivo* properties of two clinical HMPV strains

LLC-MK2 monolayers were infected with either C-85473 or CAN98-75 viruses at an MOI of 0.1 to evaluate *in vitro* replication kinetics. The syncytium-inducing C-85473 strain replicated to a significantly higher titer than the focal cell rounding strain CAN98-75 on day 4 pi ( $8.6 \pm 0.8$  vs  $4.2 \pm 1.3 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml;  $p < 0.001$ ) (Fig. 2a). After day 4, however, viral titers of strain C-85473 decreased more rapidly than those of the non-syncytium inducing strain.

Intranasal infection of BALB/c mice with  $10^6$  TCID<sub>50</sub> of C-85473 led to 37.5% mortality by day 5 post-infection (pi) whereas infection with the same inoculum of CAN98-75 did not induce any mortality (Fig. 2b). Mice infected with C-85473 reached their maximum weight loss on day 4 pi ( $14.4 \pm 2.9\%$ ), whereas CAN98-75-infected mice reached their maximum weight loss much later, on day 7 pi ( $10.3 \pm 2.8\%$ ) (Fig. 2c). Furthermore, pulmonary viral titers were determined by cell culture on day 5 pi. The C-85473 strain replicated to higher pulmonary viral titers compared to CAN98-75 ( $18.3 \pm 4.6$  vs  $3.8 \pm 1.3 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/g lung;  $p < 0.01$ ).



**Fig 2. Replicative capacity of the clinical HMPV isolates C-85473 and CAN98-75 *in vitro* and virulence in BALB/c mice.** (a) Replicative capacity of C-85473 and CAN98-75 strains in LLC-MK2 cells at an MOI of 0.1. (b) Kaplan-Meier survival curves of mice infected with  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> of C-85473 or CAN98-75. (c) Weight loss curves of BALB/c mice infected with  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> of C-85473 or CAN98-75 or mock infected. \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  comparing C-85473 to CAN98-75 using Repeated Measures Two-way ANOVA.

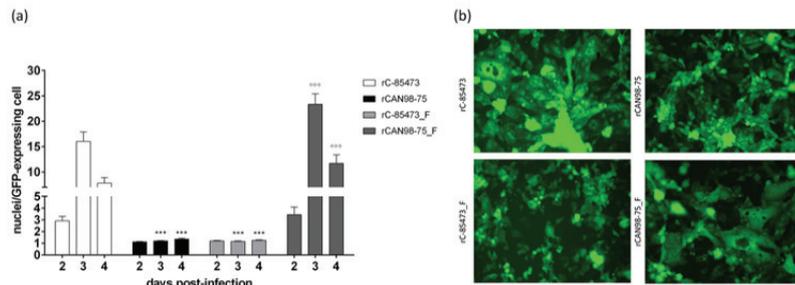
doi:10.1371/journal.pone.0120283.g002

### Generation of recombinant HMPV strains

Based on these observations, we postulated that the F protein, leading to syncytium formation, was also responsible for the increase in HMPV virulence. Thus, we generated recombinant viruses for each strain and swapped the F proteins of both viruses in order to investigate the contribution of individual F proteins in each viral background. Full-length antigenome-plasmids were created for rC-85473, rCAN98-75, rC-85473\_F and rCAN98-75 (S1 Fig). Following co-transfection of the antigenome-plasmids and supporting plasmids into BSR T7/5 cells, GFP expression was observed on average 48 h post-transfection. LLC-MK2 cells were then added to amplify viral production and recombinant viruses were rescued within 5 days of transfection.

### *In vitro* phenotype of four recombinant HMPV strains

The *in vitro* phenotype of each HMPV recombinant virus was investigated using fluorescence microscopy. The wild-type (WT) C-85473 strain is known to induce large syncytia and the recombinant strain rC-85473 conserved the same phenotype with  $15.9 \pm 1.9$  nuclei per GFP-expressing cell on day 3 p.i (Fig. 3). On the other hand, the recombinant rCAN98-75 induced mostly focal cell rounding, similar to its WT counterpart with  $1.2 \pm 0.04$  nuclei per GFP-expressing cell on day 3 p.i. When the F gene of rC-85473 was replaced with that of rCAN98-75 (rC-85473\_F), the phenotype was reverted and less syncytia were observed with  $1.2 \pm 0.05$  nuclei per GFP-expressing cell on day 3 p.i. Finally, rCAN98-75\_F induced more syncytia with  $23.3 \pm 2.1$  nuclei per GFP-expressing cell on day 3 p.i. These data confirmed that syncytium formation was primarily dependent on the F gene of the strain C-85473.

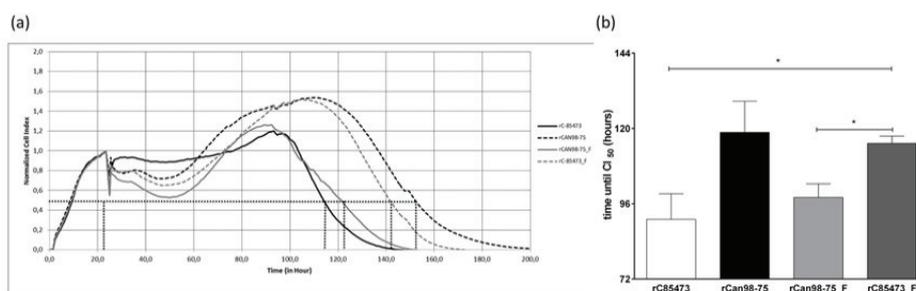


**Fig 3. Syncytium formation induced by recombinant HMPV strains.** (a) LLC-MK2 monolayers in 24 well-plates were infected with rHMPV at an MOI of 0.01 in quadruplicate. On days 2 through 4 pi, pictures were taken using fluorescent microscopy in 3 random fields (20x magnification) per well and the number of nuclei per GFP-expressing cell was calculated. \*\*\*,  $p < 0.001$  comparing all other strains to rC-85473 and °°,  $p < 0.001$  comparing all other strains to rCAN98-75 using Repeated Measures Two-way ANOVA. (b) An example of the observed difference in syncytium formation between the 4 recombinant strains on day 3 pi.

doi:10.1371/journal.pone.0120283.g003

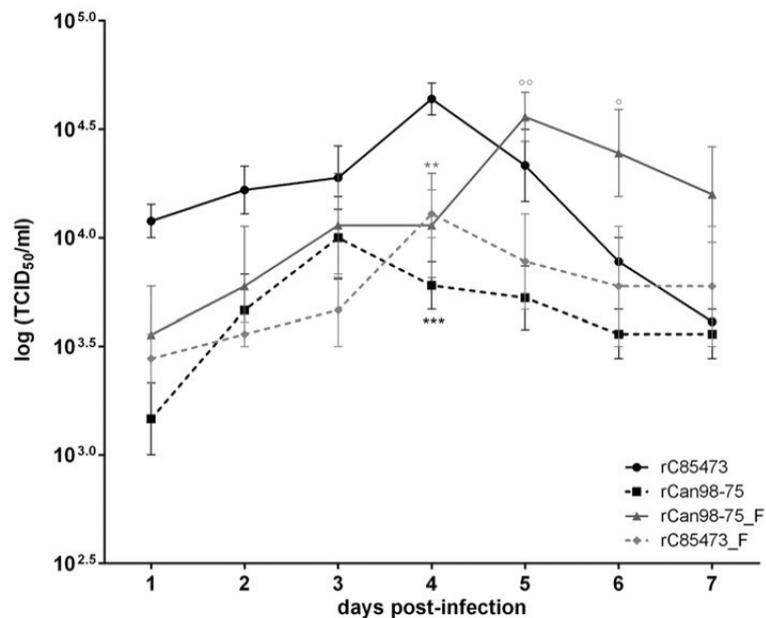
### Effects of four recombinant HMPV strains on cell state

We also investigated the effect of HMPV infection on the state of LLC-MK2 monolayers using RTCA. This method measures the change in electrical impedance across a cell monolayer in real-time. A parameter called cell index (CI) is used to quantify cell status based on the detected cell-electrode impedance; an elevated CI means that cells have fully adhered to the well and have proliferated, whereas a low CI indicates changes in morphology and viability of the cell monolayer. The changes in CI during an infection experiment using RTCA is shown in Fig. 4a and mean time until the normalized CI was reduced by 50% is reported in Fig. 4b. On average, it took rCAN98-75 28 h longer to reduce the CI by 50% than rC-85473 ( $118 \pm 9$  h compared to  $91 \pm 8$  h). Exchanging the F protein resulted in reverse phenotypes with 50% reduction of CI obtained by  $98 \pm 4$  h and  $115 \pm 2$  h for rCAN98-75\_F and rC-85473\_F, respectively. These data show that the HMPV strains carrying the syncytium-inducing F protein from C-85473 alter the cell state of infected cells faster than viruses carrying the F protein from CAN98-75.



**Fig 4. Real-time cell analysis of recombinant HMPV strains.** LLC-MK2 monolayers in 96 well-plates were infected with rHMPV at an MOI of 0.01 (a) Output of one real-time cell analysis (RTCA) experiment; data was normalized using mock-infected wells and normalized cell index is plotted. (b) Mean time until cell index is reduced by 50% from 4 independent experiments is plotted. \*,  $p < 0.05$  using unpaired, two-tailed Student t-test.

doi:10.1371/journal.pone.0120283.g004



**Fig 5. *In vitro* replicative capacity of recombinant HMPV strains.** LLC-MK2 monolayers in 24 well-plates were infected with 4 rHMPV strains at an MOI of 0.01 in triplicate, one well per condition was harvested every 24 h for 7 days, frozen, sonicated and titrated on LLC-MK2 cells. \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$  comparing all other strains to rC-85473 and °,  $p < 0.05$  comparing all other strains to rCAN98-75 using Repeated Measures Two-way ANOVA.

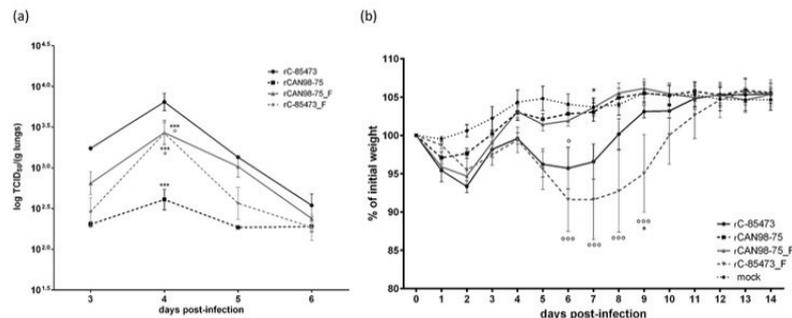
doi:10.1371/journal.pone.0120283.g005

### *In vitro* replication kinetics assay

We next sought to investigate the replicative capacity of each recombinant virus *in vitro*, using an MOI of 0.01 (Fig. 5). Over a 7-day period, rC-85473 and rCAN98-75\_F (maximum titers of  $4.5 \pm 0.7$  and  $3.8 \pm 0.8 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml, respectively) replicated to significantly higher titers ( $p < 0.05$ ) than rCAN98-75 and rC-85473\_F (maximum titers of  $1.2 \pm 0.5$  and  $1.3 \pm 0.4 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml, respectively). Of note, chimeric viruses (rCAN98-75\_F and rC-85473\_F) reached their peak titers 24 h later than recombinant WT viruses (rC-85473 and rCAN98-75). This experiment confirms that syncytium-inducing strains replicate to higher viral titers than non-syncytium inducing strains.

### Replication kinetics of HMPV strains in lungs of BALB/c mice

To investigate the replicative capacity of all 4 recombinant viruses *in vivo*, BALB/c mice were infected with  $6 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> of recombinant HMPV strains. Backtitrations of the inoculum confirmed that the same amount of recombinant HMPV was given to all groups ( $6.3$ ,  $6.0$ ,  $6.8$  and  $6.4 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mouse for rC-85473, rCAN98-75, rCAN98-75\_F and rC-85473\_F, respectively). Such inoculum did not induce mortality in any of the groups. Lungs of infected mice were harvested on day 3 through 6 post-infection to determine viral titers. All 4 recombinant viruses reached their peak of replication on day 4 pi (Fig. 6a). rC-85473 replicated to the



**Fig 6. Lung viral titers and weight loss of BALB/c mice infected with recombinant HMPV strains.** BALB/c mice were infected with  $6 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> of rHMPV (as determined by backtitration). (a) On days 3 through 6, four mice per group were euthanized to determine pulmonary viral titers. (b) Six mice per group were monitored for weight loss on a daily basis for 14 days. \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*,  $p < 0.05$  comparing all other strains to rC-85473. °°,  $p < 0.001$ ; °,  $p < 0.05$  comparing all other strains to rCAN98–75 using Repeated Measures Two-way ANOVA.

doi:10.1371/journal.pone.0120283.g006

highest titer ( $7.2 \pm 2.1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/g lung) whereas rCAN98–75 had the lowest peak ( $4.6 \pm 1.3 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/g lung). Conversely, the chimeric strains rCAN98–75\_F and rC-85473\_F replicated to similar peak titers ( $3.2 \pm 1.01$  and  $3.0 \pm 0.9 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/g lung, respectively).

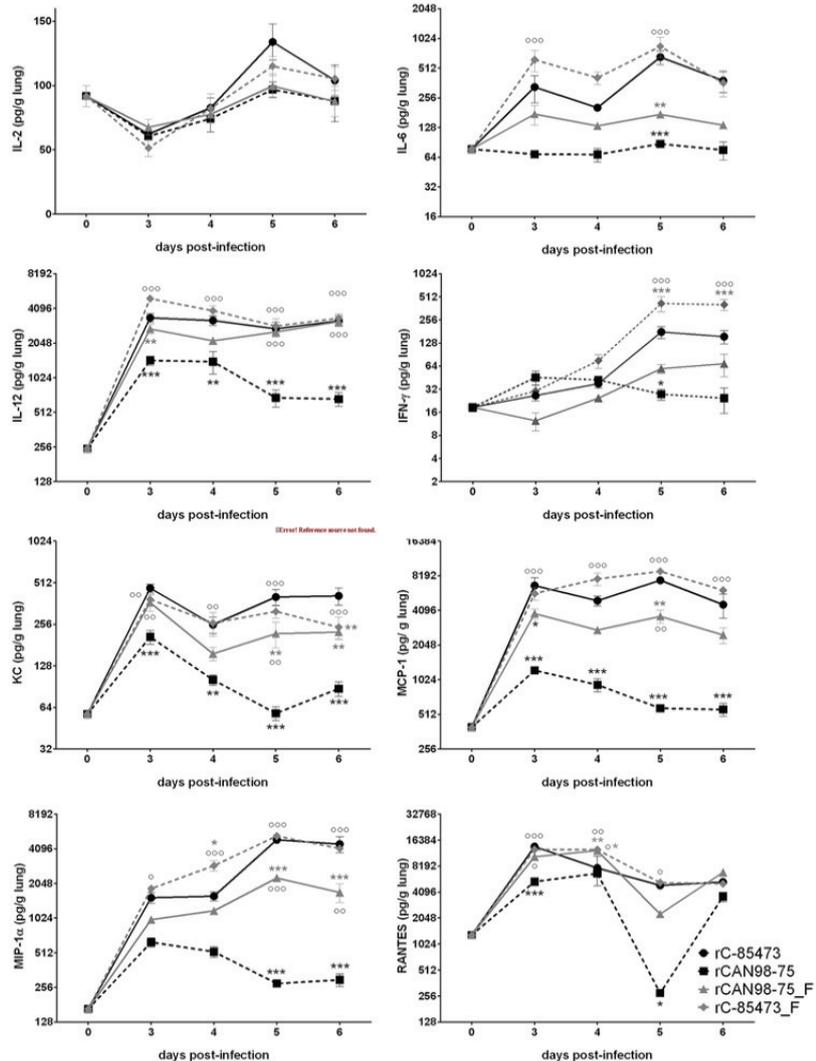
### Weight loss of HMPV-infected mice

Mice infected with  $6 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> of recombinant HMPV strains or mock infected were monitored for 14 days for clinical signs and weight loss. All infected mice lost between 3 and 7 percent of their initial weight between days 1 and 3, but only viruses with the C-85473 background (rC-85473 and rC85473\_F) continued to lose weight on days 5–7, with statistically significant differences observed between rC-85473–viruses and rCAN98–75 viruses on days 6–9 (Fig. 6b). No significant difference in weight loss was observed between the 2 viruses with CAN98–75 background (rCAN98–75 and rCAN98–75\_F). rC-85473-infected mice appeared to recuperate a little bit faster than mice infected with rC-85473\_F with a statistically significant difference observed on day 9 pi only. Thus, the severity of the HMPV symptoms correlated better with the viral background than the F protein.

### Pulmonary cytokine levels of HMPV-infected mice

On days 3 through 6 pi of the previously described experiment, an aliquot of lung homogenates was used to determine pulmonary cytokine/chemokine levels using a multiplexed bead assay (Fig. 7).

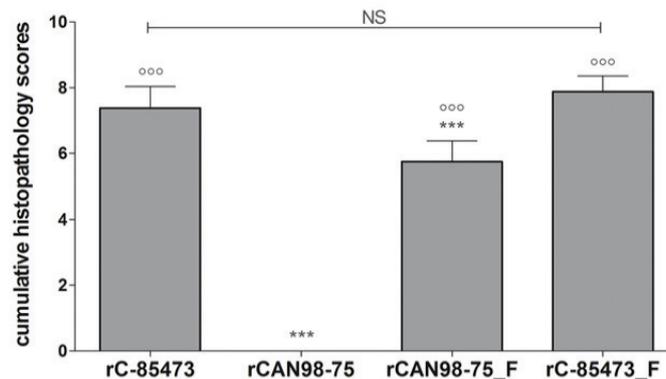
IL-2 peaked on day 5 pi for all 4 recombinant viruses and IL-2 levels were similar between groups at each time point. IL-6 also peaked on day 5 pi, but IL-6 levels were significantly higher in viruses with a C-85473 background compared to viruses with a CAN98–75 background on days 5 pi. IL-12 levels remained relatively stable between days 3 and 6 pi, except for rCAN98–75 for which IL-12 levels were reduced by half by day 5 pi. Significantly higher levels of IL-12 were observed with the viruses harboring the C-85473 background compared to the rCAN98–75 virus on all analyzed time-points. However, introducing the F protein of C-85473 into rCAN98–75 significantly increased IL-12 levels on days 5 and 6 pi. IFN- $\gamma$  levels reached a plateau on days 5 and 6 pi for both viruses with a C-85473 background as well as for rCAN98–75\_F, whereas IFN- $\gamma$  levels declined from day 3 onward for rCAN98–75. KC levels were



**Fig 7. Pulmonary cytokine levels of BALB/c mice infected with recombinant HMPV strains.** BALB/c mice were infected with  $6 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> of rHMPV (as determined by back-titration). On days 3 through 6, four mice per group were euthanized to determine pro-inflammatory cytokine/chemokine levels in the lungs of infected mice. Mock-infected mice are represented as day 0. \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$  comparing all other strains to rC-85473. °°,  $p < 0.001$ ; °°,  $p < 0.01$ ; °,  $p < 0.05$  comparing all other strains to rCAN98-75 using Repeated Measures Two-way ANOVA.

doi:10.1371/journal.pone.0120283.g007

highest on day 3 pi, with a second peak on day 5 pi for all viruses except rCAN98-75, for which KC levels increased a day later. KC levels were significantly higher for recombinant viruses with a C-85473 background compared to rCAN98-75. Furthermore, the introduction of the F protein from C-85473 into the CAN98-75 background significantly increased KC levels on days 3, 5 and 6 pi compared to the wild-type rCAN98-75.



**Fig 8. Total pulmonary inflammation scores of BALB/c mice infected with recombinant HMPV strains.** BALB/c mice were infected with  $6 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> of rHMPV (as determined by back-titration). On days 5, four mice per group were euthanized to determine histopathology scores of the lungs of infected mice. \*\*\*,  $p < 0.001$ ; comparing all other strains to rC-85473. °°,  $p < 0.001$  comparing all other strains to rCAN98-75 using Repeated Measures Two-way ANOVA.

doi:10.1371/journal.pone.0120283.g008

MCP-1 levels were consistently significantly higher for viruses with a C-85473 background compared to rCAN98-75. Moreover, on day 5 pi, a significantly higher MCP-1 level was observed in mice infected with rCAN98-75\_F compared to rCAN98-75. MIP-1 $\alpha$  levels peaked on day 5 pi for all strains except rCAN98-75, which peaked on or before day 3 pi. Furthermore, significantly higher MIP-1 $\alpha$  levels were observed on days 5 and 6 pi for rC-85473 and rC-85473\_F as well as for rCAN98-75\_F, compared to rCAN98-75. In general RANTES levels were lower for strain rCAN98-75 than for the other 3 viruses with statistically significant differences observed at early time-points.

### Lung histopathology studies of HMPV-infected mice

On day 5 of the previously described experiment, lungs were harvested from 4 more mice per group to assess pulmonary inflammation. None of the groups showed signs of vascular congestion, pulmonary edema or bronchial inflammation. Moreover, none of the mice infected with rCAN98-75 showed signs of pulmonary inflammation for any of the analyzed parameters. Conversely, mice infected with rC-85473 or rC-85473\_F showed mild, moderate or moderate to marked scores, with no significant differences in scores for any of the parameters between these two groups (total inflammation scores of  $7.4 \pm 0.7$  and  $7.9 \pm 0.5$  for rC-85473 and rC-85473\_F, respectively) (Fig. 8). Importantly, the introduction of the syncytium-inducing F protein into the rCAN98-75 background significantly increased histopathology scores for peribronchial, perivascular, interstitial and intra-alveolar inflammation (data not shown) as well as total inflammation (total inflammation score of  $5.8 \pm 0.6$ ). In summary, although the C-85473 background induced significantly more pulmonary inflammation, the introduction of the syncytium-inducing F protein into the rCAN98-75 background significantly increased lung inflammation.

### Discussion

In the current study, we examined the effects of the F protein from two different HMPV strains, producing large syncytia in cell culture or not, on *in vitro* and *in vivo* replication kinetics and virulence. We generated recombinant HMPV viruses representing either the

syncytium-inducing phenotype (strain rC-85473) or the focal cell rounding phenotype (strain rCAN98–75) and we subsequently exchanged the F genes of both strains. We demonstrated that syncytium phenotype mainly depends on the F protein and that viruses carrying an F protein that induces syncytium-formation replicate to higher titers *in vitro*. However, although the F protein appears to contribute to HMPV virulence, other genetic markers within the HMPV genome seem to impact on disease severity in mice.

HMPV is an important respiratory pathogen that can cause upper and lower RTIs. Virological risk factors for severe HMPV disease, such as HMPV subtype or lineage, have been the object of several investigations, with conflicting results [6,8–10,24]. We first sought to investigate whether the *in vitro* phenotype, namely syncytium formation, might be an indication of efficient HMPV replicative capacity. Previously, the syncytium-inducing strain NL/1/99 (subtype B1) was found to replicate to higher titers in Vero-118 cells than NL/1/00 (subtype A1), a strain that does not produce syncytium at neutral pH [23,25]. Similarly, we found that the syncytium-inducing strain C-85473 replicated to higher titers in LLC-MK2 cells than the focal cell rounding strain CAN98–75. However, to our knowledge, the impact of *in vitro* phenotype on *in vivo* replication i.e., on lung titers, had not yet been examined. For this purpose, we infected BALB/c mice with either C-85473 or CAN98–75 clinical isolates and found that the former replicated to higher titers in the lungs on day 4 pi than CAN98–75 in 3 independent experiments (data from one representative experiment are shown in Fig. 2). Furthermore, mortality was only observed in mice infected with strain C-85473.

Similarly to other paramyxoviruses, HMPV enters the host cell by fusion of viral and cellular membranes, a step mediated by surface glycoproteins. On its surface, HMPV carries 3 glycoproteins (F, G and SH) of which the F protein is the most conserved among HMPV strains [12]. As such, the HMPV F protein also shares structural features with other paramyxovirus F proteins; it is a class I viral fusion protein synthesized as inactive precursors (F<sub>0</sub>) that must be cleaved into 2 disulfide-linked F<sub>2</sub>-F<sub>1</sub> subunits to be fusion-competent [15]. Unlike members of the *Paramyxovirinae* subfamily, but similarly to other members of the *Pneumovirinae* subfamily including HRSV, the HMPV F protein mediates membrane fusion in the absence of a separate viral attachment protein [16,26]. Furthermore, by transfecting cells with recombinant HMPV F proteins, it was demonstrated that the F protein alone is able to induce syncytium formation in cell culture [16,17].

To investigate the role of the F protein on viral replication both *in vitro* and *in vivo*, we used reverse genetics to generate GFP-expressing recombinant viruses with either the C-85473 or the CAN98–75 genome and we further exchanged the F genes of both strains. Inserting the F gene of C-85473 into the CAN98–75 background restored the syncytium phenotype of strain C-85473, confirming that the F protein is responsible for syncytium formation independently of the genomic background.

Moreover, using RTCA, we demonstrated that the syncytium-inducing rHMPV strains induced changes in cell state 24 h before the focal cell rounding viruses. RTCA is a new electronic cell sensor array, in which the impedance, displayed as CI values, is continuously measured to evaluate cellular integrity [27,28]. This parameter includes cell proliferation, adhesion, viability, morphology and motility. This novel technique has been used to evaluate CPE and their inhibition by neutralizing antibodies directed against flaviviruses [28] and influenza A viruses [27], but also to evaluate antiviral activity [29,30] and cytotoxicity [31]. Here, we demonstrate the usefulness of RTCA in investigating the dynamics of HMPV infection for the first time.

A significant increase in *in vitro* replicative capacity of syncytium-inducing HMPV strains was also confirmed using replication kinetics assays. Laboratory strains were passaged extensively (10 times), which increased their viral titers significantly. On the other hand, we only passaged the recombinant viruses twice to avoid introducing mutations and defective

interfering RNAs that could alter the immune response *in vivo* [32], but this led to lower viral stock titers (by about 1 log). Although the change in genomic background did not alter peak viral titers of viruses expressing the same F protein, both chimeric viruses reached their peak of replication a day later than WT rHMPV strains; this could indicate some influence of the genomic background on F protein incorporation and/or expression.

Notably, we investigated whether *in vitro* phenotypes also correlated with *in vivo* replication titers. We observed that peak lung titers occurred on day 4 pi for all recombinant HMPV viruses. Again, rC-85473 was associated with the highest viral titers and introducing the F protein of CAN98–75 into this strain significantly reduced peak viral titers (Fig. 6a). Conversely, the rCAN98–75 strain generated the lowest peak viral titers and introducing the F protein of C-85473 significantly increased maximum pulmonary viral titers. However, the overlap in the replication curves of the two chimeric viruses suggests that *in vivo* properties were not exclusively dependent on the F protein. This was even more evident by looking at weight loss curves where strains were primarily segregated by their genomic background and not by their F protein. Similarly, pro-inflammatory cytokine/chemokine levels and pulmonary inflammation scores were increased in the rC-85473 strains independently of the F protein, although rCAN98–75\_F induced higher cytokine levels (particularly MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, IL-12 and KC) and significantly more pulmonary inflammation than the prototypic rCAN98–75 strain, suggesting that the F protein does have an effect on HMPV pathogenesis as well.

We investigated 8 cytokines/chemokines (IL-2, IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ , KC, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1 and RANTES) that had previously been described to be up-regulated in the lungs of HMPV-infected mice [21,33,34]. Although different inoculums and cytokine detection methods were used in previously-published studies, we also observed up-regulation of all cytokines/chemokines in mice infected with C-85473 strains, but only MIP-1 $\alpha$  and MCP-1, two chemokines involved in the recruitment and activation of leukocytes, as well as IL-12, a cytokine involved in Th1 differentiation, were significantly up-regulated for rCAN98–75 compared to mock-infected mice (represented as day 0 on the graph).

Unlike HRSV, HMPV does not encode non-structural proteins known to inhibit antiviral immune responses. Therefore, other viral proteins must be involved in immune evasion mechanisms. Among HMPV-expressed proteins, the SH and G glycoproteins, the P phosphoprotein and the M2–2 protein have been found to have immune evasive properties. The presence of the SH protein reduced the expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, KC and MCP-1 in mice infected with WT HMPV compared to mice infected with HMPV lacking the SH protein, in an NF- $\kappa$ B-dependent manner [35]. The G protein was found to reduce cytokine/chemokine levels in cell cultures by inhibiting RIG-1 signaling [36,37]. Furthermore, the G protein inhibited TLR4-signaling in dendritic cells [38]. Goutagny et al. observed that a HMPV-B1 strain impaired type I IFN production, specifically by prevented RIG-I-mediated sensing of HMPV viral RNA, in a P protein-dependent manner [39]. Finally, the M2–2 protein inhibited MAVS-induced IFN- $\beta$  gene transcription *in vitro* [40]. One or several of these viral proteins may be implicated in the observed differences in pathogenesis between strains with the C-85473 and CAN98–75 genomic background and this will be further investigated.

We did not investigate pH-dependency of our different HMPV strains. In contrast to previous reports [17,18], our syncytium-inducing virus is a subtype A strain and the focal cell rounding virus is a subtype B strain. This suggests that, although low-pH-triggered syncytium-formation may be subtype-dependent, syncytium formation at neutral pH does not appear to be subtype-dependent. Furthermore, the physiological relevance of low pH-dependent syncytium-formation remains to be elucidated. Interestingly, our large syncytium-inducing strain carries EKRN at the proposed tetrad positions of the F protein, which are the same as NL/17/00, a poorly fusogenic strain [18]. Moreover, our focal cell-rounding strain carries EDRP, the

same tetrad as NL/1/94, a pH-independent syncytium-inducing strain [18]. This suggests that residues at other positions are likely to influence syncytium formation at neutral pH. Given the importance of the heptad repeats located in F<sub>1</sub> subdomain of the F protein for viral fusion, it would be interesting to examine the effect of the five amino acid changes in HRA and the two amino acid changes in HRB that differentiate our two prototype strains, on syncytium formation at neutral pH.

In conclusion, we have demonstrated the importance of the HMPV F protein for syncytium formation and *in vitro* replication and further showed that the F protein contributes to some extent, but not exclusively, to the virulence potential of different strains in mice. Therefore, it is unlikely that the *in vitro* phenotype of an HMPV strain alone is sufficient to predict the severity of HMPV disease. Other syncytium-inducing and non-syncytium inducing HMPV strains of different subtypes should be studied to confirm our results. Furthermore the effects of other viral genes on HMPV pathogenesis should be investigated using recombinant viruses in different animal models.

## Supporting Information

**S1 Fig. Construction of HMPV antigenome plasmids.** Schematic representation of the cloning steps for rCAN98–75 (a) and for rC-85473 (b). Three or four cDNA fragments (A-C for rC-85473 and A-D for rCAN98–75) were cloned into the pSP72-T7<sub>T</sub>- $\delta$ -T7<sub>P</sub> vector. The obtained antigenome plasmids were then used to swap the F genes. (c) Schematic representation of the cloning steps used to obtain rCAN98–75\_F; a fragment covering M to SH was amplified from the rCAN98–75 antigenomic plasmid and cloned into the temporary pJET vector. Simultaneously, the F gene was amplified from C-85473 cDNA and also cloned into pJET. Both plasmids were digested and the F gene was ligated into the temporary pJET plasmid. From this vector, a fragment covering the region M to M2 was amplified and used as primers for site-directed mutagenesis of the rCAN98–75 antigenomic plasmid. (d) A schematic representation of the cloning steps used to obtain rC-85473\_F; a fragment containing the region P to M2 of rC-85473 was cloned into a temporary pJET vector. A fragment of the F gene of rCAN98–75, flanked by the restriction sites EcoRV and PacI, was amplified by PCR and subsequently cloned into the temporary pJET vector containing the rC-85473 fragment. From this vector, fragment 1 was amplified by PCR. Fragment 2 was amplified directly from the plasmid containing the rCAN98–75 antigenomic vector and fragments 3 and 4 were amplified from the rC-85473 antigenomic vector. Finally the pSP72 vector was digested to obtain fragment 5. All 5 fragments were then ligated using the Gibson Assembly cloning kit. (TIF)

## Acknowledgments

We would like to thank Jean-Christophe Le Bayon for his help in setting-up the reverse genetics system for HMPV.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LA MHC MEH GB. Performed the experiments: LA MHC JD JC CR. Analyzed the data: LA SL CC MEH GB. Contributed reagents/materials/analysis tools: CC GB. Wrote the paper: LA MHC MEH GB.

## References

1. Kahn JS. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(3):546–57. doi: [10.1128/CMR.00014-06](https://doi.org/10.1128/CMR.00014-06) PMID: [16847085](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16847085/)
2. Feuillet F, Lina B, Rosa-Calatrava M, Boivin G. Ten years of human metapneumovirus research. *J Clin Virol.* 2012; 53(2):97–105. doi: [10.1016/j.jcv.2011.10.002](https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.10.002) PMID: [22074934](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22074934/)
3. Papenburg J, Boivin G. The distinguishing features of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol.* 2010; 20(4):245–60. doi: [10.1002/mv.651](https://doi.org/10.1002/mv.651) PMID: [20586081](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20586081/)
4. Papenburg J, Carbonneau J, Isabel S, Bergeron MG, Williams JV, De Serres G, et al. Genetic diversity and molecular evolution of the major human metapneumovirus surface glycoproteins over a decade. *J Clin Virol.* 2013; 58(3):541–7. doi: [10.1016/j.jcv.2013.08.029](https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.08.029) PMID: [24041471](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24041471/)
5. Huck B, Scharf G, Neumann-Haefelin D, Puppe W, Weigl J, Falcone V. Novel human metapneumovirus sublineage. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12(1):147–50. Epub 2006/02/24. doi: [10.3201/eid1201.050772](https://doi.org/10.3201/eid1201.050772) PMID: [16494734](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16494734/)
6. Agapov E, Sumino KC, Gaudreault-Keener M, Storch GA, Holtzman MJ. Genetic variability of human metapneumovirus infection: evidence of a shift in viral genotype without a change in illness. *J Infect Dis.* 2006; 193(3):396–403. doi: [10.1086/499310](https://doi.org/10.1086/499310) PMID: [16388487](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16388487/)
7. Xiao NG, Xie ZP, Zhang B, Yuan XH, Song JR, Gao HC, et al. Prevalence and clinical and molecular characterization of human metapneumovirus in children with acute respiratory infection in China. *Pediatr Infect Dis J.* 2010; 29(2):131–4. Epub 2010/02/06. PMID: [20135829](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20135829/)
8. Vicente D, Montes M, Cilla G, Perez-Yarza EG, Perez-Trallero E. Differences in clinical severity between genotype A and genotype B human metapneumovirus infection in children. *Clin Infect Dis.* 2006; 42(12):e111–3. doi: [10.1086/504378](https://doi.org/10.1086/504378) PMID: [16705567](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16705567/)
9. Papenburg J, Hamelin ME, Ouhoumane N, Carbonneau J, Ouakki M, Raymond F, et al. Comparison of risk factors for human metapneumovirus and respiratory syncytial virus disease severity in young children. *J Infect Dis.* 2012; 206(2):178–89. Epub 2012/05/04. doi: [10.1093/infdis/jis333](https://doi.org/10.1093/infdis/jis333) PMID: [22551815](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22551815/)
10. Pitoiset C, Darniot M, Huet F, Aho SL, Pothier P, Manoha C. Human metapneumovirus genotypes and severity of disease in young children (n = 100) during a 7-year study in Dijon hospital, France. *Journal of medical virology.* 2010; 82(10):1782–9. doi: [10.1002/jmv.21884](https://doi.org/10.1002/jmv.21884) PMID: [20827777](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20827777/)
11. Roussy J-F, Carbonneau J, Ouakki M, Papenburg J, Hamelin M-È, De Serres G, et al. Human metapneumovirus viral load is an important risk factor for disease severity in young children. *J Clin Virol.* 2014; 60(2):133–40. doi: [10.1016/j.jcv.2014.03.001](https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.03.001) PMID: [24686044](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24686044/)
12. van den Hoogen BG, Herfst S, Sprong L, Cane PA, Forleo-Neto E, de Swart RL, et al. Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10(4):658–66. doi: [10.3201/eid1004.030393](https://doi.org/10.3201/eid1004.030393) PMID: [15200856](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15200856/)
13. Cox RG, Williams JV. Breaking in: human metapneumovirus fusion and entry. *Viruses.* 2013; 5(1):192–210. doi: [10.3390/v5010192](https://doi.org/10.3390/v5010192) PMID: [23325326](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23325326/)
14. Chang A, Dutch RE. Paramyxovirus fusion and entry: multiple paths to a common end. *Viruses.* 2012; 4(4):613–36. Epub 2012/05/17. doi: [10.3390/v4040613](https://doi.org/10.3390/v4040613) PMID: [22590688](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22590688/)
15. Lamb RA, Jardetzky TS. Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus F. *Curr Opin Struct Biol.* 2007; 17(4):427–36. doi: [10.1016/j.sbi.2007.08.016](https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.08.016) PMID: [17870467](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17870467/)
16. Schowalter RM, Smith SE, Dutch RE. Characterization of human metapneumovirus F protein-promoted membrane fusion: critical roles for proteolytic processing and low pH. *J Virol.* 2006; 80(22):10931–41. Epub 2006/09/15. doi: [10.1128/JVI.01287-06](https://doi.org/10.1128/JVI.01287-06) PMID: [16971452](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16971452/)
17. Herfst S, Mas V, VerLS, Wierda RJ, Osterhaus AD, Fouchier RA, et al. Low-pH-induced membrane fusion mediated by human metapneumovirus F protein is a rare, strain-dependent phenomenon. *J Virol.* 2008; 82(17):8891–5. Epub 2008/07/04. doi: [10.1128/JVI.00472-08](https://doi.org/10.1128/JVI.00472-08) PMID: [18596097](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18596097/)
18. Mas V, Herfst S, Osterhaus AD, Fouchier RA, Melero JA. Residues of the human metapneumovirus fusion (F) protein critical for its strain-related fusion phenotype: implications for the virus replication cycle. *J Virol.* 2011; 85(23):12650–61. Epub 2011/09/23. doi: [10.1128/JVI.05485-11](https://doi.org/10.1128/JVI.05485-11) PMID: [21937649](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21937649/)
19. Chang A, Hackett BA, Winter CC, Buchholz UJ, Dutch RE. Potential electrostatic interactions in multiple regions affect human metapneumovirus F-mediated membrane fusion. *J Virol.* 2012; 86(18):9843–53. doi: [10.1128/JVI.00639-12](https://doi.org/10.1128/JVI.00639-12) PMID: [22761366](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22761366/)
20. Hamelin ME, Prince GA, Gomez AM, Kinkead R, Boivin G. Human metapneumovirus infection induces long-term pulmonary inflammation associated with airway obstruction and hyperresponsiveness in mice. *J Infect Dis.* 2006; 193(12):1634–42. doi: [10.1086/504262](https://doi.org/10.1086/504262) PMID: [16703506](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16703506/)

