



L'analyse de l'interactome du facteur de transcription M2-1 du Virus Respiratoire Syncytial révèle une interaction avec PABPC1 (polyA-binding protein cytoplasmic 1)

Camille Bouillier

► To cite this version:

Camille Bouillier. L'analyse de l'interactome du facteur de transcription M2-1 du Virus Respiratoire Syncytial révèle une interaction avec PABPC1 (polyA-binding protein cytoplasmic 1). Virologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT: 2019SACLV010 . tel-02426027

HAL Id: tel-02426027

<https://theses.hal.science/tel-02426027>

Submitted on 1 Jan 2020

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.

L'analyse de l'interactome du facteur de transcription M2-1 du Virus Respiratoire Syncytial révèle une interaction avec PABPC1 (polyA-binding protein cytoplasmic 1).

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines

École doctorale n°577 Structure et dynamique des systèmes vivants
(SDSV)
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Montigny-le-Bretonneux, le 29/01/2019, par

Camille Bouillier

Composition du Jury :

Didier Poncet

Directeur de recherche, INRA

Président du jury

Pierre-Olivier Vidalain

Directeur de recherche, CNRS

Rapporteur

Sandie Munier

Maître de conférences, Paris VII

Rapporteur

Manuel Rosa-Calatrava

Directeur de recherche, Inserm

Examineur

Julia Dina

MCU-PH, CHU de Caen

Examineur

Marie Galloux

Chargée de recherche CR1, INRA

Examineur

Elyanne Gault

PU-PH, UVSQ - APHP - Inserm

Directeur de thèse

Marie-Anne Rameix-Welti

MCU-PH, UVSQ - APHP - Inserm

Co-Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie le Dr Pierre-Olivier Vidalain et le Dr Sandie Munier d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également le Dr Marie Galloux, le Dr Manuel Rosa-Calatrava, le Dr Didier Poncet et le Dr Julia Dina d'avoir accepté de juger mon travail.

Un très grand merci aussi à mes directrices de thèse : Elyanne Gault, qui a élaboré ce sujet de thèse et m'a toujours soutenue avec beaucoup de gentillesse, et Marie-Anne Rameix-Welti, qui m'a procuré sans compter tout au long de cette thèse son encadrement, ses conseils et ses encouragements. Ces années à vos côtés ont été extrêmement enrichissantes, à la fois sur le plan scientifique et sur le plan personnel.

Je remercie vivement l'équipe de Jean-François Eleouët pour son accueil chaleureux et l'intérêt scientifique de nos discussions, l'équipe de Nadia Naffahk pour ses conseils, ainsi que Thibaut Léger et Didier Chevret de m'avoir patiemment guidé dans mon exploration tâtonnante de la spectrométrie de masse.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Jean-Louis Herrmann, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je remercie en particulier les membres de l'équipe EPIM : Vincent Rincheval, pour son aide précieuse tout au long de ces années, Sabine Blouquit-Laye, pour son enthousiasme et ses conversations toujours déjantées, Delphine Sitterlin, pour ses conseils et son soutien bienveillant, Aurore Desquesnes, qui bien qu'arrivé il y a peu m'a déjà apporté une assistance considérable, et Fabienne Girard-Misguich et Vincent Le Moigne, qui ont toujours pris le temps de m'aider quand j'en avais besoin. Merci plus largement à toutes les équipes de l'U173 et au LGBC, qui ont toujours su maintenir la bonne humeur au 3^e étage. Je tiens à remercier particulièrement Saïd Ahnich et Christine Wintz pour leur aide et leur bonne volonté. Merci à tous les stagiaires qui ont apporté un vent de nouveauté à l'étage le temps de quelques mois.

Je veux dédier une pensée spéciale à tous les doctorants, passés, présents et futurs, qui ont partagé avec moi les hauts et les bas de la thèse et dont la solidarité m'a permis de passer les moments difficiles. Surtout, surtout, je tiens à remercier celles qui de compagnes de galère sont devenues des amies chères : Laura, Cassie, Juliette, Gina et Marion, merci du fond du cœur. Merci pour avoir partagé avec moi des conversations sans queue ni tête, des fous rires, des quiz, des soirées labo-cinéma, mille petits moments qui ont égayé mon quotidien.

Je remercie mes parents et ma sœur Adèle, qui ont toujours été là pour moi et se sont inquiétés ou réjouis autant que moi à chaque nouvelle péripétie de cette grande aventure. Et enfin, merci à mon Stéphane-Jean d'avoir toujours été à mes côtés, et de m'avoir supportée et dorlotée quand je n'allais pas bien. Je te rendrai la pareille au cours des prochaines années, mon futur doctorant !

1 TABLE DES MATIERES

1	Table des matières.....	2
2	Liste des abréviations	5
3	Synthèse bibliographique	6
3.1	Le Virus Respiratoire Syncytial.....	6
3.1.1	Découverte	6
3.1.2	Taxonomie	6
3.1.3	Structure du virion.....	6
3.1.4	Epidémiologie	7
3.1.5	Physiopathologie et clinique des infections par le RSV.....	9
3.1.6	Traitements antiviraux et vaccins.....	11
3.2	Structure du RSV	13
3.2.1	Génome	13
3.2.2	Protéines.....	16
3.3	Cycle viral	26
3.3.1	Entrée	26
3.3.2	Transcription et Réplication	27
3.3.3	Bourgeonnement	29
3.4	Interactions protéine-protéine impliquées dans l'infection par le RSV.....	31
3.4.1	Etudes portant sur l'interactome des protéines du RSV	31
3.4.2	Interactions des protéines du RSV identifiées à ce jour.....	32
3.5	PABPC1 (PolyA-binding protein cytoplasmic 1)	35
3.5.1	Famille PABP	35
3.5.2	Structure de PABPC1	36
3.5.3	Interacteurs connus de PABPC1	38
3.5.4	Rôles de PABPC1.....	40
3.5.5	PABPC1 dans l'infection virale.....	44
4	Objectifs.....	46

5	Matériel et méthodes.....	47
5.1	Matériel.....	47
5.1.1	Cellules	47
5.1.2	Virus.....	47
5.1.3	Anticorps	47
5.2	Méthodes.....	48
5.2.1	Production de virus recombinants par génétique inverse	48
5.2.2	Infection de cellules par le RSV	48
5.2.3	Récolte des virus.....	48
5.2.4	Titrage par la technique des plages de lyse	49
5.2.5	Extraction d'ARN viral et cellulaire.....	49
5.2.6	Co-immunoprécipitation	49
5.2.7	Transfection de siRNA	49
5.2.8	Transfection d'ADN plasmidique.....	50
5.2.9	Test de viabilité cellulaire.....	50
5.2.10	Marquage métabolique de la traduction	50
5.2.11	Clonages par enzymes de restriction	51
5.2.12	Marquage par immunofluorescence.....	52
5.2.13	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) et Western blot	53
5.2.14	Transcription inverse.....	53
5.2.15	Quantification relative des ARNm par qPCR en temps réel	54
5.2.16	Test de complémentation protéique	Erreur ! Signet non défini.
5.2.17	Proximity Ligation Assay.....	56
5.2.18	Analyses de spectrométrie de masse.....	56
6	Résultats	58
6.1	Construction et caractérisation de virus recombinants.....	58

6.2	Identification de partenaires potentiels cellulaires de M2-1 et L par un crible de leur interactome.....	60
6.3	Etude de l'importance des partenaires potentiels de M2-1 pour la multiplication du RSV	63
6.4	Importance de PABPC1 dans le cycle viral	64
6.4.1	Impact sur la multiplication virale	64
6.4.2	Impact sur la transcription virale.....	66
6.4.3	Impact sur la traduction virale	67
6.5	Etude de l'interaction entre M2-1 et PABPC1	69
6.5.1	Vérification de l'interaction entre M2-1 et PABPC1.....	69
6.5.2	Absence d'interaction de M2-1 avec les autres protéines du complexe d'initiation de la traduction	72
6.5.3	Domaines de PABPC1 impliqués dans sa liaison à M2-1	73
6.5.4	Localisation de l'interaction entre M2-1 et PABPC1	75
6.5.5	Recrutement de PABPC1 aux IBs.....	77
7	Discussion et Perspectives.....	79
7.1	Recherche de partenaires cellulaires de L et de M2-1	79
7.1.1	Partenaires potentiels trouvés grâce à notre crible interactomique.....	79
7.1.2	Candidats sélectionnés à l'issue de notre double crible	82
7.2	Etude de l'interaction entre M2-1 et PABPC1	84
7.2.1	Caractéristiques de cette interaction.....	84
7.2.2	Fonction possible de cette interaction.....	85
8	Conclusion	88
9	Bibliographie.....	90
10	Annexe 1 : Interacteurs potentiels de L.....	106
11	Annexe 2 : Interacteurs potentiels de M2-1.....	110
12	Annexe 3 : Article.....	115

2 LISTE DES ABREVIATIONS

BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive

CT : queue cytoplasmique

FP : peptide de fusion

FDR : False Discovery Rate

GAG : glycosaminoglycane

GE : Gene End

GS : Gene Start

IBs : corps d'inclusion

IBAGs : granules associés aux corps d'inclusion

IRES : site interne d'entrée des ribosomes

MOI : multiplicité d'infection

NES : signal d'export nucléaire

N.I : non-infecté

NLR : Normalized Luminescence Ratio

NLS : signal de localisation nucléaire

ORF : cadre de lecture ouvert

PABP : protéines de liaison aux polyA

p.i : post-infection

RdRp : polymérase ARN ARN-dépendante

RNP : ribonucléoprotéine

RSV : virus respiratoire syncytial

N2H : Nanoluc Double Hybride

TM : domaine transmembranaire

UTR : région non-traduite

VSV : virus de la stomatite vésiculaire

WT : sauvage

3 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

3.1 Le Virus Respiratoire Syncytial

Le Virus Respiratoire Syncytial (RSV) est un agent majeur d'infections respiratoires. Il est le principal responsable des bronchiolites du nourrisson, qui constituent la première cause d'hospitalisations pédiatriques dans les pays développés. Chez les personnes âgées et fragilisées, il est aussi la cause d'une morbidité et d'une mortalité importante. N'étant l'objet à l'heure actuelle d'aucun vaccin ni traitement antiviral curatif, il s'agit d'un problème majeur de santé publique.

3.1.1 Découverte

Le RSV a été découvert en 1955 chez un chimpanzé affichant les symptômes d'une infection des voies respiratoires supérieures et a d'abord été appelé « chimpanzee coryza agent » (Morris, Blount, and Savage 1956). Il a été deux ans plus tard isolé aux États-Unis chez des enfants atteints de maladies respiratoires (pneumonie et laryngite) (Chanock and Finberg 1957). Il fut renommé « virus respiratoire syncytial » par Chanock en raison de la formation de syncytia, larges cellules polynucléées résultantes de la fusion de nombreuses cellules infectées, lors d'infections de lignées cellulaires.

3.1.2 Taxonomie

Le RSV appartient à l'ordre des *Mononegavirales*. Anciennement classé dans la famille des *Paramyxoviridae*, il a été rattaché à la nouvelle famille des *Pneumoviridae* en 2016. Celle-ci comporte deux genres : les *Orthopneumovirus*, auquel appartient le RSV, et les *Metapneumovirus*, dont le metapneumovirus humain.

3.1.3 Structure du virion

Le RSV est un virus enveloppé à ARN négatif simple brin. Ses particules infectieuses prennent la forme de sphères de 100 à 350 nm de diamètre, de filaments irréguliers de 60 à 200 nm de diamètre et 1 à 10 µm de longueur, et de particules asymétriques en partie sphériques et en partie filamenteuses (Gower et al. 2005; Kiss et al. 2014; Liljeroos et al. 2013). La surface des virions est formée par une bicouche lipidique provenant de la cellule infectée d'origine. Les trois protéines transmembranaires virales, la protéine de fusion F, la glycoprotéine G et la petite protéine hydrophobe SH, y sont présentes. Parmi elles, F est la seule observable en microscopie électronique, et forme au niveau de l'enveloppe virale des piques de densité très variable. La protéine de matrice M forme une couche structurée juste en-dessous de la membrane, au niveau des parties filamenteuses mais pas des parties sphériques des virions (Liljeroos et al. 2013). Au niveau des filaments, une sous-couche moins régulière composée par le facteur de transcription M2-1 est située sous la couche de M et fait l'interface avec

les ribonucléoprotéines virales (RNPs). Chaque virion contient entre une et dix RNP (Kiss et al. 2014). Ces dernières sont formées par l'ARN génomique encapsidé par la nucléoprotéine N, qui forment une structure en hélice gauche (Bakker et al. 2013; Tawar et al. 2009), et le complexe polymérase viral, constitué de la polymérase L et de son cofacteur, la phosphoprotéine P (Figure 1).