21. Hamelin ME, Yim K, Kuhn KH, Cragin RP, Boukhvalova M, Blanco JC, et al. Pathogenesis of human metapneumovirus lung infection in BALB/c mice and cotton rats. *J Virol*. 2005; 79(14):8894–903. doi: [10.1128/JVI.79.14.8894-8903.2005](https://doi.org/10.1128/JVI.79.14.8894-8903.2005) PMID: [15994783](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15994783/)
22. Deffrasnes C, Hamelin ME, Prince GA, Boivin G. Identification and evaluation of a highly effective fusion inhibitor for human metapneumovirus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(1):279–87. doi: [10.1128/AAC.00793-07](https://doi.org/10.1128/AAC.00793-07) PMID: [17967906](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17967906/)
23. Herfst S, de Graaf M, Schickli JH, Tang RS, Kaur J, Yang CF, et al. Recovery of human metapneumovirus genetic lineages A and B from cloned cDNA. *J Virol*. 2004; 78(15):8264–70. doi: [10.1128/JVI.78.15.8264-8270.2004](https://doi.org/10.1128/JVI.78.15.8264-8270.2004) PMID: [15254198](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15254198/)
24. Sloots TP, Mackay IM, Bialasiewicz S, Jacob KC, McQueen E, Hamett GB, et al. Human metapneumovirus, Australia, 2001–2004. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12(8):1263–6. doi: [10.3201/eid1208.051239](https://doi.org/10.3201/eid1208.051239) PMID: [16965711](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16965711/)
25. de Graaf M, Herfst S, Schrauwen EJA, van den Hoogen BG, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. An improved plaque reduction virus neutralization assay for human metapneumovirus. *Journal of virological methods*. 2007; 143(2):169–74. PMID: [17420056](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17420056/)
26. Karon RA, Buonagurio DA, Georgiu AF, Whitehead SS, Adamus JE, Clements-Mann ML, et al. Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(25):13961–6. Epub 1998/02/12. PMID: [9391135](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9391135/)
27. Tian D, Zhang W, He J, Liu Y, Song Z, Zhou Z, et al. Novel, real-time cell analysis for measuring viral cytopathogenesis and the efficacy of neutralizing antibodies to the 2009 influenza A (H1N1) virus. *PLoS ONE*. 2012; 7(2):e31965. doi: [10.1371/journal.pone.0031965](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031965) PMID: [22363775](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22363775/)
28. Fang Y, Ye P, Wang X, Xu X, Reisen W. Real-time monitoring of flavivirus induced cytopathogenesis using cell electric impedance technology. *Journal of virological methods*. 2011; 173(2):251–8. doi: [10.1016/j.jviromet.2011.02.013](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.02.013) PMID: [21349291](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21349291/)
29. Sharma BN, Li R, Bemhoff E, Gutteberg TJ, Rinaldo CH. Fluoroquinolones inhibit human polyomavirus BK (BKV) replication in primary human kidney cells. *Antiviral Res*. 2011; 92(1):115–23. Epub 2011/07/30. doi: [10.1016/j.antiviral.2011.07.012](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.07.012) PMID: [21798289](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21798289/)
30. Sharma BN, Marschall M, Henriksen S, Rinaldo CH. Antiviral effects of artesunate on polyomavirus BK replication in primary human kidney cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(1):279–89. Epub 2013/10/23. doi: [10.1128/aac.01800-13](https://doi.org/10.1128/aac.01800-13) PMID: [24145549](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24145549/)
31. Fonteh PN, Keter FK, Meyer D. New bis(thiosemicarbazone) gold(III) complexes inhibit HIV replication at cytostatic concentrations: Potential for incorporation into virostatic cocktails. *J Inorg Biochem*. 2011; 105(9):1173–80. doi: [10.1016/j.jinorgbio.2011.05.011](https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.05.011) PMID: [21708102](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21708102/)
32. van den Hoogen BG, van Boheemen S, de Rijck J, van Nieuwkoop S, Smith DJ, Laksono B, et al. Excessive production and extreme editing of human metapneumovirus defective interfering RNA is associated with type I IFN induction. *J Gen Virol*. 2014; 95(8):1625–33. doi: [10.1099/vir.0.066100-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.066100-0) PMID: [24760760](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24760760/)
33. Herd KA, Nelson M, Mahalingam S, Tindle RW. Pulmonary infection of mice with human metapneumovirus induces local cytotoxic T-cell and immunoregulatory cytokine responses similar to those seen with human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*. 2010; 91(5):1302–10. Epub 2010/01/08. doi: [10.1099/vir.0.015396-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.015396-0) PMID: [20053825](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20053825/)
34. Huck B, Neumann-Haefelin D, Schmitt-Graeff A, Weckmann M, Mattes J, Ehl S, et al. Human metapneumovirus induces more severe disease and stronger innate immune response in BALB/c mice as compared with respiratory syncytial virus. *Respir Res*. 2007; 8:6. Epub 2007/01/30. doi: [10.1186/1465-9921-8-6](https://doi.org/10.1186/1465-9921-8-6) PMID: [17257445](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17257445/)
35. Bao X, Kolli D, Liu T, Shan Y, Garofalo RP, Casola A. Human metapneumovirus small hydrophobic protein inhibits NF-kappaB transcriptional activity. *J Virol*. 2008; 82(16):8224–9. doi: [10.1128/JVI.02584-07](https://doi.org/10.1128/JVI.02584-07) PMID: [18550666](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18550666/)
36. Bao X, Kolli D, Ren J, Liu T, Garofalo RP, Casola A. Human metapneumovirus glycoprotein G disrupts mitochondrial signaling in airway epithelial cells. *PLoS One*. 2013; 8(4):e62568. doi: [10.1371/journal.pone.0062568](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062568) PMID: [23626834](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23626834/)
37. Bao X, Liu T, Shan Y, Li K, Garofalo RP, Casola A. Human metapneumovirus glycoprotein G inhibits innate immune responses. *PLoS Pathog*. 2008; 4(5):e1000077. doi: [10.1371/journal.ppat.1000077](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000077) PMID: [18516301](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18516301/)
38. Kolli D, Bao X, Liu T, Hong C, Wang T, Garofalo RP, et al. Human metapneumovirus glycoprotein G inhibits TLR4-dependent signaling in monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2011; 187(1):47–54. doi: [10.4049/jimmunol.1002589](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002589) PMID: [21632720](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21632720/)
39. Goutagny N, Jiang Z, Tian J, Parroche P, Schickli J, Monks BG, et al. Cell type-specific recognition of human metapneumoviruses (HMPVs) by retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) and TLR7 and viral

- interference of RIG-I ligand recognition by HMPV-B1 phosphoprotein. *J Immunol.* 2010; 184(3): 1168–79. doi: [10.4049/jimmunol.0902750](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902750) PMID: [20042593](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20042593/)
40. Ren J, Wang Q, Koll D, Prusak DJ, Tseng CT, Chen ZJ, et al. Human metapneumovirus M2–2 protein inhibits innate cellular signaling by targeting MAVS. *J Virol.* 2012; 86(23):13049–61. doi: [10.1128/JVI.01248-12](https://doi.org/10.1128/JVI.01248-12) PMID: [23015697](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23015697/)

En lien avec mon projet complémentaire sur l'étude des interactions fonctionnelles entre les virus influenza et la cellule hôte, j'ai contribué à deux autres études publiées, l'une portant sur le détournement de la machinerie d'export nucléaire par les IAV (**Article 4**) ; l'autre portant sur les interactions fonctionnelles entre les IAV et l'inhibiteur spécifique de p53, Mdm2 (**Article 5**).

#### *Article 4*

« **Nucleolin interacts with influenza A nucleoprotein and contributes to viral ribonucleoprotein complexes nuclear trafficking and efficient influenza viral replication** » dont les auteurs sont Olivier Terrier, Coralie Carron, Benoît De Chasse, Julia Dubois, Aurélien Traversier, Thomas Julien, Gaëlle Cartet, Anaïs Proust, Sabine Hacot, Denis Ressenkoff, Vincent Lotteau, Bruno Lina, Jean-Jacques Diaz, Vincent Moules et Manuel Rosa-Calatrava. Cet article a été publié le 4 juillet 2016 dans le journal international à comité de lecture en langue anglaise *Scientific Reports*. DOI : 10.1038/srep29006.

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Nucleolin interacts with influenza A nucleoprotein and contributes to viral ribonucleoprotein complexes nuclear trafficking and efficient influenza viral replication

Received: 23 December 2015

Accepted: 09 June 2016

Published: 04 July 2016

Olivier Terrier<sup>1,2</sup>, Coralie Carron<sup>1,2</sup>, Benoît De Chasse<sup>2</sup>, Julia Dubois<sup>1,2</sup>, Aurélien Traversier<sup>1,2</sup>, Thomas Julien<sup>1,2,3</sup>, Gaëlle Cartet<sup>1,2</sup>, Anaïs Proust<sup>1,2,3</sup>, Sabine Hacot<sup>4</sup>, Denis Ressenkoff<sup>5</sup>, Vincent Lotteau<sup>2</sup>, Bruno Lina<sup>1,2,6</sup>, Jean-Jacques Diaz<sup>4</sup>, Vincent Moules<sup>1,2,3</sup> & Manuel Rosa-Calatrava<sup>1,2,3</sup>

Influenza viruses replicate their single-stranded RNA genomes in the nucleus of infected cells and these replicated genomes (vRNPs) are then exported from the nucleus to the cytoplasm and plasma membrane before budding. To achieve this export, influenza viruses hijack the host cell export machinery. However, the complete mechanisms underlying this hijacking remain not fully understood. We have previously shown that influenza viruses induce a marked alteration of the nucleus during the time-course of infection and notably in the nucleolar compartment. In this study, we discovered that a major nucleolar component, called nucleolin, is required for an efficient export of vRNPs and viral replication. We have notably shown that nucleolin interacts with the viral nucleoprotein (NP) that mainly constitutes vRNPs. Our results suggest that this interaction could allow vRNPs to “catch” the host cell export machinery, a necessary step for viral replication.

Influenza A viruses (IAV) are responsible for respiratory diseases that affect millions of people worldwide in recurrent annual epidemics, sometimes fatally. The ability of this major human pathogen to mutate and lead to the emergence of new pandemic subtypes, constitutes a constant serious threat to human health<sup>1</sup>. The genome of IAV consists of eight single-stranded negative RNA segments encoding for up to 17 distinct proteins<sup>2</sup>. These RNA segments are encapsidated by the viral nucleoprotein (NP) in association with proteins of the viral polymerase complex (PA, PB1 and PB2). The resulting viral ribonucleoproteins (vRNPs) constitute autonomous functional units for viral transcription and replication<sup>3</sup>.

In contrast with most RNA viruses, IAV have a nuclear infectious cycle and thus have direct access to the host nuclear machineries, including the transcriptosome or the spliceosome, to successfully achieve their viral replication<sup>2-4</sup>. Numerous cellular components have been identified as functional interacting partners of IAV proteins and some are subject to different extents of viral “retasking”<sup>5-9</sup>. In view of their nuclear replication, IAV require the efficient export of their vRNPs from the nucleus towards the cytoplasm and budding regions of the cell membrane for a productive infection<sup>10</sup>. Extensive investigation of the nuclear export of vRNPs has provided a model in which the viral matrix protein (M1) binds to vRNPs and the viral nuclear export protein (NEP/NS2) acts as a bridge between M1 and the cellular export receptor Crm1<sup>11</sup>. Alternatively, NP has been shown to bind to both M1 and Crm1 thereby allowing its exportation<sup>12</sup>. Nevertheless, deciphering the precise functional interplay between

<sup>1</sup>Virologie et Pathologie Humaine - Team VirPath - Université Claude Bernard Lyon 1 - Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. <sup>2</sup>CIRI, International Center for Infectiology Research, Inserm U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France. <sup>3</sup>VirNext, Faculté de Médecine RTH Laennec, Université Lyon 1, Lyon, France. <sup>4</sup>Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, UMR Inserm 1052 CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Lyon, France and Université de Lyon, Lyon, France. <sup>5</sup>CIOLE, Centre d'imagerie quantitative Lyon-Est, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France. <sup>6</sup>Hospices Civils de Lyon, Laboratory of Virology, Lyon, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to O.T. (email: olivier.terrier@univ-lyon1.fr) or M.R.-C. (email: manuel.rosa-calatrava@univ-lyon1.fr)

IAV and the host Crm1-dependent nuclear export machinery requires further exploration. Recently, Chase and collaborators showed that the interaction between vRNPs and the nuclear export machinery takes place in dense chromatin domains that allow IAV to “snatch” Crm1-RanGTP nuclear export complexes to the detriment of cellular substrates<sup>13</sup>. These results, together with other observations, highlight the involvement of host nuclear compartmentalization and chromatin territories in regulating nuclear traffic of IAV vRNPs<sup>14–17</sup>.

Several investigations, including ours, have revealed that IAV induce a strong remodeling of nuclear architecture with marked modifications of the nucleoli ultrastructure and compartments<sup>3,17–20</sup>. The nucleolus, known as the site of ribosome biogenesis, is also a sensor of cellular stresses and is involved in several cellular pathways, such as cell-cycle regulation or apoptosis<sup>21–23</sup>. Several DNA and RNA viruses, including cytoplasmic viruses are known to induce nucleolar alterations that contribute towards optimal infection<sup>24–26</sup>.

In the context of IAV, their interplay with nucleolus and selective interactions with several nucleolar components appears to be decisive in the outcome of infection<sup>17,20</sup>. Ozawa and colleagues demonstrated that dynamic nucleolar localization of NP is functionally significant by contributing to efficient viral replication and transcription<sup>27</sup>. Moreover, different studies have demonstrated a subtype dependent interaction between viral non-structural protein (NS1) and cellular nucleolin, suggesting a role of the nucleolar targeting functions of NS1 in IAV pathogenesis<sup>28,29</sup>. Proteomics-based approaches have revealed changes in the nucleolar proteome of IAV infected cells<sup>5,30</sup> and identified several nucleolar components, such as nucleolin, nucleophosmin (B23) and ribosomal proteins, as putative interactants of reconstituted IAV vRNPs<sup>7</sup>. In addition, high-throughput RNAi approaches have highlighted the functional requirement of several of these nucleolar components in viral replication<sup>31–33</sup>.

Nucleolin is a multifunctional protein that contributes extensively to DNA and RNA regulatory mechanisms, including ribosome biogenesis, chromatin remodeling, mRNA stability and translation, nuclear export of RNA and protein complexes, and microRNA processing<sup>34,35</sup>. In this way, nucleolin takes part in several cellular functions, such as gene silencing, senescence, cell proliferation and growth<sup>23,35–37</sup>, and continuously shuttles between nucleolar/nuclear compartments and the cytoplasm up to the cell surface<sup>38,39</sup>. Moreover, through its ability to associate with diverse target RNAs, nucleolin is implicated in various pathological processes, particularly cancer and viral infection<sup>40</sup>.

In this context, different functional interactions with nucleolin have been described for several DNA viruses, such as poliovirus<sup>41</sup>, adenovirus<sup>42</sup>, HSV<sup>43,44</sup> or CMV<sup>45,46</sup>, and several RNA viruses, such as hepatitis C and delta viruses<sup>47,48</sup>, coronavirus<sup>49</sup>, hPIV-3<sup>50</sup>, papillomavirus HPV9<sup>51</sup>, Crimean–Congo hemorrhagic fever virus<sup>52</sup>, HIV1<sup>53</sup>, noroviruses<sup>54</sup> and notably the infectious salmon anemia virus (ISAV) which belongs to the family *Orthomyxoviridae*, as IAV<sup>55</sup>. Altogether, these studies highlight nucleolin as a key interacting factor that is crucial, in some cases, for viral replication and involved in nucleolar-cytoplasmic export of viral genome or viral egress<sup>44</sup>.

At first, we observed the dynamic redistribution of nucleolin from a nucleolar to a very specific nuclear polarized pattern during infection. The aim of this study was therefore to investigate the functional relationship between IAV and nucleolin with regards to the nuclear traffic of vRNPs and their targeting to the dense chromatin compartment<sup>13</sup> and in the context of the viral remodeling of the host nuclear architectures<sup>17,20</sup>. We first characterized NP, the main component of IAV vRNP, as co-localizing and interacting with endogenous nucleolin during infection. Moreover, using cell fractionation and RNAi approaches, we suggest that nucleolin contributes to efficient vRNP trafficking and viral replication. Based on our results, we propose nucleolin as an essential host factor for the chromatin targeting of the nucleocytoplasmic export complex of vRNPs during infection.

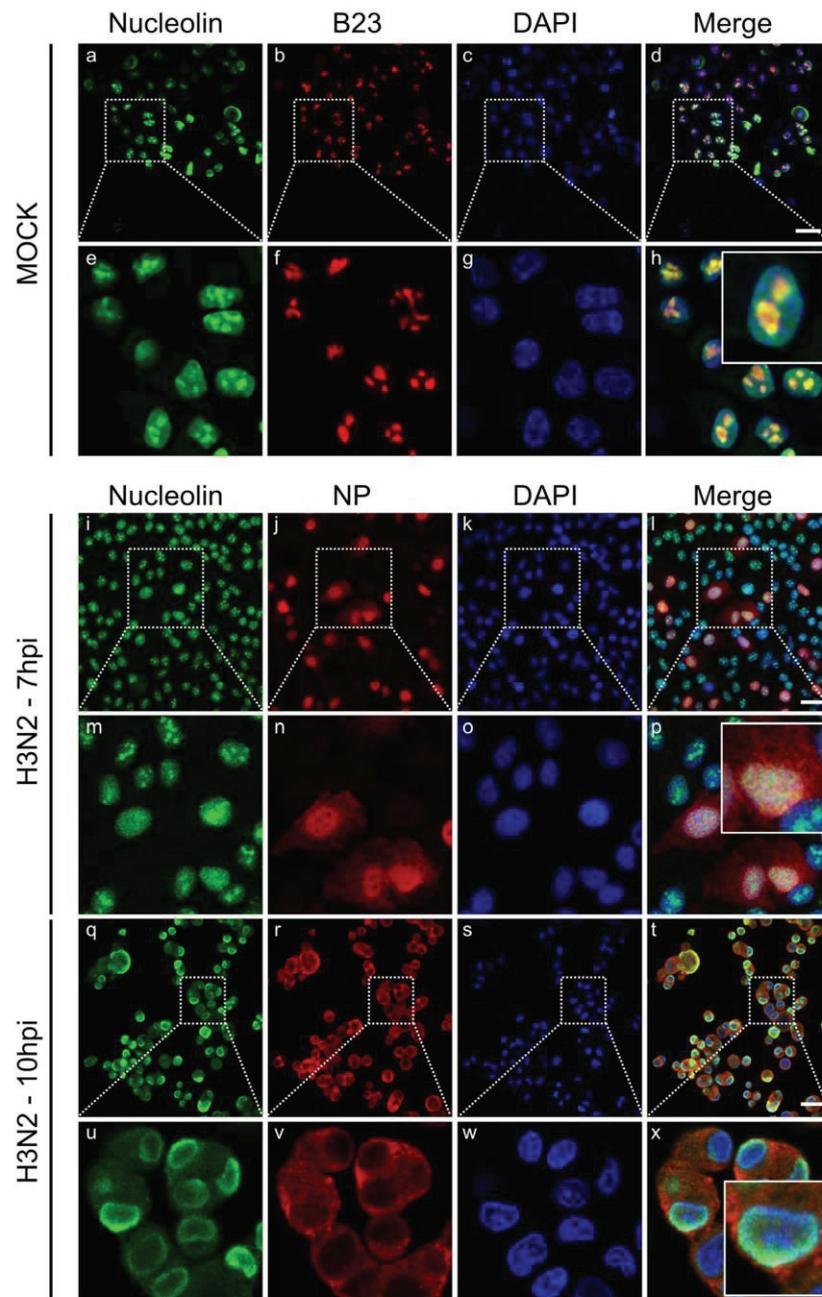
## Results

### Nucleolin redistributes with IAV ribonucleoprotein complexes to the nuclear periphery of infected cells.

Considering the strongly altered host nucleolar ultrastructure and composition during IAV infection, we analyzed the subcellular localization of three major constitutive nucleolar proteins, nucleolin, B23 and fibrillarin, during the time course of influenza infection. We used immuno-fluorescence confocal microscopy in human lung epithelial A549 cells, mock-infected or infected by influenza A/Moscow/10/99 (H3N2) virus, at 7 and 10 hours post infection (hpi). In addition to nucleolin, B23 or fibrillarin immunostaining, we also used NP as an indicator of viral cycle advancement, as previously carried out<sup>3,17–20</sup>. As expected in mock-infected cells, the three nucleolar proteins mainly localized in nucleoli (Fig. 1, panels a to h and Supplementary Figure 1B,C). During infection, localization patterns of B23 and fibrillarin remained unmodified up to 7 hpi (data not shown) compared to mock-infected cells, as previously reported<sup>7,27</sup>. In contrast, when NS1 is notably accumulated within nucleolus at this time (Supplementary Figure 1A), nucleolin no longer preferentially localized in the subnuclear compartment and instead displayed a broad relocalization throughout the nucleus (Fig. 1, panels i to p; and Supplementary Figure 1A), in accordance with previous study<sup>28</sup>. Later in infection (10 hpi), as illustrated by the mainly cytoplasmic localization of NP, nucleolin mostly redistributed at the nuclear periphery of more than 95% of the infected cells (Fig. 1, panels q to x). At this time most of the fibrillarin accumulated in a large nuclear spot (Supplementary Figure 1B), probably linked to the ultrastructural remodeling of the nucleolar compartment<sup>3,17–20</sup>, whereas B23 remained associated (Supplementary Figure 1C).

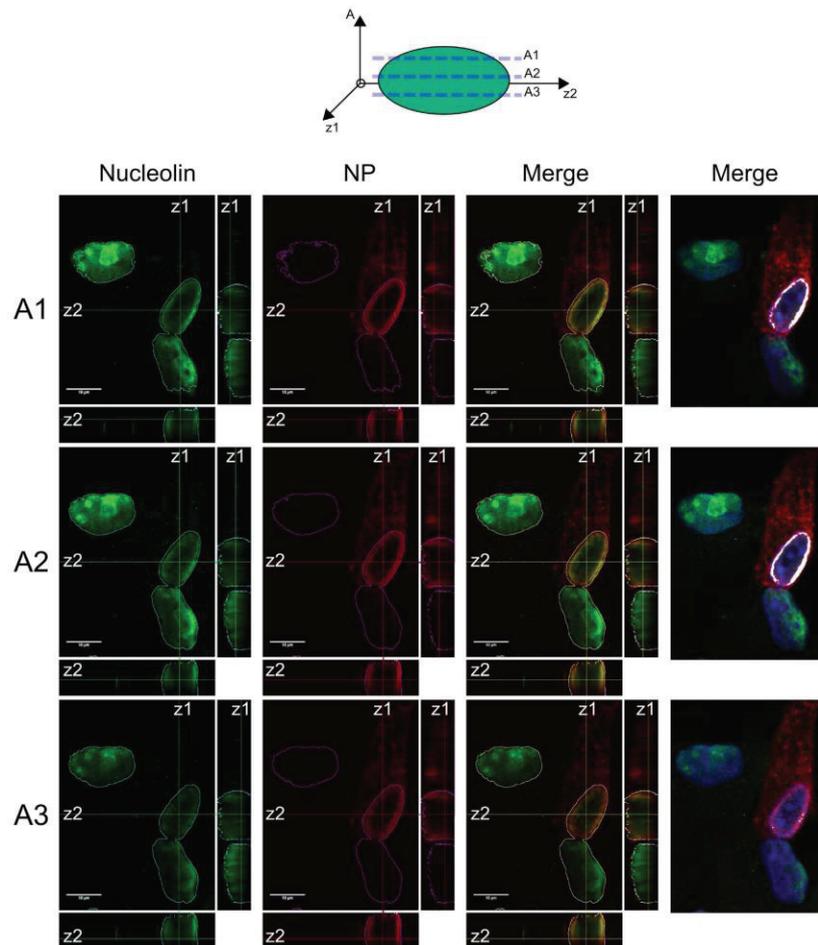
Altogether, these results reveal the differential modification of the subnuclear localization of the three abundant constitutive nucleolar proteins by H3N2 infection, and suggest a specific, earlier and dynamic redistribution of nucleolin during the time course of infection.

We then investigated the impact of infection on nucleolin localization by a different human (H1N1 pdm2009) and several avian (H5N1, H5N2 and H7N7) IAV strains. Despite their specific host-range restriction<sup>56</sup>, all viruses efficiently infected A549 cells with comparable kinetics, as we previously reported<sup>3,17</sup>. We performed immunolabeling at 24 hpi, a time corresponding to late stage of infection for all these viruses (Supplementary Figure 2A). As observed for H3N2, each infection led to a similar redistribution of endogenous nucleolin towards the nuclear periphery of infected cells (Supplementary Figure 2A). Interestingly, the observed subnuclear localization pattern



**Figure 1. Host nucleolin is dynamically relocalized during the course of influenza infection.** Immunofluorescence staining of nucleolin (green) and B23 (red) in mock-infected cells (panels a to h) or NP (red) in A549 cells infected with H3N2 virus at a MOI of 1 (panels i to x) was performed at different times, as indicated. Nuclei were counterstained with DAPI (blue, panels c,g,k,o,s,w). Merged fluorescent signals are presented in panels d,h,i,p,t and x. Cell details are enlarged (inset). Scale bar = 10  $\mu$ m.

of nucleolin in IAV infected cells clearly evoked the previously described polarized distribution of trafficking vRNPs that formed a cap at the apex of the nuclear envelope prior to their export towards the cytoplasm<sup>57,58</sup>. To

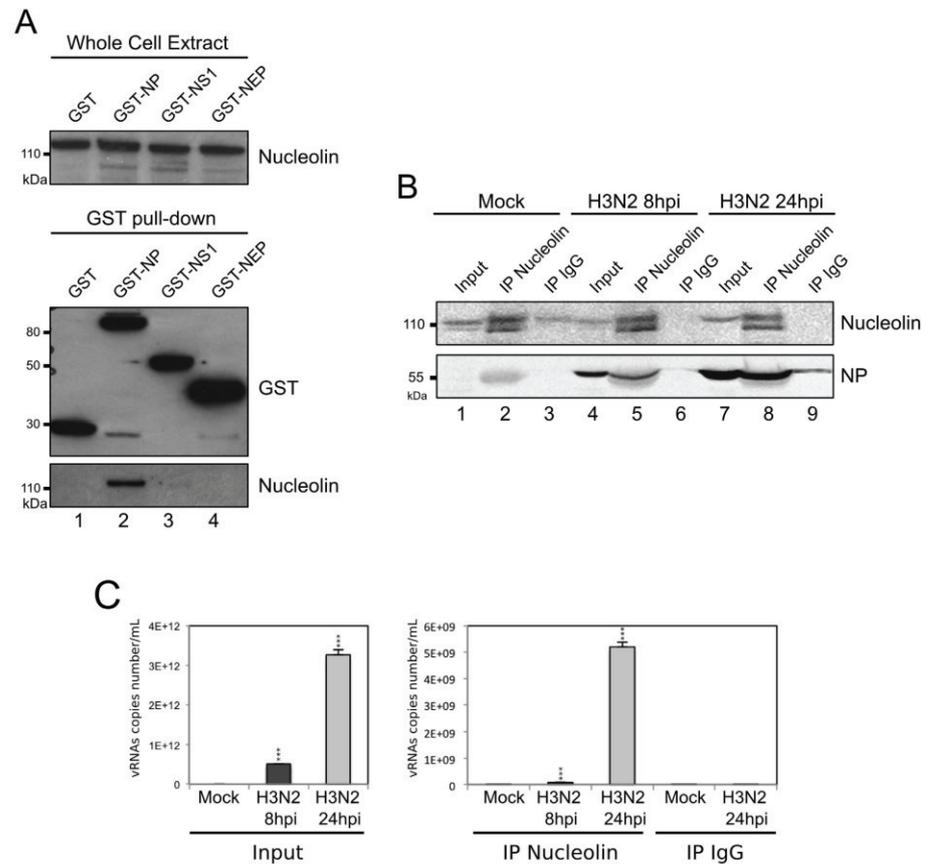


**Figure 2. Influenza virus induces a nuclear polarized redistribution of nucleolin.** A549 cells were infected with H3N2 (MOI 1) and fixed at 8 hpi. Immunofluorescence staining of NP (red) and nucleolin (green) were performed. Single optical sections through the top (A1), the midline (A2) and the bottom (A3) of nuclei (xy) and z-axis reconstruction (z1 and z2, respectively) are represented. Merged fluorescent signals are presented, as indicated. Scale bar = 10  $\mu$ m. JAcO plugin for imageJ was used to highlight the colocalization of the two stainings by thresholding the signal above the background<sup>80</sup>. For easier visualization, colocalized pixels are colored in white (right panels).

note, similar NP-nucleolin colocalization and subnuclear localization patterns were also observed using another specific monoclonal antibody raised against NP (MAb 3/1, kind gift of Dr Webster) that was reported to recognize IAV vRNP complexes<sup>59</sup> (Supplementary Figure 2B).

To further investigate these correlated observations, we studied the localization of endogenous nucleolin by 3D reconstruction of confocal images. Our observations confirmed an asymmetric localization pattern of endogenous nucleolin within H3N2 infected cells (10 hpi) (Fig. 2). Single optical sections through the nucleus (Fig. 2, panels A1 to A3) and Z-axis reconstruction revealed a polarized co-localization of nucleolin with NP towards the nuclear apex, as revealed by the asymmetric merged fluorescence staining in the z1-z2-axis plane (Fig. 2). Altogether, these results suggest a putative involvement of nucleolin in the nuclear trafficking of vRNPs during IAV infection.

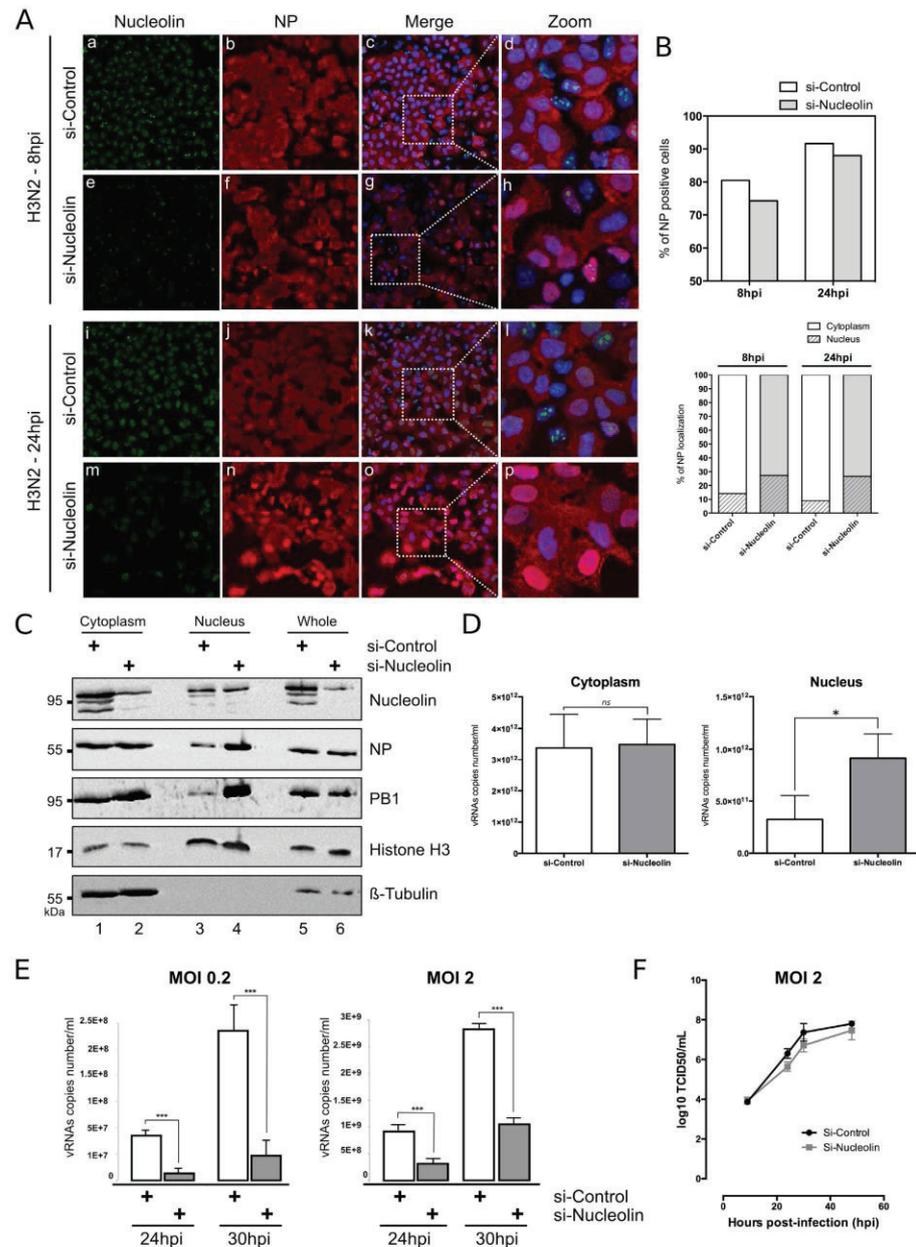
**Endogenous nucleolin interacts with transiently expressed NP.** To further explore this hypothesis, we first performed a GST pull-down assay to examine whether endogenous nucleolin could interact with nucleoprotein, the main component of vRNPs. A549 cells were transfected with a plasmid encoding NP fused to GST (GST-NP, H3N2), and cell lysates were pulled down using glutathione sepharose beads at 48 h post transfection. Complexes were analyzed by western blot with anti-GST and anti-nucleolin antibodies. As controls, cell lysates



**Figure 3.** NP interacts with endogenous nucleolin (A) A549 cells were transfected with plasmids coding GST or, alternatively, GST fused to NP, NS1 or NEP. Cell lysates were subject to a pull-down assay. Whole cell extracts and pull-down proteins were resolved on SDS-PAGE and immunoblotted with anti-GST and anti-nucleolin antibodies. Top-panel shows detection of the endogenous nucleolin within whole cell lysates. The bottom panel shows the level of expression of pulled-down GST fusion and endogenous nucleolin. (B) Cells were infected during 8 or 24 hours with H3N2 (MOI 2). Immunoprecipitations (IP) were performed on the whole cell extract with polyclonal anti-nucleolin or control IgG antibodies, as indicated. The presence of nucleolin and NP in immunopurified complexes was checked by western blot analysis. Whole cell extracts (Input) were used as control. (C) Cells were infected during 8 or 24 hours with H3N2, as before. Immunoprecipitations were performed with the corresponding whole cell extract proteins, using polyclonal anti-nucleolin or control IgG antibody. RNAs associated with purified complexes were extracted and M vRNAs were quantified by specific RT-qPCR (M vRNAs copies number/mL). Total RNAs were extracted from Mock- or H3N2-infected cells and used as controls (Input). \*\*\**P*-value < 0.001.

obtained after transfection of non-fused GST, GST-NS1 or GST-NEP were also examined as controls. As shown in Fig. 3A, endogenous nucleolin was pulled down from GST-NP lysates (Fig. 3A, lane 2). In comparison, no interaction with nucleolin was characterized with cell lysate obtained after transfection of non-fused GST protein (Fig. 3A, lane 1). In addition, a very weak interaction with nucleolin was characterized with GST-NS1 (Fig. 3A, lane 3). This partial discrepancy with a previous study<sup>29</sup> could be explained by the different strain origin of the NS1 tested (A/WSN/33), especially considering other reports showing strikingly different properties among NS1 of various origins<sup>28</sup>. Another explanation would be our experimental conditions being based on transient expression in A549 cells and not on the use of recombinant proteins expressed from bacteria<sup>29</sup>. On the other hand, our use of GST-NEP protein expression as a negative control did confirm no interaction with nucleolin (Fig. 3A, lane 4). Additionally, this interaction between endogenous nucleolin and transiently expressed NP was also confirmed by immunoprecipitation assay using a specific rabbit polyclonal anti-nucleolin antibody<sup>43</sup> (data not shown).

**Endogenous nucleolin is a putative interacting partner of IAV ribonucleoproteins in infected cells.** To determine whether NP association with nucleolin also occurs in a context of infection, we performed



**Figure 4. Silencing of endogenous nucleolin alters the nucleocytoplasmic export of vRNPs and decreases the virus production yield.** (A) A549 cells were transfected with either nucleolin (si-Nucleolin, panels e–h and panels m–p) or control (si-Control, panels a–d and panels i–l) siRNAs. Two days after transfection, cells were infected with H3N2 for 8 h or 24 h and immunostained with anti-nucleolin (green) and anti-NP (red) antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI. Panels (c,g,k,o) are merged confocal images. Details of cell are enlarged (inset d,h,l,p). (B) Percentage of infection was quantified in si-transfected cells (upper panel). Intracellular localization of NP was evaluated by counting nuclear and/or cytoplasmic labeling in a total of 100 cells per condition, on a total of three distinct fields (lower panel). (C,D) A549 cells were transfected with si-Nucleolin or si-Control and infected with H3N2 virus, as in A and submitted to nucleocytoplasmic fractionation. Equal amounts of proteins from each fraction were analyzed by western blot (C). NP and PB1 proteins were detected using specific antibodies. H3 and  $\beta$ -tubulin were detected as loading and fractionation controls. (D) Total RNAs were extracted from cytoplasmic and nuclear fractions and vRNAs were quantified by specific RT-qPCR (M vRNAs copies number/mL), \**P*-value < 0.05. (E) A549 cells were

transfected with si-Nucleolin or si-Control. Two days after transfection, cells were infected with H3N2 at MOI 0.2 and 2 for 24 to 30 hpi. Viral RNAs were extracted from culture supernatants and quantified by RT-qPCR, using specific primers for M segment. \*\*\**P*-value < 0.001. (F) A549 cells treated by si-Control or si-Nucleolin (as previously described) were infected with viruses at a MOI of 2. Samples of supernatants were harvested at several time points post-infection and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until end point viral titration assays in MDCK cells using the Reed and Muench statistical method (TCID<sub>50</sub>/mL).

immunoprecipitation assays with extracts prepared from A549 cells infected with H3N2 virus, at 8 h and 24 hpi. Extracts from mock-infected cells were used as negative controls. As expected, western blot confirmed the immunoprecipitation of nucleolin specifically by the rabbit polyclonal anti-nucleolin antibody compared to IgG control (Fig. 3B, lanes 2, 5 and 8 *versus* 3, 6 and 9). The immunoprecipitated complexes from infected cells contained NP, the amount of which increased from 8 hpi to 24 hpi (Fig. 3B, lane 5 *versus* 8). Otherwise, RNase A treatment did not abolish immunoprecipitation of NP, suggesting nucleolin could interact with both vRNP and non-vRNP forms of NP (Supplementary Figure 3). Alternatively, we investigated the presence of vRNA in immunoprecipitated complexes in similar experimental conditions (Fig. 3C). To this end, we subjected cell lysates of infected cells (8 and 24 hpi) to anti-nucleolin immunoprecipitation before extracting the putative associated vRNAs for quantification by specific RT-qPCR (Fig. 3C), described in our previous study<sup>60</sup>. As expected, total cell lysates at 24 hpi contained more vRNA copies as compared to those at 8 hpi; total cell lysates from mock-infected cells contained no detectable vRNA. Accordingly, we detected vRNAs in complex containing NP at 8 hpi and mostly at 24 hpi, whereas no vRNA in control (IgG) (Fig. 3C, right panel).

Altogether, these results demonstrate that NP and vRNA are co-immunoprecipitated with endogenous nucleolin in IAV infected cells. In accordance with previous results of immunostaining experiments and NP interaction assays, our results suggest a putative association of endogenous nucleolin with IAV ribonucleoproteins.

#### Silencing of endogenous nucleolin expression impairs nucleocytoplasmic trafficking of IAV ribonucleoprotein complexes.

We investigated functional relevance of such putative association by studying the contribution of nucleolin to the nuclear trafficking of vRNPs. We first assessed, as an indicator of infection progress, the subcellular distribution pattern of NP in conditions of endogenous nucleolin silencing. After validating silencing efficiency in non-infected A549 cells (Supplementary Figure 4), we transfected A549 cells with siRNA control (si-Control) or a pool of siRNAs targeting nucleolin (si-Nucleolin) before their subsequent infection at 48 h with H3N2 virus (MOI of 1). As expected, the si-Nucleolin treated cells displayed very low levels of nucleolin staining at 8 and 24 hpi, as compared to si-Control (Fig. 4A, panels e and m). Interestingly, the silencing of nucleolin expression appeared to only slightly decrease the number of NP positive cells (Fig. 4A, panels b *versus* f, j *versus* n and Fig. 4B, upper panel), suggesting a limited impact on cell infectivity. In contrast, the si-nucleolin treatment strongly affected the subcellular localization of NP during infection (Fig. 4A, panels b *versus* f, j *versus* n) in such a way that 1.9 to 3 times more cells harbored a stringent nuclear pattern only for NP in this condition, compared to the si-Control condition at 8 and 24 hpi, respectively. At both time intervals post-infection, the viral cycle appeared more advanced in the presence of endogenous nucleolin as shown by a more pronounced cytoplasmic staining for NP in infected cells (Fig. 4B, lower panel).

In a parallel experiment, we assessed by western blot the levels of two protein components of vRNP (NP and PB1) in subcellular compartments (Fig. 4C). A549 cells, previously transfected with si-Control or si-Nucleolin, were infected with H3N2 virus (MOI 1) for 24 h and harvested for nucleocytoplasmic fractionation. As a control, we studied the expression of histone H3 and  $\beta$ -tubulin. As expected, endogenous nucleolin had been silenced in the different sub-cellular fractions (Fig. 4C, compare lanes 1, 3 and 5 with lanes 2, 4 and 6, respectively). Moreover, the two experimental si-RNA conditions showed no difference in terms of expression levels of NP and PB1 viral proteins in whole cell extracts, suggesting no effect on viral protein expression (Fig. 4C, lanes 5 and 6). In contrast, we noted a strong increase of NP and PB1 in the nuclear fractions of si-Nucleolin-treated cells as compared to those of si-Control (Fig. 4C, lanes 3 and 4), while the cytoplasm fractions displayed similar protein ratios between the two si-RNA conditions (Fig. 4C, lanes 1 and 2). We completed this analysis by performing total RNA extraction from the cytoplasmic and nuclear fractions, followed by a quantification of viral genome copy numbers by RT-qPCR (Fig. 4D). Results revealed no difference in cytoplasmic fractions between si-Nucleolin and si-Control (Fig. 4D, left panel). In contrast, the nuclear fraction of si-Nucleolin treated cells contained a significant higher level of vRNA copies than that of the control (Fig. 4D, right panel, *p*-value < 0.05). In accordance with these results, the silencing of nucleolin also significantly reduced the yield of progeny virus produced at 24 and 30 hpi, as compared to si-Control conditions. Quantification of vRNA copies number/ml in cell supernatants revealed a marked decrease in viral progeny yield that could reach up to 95.5% at 30 hpi, (MOI 0.2, Fig. 4E) or up to 63% at 30 hpi (MOI 2, Fig. 4E). This result was also confirmed by quantification of infectious titers (TCID<sub>50</sub>/mL) in supernatants, with a slight decrease and a delay of viral production in the context of silencing of nucleolin (Fig. 4F).

Altogether, these results suggest a nuclear retention of vRNP complexes upon silencing of endogenous nucleolin and a consecutive delay in the dynamic trafficking of vRNPs towards the cytoplasm and consecutive viral production. They therefore provide evidence in support of our hypothesis that nucleolin is required for an efficient nucleocytoplasmic export of vRNPs during IAV infection.

**Association of vRNPs with dense chromatin domain requires host nucleolin expression.** Several reports have demonstrated that vRNPs are associated with chromatin during the nuclear steps of the viral cycle<sup>16,61–63</sup>. Recently, Chase and collaborators demonstrated that IAV gain privileged access to the host nuclear Crm1 export machinery by targeting vRNP complexes to the sites of Ran regeneration within dense

transfected with si-Nucleolin or si-Control. Two days after transfection, cells were infected with H3N2 at MOI 0.2 and 2 for 24 to 30 hpi. Viral RNAs were extracted from culture supernatants and quantified by RT-qPCR, using specific primers for M segment. \*\*\**P*-value < 0.001. (F) A549 cells treated by si-Control or si-Nucleolin (as previously described) were infected with viruses at a MOI of 2. Samples of supernatants were harvested at several time points post-infection and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until end point viral titration assays in MDCK cells using the Reed and Muench statistical method (TCID<sub>50</sub>/mL).

immunoprecipitation assays with extracts prepared from A549 cells infected with H3N2 virus, at 8 h and 24 hpi. Extracts from mock-infected cells were used as negative controls. As expected, western blot confirmed the immunoprecipitation of nucleolin specifically by the rabbit polyclonal anti-nucleolin antibody compared to IgG control (Fig. 3B, lanes 2, 5 and 8 *versus* 3, 6 and 9). The immunoprecipitated complexes from infected cells contained NP, the amount of which increased from 8 hpi to 24 hpi (Fig. 3B, lane 5 *versus* 8). Otherwise, RNase A treatment did not abolish immunoprecipitation of NP, suggesting nucleolin could interact with both vRNP and non-vRNP forms of NP (Supplementary Figure 3). Alternatively, we investigated the presence of vRNA in immunoprecipitated complexes in similar experimental conditions (Fig. 3C). To this end, we subjected cell lysates of infected cells (8 and 24 hpi) to anti-nucleolin immunoprecipitation before extracting the putative associated vRNAs for quantification by specific RT-qPCR (Fig. 3C), described in our previous study<sup>60</sup>. As expected, total cell lysates at 24 hpi contained more vRNA copies as compared to those at 8 hpi; total cell lysates from mock-infected cells contained no detectable vRNA. Accordingly, we detected vRNAs in complex containing NP at 8 hpi and mostly at 24 hpi, whereas no vRNA in control (IgG) (Fig. 3C, right panel).

Altogether, these results demonstrate that NP and vRNA are co-immunoprecipitated with endogenous nucleolin in IAV infected cells. In accordance with previous results of immunostaining experiments and NP interaction assays, our results suggest a putative association of endogenous nucleolin with IAV ribonucleoproteins.

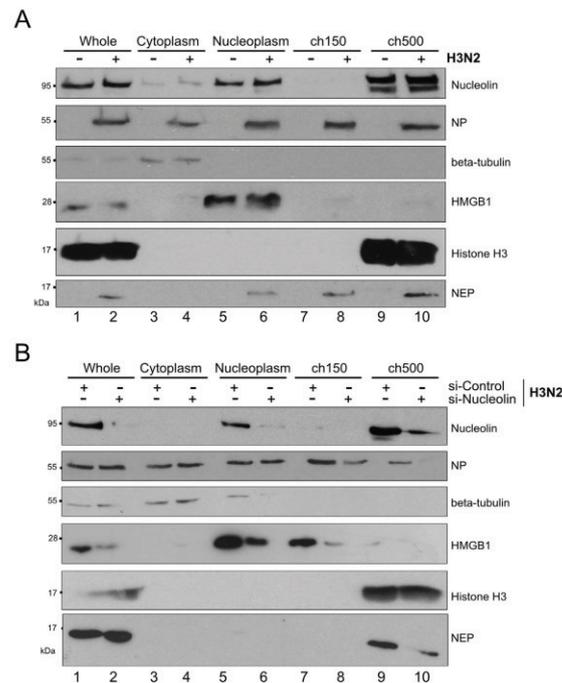
#### Silencing of endogenous nucleolin expression impairs nucleocytoplasmic trafficking of IAV ribonucleoprotein complexes.

We investigated functional relevance of such putative association by studying the contribution of nucleolin to the nuclear trafficking of vRNPs. We first assessed, as an indicator of infection progress, the subcellular distribution pattern of NP in conditions of endogenous nucleolin silencing. After validating silencing efficiency in non-infected A549 cells (Supplementary Figure 4), we transfected A549 cells with siRNA control (si-Control) or a pool of siRNAs targeting nucleolin (si-Nucleolin) before their subsequent infection at 48 h with H3N2 virus (MOI of 1). As expected, the si-Nucleolin treated cells displayed very low levels of nucleolin staining at 8 and 24 hpi, as compared to si-Control (Fig. 4A, panels e and m). Interestingly, the silencing of nucleolin expression appeared to only slightly decrease the number of NP positive cells (Fig. 4A, panels b *versus* f, j *versus* n and Fig. 4B, upper panel), suggesting a limited impact on cell infectivity. In contrast, the si-nucleolin treatment strongly affected the subcellular localization of NP during infection (Fig. 4A, panels b *versus* f, j *versus* n) in such a way that 1.9 to 3 times more cells harbored a stringent nuclear pattern only for NP in this condition, compared to the si-Control condition at 8 and 24 hpi, respectively. At both time intervals post-infection, the viral cycle appeared more advanced in the presence of endogenous nucleolin as shown by a more pronounced cytoplasmic staining for NP in infected cells (Fig. 4B, lower panel).

In a parallel experiment, we assessed by western blot the levels of two protein components of vRNP (NP and PB1) in subcellular compartments (Fig. 4C). A549 cells, previously transfected with si-Control or si-Nucleolin, were infected with H3N2 virus (MOI 1) for 24 h and harvested for nucleocytoplasmic fractionation. As a control, we studied the expression of histone H3 and  $\beta$ -tubulin. As expected, endogenous nucleolin had been silenced in the different sub-cellular fractions (Fig. 4C, compare lanes 1, 3 and 5 with lanes 2, 4 and 6, respectively). Moreover, the two experimental si-RNA conditions showed no difference in terms of expression levels of NP and PB1 viral proteins in whole cell extracts, suggesting no effect on viral protein expression (Fig. 4C, lanes 5 and 6). In contrast, we noted a strong increase of NP and PB1 in the nuclear fractions of si-Nucleolin-treated cells as compared to those of si-Control (Fig. 4C, lanes 3 and 4), while the cytoplasm fractions displayed similar protein ratios between the two si-RNA conditions (Fig. 4C, lanes 1 and 2). We completed this analysis by performing total RNA extraction from the cytoplasmic and nuclear fractions, followed by a quantification of viral genome copy numbers by RT-qPCR (Fig. 4D). Results revealed no difference in cytoplasmic fractions between si-Nucleolin and si-Control (Fig. 4D, left panel). In contrast, the nuclear fraction of si-Nucleolin treated cells contained a significant higher level of vRNA copies than that of the control (Fig. 4D, right panel, *p*-value < 0.05). In accordance with these results, the silencing of nucleolin also significantly reduced the yield of progeny virus produced at 24 and 30 hpi, as compared to si-Control conditions. Quantification of vRNA copies number/ml in cell supernatants revealed a marked decrease in viral progeny yield that could reach up to 95.5% at 30 hpi, (MOI 0.2, Fig. 4E) or up to 63% at 30 hpi (MOI 2, Fig. 4E). This result was also confirmed by quantification of infectious titers (TCID<sub>50</sub>/mL) in supernatants, with a slight decrease and a delay of viral production in the context of silencing of nucleolin (Fig. 4F).

Altogether, these results suggest a nuclear retention of vRNP complexes upon silencing of endogenous nucleolin and a consecutive delay in the dynamic trafficking of vRNPs towards the cytoplasm and consecutive viral production. They therefore provide evidence in support of our hypothesis that nucleolin is required for an efficient nucleocytoplasmic export of vRNPs during IAV infection.

**Association of vRNPs with dense chromatin domain requires host nucleolin expression.** Several reports have demonstrated that vRNPs are associated with chromatin during the nuclear steps of the viral cycle<sup>16,61–63</sup>. Recently, Chase and collaborators demonstrated that IAV gain privileged access to the host nuclear Crm1 export machinery by targeting vRNP complexes to the sites of Ran regeneration within dense



**Figure 5.** Nucleolin is required for the association of vRNPs with the host chromatin during infection **(A)** A549 cells were infected with H3N2 virus for 24 h (MOI 1) or mock-infected. Fractionated lysates were analyzed by western blot for detection of nucleolin, NP, NEP, and subcellular markers  $\beta$ -tubulin, HMGB1 and histone H3. **(B)** A549 cells were transfected with either si-Nucleolin or si-Control. Two days after transfection, cells were infected with H3N2 for 24 hours (MOI 1). Cells were subfractionated and lysates were analyzed by western blot. H3 and  $\beta$ -tubulin were detected as loading and fractionation control. wh.: Whole fraction; cytoplasm: cytoplasmic fraction; nucleoplasm: nucleoplasmic fraction; ch150: low salt chromatin fraction; ch500: high salt chromatin fraction.

chromatin<sup>13</sup>. Taking into account our above results together with the functional role of histone chaperone played by nucleolin via its association with chromatin<sup>64</sup>, we examined the contribution of nucleolin towards the observed close association between vRNPs and the dense chromatin compartment.

For this purpose, we performed subnuclear fractionation of A549 cells either mock-infected or infected with H3N2 (Fig. 5A). From the initial whole fraction (Whole, lanes 1–2), we harvested cytoplasmic (Cytoplasm, lanes 3–4), soluble nucleoplasmic (Nucleoplasm, lanes 5–6), and the functionally distinct low-salt chromatin (ch150, lanes 7–8) and high-salt chromatin (ch500, lanes 9–10) fractions, according to the protocol described by Chase and collaborators<sup>13,65</sup>. We used western blot detection of NP as a marker of vRNP and different subcellular markers, such as  $\beta$ -tubulin (cytoplasm), histone H3 (chromatin), to confirm the successfulness of fractionation (Fig. 5). In accordance with Chase *et al.*<sup>13,65</sup>, NP was detected in all cellular fractions, including the ch150 and ch500 fractions at 24 hpi (Fig. 5A, lanes 2, 4, 6, 8 and 10). Interestingly, nucleolin was shared between nucleoplasmic and ch500 fractions in mock-infected cells, whereas at 24 hpi, it had slightly accumulated in the ch500 fraction (Fig. 5A, compare lane 10 *versus* 9). Thus, these results suggest that nucleolin relocates to regions of high chromatin density where vRNP export complexes accumulate during infection.

To further support these results, we assessed the association of vRNP components with chromatin under conditions of endogenous nucleolin depletion during infection (Fig. 5B). Again, we infected A549 cells, previously transfected for 48 hours with si-Control or si-Nucleolin, with H3N2 virus. At 24 hpi we performed subnuclear fractionations to detect NP, nucleolin and subcellular markers by western blot, as described above. In the si-Control condition, NP localized in the cytoplasmic, nucleoplasmic and chromatin fractions (Fig. 5B, lanes 1, 3, 5, 7 and 9) and control subcellular markers were detected as expected, whereas nucleolin mainly accumulated in ch500 fraction (Fig. 5B, lane 9). In contrast, effective silencing of nucleolin led to a decrease in the level of NP found in Ch150 fraction a more pronounced decreased in Ch500 fraction at 24 hpi (Fig. 5B, compare lane 8 *versus* 7 and lane 10 *versus* 9), in agreement with the hypothesis of an alteration in the vRNP targeting to chromatin.

Altogether, these results indicate that nucleolin strongly accumulates in regions of high chromatin density during IAV infection and is required for an efficient association of vRNPs with this chromatin compartment during their nuclear trafficking.

## Discussion

Influenza A are nuclear replicating viruses which have direct access to and thus hijack host nuclear machineries in order to achieve optimal infection<sup>3</sup>. In this context, several studies including ours have described the extensive modifications of nuclear ultrastructure and composition<sup>7,5,30</sup> with marked nucleolar and chromatin alterations in IAV infected cells<sup>17,18,20</sup>. In accordance with these observations, we report in this study the differential delocalization through the nucleus of the three major nucleolar components, nucleolin, B23 and fibrillarin during the time-course of IAV infection. Interestingly, the earlier and specific redistribution of nucleolin was of interest and in particular its dynamic colocalization with NP at the vicinity of the inner nuclear membrane, where vRNPs accumulate before their nuclear export<sup>13,16,58</sup>. Consequently, we then investigated the putative connection between nucleolin and vRNP traffic, notably in regard to a previous study that identified nucleolin as a possible interaction partner of reconstituted IAV vRNPs, without further exploring the functional significance of this interaction<sup>7</sup>. Interestingly, some functional interactions have been described in other viral models, such as feline calicivirus (FCV) and Norwalk virus (NV), in which infections also result in a relocalization of nucleolin from nucleoli to nucleoplasm and the perinuclear area. In this context, nucleolin was shown to act as a positive regulator of viral replication by forming RNP complexes with viral RNA and interacting with the viral NS6/7 proteins<sup>54</sup>.

In this way, our results obtained in GST-pull down and immunoprecipitation assays indicate that endogenous nucleolin interacts with NP and suggest a possible association with vRNP complexes in the context of IAV infection. This hypothesis is supported by several results obtained in conditions of infection such as (i) the relocalization of endogenous Nucleolin in subnuclear compartments in which vRNPs components NP (Fig. 2) and PB1 (Supplementary Figure 2C) are also accumulated, (ii) the detection of vRNA within immunoprecipitated Nucleolin-NP complex (Fig. 3C), and (iii) the silencing of endogenous nucleolin expression that led to an altered nuclear trafficking of vRNPs and a consecutive significant delay in viral production (Fig. 4).

An interesting way to explore should be the role of RNA in the interaction between two RNA binding proteins such as NP and nucleolin. Possibly, the flexibility of NP structure in promoting RNA binding which likely involves conformational change(s) of NP, as previously suggested<sup>66</sup>, would consecutively impact on its interactions with cellular factors.

Altogether, our results play in favor of a possible model in which nucleolin is involved in the nucleocytoplasmic export of vRNPs during IAV infection, even if we cannot exclude concomitant impact on other steps of viral replication (e.g. viral transcription, viral mRNA translation) due to the multifunctional properties of the host nucleolin.

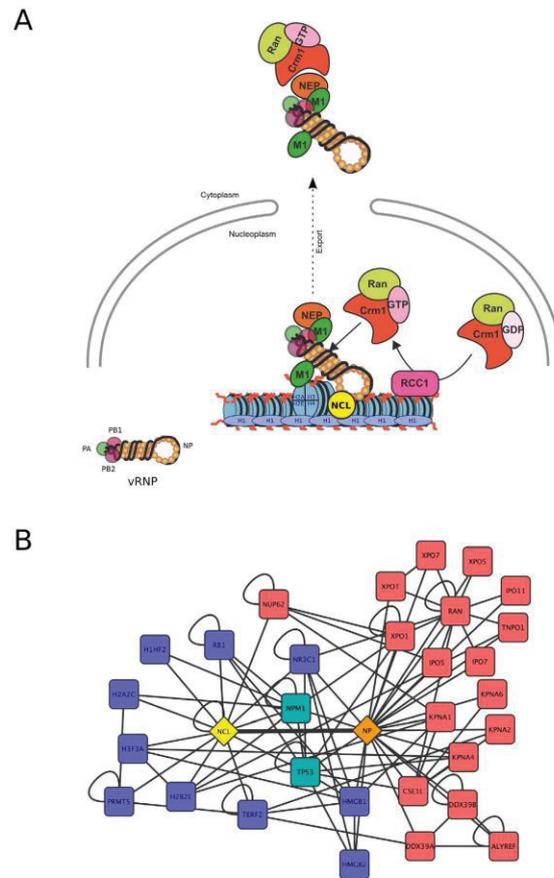
Data from several other studies converge on a model for vRNP traffic illustrated by a vRNP nuclear export complex consisting of as a daisy chain of proteins and involving dynamic and intricate interactions between vRNP, viral and host factors<sup>52,67,68,69</sup>. Previous *in vitro* experiments demonstrated that both vRNPs and M1 interact with the chromatin components at two different sites, RNP to the histone tails and M1 to the globular domain of a histone octamer<sup>52,70</sup>, whereas NEP acts as an adapter and interacts with the host Crm1 export machinery<sup>66</sup>.

However, several questions remain unanswered, notably what really happens in the nucleus during IAV infection, what are the exact modifications of nuclear architecture and notably how does chromatin remodeling contribute towards vRNP trafficking? Chase and collaborators proposed that association between vRNPs and export machinery occurs in dense chromatin domains, where RCC1 exchanges GDP for GTP to produce export energy. They suggested that IAV gain preferential access to host nuclear export machinery by targeting vRNP export complexes to chromatin-dense territories which confer a physical proximity to the sites of Ran regeneration<sup>13</sup>. Our results support the model proposed by Chase and collaborators and also suggest the requirement of nucleolin in the close association between vRNPs and the host chromatin (Fig. 6A). Indeed, by subnuclear fractionation, we observed a strong accumulation of nucleolin within the condensed chromatin domain (ch500 fraction), which is targeted by vRNPs at 24 hpi. Moreover, depletion of endogenous nucleolin induced a decrease in accumulation of NP, a component of vRNP trafficking through the condensed chromatin fractions.

Our hypothesis relies on the chromatin remodeling and histone chaperone activities of the nucleolin<sup>34,64,71</sup>. Indeed, nucleolin is known to induce chromatin de-condensation by binding to histone H1<sup>72</sup> and thus has a function analogous to the family of high-mobility-group (HMG) proteins. In this context, the nucleolin-H1 interaction could cooperate to reorganize cellular chromatin in order to facilitate its efficient targeting by vRNPs. By interacting with NP, the main component of vRNPs, nucleolin would thus constitute a key mediator in the vRNP nuclear export (Fig. 6A). Alternatively and in regards to RNase sensitivity assay, nucleolin most probably also interacts with non-vRNP form of NP during infection, which could incidentally have an impact on several other steps of viral cycle, as well, including vRNP assembly and/or trafficking.

Analysis of enriched gene ontology terms corresponding to the interactants of NP and nucleolin provided molecular support to the pivotal role of NP-nucleolin association in linking chromatin organization and nucleo-cytoplasmic transport biological processes (Fig. 6B). Indeed, a significant proportion of nucleolin interactants are involved in chromatin organization, such as components of nucleosome (e.g.: H2A2C, H3F3A; Blue Squares, Benjamini P-value =  $4.3 \times 10^{-2}$ ) or chromatin associated factors such as HMGB1 or HMGB2. Alternatively, NP interactants are strongly enriched in nucleo-cytoplasmic transport proteins, such as RAN or KPNA1, and protein complexes associated with the nuclear envelope such as Nup62 (Red squares, Benjamini P-value =  $1.7 \times 10^{-2}$ ) (Fig. 6B). Interestingly, at the interface of chromatin organization and nucleo-cytoplasmic transport processes, and in addition to p53 (TP53) which we have previously shown to be involved in multiple levels of IAV-host interactions<sup>73,74</sup>, B23 (NPM1) represents another common interactant of NP and nucleolin as well as interacting with vRNP<sup>7,28</sup>.

Further studies are required to elucidate the mechanism through which nucleolin contributes to IAV vRNP trafficking and to identify other host factors involved in chromatin remodeling and post-translational modifications of histones in the context of IAV infection. Another important consideration is the constant shuttling of nucleolin between subcellular compartments which may reflect a dependence of nucleolin on post-translational



**Figure 6. Model for the nucleolin contribution in the vRNPs export at the crossroads between chromatin organization and nucleocytoplasmic transport.** (A) Influenza viruses gain preferential access to host cell export machinery by targeting chromatin at the sites of Ran regeneration, as proposed by Chase *et al.*<sup>13</sup>. As a chromatin remodeler and an interaction partner of histone H1, nucleolin should contribute to the chromatin targeting of vRNPs. (B) The interaction between nucleolin (NCL, yellow diamond) and NP (orange diamond) is placed on the center of the graph (thick edge). Proteins interacting with nucleolin or NP and involved in chromatin organization are in blue squares. Proteins interacting with nucleolin or NP and involved in nucleocytoplasmic transport are in red squares. NPM1 (B23) and TP53 involved in both processes are in green squares.

modifications that determine its localization<sup>36</sup>. Therefore, the possibility that the phosphorylation and methylation of nucleolin, which influence its interaction with nucleic acids or ADP-ribosylation<sup>40</sup>, also contribute to its nuclear redistribution during IAV infection, remains to be elucidated/investigated.

Beyond the role of nucleolin in IAV vRNP trafficking, its binding to NP could also contribute to viral transcription/replication in accordance with previous observations of nucleolin's impact on IAV polymerase activity<sup>31–33</sup>. This further hypothesis is consistent with the facts that (i) IAV transcription is dependent on the cellular transcription machinery<sup>61</sup> and (ii) vRNP binds nucleosomes<sup>62</sup> and chromatin-associated factors<sup>7</sup>. Similarly to HMGB1<sup>75</sup>, putative nucleolin binding to NP/vRNA complexes could facilitate the recruitment of vRNPs at transcriptionally active sites of chromatin and also contribute in this way to efficient IAV replication.

Additionally, the NP-nucleolin association could also restrict nucleolar functions of nucleolin (ribosome biogenesis, ribosome transport) and thereby contribute to the strong remodeling of nucleolar compartment observed during IAV infection<sup>17,18,20</sup>. Concomitantly, by directly binding to nucleolin in the nucleolus<sup>28,29</sup>, NS1 may contribute towards nucleolar disruption resulting in the subsequent redistribution and availability of nucleolin for vRNP trafficking and viral replication. However, further studies are needed to investigate the specific sequence of events occurring in such a viral hijacking of nucleolin. An interesting approach could be to further investigate the histone mimic of NS1 which was recently reported to be able to recruit several host chromatin-associated proteins<sup>76</sup>.

In conclusion, our results highlight nucleolin as an essential host actor for the chromatin targeting of the nucleocytoplasmic export complex of vRNPs during infection. An interesting avenue to explore would now be the potential of targeting host nucleolin, as already proposed in cancer therapy<sup>77</sup>, and more broadly chromatin and host-associated factors, in identifying novel anti-influenza treatments.

## Methods

**Viruses and cells.** IAV strain A/Moscow/10/99 (H3N2), was obtained from the French national influenza monitoring network GROG (Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe, Lyon, France). Virus was cultivated and titered in MDCK cells and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ , as previously described<sup>60</sup>. MDCK cells were purchased from Lonza (ATCC, CCL34) and were passaged twice weekly in serum-free Ultra-MDCK medium (Lonza) supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich), penicillin (225 units/ml) and streptomycin (225  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Lonza). Human lung epithelial cells (A549) were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza, Biowhittaker) supplemented with 200 units/ml penicillin, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin, 2 mM L-glutamine and 10% fetal calf serum (Dutscher). All cells were maintained at  $37^{\circ}\text{C}$  with 5%  $\text{CO}_2$ . For infection, viruses were inoculated at a multiplicity of infection (MOI) of 1 for 1 hpi to 24 hpi, in DMEM supplemented with 200 units/ml penicillin, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin, 2 mM L-glutamine and 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  TPCK-trypsin (Roche diagnostics), as previously described<sup>17</sup>. For viral kinetics on A549 cells, confluent cells were infected with viruses at a MOI of 2 for one hour under a minimal volume of medium at  $37^{\circ}\text{C}$ . Cells were then overlaid with fresh medium and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$ . Samples of supernatants were harvested at several time points post-infection and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until end point viral titration assays in MDCK cells using the Reed and Muench statistical method (TCID<sub>50</sub>/mL), as previously described<sup>78</sup>.

**Fluorescence immunostaining.** A549 cells grown on Lab-Tek II chamber slides (ThermoScientific) were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min. After washing in PBS, cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS (PBS-T) for 15 min. Mouse monoclonal anti-nucleoprotein (17C2, VirPath laboratory)<sup>79</sup>, mouse monoclonal anti-nucleoprotein clone 3/1 (MAb 3/1, kind gift from R. Webster), anti-B23 (Sigma), rabbit polyclonal anti-nucleolin (#134, kindly provided by P. Bouvet) and anti-fibrillarin (Abcam, Ab5821) antibodies were used as primary antibodies in PBS-T. After incubation for 1 h, the cells were washed in PBS-T and then incubated with goat anti-mouse coupled to AlexaFluor 633 and/or goat anti-rabbit coupled to AlexaFluor 488 (Molecular Probes, Invitrogen) for 30 min, at concentrations recommended by the suppliers. Nuclei were counterstained with DNA-binding fluorochrome 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen). After staining, the coverslips were mounted with Fluoromount G (Cliniscience) and analyzed using a confocal laser scanning microscope (Leica). Each observation was performed on at least 20 individual cells from 5 different large fields of view. For all observations, each representative pattern was reported.

**Light microscopy observations.** The Confocal Microscope Laser Scanning allows an optical section image acquisition in two dimensions X and Y. For 3D reconstruction of a stack of images, with a motorized stage, a minimum of twenty optical sections were acquired with the confocal microscope described above with a  $0.1\ \mu\text{m}$  z-step. JAcOP plugin for imageJ<sup>80</sup> was used to highlight the colocalization of both stainings by thresholding the signal above the background. The confocal image stacks were treated by three-dimensional visualization software: Amira version 3.1 (Mercury Inc). To create three-dimensional animations and pictures, two methods were applied. Isosurface generated a geometric surface representing points of constant value as a limit between shadow and brightness of a staining. This limit was defined through an adjusted threshold. This representation was used to define the limit of the nucleus staining (DAPI). Volume rendering visualization technique was used to simulate the casting of light rays through the volume and give a 3D impression of the stained structure.

**GST pull-down assay.** A/Moscow/10/99 (H3N2) NP and A/WSN/33 (H1N1) NS1, NEP open reading frames were transferred into pDEST27 plasmid (GST fusion in N-term, Invitrogen). 293T cells were transfected (JetPei, Polyplus) by these vectors (control: GST alone). Two days after transfection, cells were harvested and lysed with lysis buffer (0.5% NP-40, 20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 180 mM NaCl, 1 mM EDTA, and complete protease inhibitor cocktail [Roche]) for 20 min on ice. Whole cell lysates were cleared by centrifugation for 20 min at 13,000 rpm at  $4^{\circ}\text{C}$  and soluble protein complexes were purified using glutathione sepharose 4B beads (Amersham), according the manufacturer's instructions. Beads were then washed extensively four times with lysis buffer, and pull-down proteins displayed on NuPAGE acrylamide gels before being transferred to nitrocellulose membrane. GST-tagged viral protein and endogenous nucleolin were detected using standard immunoblotting techniques with mouse anti-GST (Covance, 1:1000) and rabbit anti-nucleolin (1:1000) antibodies. All results were reproduced in at least three independent experiments.

**Immunoprecipitation.**  $1 \times 10^6$  cells were harvested 8 or 24 h after infection with the human virus A/Moscow/10/99 (H3N2). Then, cell pellets were lysed at  $4^{\circ}\text{C}$  for 30 min in 500  $\mu\text{L}$  of RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.2, 0.1% Triton X-100, 0.1% CHAPS) that contained a cocktail of protease inhibitors (cOmplete<sup>®</sup>, ROCHE) and was supplemented with 150 mM NaCl. Cell extracts were centrifuged at 13000 rpm for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Inputs correspond to 10% of supernatants (50  $\mu\text{L}/500\ \mu\text{L}$ ). Supernatants were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  in the presence of anti-nucleolin antibody. Immuno-complexes were immobilized for 30 min on protein A/G agarose beads (Santa-Cruz, sc-2003). Bound complexes were then washed 3 times in RIPA buffer supplemented with 150 mM NaCl<sup>43</sup>. Then, for protein analysis, bound complexes were eluted with NuPAGE LDS sample buffer (Invitrogen, NP0008) and boiled for 5 min. Proteins were then separated on a 10% polyacrylamide/SDS gel. For viral RNA analysis, RNAs were extracted and then quantified by RT-qPCR<sup>60</sup>.

**Western blot analysis.** The level of expression of viral or cellular proteins was assessed by western blotting. Proteins were extracted by scraping and syringing cells in 1X NuPAGE LDS buffer (Invitrogen). Ten to thirty micrograms of protein extract was separated on 10% SDS gel and then transferred to nitrocellulose membrane with a Transblot Turbo system (BioRad). The membrane was blocked by incubation 30 min in 5% non-fat dried milk in TBS-0.1% Tween buffer (TBS-T) at room temperature. The membrane was then incubated 1 hour in 1% non-fat dried TBS-T with monoclonal mouse anti-NP (CDC/IVPS, 30AUG01), goat polyclonal anti-PB1 (SantaCruz, sc-17601), rabbit polyclonal anti-NEP (kind gift from Thorsten Wolff, Robert Koch-Institute, Berlin, Germany), rabbit polyclonal anti-H3 (AbCam, ab1791), rabbit polyclonal anti-nucleolin (SantaCruz, sc-13057), mouse monoclonal anti-nucleolin (SantaCruz, sc-8031). Rabbit polyclonal anti- $\beta$ -tubulin (Epitomics, 1862-1) or anti-histone H3 (SantaCruz, sc8653) were used as controls. After 3 washes in TBS-T at room temperature, membranes were incubated with the appropriate secondary antibody, goat anti-mouse coupled to HRP (GE Healthcare, NXA931), goat anti-rabbit coupled to HRP (GE Healthcare, NA934) or donkey anti-goat coupled to HRP (SouthernBiotech, 6420-05), at room temperature during 30 min.

**Cell fractionation.** For nucleo-cytoplasmic fractionation,  $6 \times 10^5$  cells were scraped into 1 mL of ice-cold PBS. After one wash in PBS, cells were fractionated with PBS, 0.1% NP-40 and protease inhibitor. One-tenth of the suspension was kept aside as whole cell lysate. After centrifugation, the supernatant was kept for the cytoplasmic fraction. The nuclei pellets were washed with PBS, and then nuclei lysed in LDS 1X (Method adapted from<sup>81</sup>). The protocol used for cytoplasm/nucleoplasm/chromatin150/chromatin500 fractionation, has already been described<sup>13,65</sup>. Briefly,  $1.5 \times 10^7$  A549 cells were washed and pelleted in PBS. The cell pellet was resuspended in 5 ml sucrose buffer (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 2 mM Mg acetate, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 340 mM sucrose, 1 mM DTT and protease inhibitor), and cells were incubated 10 min on ice. NP-40 was then added to a final concentration of 0.5%, followed by vortexing for 20 sec. Lysate was triturated 6 times and vortexed for 20 sec. One-tenth of the suspension was removed for the whole extract. After centrifugation for 10 min at 4 °C at 4,500g, supernatant was saved as the cytoplasmic fraction, and the nuclear pellet was washed once with 2.5 ml sucrose buffer. The nuclear pellet was then resuspended in 750  $\mu$ L of nucleoplasm extraction buffer (50 mM HEPES pH 7.9, 150 mM potassium acetate, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NP-40, 1 mM DTT and protease inhibitor), transferred to an all-glass 1 ml Dounce homogenizer, and homogenized with 60 strokes. Homogenate was then incubated 20 min at 4 °C on a rotating wheel, followed by a second homogenization with 70 strokes of Dounce, followed by a centrifugation for 10 min at 4 °C at 14,000 rpm in a microcentrifuge. The supernatant was saved as the nucleoplasmic fraction, and the pellet was resuspended in 750  $\mu$ L nucleic acid incubation buffer (50 mM HEPES pH 7.9, 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT and protease inhibitor) containing 100 U/ml Benzonase nuclease (Novagen). Chromatin was digested for 10 min at 37 °C, followed by addition of NaCl to 150 mM and further incubation for 20 min on ice. Digested lysate was then centrifuged 10 min at 4 °C at 14,000 rpm, and supernatant was saved as the low-salt chromatin fraction. The pellet was resuspended in 750  $\mu$ L chromatin extraction buffer (50 mM HEPES pH 7.9, 500 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, 1 mM DTT and protease inhibitor) and incubated 20 min on ice, followed by centrifugation as above. The supernatant was saved as the high-salt chromatin fraction<sup>13</sup>.

**Real-time quantitative RT-PCR.** Viral RNA was extracted from the supernatant of infected MDCK cell cultures using the QIAmp viral RNA minikit (Qiagen), according manufacturer's instructions. On Cellular viral RNAs were extracted using Trizol reagent method (Josset *et al.*, 2008). The real-time PCR was developed to detect and quantify the number of genome copies from all subtypes of influenza type A viruses, as previously described<sup>60</sup>. Primers and TaqMan probe (5'FAM/3'BHQ) were designed in a highly conserved sequence of viral M gene<sup>82</sup>. The quantification standard was pHW2000 plasmid containing influenza A/Moscow/10/99 H3N2 M1 gene. Amplification was performed in an ABI Prism 7500 system (Applied Biosystems) using the Superscript III/Platinum Taq One-step qRT-PCR kit (Invitrogen). The 50  $\mu$ L reaction mixture contained 5  $\mu$ L extracted RNA or standard plasmid, 25  $\mu$ L Superscript III/Platinum Taq One-step qRT-PCR reaction mix, 1  $\mu$ L Superscript III/Platinum Taq One-step qRT-PCR enzyme mix, 0.1  $\mu$ L ROX reference dye as a passive reference, 200 nmol Taqman probe, and 800 nmol of each primer. The following thermal profile was used: an initial reverse transcription at 50 °C for 15 min, followed by reverse transcriptase inactivation and DNA polymerase activation at 95 °C for 2 min and 40 cycles of amplification (15 s at 95 °C and 30 s at 60 °C). The reporter dye (FAM) signal was measured against the internal reference dye (ROX) signal to normalize the signals for non-PCR-related fluorescence fluctuations that occur from well to well. Data were collected at the annealing step of each cycle and the threshold cycle (CT) for each sample was calculated by determining the point at which the fluorescence exceeded the threshold limit.

**siRNA transfection.** A pool of ON-TARGETplus SMARTpool siRNA duplexes specific for human nucleolin (si C23), siRNA J-003854-05: 5'-GCAAAGAAGGUGGUCGUU-3', siRNA J-003854-06: 5'-GAUAGUUCUGACCGGGAA-3', siRNA J-003854-07: 5'-CAAUCUGCUCUGAAUUA-3', siRNA J-003854-08: 5'-GAAAGAAGAUGAAGUUUGA-3' (from Dharmacon, ThermoFisher Scientific) were used to silence endogenous nucleolin expression, as previously shown<sup>83</sup>. Transfection was performed using Oligofectamine (Invitrogen), as previously described<sup>60</sup>. Two rounds of siRNA transfection were performed - with a 24 h interval - to achieve a sufficient level of nucleolin silencing. Twelve hours after the second transfection, cells were subjected to H3N2 infection at the indicated MOIs and incubated for different time periods.

**Functional analysis, network reconstruction and representation.** DAVID database was used for functional annotation<sup>84</sup>. DAVID functional annotation chart tool was used to perform Gene Ontology biological process analysis. Gene Ontology terms with a Benjamini-Hochberg corrected p-value smaller than 5.10<sup>-2</sup> were considered as significantly overrepresented. NP-human protein-protein interactions were retrieved from the VirHostNet database<sup>85</sup>. Human protein interactions were retrieved from iREF<sup>86</sup>. Network is visualized with Cytoscape<sup>87</sup>.