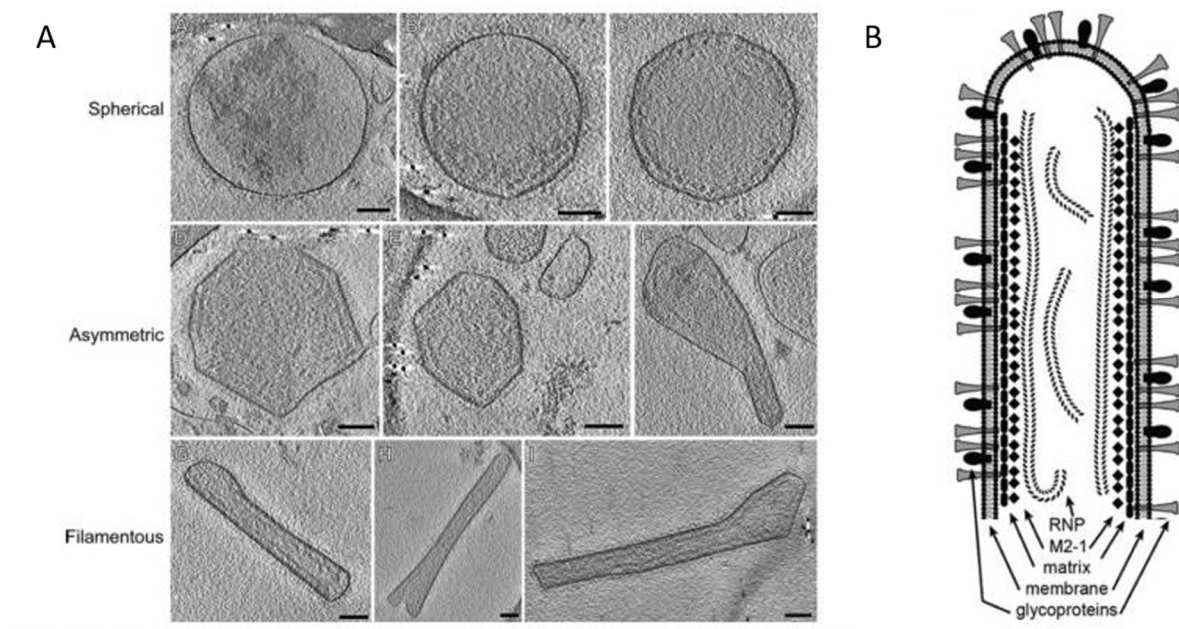


Figure 1 : Structure des virions du RSV.

A. Virions du RSV observés au microscope électronique : ils forment des particules de sphériques, filamenteuses ou asymétriques. B. Structure d'un filament viral : au niveau de l'enveloppe virale se trouvent les glycoprotéines virales F, G et SH. M tapisse la surface interne de la membrane, et une sous-couche de M2-1 est à l'interface entre M et les RNP virales. Chaque particule virale peut contenir plusieurs RNP. D'après (Kiss et al. 2014).

3.1.4 Épidémiologie

3.1.4.1 Saisonnalité du RSV

Le RSV est un virus strictement humain. Il circule dans le monde entier. Sous les climats tempérés, les infections par le RSV présentent une saisonnalité marquée, prenant la forme d'épidémies automno-hivernales, tandis qu'en zone tropicale la circulation du virus est biannuelle ou plus sporadique (Bloom-Feshbach et al. 2013; Chi et al. 2011). De manière générale, sa propagation semble favorisée par les basses températures et l'humidité, et par un confinement en intérieur accru lié à ces conditions météorologiques (Pitzer et al. 2015).

3.1.4.2 Variabilité du RSV

Le RSV est classifié en deux groupes A et B selon leur profil antigénique, établi grâce à des anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines virales F, G, M et N (Mufson et al. 1985). Ils correspondent à

deux lignées phylogénétiques distinctes qui auraient divergées il y a environ 350 ans (Zlateva et al. 2005). En culture cellulaire, le RSV A atteint un titre viral généralement plus haut que le RSV B et produit des plages de lyse plus larges que le RSV B, mais ces particularités n'ont pas pu être reliées clairement à une différence de pathogénicité *in vivo* (Gilca et al. 2006; Hall et al. 1990; Kim et al. 2015; Martinello et al. 2002).

Plusieurs génotypes ont été définis au sein de ces deux groupes sur la base de la séquence de la glycoprotéine G, la plus variable des protéines du virus. Une analyse récente des séquences de RSV-A les a classées en 7 génotypes GA1 à GA7, les génotypes différents étant définis par une distance génétique supérieure à 0,049 (Trento et al. 2015). Une dizaine de génotypes sont décrits pour les virus B mais leurs définitions ne reposent pas sur des critères univoques (Cui et al. 2013; Östlund et al. 2008; Peret et al. 1998; Trento et al. 2003). Les moteurs de variabilité de la G restent peu clairs. Une hypothèse suggère que cette variabilité repose sur la sélection de variants d'échappement à la réponse humorale, par analogie avec l'évolution de l'hémagglutinine (HA) des virus influenza. L'accumulation de mutations au niveau des sites antigéniques de la G et la mise en évidence d'une pression de sélection perturbatrice sur certains de ces sites sont en faveur de cette hypothèse (Tan et al. 2013). Cependant, la mauvaise corrélation entre les génotypes et la réactivité des anticorps neutralisants, ainsi que les réinfections fréquentes observées avec des virus d'un même génotype, indiquent une faible sensibilité de la G à la réponse anticorps (Agoti et al. 2012; Sande et al. 2013; Trento et al. 2015).

3.1.4.3 Circulation des génotypes

Au cours d'une épidémie, les RSV type A et B co-circulent fréquemment, avec éventuellement une dominance de l'un ou l'autre. Dans l'ensemble, les RSV type A seraient plus prévalents (Cane, Matthews, and Pringle 1994; Peret et al. 1998). De même, une seule épidémie peut rassembler plusieurs génotypes différents. Certains génotypes peuvent rester dominants plusieurs années, puis disparaître et réapparaître un peu plus tard (Trento et al. 2015). La circulation des différents génotypes du RSV est en général mondiale avec une diffusion simultanée des variants dans les différentes régions du globe (Agoti et al. 2014; Duvvuri et al. 2015; García et al. 1994).

3.1.4.4 Prévalence des infections par le RSV

La prévalence du RSV est extrêmement élevée, avec une infection initiale qui survient dans 70% des cas dans la première année de vie, et quasiment 100% du temps avant 2 ans (Glezen et al. 1986). De plus, des réinfections sont fréquentes tout au long de la vie, avec un taux estimé à 5-10% par an (Falsey et al. 2005). Il s'agit d'un virus très contagieux : une étude prospective à données longitudinales menée au cours de plusieurs épidémies en collectivité donne un taux d'attaque pour les primo-infections de 98%, 75% pour les secondes infections et 65% pour les troisièmes infections (Henderson et al. 1979).

3.1.4.5 Impact en santé publique

Les primo-infections par le RSV sont régulièrement associées à des atteintes respiratoires sévères. Elles sont ainsi la principale cause des bronchiolites du nourrisson. Au niveau mondial, le virus est estimé responsable chaque année chez les enfants de moins de 5 ans de 33 millions d'infections respiratoires basses, 3.2 millions d'hospitalisations et 100 000 morts (Shi et al. 2017). Les décès surviennent majoritairement dans les pays en voie de développement. En France le RSV serait responsable chaque année pour les enfants de moins de 5 ans de 15 000 à 20 000 hospitalisations et de 480 000 consultations (INVS¹).

Les réinfections par le RSV sont associées chez l'adulte sain à des cas plus bénins, avec une symptomatologie peu bruyante et une épidémiologie mal connue. Une étude réalisée en 2001 retrouvait le RSV à une fréquence supérieure à celle de la grippe, avec un absentéisme au travail de l'ordre de 35% (Hall, Long, and Schnabel 2001).

Chez les personnes âgées et fragilisées, les réinfections par le RSV ont des conséquences plus sévères. Ainsi, le RSV est retrouvé chez 6-10% des personnes de plus de 65 ans hospitalisées pour pathologies respiratoires, avec une mortalité associée de l'ordre de 8-10% (Falsey et al. 2005; Lee et al. 2013; Widmer et al. 2012). Il faut ajouter à ceci les infections traitées en ville, car le RSV est retrouvé chez 18% des patients de plus de 45 ans qui consultent pour symptômes respiratoires en hiver (Zambon et al. 2001). En outre, chez les patients souffrant de Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO), le RSV est retrouvé à l'origine du déclenchement des poussées inflammatoires avec une fréquence de l'ordre de 10% des cas (Wu et al. 2014). Les patients immunodéprimés sont eux aussi sujets à des infections graves au RSV. Ainsi, chez les greffés de moelle, la fréquence des infections par le RSV est estimée entre 2-17% avec une mortalité importante, assez variable selon les études (Renaud et al. 2013; Shah and Chemaly 2011).

3.1.5 Physiopathologie et clinique des infections par le RSV

3.1.5.1 Physiopathologie des infections par le RSV

L'infection par le RSV a lieu par voie nasale (Hall and Douglas 1981; Hall et al. 2001). Le virus infecte alors les cellules ciliées de l'épithélium respiratoire (Villenave et al. 2012; Zhang et al. 2002). Son entrée et son bourgeonnement sont localisés au pôle apical, et les cellules basales sont épargnées par l'infection. D'autres cellules peuvent aussi être infectées, comme les pneumocytes de type I ou les macrophages alvéolaires (Johnson et al. 2007). *In vivo*, le RSV est peu cytopathogène, mais il induit une

¹<http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-respiratoires/Bronchiolite/Aide-memoire>; Données consultées le 03 janvier 2017

perturbation de la motilité ciliaire, une hypersécrétion de mucus, un œdème et un infiltrat inflammatoire péribronchiolaire, qui peuvent mener à une obstruction des bronchioles (Ackermann 2014; Johnson et al. 2007; Welliver et al. 2007).

La réplication virale et la réponse immunitaire joueraient toutes deux un rôle dans la pathogénèse du RSV, mais l'ampleur de leurs contributions respectives est encore débattue. L'importance d'un mécanisme immunopathologique a été mise en évidence lors d'un essai vaccinal dans les années 60, où des enfants ayant reçu un vaccin inactivé au formaldéhyde, au lieu d'être protégés contre l'infection par le RSV, ont développé des infections respiratoires très sévères (Kim et al. 1969). Les enfants vaccinés présentaient un fort déséquilibre de la réponse immunitaire en faveur des réponses TH2 (cytokines IL5, IL6, IL10 et IL13), associées à une hyperéosinophilie, une augmentation de la sécrétion de mucus et une hyperactivité bronchique. Le rôle de ce déséquilibre en faveur de la réponse TH2 dans l'exacerbation de la pathologie après immunisation par un vaccin inactivé a été confirmé dans le modèle murin (Graham et al. 1993). De façon intéressante, les nouveau-nés développent préférentiellement des réponses orientées TH2. La gravité de l'infection par le RSV chez les nourrissons pourrait donc résulter de l'immaturité du système immunitaire du nouveau-né, conduisant à une réponse TH2 inappropriée. Cette hypothèse est cependant discutable. En effet, ce biais TH2 n'est pas retrouvé chez tous les jeunes malades, et n'apparaît pas caractéristique des seules infections par le RSV. En outre, plusieurs études retrouvent une corrélation entre la charge virale et la gravité des symptômes, mais cette corrélation n'est pas systématiquement observée (Bennett et al. 2007; Buckingham, Bush, and Devincenzo 2000; DeVincenzo, El Saleeby, and Bush 2005; Wright et al. 2002). Ce constat suggère une participation de la multiplication virale dans la pathogénèse, dont l'importance reste à déterminer.

3.1.5.2 Clinique des infections par le RSV

La bronchiolite du nourrisson est marquée par l'apparition, après une incubation de 3-6 jours, d'une rhinorrhée et une toux, accompagnées de fièvre dans 50% des cas et d'une dyspnée et de difficultés alimentaires dans 30% des cas. Même lorsqu'une bronchiolite n'est pas diagnostiquée, la gêne respiratoire est fréquente. La guérison survient en quelques jours. Des complications aiguës peuvent survenir : insuffisance respiratoire, apnée et déshydratation, qui peuvent motiver une hospitalisation pour un traitement symptomatique et une surveillance. Les otites aiguës sont extrêmement fréquentes, compliquant 16 à 50% des bronchiolites (Kafetzis et al. 2003).

La naissance prématurée avant 30 semaines de gestation, la présence d'une anomalie chromosomique, d'une cardiopathie ou encore d'une pathologie pulmonaire sont des facteurs de risque de bronchiolite sévère. Cependant, 80% des enfants hospitalisés pour bronchiolite ne

présentent aucun facteur de risque particulier. Deux-tiers des hospitalisations concernant des enfants de moins de 5 mois, l'âge reste le plus fort facteur de risque de bronchiolite sévère. Le risque d'hospitalisation pour bronchiolite à RSV atteint un maximum entre 30 et 90 jours de vie, ce qui pourrait correspondre à la période de baisse de la concentration des anticorps maternels transmis passivement en fin de grossesse (Hall et al. 2013; Nair et al. 2010; Stockman et al. 2012).

3.1.6 Traitements antiviraux et vaccins

3.1.6.1 Traitements antiviraux

Il n'existe à ce jour aucun traitement antiviral curatif dirigé contre le RSV. Pour les nourrissons à haut risque, on recommande une prophylaxie saisonnière par des anticorps monoclonaux humanisés dirigés contre la protéine F (Palivizumab Synagis)². Cette stratégie coûteuse diminue de 50% le risque d'hospitalisation (Andabaka et al. 2013; Wang et al. 2008). Pour les patients transplantés, chez qui les infections par le RSV peuvent être dramatiques, un traitement par Ribavirine administrée en aérosol est parfois effectué. Cependant, sa forte toxicité et son efficacité contestable rendent son utilisation sujette à débat. Enfin, pour les adultes fragilisés et particulièrement les personnes âgées, il n'existe aucun traitement spécifique. Différents antiviraux sont actuellement en développement pour combler ce manque.