## References

- Palese, P. & Shaw, M. In *Fields Virology* 1647–1689 (Knipe Dm, Howley Pm, Griffin Dm, Lamb Ra, Martin Ma, 2007).
- Dubois, J., Terrier, O. & Rosa-Calatrava, M. Influenza Viruses and mRNA Splicing: Doing More with Less. *mBio*. 5, e00070–14 (2014).
- Josset, L., Frobert, E. & Rosa-Calatrava, M. Influenza A replication and host nuclear compartments: many changes and many questions. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 43, 381–390 (2008).
- Neumann, G., Brownlee, G. G., Fodor, E. & Kawaoka, Y. Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 283, 121–143 (2004).
- Emmott, E. *et al.* Quantitative proteomics using SILAC coupled to LC-MS/MS reveals changes in the nucleolar proteome in influenza A virus-infected cells. *J. Proteome Res.* 9, 5335–5345 (2010).
- Jorba, N. *et al.* Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors. *Proteomics* 8, 2077–2088 (2008).
- Mayer, D. *et al.* Identification of cellular interaction partners of the influenza virus ribonucleoprotein complex and polymerase complex using proteomic-based approaches. *J. Proteome Res.* 6, 672–682 (2007).
- Nagata, K., Kawaguchi, A. & Naito, T. Host factors for replication and transcription of the influenza virus genome. *Rev. Med. Virol.* 18, 247–260 (2008).
- Shaw, M. L. The host interactome of influenza virus presents new potential targets for antiviral drugs. *Rev. Med. Virol.* 21, 358–369 (2011).
- Cros, J. F. & Palese, P. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Bornavirus. *Virus Res.* 95, 3–12 (2003).
- Akarsu, H. *et al.* Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *EMBO J.* 22, 4646–4655 (2003).
- Elton, D. *et al.* Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J. Virol.* 75, 408–419 (2001).
- Chase, G. P. *et al.* Influenza virus ribonucleoprotein complexes gain preferential access to cellular export machinery through chromatin targeting. *PLoS Pathog.* 7, e1002187 (2011).
- Amorim, M. J. & Digard, P. Influenza A virus and the cell nucleus. *Vaccine* 24, 6651–6655 (2006).
- Fortes, P., Lamond, A. I. & Ortin, J. Influenza virus NS1 protein alters the subnuclear localization of cellular splicing components. *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 4), 1001–1007 (1995).
- Takizawa, N., Watanabe, K., Nouno, K., Kobayashi, N. & Nagata, K. Association of functional influenza viral proteins and RNAs with nuclear chromatin and sub-chromatin structure. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 8, 823–833 (2006).
- Terrier, O. *et al.* The influenza fingerprints: NS1 and M1 proteins contribute to specific host cell ultrastructure signatures upon infection by different influenza A viruses. *Virology* 432, 204–218 (2012).
- Anisimova, E., Ghendon, Y. & Markushin, S. Ultrastructural changes in cells induced by temperature-sensitive mutants of fowl plague virus at permissive and non-permissive temperature. *J. Gen. Virol.* 47, 11–18 (1980).
- Compans, R. W. & Dimmock, N. J. An electron microscopic study of single-cycle infection of chick embryo fibroblasts by influenza virus. *Virology* 39, 499–515 (1969).
- Terrier, O. *et al.* Ultrastructural fingerprints of avian influenza A (H7N9) virus in infected human lung cells. *Virology* 456–457, 39–42 (2014).
- Boulon, S., Westman, B. J., Hutten, S., Boisvert, F.-M. & Lamond, A. I. The nucleolus under stress. *Mol. Cell* 40, 216–227 (2010).
- Couté, Y. *et al.* Deciphering the human nucleolar proteome. *Mass Spectrom. Rev.* 25, 215–234 (2006).
- Olson, M. O. J. Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus? *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2004, pe10 (2004).
- Hiscox, J. A. RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 119–127 (2007).
- Hiscox, J. A. The nucleolus—a gateway to viral infection? *Arch. Virol.* 147, 1077–1089 (2002).
- Rawlinson, S. M. & Moseley, G. W. The nucleolar interface of RNA viruses. *Cell. Microbiol.* 17, 1108–1120 (2015).
- Ozawa, M. *et al.* Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication. *J. Virol.* 81, 30–41 (2007).
- Melén, K. *et al.* Influenza A H3N2 subtype virus NS1 protein targets into the nucleus and binds primarily via its C-terminal NLS2/NoLS to nucleolin and fibrillarin. *Virology* 432, 167 (2012).
- Murayama, R. *et al.* Influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) interacts with cellular multifunctional protein nucleolin during infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 880–885 (2007).
- Dove, B. K. *et al.* A quantitative proteomic analysis of lung epithelial (A549) cells infected with 2009 pandemic influenza A virus using stable isotope labelling with amino acids in cell culture. *Proteomics* 12, 1431–1436 (2012).
- Karlas, A. *et al.* Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* 463, 818–822 (2010).
- König, R. *et al.* Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* 463, 813–817 (2010).
- Bortz, E. *et al.* Host- and strain-specific regulation of influenza virus polymerase activity by interacting cellular proteins. *mBio*. 2, (2011).
- Mongelard, F. & Bouvet, P. Nucleolin: a multiFACeTed protein. *Trends Cell Biol.* 17, 80–86 (2007).
- Tajrishi, M. M., Tuteja, R. & Tuteja, N. Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Commun. Integr. Biol.* 4, 267–275 (2011).
- Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B. & Bouvet, P. Structure and functions of nucleolin. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 6), 761–772 (1999).
- Ugrinova, I. *et al.* Inactivation of nucleolin leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication. *BMC Mol. Biol.* 8, 66 (2007).
- Borer, R. A., Lehner, C. E., Eppenberger, H. M. & Nigg, E. A. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56, 379–390 (1989).
- Hovanessian, A. G. *et al.* The cell-surface-expressed nucleolin is associated with the actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* 261, 312–328 (2000).
- Abdelmohsen, K. & Gorospe, M. RNA-binding protein nucleolin in disease. *RNA Biol.* 9, 799–808 (2012).
- Waggoner, S. & Sarnow, P. Viral ribonucleoprotein complex formation and nucleolar-cytoplasmic relocalization of nucleolin in poliovirus-infected cells. *J. Virol.* 72, 6699–6709 (1998).
- Matthews, D. A. Adenovirus protein V induces redistribution of nucleolin and B23 from nucleolus to cytoplasm. *J. Virol.* 75, 1031–1038 (2001).
- Greco, A. *et al.* Nucleolin interacts with US11 protein of herpes simplex virus 1 and is involved in its trafficking. *J. Virol.* 86, 1449–1457 (2012).
- Sagou, K., Uema, M. & Kawaguchi, Y. Nucleolin is required for efficient nuclear egress of herpes simplex virus type 1 nucleocapsids. *J. Virol.* 84, 2110–2121 (2010).
- Strang, B. L., Boulant, S., Kirchhausen, T. & Coen, D. M. Host cell nucleolin is required to maintain the architecture of human cytomegalovirus replication compartments. *mBio*. 3, (2012).

46. Strang, B. L., Boulant, S. & Coen, D. M. Nucleolin associates with the human cytomegalovirus DNA polymerase accessory subunit UL44 and is necessary for efficient viral replication. *J. Virol.* **84**, 1771–1784 (2010).
47. Hirano, M. *et al.* Direct interaction between nucleolin and hepatitis C virus NS5B. *J. Biol. Chem.* **278**, 5109–5115 (2003).
48. Lee, C. H., Chang, S. C., Chen, C. J. & Chang, M. F. The nucleolin binding activity of hepatitis delta antigen is associated with nucleolus targeting. *J. Biol. Chem.* **273**, 7650–7656 (1998).
49. Chen, H., Wurm, T., Britton, P., Brooks, G. & Hiscox, J. A. Interaction of the coronavirus nucleoprotein with nucleolar antigens and the host cell. *J. Virol.* **76**, 5233–5250 (2002).
50. Bose, S., Basu, M. & Banerjee, A. K. Role of nucleolin in human parainfluenza virus type 3 infection of human lung epithelial cells. *J. Virol.* **78**, 8146–8158 (2004).
51. Sato, H. *et al.* Identification of nucleolin as a protein that binds to human papillomavirus type 16 DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **387**, 525–530 (2009).
52. Xiao, X., Feng, Y., Zhu, Z. & Dimitrov, D. S. Identification of a putative Crimean–Congo hemorrhagic fever virus entry factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **411**, 253–258 (2011).
53. Lin, M.-H. *et al.* Nullbasic, a potent anti-HIV tat mutant, induces CRM1-dependent disruption of HIV rev trafficking. *PLoS One* **7**, e51466 (2012).
54. Cancio-Lonches, C. *et al.* Nucleolin interacts with the feline calicivirus 3' untranslated region and the protease-polymerase NS6 and NS7 proteins, playing a role in virus replication. *J. Virol.* **85**, 8056–8068 (2011).
55. Goić, B. *et al.* The nucleoprotein and the viral RNA of infectious salmon anemia virus (ISAV) are localized in the nucleolus of infected cells. *Virology* **379**, 55–63 (2008).
56. Naffakh, N., Tomoiu, A., Rameix-Welti, M.-A. & van der Werf, S. Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **62**, 403–424 (2008).
57. Carrasco, M., Amorim, M. J. & Digard, P. Lipid raft-dependent targeting of the influenza A virus nucleoprotein to the apical plasma membrane. *Traffic Cph. Den.* **5**, 979–992 (2004).
58. Elton, D., Amorim, M. J., Medcalf, L. & Digard, P. 'Genome gating': polarized intranuclear trafficking of influenza virus RNPs. *Biol. Lett.* **1**, 113–117 (2005).
59. Eisfeld, A. J., Kawakami, E., Watanabe, T., Neumann, G. & Kawaoka, Y. RAB11A is essential for transport of the influenza virus genome to the plasma membrane. *J. Virol.* **85**, 6117–6126 (2011).
60. Terrier, O. *et al.* Influenza A viruses control expression of proviral human p53 isoforms p53 $\beta$  and Delta133p53 $\alpha$ . *J. Virol.* **86**, 8452–8460 (2012).
61. Engelhardt, O. G., Smith, M. & Fodor, E. Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J. Virol.* **79**, 5812–5818 (2005).
62. Garcia-Robles, L., Akarsu, H., Müller, C. W., Ruigrok, R. W. H. & Baudin, F. Interaction of influenza virus proteins with nucleosomes. *Virology* **332**, 329–336 (2005).
63. Loucaides, E. M. *et al.* Nuclear dynamics of influenza A virus ribonucleoproteins revealed by live-cell imaging studies. *Virology* **394**, 154–163 (2009).
64. Storck, S., Shukla, M., Dimitrov, S. & Bouvet, P. Functions of the histone chaperone nucleolin in diseases. *Subcell. Biochem.* **41**, 125–144 (2007).
65. Chase, G. P. & Schwemmle, M. Affinity purification of influenza virus ribonucleoprotein complexes from the chromatin of infected cells. *J. Vis. Exp. JoVE* e4028, doi: 10.3791/4028 (2012).
66. Tarus, B. *et al.* Molecular dynamics studies of the nucleoprotein of influenza A virus: role of the protein flexibility in RNA binding. *PLoS One* **7**, e30038 (2012).
67. Portela, A. & Digard, P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J. Gen. Virol.* **83**, 723–734 (2002).
68. Paterson, D. & Fodor, E. Emerging roles for the influenza A virus nuclear export protein (NEP). *PLoS Pathog.* **8**, e1003019 (2012).
69. Hutchinson, E. C. & Fodor, E. Transport of the influenza virus genome from nucleus to nucleus. *Viruses* **5**, 2424–2446 (2013).
70. Zhirnov, O. P. & Klenk, H. D. Histones as a target for influenza virus matrix protein M1. *Virology* **235**, 302–310 (1997).
71. Angelov, D. *et al.* Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *EMBO J.* **25**, 1669–1679 (2006).
72. Erard, M. S., Belenguer, P., Caizergues-Ferrer, M., Pantaloni, A. & Amalric, F. A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1. *Eur. J. Biochem. FEBS* **175**, 525–530 (1988).
73. Terrier, O. *et al.* Influenza NS1 interacts with p53 and alters its binding to p53-responsive genes, in a promoter-dependent manner. *FEBS Lett.* **587**, 2965–2971 (2013).
74. Terrier, O. *et al.* Cellular transcriptional profiling in human lung epithelial cells infected by different subtypes of influenza A viruses reveals an overall down-regulation of the host p53 pathway. *Viral J.* **8**, 285 (2011).
75. Moisy, D. *et al.* HMGB1 protein binds to influenza virus nucleoprotein and promotes viral replication. *J. Virol.* **86**, 9122–9133 (2012).
76. Marazzi, I. *et al.* Suppression of the antiviral response by an influenza histone mimic. *Nature* **483**, 428–433 (2012).
77. Xu, Z. *et al.* Knocking down nucleolin expression in gliomas inhibits tumor growth and induces cell cycle arrest. *J. Neurooncol.* **108**, 59–67 (2012).
78. Moules, V. *et al.* *In vitro* characterization of naturally occurring influenza H3NA- viruses lacking the NA gene segment: toward a new mechanism of viral resistance? *Virology* **404**, 215–224 (2010).
79. Terrier, O. *et al.* The influenza fingerprints: NS1 and M1 proteins contribute to specific host cell ultrastructure signatures upon infection by different influenza A viruses. *Virology* **432**, 204–218 (2012).
80. Bolte, S. & Cordelières, F. P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* **224**, 213–232 (2006).
81. Suzuki, K., Bose, P., Leong-Quong, R. Y., Fujita, D. J. & Riabowol, K. REAP: A two minute cell fractionation method. *BMC Res. Notes* **3**, 294 (2010).
82. Whiley, D. M. & Sloots, T. P. A 5'-nuclease real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the detection of a broad range of influenza A subtypes, including H5N1. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **53**, 335–337 (2005).
83. Peddigari, S., Li, P. W.-L., Rabe, J. L. & Martin, S. L. hnRNPL and nucleolin bind LINE-1 RNA and function as host factors to modulate retrotransposition. *Nucleic Acids Res.* **41**, 575–585 (2013).
84. Dennis, G. Jr *et al.* DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* **4**, P3 (2003).
85. Navratil, V. *et al.* VirHostNet: a knowledge base for the management and the analysis of proteome-wide virus-host interaction networks. *Nucleic Acids Res.* **37**, D661–668 (2009).
86. Turner, B. *et al.* iRefWeb: interactive analysis of consolidated protein interaction data and their supporting evidence. *Database J. Biol. Databases Curation* **2010**, baq023 (2010).
87. Shannon, P. *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **13**, 2498–2504 (2003).

### Acknowledgements

The authors would like to thank Philippe Bouvet (ENS, Lyon, France), Thorsten Wolff (Robert Koch-Institute, Germany), Yoshihiro Kawaoka (University of Wisconsin, USA) and Robert Webster (St Jude Children's Research Hospital, USA) for their help in providing useful advices, tools and reagents.

### Author Contributions

O.T., C.C., B.D.C., J.D., A.T., T.J., G.C., A.P., S.H., D.R., V.M. and M.R.-C. carried out the experiments and analysis of the results. V.L., B.L., J.-J.D. and V.M. participated to the conception and coordination of the study. O.T. and M.R.-C. designed the study and wrote the manuscript.

### Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**How to cite this article:** Terrier, O. *et al.* Nucleolin interacts with influenza A nucleoprotein and contributes to viral ribonucleoprotein complexes nuclear trafficking and efficient influenza viral replication. *Sci. Rep.* **6**, 29006; doi: 10.1038/srep29006 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Article 5

**«Influenza A viruses alter the stability and antiviral contribution of host E3-ubiquitin ligase Mdm2 during the time-course of infection »** dont les auteurs sont Andrés Pizzorno, Julia Dubois, Daniela Bandeira, Gaëlle Cartet, Aurélien Traversier, Thomas Julien, Bruno Lina, Jean-Christophe Bourdon, Manuel Rosa-Calatrava et Olivier Terrier. Cet article a été publié dans le journal international à comité de lecture en langue anglaise *Scientific Reports*. DOI : 10.1038/s41598-018-22139-6.

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Influenza A viruses alter the stability and antiviral contribution of host E3-ubiquitin ligase Mdm2 during the time-course of infection

Andrés Pizzorno<sup>1</sup>, Julia Dubois<sup>1</sup>, Daniela Machado<sup>1,2</sup>, Gaëlle Cartet<sup>1</sup>, Aurelien Traversier<sup>1</sup>, Thomas Julien<sup>1</sup>, Bruno Lina<sup>1,3</sup>, Jean-Christophe Bourdon<sup>1,4</sup>, Manuel Rosa-Calatrava<sup>1</sup> & Olivier Terrier<sup>1</sup>

The interplay between influenza A viruses (IAV) and the p53 pathway has been reported in several studies, highlighting the antiviral contribution of p53. Here, we investigated the impact of IAV on the E3-ubiquitin ligase Mdm2, a major regulator of p53, and observed that IAV targets Mdm2, notably *via* its non-structural protein (NS1), therefore altering Mdm2 stability, p53/Mdm2 interaction and regulatory loop during the time-course of infection. This study also highlights a new antiviral facet of Mdm2 possibly increasing the list of its many p53-independent functions. Altogether, our work contributes to better understand the mechanisms underlining the complex interactions between IAV and the p53 pathway, for which both NS1 and Mdm2 arise as key players.

Influenza viruses are important pathogens responsible for recurrent seasonal epidemics and causing acute febrile respiratory illness<sup>1</sup>. Among the three types of influenza viruses (A, B & C), influenza A viruses (IAV) constitute a serious threat to human populations, with the potential to cause pandemics, as illustrated by the influenza A(H1N1) virus in 2009<sup>1,2</sup>. Influenza viruses rely on numerous host factors and pathways to achieve successful replication. However, despite important progress made throughout the last decade, notably with the contribution of high-throughput ‘omics’ approaches, many mechanisms underlying influenza-host interactions remain elusive<sup>3–6</sup>.

The transcription factor p53 is well-known for its role as a tumour suppressor, by rapidly accumulating in the cell nucleus in response to stress stimuli, hence modifying gene expression to regulate cell fate. Beyond this major function, p53 is also involved in the regulation of a large panel of biological processes<sup>7,8</sup>. Several studies have investigated the interplay between influenza viruses and different signalling pathways, such as the PI3K/Akt or the NF- $\kappa$ B<sup>9,10</sup>. Interestingly, the functional interactions between influenza viruses and p53 have only been reported in a limited number of studies, mainly focused on the antiviral facet of p53<sup>11–14</sup>. We have previously shown that several levels of regulation of p53 transcriptional activity are affected during the time course of IAV infection, possibly enabling a fine-tuning of p53-mediated biological responses in favour of viral replication<sup>14–16</sup>. We have particularly demonstrated that IAV modulate p53 transcriptional activity, notably through the contribution of viral non-structural protein NS1 to the stabilization of p53 in IAV-infected cells<sup>15</sup>.

Mdm2, considered as the main negative regulator of p53, is an RING-finger E3 ubiquitin ligase that binds to p53 to promote its ubiquitination and degradation<sup>17</sup>. Mdm2 and p53 participate in a negative feedback loop wherein p53 activates the transcription of Mdm2, which in turn inactivates p53 by directly associating with it and promoting its ubiquitination and proteasomal degradation<sup>17</sup>. Since p53 is largely regulated at the

<sup>1</sup>Virologie et Pathologie Humaine-VirPath team, Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), INSERM U1111, ENS Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, CNRS UMR5308, France. <sup>2</sup>Laboratoire des Pathogènes Emergents, Fondation Mérieux, CIRI, UCBL1-INSERM U1111, ENS Lyon, CNRS UMR5308, Lyon, France. <sup>3</sup>Laboratoire de Virologie, Centre National de Référence des virus Influenza, Institut des Agents Infectieux, Groupement Hospitalier Nord, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. <sup>4</sup>Division of Cancer Research, University of Dundee, Ninewells Hospital and Medical School, Dundee, United Kingdom. Manuel Rosa-Calatrava and Olivier Terrier jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to O.T. (email: [olivier.terrier@univ-lyon1.fr](mailto:olivier.terrier@univ-lyon1.fr))

post-translational level, the possible alteration of the Mdm2–p53 interaction, decrease of Mdm2 protein levels and/or subcellular delocalisation of Mdm2 have been suggested as the primary mechanisms for stabilization of p53<sup>17</sup>. Nevertheless, only a limited number of studies have investigated the role of Mdm2 in the context of infection by non-oncogenic viruses, such as hantaviruses for example<sup>18</sup>. Although two different genome-wide RNAi studies, both performed in human lung epithelial cells, have highlighted Mdm2 as a crucial factor for IAV infection<sup>5,6</sup>, the role of Mdm2 in IAV infection remains unclear. In that regard, Wang and collaborators have recently shown that the stabilization of p53 in IAV infected cells was associated with a compromised Mdm2-mediated ubiquitination of p53<sup>19</sup>.

The aim of the present study was to further characterise the mechanisms underlying the compromised activity of Mdm2 during IAV infection. Our results indicate that Mdm2 stability is modulated during infection, with a marked degradation at early stages of infection. Different experimental strategies also indicate an antiviral role played by Mdm2, possibly independently of both its E3-ubiquitin ligase activity and p53. Altogether, our results improve our comprehension of the role of Mdm2 during the time course of IAV infection.

## Results

**Mdm2 expression is strongly impacted by IAV infection.** We firstly investigated the impact of IAV infection on endogenous Mdm2 expression, by performing mock or influenza A (H3N2) infections in A549 human lung epithelial cells (Fig. 1). At a multiplicity of infection (MOI) of 0.1, we observed a dramatic decrease of up to 5-fold in Mdm2 endogenous protein levels at 2 h post-infection (hpi), compared to the mock-infected control. Although Mdm2 relative protein levels (RPL) remained below 50% at least for the following 8 h, a more than 1.5-fold increase compared to mock was observed 24 h after infection ( $P < 0.01$ , Fig. 1A). Of note, these results were validated using another anti-Mdm2 monoclonal antibody 2 A10 (Supp. Fig. 1), in order to discard any possible detection bias due to potential interference of IAV-induced post-translational modifications of the epitopes recognised by the SMP14 antibody. Moreover, a similar increase in Mdm2 expression at 24 hpi was observed using increasing MOIs in A549 cells (Fig. 1B). Interestingly, this increase was not correlated with a decrease of endogenous p53, suggesting a possible deregulation of p53/Mdm2 loop at late stages of IAV infection. Analogous experiments performed in H1299 cells, which possess a homozygous partial deletion of *TP53* gene, show a similar increase of Mdm2 protein levels at 24 hpi, hence advocating for a p53-independent nature of this phenomenon (Fig. 1B). The p53-independent impact of IAV infection on Mdm2 expression was further confirmed by performing experimental infections an IAV of the H1N1 subtype in both A549 and H1299 cells. Of note, with differences in terms of the extent or kinetics of this modulation were observed, probably due to viral strain/subtype specificity. (Supp. Fig. 2A,B).

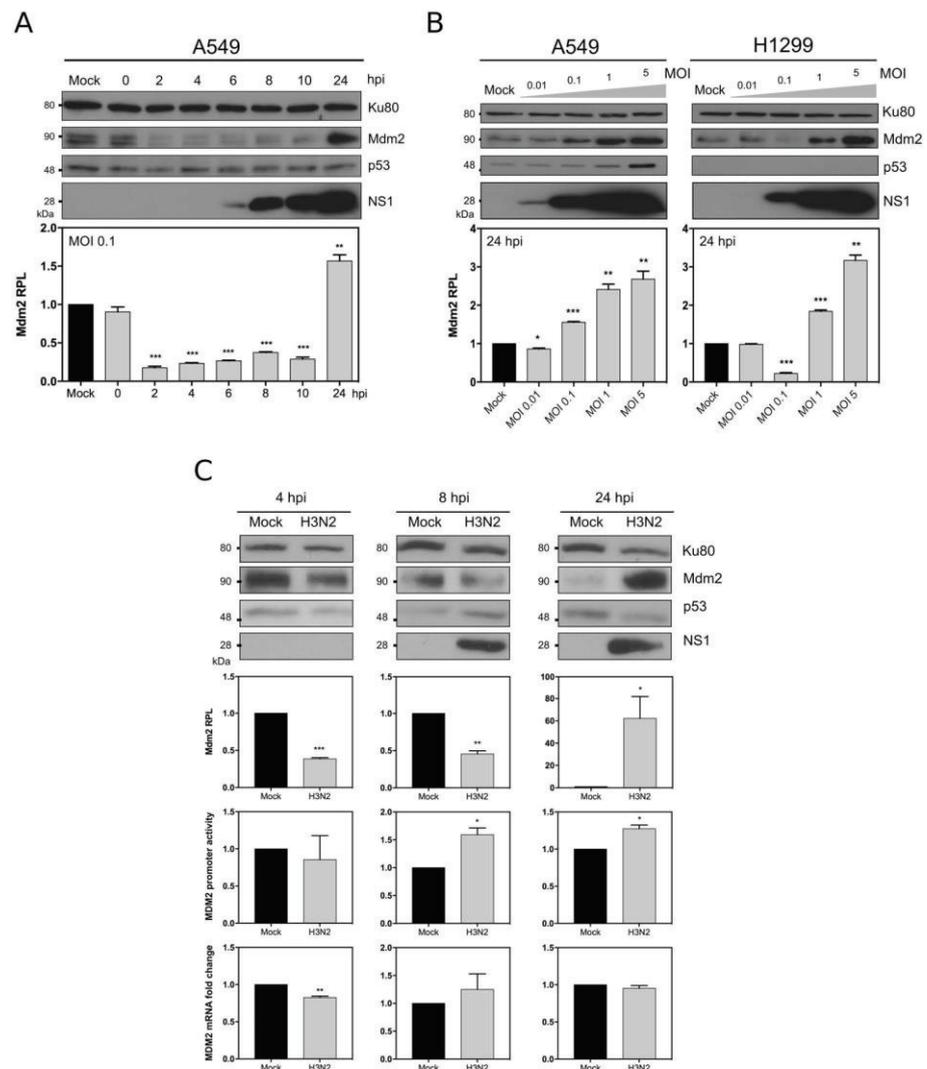
To further characterize the impact of infection on Mdm2 expression, we mock-infected or infected A549 cells to reproduce different viral conditions of marked decrease (MOI 4, 4 and 8 hpi) or increase (MOI 0.1, 24 hpi) of Mdm2 RPL compared to mock and measured Mdm2 mRNA levels by RT-qPCR (Fig. 1C). At 4 hpi, Mdm2 mRNA levels in H3N2 infected cells remained comparable to those observed in mock controls at 8 or 24 hpi (Fig. 1C). In a parallel experiment, we also measured the Mdm2 promoter activity, using a luciferase reporter plasmid. Our results indicated a limited, yet statistically significant ( $P < 0.05$ ) increase of promoter activity in IAV-infected cells compared to mock at 8 and 24 hpi. However, this increased activity did not appear to be correlated with Mdm2 mRNA and/or protein levels at the same time-points (Fig. 1C). Altogether, our results indicate that IAV strongly impacts endogenous Mdm2 expression, most probably at post-translational level.

### IAV modulates Mdm2 nucleo-cytoplasmic localization during the time-course of infection.

Since subcellular localization is known to play a major role in Mdm2 activity towards p53, and to further investigate the impact of IAV infection on Mdm2, we performed immuno-fluorescence confocal microscopy in A549 cells mock-infected or infected by influenza A (H3N2) virus at 8 or 24 hpi (Fig. 2). In addition to the specific Mdm2 immunostaining (red), we also used the IAV non-structural protein NS1 staining (green) as a key indicator of viral cycle advancement. In mock-infected cells, Mdm2 is mainly localized in nuclei (Fig. 2, panels a and e). In IAV-infected cells, Mdm2 immunostaining signal was slightly increased at 8 hpi, compared to mock-infected cells, with a visible nuclear accumulation (Fig. 2, panels i and m), and a co-localization with NS1 in several cells (Fig. 2, panels l and p). This co-localization was confirmed by quantitative image analysis using ImageJ, indicating a strong correlation between relative NS1 and Mdm2 mean signal intensities within nuclei at 8 hpi (Spearman  $r = 0.7983$ ,  $P < 0.0001$ , Fig. 2, right panel). At late stages of infection (24 hpi), we observed a stronger increase of global Mdm2 staining, yet with partial relocalization of Mdm2 in the cytoplasm of several infected cells (Fig. 2, panels q and u), as well as a relative exclusion between cytoplasmic Mdm2 and nuclear NS1 respective stainings (Fig. 2, panels t and x). This result was supported by quantitative image analysis, revealing that NS1 and Mdm2 nuclear staining intensities were negatively correlated at 24 hpi (Spearman  $r = -0.3875$ ,  $P < 0.0001$ , Fig. 2, right panel). These observations suggest that IAV infection alters Mdm2 nuclear-cytoplasmic localization.

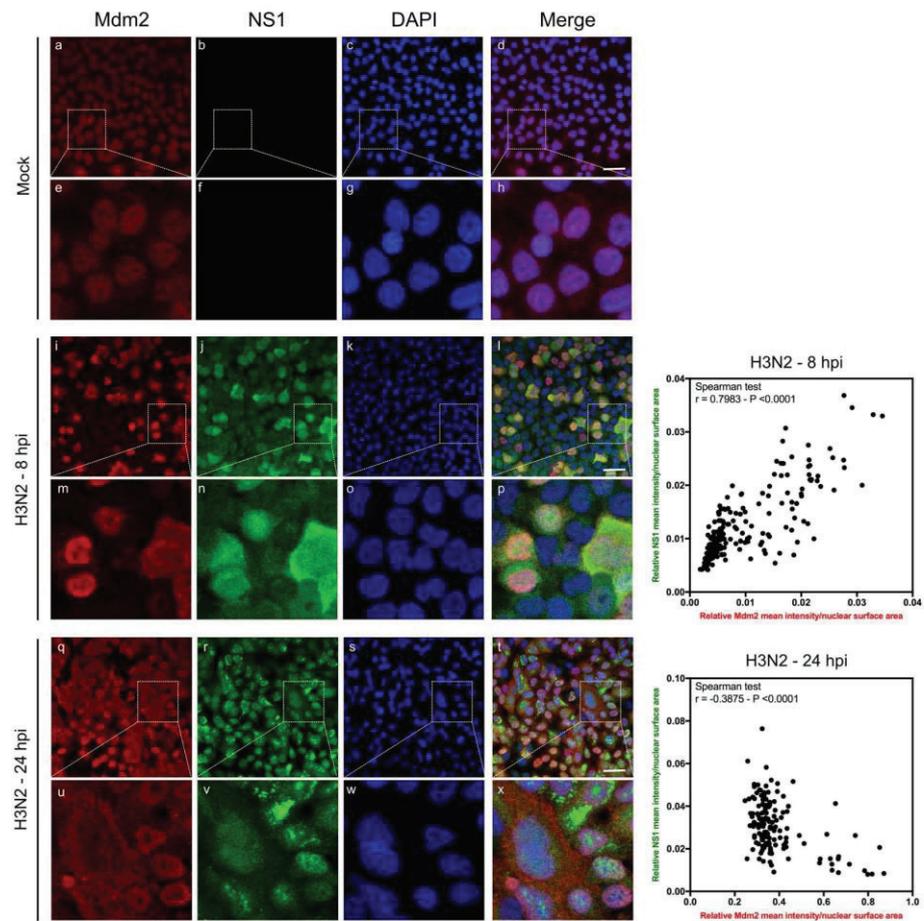
**IAV infection modulates Mdm2 stability.** We then investigated the impact of IAV infection on Mdm2 stability. To that end, we mock-infected or infected A549 cells in two specific conditions that reproduced a scenario of marked decrease (MOI 4, 4 hpi) or increase (MOI 0.1, 24 hpi) of Mdm2 RPL, and then analysed Mdm2 stability by monitoring protein levels over a 1 h period after treatment with 50  $\mu\text{M}$  of protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX) (Fig. 3A and B). At early stages of infection (4 hpi), we observed a faster decrease of Mdm2 RPL on infected *versus* mock conditions, with an estimated half-life of 12 and 50 min ( $P < 0.001$ ), respectively (Fig. 3A). Conversely, at late stages of infection (24 hpi), Mdm2 estimated half-life was almost 3 times higher in IAV-infected cells compared to mock (60 *versus* 20 minutes,  $P < 0.001$ , Fig. 3B).

We then further investigated the decrease of Mdm2 at early stages of infection (4 hpi), and observed less pronounced IAV-induced destabilization of Mdm2 in the presence of proteasome inhibitor MG132 (Fig. 3C).



**Figure 1.** Mdm2 expression is strongly impacted by IAV infection, mostly at post-transcriptional levels. **(A)** Human lung A549 cells were mock-infected or infected by influenza A/Moscow/10/99 (H3N2) at a MOI of 0.1 and cell lysates were analyzed by western blot for the expression of Mdm2 (SMP14 antibody), p53 and IAV NS1 at different time-points post infection. Ku80 was used as a loading control. Mdm2 relative protein levels (Mdm2 RPL) were measured by densitometry and calculated from data from three independent experiments. An asterisk indicates a significant difference compared with the results for mock-infected cells (\*\* and \*\*\* for  $P$ -value  $< 0.01$  and  $0.001$ , respectively). **(B)** Alternatively, A549 or H1299 cells were mock-infected or infected by influenza A/Moscow/10/99 (H3N2) at different MOI and expression of Mdm2, p53 and IAV NS1 were monitored at 24h post-infection by western blot, using the same approach. **(C)** A549 cells were mock-infected or infected by influenza A/Moscow/10/99 (H3N2) at a MOI of 4 or 0.1 and cell supernatants and lysates were harvested at 4, 8 or 24 hpi, respectively. Endogenous Mdm2 expression was measured at protein level by western blot, Mdm2 promoter activity was monitored using a luciferase reporter plasmid. In addition, Mdm2 mRNA expression was measured by RT-qPCR. An asterisk indicates a significant difference compared with the results for mock-infected cells (\*, \*\*, \*\*\*\* for  $P$ -value  $< 0.05$ ,  $0.01$  and  $< 0.001$ , respectively).

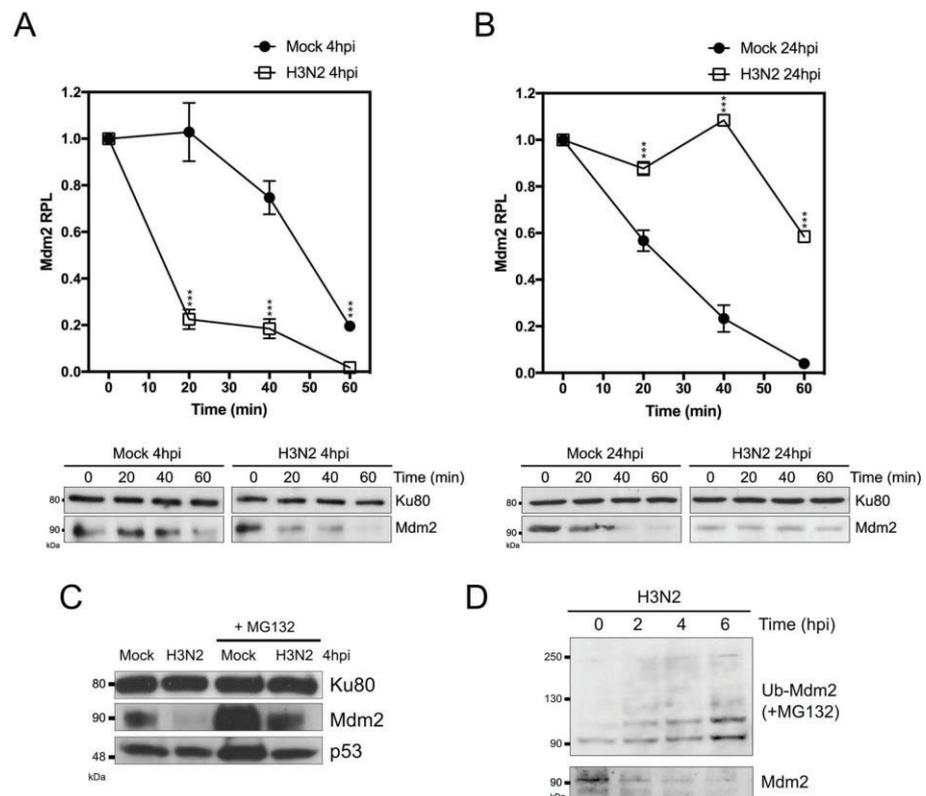
Moreover, ubiquitination assay in IAV-infected cells revealed an increase on Mdm2-ubiquitin conjugates between 0 and 6 hpi (Fig. 3D). Altogether, these results indicate that IAV infection modulates Mdm2 stability, with a role of ubiquitin-dependent proteasomal degradation at early stages of infection.



**Figure 2.** IAV alters Mdm2 protein level and its nucleo-cytoplasmic localization during the time-course of infection. Immunofluorescence staining of Mdm2 (red) and influenza NS1 (green) in mock-infected (panels a to h) or infected with H3N2 virus at a MOI of 1 (panels i to x) was performed at different times, as indicated. Nuclei were counterstained with DAPI (blue, panels c,g,k,o,s,w). Merged fluorescent signals are presented in panels d,h,i,p,t and x. Cell details are enlarged (inset). White scale bar = 10  $\mu$ m. The presented results obtained by confocal immunofluorescence microscopy are representative fields, from several repeated experiments. The relative mean nuclear intensity of NS1 and Mdm2 stainings was measured at 8 and 24 hpi with ImageJ (version 1.51 h - <http://imagej.nih.gov/ij/>), using DAPI staining to define nuclear areas for measurements. Data collected for NS1 and Mdm2 were subject to correlation analysis.

**IAV NS1 expression contributes to IAV-induced Mdm2 destabilization.** We previously demonstrated that IAV non-structural protein NS1 contributes to p53 stabilization<sup>15</sup>. Although the underlying mechanism was not fully understood, Wang and collaborators proposed that IAV-induced p53 stabilization was associated with a compromised Mdm2-mediated ubiquitination of p53<sup>19</sup>. In an attempt to shed light on the potential role of NS1, we transfected A549 cells with either an empty plasmid or a plasmid expressing the influenza A (H3N2) NS1 protein and assessed Mdm2 stability as described above but over a 4 h period (Fig. 4A). Compared to mock-transfected cells, we observed a significant decrease of Mdm2 RPL in NS1-expressing cells at 40 and 60 min time-points ( $P < 0.001$ , Fig. 4A). Indeed, the estimated Mdm2 half-life in the context of transient expression of NS1 was almost half of that observed in mock conditions (35 versus 75 min, Fig. 4A). In parallel, we also observed that this NS1-induced destabilization was dependent of the quantity and kinetics of transient expression of NS1 (data not shown).

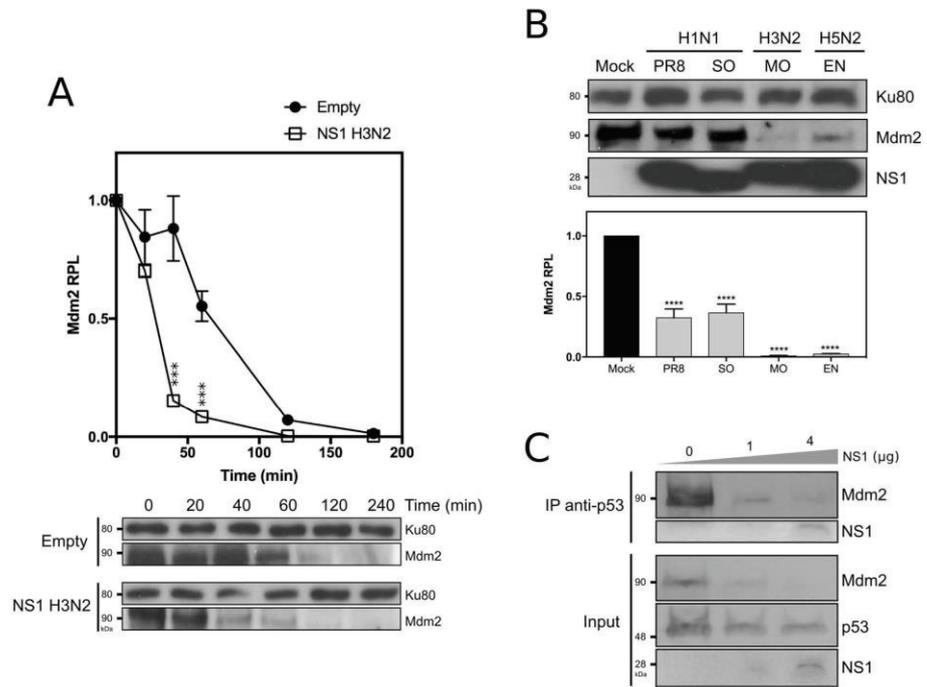
We then hypothesized that NS1 could constitute a major determinant involved in virus-induced destabilization of Mdm2. To further explore the potential contribution of NS1, we used reverse genetics<sup>20</sup> to produce 4 recombinant influenza viruses sharing the same A/PuertoRico/8/34 (H1N1) genomic background, but harbouring the NS1-coding segment (NS) issued from different IAV strains and subtypes: NS from A/PuertoRico/8/34 (H1N1, PR8), swine-origin A/Lyon/0969/09 (H1N, SO), A/Moscow/10/99 (H3N2, MO), A/



**Figure 3.** IAV infection modulates Mdm2 stability. Stability assay in IAV-infected cells at 4 hpi (A) and 24 hpi (B). Human lung A549 cells were mock-infected or infected with influenza A/Moscow/10/99 (H3N2) with an MOI of 4 or 0.1 and analyzed at 4 and 24 hpi, respectively. Stability was assessed by monitoring relative protein levels (RPL) of Mdm2 during a 1 h period, after treatment with 50  $\mu$ M cycloheximide (CHX). Mean values  $\pm$  standard deviation from three independent experiments are presented. An asterisk indicates a significant difference compared with the results for mock-infected cells (\*\*\*) for  $P$ -value  $< 0.001$ . (C) Human lung A549 cells were mock-infected or infected with influenza A/Moscow/10/99 (H3N2) with an MOI of 4, in presence/absence of proteasome inhibitor MG132 (20  $\mu$ M), and harvested at 4 h post-infection, and analyzed by western blot. (D) A549 cells were transfected with a plasmid expressing His-tagged Ubiquitin and then further infected 48 h post-transfection with influenza A/Moscow/10/99 (H3N2) with an MOI of 4, in presence of 20  $\mu$ M MG132. Cell lysates were harvested at different time-points after infection, ubiquitinated products were separated and analyzed by western blot using a specific antibody against Mdm2. In parallel, without MG132 treatment, Mdm2 protein levels were monitored at similar time-points. When necessary, Ku80 was used as a loading control for western blot.

Finch/England/20151/94 (H5N2, EN). A549 cells were mock-infected or infected with the different recombinant IAV at a MOI of 4, and cell lysates were harvested at 8 hpi for western blot analysis (Fig. 4B). The four recombinant IAV induced significant yet differential decrease on Mdm2 RPL ( $P < 0.0001$ ) at similar stages of infection, as confirmed by NS1 protein levels. Indeed, NS1 issued from H3N2 and H5N2 strains appeared to induce Mdm2 destabilization more efficiently than their H1N1 counterparts (PR8, SO), suggesting a possible strain/subtype specificity in this process (Fig. 4B). In addition, we also evaluated the impact of NS1 expression on the interaction between p53 and Mdm2 by transfecting A549 cells with either an empty plasmid, or two different amounts of plasmids (1 and 4  $\mu$ g) expressing NS1 issued from the H3N2 strain (Fig. 4C). Cell lysates were harvested at 48 h post-transfection and analysed by co-immunoprecipitation assay using an anti-p53 polyclonal antibody. As expected, in the absence of NS1 Mdm2 was co-immunoprecipitated with the anti-p53 antibody. In contrast, the transient expression of NS1 sharply decreased Mdm2 co-immunoprecipitation, in correlation with decreased Mdm2 protein levels in the input (Fig. 4C). In conclusion, our results highlight NS1 as a key determinant in the IAV-induced destabilization of endogenous Mdm2, at early stage of infection.

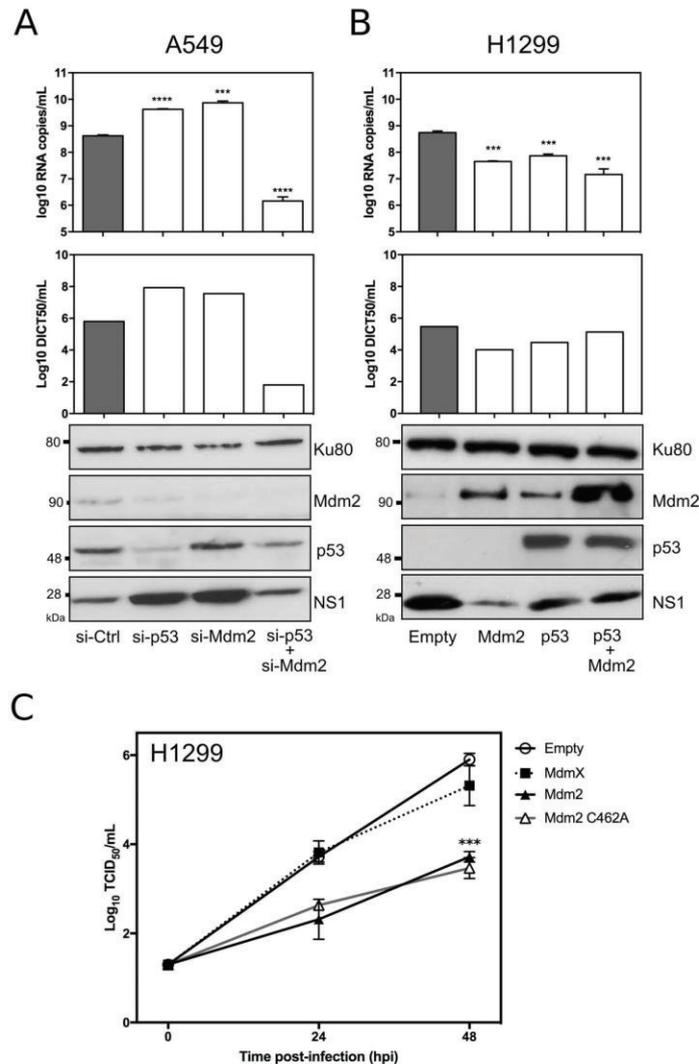
**An unexpected antiviral role of Mdm2.** To further investigate the role of Mdm2 in IAV infection, we first evaluated the impact of Mdm2 knockdown on IAV production. A549 cells were transfected with either a



**Figure 4.** IAV NS1 expression contributes to IAV-induced Mdm2 destabilization, and consecutively alters Mdm2/p53 interaction. **(A)** Stability assay in presence of NS1. A549 cells were transfected with either an empty plasmid or a plasmid expressing NS1 from A/Moscow/10/00 (H3N2), and Mdm2 stability was evaluated at 48 h post-transfection. Stability was assessed by monitoring relative protein levels (RPL) of Mdm2 during a 1 h period, after treatment with 50 μM cycloheximide (CHX). Mean values ± standard deviation from three independent experiments are presented. \*\*\* for  $P$ -value < 0.001. Ku80 was used as a loading control. **(B)** Four different recombinant IAV were generated using reverse genetics, using the same A/PuertoRico/8/34 (H1N1) genomic background, and harboring NS segment from different IAV strains; NS from A/PuertoRico/8/34 (H1N1, PR8), swine-origin A/Lyon/0969/09 (H1N, SO), A/Moscow/10/99 (H3N2, MO), A/Finch/England/20151/94 (H5N2, EN). Human lung A549 cells were mock-infected or infected with these different IAV with an MOI of 4 and cell lysates were harvested at 8 h post-infection for western blot analysis. Mdm2 relative protein levels (Mdm2 RPL) were measured by densitometry and calculated from data from three independent experiments. An asterisk indicates a significant difference compared with the results for mock-infected cells (\*\*\*\* for  $P$ -value < 0.0001). Ku80 was used as a loading control. **(C)** Impact of NS1 transient expression on the interaction between p53 and Mdm2. A549 cells were transfected with either an empty plasmid, or two quantities of plasmids expressing NS1 (1 and 4 μg NS1 H3N2). After 48 h post-transfection, cells lysates were analyzed using a co-immunoprecipitation assay using an anti-p53 polyclonal antibody.

non-specific siRNA (si-Ctrl) or a pool of siRNAs targeting Mdm2 and/or p53. Forty-eight hours post-transfection, cells were infected with influenza A (H3N2) at a MOI of 0.01, and viral supernatants and cell extracts were harvested at 24 hpi. As expected, western blots confirmed that p53 and/or Mdm2 expression levels were reduced in cells transfected by specific siRNAs targeting p53 and/or Mdm2, respectively, compared to si-Ctrl treated cells (Fig. 5A). Moreover, viral production at 24 hpi was assessed by three different approaches: (i) quantification of influenza M gene copies by RT-qPCR, (ii) measurement of infectious viral titres by endpoint titration in supernatants, and (iii) detection of NS1 protein by western blot. In agreement with previously published work validating the antiviral role of p53<sup>11,14,16</sup>, we observed that viral genome copy number was significantly increased (approximately 10-fold) in supernatants of si-p53 transfected cells, compared to that of si-Ctrl transfected cells (Fig. 5A). This result was confirmed by both infectious titres, with more than 10-fold increase on TCID<sub>50</sub>/mL values under si-p53 treatment compared to si-Ctrl, and increased NS1 protein levels in western blot (Fig. 5A).

Based on these initial observations, and considering Mdm2 is mainly recognised as a negative regulator of p53, we anticipated to observe the opposite effect with si-Mdm2. Surprisingly, we obtained very similar results between si-p53 and si-Mdm2 experimental conditions, regardless of the readout used (Fig. 5A). For example, we observed that viral genome copy number was significantly increased (more than 10-fold) in supernatants of si-Mdm2 transfected cells, compared to that of si-Ctrl transfected cells (Fig. 5A). Interestingly, in the case of a combination of si-p53 and si-Mdm2 treatment, we observed a strong decrease of viral production compared to si-Ctrl, with more than 100-fold decrease in viral genome copies/mL and TCID<sub>50</sub>/mL, but without a marked



**Figure 5.** An unexpected antiviral contribution of Mdm2 revealed by silencing/transient expression experiments. **(A)** Knock-down of p53 and/or Mdm2 mRNA expression in A549 cells differentially modulates levels of IAV production (Left panel). Forty-eight hours after si-RNA transfection using a control si-RNAs (si-Ctrl) or specific siRNAs (si-p53/si-Mdm2), A549 cells were infected by A/Moscow/10/99 (H3N2) at a MOI of 0.01 and the level of viral production at 24 h post-infection was assessed using three different experiments: (i) RT-qPCR (log<sub>10</sub> RNA copies/mL, measured in three independent experiments). An asterisk indicates a significant difference compared with the results for si-Ctrl treated cells (\*\*\*\* and \*\*\*\* for respectively *P*-values < 0.001 and < 0.0001), (ii) determination of infectious viral titers of supernatants (TCID<sub>50</sub>/mL) by endpoint titration in MDCK cells (measured in quadruplicate in 2 independent experiments), and (iii) western blot. Ku80 was used as a loading control; **(B)** Transient expression/co-expression of p53 and/or Mdm2 in H1299 cells decreases the level of viral production (Right panel). Forty-eight hours after transfection, H1299 cells were infected by A/Moscow/10/99 (H3N2) at a MOI of 0.01 and the level of viral production at 24 h post-infection was assessed using similar methods. An asterisk indicates a significant difference compared with the results obtained for cells transfected with the empty vector (\*\*\* and \*\*\*\* for respectively *P*-values < 0.001 and < 0.0001) **(C)** Comparative viral kinetics in the context of transient expression of Mdm2, Mdm2 RING mutant C462A or Mdmx in H1299 cells. Forty-eight hours after transfection, H1299 cells were infected by A/Moscow/10/99 (H3N2) at a MOI of 0.01 and the level of viral production at 24 h and 48 h post-infection was assessed using determination of infectious titers of supernatants (log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/mL) by endpoint titration in MDCK cells (measured in quadruplicate in 2 independent experiments). An asterisk indicates a significant difference compared with the results obtained for cells transfected with the empty vector (\*\*\* for *P*-value < 0.001).

difference of NS1 protein level in western blot (Fig. 5A). This discrepancy suggests a possible defect of late viral steps (viral RNA traffic and budding) due to the double treatment, that could explain this observation. To complete these results, we performed a mirror experiment, using a transient expression approach in H1299 cells (Fig. 5B) that not only lack the expression of full-length p53 but also express low levels of Mdm2. Cells were transfected with either an empty plasmid or a plasmid expressing p53 or Mdm2, or alternatively co-transfected with plasmids expressing p53 and Mdm2. Forty-eight hours post transfection, cells were further infected with influenza A (H3N2), and the impact of transient expression on viral production was assessed by measuring infectious titres, viral genome copy numbers and viral protein levels (Fig. 5B). The transient expression of p53 and/or Mdm2 was confirmed by western blot. As expected, viral production was significantly lower in cells transfected with p53 ( $P < 0.01$ ) compared to mock-transfected cells, in line with our previous observations<sup>16</sup>. Interestingly, a similar impact of Mdm2 transient expression on viral production was observed, with almost 100-fold lower viral genome copies/mL and TCID<sub>50</sub>/mL titres compared to mock-transfected cells, and consistent with a marked decrease of NS1 protein levels in western blot (Fig. 5B). Although the co-transfection of p53/Mdm2 was also associated with a reduced viral production, no synergistic effect was observed.

To further investigate the role of Mdm2 in IAV infection, we also performed comparative viral kinetics, using a similar transient expression approach in H1299 cells (Fig. 5C). As previously demonstrated, in the context of Mdm2 transient expression, viral production was significantly reduced ( $P < 0.001$ ) compared to mock-transfected cells. Interestingly, the same result was obtained for the MDM2 RING domain mutant C462A, therefore suggesting that the E3 ubiquitin ligase activity of the Mdm2 RING domain is not involved in Mdm2 antiviral properties. Of note, viral production remained unaffected by Mdmx (Fig. 5C).

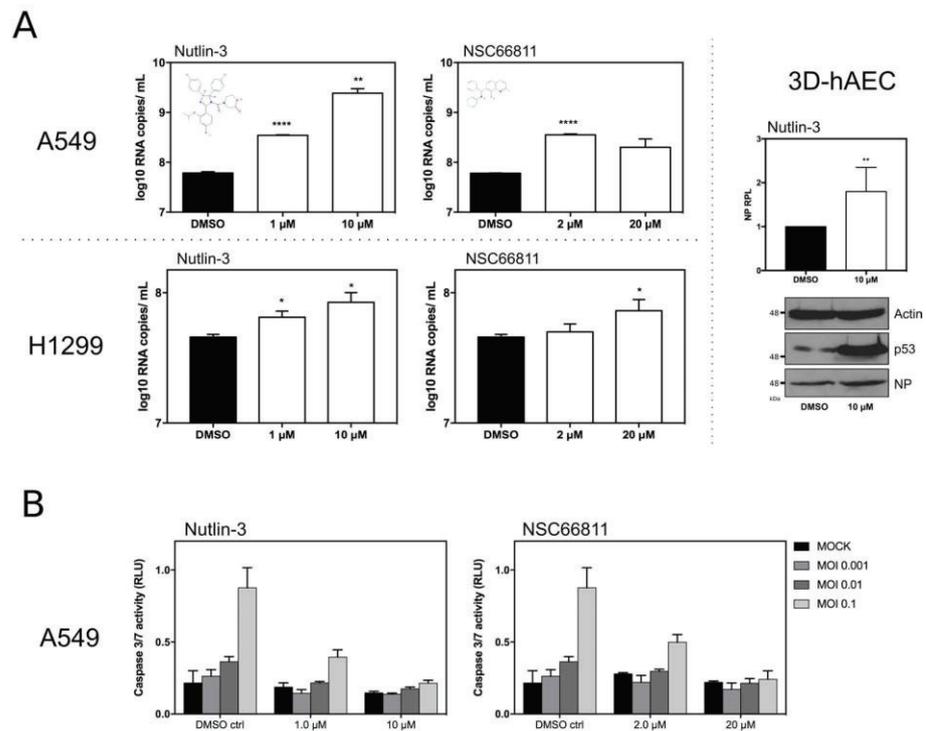
In parallel, we advantageously used small Mdm2 antagonist molecules such as Nutlin-3<sup>21</sup> or NSC66811<sup>22</sup>, which are known to bind Mdm2 in its p53-binding region, hence blocking Mdm2 regulatory activities towards p53 and inducing the stabilization and activation of p53<sup>23</sup>. We therefore evaluated the impact of these two Mdm2 antagonists on IAV production, by infecting A549 or H1299 cells with influenza A (H3N2) at a MOI of 0.001, in the presence of either DMSO (control) or different concentrations of Mdm2 antagonists (Fig. 6A). Cells were pre-treated 14 h before infection to enable the effect of Mdm2-antagonist treatment, and harvested at 48 hpi, with minimal impact on A549 and H1299 cell viability (Supp. Fig. 3). In A549 cells, treatment with Nutlin-3 significantly increased viral production compared to the control, with up to 40-fold increase of log<sub>10</sub> RNA copies/mL for 10  $\mu$ M ( $P < 0.05$ , Fig. 6A – upper panel). A similar yet milder effect was observed for the NSC66811 molecule, with a 5-fold maximum increase on viral production for 2  $\mu$ M ( $P < 0.001$ ). Interestingly, increased viral production associated with the use of small molecule antagonists was also observed in the p53-lacking H1299 cells (Fig. 6A – lower panel). However, this increased viral production, despite being statistically significant, remained limited in comparison with those obtained in A549 cells. These results are consistent with our previous observations using si-RNA and transient expression approaches, suggesting a mostly p53-independent antiviral role of Mdm2. In addition, we also evaluated the impact of Nutlin-3 on IAV production in the context of infected human primary cells (Fig. 6A – right panel). Reconstituted 3D-human airway epithelial cells (3D-hAEC, p53-wt), cultivated at the air-liquid interface, were treated in their basal medium with Nutlin-3 (10  $\mu$ M) or DMSO and then infected by influenza virus A/Moscow/10/99 (H3N2) at a MOI of 0.1. Viral production at 48 hpi, illustrated by NP RPL in western blot, was significantly increased in Nutlin-3-treated cells compared to DMSO-treated cells ( $P < 0.01$ , Fig. 6A, right panel). This increased viral production was in good agreement with our observations performed in A549 and H1299 cells.

We finally explored different cellular processes regulated by p53/Mdm2 and therefore potentially impacted by Mdm2 antagonists. Among these processes, the most striking observation was the impact of Nutlin-3 and NSC66811 on the early steps of IAV-induced apoptosis (Fig. 6B). We then infected A549 cells with influenza A (H3N2) at different MOIs in presence of different concentrations of control DMSO or Mdm2, and used a specific luciferase assay to measure caspase 3/7 activity at 48 hpi. As expected, whereas higher MOIs were correlated with an increase of caspase 3/7 activity in DMSO-treated cells (control), the impact of IAV infection on apoptosis was strongly reduced, or even almost completely attenuated in the context of Nutlin-3 or NSC66811 treatment (Fig. 6B). These results suggest a possible reduction of IAV-induced apoptosis by Mdm2 antagonists, creating a favourable context for IAV replication.

## Discussion

Mdm2 is a RING finger domain-containing protein with E3-ubiquitin ligase activity, mainly known for a central regulatory role through the binding to p53, promoting its ubiquitination and degradation<sup>17</sup>. Whereas many studies have been dedicated to the interplay between p53 and viruses, including non-oncogenic viruses, only a limited number have really focused their interest on its partner Mdm2, essentially explaining the stabilization of p53 observed in the context of infection<sup>18,24,25</sup>. In the context of IAV, several research groups, including ours, have described a stabilization of p53 as a result of viral infection<sup>11–13,15</sup>, with Wang and colleagues showing that this stabilization was associated with a compromised Mdm2-mediated ubiquitination of p53. We hypothesized that both compromised ubiquitination of p53 and NS1 interaction may contribute towards IAV-induced stabilization of p53, but the underlying mechanisms remained unveiled.

Here, we showed that IAV alters Mdm2 expression mostly at the post-translational level, with an impact on its nucleocytoplasmic localization (Figs 1 and 2). Although this observation is not in complete agreement with previous work by Wang *et al.*, indicating unchanged abundance or subcellular distribution of Mdm2 in IAV-infected cells compared with mock-infected cells<sup>19</sup>, this discrepancy may be explained not only by the differential origin of cellular models (simian/canine *versus* human) but also by differences in the infection parameters used (viral strains, MOI and replication kinetics). The initial degradation of Mdm2, followed by a stabilization at late stages of infection described in our study, partially correlates with the biphasic pattern of p53 observed by Shen and colleagues, notably with the transient p53 increase at the beginning of infection<sup>13</sup>. The rapid and global decrease of



**Figure 6.** An unexpected antiviral contribution of Mdm2 revealed by small-molecules Mdm2 antagonists. **(A)** Impact of small molecule Mdm2 antagonists on viral production and IAV-induced apoptosis. Human lung epithelial A549 or H1299 cells were infected by influenza virus A/Moscow/10/99 (H3N2) at a MOI of 0.001, in presence of DMSO or small molecules Mdm2 antagonists (Nutlin-3 or NSC 66811) at different concentrations. The level of viral production at 48 h post-infection was evaluated by RT-qPCR (log<sub>10</sub> RNA copies/mL measured in three independent experiments). An asterisk indicates a significant difference compared with the results for DMSO treated cells (\*, \*\*, \*\*\*\* for *P*-values < 0.01, < 0.05 and < 0.0001, respectively). 3D-Human airway epithelia (3D-hAEC), which are constituted by human primary respiratory epithelial cells cultivated at the air-liquid interface, were treated in basal medium with Nutlin-3 (10 μM) or DMSO and then infected by influenza virus A/Moscow/10/99 (H3N2) at a MOI of 0.1. Cell lysates were analyzed at 48 hours post-infection by western blot for the expression of IAV NP and p53. Actin was used as a loading control. IAV NP relative protein levels (NP RPL) were measured by densitometry and calculated from data from two independent experiments. **(B)** The impact of small molecule antagonists on IAV-induced caspase3/7 activity at 48 h post-infection in A549 cells was monitored using a luciferase reporter assay, using three different MOI (0.1, 0.01 and 0.001).

Mdm2 protein levels at early stages, in the context of a limited infection (Fig. 1A) suggests a possible involvement of cellular paracrine mechanisms that need to be further investigated.

Different experimental approaches in our study suggest that the p53/Mdm2 autoregulatory negative feedback loop is altered during the time course of IAV infection, notably at late stages (Figs 1 and 5). This kind of modification has been already described in the literature as a consequence of different cellular stress stimuli, such as DNA damage, oncogenic or nucleolar/ribosomal stress<sup>17,26,27</sup>. Since we previously demonstrated that IAV infection induces a strong remodelling of the host nucleolus<sup>28,29</sup>, we cannot exclude a role/connexion of nucleolar/ribosomal stress in/with the IAV-induced alteration of the Mdm2/p53 loop. Another non-exclusive hypothesis would be the involvement of viral proteins such as NP and NS1 in this mechanism, as we have previously demonstrated their functional interaction with host nucleolus and ribosome machinery at different levels<sup>28–30</sup>.

Our results show that NS1 partially contributes to Mdm2 degradation either directly or indirectly (Fig. 4), which is in line with our previous work on the induction of p53 stabilisation by transient expression of NS1<sup>15</sup>. We can then hypothesize that NS1 might contribute to p53 stabilisation at different levels, *via* its interaction with p53 and/or its contribution to Mdm2 degradation. In that regard, the modification of the NS1/p53/Mdm2 ratio during the time course of infection could directly impact the p53/mdm2 regulation loop. Although the underlying mechanisms remain to be investigated, several observations might be worth further explorations. For example, our immuno-fluorescence confocal microscopy results (Fig. 2) indicate a progressive decrease of co-localization of Mdm2 and NS1 during the time course of infection, in correlation with the stabilization of Mdm2 observed at late stages of infection (Figs 1 and 3), which suggests that NS1 contribution to Mdm2 degradation could occur in

the nuclear compartment of infected cells. Interestingly, NS1 has been shown to target other E3-ubiquitin ligases involved in innate immunity, such as RING-domain containing TRIM proteins<sup>31</sup>, for which we cannot exclude a similar mechanism in the case of Mdm2. Interestingly, NS1 could involve TRIM25, which have a dual function in the p53/mDM circuit<sup>32</sup>. In addition, the differences observed between IAV subtypes (H3N2 versus H1N1, Figs 1 and Supp. Fig. 2) and the differential effect of NS1 on endogenous Mdm2 expression in the context of infection by different recombinant IAV (Fig. 4B) suggest a viral strain/subtype specificity, which could be linked to specific NS1 amino-acid sequences, subcellular localization and/or functionalities of the NS1 proteins. As an example, NS1 from different IAV strains/subtypes were shown to differentially activate the PI3K/Akt signalling pathway<sup>10,33</sup>, which is part of the upstream regulatory pathway of Mdm2<sup>17</sup>. The possible role of functional interactions between NS1 and the upstream signalling pathway (MAPK, ERK, PI3K/Akt) as well as their consequence of Mdm2 underscores further validation.

The most striking finding of our study is the unexpected inhibitory role on viral production apparently played by Mdm2, as suggested by silencing/transient expression experiments as well as small molecule Mdm2-antagonists (Figs 5 and 6). This potential antiviral facet of Mdm2 is quite interesting, as Mdm2 is the main negative regulator of p53<sup>17</sup> and p53 is known to contribute to the antiviral response<sup>34,35</sup>. However, several results indicate that Mdm2 limits IAV production in a p53-independent manner (Fig. 5A,B). Indeed, Mdm2 has been reported to have p53-independent functions in a large panel of cellular processes such as cell cycle control, cell fate determination, or signalling pathways (i.e. NF- $\kappa$ -B)<sup>36,37</sup>, with whom IAV is/are interconnected/interdependent, and thereby could be involved in the Mdm2 inhibitory effect on infection. In addition, our results also suggest that the Mdm2 RING domain and its associated E3 ubiquitin ligase activity are not involved in Mdm2 antiviral properties (Fig. 5C). Moreover, this antiviral property appears to be quite specific to Mdm2 since Mdmx does not demonstrate a similar impact on IAV production (Fig. 5C). As Mdm2 has been initially identified as a required host factor for viral replication<sup>5,6</sup>, we cannot exclude an ambivalent role of Mdm2 during infection, as a result of its multiple functions and interactions with other host factors.

Further investigations with Mdm2 antagonists were carried out in order to identify potential Mdm2 functions that could be related to its antiviral function. We observed a significant increase of viral production in the context of Nutlin-3 or NSC66811 treatment (Fig. 6A). In the light of the results obtained, we can hypothesize that these molecules, known to target Mdm2 in its p53-binding site, also alter other Mdm2 functional interactions (e.g. with p63/p73), that could interfere with an optimal viral replication.

After exploring several cellular processes potentially impacted by small Mdm2 antagonists, we found that apoptosis was possibly involved. Indeed, our results indicate a reduction of IAV-induced apoptosis by both Nutlin-3 and NSC66811 in comparison to the mock-treated control (Fig. 6B). Whereas the induction of apoptosis was demonstrated to be essential for IAV propagation, notably for nuclear traffic of viral ribonucleoprotein complexes at very early stages of infection<sup>38</sup>, the limitation of IAV-induced apoptosis at late stages of infection should be also favourable to viral production, by preventing a premature death of the infected cells.

In conclusion, we have shown that IAV targets the E3-ubiquitin ligase Mdm2 *via* its multifunctional protein NS1, altering Mdm2 stability and the p53/Mdm2 interaction and regulatory loop during the time-course of infection. This study also highlights a new antiviral facet of Mdm2, which may be part of its p53-independent functions. Altogether, our work contributes to better understand the mechanism involved in the intricate interactions between IAV and the p53 pathway, in which both NS1 and Mdm2 appear to constitute key players as well as cellular gatekeeper p53.

## Materials and Methods

**Viruses and cells.** IAV strain A/Moscow/10/99 (H3N2) and recombinant viruses used in this study were cultivated and titered in MDCK cells and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ , as previously described<sup>16,39</sup>. All experiments using IAV were conducted in a class II biosafety cabinet in BSL2 laboratory, and all personnel has been vaccinated, trained and properly protected. MDCK cells were purchased from Lonza (ATCC, CCL34) and were passaged twice weekly in serum-free Ultra-MDCK medium (Lonza) supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich), penicillin (225 units/ml) and streptomycin (225  $\mu\text{g/ml}$ ) (Lonza). Human lung epithelial A549 cells (ATCC CCL-185, wild type p53) and H1299 cells (ATCC CRL-5803, Homozygous partial deletion of TP53 gene) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza, Biowhittaker) supplemented with 100 units/ml penicillin, 200  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin, 2 mM L-glutamine and 10% fetal calf serum (Dutscher). All cells were maintained at  $37^{\circ}\text{C}$  with 5%  $\text{CO}_2$ . Sub-confluent A549 or H1299 cells were infected with influenza viruses at different multiplicity of infection (MOI, indicated in text and figure legend). After a 1 h adsorption period in a minimal volume, DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Lonza), L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (200  $\mu\text{g/ml}$ ) and 0.5  $\mu\text{g/ml}$  trypsin was added, and cells were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for different lengths of time. Mock-infected controls were realized with the same protocol, using DMEM instead of viral inoculum. All experiments with A549 or H1299 cells were performed in the same limited range of cell passages to ensure the reproducibility of results. 3D-human airway epithelial cells (3D-hAEC, Mucilair<sup>TM</sup>) were purchased from Epithelix (Geneva, Switzerland). 3D-hAEC originated from primary nasal epithelial cells cultivated at the air-liquid interface. Sterility, tissue integrity, mucus production and cilia beating frequency have been certified by the company.

**Reverse genetics.** Reverse genetic system A/PR/8/34 (H1N1), and all NS reassortant viruses were generated by reverse genetic as previously described<sup>28,39</sup>. Four different recombinant IAV were generated using reverse genetics, using the same A/PuertoRico/8/34 (H1N1) genomic background, and harboring NS segment from different IAV strains; NS from A/PuertoRico/8/34 (H1N1, PR8), swine-origin A/Lyon/0969/09 (H1N, SO), A/Moscow/10/99 (H3N2, MO), A/Finch/England/20151/94 (H5N2, EN). Recombinant viruses were generated by DNA transfection. Plasmids were mixed with Superfect reagent (Qiagen) in OptiMEM (GIBCO), according to

the manufacturer's instructions and added to 293 T cells in six-well tissue culture plates. At 48 h post-transfection, viruses in the culture supernatant were harvested and used to infect MDCK cells to be amplified. After two passages, viral titers were measured using standard methods.

**Immunofluorescence confocal microscopy.** A549 cells grown, and Mock or IAV-infected on Lab-Tek II chamber slides (ThermoScientific) were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min. After washing in PBS, cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS (PBS-T) for 15 min. Mouse monoclonal anti-Mdm2 antibody (SMP14, sc-965, Santa Cruz Biotechnology), and a rabbit polyclonal anti-NS1 (Kind gift of Dr Juan Ortin, CSIC, Spain) were used as primary antibodies in PBS-T. After incubation for 1 h, the cells were washed in PBS-T and then incubated with goat anti-mouse coupled to AlexaFluor 633 and/or goat anti-rabbit coupled to AlexaFluor 488 (Molecular Probes, Invitrogen) for 30 min, at concentrations recommended by the suppliers. Nuclei were counterstained with DNA-binding fluorochrome 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen). After staining, coverslips were mounted with Fluoromount G (Cliniscience) and analyzed using a confocal laser scanning microscope (SP5 Leica). The relative mean nuclear intensity of NS1 and Mdm2 stainings was measured with ImageJ (version 1.51 h - <http://imagej.nih.gov/ij/>), using DAPI staining to define nuclear areas for measurements. Data collected for NS1 and Mdm2 were subject of a correlation analysis using Graphpad Prism software (La Jolla, California, USA).

**Antibodies and western blot.** Total proteins were extracted by scraping and syringing cells in  $1 \times$  NuPAGE LDS buffer (Invitrogen). Fifteen to thirty micrograms of total proteins were then separated on 10% SDS-PAGE gels. The following antibodies were used: mouse monoclonal anti-Mdm2 (SMP14, sc-965, Santa Cruz Biotechnology or 2A10, MABE281# Merck Millipore), anti-p53 (DO-1, Santa-Cruz Biotechnology) and anti-NS1 (sc-130568, Santa Cruz biotechnology) antibodies, and a sheep polyclonal anti-p53 antibody (SAPU, JC Bourdon, University of Dundee). In addition, an anti-Ku80 polyclonal antibody was used as a loading control (#2753, Cell Signaling).

**Stability, transactivation and RT-qPCR assays.** For the determination of Mdm2 half-life, cells were treated with cycloheximide (50  $\mu$ g/mL), and total protein lysates were harvested at different time points and analyzed by western blot. Mdm2 relative protein levels (RPL) were determined by densitometry analysis using the ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). For transactivation assays, cells were transfected with 1  $\mu$ g of Mdm2-luc vector, possessing the firefly luciferase gene under the control of the partial promoter sequence of Mdm2 (Mdm2-luc)<sup>40</sup>. Transfection efficiency was normalized using a Renilla Luciferase plasmid. Luciferase activity was measured in whole cell extracts using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega), according to the manufacturer's instructions, and was expressed as Relative Luciferase Units (RLU), compared to the control. For real-time quantitative PCR, total RNAs were extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). Reverse-transcription was performed on 1  $\mu$ g of total RNAs using the Superscript II enzyme (Invitrogen) at 42 °C. Quantification of the levels of the different mRNAs of interest was performed by real-time quantitative PCR, as previously described (Terrier *et al.*, 2011).

**Immunoprecipitation and Purification of His-tagged ubiquitin conjugates.** For immunoprecipitation, A549 cells were mock-infected or infected at different MOI. Cells were harvested 8 or 24 h post infection in a NP40 lysis buffer (NP40 (1%), NaCl (150 mM), Tris-HCl (20 mM)). Lysates were incubated with an anti-p53 polyclonal rabbit antibody (CM1, Novocastra Laboratories) on a rotating wheel overnight at 4 °C. Protein G agarose beads (Life technologies) were then added to the lysate and incubated 1 h at room temperature. The beads were pelleted and washed in NP40 lysis buffer. Antibody-antigen complexes bound to the beads were eluted in  $1 \times$  NuPAGE LDS buffer (Invitrogen) and analyzed by western blot with an anti-Mdm2 antibody (SMP14, Santa Cruz biotechnology). For purification of His-tagged ubiquitin conjugates, cells grown in 150 mm dishes were transfected with a plasmid expressing his-tagged ubiquitin (pUb(His)6). The purification of His-tagged ubiquitin conjugates was performed as previously described<sup>41</sup>. Briefly, cells were harvested in a lysis buffer (Guanidinium-HCl (3 M), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.1 M), Tris-HCl pH8 (0.01 M), Tween 20 (0.05%)). Lysates were mixed with Ni-NTA agarose beads (QIAGEN) and incubated on a rotating wheel 2 h at room temperature. Beads were then washed (Urea 8 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.1 M), Tris-HCl pH6.3 (0.01 M), Tween 20 (0.05%)) and His-tagged ubiquitin conjugates were eluted (Imidazole (200 mM), Tris-HCl pH6.7 (0.15 M), glycerol (30%),  $\beta$ -mercaptoethanol (0.72 M), SDS (5%)). The eluates were analyzed by western-blot with the appropriate antibodies.

**Plasmid and siRNA transfection.** Plasmid transfections were performed using TransIT-LT1 reagent (Mirus), according to the manufacturer's instructions. Plasmids pcDNA3 expressing Mdm2, Mdm2 RING mutant C462A, Mdmx and The His6-tagged ubiquitin construct were kind gifts from Dr Mark Saville (Division of Cancer Research, University of Dundee, UK). The NS1 (H3N2) plasmid (pCI-NS1 H3N2) was a kind gift from Dr Nadia Naffakh (Pasteur Institute, France). Silencing of MDM2 was performed in A549 cells transfected with the Smart Pool ON-TARGET plus Mdm2 (si-Mdm2) (L-003279-00-0005, Thermo Scientific), a siRNA specifically targeting p53 (si-p53)<sup>16</sup> and a non-specific siRNA (si-Ctrl, OR-0030-neg05, Eurogentec), using Oligofectamine (Invitrogen).

**Small molecule Mdm2 antagonists.** Two different small molecule Mdm2 antagonists were used in this study, Nutlin-3a (Calbiochem) or NSC66811 (Calbiochem)<sup>21,22</sup>. A549 and H1299 cells were pre-treated for 14 h, and then infected by influenza virus A/Moscow/10/99 (H3N2) at a MOI of 0.001, in presence of DMSO or small molecules Mdm2 antagonists (Nutlin-3 or NSC 66811) at different concentrations.

**Statistical analysis.** Unpaired t-tests were used to compare normally distributed data. For image analysis, a non-parametric Spearman correlation analysis was used to compare relative mean Mdm2/NS1 intensity/nuclear surface area measurements.  $P < 0.05$  was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using Graphpad Prism software (La Jolla, California, USA).