Une dizaine d'antiviraux sont en développement à l'heure actuelle. La plupart ciblent l'étape d'entrée du virion dans la cellule, et plus particulièrement la fusion des membranes virale et cellulaire. Plusieurs sont, comme le Palivizumab, des anticorps ou des molécules apparentées. Ainsi, des nanobodies (fragments d'anticorps à domaine unique) dirigés contre la F sont capables de neutraliser le RSV en culture et sont en cours d'évaluation chez l'homme (ALX-0171) (Detalle et al. 2016). Un anticorps ciblant le motif CXCR3 de la G (mAb 131-2G) a montré une réduction de l'inflammation et des titres viraux dans le modèle murin (Radu et al. 2010). Plusieurs inhibiteurs de fusion sont en cours d'évaluation chez l'homme (MDT-637 de Micro-Dose Therapeutics/ Gilead, TMC353121 de Janssen Pharmaceutical Companies, BTA-585 de Biota Pharmaceuticals) et le plus avancé, le GS-5806 (Presatovir), a montré une diminution de la réplication virale, des symptômes et de la quantité de mucus lorsqu'il est administré oralement dans un modèle d'infection expérimentale de volontaires sains (DeVincenzo et al. 2014; Douglas et al. 2005; Ispas et al. 2015). Deux autres antiviraux ciblent eux

² Indications du palivizumab selon la conférence de consensus « Prise en charge de la bronchiolite du nourrisson » du 21 septembre 2000.

l'étape de transcription et réplication du cycle viral. Le ALS-008176, un analogue nucléosidique inhibant la polymérase du RSV, a permis, comme le GS-5806, de diminuer significativement la charge virale, les symptômes et la sécrétion de mucus dans un essai d'infection expérimentale d'adultes sains (Deval et al. 2015; DeVincenzo et al. 2015). Ouvrant la voie à l'utilisation thérapeutique des techniques d'interférence ARN, un siRNA ciblant l'ARN messager de la protéine N semble produire une certaine activité antivirale et un effet sur les symptômes lorsqu'il est administré par voie nasale chez l'adulte, sans toutefois que ceux-ci atteignent un niveau statistiquement significatif (DeVincenzo et al. 2010). De plus, il a permis une amélioration de la fonction respiratoire dans une étude de tolérance réalisée chez des patients transplantés pulmonaires (Gottlieb et al. 2016; Zamora et al. 2011).

3.1.6.2 Vaccins

Une première tentative de vaccination à partir d'un RSV inactivé au formaldéhyde a été réalisée dans les années 60. Elle s'est avérée catastrophique : non seulement les enfants vaccinés n'ont pas été protégés d'une infection ultérieure par le RSV mais au contraire ils ont développé des symptômes respiratoires très sévères, conduisant à une hospitalisation dans 80% des cas et à 2 décès (Kim et al. 1969). Plus de 50 ans après, aucun vaccin protégeant contre l'infection par le RSV n'a encore été développé. La mise au point d'un vaccin est reconnue comme une priorité mondiale par l'Organisation mondiale de la santé, par différents gouvernements et par l'industrie pharmaceutique. De ce fait une soixantaine de candidats sont actuellement en cours de développement, des évaluations précliniques jusqu'aux essais de phase 3.

Il existe deux types de stratégies vaccinales : les vaccins vivants atténués et les vaccins sous-unitaires. L'utilisation de virus atténués est à l'étude depuis plusieurs dizaines d'années. Ils ont d'abord été produits par mutagenèse et passages à basse température, permettant l'obtention de mutants thermosensibles (Wright et al. 2007). Plus récemment, la technique de génétique inverse a permis l'obtention de virus atténués portant des mutations spécifiques, souvent au niveau de la polymérase, ou dépourvus des gènes non-indispensables pour la culture cellulaire comme NS2, M2-1 ou SH (Karron et al. 2005; Luongo et al. 2013; Malkin et al. 2013). La difficulté de cette approche consiste à trouver un équilibre entre pathogénicité et immunogénicité. En effet les vaccins s'avèrent soit protecteurs mais induisant des effets secondaires trop importants, soit bien tolérés mais peu immunogènes.

La seconde possibilité consiste à produire des virus chimériques exprimant des protéines du RSV. La protéine F est l'antigène de choix utilisé pour la préparation de vaccins sous-unitaires : elle est très conservée, et elle est la cible d'anticorps neutralisants. Au cours de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique, la F passe d'une conformation pré-fusion à une conformation post-fusion, présentant des sites antigéniques différents. La forme post-fusion étant plus stable et plus facile à

produire, c'est elle qui a été utilisée jusqu'ici pour les préparations vaccinales. Différents vaccins reposant sur l'administration de F purifiée dans sa forme post-fusion avec différents adjuvants (aluminium hydroxyde, adjuvant TLR4), ou sous forme de nanoparticules, comme des agonistes TLR4, sont actuellement à l'étude (Coler et al. 2010; Raghunandan et al. 2014; Smith et al. 2012). En particulier, l'administration de nanoparticules de F adjuvantées par du phosphate d'aluminium permettrait d'obtenir une bonne réponse sérologique chez les femmes enceintes et réduirait les infections par le RSV dans les 3 mois suivants (Glenn et al. 2016). En 2013, la structure cristallographique de la F en conformation pré-fusion a été résolue, ouvrant la voie à son utilisation comme antigène vaccinal (McLellan et al. 2013). Cela devrait permettre une meilleure induction d'anticorps neutralisants puisque la forme de F majoritairement présente à la surface du virion est la forme pré-fusion (Magro et al. 2012). De nombreux vaccins reposant sur l'administration d'une F stabilisée dans la conformation pré-fusion sont en développement.

3.2 Structure du RSV

3.2.1 Génome

Le génome du RSV est constitué d'un ARN simple brin non-segmenté, de polarité négative, d'une taille de 15,2 kb. Il comporte 10 gènes : NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2 et L, dans l'ordre de 3' en 5' (Figure 2A). Comme pour les autres *Mononegavirales*, chaque gène est précédé d'une séquence Gene Start (GS) de 9pb très conservée, suivi d'une séquence Gene End (GE) de 12-14pb moyennement conservée et terminée par une suite de 4 à 7 uraciles (Figure 2C). Elles marquent respectivement l'initiation et la terminaison de la transcription de chaque ARNm. De plus, le génome porte à son extrémité 3' une séquence Leader de 44 nucléotides nécessaire à l'initiation de la transcription et de la réplication. Celle-ci comporte une première région très conservée assurant le recrutement de la polymérase, une région médiane plus variable et de nouveau une région très conservée, riche en uraciles, juste en amont du premier gène (Cowton and Fearn 2005) (Figure 2B). A l'extrémité 5' du génome se trouve une séquence Trailer de 155 nucléotides, dont les 50 nucléotides terminaux correspondent à l'équivalent de la région Leader sur l'antigénome (Collins, Mink, and Stec 1991).

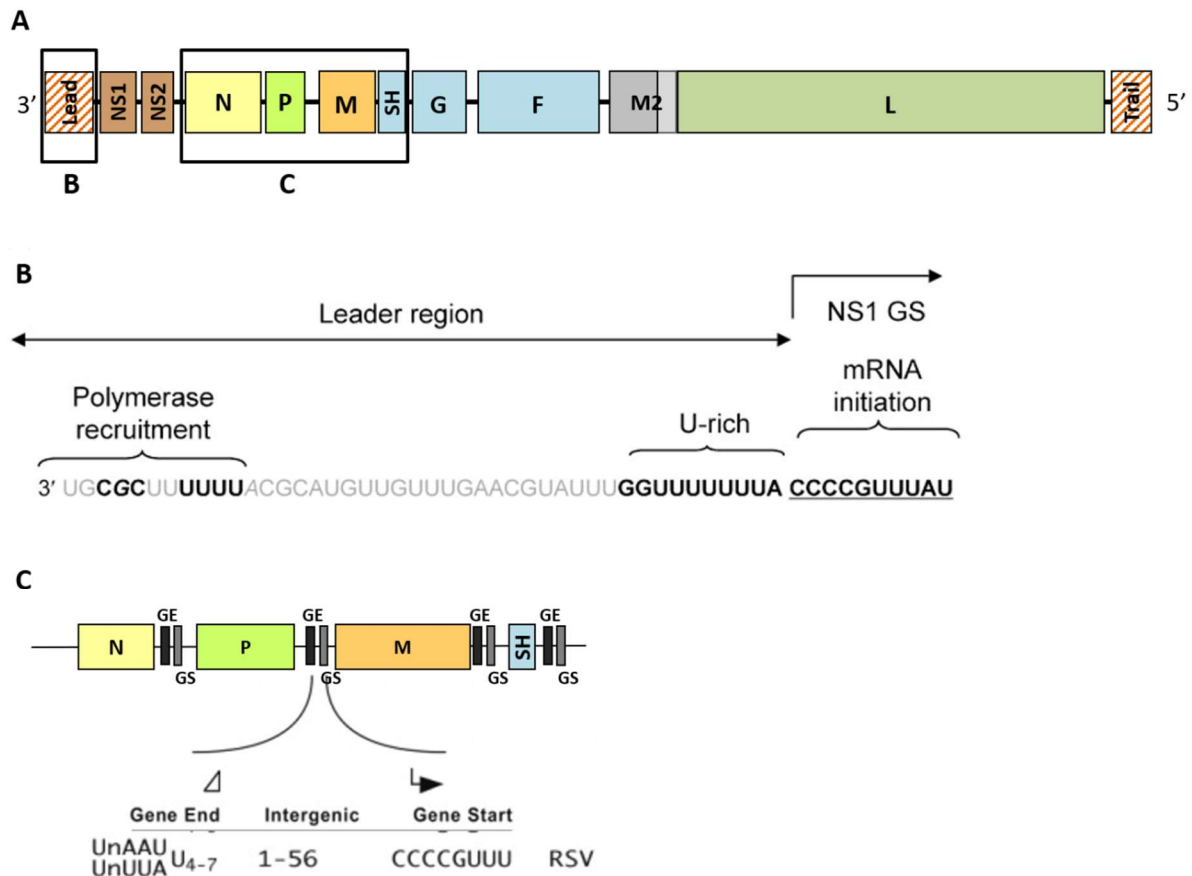


Figure 2 : Génome du RSV.

A. L'ARN génomique du RSV contient dix gènes codant pour 11 protéines, et possède à ses extrémités 3' et 5' des séquences Leader et Trailer nécessaires à sa transcription et sa réplication. B. La séquence Leader contient deux régions très conservées : la première permet le recrutement de la polymérase et la deuxième, juste en amont du premier gène, est riche en uraciles. C. Chaque gène est flanqué de séquences conservées Gene Start et Gene End.

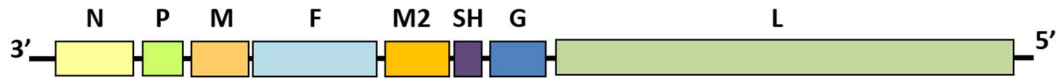
Parmi les *Mononegavirales*, le RSV possède l'un des génomes les plus complexes. Un grand nombre de ses protéines sont présentes chez d'autres virus du même ordre, mais NS1 et NS2 sont spécifiques au RSV (Figure 3). Son gène M2 est caractéristique des virus de la famille *Pneumoviridae*, mais on en retrouve un équivalent chez les *Filiviridae* avec VP30 et VP24. De plus, celui-ci code pour deux protéines virales : il est à l'origine d'un unique ARNm qui possède deux ORF superposés sur 32 nucléotides, et est traduit en deux protéines, M2-1 et M2-2, par un mécanisme de traduction couplée (Ahmadian, Randhawa, and Easton 2000) (Figure 4). En outre, les gènes M2 et L sont superposés, le GE de M2 étant situé 68pb après le GS de L.

Pneumoviridae

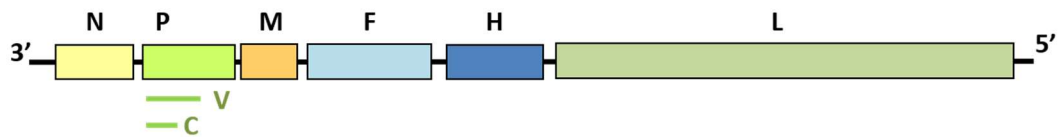
Orthopneumovirus (Virus respiratoire syncytial humain)



Metapneumovirus (Metapneumovirus humain)



Paramyxoviridae (Virus de la rougeole)



Filoviridae (Ebola Virus)



Rhabdoviridae (Virus de la rage)



Figure 3 : Génomes de différents virus Mononegavirales.

Les

génomes des virus Mononegavirales présentent une organisation similaire. Celui du RSV, codant pour 10 ARNm et 11 protéines, est l'un des plus complexes.

A



B



Figure 4 : ARNm du gène M2 du RSV.

A. Représentation schématique de l'ARNm du gène M2 du RSV, indiquant les régions non codantes (NC) en jaune et les régions codant pour M2-1 (vert) et M2-2 (bleu). B. Zone de chevauchement entre les séquences codantes de M2-1 et M2-2 montrant les cadres de lecture et leurs traductions.

3.2.2 Protéines

3.2.2.1 Protéines membranaires et non-structurales

3.2.2.1.1 La glycoprotéine G

La glycoprotéine G joue un rôle dans l'attachement du virion à la cellule-hôte et dans l'échappement à la réponse immunitaire. Cependant, elle n'est pas indispensable au fonctionnement du virus : des RSV mutants dépourvus de G se multiplient efficacement en culture cellulaire, et des souches cliniques ayant une G très fortement tronquée ont été isolées chez des enfants immunodéprimés (Karron et al. 1997; Levine, Klaiber-Franco, and Paradiso 1987; Techaarpornkul, Barretto, and Peeples 2001; Venter et al. 2011).

Cette protéine d'environ 30 kDa est si fortement glycosylée que son poids moléculaire apparent est entre 80 et 120 kDa *in cellula*. Elle possède à son extrémité N-terminale une courte queue cytoplasmique suivie d'un petit domaine transmembranaire. Son ectodomaine est composé de deux domaines « mucin-like » hypervariables et très glycosylés liés par un domaine central conservé (Figure 5). Ces domaines hypervariables lui donnent une grande variabilité antigénique. Le deuxième domaine « mucin-like » présente un motif CX3C et un domaine de liaison à l'héparine. De plus, en plus de sa forme principale transmembranaire, le RSV exprime aussi une forme plus petite et soluble de cette protéine, commençant au deuxième codon d'initiation de l'ORF, qui est sécrétée dans le milieu extra-cellulaire. Elle y servirait de leurre, captant les anticorps neutralisants et inhibant les effets anticorps-dépendant des macrophages et du complément (Bukreyev et al. 2008; Bukreyev, Yang, and Collins 2012).

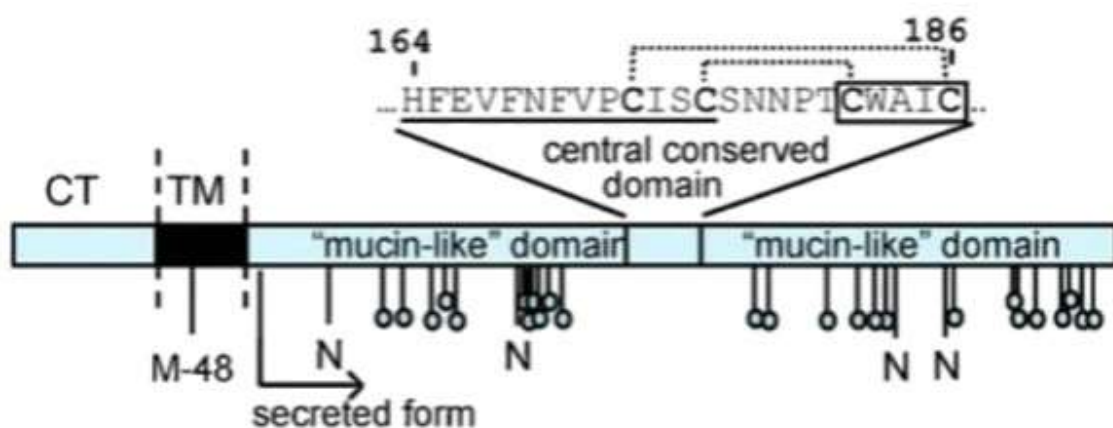


Figure 5 : Structure de la glycoprotéine G.

Elle possède une queue cytoplasmique (CT), un domaine transmembranaire (TM) et un ectodomaine composé de deux domaines hypervariables et glycosylés reliés par un domaine central conservé. Une forme tronquée de G ne contenant que l'ectodomaine est aussi sécrétée par le RSV. D'après (Collins and Melero 2011).

3.2.2.1.2 La protéine de fusion F

La protéine de fusion F est impliquée dans l'attachement du virion à la cellule-hôte et est responsable de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique. Elle provoque aussi la fusion des cellules infectées en large syncytia qui ont donné au virus son nom.

Cette protéine transmembranaire est d'abord synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif F0 de 70 kDa. Dans l'appareil de Golgi, celui-ci est clivé par une protéase « furin-like » en deux sous-unités F1 (50 kDa) et F2 (20 kDa) liées par deux ponts di-sulfures (Bolt, Pedersen, and Birkeslund 2000; Day et al. 2006; Gonzalez-Reyes et al. 2001; Gruber and Levine 1983). F est ensuite exportée à la membrane plasmique, au niveau des sites de bourgeonnement, et est par la suite retrouvée à la surface des virions. Juste avant la fusion, et probablement après internalisation du virion, F subit un deuxième clivage par une protéase « furin-like », libérant le peptide p27 à l'extrémité de F1 (Krzyzaniak et al. 2013) (Figure 6A).

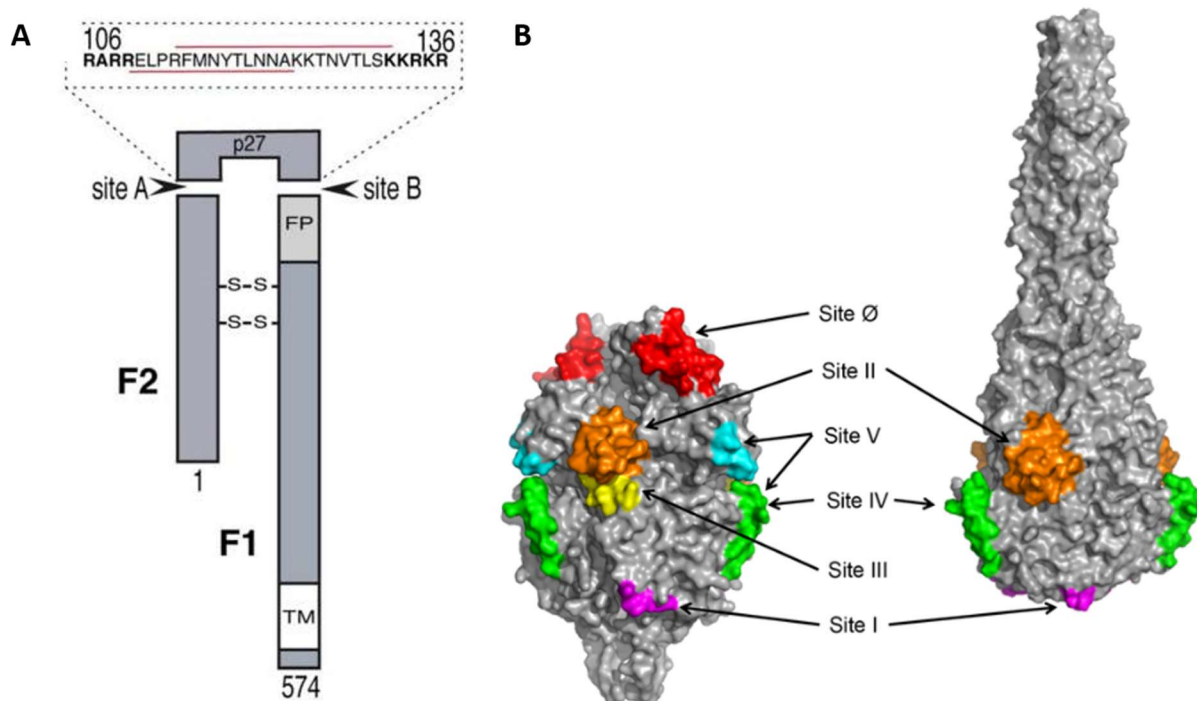


Figure 6 : Structure de la protéine de fusion F.

A. Le précurseur F0 est clivé au niveau du site A puis du site B, libérant le peptide p27 et formant deux sous-unités F1 et F2 reliées par deux ponts di-sulfure. F1 porte le domaine transmembranaire (TM) et le peptide de fusion (FP). D'après (Krzyzaniak et al. 2013). B. F présente des sites antigéniques différents selon si elle est en conformation pré-fusion (gauche) ou post-fusion (droite). D'après (Flynn et al. 2016).

F est une protéine de fusion virale de classe I, et possède une structure similaire à la F d'autres *Mononegavirales*. Avant la fusion, F est assemblée en trimères dans une conformation « pré-fusion », dont la structure cristalline a pu être déterminée (McLellan et al. 2013). Les sous-unités F1 et F2 sont

étroitement intriquées, formant deux domaines liés par un tonneau β . Un court domaine très hydrophobe à l'extrémité de F1, appelé peptide de fusion, est dissimulé à l'intérieur du trimère de F. Au moment de la fusion, un stimulus encore non-déterminé mais indépendant du pH provoque l'insertion du peptide de fusion au niveau de la membrane de la cellule-hôte. F bascule alors dans sa conformation post-fusion, dont la structure cristalline est connue (McLellan et al. 2011; Swanson et al. 2011) : elle se plie en deux, formant un faisceau de 6 hélices α . Cette conformation met en proximité étroite son domaine transmembranaire, ancré dans l'enveloppe virale, et son peptide de fusion, inséré dans la membrane plasmique. Ceci entraîne le rapprochement et la fusion des deux membranes (White et al. 2008; Zhao et al. 2000) (Figure 7).

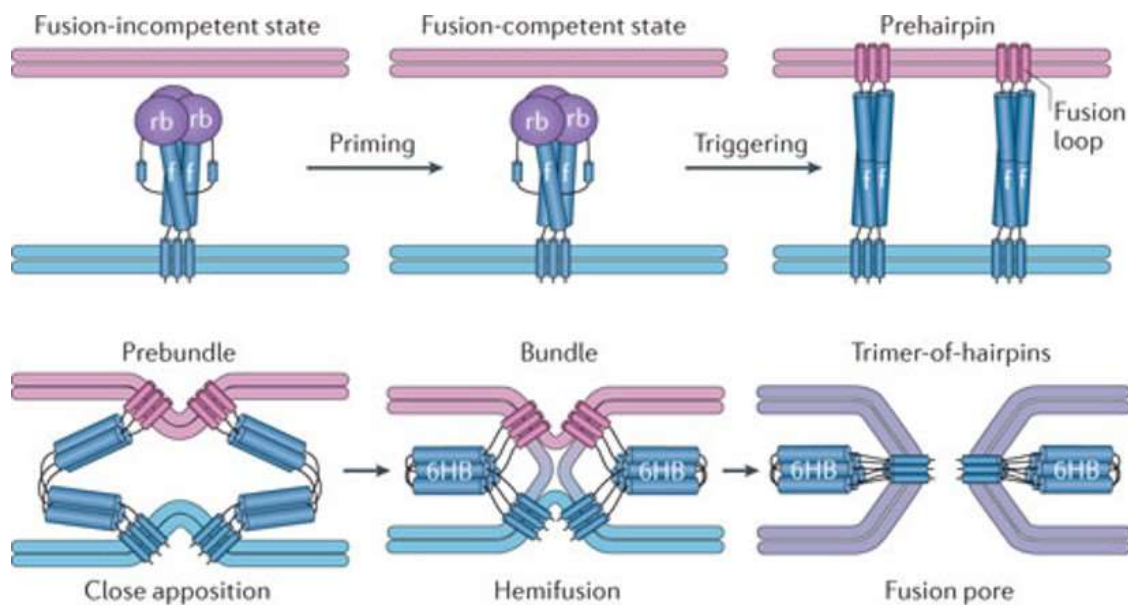


Figure 7 : Mécanisme de fusion des protéines virales de fusion de classe I

La protéine, assemblée en trimères, passe d'un état incapable de fusion à un état capable de fusion par des modifications post-traductionnelles. Un stimulus provoque ensuite l'insertion du peptide de fusion dans la membrane de la cellule-hôte. La protéine change de conformation, se pliant en deux jusqu'à former un faisceau de 6 hélices α . Ceci induit un rapprochement du domaine transmembranaire et du peptide de fusion qui entraîne la fusion des deux membranes. D'après (White et al. 2008).

La séquence de la protéine F est très conservée, et présente plusieurs sites antigéniques : trois sont conservés à la fois dans ses formes pré- et post-fusion (sites I, II et IV) et trois sont visibles uniquement sur sa forme pré-fusion (sites $\emptyset$, III et V) (Figure 6B). Ceci en fait une cible de choix pour le design d'anticorps neutralisants et de vaccins potentiels.

3.2.2.1.3 La petite protéine hydrophobe SH

Le rôle de SH dans le cycle viral est encore très peu compris, et la production d'un virus recombinant avec délétion de SH montre qu'elle n'est pas indispensable dans l'infection. Les virus dépourvus de SH

montrent une atténuation partielle *in vivo*, mais pas en culture cellulaire, et une réponse interleukin-1 β accrue *in vivo*, indiquant que SH joue un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire (Techaarpornkul et al. 2001).

Il s'agit d'une petite protéine virale de 7,5 kDa contenant un seul domaine transmembranaire. Elle s'assemble en pores pentamériques, ce qui lui confère une activité de canal à perméabilité cationique pH-dépendante, et semble donc appartenir à la classe des viroporines (Carter et al. 2010; Gan et al. 2012).