## References

- Paules, C. & Subbarao, K. Influenza. *Lancet Lond Engl*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30129-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30129-0) (2017).
- Neumann, G. & Kawaoka, Y. The first influenza pandemic of the new millennium. *Influenza Other Respir Viruses* **5**, 157–166 (2011).
- Fukuyama, S. & Kawaoka, Y. The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Curr Opin Immunol* **23**, 481–486 (2011).
- Stertz, S. & Shaw, M. L. Uncovering the global host cell requirements for influenza virus replication via RNAi screening. *Microbes Infect Inst Pasteur* **13**, 516–525 (2011).
- König, R. *et al.* Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* **463**, 813–817 (2010).
- Karlas, A. *et al.* Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* **463**, 818–822 (2010).
- Lane, D. & Levine, A. p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000893 (2010).
- Biegging, K. T., Mello, S. S. & Attardi, L. D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer* **14**, 359–370 (2014).
- Ludwig, S. & Planz, O. Influenza viruses and the NF- $\kappa$ B signaling pathway - towards a novel concept of antiviral therapy. *Biol Chem* **389**, 1307–1312 (2008).
- Ehrhardt, C. & Ludwig, S. A new player in a deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway. *Cell Microbiol* **11**, 863–871 (2009).
- Turpin, E. *et al.* Influenza virus infection increases p53 activity: role of p53 in cell death and viral replication. *J Virol* **79**, 8802–8811 (2005).
- Zhirnov, O. P. & Klenk, H.-D. Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling. *Apoptosis Int J Program Cell Death* **12**, 1419–1432 (2007).
- Shen, Y. *et al.* Influenza A virus induces p53 accumulation in a biphasic pattern. *Biochem Biophys Res Commun* **382**, 331–335 (2009).
- Terrier, O. *et al.* Cellular transcriptional profiling in human lung epithelial cells infected by different subtypes of influenza A viruses reveals an overall down-regulation of the host p53 pathway. *Virology* **432**, 285 (2011).
- Terrier, O. *et al.* Influenza NS1 interacts with p53 and alters its binding to p53-responsive genes, in a promoter-dependent manner. *FEBS Lett* **587**, 2965–2971 (2013).
- Terrier, O. *et al.* Influenza A viruses control expression of proviral human p53 isoforms p53 $\beta$  and Delta133p53 $\alpha$ . *J Virol* **86**, 8452–8460 (2012).
- Ponnuswamy, A., Hupp, T. & Fähræus, R. Concepts in MDM2 Signaling. *Genes Cancer* **3**, 291–297 (2012).
- Park, S.-W. *et al.* Hantaan virus nucleocapsid protein stimulates MDM2-dependent p53 degradation. *J Gen Virol* **94**, 2424–2428 (2013).
- Wang, X. *et al.* Stabilization of p53 in influenza A virus-infected cells is associated with compromised MDM2-mediated ubiquitination of p53. *J Biol Chem* **287**, 18366–18375 (2012).
- Moules, V. *et al.* Importance of viral genomic composition in modulating glycoprotein content on the surface of influenza virus particles. *Virology* **414**, 51–62 (2011).
- Vassilev, L. T. *et al.* *In vivo* activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* **303**, 844–848 (2004).
- Lu, Y. *et al.* Discovery of a nanomolar inhibitor of the human murine double minute 2 (MDM2)-p53 interaction through an integrated, virtual database screening strategy. *J Med Chem* **49**, 3759–3762 (2006).
- Khoo, K. H., Hoe, K. K., Verma, C. S. & Lane, D. P. Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 217–236 (2014).
- Henning, W. *et al.* MDM2 is a target of simian virus 40 in cellular transformation and during lytic infection. *J Virol* **71**, 7609–7618 (1997).
- Santos, C. R., Vega, F. M., Blanco, S., Barcia, R. & Lazo, P. A. The vaccinia virus B1R kinase induces p53 downregulation by an Mdm2-dependent mechanism. *Virology* **328**, 254–265 (2004).
- Haupt, V. J. & Schroeder, M. Old friends in new guise: repositioning of known drugs with structural bioinformatics. *Brief Bioinform* **12**, 312–326 (2011).
- Zhou, X., Liao, J.-M., Liao, W.-J. & Lu, H. Scission of the p53-MDM2 Loop by Ribosomal Proteins. *Genes Cancer* **3**, 298–310 (2012).
- Terrier, O. *et al.* The influenza fingerprints: NS1 and M1 proteins contribute to specific host cell ultrastructure signatures upon infection by different influenza A viruses. *Virology* **432**, 204–218 (2012).
- Terrier, O. *et al.* Nucleolin interacts with influenza A nucleoprotein and contributes to viral ribonucleoprotein complexes nuclear trafficking and efficient influenza viral replication. *Sci Rep* **6**, 29006 (2016).
- Panthu B *et al.* The NS1 protein from influenza virus stimulates translation initiation by enhancing ribosome recruitment to mRNAs. *J Mol Biol*, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.04.007> (2017).
- Gack, M. U. *et al.* Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host Microbe* **5**, 439–449 (2009).
- Zhang, P. *et al.* TRIM25 has a dual function in the p53/Mdm2 circuit. *Oncogene* **34**, 5729–5738 (2015).
- Shin, Y.-K., Liu, Q., Tikoo, S. K., Babuik, L. A. & Zhou, Y. Influenza A virus NS1 protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway by direct interaction with the p85 subunit of PI3K. *J Gen Virol* **88**, 13–18 (2007).
- Muñoz-Fontela, C., Mandinova, A., Aaronson, S. A. & Lee, S. W. Emerging roles of p53 and other tumour-suppressor genes in immune regulation. *Nat Rev Immunol* **16**, 741–750 (2016).
- Lazo, P. A. & Santos, C. R. Interference with p53 functions in human viral infections, a target for novel antiviral strategies? *Rev Med Virol* **21**, 285–300 (2011).
- Bohlman, S. & Manfredi, J. J. p53-independent effects of Mdm2. *Subcell Biochem* **85**, 235–246 (2014).
- Thomasova, D., Mulay, S. R., Bruns, H. & Anders, H.-J. p53-Independent Roles of MDM2 in NF- $\kappa$ B Signaling: Implications for Cancer Therapy, Wound Healing, and Autoimmune Diseases. *Neoplasia N Y N* **14**, 1097–1101 (2012).
- Wurzer, W. J. *et al.* Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation. *EMBO J* **22**, 2717–2728 (2003).
- Moules, V. *et al.* *In vitro* characterization of naturally occurring influenza H3NA- viruses lacking the NA gene segment: toward a new mechanism of viral resistance? *Virology* **404**, 215–224 (2010).
- Juven, T., Barak, Y., Zauberman, A., George, D. L. & Oren, M. Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the *mdm2* gene. *Oncogene* **8**, 3411–3416 (1993).
- Xirodimas, D., Saville, M. K., Edling, C., Lane, D. P. & Lain, S. Different effects of p14ARF on the levels of ubiquitinated p53 and Mdm2 *in vivo*. *Oncogene* **20**, 4972–4983 (2001).

### Acknowledgements

The Authors would like to thank Denis Ressenkoff, CIQLE (Centre Imagerie Quantitative Lyon-Est, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France) for his precious help with confocal microscopy.

### Author Contributions

A.P., J.D., D.M., G.C., A.T., T.J., B.L., J.C.B., M.R.C. and O.T. carried out the experiments and analysis of the results. A.P., G.C., B.L., J.C.B., M.R.C. and O.T. participated to the conception and coordination of the study. A.P., M.R.C. and O.T. designed the study and wrote the manuscript.

### Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22139-6>.

**Competing Interests:** O.T., J.C.B. and M.R.C. are co-inventors of a patent application deposited by University of Dundee, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Claude Bernard Lyon 1 and Hospices Civils de Lyon (FR20100059132 201011105; WO2011FR52575 20111104). The other authors declare that they have no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

# BIBLIOGRAPHIE

1. Dubois J, Cavanagh MH, Terrier O, Hamelin ME, Lina B, Shi R, et al. Mutations in the fusion protein heptad repeat domains of human metapneumovirus impact on the formation of syncytia. *The Journal of general virology*. 2017;98(6):1174-80.
2. Aerts L, Cavanagh MH, Dubois J, Carbonneau J, Rheume C, Lavigne S, et al. Effect of in vitro syncytium formation on the severity of human metapneumovirus disease in a murine model. *PLoS one*. 2015;10(3):e0120283.
3. Dubois J, Terrier O, Rosa-Calatrava M. Influenza viruses and mRNA splicing: doing more with less. *mBio*. 2014;5(3):e00070-14.
4. Terrier O, Carron C, De Chasse B, Dubois J, Traversier A, Julien T, et al. Nucleolin interacts with influenza A nucleoprotein and contributes to viral ribonucleoprotein complexes nuclear trafficking and efficient influenza viral replication. *Scientific reports*. 2016;6:29006.
5. Pizzorno A, Dubois J, Machado D, Cartet G, Traversier A, Julien T, et al. Influenza A viruses alter the stability and antiviral contribution of host E3-ubiquitin ligase Mdm2 during the time-course of infection. *Scientific reports*. 2018;8(1):3746.
6. Mathers CD LA, Murray CJL. The Burden of Disease and Mortality by Condition: Data, Methods, and Results for 2001. In: Lopez AD MC, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJL, editor. *Global Burden of Disease and Risk Factors*. New York: Oxford University Press and the World Bank; 2006. p. 45-93.
7. Fendrick AM, Monto AS, Nightengale B, Sarnes M. The economic burden of non-influenza-related viral respiratory tract infection in the United States. *Archives of internal medicine*. 2003;163(4):487-94.
8. Raymond F, Carbonneau J, Boucher N, Robitaille L, Boisvert S, Wu WK, et al. Comparison of automated microarray detection with real-time PCR assays for detection of respiratory viruses in specimens obtained from children. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(3):743-50.
9. Robinson CC. Respiratory Viruses. In: Steven Spector RLH, Stephen A Young, Danny Wiedbrauk, editor. *Clinical Virology Manual*. Washington, DC: ASM Press; 2009. p. 203-48.

10. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *The New England journal of medicine*. 2009;360(6):588-98.
11. Iwane MK, Edwards KM, Szilagyi PG, Walker FJ, Griffin MR, Weinberg GA, et al. Population-based surveillance for hospitalizations associated with respiratory syncytial virus, influenza virus, and parainfluenza viruses among young children. *Pediatrics*. 2004;113(6):1758-64.
12. Boivin G, De Serres G, Côté S, Gilca R, Abed Y, Rochette L, et al. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerging infectious diseases*. 2003;9(6):634-40.
13. Freymouth F, Vabret A, Legrand L, Etteradossi N, Lafay-Delaire F, Brouard J, et al. Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22(1):92-4.
14. Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *The New England journal of medicine*. 2004;350(5):443-50.
15. Marguet C, Lubrano M, Gueudin M, Le Roux P, Deschildre A, Forget C, et al. In very young infants severity of acute bronchiolitis depends on carried viruses. *PloS one*. 2009;4(2):e4596.
16. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med*. 2001;7(6):719-24.
17. Peret TC, Boivin G, Li Y, Couillard M, Humphrey C, Osterhaus AD, et al. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *The Journal of infectious diseases*. 2002;185(11):1660-3.
18. Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Côté S, et al. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *The Journal of infectious diseases*. 2002;186(9):1330-4.
19. Maertzdorf J, Wang CK, Brown JB, Quinto JD, Chu M, de Graaf M, et al. Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known genetic lineages. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(3):981-6.

20. Collins MS, Gough RE, Lister SA, Chettle N, Eddy R. Further characterisation of a virus associated with turkey rhinotracheitis. *The Veterinary record*. 1986;119(24):606.
21. ICTV ICoToV. Elevation of the paramyxoviral subfamily Pneumovirinae to family status as family Pneumoviridae in the order Mononegavirales; and renaming of one pneumoviral genus. 2015.
22. Rima B, Collins P, Easton A, Fouchier R, Kurath G, Lamb RA, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae. *The Journal of general virology*. 2017.
23. Renshaw R, Laverack M, Zyllich N, Glaser A, Dubovi E. Genomic analysis of a pneumovirus isolated from dogs with acute respiratory disease. *Veterinary microbiology*. 2011;150(1-2):88-95.
24. de Graaf M, Osterhaus AD, Fouchier RA, Holmes EC. Evolutionary dynamics of human and avian metapneumoviruses. *The Journal of general virology*. 2008;89(Pt 12):2933-42.
25. Viazov S, Ratjen F, Scheidhauer R, Fiedler M, Roggendorf M. High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(7):3043-5.
26. Gutsche I, Desfosses A, Effantin G, Ling WL, Haupt M, Ruigrok RW, et al. Structural virology. Near-atomic cryo-EM structure of the helical measles virus nucleocapsid. *Science (New York, NY)*. 2015;348(6235):704-7.
27. Tawar RG, Duquerroy S, Vonrhein C, Varela PF, Damier-Piolle L, Castagne N, et al. Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science (New York, NY)*. 2009;326(5957):1279-83.
28. Feuillet F, Lina B, Rosa-Calatrava M, Boivin G. Ten years of human metapneumovirus research. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2012;53(2):97-105.
29. van den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology*. 2002;295(1):119-32.
30. Spann KM, Tran KC, Chi B, Rabin RL, Collins PL. Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]. *Journal of virology*. 2004;78(8):4363-9.

31. Bastien N, Normand S, Taylor T, Ward D, Peret TC, Boivin G, et al. Sequence analysis of the N, P, M and F genes of Canadian human metapneumovirus strains. *Virus research*. 2003;93(1):51-62.
32. Herfst S, de Graaf M, Schickli JH, Tang RS, Kaur J, Yang CF, et al. Recovery of human metapneumovirus genetic lineages a and B from cloned cDNA. *Journal of virology*. 2004;78(15):8264-70.
33. Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Boivin G, Hanson CT, Murphy BR, Collins PL, et al. Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology*. 2003;315(1):1-9.
34. Boivin G, Mackay I, Sloots TP, Madhi S, Freymuth F, Wolf D, et al. Global genetic diversity of human metapneumovirus fusion gene. *Emerging infectious diseases*. 2004;10(6):1154-7.
35. Ishiguro N, Ebihara T, Endo R, Ma X, Kikuta H, Ishiko H, et al. High genetic diversity of the attachment (G) protein of human metapneumovirus. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(8):3406-14.
36. van den Hoogen BG, Herfst S, Sprong L, Cane PA, Forleo-Neto E, de Swart RL, et al. Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerging infectious diseases*. 2004;10(4):658-66.
37. Papenburg J, Carbonneau J, Isabel S, Bergeron MG, Williams JV, De Serres G, et al. Genetic diversity and molecular evolution of the major human metapneumovirus surface glycoproteins over a decade. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2013;58(3):541-7.
38. van den Hoogen BG, van Doornum GJ, Fockens JC, Cornelissen JJ, Beyer WE, de Groot R, et al. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. *The Journal of infectious diseases*. 2003;188(10):1571-7.
39. Huck B, Scharf G, Neumann-Haefelin D, Puppe W, Weigl J, Falcone V. Novel human metapneumovirus sublineage. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(1):147-50.
40. Skiadopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ, Riggs JM, Surman SR, Amaro-Carambot E, et al. The two major human metapneumovirus genetic lineages are highly related antigenically, and the fusion (F) protein is a major contributor to this antigenic relatedness. *Journal of virology*. 2004;78(13):6927-37.

41. Peret TC, Abed Y, Anderson LJ, Erdman DD, Boivin G. Sequence polymorphism of the predicted human metapneumovirus G glycoprotein. *The Journal of general virology*. 2004;85(Pt 3):679-86.
42. Kim JI, Park S, Lee I, Park KS, Kwak EJ, Moon KM, et al. Genome-Wide Analysis of Human Metapneumovirus Evolution. *PloS one*. 2016;11(4):e0152962.
43. Collins PL, Fearn R, Graham BS. Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. *Current topics in microbiology and immunology*. 2013;372:3-38.
44. Lwamba HC, Alvarez R, Wise MG, Yu Q, Halvorson D, Njenga MK, et al. Comparison of the full-length genome sequence of avian metapneumovirus subtype C with other paramyxoviruses. *Virus research*. 2005;107(1):83-92.
45. Esper F, Martinello RA, Boucher D, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, et al. A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years. *The Journal of infectious diseases*. 2004;189(8):1388-96.
46. Williams JV, Wang CK, Yang CF, Tollefson SJ, House FS, Heck JM, et al. The role of human metapneumovirus in upper respiratory tract infections in children: a 20-year experience. *The Journal of infectious diseases*. 2006;193(3):387-95.
47. Haas LE, Thijsen SF, van Elden L, Heemstra KA. Human metapneumovirus in adults. *Viruses*. 2013;5(1):87-110.
48. Louie JK, Schnurr DP, Pan CY, Kiang D, Carter C, Tougaw S, et al. A summer outbreak of human metapneumovirus infection in a long-term-care facility. *The Journal of infectious diseases*. 2007;196(5):705-8.
49. Peiris JS, Tang WH, Chan KH, Khong PL, Guan Y, Lau YL, et al. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. *Emerging infectious diseases*. 2003;9(6):628-33.
50. Matsuzaki Y, Itagaki T, Ikeda T, Aoki Y, Abiko C, Mizuta K. Human metapneumovirus infection among family members. *Epidemiology and infection*. 2013;141(4):827-32.
51. Kim S, Sung H, Im HJ, Hong SJ, Kim MN. Molecular epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of human metapneumovirus infection in a pediatric hemato-oncology patient population. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(4):1221-4.

52. Kuiken T, van den Hoogen BG, van Riel DA, Laman JD, van Amerongen G, Sprong L, et al. Experimental human metapneumovirus infection of cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) results in virus replication in ciliated epithelial cells and pneumocytes with associated lesions throughout the respiratory tract. *Am J Pathol*. 2004;164(6):1893-900.
53. Talaat KR, Karron RA, Thumar B, McMahon BA, Schmidt AC, Collins PL, et al. Experimental Infection of Adults With Recombinant Wild-Type Human Metapneumovirus. *Journal of Infectious Diseases*. 2013;208(10):1669-78.
54. Aberle SW, Aberle JH, Sandhofer MJ, Pracher E, Popow-Kraupp T. Biennial spring activity of human metapneumovirus in Austria. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27(12):1065-8.
55. Ahmed JA, Katz MA, Auko E, Njenga MK, Weinberg M, Kapella BK, et al. Epidemiology of respiratory viral infections in two long-term refugee camps in Kenya, 2007-2010. *BMC infectious diseases*. 2012;12:7.
56. Banerjee S, Sullender WM, Ahuja RK, Broor S. Seroepidemiological study of human metapneumovirus in New Delhi, India. *Indian journal of medical microbiology*. 2011;29(4):363-7.
57. Ebihara T, Endo R, Kikuta H, Ishiguro N, Yoshioka M, Ma X, et al. Seroprevalence of human metapneumovirus in Japan. *Journal of medical virology*. 2003;70(2):281-3.
58. Esper F, Boucher D, Weibel C, Martinello RA, Kahn JS. Human metapneumovirus infection in the United States: clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. *Pediatrics*. 2003;111(6 Pt 1):1407-10.
59. Feng L, Li Z, Zhao S, Nair H, Lai S, Xu W, et al. Viral etiologies of hospitalized acute lower respiratory infection patients in china, 2009-2013. *PloS one*. 2014;9(6):e99419.
60. Gardinassi LG, Marques Simas PV, Salomao JB, Durigon EL, Zanetta Trevisan DM, Cordeiro JA, et al. Seasonality of viral respiratory infections in southeast of Brazil: the influence of temperature and air humidity. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*. 2012;43(1):98-108.
61. IJpma F, Beekhuis D, Cotton MF, Pieper CH, Kimpfen JL, van den Hoogen BG, et al. Human metapneumovirus infection in hospital referred South African children. *Journal of medical virology*. 2004;73(3):486-93.

62. Ljubin Sternak S, Vilibic Cavlek T, Falsey AR, Walsh EE, Mlinaric Galinovic G. Serosurvey of human metapneumovirus infection in Croatia. *Croatian medical journal*. 2006;47(6):878-81.
63. Lu G, Gonzalez R, Guo L, Wu C, Wu J, Vernet G, et al. Large-scale seroprevalence analysis of human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus infections in Beijing, China. *Virology journal*. 2011;8:62.
64. McCracken JP, Arvelo W, Ortiz J, Reyes L, Gray J, Estevez A, et al. Comparative epidemiology of human metapneumovirus- and respiratory syncytial virus-associated hospitalizations in Guatemala. *Influenza and other respiratory viruses*. 2014;8(4):414-21.
65. Njouom R, Yekwa EL, Cappy P, Vabret A, Boisier P, Rousset D. Viral etiology of influenza-like illnesses in Cameroon, January-December 2009. *The Journal of infectious diseases*. 2012;206 Suppl 1:S29-35.
66. Regev L, Hindiyeh M, Shulman LM, Barak A, Levy V, Azar R, et al. Characterization of human metapneumovirus infections in Israel. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(4):1484-9.
67. Turner P, Turner C, Watthanaworawit W, Carrara V, Cicelia N, Deglise C, et al. Respiratory virus surveillance in hospitalised pneumonia patients on the Thailand-Myanmar border. *BMC infectious diseases*. 2013;13:434.
68. Yahia S, Kandeel AY, Hammad E, El-Gilany AH. Human metapneumovirus (hMPV) in acute respiratory infection: a clinic-based study in Egypt. *Indian journal of pediatrics*. 2012;79(10):1323-7.
69. Chano F, Rousseau C, Laferriere C, Couillard M, Charest H. Epidemiological survey of human metapneumovirus infection in a large pediatric tertiary care center. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(11):5520-5.
70. Kahn JS. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(3):546-57.
71. Ali A, Khowaja AR, Bashir MZ, Aziz F, Mustafa S, Zaidi A. Role of human metapneumovirus, influenza A virus and respiratory syncytial virus in causing WHO-defined severe pneumonia in children in a developing country. *PloS one*. 2013;8(9):e74756.
72. Litwin CM, Bosley JG. Seasonality and prevalence of respiratory pathogens detected by multiplex PCR at a tertiary care medical center. *Archives of virology*. 2014;159(1):65-72.

73. Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Matsuzaki Y, Itagaki T, et al. Seasonal patterns of respiratory syncytial virus, influenza A virus, human metapneumovirus, and parainfluenza virus type 3 infections on the basis of virus isolation data between 2004 and 2011 in Yamagata, Japan. *Japanese journal of infectious diseases*. 2013;66(2):140-5.
74. Aberle JH, Aberle SW, Redlberger-Fritz M, Sandhofer MJ, Popow-Kraupp T. Human metapneumovirus subgroup changes and seasonality during epidemics. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29(11):1016-8.
75. Robinson JL, Lee BE, Bastien N, Li Y. Seasonality and clinical features of human metapneumovirus infection in children in Northern Alberta. *Journal of medical virology*. 2005;76(1):98-105.
76. Pabbaraju K, Wong S, McMillan T, Lee BE, Fox JD. Diagnosis and epidemiological studies of human metapneumovirus using real-time PCR. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2007;40(3):186-92.
77. Madhi SA, Ludewick H, Kuwanda L, van Niekerk N, Cutland C, Klugman KP. Seasonality, incidence, and repeat human metapneumovirus lower respiratory tract infections in an area with a high prevalence of human immunodeficiency virus type-1 infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26(8):693-9.
78. Zappa A, Canuti M, Frati E, Pariani E, Perin S, Ruzza ML, et al. Co-circulation of genetically distinct human metapneumovirus and human bocavirus strains in young children with respiratory tract infections in Italy. *Journal of medical virology*. 2011;83(1):156-64.
79. Abrego LE, Mirazo S, Delfraro A, Franco D, Castillo M, Gaitan M, et al. Genotypes of Human Metapneumovirus circulating during 2010-2012 in children from Panama. *Journal of medical virology*. 2017.
80. Reiche J, Jacobsen S, Neubauer K, Hafemann S, Nitsche A, Milde J, et al. Human metapneumovirus: insights from a ten-year molecular and epidemiological analysis in Germany. *PloS one*. 2014;9(2):e88342.
81. Dunn SR, Ryder AB, Tollefson SJ, Xu M, Saville BR, Williams JV. Seroepidemiologies of Human Metapneumovirus and Respiratory Syncytial Virus in Young Children, Determined with a New Recombinant Fusion Protein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2013;20(10):1654-6.

82. Ebihara T, Endo R, Kikuta H, Ishiguro N, Ishiko H, Kobayashi K. Comparison of the seroprevalence of human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus. *Journal of medical virology*. 2004;72(2):304-6.
83. Zhang Q, Yang XQ, Zhao Y, Zhao XD. High seroprevalence of human metapneumovirus infection in children in Chongqing, China. *Chinese medical journal*. 2008;121(21):2162-6.
84. Liu L, Bastien N, Sidaway F, Chan E, Li Y. Seroprevalence of human metapneumovirus (hMPV) in the Canadian province of Saskatchewan analyzed by a recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of medical virology*. 2007;79(3):308-13.
85. Leung J, Esper F, Weibel C, Kahn JS. Seroepidemiology of human metapneumovirus (hMPV) on the basis of a novel enzyme-linked immunosorbent assay utilizing hMPV fusion protein expressed in recombinant vesicular stomatitis virus. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(3):1213-9.
86. Lusebrink J, Wiese C, Thiel A, Tillmann RL, Ditt V, Muller A, et al. High seroprevalence of neutralizing capacity against human metapneumovirus in all age groups studied in Bonn, Germany. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2010;17(3):481-4.
87. Hamelin ME, Cote S, Laforge J, Lampron N, Bourbeau J, Weiss K, et al. Human metapneumovirus infection in adults with community-acquired pneumonia and exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005;41(4):498-502.
88. Boivin G, De Serres G, Hamelin ME, Côté S, Argouin M, Tremblay G, et al. An outbreak of severe respiratory tract infection due to human metapneumovirus in a long-term care facility. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007;44(9):1152-8.
89. Apostoli P, Zicari S, Lo Presti A, Ciccozzi M, Ciotti M, Caruso A, et al. Human metapneumovirus-associated hospital admissions over five consecutive epidemic seasons: evidence for alternating circulation of different genotypes. *Journal of medical virology*. 2012;84(3):511-6.
90. da Silva ER, Pitrez MC, Arruda E, Mattiello R, Sarria EE, de Paula FE, et al. Severe lower respiratory tract infection in infants and toddlers from a non-affluent population: viral etiology and co-detection as risk factors. *BMC infectious diseases*. 2013;13:41.

91. Edwards KM, Zhu Y, Griffin MR, Weinberg GA, Hall CB, Szilagyi PG, et al. Burden of human metapneumovirus infection in young children. *The New England journal of medicine*. 2013;368(7):633-43.
92. Garcia-Garcia ML, Calvo C, Pozo F, Villadangos PA, Perez-Brena P, Casas I. Spectrum of respiratory viruses in children with community-acquired pneumonia. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(8):808-13.
93. Papenburg J, Hamelin ME, Ouhoumane N, Carbonneau J, Ouakki M, Raymond F, et al. Comparison of risk factors for human metapneumovirus and respiratory syncytial virus disease severity in young children. *The Journal of infectious diseases*. 2012;206(2):178-89.
94. Wang Y, Chen Z, Yan YD, Guo H, Chu C, Liu J, et al. Seasonal distribution and epidemiological characteristics of human metapneumovirus infections in pediatric inpatients in Southeast China. *Archives of virology*. 2013;158(2):417-24.
95. Bosis S, Esposito S, Niesters HG, Crovari P, Osterhaus AD, Principi N. Impact of human metapneumovirus in childhood: comparison with respiratory syncytial virus and influenza viruses. *Journal of medical virology*. 2005;75(1):101-4.
96. Papenburg J, Boivin G. The distinguishing features of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *Reviews in medical virology*. 2010;20(4):245-60.
97. Nokso-Koivisto J, Pyles RB, Miller AL, Patel JA, Loeffelholz M, Chonmaitree T. Viral load and acute otitis media development after human metapneumovirus upper respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(7):763-6.
98. Schildgen O, Geikowski T, Glatzel T, Schuster J, Simon A. Frequency of human metapneumovirus in the upper respiratory tract of children with symptoms of an acute otitis media. *European journal of pediatrics*. 2005;164(6):400-1.
99. Heikkinen T, Osterback R, Peltola V, Jartti T, Vainionpaa R. Human metapneumovirus infections in children. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(1):101-6.
100. Williams JV, Tollefson SJ, Nair S, Chonmaitree T. Association of human metapneumovirus with acute otitis media. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 2006;70(7):1189-93.
101. Suzuki A, Watanabe O, Okamoto M, Endo H, Yano H, Suetake M, et al. Detection of human metapneumovirus from children with acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24(7):655-7.

102. Mullins JA, Erdman DD, Weinberg GA, Edwards K, Hall CB, Walker FJ, et al. Human metapneumovirus infection among children hospitalized with acute respiratory illness. *Emerging infectious diseases*. 2004;10(4):700-5.
103. Akhras N, Weinberg JB, Newton D. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus: subtle differences but comparable severity. *Infectious disease reports*. 2010;2(2):e12.
104. Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ, Walsh EE. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *The Journal of infectious diseases*. 2003;187(5):785-90.
105. Walsh EE, Peterson DR, Falsey AR. Human metapneumovirus infections in adults: another piece of the puzzle. *Archives of internal medicine*. 2008;168(22):2489-96.
106. Widmer K, Zhu Y, Williams JV, Griffin MR, Edwards KM, Talbot HK. Rates of hospitalizations for respiratory syncytial virus, human metapneumovirus, and influenza virus in older adults. *The Journal of infectious diseases*. 2012;206(1):56-62.
107. Stockton J, Stephenson I, Fleming D, Zambon M. Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. *Emerging infectious diseases*. 2002;8(9):897-901.
108. Zwaans WA, Mallia P, van Winden ME, Rohde GG. The relevance of respiratory viral infections in the exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease-a systematic review. *J Clin Virol*. 2014;61(2):181-8.
109. Johnstone J, Majumdar SR, Fox JD, Marrie TJ. Human metapneumovirus pneumonia in adults: results of a prospective study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;46(4):571-4.
110. Johnstone J, Majumdar SR, Fox JD, Marrie TJ. Viral infection in adults hospitalized with community-acquired pneumonia: prevalence, pathogens, and presentation. *Chest*. 2008;134(6):1141-8.
111. Liao RS, Appelgate DM, Pelz RK. An outbreak of severe respiratory tract infection due to human metapneumovirus in a long-term care facility for the elderly in Oregon. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2012;53(2):171-3.
112. Te Wierik MJ, Nguyen DT, Beersma MF, Thijsen SF, Heemstra KA. An outbreak of severe respiratory tract infection caused by human metapneumovirus in a

residential care facility for elderly in Utrecht, the Netherlands, January to March 2010. 2012 1025-496x Contract No.: 13.

113. Falsey AR. Human metapneumovirus infection in adults. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27(10 Suppl):S80-3.

114. Ibrahim S, Scott M, Bixler D, Pedersen R, Tripp J, Carter K, et al. Outbreaks of human metapneumovirus in two skilled nursing facilities -West Virginia and Idaho, 2011-2012. Centre for Disease Control and Prevention, 2013 Nov 22. Report No.: 0149-2195 Contract No.: 46.

115. Souza JS, Watanabe A, Carraro E, Granato C, Bellei N. Severe metapneumovirus infections among immunocompetent and immunocompromised patients admitted to hospital with respiratory infection. *Journal of medical virology*. 2013;85(3):530-6.

116. Haas LE, de Rijk NX, Thijsen SF. Human metapneumovirus infections on the ICU: a report of three cases. *Annals of intensive care*. 2012;2(1):30.

117. Sumino KC, Agapov E, Pierce RA, Trulock EP, Pfeifer JD, Ritter JH, et al. Detection of severe human metapneumovirus infection by real-time polymerase chain reaction and histopathological assessment. *The Journal of infectious diseases*. 2005;192(6):1052-60.

118. Chan PK, Tam JS, Lam CW, Chan E, Wu A, Li CK, et al. Human metapneumovirus detection in patients with severe acute respiratory syndrome. *Emerging infectious diseases*. 2003;9(9):1058-63.

119. Talaat KR, Karron RA, Thumar B, McMahon BA, Schmidt AC, Collins PL, et al. Experimental infection of adults with recombinant wild-type human metapneumovirus. *J Infect Dis*. 2013;208(10):1669-78.

120. Agapov E, Sumino KC, Gaudreault-Keener M, Storch GA, Holtzman MJ. Genetic variability of human metapneumovirus infection: evidence of a shift in viral genotype without a change in illness. *The Journal of infectious diseases*. 2006;193(3):396-403.

121. Vicente D, Montes M, Cilla G, Perez-Yarza EG, Perez-Trallero E. Differences in clinical severity between genotype A and genotype B human metapneumovirus infection in children. *Clin Infect Dis*. 2006;42(12):e111-3.

122. Pitoiset C, Darniot M, Huet F, Aho SL, Pothier P, Manoha C. Human metapneumovirus genotypes and severity of disease in young children (n = 100) during

a 7-year study in Dijon hospital, France. *Journal of medical virology*. 2010;82(10):1782-9.

123. Semple MG, Cowell A, Dove W, Greensill J, McNamara PS, Halfhide C, et al. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *The Journal of infectious diseases*. 2005;191(3):382-6.

124. Wolf DG, Greenberg D, Kalkstein D, Shemer-Avni Y, Givon-Lavi N, Saleh N, et al. Comparison of human metapneumovirus, respiratory syncytial virus and influenza A virus lower respiratory tract infections in hospitalized young children. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25(4):320-4.

125. Papenburg J, Hamelin M-E, Ouhoumane N, Carbonneau J, Ouakki M, Raymond F, et al. Comparison of risk factors for human metapneumovirus and respiratory syncytial virus disease severity in young children. *J infect Dis* **In press**. 2011.

126. Moe N, Krokstad S, Stenseng IH, Christensen A, Skanke LH, Risnes KR, et al. Comparing Human Metapneumovirus and Respiratory Syncytial Virus: Viral Co-Detections, Genotypes and Risk Factors for Severe Disease. *PloS one*. 2017;12(1):e0170200.

127. Hahn A, Wang W, Jaggi P, Dvorchik I, Ramilo O, Koranyi K, et al. Human metapneumovirus infections are associated with severe morbidity in hospitalized children of all ages. *Epidemiology and infection*. 2013;141(10):2213-23.

128. Edwards KM, Zhu Y, Griffin MR, Weinberg GA, Hall CB, Szilagyi PG, et al. Burden of Human Metapneumovirus Infection in Young Children. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(7):633-43.

129. Spaeder MC, Custer JW, Bembea MM, Aganga DO, Song X, Scafidi S. A multicenter outcomes analysis of children with severe viral respiratory infection due to human metapneumovirus. *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies*. 2013;14(3):268-72.

130. Eggleston HA, Gunville CF, Miller JI, Sontag MK, Mourani PM. A comparison of characteristics and outcomes in severe human metapneumovirus and respiratory syncytial virus infections in children treated in an intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(12):1330-4.

131. Ali M, Baker JM, Richardson SE, Weitzman S, Allen U, Abla O. Human metapneumovirus (hMPV) infection in children with cancer. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2013;35(6):444-6.
132. McAdam AJ, Hasenbein ME, Feldman HA, Cole SE, Offermann JT, Riley AM, et al. Human metapneumovirus in children tested at a tertiary-care hospital. *The Journal of infectious diseases*. 2004;190(1):20-6.
133. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acids research*. 2014;42(Web Server issue):W252-8.
134. Bosis S, Esposito S, Osterhaus ADME, Tremolati E, Begliatti E, Tagliabue C, et al. Association between high nasopharyngeal viral load and disease severity in children with human metapneumovirus infection. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2008;42(3):286-90.
135. Roussy J-F, Carbonneau J, Ouakki M, Papenburg J, Hamelin M-È, De Serres G, et al. Human metapneumovirus viral load is an important risk factor for disease severity in young children. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2014;60(2):133-40.
136. Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerging infectious diseases*. 2003;9(3):372-5.
137. Pilger DA, Cantarelli VV, Amantea SL, Leistner-Segal S. Detection of human bocavirus and human metapneumovirus by real-time PCR from patients with respiratory symptoms in Southern Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2011;106(1):56-60.
138. Fathima S, Lee BE, May-Hadford J, Mukhi S, Drews SJ. Use of an innovative web-based laboratory surveillance platform to analyze mixed infections between human metapneumovirus (hMPV) and other respiratory viruses circulating in Alberta (AB), Canada (2009-2012). *Viruses*. 2012;4(11):2754-65.
139. Esposito S, Daleno C, Prunotto G, Scala A, Tagliabue C, Borzani I, et al. Impact of viral infections in children with community-acquired pneumonia: results of a study of 17 respiratory viruses. *Influenza and other respiratory viruses*. 2013;7(1):18-26.
140. Kaida A, Kubo H, Goto K, Shiomi M, Kohdera U, Iritani N. Co-infection of human metapneumovirus with adenovirus or respiratory syncytial virus among children in Japan. *Microbiology and immunology*. 2007;51(7):679-83.

141. Seki M, Yoshida H, Gotoh K, Hamada N, Motooka D, Nakamura S, et al. Severe respiratory failure due to co-infection with human metapneumovirus and *Streptococcus pneumoniae*. *Respiratory medicine case reports*. 2014;12:13-5.
142. McNamara PS, Flanagan BF, Smyth RL, Hart CA. Impact of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus co-infection in severe bronchiolitis. *Pediatric Pulmonology*. 2007;42(8):740-3.
143. Lin PY, Lin TY, Huang YC, Tsao KC, Huang YL. Human metapneumovirus and community-acquired pneumonia in children. *Chang Gung medical journal*. 2005;28(10):683-8.
144. van Woensel JB, Bos AP, Lutter R, Rossen JW, Schuurman R. Absence of human metapneumovirus co-infection in cases of severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatric pulmonology*. 2006;41(9):872-4.
145. Foulongne V, Guyon G, Rodiere M, Segondy M. Human metapneumovirus infection in young children hospitalized with respiratory tract disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25(4):354-9.
146. Lazar I, Weibel C, Dziura J, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. Human metapneumovirus and severity of respiratory syncytial virus disease. *Emerging infectious diseases*. 2004;10(7):1318-20.
147. Konig B, Konig W, Arnold R, Werchau H, Ihorst G, Forster J. Prospective study of human metapneumovirus infection in children less than 3 years of age. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(10):4632-5.
148. Xepapadaki P, Psarras S, Bossios A, Tsolia M, Gourgiotis D, Liapi-Adamidou G, et al. Human metapneumovirus as a causative agent of acute bronchiolitis in infants. *Journal of Clinical Virology*. 2004;30(3):267-70.
149. Maggi F, Pifferi M, Vatteroni M, Fornai C, Tempestini E, Anzilotti S, et al. Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(7):2987-91.
150. Canducci F, Debiaggi M, Sampalo M, Marinozzi MC, Berrè S, Terulla C, et al. Two-year prospective study of single infections and co-infections by respiratory syncytial virus and viruses identified recently in infants with acute respiratory disease. *Journal of Medical Virology*. 2008;80(4):716-23.
151. Verkaik NJ, Nguyen DT, de Vogel CP, Moll HA, Verbrugh HA, Jaddoe VW, et al. *Streptococcus pneumoniae* exposure is associated with human metapneumovirus

seroconversion and increased susceptibility to in vitro HMPV infection. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2011;17(12):1840-4.

152. Kukavica-Ibrulj I, Hamelin ME, Prince GA, Gagnon C, Bergeron Y, Bergeron MG, et al. Infection with human metapneumovirus predisposes mice to severe pneumococcal pneumonia. *Journal of virology*. 2009;83(3):1341-9.

153. Shachor-Meyouhas Y, Ben-Barak A, Kassis I. Treatment with oral ribavirin and IVIG of severe human metapneumovirus pneumonia (HMPV) in immune compromised child. *Pediatric blood & cancer*. 2011;57(2):350-1.

154. Dokos C, Masjosthusmann K, Rellensmann G, Werner C, Schuler-Luttmann S, Muller KM, et al. Fatal human metapneumovirus infection following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2013;15(3):E97-e101.

155. Abed Y, Boivin G. Human metapneumovirus infection in immunocompromised child. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(5):854-6.

156. Kitanovski L, Kopriva S, Pokorn M, Dolnicar MB, Rajic V, Stefanovic M, et al. Treatment of severe human metapneumovirus (hMPV) pneumonia in an immunocompromised child with oral ribavirin and IVIG. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2013;35(7):e311-3.

157. Pelletier G, Déry P, Abed Y, Boivin G. Respiratory tract reinfections by the new human Metapneumovirus in an immunocompromised child. *Emerging infectious diseases*. 2002;8(9):976-8.

158. Larcher C, Geltner C, Fischer H, Nachbaur D, Muller LC, Huemer HP. Human metapneumovirus infection in lung transplant recipients: clinical presentation and epidemiology. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(11):1891-901.

159. Englund JA, Boeckh M, Kuypers J, Nichols WG, Hackman RC, Morrow RA, et al. Brief communication: fatal human metapneumovirus infection in stem-cell transplant recipients. *Annals of internal medicine*. 2006;144(5):344-9.

160. Renaud C, Xie H, Seo S, Kuypers J, Cent A, Corey L, et al. Mortality rates of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus lower respiratory tract infections in hematopoietic cell transplantation recipients. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2013;19(8):1220-6.

161. Rudd PA, Thomas BJ, Zaid A, MacDonald M, Kan OK, Rolph MS, et al. Role of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus in asthma exacerbations: where are we now? *Clinical science*. 2017;131(14):1713-21.
162. Seo KH, Bae DJ, Kim JN, Lee HS, Kim YH, Park JS, et al. Prevalence of Respiratory Viral Infections in Korean Adult Asthmatics With Acute Exacerbations: Comparison With Those With Stable State. *Allergy, asthma & immunology research*. 2017;9(6):491-8.
163. Jartti T, van den Hoogen B, Garofalo RP, Osterhaus AD, Ruuskanen O. Metapneumovirus and acute wheezing in children. *Lancet*. 2002;360(9343):1393-4.
164. Williams JV, Martino R, Rabella N, Otegui M, Parody R, Heck JM, et al. A prospective study comparing human metapneumovirus with other respiratory viruses in adults with hematologic malignancies and respiratory tract infections. *The Journal of infectious diseases*. 2005;192(6):1061-5.
165. Rawlinson WD, Waliuzzaman Z, Carter IW, Belessis YC, Gilbert KM, Morton JR. Asthma exacerbations in children associated with rhinovirus but not human metapneumovirus infection. *The Journal of infectious diseases*. 2003;187(8):1314-8.
166. Williams JV, Tollefson SJ, Heymann PW, Carper HT, Patrie J, Crowe Jr JE. Human metapneumovirus infection in children hospitalized for wheezing. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005;115(6):1311-2.
167. Schildgen O, Wilkesmann A, Simon A. Wheezing in patients with human metapneumovirus infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006;117(1):223.
168. Garcia-Garcia ML, Calvo C, Casas I, Bracamonte T, Rellan A, Gozalo F, et al. Human metapneumovirus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma at age 5. *Pediatric pulmonology*. 2007;42(5):458-64.
169. Bedolla-Barajas M, Montero H, Morales-Romero J, Landa-Cardena A, Diaz J, Delgado-Figueroa N, et al. Prevalence of respiratory viruses in wheezing children not older than 24 months of age. *Gaceta medica de Mexico*. 2017;153(3):329-34.
170. Jokela P, Piiparinen H, Luiro K, Lappalainen M. Detection of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by duplex real-time RT-PCR assay in comparison with direct fluorescent assay. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2010;16(10):1568-73.