3.2.2.1.4 La protéine de matrice M

La protéine de matrice M est indispensable à l'assemblage et au bourgeonnement des particules virales (Teng and Collins 1998) : elle interagit avec F et G, colocalise avec ces protéines au niveau de la membrane plasmique, et sa présence est nécessaire à la maturation des filaments viraux (R. Ghildyal et al. 2005; Henderson, Murray, and Yeo 2002; Mitra et al. 2012). Son rôle dans d'autres aspects du cycle viral est encore discuté. Ainsi, elle est aussi retrouvée dans les corps d'inclusion où se forment les RNPs virales et pourrait les recruter à la membrane plasmique par une interaction avec M2-1 (Li et al. 2008; Mitra et al. 2012). De plus, elle est observée à certains moments du cycle viral dans le noyau, où elle pourrait aussi inhiber la transcription cellulaire (Ghildyal et al. 2003). Son import dans le noyau dépend de l'importine β 1 et son export de Crm1 (Ghildyal et al. 2009; Reena Ghildyal et al. 2005). Elle pourrait aussi avoir un effet inhibiteur sur la transcription virale, comme les protéines M d'autres *Mononegavirales* (Ghildyal et al. 2002).

La structure cristalline de M a été déterminée en 2009 (Money et al. 2009). Cette protéine de 28 kDa est composée de deux domaines riches en feuillets β reliés par une région peu structurée. Elle présente une large surface de polarité positive ainsi que des régions hautement hydrophobes, lui permettant de s'associer à la membrane. De plus, M s'auto-assemble en structures hélicoïdales au contact de lipides (McPhee et al. 2011). M présente aussi un domaine de liaison à l'ARN, situé au niveau de la région connectrice centrale de la protéine (Rodriguez et al. 2004). Les monomères de M peuvent s'associer pour former des dimères, tétramères, hexamères et oligomères d'ordres supérieurs, permettant la formation de la matrice tapissant la surface interne des virions (Money et al. 2009; Rodriguez et al. 2004).

3.2.2.1.5 Les protéines non-structurales NS1 et NS2

NS1 et NS2 sont des protéines du RSV essentiellement impliquées dans la perturbation de la réponse immunitaire. Travaillant individuellement ou ensemble, elles interfèrent avec la réponse interféron de type I à de multiples étapes. NS2 empêche la reconnaissance par la cellule d'ARN double-brin viral en interagissant avec RIG-I, bloquant ainsi sa liaison à MAVS, et en inhibant la voie TLR3 (Ling, Tran, and

Teng 2009). NS1 et NS2 induisent une diminution de l'expression de plusieurs intermédiaires de ces voies, tels que IKK ϵ et TRAF3, et NS1 inhibe la liaison de IRF3 à son coactivateur CBP (Ren et al. 2011; Swedan, Musiyenko, and Barik 2009). NS2 intervient aussi dans la réponse immune induite par l'interféron en provoquant la dégradation de STAT2 par le protéasome, possiblement en conjonction avec NS1 (Elliott et al. 2007; Lo, Brazas, and Holtzman 2005; Ramaswamy et al. 2004, 2006). De plus, NS1 et NS2 inhibent aussi l'apoptose, prolongeant la survie des cellules infectées (Bitko et al. 2007). Enfin, une étude indiquerait que NS1 régule la transcription et la réplication virale (Atreya, Peeples, and Collins 1998).

NS1 et NS2 sont des petites protéines non-structurales de 17,5 et 14,5 kDa respectivement. Elles interagissent l'une avec l'autre ainsi qu'avec elles-mêmes, et forment donc possiblement des complexes hétérogènes. NS1 et NS2 seules ont une localisation majoritairement nucléaire et mitochondriale, respectivement, mais NS1 est aussi retrouvée dans les mitochondries lorsqu'elle est complexée avec NS2 (Swedan et al. 2011). La structure de NS2 n'est pas encore élucidée, mais celle de NS1 a été déterminée récemment. Le monomère de NS1 est composé d'un unique domaine formé par un β -sandwich flanqué de 3 hélices α , et sa structure est très similaire à la protéine M du RSV et à la protéine VP40 du virus Ebola (Chatterjee et al. 2017).

3.2.2.2 Protéines de la ribonucléocapside et du complexe polymérase viral

3.2.2.2.1 La nucléoprotéine N

La protéine N encapside l'ARN génomique et antigénomique viral, ce qui le stabilise et le protège des RNAses et des senseurs des voies de réponse antivirale de la cellule.

Le complexe formé par N et l'ARN forme une structure en hélice gauche dont chaque tour comporte en moyenne dix monomères de N (Bakker et al. 2013). Chacun de ces monomères fait 42 kDa et est composé d'un domaine N-terminal et d'un domaine C-terminal reliés par une région charnière, et présente une extension N-terminale et une extension C-terminale capables de s'insérer au niveau d'autres monomères de N adjacents. Chaque monomère de N se lie à sept nucléotides d'ARN, et l'ARN viral s'enroule autour des anneaux de N avec une alternance de quatre nucléotides visibles et trois nucléotides dissimulés dans la rainure centrale d'un monomère de N (Figure 8). Les polymères de N sont stables mais flexibles, facilitant l'accès de la polymérase à l'ARN lors de la transcription et de la réplication (Tawar et al. 2009). En outre, N possède un domaine de liaison à P au niveau d'une poche hydrophobe de son domaine N-terminal, ce qui permet l'interaction du complexe polymérase viral et de la ribonucléocapside lors de la réplication et de la transcription (Galloux et al. 2012).

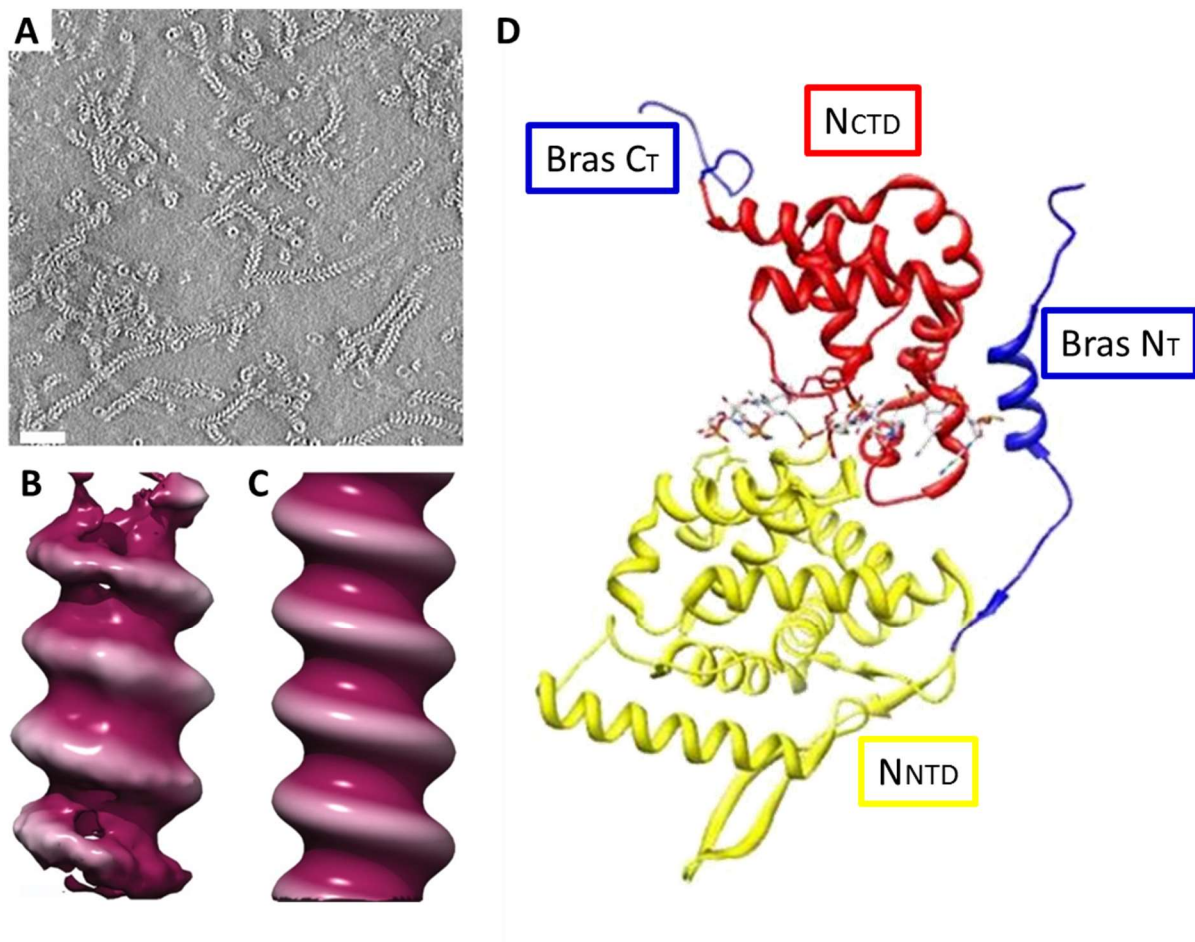


Figure 8 : Structure de la nucléoprotéine N.

A. L'observation de RNPs virales au microscope électronique révèle une structure en hélice. B-C. La reconstruction 3D de la ribonucléocapside montre une forme en hélice de pas gauche. D'après (Bakker et al. 2013). D. Le diagramme en rubans d'un monomère de N présente un domaine N-terminal (N_{NTD}) représenté en jaune et un domaine C-terminal (N_{CTD}) représenté en rouge, portant chacun un bras (N_T et C_T) qui va s'insérer dans le monomère adjacent. Ces deux domaines sont séparés par un sillon dans lequel s'insère l'ARN. D'après (Tawar et al. 2009).

N est aussi présente dans la cellule sous forme de monomères libres. Sous cette forme, elle interagit aussi avec P, par des domaines différents de ceux de la liaison de P au complexe N-ARN (Galloux et al. 2015). Par analogie avec le metapneumovirus, il est probable que cette interaction masque ses domaines d'oligomérisation et de liaison à l'ARN (Renner et al. 2016). P jouerait ainsi un rôle de chaperonne, évitant que la protéine N libre se complexe avec de l'ARN cellulaire ou s'oligomérisse avant d'être recrutée (probablement toujours par P) pour encapsider les ARN viraux naissants.

3.2.2.2.2 La polymérase L

La transcription et la réplication virale sont effectuées par le complexe polymérase viral, composé de L, P et M2-1. L'unité catalytique de ce complexe est la protéine L, qui possède une activité polymérase

ARN ARN-dépendante (RdRp), et réalise aussi la mise en place de la coiffe et la polyadénylation des ARNm viraux.

Avec un poids moléculaire de 250 kDa, elle représente la plus grande des protéines du RSV. Sa structure cristalline n'est pas connue, mais l'analyse de mutants permet une première estimation de la position des domaines impliqués dans la polymérisation, la coiffe et la reconnaissance des signaux Gene End (Cartee et al. 2003; Fix et al. 2011; Liuzzi et al. 2005). De plus, L possède plusieurs régions (sites I à VI) présentant des similarités de séquence avec les polymérases d'autres *Mononegavirales* tel que celle du virus de la stomatite vésiculaire (VSV). Par analogie avec la L du VSV, dont la structure a été résolue par cryomicroscopie électronique, il est donc possible de se faire une idée de la structure de la L du RSV (Liang et al. 2015) (Figure 9).

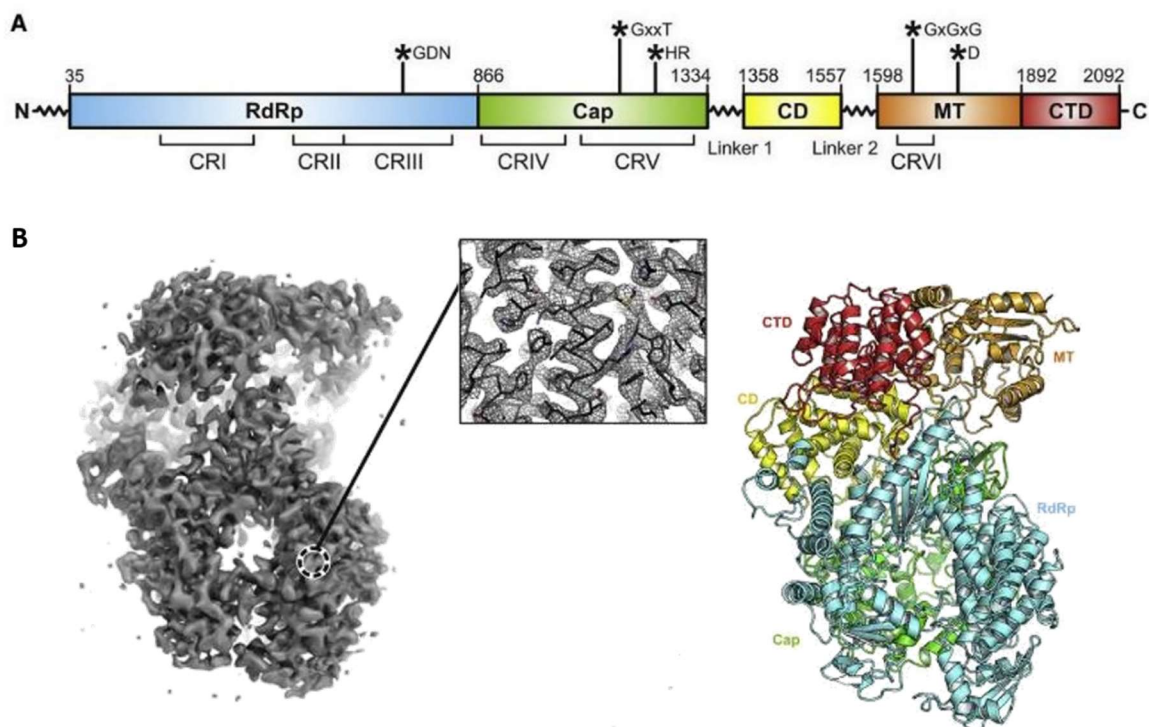


Figure 9 : Structure de la polymérase du VSV.