171. Mackay IM, Jacob KC, Woolhouse D, Waller K, Symmis MW, Whitley DM, et al. Molecular assays for detection of human metapneumovirus. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(1):100-5.
172. Lemaitre E, Allee C, Vabret A, Etteradossi N, Brown PA. Single reaction, real time RT-PCR detection of all known avian and human metapneumoviruses. *Journal of virological methods*. 2018;251:61-8.
173. Buchholz UJ, Biacchesi S, Pham QN, Tran KC, Yang L, Luongo CL, et al. Deletion of M2 gene open reading frames 1 and 2 of human metapneumovirus: effects on RNA synthesis, attenuation, and immunogenicity. *Journal of virology*. 2005;79(11):6588-97.
174. Biacchesi S, Pham QN, Skiadopoulos MH, Murphy BR, Collins PL, Buchholz UJ. Infection of nonhuman primates with recombinant human metapneumovirus lacking the SH, G, or M2-2 protein categorizes each as a nonessential accessory protein and identifies vaccine candidates. *Journal of virology*. 2005;79(19):12608-13.
175. Oliveira AP, Simabuco FM, Tamura RE, Guerrero MC, Ribeiro PG, Libermann TA, et al. Human respiratory syncytial virus N, P and M protein interactions in HEK-293T cells. *Virus research*. 2013;177(1):108-12.
176. Renner M, Bertinelli M, Leyrat C, Paesen GC, Saraiva de Oliveira LF, Huiskonen JT, et al. Nucleocapsid assembly in pneumoviruses is regulated by conformational switching of the N protein. *eLife*. 2016;5:e12627.
177. Krokhin O, Li Y, Andonov A, Feldmann H, Flick R, Jones S, et al. Mass spectrometric characterization of proteins from the SARS virus: a preliminary report. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2003;2(5):346-56.
178. El Omari K, Dhaliwal B, Ren J, Abrescia NG, Lockyer M, Powell KL, et al. Structures of respiratory syncytial virus nucleocapsid protein from two crystal forms: details of potential packing interactions in the native helical form. *Acta crystallographica Section F, Structural biology and crystallization communications*. 2011;67(Pt 10):1179-83.
179. Leyrat C, Renner M, Harlos K, Grimes JM. Solution and crystallographic structures of the central region of the phosphoprotein from human metapneumovirus. *PLoS one*. 2013;8(11):e80371.
180. Sourimant J, Rameix-Welti MA, Gaillard AL, Chevret D, Galloux M, Gault E, et al. Fine mapping and characterization of the L-polymerase-binding domain of the respiratory syncytial virus phosphoprotein. *Journal of virology*. 2015;89(8):4421-33.

181. Ling R, Davis PJ, Yu Q, Wood CM, Pringle CR, Cavanagh D, et al. Sequence and in vitro expression of the phosphoprotein gene of avian pneumovirus. *Virus research*. 1995;36(2-3):247-57.
182. Fearn R, Peeples ME, Collins PL. Increased expression of the N protein of respiratory syncytial virus stimulates minigenome replication but does not alter the balance between the synthesis of mRNA and antigenome. *Virology*. 1997;236(1):188-201.
183. Leyrat C, Yabukarski F, Tarbouriech N, Ribeiro EA, Jr., Jensen MR, Blackledge M, et al. Structure of the vesicular stomatitis virus N(0)-P complex. *PLoS pathogens*. 2011;7(9):e1002248.
184. Guryanov SG, Liljeroos L, Kasaragod P, Kajander T, Butcher SJ. Crystal Structure of the Measles Virus Nucleoprotein Core in Complex with an N-Terminal Region of Phosphoprotein. *Journal of virology*. 2015;90(6):2849-57.
185. Leung DW, Borek D, Luthra P, Binning JM, Anantpadma M, Liu G, et al. An Intrinsically Disordered Peptide from Ebola Virus VP35 Controls Viral RNA Synthesis by Modulating Nucleoprotein-RNA Interactions. *Cell reports*. 2015;11(3):376-89.
186. Yabukarski F, Lawrence P, Tarbouriech N, Bourhis JM, Delaforge E, Jensen MR, et al. Structure of Nipah virus unassembled nucleoprotein in complex with its viral chaperone. *Nature structural & molecular biology*. 2014;21(9):754-9.
187. Leyrat C, Renner M, Harlos K, Huiskonen JT, Grimes JM. Drastic changes in conformational dynamics of the antiterminator M2-1 regulate transcription efficiency in Pneumovirinae. *eLife*. 2014;3:e02674.
188. Esperante SA, Paris G, de Prat-Gay G. Modular unfolding and dissociation of the human respiratory syncytial virus phosphoprotein p and its interaction with the m(2-1) antiterminator: a singular tetramer-tetramer interface arrangement. *Biochemistry*. 2012;51(41):8100-10.
189. Li J, Rahmeh A, Morelli M, Whelan SP. A conserved motif in region v of the large polymerase proteins of nonsegmented negative-sense RNA viruses that is essential for mRNA capping. *Journal of virology*. 2008;82(2):775-84.
190. Zhang Y, Wei Y, Zhang X, Cai H, Niewiesk S, Li J. Rational design of human metapneumovirus live attenuated vaccine candidates by inhibiting viral mRNA cap methyltransferase. *Journal of virology*. 2014;88(19):11411-29.
191. Blondot ML, Dubosclard V, Fix J, Lassoued S, Aumont-Nicaise M, Bontems F, et al. Structure and functional analysis of the RNA- and viral phosphoprotein-binding

domain of respiratory syncytial virus M2-1 protein. *PLoS pathogens*. 2012;8(5):e1002734.

192. Kitagawa Y, Zhou M, Yamaguchi M, Komatsu T, Takeuchi K, Itoh M, et al. Human metapneumovirus M2-2 protein inhibits viral transcription and replication. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2010;12(2):135-45.

193. Leyrat C, Renner M, Harlos K, Huiskonen Juha T, Grimes Jonathan M. Structure and Self-Assembly of the Calcium Binding Matrix Protein of Human Metapneumovirus. *Structure*. 2014;22(1):136-48.

194. Amarasinghe GK, Dutch RE. A calcium-fortified viral matrix protein. *Structure*. 2014;22(1):5-7.

195. Sabo Y, Ehrlich M, Bacharach E. The conserved YAGL motif in human metapneumovirus is required for higher-order cellular assemblies of the matrix protein and for virion production. *Journal of virology*. 2011;85(13):6594-609.

196. Bagnaud-Baule A, Reynard O, Perret M, Berland JL, Maache M, Peyrefitte C, et al. The human metapneumovirus matrix protein stimulates the inflammatory immune response in vitro. *PloS one*. 2011;6(3):e17818.

197. Loo LH, Jumat MR, Fu Y, Ayi TC, Wong PS, Tee NW, et al. Evidence for the interaction of the human metapneumovirus G and F proteins during virus-like particle formation. *Virology journal*. 2013;10:294.

198. Cox RG, Erickson JJ, Hastings AK, Becker JC, Johnson M, Craven RE, et al. Human metapneumovirus virus-like particles induce protective B and T cell responses in a mouse model. *Journal of virology*. 2014;88(11):6368-79.

199. Cox RG, Livesay SB, Johnson M, Ohi MD, Williams JV. The human metapneumovirus fusion protein mediates entry via an interaction with RGD-binding integrins. *Journal of virology*. 2012;86(22):12148-60.

200. Aerts L, Rheaume C, Carbonneau J, Lavigne S, Couture C, Hamelin ME, et al. Adjuvant effect of the human metapneumovirus (HMPV) matrix protein in HMPV subunit vaccines. *The Journal of general virology*. 2015;96(Pt 4):767-74.

201. Harrison SC. Viral membrane fusion. *Virology*. 2015;479-480:498-507.

202. Yang CF, Wang CK, Tollefson SJ, Piyaratna R, Lintao LD, Chu M, et al. Genetic diversity and evolution of human metapneumovirus fusion protein over twenty years. *Virology journal*. 2009;6:138.

203. Cox R, Williams J. Breaking In: Human Metapneumovirus Fusion and Entry. *Viruses*. 2013;5(1):192-210.
204. Chang A, Dutch RE. Paramyxovirus fusion and entry: multiple paths to a common end. *Viruses*. 2012;4(4):613-36.
205. de Graaf M, Schrauwen EJ, Herfst S, van Amerongen G, Osterhaus AD, Fouchier RA. Fusion protein is the main determinant of metapneumovirus host tropism. *The Journal of general virology*. 2009;90(Pt 6):1408-16.
206. Cseke G, Maginnis MS, Cox RG, Tollefson SJ, Podsiad AB, Wright DW, et al. Integrin  $\alpha\beta 1$  promotes infection by human metapneumovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(5):1566-71.
207. Skiadopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ, Amaro-Carambot E, Surman SR, Collins PL, et al. Individual contributions of the human metapneumovirus F, G, and SH surface glycoproteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity. *Virology*. 2006;345(2):492-501.
208. Schowalter RM, Smith SE, Dutch RE. Characterization of human metapneumovirus F protein-promoted membrane fusion: critical roles for proteolytic processing and low pH. *Journal of virology*. 2006;80(22):10931-41.
209. Dutch RE, Jardetzky TS, Lamb RA. Virus membrane fusion proteins: biological machines that undergo a metamorphosis. *Bioscience reports*. 2000;20(6):597-612.
210. Schickli JH, Kaur J, Ulbrandt N, Spaete RR, Tang RS. An S101P substitution in the putative cleavage motif of the human metapneumovirus fusion protein is a major determinant for trypsin-independent growth in vero cells and does not alter tissue tropism in hamsters. *Journal of virology*. 2005;79(16):10678-89.
211. Biacchesi S, Pham QN, Skiadopoulos MH, Murphy BR, Collins PL, Buchholz UJ. Modification of the trypsin-dependent cleavage activation site of the human metapneumovirus fusion protein to be trypsin independent does not increase replication or spread in rodents or nonhuman primates. *Journal of virology*. 2006;80(12):5798-806.
212. Cox RG, Williams JV. Breaking in: human metapneumovirus fusion and entry. *Viruses*. 2013;5(1):192-210.
213. Kielian M, Rey FA. Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nature reviews Microbiology*. 2006;4(1):67-76.

214. Cseke G, Maginnis MS, Cox RG, Tollefson SJ, Podsiad AB, Wright DW, et al. Integrin alphavbeta1 promotes infection by human metapneumovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(5):1566-71.
215. Herfst S, Mas V, Ver LS, Wierda RJ, Osterhaus AD, Fouchier RA, et al. Low-pH-induced membrane fusion mediated by human metapneumovirus F protein is a rare, strain-dependent phenomenon. *Journal of virology*. 2008;82(17):8891-5.
216. Schowalter RM, Chang A, Robach JG, Buchholz UJ, Dutch RE. Low-pH triggering of human metapneumovirus fusion: essential residues and importance in entry. *Journal of virology*. 2009;83(3):1511-22.
217. Chang A, Masante C, Buchholz UJ, Dutch RE. Human metapneumovirus (HMPV) binding and infection are mediated by interactions between the HMPV fusion protein and heparan sulfate. *Journal of virology*. 2012;86(6):3230-43.
218. Thammawat S, Sadlon TA, Hallsworth PG, Gordon DL. Role of cellular glycosaminoglycans and charged regions of viral G protein in human metapneumovirus infection. *Journal of virology*. 2008;82(23):11767-74.
219. Ulbrandt ND, Ji H, Patel NK, Riggs JM, Brewah YA, Ready S, et al. Isolation and characterization of monoclonal antibodies which neutralize human metapneumovirus in vitro and in vivo. *Journal of virology*. 2006;80(16):7799-806.
220. Ulbrandt ND, Ji H, Patel NK, Barnes AS, Wilson S, Kiener PA, et al. Identification of antibody neutralization epitopes on the fusion protein of human metapneumovirus. *The Journal of general virology*. 2008;89(Pt 12):3113-8.
221. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. The IMpact-RSV Study Group. *Pediatrics*. 1998;102(3 Pt 1):531-7.
222. Yang CF, Wang CK, Tollefson SJ, Lintao LD, Liem A, Chu M, et al. Human metapneumovirus G protein is highly conserved within but not between genetic lineages. *Archives of virology*. 2013;158(6):1245-52.
223. Leyrat C, Paesen GC, Charleston J, Renner M, Grimes JM. Structural insights into the human metapneumovirus glycoprotein ectodomain. *Journal of virology*. 2014;88(19):11611-6.
224. Peret TC, Abed Y, Anderson LJ, Erdman DD, Boivin G. Sequence polymorphism of the predicted human metapneumovirus G glycoprotein. *J Gen Virol*. 2004;85(3):679-86.

225. Bastien N, Liu L, Ward D, Taylor T, Li Y. Genetic variability of the G glycoprotein gene of human metapneumovirus. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(8):3532-7.
226. Liu L, Bastien N, Li Y. Intracellular processing, glycosylation, and cell surface expression of human metapneumovirus attachment glycoprotein. *J Virol*. 2007;81(24):13435-43.
227. Pinana M, Vila J, Gimferrer L, Valls M, Andres C, Codina MG, et al. Novel human metapneumovirus with a 180-nucleotide duplication in the G gene. *Future microbiology*. 2017;12:565-71.
228. Saikusa M, Kawakami C, Nao N, Takeda M, Usuku S, Sasao T, et al. 180-Nucleotide Duplication in the G Gene of Human metapneumovirus A2b Subgroup Strains Circulating in Yokohama City, Japan, since 2014. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:402.
229. Rochette PJ, Therrien JP, Drouin R, Perdiz D, Bastien N, Drobetsky EA, et al. UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells. *Nucleic acids research*. 2003;31(11):2786-94.
230. Ryder AB, Tollefson SJ, Podsiad AB, Johnson JE, Williams JV. Soluble recombinant human metapneumovirus G protein is immunogenic but not protective. *Vaccine*. 2010;28(25):4145-52.
231. Mok H, Tollefson SJ, Podsiad AB, Shepherd BE, Polosukhin VV, Johnston RE, et al. An alphavirus replicon-based human metapneumovirus vaccine is immunogenic and protective in mice and cotton rats. *Journal of virology*. 2008;82(22):11410-8.
232. Adamson P, Thammawat S, Muchondo G, Sadlon T, Gordon D. Diversity in glycosaminoglycan binding amongst hMPV G protein lineages. *Viruses*. 2012;4(12):3785-803.
233. Kolli D, Bao X, Casola A. Human metapneumovirus antagonism of innate immune responses. *Viruses*. 2012;4(12):3551-71.
234. Kolli D, Bao X, Liu T, Hong C, Wang T, Garofalo RP, et al. Human metapneumovirus glycoprotein G inhibits TLR4-dependent signaling in monocyte-derived dendritic cells. *Journal of immunology*. 2011;187(1):47-54.
235. Bao X, Kolli D, Ren J, Liu T, Garofalo RP, Casola A. Human Metapneumovirus Glycoprotein G Disrupts Mitochondrial Signaling in Airway Epithelial Cells. *PloS one*. 2013;8(4):e62568.

236. Bao X, Liu T, Shan Y, Li K, Garofalo RP, Casola A. Human metapneumovirus glycoprotein G inhibits innate immune responses. *PLoS pathogens*. 2008;4(5):e1000077.
237. Velayutham TS, Kolli D, Ivanciuc T, Garofalo RP, Casola A. Critical role of TLR4 in human metapneumovirus mediated innate immune responses and disease pathogenesis. *PloS one*. 2013;8(10):e78849.
238. Banos-Lara MD, Harvey L, Mendoza A, Simms D, Chouljenko VN, Wakamatsu N, et al. Impact and Regulation of Lambda Interferon Response in Human Metapneumovirus Infection. *Journal of virology*. 2014.
239. Le Nouen C, Hillyer P, Brock LG, Winter CC, Rabin RL, Collins PL, et al. Human metapneumovirus SH and G glycoproteins inhibit macropinocytosis-mediated entry into human dendritic cells and reduce CD4+ T cell activation. *Journal of virology*. 2014;88(11):6453-69.
240. Preston FM, Straub CP, Ramirez R, Mahalingam S, Spann KM. siRNA against the G gene of human metapneumovirus. *Virology journal*. 2012;9:105.
241. van den Hoogen BG, van Boheemen S, de Rijck J, van Nieuwkoop S, Smith DJ, Laksono B, et al. Excessive production and extreme editing of human metapneumovirus defective interfering RNA is associated with type I IFN induction. *The Journal of general virology*. 2014;95(Pt 8):1625-33.
242. Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Yang L, Lamirande EW, Tran KC, Murphy BR, et al. Recombinant human Metapneumovirus lacking the small hydrophobic SH and/or attachment G glycoprotein: deletion of G yields a promising vaccine candidate. *Journal of virology*. 2004;78(23):12877-87.
243. Masante C, El Najjar F, Chang A, Jones A, Moncman CL, Dutch RE. The human metapneumovirus small hydrophobic protein has properties consistent with those of a viroporin and can modulate viral fusogenic activity. *Journal of virology*. 2014;88(11):6423-33.
244. Bao X, Kolli D, Liu T, Shan Y, Garofalo RP, Casola A. Human Metapneumovirus Small Hydrophobic Protein Inhibits NF- $\kappa$ B Transcriptional Activity. *Journal of virology*. 2008;82(16):8224-9.
245. Wilson RL, Fuentes SM, Wang P, Taddeo EC, Klatt A, Henderson AJ, et al. Function of small hydrophobic proteins of paramyxovirus. *Journal of virology*. 2006;80(4):1700-9.

246. de Graaf M, Herfst S, Aarbiou J, Burgers PC, Zaaraoui-Boutahar F, Bijl M, et al. Small hydrophobic protein of human metapneumovirus does not affect virus replication and host gene expression in vitro. *PloS one*. 2013;8(3):e58572.
247. Triantafilou K, Kar S, Vakakis E, Kotecha S, Triantafilou M. Human respiratory syncytial virus viroporin SH: a viral recognition pathway used by the host to signal inflammasome activation. *Thorax*. 2013;68(1):66-75.
248. Biacchesi S, Murphy BR, Collins PL, Buchholz UJ. Frequent frameshift and point mutations in the SH gene of human metapneumovirus passaged in vitro. *Journal of virology*. 2007;81(11):6057-67.
249. Klimyte EM, Smith SE, Oreste P, Lembo D, Dutch RE. Inhibition of Human Metapneumovirus Binding to Heparan Sulfate Blocks Infection in Human Lung Cells and Airway Tissues. *Journal of virology*. 2016;90(20):9237-50.
250. Kolokoltsov AA, Deniger D, Fleming EH, Roberts NJ, Jr., Karpilow JM, Davey RA. Small interfering RNA profiling reveals key role of clathrin-mediated endocytosis and early endosome formation for infection by respiratory syncytial virus. *Journal of virology*. 2007;81(14):7786-800.
251. Krzyzaniak MA, Zumstein MT, Gerez JA, Picotti P, Helenius A. Host cell entry of respiratory syncytial virus involves macropinocytosis followed by proteolytic activation of the F protein. *PLoS pathogens*. 2013;9(4):e1003309.
252. Cox RG, Mainou BA, Johnson M, Hastings AK, Schuster JE, Dermody TS, et al. Human Metapneumovirus Is Capable of Entering Cells by Fusion with Endosomal Membranes. *PLoS pathogens*. 2015;11(12):e1005303.
253. Lamb RA, Parks GD. Paramyxoviridae. In: Howley P, Knipe DM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
254. Noton SL, Fearn R. Initiation and regulation of paramyxovirus transcription and replication. *Virology*. 2015;479-480:545-54.
255. Ortin J, Martin-Benito J. The RNA synthesis machinery of negative-stranded RNA viruses. *Virology*. 2015;479-480:532-44.
256. Fearn R, Collins PL. Model for polymerase access to the overlapped L gene of respiratory syncytial virus. *Journal of virology*. 1999;73(1):388-97.
257. Gould PS, Easton AJ. Coupled translation of the second open reading frame of M2 mRNA is sequence dependent and differs significantly within the subfamily Pneumovirinae. *Journal of virology*. 2007;81(16):8488-96.

258. Schickli JH, Kaur J, Macphail M, Guzzetta JM, Spaete RR, Tang RS. Deletion of human metapneumovirus M2-2 increases mutation frequency and attenuates growth in hamsters. *Virology journal*. 2008;5:69.
259. Barik S. The structure of the 5' terminal cap of the respiratory syncytial virus mRNA. *The Journal of general virology*. 1993;74 ( Pt 3):485-90.
260. Li J, Wang JT, Whelan SP. A unique strategy for mRNA cap methylation used by vesicular stomatitis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(22):8493-8.
261. Li J, Fontaine-Rodriguez EC, Whelan SP. Amino acid residues within conserved domain VI of the vesicular stomatitis virus large polymerase protein essential for mRNA cap methyltransferase activity. *Journal of virology*. 2005;79(21):13373-84.
262. Rahmeh AA, Li J, Kranzusch PJ, Whelan SP. Ribose 2'-O methylation of the vesicular stomatitis virus mRNA cap precedes and facilitates subsequent guanine-N-7 methylation by the large polymerase protein. *Journal of virology*. 2009;83(21):11043-50.
263. Sun J, Wei Y, Rauf A, Zhang Y, Ma Y, Zhang X, et al. Methyltransferase-defective avian metapneumovirus vaccines provide complete protection against challenge with the homologous Colorado strain and the heterologous Minnesota strain. *Journal of virology*. 2014;88(21):12348-63.
264. Zust R, Cervantes-Barragan L, Habjan M, Maier R, Neuman BW, Ziebuhr J, et al. Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nature immunology*. 2011;12(2):137-43.
265. Daffis S, Szretter KJ, Schriewer J, Li J, Youn S, Errett J, et al. 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature*. 2010;468(7322):452-6.
266. Bermingham A, Collins PL. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(20):11259-64.
267. McGivern DR, Collins PL, Fearn R. Identification of internal sequences in the 3' leader region of human respiratory syncytial virus that enhance transcription and confer replication processivity. *Journal of virology*. 2005;79(4):2449-60.

268. Kell AM, Gale M, Jr. RIG-I in RNA virus recognition. *Virology*. 2015;479-480:110-21.
269. Derdowski A, Peters TR, Glover N, Qian R, Utlej TJ, Burnett A, et al. Human metapneumovirus nucleoprotein and phosphoprotein interact and provide the minimal requirements for inclusion body formation. *The Journal of general virology*. 2008;89(Pt 11):2698-708.
270. Cifuentes-Munoz N, Brantje J, Slaughter KB, Dutch RE. Human Metapneumovirus Induces Formation of Inclusion Bodies for Efficient Genome Replication and Transcription. *Journal of virology*. 2017.
271. Garcia J, Garcia-Barreno B, Vivo A, Melero JA. Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. *Virology*. 1993;195(1):243-7.
272. Kolesnikova L, Muhlberger E, Ryabchikova E, Becker S. Ultrastructural organization of recombinant Marburg virus nucleoprotein: comparison with Marburg virus inclusions. *Journal of virology*. 2000;74(8):3899-904.
273. Heinrich BS, Cureton DK, Rahmeh AA, Whelan SP. Protein expression redirects vesicular stomatitis virus RNA synthesis to cytoplasmic inclusions. *PLoS pathogens*. 2010;6(6):e1000958.
274. El Najjar F, Schmitt AP, Dutch RE. Paramyxovirus glycoprotein incorporation, assembly and budding: a three way dance for infectious particle production. *Viruses*. 2014;6(8):3019-54.
275. Jumat MR, Nguyen Huong T, Wong P, Loo LH, Tan BH, Fenwick F, et al. Imaging analysis of human metapneumovirus-infected cells provides evidence for the involvement of F-actin and the raft-lipid microdomains in virus morphogenesis. *Virology journal*. 2014;11:198.
276. Rixon HW, Brown G, Aitken J, McDonald T, Graham S, Sugrue RJ. The small hydrophobic (SH) protein accumulates within lipid-raft structures of the Golgi complex during respiratory syncytial virus infection. *The Journal of general virology*. 2004;85(Pt 5):1153-65.
277. Meshram CD, Baviskar PS, Ognibene CM, Oomens AG. The Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein, Matrix Protein, and Fusion Protein Carboxy-Terminal Domain Drive Efficient Filamentous Virus-Like Particle Formation. *Journal of virology*. 2016;90(23):10612-28.

278. Mehedi M, McCarty T, Martin SE, Le Nouen C, Buehler E, Chen YC, et al. Actin-Related Protein 2 (ARP2) and Virus-Induced Filopodia Facilitate Human Respiratory Syncytial Virus Spread. *PLoS pathogens*. 2016;12(12):e1006062.
279. Mehedi M, Collins PL, Buchholz UJ. A novel host factor for human respiratory syncytial virus. *Communicative & integrative biology*. 2017;10(3):e1319025.
280. El Najjar F, Cifuentes-Munoz N, Chen J, Zhu H, Buchholz UJ, Moncman CL, et al. Human metapneumovirus Induces Reorganization of the Actin Cytoskeleton for Direct Cell-to-Cell Spread. *PLoS pathogens*. 2016;12(9):e1005922.
281. Sattentau Q. Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nature reviews Microbiology*. 2008;6(11):815-26.
282. Deffrasnes C, Cote S, Boivin G. Analysis of replication kinetics of the human metapneumovirus in different cell lines by real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(1):488-90.
283. Tollefson SJ, Cox RG, Williams JV. Studies of culture conditions and environmental stability of human metapneumovirus. *Virus research*. 2010;151(1):54-9.
284. Yun BL, Guan XL, Liu YZ, Zhang Y, Wang YQ, Qi XL, et al. Integrin alphavbeta1 Modulation Affects Subtype B Avian Metapneumovirus Fusion Protein-mediated Cell-Cell Fusion and Virus Infection. *The Journal of biological chemistry*. 2016;291(28):14815-25.
285. Meng J, Hotard AL, Currier MG, Lee S, Stobart CC, Moore ML. Respiratory Syncytial Virus Attachment Glycoprotein Contribution to Infection Depends on the Specific Fusion Protein. *Journal of virology*. 2015;90(1):245-53.
286. Bao X, Liu T, Spetch L, Kolli D, Garofalo RP, Casola A. Airway epithelial cell response to human metapneumovirus infection. *Virology*. 2007;368(1):91-101.
287. Schildgen O, Simon A, Williams J. Animal models for human metapneumovirus (HMPV) infections. *Veterinary research*. 2007;38(1):117-26.
288. MacPhail M, Schickli JH, Tang RS, Kaur J, Robinson C, Fouchier RA, et al. Identification of small-animal and primate models for evaluation of vaccine candidates for human metapneumovirus (hMPV) and implications for hMPV vaccine design. *The Journal of general virology*. 2004;85(Pt 6):1655-63.
289. Alvarez R, Harrod KS, Shieh WJ, Zaki S, Tripp RA. Human metapneumovirus persists in BALB/c mice despite the presence of neutralizing antibodies. *Journal of virology*. 2004;78(24):14003-11.

290. Hamelin ME, Yim K, Kuhn KH, Cragin RP, Boukhvalova M, Blanco JC, et al. Pathogenesis of human metapneumovirus lung infection in BALB/c mice and cotton rats. *Journal of virology*. 2005;79(14):8894-903.
291. Zhang Y, Niewiesk S, Li J. Small Animal Models for Human Metapneumovirus: Cotton Rat is More Permissive than Hamster and Mouse. *Pathogens*. 2014;3(3):633-55.
292. Darniot M, Petrella T, Aho S, Pothier P, Manoha C. Immune response and alteration of pulmonary function after primary human metapneumovirus (hMPV) infection of BALB/c mice. *Vaccine*. 2005;23(36):4473-80.
293. Hamelin ME, Prince GA, Gomez AM, Kinkead R, Boivin G. Human metapneumovirus infection induces long-term pulmonary inflammation associated with airway obstruction and hyperresponsiveness in mice. *The Journal of infectious diseases*. 2006;193(12):1634-42.
294. Alvarez R, Tripp RA. The immune response to human metapneumovirus is associated with aberrant immunity and impaired virus clearance in BALB/c mice. *Journal of virology*. 2005;79(10):5971-8.
295. Lai SH, Liao SL, Wong KS, Lin TY. Preceding human metapneumovirus infection increases adherence of *Streptococcus pneumoniae* and severity of murine pneumococcal pneumonia. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. 2014.
296. Boukhvalova MS, Blanco JC. The cotton rat *Sigmodon hispidus* model of respiratory syncytial virus infection. *Current topics in microbiology and immunology*. 2013;372:347-58.
297. Williams JV, Tollefson SJ, Johnson JE, Crowe JE, Jr. The cotton rat (*Sigmodon hispidus*) is a permissive small animal model of human metapneumovirus infection, pathogenesis, and protective immunity. *J Virol*. 2005;79(17):10944-51.
298. Tang RS, Mahmood K, Macphail M, Guzzetta JM, Haller AA, Liu H, et al. A host-range restricted parainfluenza virus type 3 (PIV3) expressing the human metapneumovirus (hMPV) fusion protein elicits protective immunity in African green monkeys. *Vaccine*. 2005;23(14):1657-67.
299. Pham QN, Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Murphy BR, Collins PL, Buchholz UJ. Chimeric recombinant human metapneumoviruses with the nucleoprotein or phosphoprotein open reading frame replaced by that of avian metapneumovirus exhibit

improved growth in vitro and attenuation in vivo. *Journal of virology*. 2005;79(24):15114-22.

300. Kondgen S, Calvignac-Spencer S, Grutzmacher K, Keil V, Matz-Rensing K, Nowak K, et al. Evidence for Human *Streptococcus pneumoniae* in wild and captive chimpanzees: A potential threat to wild populations. *Scientific reports*. 2017;7(1):14581.

301. Kolli D, Gupta MR, Sbrana E, Velayutham TS, Chao H, Casola A, et al. Alveolar macrophages contribute to the pathogenesis of human metapneumovirus infection while protecting against respiratory syncytial virus infection. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2014;51(4):502-15.

302. Cheemarla NR, Guerrero-Plata A. Immune Response to Human Metapneumovirus Infection: What We Have Learned from the Mouse Model. *Pathogens*. 2015;4(3):682-96.

303. Kolli D, Velayutham TS, Casola A. Host-Viral Interactions: Role of Pattern Recognition Receptors (PRRs) in Human Pneumovirus Infections. *Pathogens*. 2013;2(2).

304. Goutagny N, Jiang Z, Tian J, Parroche P, Schickli J, Monks BG, et al. Cell type-specific recognition of human metapneumoviruses (HMPVs) by retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) and TLR7 and viral interference of RIG-I ligand recognition by HMPV-B1 phosphoprotein. *Journal of immunology*. 2010;184(3):1168-79.

305. Liao S, Bao X, Liu T, Lai S, Li K, Garofalo RP, et al. Role of retinoic acid inducible gene-I in human metapneumovirus-induced cellular signalling. *The Journal of general virology*. 2008;89(Pt 8):1978-86.

306. Diab M, Vitenshtein A, Drori Y, Yamin R, Danziger O, Zamostiano R, et al. Suppression of human metapneumovirus (HMPV) infection by the innate sensing gene CEACAM1. *Oncotarget*. 2016;7(41):66468-79.

307. Wang S, Zheng G, Zhao L, Xu F, Qian J. Shp-2 contributes to anti-RSV activity in human pulmonary alveolar epithelial cells by interfering with the IFN-alpha-induced Jak/Stat1 pathway. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2015;19(10):2432-40.

308. Ren J, Kolli D, Deng J, Fang R, Gong B, Xue M, et al. MyD88 controls human metapneumovirus-induced pulmonary immune responses and disease pathogenesis. *Virus research*. 2013;176(1-2):241-50.

309. Ren J, Liu G, Go J, Kolli D, Zhang G, Bao X. Human metapneumovirus M2-2 protein inhibits innate immune response in monocyte-derived dendritic cells. *PloS one*. 2014;9(3):e91865.

310. Cespedes PF, Palavecino CE, Kalergis AM, Bueno SM. Modulation of Host Immunity by the Human Metapneumovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(4):795-818.
311. Guerrero-Plata A, Casola A, Suarez G, Yu X, Spetch L, Peeples ME, et al. Differential response of dendritic cells to human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *American journal of respiratory cell and molecular biology.* 2006;34(3):320-9.
312. Le Nouen C, Munir S, Losq S, Winter CC, McCarty T, Stephany DA, et al. Infection and maturation of monocyte-derived human dendritic cells by human respiratory syncytial virus, human metapneumovirus, and human parainfluenza virus type 3. *Virology.* 2009;385(1):169-82.
313. Guerrero-Plata A, Baron S, Poast JS, Adegboyega PA, Casola A, Garofalo RP. Activity and regulation of alpha interferon in respiratory syncytial virus and human metapneumovirus experimental infections. *Journal of virology.* 2005;79(16):10190-9.
314. Hastings AK, Erickson JJ, Schuster JE, Boyd KL, Tollefson SJ, Johnson M, et al. Role of type I interferon signaling in human metapneumovirus pathogenesis and control of viral replication. *Journal of virology.* 2015;89(8):4405-20.
315. Ren J, Kolli D, Liu T, Xu R, Garofalo RP, Casola A, et al. Human metapneumovirus inhibits IFN-beta signaling by downregulating Jak1 and Tyk2 cellular levels. *PloS one.* 2011;6(9):e24496.
316. Mitzel DN, Jaramillo RJ, Stout-Delgado H, Senft AP, Harrod KS. Human metapneumovirus inhibits the IL-6-induced JAK/STAT3 signalling cascade in airway epithelium. *The Journal of general virology.* 2014;95(Pt 1):26-37.
317. Dinwiddie DL, Harrod KS. Human metapneumovirus inhibits IFN-alpha signaling through inhibition of STAT1 phosphorylation. *American journal of respiratory cell and molecular biology.* 2008;38(6):661-70.
318. Liu Y, Haas DL, Poore S, Isakovic S, Gahan M, Mahalingam S, et al. Human metapneumovirus establishes persistent infection in the lungs of mice and is reactivated by glucocorticoid treatment. *Journal of virology.* 2009;83(13):6837-48.
319. Yang M, Kumar RK, Foster PS. Interferon-gamma and pulmonary macrophages contribute to the mechanisms underlying prolonged airway hyperresponsiveness. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology.* 2010;40(1):163-73.

320. Ren J, Wang Q, Kolli D, Prusak DJ, Tseng CT, Chen ZJ, et al. Human metapneumovirus M2-2 protein inhibits innate cellular signaling by targeting MAVS. *Journal of virology*. 2012.
321. Guerrero-Plata A, Casola A, Garofalo RP. Human metapneumovirus induces a profile of lung cytokines distinct from that of respiratory syncytial virus. *Journal of virology*. 2005;79(23):14992-7.
322. Laham FR, Israele V, Casellas JM, Garcia AM, Lac Prugent CM, Hoffman SJ, et al. Differential production of inflammatory cytokines in primary infection with human metapneumovirus and with other common respiratory viruses of infancy. *The Journal of infectious diseases*. 2004;189(11):2047-56.
323. Melendi GA, Laham FR, Monsalvo AC, Casellas JM, Israele V, Polack NR, et al. Cytokine profiles in the respiratory tract during primary infection with human metapneumovirus, respiratory syncytial virus, or influenza virus in infants. *Pediatrics*. 2007;120(2):e410-5.
324. Panchar K, Perez GF, Huseni S, Jain A, Kurdi B, Rodriguez-Martinez CE, et al. Premature infants have impaired airway antiviral IFN $\gamma$  responses to human metapneumovirus compared to respiratory syncytial virus. *Pediatric research*. 2015;78(4):389-94.
325. Lay MK, Cespedes PF, Palavecino CE, Leon MA, Diaz RA, Salazar FJ, et al. Human metapneumovirus infection activates the TSLP pathway that drives excessive pulmonary inflammation and viral replication in mice. *European journal of immunology*. 2015;45(6):1680-95.
326. Huck B, Neumann-Haefelin D, Schmitt-Graeff A, Weckmann M, Mattes J, Ehl S, et al. Human metapneumovirus induces more severe disease and stronger innate immune response in BALB/c mice as compared with respiratory syncytial virus. *Respiratory research*. 2007;8:6.
327. Aerts L, Hamelin ME, Rheume C, Lavigne S, Couture C, Kim W, et al. Modulation of protease activated receptor 1 influences human metapneumovirus disease severity in a mouse model. *PloS one*. 2013;8(8):e72529.
328. Guerrero-Plata A, Kolli D, Hong C, Casola A, Garofalo RP. Subversion of pulmonary dendritic cell function by paramyxovirus infections. *Journal of immunology*. 2009;182(5):3072-83.
329. Guerrero-Plata A. Dendritic cells in human Pneumovirus and Metapneumovirus infections. *Viruses*. 2013;5(6):1553-70.

330. Kitagawa Y, Sakai M, Funayama M, Itoh M, Gotoh B. Human Metapneumovirus M2-2 Protein Acts as a Negative Regulator of Alpha Interferon Production by Plasmacytoid Dendritic Cells. *Journal of virology*. 2017;91(20).
331. Pribul PK, Harker J, Wang B, Wang H, Tregoning JS, Schwarze J, et al. Alveolar macrophages are a major determinant of early responses to viral lung infection but do not influence subsequent disease development. *Journal of virology*. 2008;82(9):4441-8.
332. Wen SC, Tollefson SJ, Johnson M, Gilchuk P, Boyd KL, Shepherd B, et al. Acute clearance of human metapneumovirus occurs independently of natural killer cells. *J Virol*. 2014;88(18):10963-9.
333. Diab M, Glasner A, Isaacson B, Bar-On Y, Drori Y, Yamin R, et al. NK-cell receptors NKp46 and NCR1 control human metapneumovirus infection. *European journal of immunology*. 2017;47(4):692-703.
334. Kolli D, Bataki EL, Spetch L, Guerrero-Plata A, Jewell AM, Piedra PA, et al. T lymphocytes contribute to antiviral immunity and pathogenesis in experimental human metapneumovirus infection. *Journal of virology*. 2008;82(17):8560-9.
335. Cheemarla NR, Guerrero-Plata A. Human Metapneumovirus Attachment Protein Contributes to Neutrophil Recruitment into the Airways of Infected Mice. *Viruses*. 2017;9(10).
336. Cheemarla NR, Banos-Lara MDR, Naidu S, Guerrero-Plata A. Neutrophils regulate the lung inflammatory response via gammadelta T cell infiltration in an experimental mouse model of human metapneumovirus infection. *Journal of leukocyte biology*. 2017;101(6):1383-92.
337. Erickson JJ, Rogers MC, Hastings AK, Tollefson SJ, Williams JV. Programmed death-1 impairs secondary effector lung CD8(+) T cells during respiratory virus reinfection. *Journal of immunology*. 2014;193(10):5108-17.
338. Erickson JJ, Gilchuk P, Hastings AK, Tollefson SJ, Johnson M, Downing MB, et al. Viral acute lower respiratory infections impair CD8+ T cells through PD-1. *J Clin Invest*. 2012;122(8):2967-82.
339. Wyde PR, Chetty SN, Jewell AM, Boivin G, Piedra PA. Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro. *Antiviral Res*. 2003;60(1):51-9.

340. Roussy J-F, Carbonneau J, Ouakki M, Papenburg J, Hamelin M-È, De Serres G, et al. Human metapneumovirus viral load is an important risk factor for disease severity in young children. *J Clin Virol.* 2014;60(2):133-40.
341. Wilkesmann A, Schildgen O, Eis-Hubinger AM, Geikowski T, Glatzel T, Lentze MJ, et al. Human metapneumovirus infections cause similar symptoms and clinical severity as respiratory syncytial virus infections. *European journal of pediatrics.* 2006;165(7):467-75.
342. Rasmussen LK, Schuette J, Spaeder MC. Albuterol Use in Children Hospitalized with Human Metapneumovirus Respiratory Infection. *International journal of pediatrics.* 2016;2016:7021943.
343. Deffrasnes C, Hamelin ME, Prince GA, Boivin G. Identification and evaluation of a highly effective fusion inhibitor for human metapneumovirus. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2008;52(1):279-87.
344. Deffrasnes C, Cavanagh MH, Goyette N, Cui K, Ge Q, Seth S, et al. Inhibition of human metapneumovirus replication by small interfering RNA. *Antiviral therapy.* 2008;13(6):821-32.
345. Fried MW, Fong TL, Swain MG, Park Y, Beames MP, Banks SM, et al. Therapy of chronic hepatitis B with a 6-month course of ribavirin. *Journal of hepatology.* 1994;21(2):145-50.
346. Di Bisceglie AM, Conjeevaram HS, Fried MW, Sallie R, Park Y, Yurdaydin C, et al. Ribavirin as therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Annals of internal medicine.* 1995;123(12):897-903.
347. Glanville AR, Scott AI, Morton JM, Aboyoun CL, Plit ML, Carter IW, et al. Intravenous ribavirin is a safe and cost-effective treatment for respiratory syncytial virus infection after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2005;24(12):2114-9.
348. Burrows FS, Carlos LM, Benzimra M, Marriott DJ, Havryk AP, Plit ML, et al. Oral ribavirin for respiratory syncytial virus infection after lung transplantation: Efficacy and cost-efficiency. *J Heart Lung Transplant.* 2015;34(7):958-62.
349. Shigeta S, Mori S, Baba M, Ito M, Honzumi K, Nakamura K, et al. Antiviral activities of ribavirin, 5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide, and 6'-(R)-6'-C-methylneplanocin A against several ortho- and paramyxoviruses. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 1992;36(2):435-9.

350. Stein DS, Creticos CM, Jackson GG, Bernstein JM, Hayden FG, Schiff GM, et al. Oral ribavirin treatment of influenza A and B. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1987;31(8):1285-7.
351. Seo S, Englund JA, Nguyen JT, Pukrittayakamee S, Lindegardh N, Tarning J, et al. Combination therapy with amantadine, oseltamivir and ribavirin for influenza A infection: safety and pharmacokinetics. *Antiviral therapy*. 2013;18(3):377-86.
352. Hamelin ME, Prince GA, Boivin G. Effect of ribavirin and glucocorticoid treatment in a mouse model of human metapneumovirus infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(2):774-7.
353. Sidwell RW, Huffman JH, Khare GP, Allen LB, Witkowski JT, Robins RK. Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science (New York, NY)*. 1972;177(4050):705-6.
354. Tam RC, Lau JY, Hong Z. Mechanisms of action of ribavirin in antiviral therapies. *Antiviral chemistry & chemotherapy*. 2001;12(5):261-72.
355. Raza K, Ismailjee SB, Crespo M, Studer SM, Sanghavi S, Paterson DL, et al. Successful outcome of human metapneumovirus (hMPV) pneumonia in a lung transplant recipient treated with intravenous ribavirin. *J Heart Lung Transplant*. 2007;26(8):862-4.
356. Shahda S, Carlos WG, Kiel PJ, Khan BA, Hage CA. The human metapneumovirus: a case series and review of the literature. *Transpl Infect Dis*. 2011;13(3):324-8.
357. Jolles S, Sewell WA, Misbah SA. Clinical uses of intravenous immunoglobulin. *Clinical and experimental immunology*. 2005;142(1):1-11.
358. Wen SC, Williams JV. New Approaches for Immunization and Therapy against Human Metapneumovirus. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2015;22(8):858-66.
359. Bonney D, Razali H, Turner A, Will A. Successful treatment of human metapneumovirus pneumonia using combination therapy with intravenous ribavirin and immune globulin. *British journal of haematology*. 2009;145(5):667-9.
360. Johnson S, Oliver C, Prince GA, Hemming VG, Pfarr DS, Wang SC, et al. Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. *The Journal of infectious diseases*. 1997;176(5):1215-24.

361. Anderson EJ, Carosone-Link P, Yogev R, Yi J, Simoes EAF. Effectiveness of Palivizumab in High-risk Infants and Children: A Propensity Score Weighted Regression Analysis. *Pediatr Infect Dis J*. 2017;36(8):699-704.
362. Williams JV, Chen Z, Cseke G, Wright DW, Keefer CJ, Tollefson SJ, et al. A recombinant human monoclonal antibody to human metapneumovirus fusion protein that neutralizes virus in vitro and is effective therapeutically in vivo. *J Virol*. 2007;81(15):8315-24.
363. Schuster JE, Cox RG, Hastings AK, Boyd KL, Wadia J, Chen Z, et al. A broadly neutralizing human monoclonal antibody exhibits in vivo efficacy against both human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *The Journal of infectious diseases*. 2015;211(2):216-25.
364. Melero JA, Mas V. The Pneumovirinae fusion (F) protein: A common target for vaccines and antivirals. *Virus research*. 2015;209:128-35.
365. Ulbrandt ND, Ji H, Patel NK, Barnes AS, Wilson S, Kiener PA, et al. Identification of antibody neutralization epitopes on the fusion protein of human metapneumovirus. *J Gen Virol*. 2008;89(12):3113-8.
366. Corti D, Bianchi S, Vanzetta F, Minola A, Perez L, Agatic G, et al. Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. *Nature*. 2013;501(7467):439-43.
367. Wen X, Krause JC, Leser GP, Cox RG, Lamb RA, Williams JV, et al. Structure of the human metapneumovirus fusion protein with neutralizing antibody identifies a pneumovirus antigenic site. *Nature structural & molecular biology*. 2012;19(4):461-3.
368. Mas V, Rodriguez L, Olmedillas E, Cano O, Palomo C, Terron MC, et al. Engineering, Structure and Immunogenicity of the Human Metapneumovirus F Protein in the Postfusion Conformation. *PLoS pathogens*. 2016;12(9):e1005859.
369. Wen X, Mousa JJ, Bates JT, Lamb RA, Crowe JE, Jr., Jardetzky TS. Structural basis for antibody cross-neutralization of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus. *Nature microbiology*. 2017;2:16272.
370. Cimica V, Boigard H, Bhatia B, Fallon JT, Alimova A, Gottlieb P, et al. Novel Respiratory Syncytial Virus-Like Particle Vaccine Composed of the Postfusion and Prefusion Conformations of the F Glycoprotein. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2016;23(6):451-9.

371. Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM, DiMassimo B, Cloud GA, Lee JY, et al. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med.* 1998;4(11):1302-7.
372. Dwyer JJ, Wilson KL, Davison DK, Freel SA, Seedorff JE, Wring SA, et al. Design of helical, oligomeric HIV-1 fusion inhibitor peptides with potent activity against enfuvirtide-resistant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007;104(31):12772-7.
373. Russell CJ, Jardetzky TS, Lamb RA. Membrane fusion machines of paramyxoviruses: capture of intermediates of fusion. *The EMBO journal.* 2001;20(15):4024-34.
374. Badani H, Garry RF, Wimley WC. Peptide entry inhibitors of enveloped viruses: the importance of interfacial hydrophobicity. *Biochimica et biophysica acta.* 2014;1838(9):2180-97.
375. Olszewska W, Ispas G, Schnoeller C, Sawant D, Van de Castele T, Nauwelaers D, et al. Antiviral and lung protective activity of a novel respiratory syncytial virus fusion inhibitor in a mouse model. *The European respiratory journal.* 2011;38(2):401-8.
376. Miller SA, Tollefson S, Crowe JE, Jr., Williams JV, Wright DW. Examination of a fusogenic hexameric core from human metapneumovirus and identification of a potent synthetic peptide inhibitor from the heptad repeat 1 region. *Journal of virology.* 2007;81(1):141-9.
377. Kimura K, Mori S, Tomita K, Ohno K, Takahashi K, Shigeta S, et al. Antiviral activity of NMSO3 against respiratory syncytial virus infection in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* 2000;47(1):41-51.
378. Wyde PR, Moylett EH, Chetty SN, Jewell A, Bowlin TL, Piedra PA. Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by NMSO3 in tissue culture assays. *Antiviral Res.* 2004;63(1):51-9.
379. Spetch L, Bowlin TL, Casola A. Effect of NMSO3 treatment in a murine model of human metapneumovirus infection. *J Gen Virol.* 2008;89(11):2709-12.
380. Zhou J, Rossi JJ. Progress in RNAi-based antiviral therapeutics. *Methods in molecular biology.* 2011;721:67-75.
381. Zhang W, Tripp RA. RNA interference inhibits respiratory syncytial virus replication and disease pathogenesis without inhibiting priming of the memory immune response. *Journal of virology.* 2008;82(24):12221-31.

382. DeVincenzo J, Cehelsky JE, Alvarez R, Elbashir S, Harborth J, Toudjarska I, et al. Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV). *Antiviral Res.* 2008;77(3):225-31.
383. Gottlieb J, Zamora MR, Hodges T, Musk AW, Sommerwerk U, Dilling D, et al. ALN-RSV01 for prevention of bronchiolitis obliterans syndrome after respiratory syncytial virus infection in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2016;35(2):213-21.
384. Darniot M, Schildgen V, Schildgen O, Sproat B, Kleines M, Ditt V, et al. RNA interference in vitro and in vivo using DsiRNA targeting the nucleocapsid N mRNA of human metapneumovirus. *Antiviral Res.* 2012;93(3):364-73.
385. Shatizadeh Malekshahi S, Arefian E, Salimi V, Mokhtari Azad T, Yavarian J. Potential siRNA Molecules for Nucleoprotein and M2/L Overlapping Region of Respiratory Syncytial Virus: In Silico Design. *Jundishapur journal of microbiology.* 2016;9(4):e34304.
386. Astor TL. RNA interference, RSV, and lung transplantation: a promising future for siRNA therapeutics. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(4):427-8.
387. Paavilainen H, Lehtinen J, Romanovskaya A, Nygardas M, Bamford DH, Poranen MM, et al. Inhibition of clinical pathogenic herpes simplex virus 1 strains with enzymatically created siRNA pools. *Journal of medical virology.* 2016;88(12):2196-205.
388. Rosenberg HF, Domachowske JB. Inflammatory responses to respiratory syncytial virus (RSV) infection and the development of immunomodulatory pharmacotherapeutics. *Current medicinal chemistry.* 2012;19(10):1424-31.
389. Zang N, Xie X, Deng Y, Wu S, Wang L, Peng C, et al. Resveratrol-mediated gamma interferon reduction prevents airway inflammation and airway hyperresponsiveness in respiratory syncytial virus-infected immunocompromised mice. *J Virol.* 2011;85(24):13061-8.
390. Scagnolari C, Trombetti S, Selvaggi C, Carbone T, Monteleone K, Spano L, et al. In vitro sensitivity of human metapneumovirus to type I interferons. *Viral immunology.* 2011;24(2):159-64.
391. Steinhoff M, Buddenkotte J, Shpacovitch V, Rattenholl A, Moormann C, Vergnolle N, et al. Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev.* 2005;26(1):1-43.

392. Adams MN, Ramachandran R, Yau MK, Suen JY, Fairlie DP, Hollenberg MD, et al. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. *Pharmacol Ther.* 2011;130(3):248-82.
393. Antoniak S, Tatsumi K, Bode M, Vanja S, Williams JC, Mackman N. Protease-Activated Receptor 1 Enhances Poly I:C Induction of the Antiviral Response in Macrophages and Mice. *Journal of innate immunity.* 2017;9(2):181-92.
394. Weithauser A, Bobbert P, Antoniak S, Bohm A, Rauch BH, Klingel K, et al. Protease-activated receptor-2 regulates the innate immune response to viral infection in a coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Journal of the American College of Cardiology.* 2013;62(19):1737-45.
395. Nhu QM, Shirey K, Teijaro JR, Farber DL, Netzel-Arnett S, Antalis TM, et al. Novel signaling interactions between proteinase-activated receptor 2 and Toll-like receptors in vitro and in vivo. *Mucosal Immunol.* 2010;3(1):29-39.
396. Mackman N, Antoniak S. Roles of PAR1 and PAR2 in viral myocarditis. *Thrombosis research.* 2014;133 Suppl 1:S18-20.
397. Herfst S, Fouchier RA. Vaccination approaches to combat human metapneumovirus lower respiratory tract infections. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 2008;41(1):49-52.
398. Wright PF, Karron RA, Belshe RB, Shi JR, Randolph VB, Collins PL, et al. The absence of enhanced disease with wild type respiratory syncytial virus infection occurring after receipt of live, attenuated, respiratory syncytial virus vaccines. *Vaccine.* 2007;25(42):7372-8.
399. Karron RA, San Mateo J, Wanionek K, Collins PL, Buchholz UJ. Evaluation of a Live Attenuated Human Metapneumovirus Vaccine in Adults and Children. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society.* 2017.
400. Anderson LJ, Dormitzer PR, Nokes DJ, Rappuoli R, Roca A, Graham BS. Strategic priorities for respiratory syncytial virus (RSV) vaccine development. *Vaccine.* 2013;31 Suppl 2:B209-15.
401. Zhang F, Peng B, Chang H, Zhang R, Lu F, Wang F, et al. Intranasal Immunization of Mice to Avoid Interference of Maternal Antibody against H5N1 Infection. *PloS one.* 2016;11(6):e0157041.
402. Higgins D, Trujillo C, Keech C. Advances in RSV vaccine research and development - A global agenda. *Vaccine.* 2016;34(26):2870-5.

403. Herfst S, de Graaf M, Schrauwen EJ, Ulbrandt ND, Barnes AS, Senthil K, et al. Immunization of Syrian golden hamsters with F subunit vaccine of human metapneumovirus induces protection against challenge with homologous or heterologous strains. *The Journal of general virology*. 2007;88(Pt 10):2702-9.
404. Battles MB, Mas V, Olmedillas E, Cano O, Vazquez M, Rodriguez L, et al. Structure and immunogenicity of pre-fusion-stabilized human metapneumovirus F glycoprotein. *Nature communications*. 2017;8(1):1528.
405. Liang B, Surman S, Amaro-Carambot E, Kabatova B, Mackow N, Lingemann M, et al. Enhanced Neutralizing Antibody Response Induced by Respiratory Syncytial Virus Prefusion F Protein Expressed by a Vaccine Candidate. *Journal of virology*. 2015;89(18):9499-510.
406. Ren J, Phan T, Bao X. Recent vaccine development for human metapneumovirus. *The Journal of general virology*. 2015;96(Pt 7):1515-20.
407. Herd KA, Mahalingam S, Mackay IM, Nissen M, Sloots TP, Tindle RW. Cytotoxic T-lymphocyte epitope vaccination protects against human metapneumovirus infection and disease in mice. *Journal of virology*. 2006;80(4):2034-44.
408. Hastings AK, Gilchuk P, Joyce S, Williams JV. Novel HLA-A2-restricted human metapneumovirus epitopes reduce viral titers in mice and are recognized by human T cells. *Vaccine*. 2016;34(24):2663-70.
409. Suhrbier A. Multi-epitope DNA vaccines. *Immunology and cell biology*. 1997;75(4):402-8.
410. Zhang L. Multi-epitope vaccines: a promising strategy against tumors and viral infections. *Cellular & molecular immunology*. 2017.
411. Li X, Guo L, Kong M, Su X, Yang D, Zou M, et al. Design and Evaluation of a Multi-Epitope Peptide of Human Metapneumovirus. *Intervirology*. 2015;58(6):403-12.
412. Bonam SR, Partidos CD, Halmuthur SKM, Muller S. An Overview of Novel Adjuvants Designed for Improving Vaccine Efficacy. *Trends in pharmacological sciences*. 2017;38(9):771-93.
413. Li H, Willingham SB, Ting JP, Re F. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *Journal of immunology*. 2008;181(1):17-21.

414. Singh M, Ugozzoli M, Kazzaz J, Chesko J, Soenawan E, Mannucci D, et al. A preliminary evaluation of alternative adjuvants to alum using a range of established and new generation vaccine antigens. *Vaccine*. 2006;24(10):1680-6.
415. Cseke G, Wright DW, Tollefson SJ, Johnson JE, Crowe JE, Jr., Williams JV. Human metapneumovirus fusion protein vaccines that are immunogenic and protective in cotton rats. *Journal of virology*. 2007;81(2):698-707.
416. Li L, Saade F, Petrovsky N. The future of human DNA vaccines. *Journal of biotechnology*. 2012;162(2-3):171-82.
417. Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, Jensen K, et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *American journal of epidemiology*. 1969;89(4):422-34.
418. Acosta PL, Caballero MT, Polack FP. Brief History and Characterization of Enhanced Respiratory Syncytial Virus Disease. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2015;23(3):189-95.
419. Prince GA, Curtis SJ, Yim KC, Porter DD. Vaccine-enhanced respiratory syncytial virus disease in cotton rats following immunization with Lot 100 or a newly prepared reference vaccine. *The Journal of general virology*. 2001;82(Pt 12):2881-8.
420. Fulginiti VA, Eller JJ, Downie AW, Kempe CH. Altered reactivity to measles virus. Atypical measles in children previously immunized with inactivated measles virus vaccines. *JAMA*. 1967;202(12):1075-80.
421. Hamelin ME, Couture C, Sackett MK, Boivin G. Enhanced lung disease and Th2 response following human metapneumovirus infection in mice immunized with the inactivated virus. *The Journal of general virology*. 2007;88(Pt 12):3391-400.
422. de Swart RL, van den Hoogen BG, Kuiken T, Herfst S, van Amerongen G, Yüksel S, et al. Immunization of macaques with formalin-inactivated human metapneumovirus induces hypersensitivity to hMPV infection. *Vaccine*. 2007;25(51):8518-28.
423. Yim KC, Cragin RP, Boukhvalova MS, Blanco JC, Hamlin ME, Boivin G, et al. Human metapneumovirus: enhanced pulmonary disease in cotton rats immunized with formalin-inactivated virus vaccine and challenged. *Vaccine*. 2007;25(27):5034-40.
424. Knudson CJ, Hartwig SM, Meyerholz DK, Varga SM. RSV vaccine-enhanced disease is orchestrated by the combined actions of distinct CD4 T cell subsets. *PLoS pathogens*. 2015;11(3):e1004757.

425. Mohsen MO, Zha L, Cabral-Miranda G, Bachmann MF. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Seminars in immunology*. 2017.
426. Levy C, Aerts L, Hamelin ME, Granier C, Szecsi J, Lavillette D, et al. Virus-like particle vaccine induces cross-protection against human metapneumovirus infections in mice. *Vaccine*. 2013;31(25):2778-85.
427. Cimica V, Galarza JM. Adjuvant formulations for virus-like particle (VLP) based vaccines. *Clinical immunology*. 2017;183:99-108.
428. Minor PD. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. *Virology*. 2015;479-480:379-92.
429. Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Tran KC, Murphy BR, Collins PL, Buchholz UJ. Recovery of human metapneumovirus from cDNA: optimization of growth in vitro and expression of additional genes. *Virology*. 2004;321(2):247-59.
430. Skiadopoulos MH, Surman S, Tatem JM, Paschalis M, Wu SL, Udem SA, et al. 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. *Journal of virology*. 1999;73(2):1374-81.
431. Karron RA, Casey R, Thumar B, Surman S, Murphy BR, Collins PL, et al. The cDNA-derived investigational human parainfluenza virus type 3 vaccine rcp45 is well tolerated, infectious, and immunogenic in infants and young children. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(10):e186-91.
432. Herfst S, de Graaf M, Schrauwen EJ, Sprong L, Hussain K, van den Hoogen BG, et al. Generation of temperature-sensitive human metapneumovirus strains that provide protective immunity in hamsters. *The Journal of general virology*. 2008;89(Pt 7):1553-62.
433. Liu P, Shu Z, Qin X, Dou Y, Zhao Y, Zhao X. A live attenuated human metapneumovirus vaccine strain provides complete protection against homologous viral infection and cross-protection against heterologous viral infection in BALB/c mice. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2013;20(8):1246-54.
434. Wei Y, Zhang Y, Cai H, Mirza AM, Iorio RM, Peeples ME, et al. Roles of the putative integrin-binding motif of the human metapneumovirus fusion (f) protein in cell-cell fusion, viral infectivity, and pathogenesis. *Journal of virology*. 2014;88(8):4338-52.

435. Cai H, Zhang Y, Lu M, Liang X, Jennings R, Niewiesk S, et al. Phosphorylation of Human Metapneumovirus M2-1 Protein Upregulates Viral Replication and Pathogenesis. *Journal of virology*. 2016;90(16):7323-38.
436. Zhang Y, Wei Y, Zhang X, Cai H, Niewiesk S, Li J. Rational design of human metapneumovirus live attenuated vaccine candidates by inhibiting viral messenger RNA cap methyltransferase. *Journal of virology*. 2014.
437. Ma Y, Wei Y, Zhang X, Zhang Y, Cai H, Zhu Y, et al. mRNA cap methylation influences pathogenesis of vesicular stomatitis virus in vivo. *Journal of virology*. 2014;88(5):2913-26.
438. Yu CM, Li RP, Chen X, Liu P, Zhao XD. Replication and pathogenicity of attenuated human metapneumovirus F mutants in severe combined immunodeficiency mice. *Vaccine*. 2012;30(2):231-6.
439. Tang RS, Schickli JH, MacPhail M, Fernandes F, Bicha L, Spaete J, et al. Effects of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus antigen insertion in two 3' proximal genome positions of bovine/human parainfluenza virus type 3 on virus replication and immunogenicity. *Journal of virology*. 2003;77(20):10819-28.
440. Russell CJ, Jones BG, Sealy RE, Surman SL, Mason JN, Hayden RT, et al. A Sendai virus recombinant vaccine expressing a gene for truncated human metapneumovirus (hMPV) fusion protein protects cotton rats from hMPV challenge. *Virology*. 2017;509:60-6.
441. de Graaf M, Herfst S, Schrauwen EJ, Choi Y, van den Hoogen BG, Osterhaus AD, et al. Specificity and functional interaction of the polymerase complex proteins of human and avian metapneumoviruses. *The Journal of general virology*. 2008;89(Pt 4):975-83.
442. Bates JT, Pickens JA, Schuster JE, Johnson M, Tollefson SJ, Williams JV, et al. Immunogenicity and efficacy of alphavirus-derived replicon vaccines for respiratory syncytial virus and human metapneumovirus in nonhuman primates. *Vaccine*. 2016;34(7):950-6.
443. Wen X, Pickens J, Mousa JJ, Leser GP, Lamb RA, Crowe JE, Jr., et al. A Chimeric Pneumovirus Fusion Protein Carrying Neutralizing Epitopes of Both MPV and RSV. *PloS one*. 2016;11(5):e0155917.
444. Buchholz UJ, Finke S, Conzelmann KK. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in

tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *Journal of virology*. 1999;73(1):251-9.

445. Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA, 3rd, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods*. 2009;6(5):343-5.

446. Zhang J, Dou Y, Wu J, She W, Luo L, Zhao Y, et al. Effects of N-linked glycosylation of the fusion protein on replication of human metapneumovirus in vitro and in mouse lungs. *The Journal of general virology*. 2011;92(Pt 7):1666-75.

447. Mas V, Herfst S, Osterhaus AD, Fouchier RA, Melero JA. Residues of the human metapneumovirus fusion (F) protein critical for its strain-related fusion phenotype: implications for the virus replication cycle. *Journal of virology*. 2011;85(23):12650-61.

448. Chang A, Hackett BA, Winter CC, Buchholz UJ, Dutch RE. Potential electrostatic interactions in multiple regions affect human metapneumovirus F-mediated membrane fusion. *Journal of virology*. 2012;86(18):9843-53.

449. Terrier O, Durupt F, Cartet G, Thomas L, Lina B, Rosa-Calatrava M. Engineering of a parainfluenza virus type 5 fusion protein (PIV-5 F): development of an autonomous and hyperfusogenic protein by a combinational mutagenesis approach. *Virus research*. 2009;146(1-2):115-24.

450. Le Bayon JC, Terrier O, Cartet G, Lina B, Rosa-Calatrava M. Characterization of a key residue for hyperfusogenic phenotype in human parainfluenza virus type 2 (hPIV-2) fusion glycoprotein. *Virus genes*. 2013;47(2):365-9.

451. Krarup A, Truan D, Furmanova-Hollenstein P, Bogaert L, Bouchier P, Bisschop IJ, et al. A highly stable prefusion RSV F vaccine derived from structural analysis of the fusion mechanism. *Nature communications*. 2015;6:8143.

452. Bao X, Kolli D, Liu T, Shan Y, Garofalo RP, Casola A. Human metapneumovirus small hydrophobic protein inhibits NF-kappaB transcriptional activity. *Journal of virology*. 2008;82(16):8224-9.

453. Liang B, Ngwuta JO, Surman S, Kabatova B, Liu X, Lingemann M, et al. Improved Prefusion Stability, Optimized Codon Usage, and Augmented Virion Packaging Enhance the Immunogenicity of Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein in a Vectored-Vaccine Candidate. *Journal of virology*. 2017;91(15).

454. Petiot E, Proust A, Traversier A, Durous L, Dappozze F, Gras M, et al. Influenza viruses production: Evaluation of a novel avian cell line DuckCelt(R)-T17. *Vaccine*. 2017.
455. Paules C, Subbarao K. *Influenza*. *Lancet*. 2017.
456. Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine*. 2008;26 Suppl 4:D49-53.
457. Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*. 2001;7(12):1306-12.
458. Wise HM, Foeglein A, Sun J, Dalton RM, Patel S, Howard W, et al. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *Journal of virology*. 2009;83(16):8021-31.
459. Jagger BW, Wise HM, Kash JC, Walters KA, Wills NM, Xiao YL, et al. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science (New York, NY)*. 2012;337(6091):199-204.
460. Bavagnoli L, Cucuzza S, Campanini G, Rovida F, Paolucci S, Baldanti F, et al. The novel influenza A virus protein PA-X and its naturally deleted variant show different enzymatic properties in comparison to the viral endonuclease PA. *Nucleic acids research*. 2015;43(19):9405-17.
461. Wise HM, Hutchinson EC, Jagger BW, Stuart AD, Kang ZH, Robb N, et al. Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain. *PLoS pathogens*. 2012;8(11):e1002998.
462. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *Journal of virology*. 2005;79(5):2814-22.
463. Mehle A. Unusual influenza A viruses in bats. *Viruses*. 2014;6(9):3438-49.
464. Matsuoka Y, Matsumae H, Katoh M, Einfeld AJ, Neumann G, Hase T, et al. A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle. *BMC systems biology*. 2013;7:97.
465. Watanabe T, Kawakami E, Shoemaker JE, Lopes TJ, Matsuoka Y, Tomita Y, et al. Influenza virus-host interactome screen as a platform for antiviral drug development. *Cell host & microbe*. 2014;16(6):795-805.

466. Jefferson T, Deeks JJ, Demicheli V, Rivetti D, Rudin M. Amantadine and rimantadine for preventing and treating influenza A in adults. The Cochrane database of systematic reviews. 2004(3):CD001169.
467. Shobugawa Y, Saito R, Sato I, Kawashima T, Dapat C, Dapat IC, et al. Clinical effectiveness of neuraminidase inhibitors--oseltamivir, zanamivir, laninamivir, and peramivir--for treatment of influenza A(H3N2) and A(H1N1)pdm09 infection: an observational study in the 2010-2011 influenza season in Japan. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2012;18(6):858-64.
468. Gupta YK, Meenu M, Mohan P. The Tamiflu fiasco and lessons learnt. *Indian journal of pharmacology*. 2015;47(1):11-6.
469. Li TC, Chan MC, Lee N. Clinical Implications of Antiviral Resistance in Influenza. *Viruses*. 2015;7(9):4929-44.
470. Abed Y, Boivin G. A Review of Clinical Influenza A and B Infections With Reduced Susceptibility to Both Oseltamivir and Zanamivir. *Open forum infectious diseases*. 2017;4(3):ofx105.
471. Lee SM, Yen HL. Targeting the host or the virus: current and novel concepts for antiviral approaches against influenza virus infection. *Antiviral Res*. 2012;96(3):391-404.
472. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992;358(6381):15-6.
473. el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nature genetics*. 1992;1(1):45-9.
474. Bourdon JC, Deguin-Chambon V, Lelong JC, Dessen P, May P, Debuire B, et al. Further characterisation of the p53 responsive element--identification of new candidate genes for trans-activation by p53. *Oncogene*. 1997;14(1):85-94.
475. Fischer M. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene*. 2017;36(28):3943-56.
476. Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, et al. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes & development*. 2005;19(18):2122-37.
477. Jorruiz SM, Bourdon JC. p53 Isoforms: Key Regulators of the Cell Fate Decision. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2016;6(8).

478. Bourdon JC. p53 isoforms change p53 paradigm. *Molecular & cellular oncology*. 2014;1(4):e969136.
479. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. 1979;278(5701):261-3.
480. Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*. 1979;17(1):43-52.
481. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*. 1989;57(7):1083-93.
482. Kasthuber ER, Lowe SW. Putting p53 in Context. *Cell*. 2017;170(6):1062-78.
483. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997;387(6630):296-9.
484. Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS letters*. 1997;420(1):25-7.
485. Meek DW, Anderson CW. Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009;1(6):a000950.
486. Horn HF, Vousden KH. Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene*. 2007;26(9):1306-16.
487. Rivas C, Aaronson SA, Munoz-Fontela C. Dual Role of p53 in Innate Antiviral Immunity. *Viruses*. 2010;2(1):298-313.
488. Gaur P, Munjhal A, Lal SK. Influenza virus and cell signaling pathways. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2011;17(6):RA148-54.
489. Maruzuru Y, Fujii H, Oyama M, Kozuka-Hata H, Kato A, Kawaguchi Y. Roles of p53 in herpes simplex virus 1 replication. *Journal of virology*. 2013;87(16):9323-32.
490. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science (New York, NY)*. 1990;248(4951):76-9.
491. Querido E, Blanchette P, Yan Q, Kamura T, Morrison M, Boivin D, et al. Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes & development*. 2001;15(23):3104-17.

492. Qu J, Lin J, Zhang S, Zhu Z, Ni C, Zhang S, et al. HBV DNA can bind to P53 protein and influence p53 transactivation in hepatoma cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;386(3):504-9.
493. Lan KH, Sheu ML, Hwang SJ, Yen SH, Chen SY, Wu JC, et al. HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene*. 2002;21(31):4801-11.
494. Terrier O, Diederichs A, Dubois J, Cartet G, Lina B, Bourdon JC, et al. Influenza NS1 interacts with p53 and alters its binding to p53-responsive genes, in a promoter-dependent manner. *FEBS letters*. 2013;587(18):2965-71.
495. Terrier O, Marcel V, Cartet G, Lane DP, Lina B, Rosa-Calatrava M, et al. Influenza A viruses control expression of proviral human p53 isoforms p53beta and Delta133p53alpha. *Journal of virology*. 2012;86(16):8452-60.
496. Turpin E, Luke K, Jones J, Tumpey T, Konan K, Schultz-Cherry S. Influenza virus infection increases p53 activity: role of p53 in cell death and viral replication. *Journal of virology*. 2005;79(14):8802-11.
497. Wang X, Deng X, Yan W, Zhu Z, Shen Y, Qiu Y, et al. Stabilization of p53 in influenza A virus-infected cells is associated with compromised MDM2-mediated ubiquitination of p53. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(22):18366-75.
498. Nailwal H, Sharma S, Mayank AK, Lal SK. The nucleoprotein of influenza A virus induces p53 signaling and apoptosis via attenuation of host ubiquitin ligase RNF43. *Cell death & disease*. 2015;6:e1768.
499. Terrier O, Josset L, Textoris J, Marcel V, Cartet G, Ferraris O, et al. Cellular transcriptional profiling in human lung epithelial cells infected by different subtypes of influenza A viruses reveals an overall down-regulation of the host p53 pathway. *Virology journal*. 2011;8:285.
500. Solomon H, Sharon M, Rotter V. Modulation of alternative splicing contributes to cancer development: focusing on p53 isoforms, p53beta and p53gamma. *Cell death and differentiation*. 2014;21(9):1347-9.
501. Avery-Kiejda KA, Morten B, Wong-Brown MW, Mathe A, Scott RJ. The relative mRNA expression of p53 isoforms in breast cancer is associated with clinical features and outcome. *Carcinogenesis*. 2014;35(3):586-96.
502. Fujita K, Mondal AM, Horikawa I, Nguyen GH, Kumamoto K, Sohn JJ, et al. p53 isoforms Delta133p53 and p53beta are endogenous regulators of replicative cellular senescence. *Nature cell biology*. 2009;11(9):1135-42.

503. Arsic N, Ho-Pun-Cheung A, Evelyne C, Assenat E, Jarlier M, Anguille C, et al. The p53 isoform delta133p53ss regulates cancer cell apoptosis in a RhoB-dependent manner. *PloS one*. 2017;12(2):e0172125.
504. Hofstetter G, Berger A, Berger R, Zoric A, Braicu EI, Reimer D, et al. The N-terminally truncated p53 isoform Delta40p53 influences prognosis in mucinous ovarian cancer. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2012;22(3):372-9.
505. Qiu Y, Nemeroff M, Krug RM. The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing. *Rna*. 1995;1(3):304-16.
506. Nemeroff ME, Barabino SM, Li Y, Keller W, Krug RM. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs. *Molecular cell*. 1998;1(7):991-1000.
507. Marcel V, Fernandes K, Terrier O, Lane DP, Bourdon JC. Modulation of p53beta and p53gamma expression by regulating the alternative splicing of TP53 gene modifies cellular response. *Cell death and differentiation*. 2014;21(9):1377-87.
508. Krug RM. Functions of the influenza A virus NS1 protein in antiviral defense. *Current opinion in virology*. 2015;12:1-6.
509. Hale BG, Randall RE, Ortin J, Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *The Journal of general virology*. 2008;89(Pt 10):2359-76.
510. Misra A, Green MR. From polyadenylation to splicing: Dual role for mRNA 3' end formation factors. *RNA biology*. 2016;13(3):259-64.
511. Misra A, Ou J, Zhu LJ, Green MR. Global Promotion of Alternative Internal Exon Usage by mRNA 3' End Formation Factors. *Molecular cell*. 2015;58(5):819-31.
512. Misra A, Ou J, Zhu LJ, Green MR. Global analysis of CPSF2-mediated alternative splicing: Integration of global iCLIP and transcriptome profiling data. *Genomics data*. 2015;6:217-21.
513. Tang Y, Horikawa I, Ajiro M, Robles AI, Fujita K, Mondal AM, et al. Downregulation of splicing factor SRSF3 induces p53beta, an alternatively spliced isoform of p53 that promotes cellular senescence. *Oncogene*. 2013;32(22):2792-8.
514. Groskreutz DJ, Monick MM, Yarovinsky TO, Powers LS, Quelle DE, Varga SM, et al. Respiratory syncytial virus decreases p53 protein to prolong survival of airway epithelial cells. *Journal of immunology*. 2007;179(5):2741-7.

515. Eckardt-Michel J, Lorek M, Baxmann D, Grunwald T, Keil GM, Zimmer G. The fusion protein of respiratory syncytial virus triggers p53-dependent apoptosis. *Journal of virology*. 2008;82(7):3236-49.
516. Bian T, Gibbs JD, Orvell C, Imani F. Respiratory syncytial virus matrix protein induces lung epithelial cell cycle arrest through a p53 dependent pathway. *PloS one*. 2012;7(5):e38052.
517. Baturcam E, Snape N, Yeo TH, Schagen J, Thomas E, Logan J, et al. Human Metapneumovirus Impairs Apoptosis of Nasal Epithelial Cells in Asthma via HSP70. *Journal of innate immunity*. 2017;9(1):52-64.

## Résumé

Le métapneumovirus humain (hMPV) est un virus responsable d'infections aiguës des voies respiratoires telles que des bronchiolites, des bronchites ou des pneumonies, principalement chez les populations à risques que sont les jeunes enfants de moins de 5 ans, ainsi que les personnes âgées ou immunodéprimées. Découvert en 2001, ce virus et sa pathogénèse ne restent encore aujourd'hui que partiellement caractérisés. De ce fait et malgré les besoins, il n'y a aucun vaccin ou traitement thérapeutique spécifique et efficace contre le hMPV disponible sur le marché. Dans ce contexte, mon projet de thèse s'est articulé autour de deux axes principaux :

(i) L'étude de la protéine de fusion F du virus hMPV, protéine majeure antigénique de surface et responsable de l'entrée du virus dans la cellule cible. Elle a pour particularité d'induire de manière autonome la fusion membranaire *in vitro* et d'être associée à des effets cytopathiques variable selon les souches virales. De par son rôle clé pour le virus hMPV, la protéine F a déjà fait l'objet de plusieurs études structurales et fonctionnelles mais les déterminants de cette activité fusogénique ne sont pas encore entièrement caractérisés. Nous nous sommes donc intéressés à l'identification de déterminants du phénotype viral hyperfusogénique, localisés dans les domaines *heptad repeats* de la protéine F du hMPV.

(ii) L'atténuation de deux souches virales cliniques (CAN98-75 et C-85473) par délétion de gènes accessoires dans le but de développer des candidats vaccinaux adaptés aux enfants en bas âge. Différents virus ont été générés par génétique inverse et les délétions des gènes accessoires SH et G dans les deux fonds génétiques viraux ont été étudiées pour leur impact sur l'infektivité, la réplication et la pathogénèse virale *in vitro* et *in vivo* ainsi que leur contribution pour le développement de virus atténués candidats vaccinaux.

---

## Abstract

Human metapneumovirus (hMPV) is a major pathogen responsible of acute respiratory tract infections, such as bronchiolitis or pneumonia, affecting especially infants, under five years old, elderly individuals and immunocompromised adults. Identified since 2001, this virus and its pathogenesis still remain largely unknown and no licensed vaccines or specific antivirals against hMPV are currently available. In this context, my research project was built over two main subjects:

(i) The study of the fusion F glycoprotein which is the major antigenic protein of hMPV and is responsible of viral entry into host cell. By its crucial role for the virus, the F protein has already been characterized in several structural and/or functional studies. Thus, it has been described that the hMPV F protein induces membrane fusion autonomously, resulting in variable cytopathic effects *in vitro*, in a strain-dependent manner. However, as the determinants of the hMPV fusogenic activity are not well characterized yet, we focused on identification of some of these, located in heptad repeats domains of the protein.

(ii) The evaluation of hMPV SH and G gene deletion for viral attenuation. Live-attenuated hMPV vaccine candidates for infants' immunization has been constructed thank to this deletion approach at the beginning of hMPV vaccine development efforts. Despite encouraging results, these candidates have not been further characterized and the importance of the viral background has not been evaluated.