A. La polymérase du VSV comporte 5 domaines : le domaine ARN polymérase ARN-dépendant (RdRp, bleu), le domaine responsable de la coiffe (Cap, vert), un domaine de connexion (CD, jaune), un domaine methyl transferase (MT, orange) et un domaine C-terminal (CTD, rouge). Elle présente 6 régions de séquence conservée : CR I, CR II, CR III, CR IV, CR V et CR VI, qui sont retrouvées chez la L du RSV. B. La reconstruction 3D (gauche) et le diagramme en rubans (droite) de la L du VSV montrent une partie C-terminale en anneau composée des domaines RdRp et Cap, et 3 domaines globulaires correspondant aux domaines CD, MT et CTD. D'après (Liang et al. 2015).

Ainsi, un large domaine à son extrémité N-terminale serait responsable de son activité RdRp : il formerait une cavité en forme d'anneau avec en son cœur le site catalytique. Le domaine responsable

de la coiffe serait adjacent au domaine RdRp. Le mécanisme de coiffe des virus à ARN négatif non segmenté étant différent de celui utilisé par la cellule, il s'agit d'une polyribonucleotidyl transferase et non d'une guanylyl transferase (Liang et al. 2015). Enfin, l'extrémité C-terminale de la protéine porterait trois domaines globulaires, reliés entre eux et à la partie N-terminale de la protéine par des régions flexibles, leur permettant d'adopter différentes conformations. L'un de ces domaines serait responsable de son activité méthyltransferase.

3.2.2.2.3 La phosphoprotéine P

P est le principal co-facteur de la polymérase. Il joue un rôle clé dans les étapes de transcription et réplication en coordonnant les interactions des protéines de la nucléocapside et du complexe polymérase viral. Ainsi, il peut se lier à la protéine N complexée avec l'ARN génomique, ainsi qu'à L et M2-1, mettant en présence tous les acteurs nécessaires à l'initiation de la transcription et de la réplication virale (Galloux et al. 2012; Sourimant et al. 2015; Tran et al. 2009). De plus, il agit aussi en tant que chaperonne, empêchant les monomères libres de N de s'oligomériser ou de s'associer à l'ARN cellulaire et les recrutant pour l'encapsidation des ARN génomiques et antigénomiques naissants (Galloux et al. 2015).

La protéine P fait 35 kDa et forme des homotétramères. Elle est composée d'un domaine central d'oligomérisation flanqué de deux régions désordonnées (Castagné et al. 2004; Llorente et al. 2006). Ces régions désordonnées présentent des sites de liaison à diverses protéines virales et cellulaires. Ainsi, l'extrémité N-terminale de P interagit avec les monomères libres de N (Galloux et al. 2015). Au niveau de l'extrémité C-terminale se trouvent un site de liaison au complexe N-ARN et un site de liaison à L, permettant la mise en présence de la ribonucléocapside et de la polymérase afin d'initier la transcription et la réplication virale (Galloux et al. 2012; Sourimant et al. 2015). Un peu en amont du domaine d'oligomérisation se trouvent des sites de liaison à M2-1 et à la phosphatase cellulaire PP1, permettant le recrutement de ces protéines au niveau des sites de transcription et réplication virale et la déphosphorylation de M2-1 par PP1 (Mason et al. 2003; Richard et al. 2018) (Figure 10). De plus, N présente la capacité de former des structures secondaires transitoires, qui pourraient se stabiliser au contact de partenaires interacteurs de P (Pereira et al. 2017). Cette propriété de P de passer par endroit d'un état désordonné à un état structuré pourrait jouer un rôle dans la régulation de ses nombreuses interactions, et donc être indispensable au bon fonctionnement de la transcription et de la réplication virale.

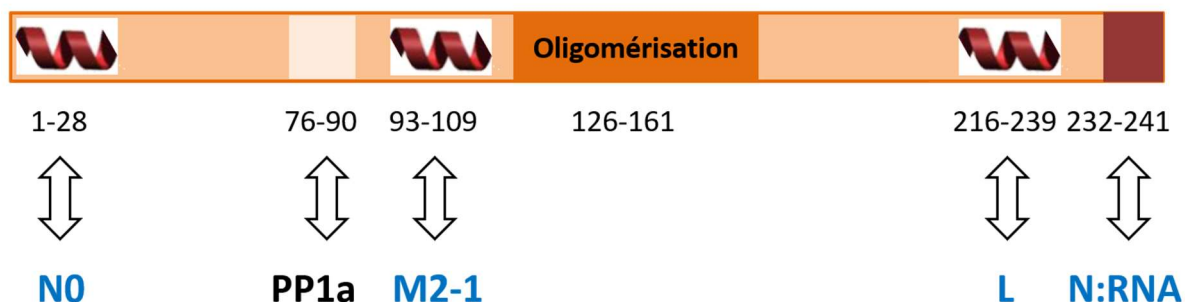


Figure 10 : Structure de la phosphoprotéine P.

La phosphoprotéine P présente deux régions désordonnées portant des sites d'interaction à diverses protéines virales et cellulaires, reliées par un domaine d'oligomérisation central. Ses sites de liaison à la N soluble (Galloux et al. 2015), la N liée à l'ARN (Galloux et al. 2012; Tran et al. 2007), L (Sourimant et al. 2015), M2-1 et PP1a (Richard et al. 2018) sont indiqués.

En outre, P porte plus d'une dizaine de sites de phosphorylation au niveau de sérines et de thréonines. Ces différentes phosphorylations de P modulent son implication dans le cycle viral. Ainsi, la phosphorylation de sa sérine 54 promeut la dissociation de M et des RNPs virales après libération des contenus du virion dans le cytoplasme, possiblement en perturbant une éventuelle interaction entre P et M (Asenjo, González-Armas, and Villanueva 2008; Asenjo, Rodríguez, and Villanueva 2005). La phosphorylation de la thréonine 108 perturbe l'interaction de P avec M2-1 (Asenjo, Calvo, and Villanueva 2006). Enfin, la phosphorylation des sérines 116, 117, 119, 232 et 237 de P modulent l'activité de M2-2 (Asenjo and Villanueva 2015).

3.2.2.2.4 Le facteur de transcription M2-1

M2-1 est la protéine synthétisée à partir du premier ORF du gène M2. Elle joue un rôle antiterminateur essentiel lors de la transcription virale : elle empêche la polymérase d'interrompre prématurément la transcription des gènes viraux. Ainsi, en son absence, la polymérase synthétise essentiellement des ARNm tronqués. Seuls les ARNm NS1 et NS2 peuvent être produits de façon complète, avec cependant avec une efficacité de transcription très réduite. De plus, M2-1 favorise la synthèse d'ARNm viraux polycistroniques (Fearn and Collins 1999).

M2-1 s'organise sous forme de tétramères (Tanner et al. 2014; Tran et al. 2009). Sa structure cristalline a été décrite (Tanner et al. 2014). Un monomère a un poids moléculaire de 22 kDa et présente à son extrémité C-terminale un large domaine impliqué dans son activité transcriptionnelle. Celui-ci possède des sites de liaison superposés à P et à l'ARN, lui donnant la capacité d'interagir avec l'ARN ainsi qu'avec P de façon compétitive. Son interaction avec l'ARN n'est pas séquence-dépendante, mais elle montre une affinité plus forte envers les régions riches en A. Quant à son interaction avec P, celle-ci est nécessaire à son recrutement dans les corps d'inclusion où se déroule la transcription. Ces deux

interactions sont indispensables à sa fonction d'activateur transcriptionnel (Blondot et al. 2012; Tran et al. 2009). Une courte région non-structurée relie le domaine C-terminal à une hélice alpha responsable de sa tétramérisation. A son extrémité N-terminale se trouve un domaine de liaison au zinc, qui peut jouer un rôle secondaire dans l'oligomérisation ou l'interaction avec l'ARN (Figure 11).

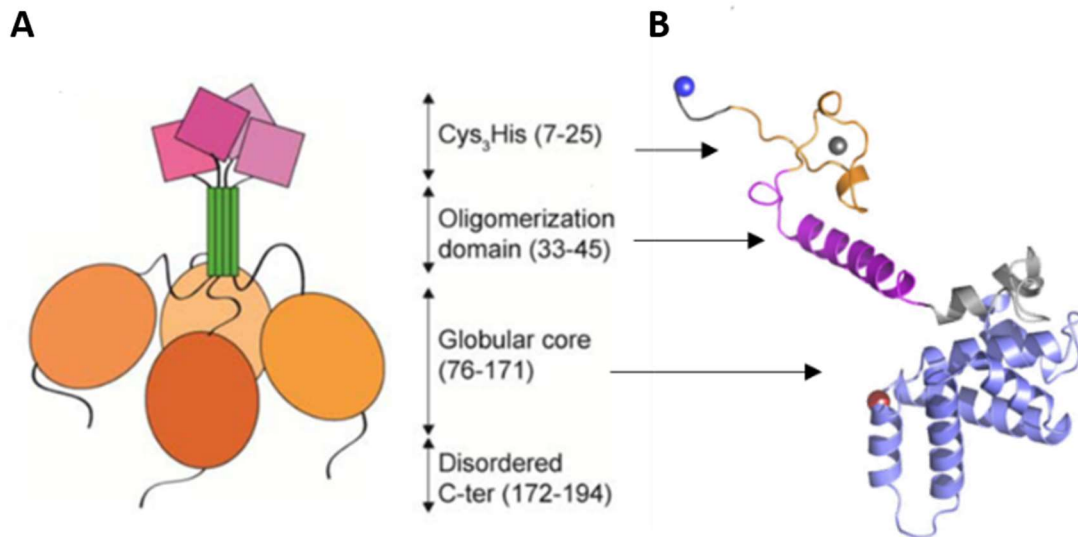


Figure 11 : Structure de la protéine M2-1.

A. Schéma d'un tétramère de M2-1. B. Le diagramme en rubans d'un monomère de M2-1 présente un large domaine C-terminal (bleu), une courte région flexible (gris), une hélice impliquée dans la tétramérisation (violet) et un domaine de liaison au zinc (orange). D'après (Blondot et al. 2012).

De plus, M2-1 présente une forme déphosphorylée et une forme phosphorylée, selon l'état de phosphorylation de deux sérines situées dans la région flexible entre le domaine C-terminal et l'hélice d'oligomérisation. En absence d'autres protéines virales, elle est exclusivement phosphorylée. En présence de P, elle est déphosphorylée par PP1a, qui est recrutée par P grâce à sa capacité à se lier à la fois à M2-1 et à PP1a (Richard et al. 2018).

3.2.2.2.5 La protéine régulatrice M2-2

M2-2, la petite protéine correspondant au deuxième ORF du gène M2, provoque dans la phase tardive de l'infection une inhibition de la synthèse d'ARNm viraux et une augmentation de la synthèse d'ARN génomique et antigénomique. Elle régule donc la polymérase en favorisant un basculement de son activité de transcription vers son activité de réplication (Bermingham and Collins 1999).

3.3 Cycle viral

3.3.1 Entrée

In vivo, le RSV infecte préférentiellement les cellules ciliées de l'épithélium respiratoire, au niveau de la membrane apicale (Villenave et al. 2012; Zhang et al. 2002). *In vitro*, il présente un tropisme beaucoup plus large : la majorité des lignées cellulaires sont permissives au RSV.

L'attachement du virus à la cellule dépend des protéines d'enveloppe F et G. Différents récepteurs ont été proposés, reconnus par F ou par G. La variété des récepteurs potentiels identifiés pourrait indiquer plusieurs voies d'entrée variant selon le modèle cellulaire ou la souche virale étudiée.

Il a d'abord été mis en évidence que G interagit avec les glycosaminoglycanes (GAGs) de la surface cellulaire, et tout particulièrement avec le sulfate d'héparane, par un domaine de liaison à l'héparine, et des expériences de compétition ainsi que de digestion des GAGs sur des lignées cellulaires ont montré une implication importante dans l'infectiosité du virus (Feldman, Audet, and Beeler 2000; Feldman, Hendry, and Beeler 1999). Cependant, le sulfate d'héparane n'étant pas présent à la surface apicale des cellules de l'épithélium respiratoire, ce mécanisme n'intervient sans doute pas dans l'entrée du RSV *in vivo* (Johnson et al. 2015).

G reconnaît aussi le récepteur de la fractalkine CX3CR1 par le biais d'un motif CX3C à la surface de celle-là, et cette interaction est impliquée dans l'attachement du virus aux cellules de culture primaire d'épithélium respiratoire (Chirkova et al. 2015; Jeong et al. 2015; Johnson et al. 2015). De façon intéressante, CX3CR1 n'est présent dans l'épithélium respiratoire qu'au niveau des cellules ciliées, ce qui pourrait expliquer le tropisme du virus. Cependant, la viabilité du RSV recombinant dépourvu de G *in vitro* et *in vivo* (bien qu'il soit atténué *in vivo*) indique que le RSV possède d'autres voies d'entrées dans ses cellules-hôtes (Techaarpornkul et al. 2001).

La nucléoline a été identifiée en 2011 comme un partenaire interacteur de F, et des expériences de neutralisation par anticorps anti-nucléoline, de compétition et d'interférence par des siRNA sur 1HAEO- (une lignée cellulaire de l'épithélium respiratoire humain) montrent toutes une diminution de l'infection. De plus, la transfection de nucléoline dans des cellules d'insecte *S. frugiperda* Sf9 non-permissives suffit à les rendre susceptibles à l'infection par le RSV, et l'inhibition de l'expression de la nucléoline par des siRNA *in vivo* diminue significativement l'infection (Tayyari et al. 2011).

F interagit aussi avec la molécule d'adhésion ICAM1, et des expériences de neutralisation par anticorps anti-ICAM1 et de compétition semblent montrer une inhibition de l'infection par le RSV sur plusieurs

lignées cellulaires (Behera et al. 2001). F activerait aussi le récepteur TLR4 (Kurt-Jones et al. 2000). Ces protéines sont donc elles aussi des récepteurs potentiels du RSV.

De même que les protéines impliquées dans l'attachement du RSV à la cellule-hôte restent discutées, les modalités de l'entrée proprement dite du virion sont encore controversées. Des résultats de diverses études semblent indiquer soit une fusion au niveau de la membrane plasmique, soit une internalisation par endocytose ou macropinocytose suivie d'une fusion au niveau de la membrane vésiculaire, soit une héli-fusion au niveau de la membrane plasmique suivie par une internalisation (Kolokoltsov et al. 2007; Krzyzaniak et al. 2013; San-Juan-Vergara et al. 2012). Dans tous les cas, c'est la protéine F qui est responsable de la fusion, par le mécanisme décrit dans le chapitre 3.2.

3.3.2 Transcription et Réplication

3.3.2.1 *Corps d'inclusion*

Après la libération du contenu du virion dans le cytoplasme commencent les étapes de transcription et de réplication du cycle viral. Elles ont lieu dans des structures cytoplasmiques appelées corps d'inclusion (IBs). Cependant, la synthèse d'ARNm viraux débute environ 4 h post-infection (p.i), tandis que les IBs ne sont pas visibles avant 8 h p.i, suggérant qu'au tout début de l'infection la transcription virale a lieu dans le cytoplasme ou dans des IBs trop petits pour être détectés (Rincheval et al. 2017).

Ces structures se forment aussi bien en lignées cellulaires que dans les cellules de patients (Kumaria et al. 2011). Observés par microscopie électronique, ces IBs ressemblent à des agrégats de nature granulaire ou amorphe (Norrby, Marusyk, and Orvell 1970). S'y accumulent les protéines virales N, P, M2-1, L et M, ainsi que l'ARN viral (Carromeu et al. 2007; Li et al. 2008; Lifland et al. 2012; Rincheval et al. 2017), mais seul N et P sont nécessaires et suffisantes à leur formation (Garcia et al. 1993). Les IBs présentent des sous-structures de taille variable, nommées granules associés aux corps d'inclusion (IBAGs), où s'accumulent les ARNm viraux et M2-1, mais dont sont exclus N, P, L et l'ARN génomique (Rincheval et al. 2017).

Les étapes de transcription et de réplication virales ont lieu à l'intérieur des IBs. Puis les ARNm néosynthétisés s'accumulent dans les IBAGs, et en sortent pour être ensuite traduits dans le cytoplasme (Rincheval et al. 2017) (Figure 12). Outre leur rôle d'usine virale, les IBs participent au contrôle de la réponse cellulaire antivirale en séquestrant des protéines cellulaires impliquées dans l'immunité (Fricke et al. 2013; Lifland et al. 2012).

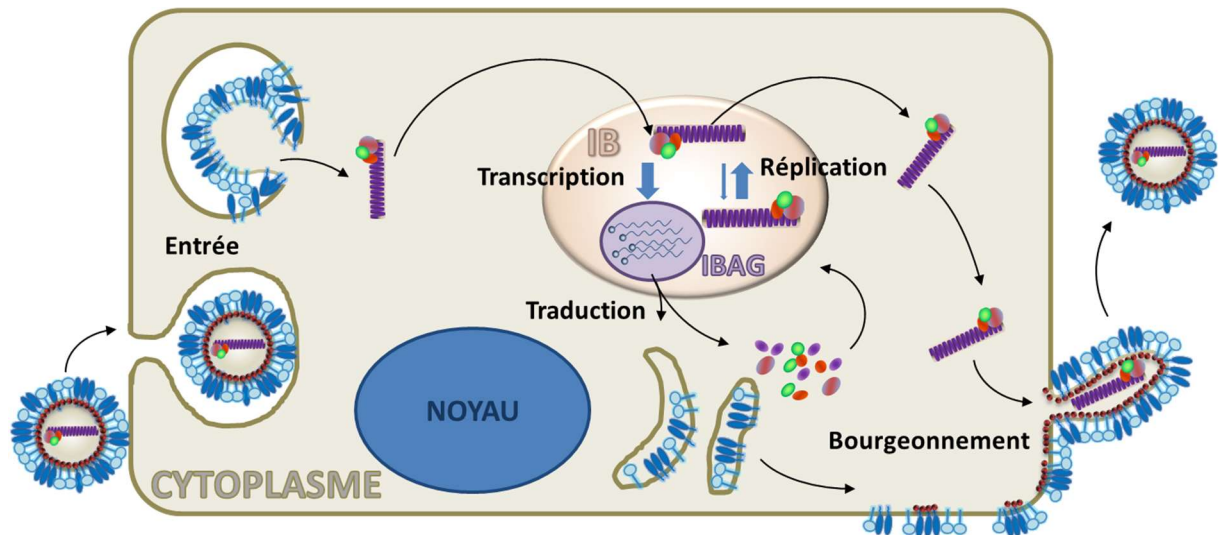


Figure 12 : Schéma du cycle viral du RSV.

Le RSV adhère à la cellule grâce à ses protéines membranaires. Après une probable internalisation du virion par endocytose ou macropinocytose, l'enveloppe virale fusionne avec la membrane plasmique. La RNP virale est alors libérée dans le cytoplasme. La réplication et la transcription du génome viral ont lieu à l'intérieur de structures virales cytoplasmiques, les IBs. Après leur synthèse, les ARNm viraux sont stockés au sein de sous-structures des IBs, les IBAGs, puis exportés dans le cytoplasme, où ils sont traduits. Les protéines virales membranaires rejoignent la membrane plasmique par la voie sécrétoire classique. Les autres protéines virales s'associent aux génomes viraux issus de la réplication puis retrouvent F, G et SH à la membrane plasmique au niveau de radeaux lipidiques. Le bourgeonnement a lieu au niveau de ces sites et permet la formation des virions, qui prennent la forme de filaments, de sphères et de particules asymétriques.

3.3.2.2 Transcription

La protéine P, grâce à sa capacité à interagir à la fois avec L et avec le complexe N-ARN, recrute aux IBs le complexe polymérase et le met en contact avec la nucléocapside. D'après le modèle actuel (Noton and Fearn 2015), L est recrutée sur l'ARN au niveau des nucléotides 3-11 de la séquence *leader* 3', qui présentent une forte homologie avec les séquences GS. Elle initie la transcription au niveau du nucléotide 3 mais échoue à entrer dans un état d'élongation stable et relâche ce premier ARN après 20 à 25 nucléotides (Tremaglio et al. 2013). Elle scanne le génome jusqu'à trouver le GS de NS1 et ré-initie alors la synthèse d'ARNm, jusqu'à arriver au GE qui marque la fin de la transcription et la libération de l'ARNm. La présence de M2-1 est nécessaire à l'élongation de l'ARNm. La mise en place de la coiffe est gérée par la polymérase en parallèle de l'élongation, et l'élongation s'arrête prématurément (après 45-50 nucléotides) en cas d'échec de la mise en place de la coiffe (Liuzzi et al. 2005). La coiffe est mise en place par une activité polyribonucleotidyl transferase et non guanylyl transferase comme pour les ARNm cellulaires. La méthylation de la coiffe est elle aussi effectuée par L en parallèle de la transcription, mais elle n'est pas nécessaire à l'élongation. A la fin de la synthèse de

l'ARNm viral, la polyadénylation est effectuée lorsque la L « patine » sur la région polyU du GE (Whelan, Barr, and Wertz 2004).

A chaque terminaison de la transcription sur une séquence GE, la polymérase scanne ensuite le génome à la recherche du prochain Gene Start, afin d'initier la transcription de l'ARNm suivant. Ce processus de scanning se fait en aval mais aussi en amont de sa position actuelle, comme le montre la capacité de L d'initier la transcription de L en venant du GE de M2, qui est situé en aval du GS de L. En parcourant l'entièreté du génome, la polymérase réalise la synthèse de tous les ARNm viraux monocistroniques, jusqu'à la séquence *trailer* au niveau de laquelle la polymérase se dissocie de l'ARN génomique. Au niveau de chaque jonction intergénique, la polymérase présente une probabilité de se détacher, ce qui conduit à un gradient d'expression des gènes viraux, ceux en amont étant exprimés plus que ceux en aval (Iverson and Rose 1981; Kuo, Fearn, and Collins 1996). De plus, la polymérase échoue parfois à reconnaître les Gene End, amenant à la synthèse d'ARNm polycistroniques.

Les ARNm néosynthétisés, polyadénylés et coiffés, s'accumulent au sein des IBAGs puis sortent des IBs et sont traduits au niveau du cytoplasme par la machinerie cellulaire (Rincheval et al. 2017). L'ARNm de M2, qui contient deux ORFs superposés codant pour M2-1 et M2-2, est traduit par un processus de terminaison et réinitiation couplées où les complexes ribosomiaux terminant la traduction de M2-1 sont redirigés afin d'initier la traduction de M2-2 (Ahmadian et al. 2000). Des structures secondaires à l'intérieur de la séquence de M2-1 sont impliquées dans ce processus (Gould and Easton 2005).

3.3.2.3 Réplication

Entre 12 h et 18 h p.i, un basculement s'opère de la transcription vers la réplication du génome viral, en partie grâce à la protéine M2-2 (Bermingham and Collins 1999). D'autres facteurs, comme l'abondance de N disponible pour l'encapsidation, pourraient aussi moduler cette transition. La polymérase entre en mode hyper-processif et synthétise un ARN antigénomique complet de polarité positive, qui sert ensuite de matrice à la production d'un nouvel ARN génomique de polarité négative. La protéine P, en se liant aux monomères libres de N, orchestre l'encapsidation du brin d'ARN naissant au fur et à mesure de la réplication (Galloux et al. 2015; Gubbay, Curran, and Kolakofsky 2001).

Comme la plupart des virus à ARN, la réplication du RSV donne lieu à des mutations spontanées à une fréquence assez forte, avec un taux de substitution de nucléotides de 10^{-3} à 10^{-4} (Collins, Fearn, and Graham 2013).

3.3.3 Bourgeonnement

Dans les cellules polarisées, le bourgeonnement des particules infectieuses se fait au niveau de la surface apicale (Zhang et al. 2002). Ces virions prennent la forme soit de sphères, soit de particules

asymétriques, soit de long filaments rattachés à la membrane plasmique (Gower et al. 2005). Leur composition est abordée dans le chapitre 3.1, dans le paragraphe Structure du virion. Les protéines virales F, M, N et P sont nécessaires et suffisantes à la formation de ces structures (Teng and Collins 1998).

F, G et SH transitent au niveau de la membrane plasmique par la voie sécrétoire classique des protéines membranaires, où elles se concentrent au niveau de radeaux lipidiques (McCurdy and Graham 2003; McDonald et al. 2004; Yeo et al. 2009). Des RNPs virales contenant l'ARN génomique viral, N, P et M s'accumulent à la surface interne de la membrane au niveau de ces sites. F, et en particulier sa queue cytoplasmique, est responsable du rassemblement des RNPs et des protéines membranaires virales au niveau de ces radeaux lipidiques (Batonick and Wertz 2011; Oomens, Bevis, and Wertz 2006). Au niveau de ces sites se forment les filaments viraux. La queue cytoplasmique de F joue un rôle central dans l'initiation de la formation de ces filaments (Baviskar et al. 2013; Shaikh et al. 2012) tandis que M est nécessaire à leur maturation (Mitra et al. 2012). Un modèle établi par Liljeroos et al. propose que ces filaments doivent leur forme à leur « échafaudage » interne de M, et que pour les particules détachées de la membrane plasmique, la couche de M se désorganise par endroit, provoquant un arrondissement de l'enveloppe virale, ce qui serait à l'origine des virions asymétriques et sphériques (Liljeroos et al. 2013).

Le cytosquelette d'actine et les microtubules interviennent tous deux dans le bourgeonnement, mais leur rôle est encore mal défini. Il semblerait que les microtubules participent plutôt à la formation des filaments viraux et que l'actine facilite la libération des virions (Kallewaard, Bowen, and Crowe 2005; Vanover et al. 2017). En outre, quelques études montrent que des éléments de l'endosome de recyclage seraient impliqués dans le bourgeonnement (Brock et al. 2003; Utley et al. 2008). En particulier, Daryll Vanover observe la formation de filaments viraux au niveau de vésicules intracellulaires (Vanover et al. 2017), indiquant que ces structures pourraient se former dans l'endosome de recyclage puis être transportées à la membrane plasmique.

3.4 Interactions protéine-protéine impliquées dans l'infection par le RSV

Les virus assurent leur multiplication en détournant la machinerie cellulaire et en perturbant les mécanismes de défense de la cellule. De nombreuses interactions protéines-protéines interviennent dans ces processus. Il existe une littérature abondante sur ces interactions chez des virus comme le VIH et l'influenza A, mais l'interactome cellulaire de protéines du RSV est encore assez peu exploré. Après une présentation rapide des quelques articles dédiés à ce sujet, les interactions des protéines du RSV connues à ce jour seront récapitulées.

3.4.1 Etudes portant sur l'interactome des protéines du RSV

Seules 3 études ont exploré l'interactome cellulaire de protéines du RSV par des méthodes de criblage. Les deux premières effectuent des co-immunoprécipitations d'une protéine virale (L, P ou NS1) étiquetée *in cellula*, puis identifient les protéines cellulaires co-immunoprécipitées par des analyses quantitatives de spectrométrie de masse (Munday et al. 2015; Wu et al. 2012). La troisième utilise une technique de microfluidique qui consiste à faire circuler de la M purifiée dans une puce contenant 500 protéines cellulaires immobilisées, puis de détecter par immunofluorescence la M capturée pour chaque protéine cellulaire (Kipper et al. 2015). Ces approches ont permis d'identifier 19 interacteurs potentiels de L, 38 interacteurs potentiels de P, 221 interacteurs potentiels de NS1 et 93 interacteurs potentiels de M.

Parmi ces interactions potentielles, certaines ont été validées grâce à une co-immunoprécipitation des différentes protéines virales et à la visualisation de leur partenaires en Western blot. Wu et al. identifient ainsi 4 interacteurs cellulaires de NS1 (l'ARN polymérase II, la cycline C, Med8 et ATR). Kipper et al. 5 interacteurs de M (les cavéolines 1 et 3, la cofiline 1, ZNF502 et Tom22), et Munday et al. 2 interacteurs de L (Hsp90 et STIP1).

Une 4^e étude, sans effectuer de crible proprement dit, sélectionne à partir de données de co-immunoprécipitations suivies de spectrométrie de masse 5 protéines pouvant interagir avec N, P ou M. Ces 5 interactions sont démontrées par co-immunoprécipitation des protéines cellulaires et visualisation des partenaires viraux en Western blot. Cette étude identifie un interacteur de M (la nucléophosmine), un interacteur de N (Mep50), un interacteur de M et P (la tropomyosine) et un interacteur de N et P (Hsp70) (Oliveira et al. 2013).

D'autres interactions des protéines du RSV sont identifiées au sein d'une quinzaine d'autres articles.

3.4.2 Interactions des protéines du RSV identifiées à ce jour

4 études dédiées à l'interactome des protéines du RSV ainsi qu'une quinzaine d'autres études ont permis d'identifier un certain nombre de partenaires cellulaires de diverses protéines du RSV (Tableau 1). Une majorité de ces interactions n'a été décrite qu'une fois, et pour beaucoup leur rôle dans le cycle viral n'a pas été identifié.

Certaines de ces protéines sont membranaires et interagissent avec F ou G, et sont donc des récepteurs potentiels du RSV. Ces protéines ont déjà été discutées dans le chapitre 3.3, section Entrée, et ne seront donc pas abordés de nouveau.

3.4.2.1 *Interacteurs cellulaires des protéines non-structurales et de N*

Les protéines non-structurales NS1 et NS2 interagissent avec plusieurs protéines cellulaires impliquées dans la réponse antivirale. Ainsi, NS2 interagit avec RIG-I, un récepteur capable de détecter les ARN double-brin issus de la réplication virale, et bloque sa liaison à MAVS, perturbant la voie de production des interférons de type I (Ling et al. 2009).

Ces protéines virales perturbent aussi la réponse interféron en induisant la dégradation de STAT2 par le protéasome (Lo et al. 2005; Ramaswamy et al. 2004, 2006). Ces résultats sont confirmés par la mise en évidence d'une interaction entre NS1 et deux éléments du complexe ubiquitine ligase E3 (Cul2 et l'élongine 3), qui ubiquityle les protéines destinées à la dégradation (Elliott et al. 2007). De plus, une autre étude identifie MAP1B, une protéine associée aux microtubules impliquée dans la dégradation de STAT2 induite par le RSV, parmi les protéines co-immunoprécipitées à la fois avec NS1 et NS2 (Swedan et al. 2011).

En outre, l'étude de Wu et al. indique que NS1 interagit avec l'ARN polymérase II et deux composants du complexe mediator (la cycline C et Med8), un complexe central à la régulation de la transcription. Ceci indique que NS1 pourrait moduler la transcription de l'hôte via ce complexe mediator. La même étude détermine que NS1 interagit avec ATR, une protéine impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire, et favorise l'arrêt en phase G₁ des cellules infectées par le RSV (Wu et al. 2012).

La protéine de capside N intervient elle aussi dans le contrôle de la réponse antivirale en ciblant deux protéines à la source de la réponse antivirale, toutes deux capables de détecter les ARN double-brin issus de la réplication virale. Ainsi, N interagit avec la kinase PKR et l'empêche de phosphoryler le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α et donc d'inhiber la traduction (Groskreutz et al. 2010). N interagit aussi avec MDA5, dont l'activation conduit à la production d'interféron β , et provoque sa séquestration dans les IBs (Lifland et al. 2012). Enfin, N interagit avec Mep50, un constituant du complexe methylosome, qui assure la méthylation de protéines du spliceosome (Oliveira et al. 2013).

3.4.2.2 *Interacteurs cellulaires de M*

M interagit avec de nombreuses protéines associées au cytosquelette, ce qui est cohérent avec son rôle majeur dans l'assemblage des virions et leur bourgeonnement. Ainsi, cette protéine virale interagit directement avec l'actine polymérisée ainsi qu'avec deux protéines associées aux filaments d'actine, la cofiline 1 et la tropomyosine (Kipper et al. 2015; Oliveira et al. 2013; Shahriari, Wei, and Ghildyal 2018). La tropomyosine est également co-immunoprécipitée avec P.

Les cavéolines 1 et 3 sont également des partenaires cellulaires de M (Kipper et al. 2015). Ceci semble indiquer que les vésicules à cavéoline sont impliquées dans le cycle viral. Cette intervention pourrait avoir lieu au moment du bourgeonnement, comme le montre la présence de cavéoline au niveau des filaments viraux (Vanover et al. 2017).

La nucléophosmine, une chaperonne impliquée dans la biogénèse et l'export des ribosomes et dans l'assemblage des histones, est aussi retrouvée comme partenaire de M (Oliveira et al. 2013).

Enfin, le crible de Kipper et al. identifie aussi la protéine Tom22, une protéine de la membrane externe des mitochondries impliquée dans le transport des protéines vers la mitochondrie, et ZNF502, une protéine à motif en doigt de zinc dont la fonction est inconnue, comme interacteurs de M (Kipper et al. 2015).

3.4.2.3 *Interacteurs cellulaires du complexe polymérase viral*

Le complexe polymérase viral, composé de L, P et M2-1, est associé à quelques interacteurs cellulaires, principalement des protéines chaperonnes. Ainsi, Hsp70 est co-immunoprécipitée avec le complexe polymérase viral, est retrouvée dans les sites de bourgeonnement du virus et pourrait participer à la transcription virale (Brown et al. 2005; Munday et al. 2015; Oliveira et al. 2013). Hsp90 est co-immunoprécipitée avec L et stabilise cette protéine virale massive (Geller, Andino, and Frydman 2013; Munday et al. 2015). STIP1, un cofacteur de Hsp70 et Hsp90, interagit aussi avec L (Munday et al. 2015). D'autres protéines chaperonnes (DNJA1, DNJA2, DNJB6, TCPB) sont aussi retrouvées parmi les interacteurs potentiels de L identifiés par Munday et al.

Enfin, P interagit avec la phosphatase PPIa, et cette interaction permet le recrutement de PPIa aux IBs et la déphosphorylation de M2-1 (Richard et al. 2018).

Avant ces travaux, aucun partenaire cellulaire de M2-1 n'avait été identifié. Les expériences réalisées lors de cette thèse ont mis en évidence une interaction entre M2-1 et PABPC1, une protéine cellulaire décrite dans le prochain chapitre.

Tableau 1 : Partenaires cellulaires des protéines du RSV

Protéine cellulaire	Fonction	Interacteur viral
RIG-I	Réponse interféron de type I	NS2
Culline 2	Dégradation protéique	NS1
Elongine 3	Dégradation protéique	NS1
MAP1B	Cytosquelette	NS1, NS2
ARN polymérase II	Transcription	NS1
Cycline C	Régulation de la transcription	NS1
Med8	Régulation de la transcription	NS1
ATR	Arrêt du cycle cellulaire	NS1
PKR	Réponse interféron de type I	N
MDA5	Réponse interféron de type I	N
Mep50	Maturation du spliceosome	N
Actine	Cytosquelette	M
Cofiline 1	Cytosquelette	M
Tropomyosine	Cytosquelette	M, P
Cavéoline 1	Transport vésiculaire	M
Cavéoline 3	Transport vésiculaire	M
Nucléophosmine	Chaperonne	M
Tom22	Import mitochondrial	M
ZNF502	-	M
Hsp70	Chaperonne	L, N, P
Hsp90	Chaperonne	L
STIP1	Chaperonne	L
PP1a	Phosphorylation	P

3.5 PABPC1 (PolyA-binding protein cytoplasmic 1)

3.5.1 Famille PABP

Les protéines de liaison aux polyA (PABP) sont une famille de protéines fortement conservées chez les eucaryotes, qui reconnaissent spécifiquement la queue polyadénylée des ARNm. Le nombre de PABP varie selon les organismes, de 1 pour la plupart des eucaryotes unicellulaires à 8 chez *Arabidopsis thaliana*.

Chez l'être humain, on en dénombre 6 (Tableau 2). PABPN1 (parfois appelée PABP2) est essentiellement nucléaire et joue un rôle important dans les modifications post-transcriptionnelles des ARNm. Toutes les autres PABP sont essentiellement cytoplasmiques. La PABP cytoplasmique majeure, PABPC1, fait partie du complexe d'initiation de la traduction et joue un rôle central dans la stabilité des ARNm.

PABPN1 et PABPC1 sont les PABP les plus étudiées, mais il en existe quatre autres, sur lesquelles on connaît encore peu de choses. PABPC2 (tPABP, PABPC1L) et PABPC3 (ePABP) sont exprimées uniquement dans les tissus testiculaires et embryonnaires respectivement. PABPC4 (ou iPABP, PABP inducible), est peu exprimée à l'état basal mais a été décrite comme fortement induite lors de l'activation des lymphocytes T et des plaquettes (Houng et al. 1997; Yang, Duckett, and Lindsten 1995). Enfin, PABPC5, ou X-linked PABP, est codée par un gène situé sur le chromosome X (Blanco et al. 2001). Les fonctions de ces 4 PABP sont encore peu explorées, mais ces protéines pourraient assurer une certaine redondance fonctionnelle. Ainsi, l'inhibition de PABPN1 induit une relocalisation de PABPC4 au noyau et une augmentation de la quantité de PABPC5 dans le cytoplasme, ce qui laisse à penser que ces protéines peuvent en cas de besoin suppléer PABPC1 et PABPN1 (Bhattacharjee and Bag 2012).

Tableau 2 : Récapitulatif des protéines de la famille PABP

Noms	Particularité majeure	Locus chromosomique
PABPC1, PABP1	Rôle majeur dans la traduction	8q22.2-q23
PABPC2, tPABP	Expression uniquement testiculaire	20
PABPC3, ePABP	Expression uniquement embryonnaire	13q12-q13
PABPC4, iPABP	Inductible dans certains types cellulaires	1p34.2
PABPC5, xPABP	Non décrite	Xq21.3
PABPN1, PABP2	Rôle majeur dans la maturation des ARNm	14q11.2

3.5.2 Structure de PABPC1

PABPC1 est une protéine de 70 kDa comprenant 636 acides aminés. Elle est composée, de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale, de 4 domaines RRM successifs, d'une région désordonnée et d'un domaine MLLE (Figure 13).

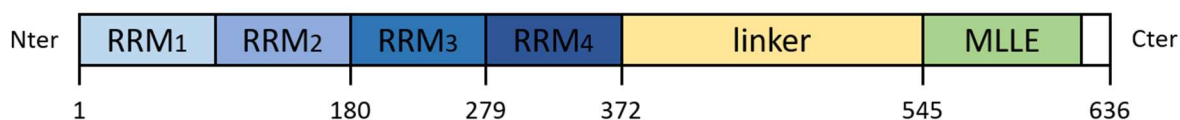


Figure 13 : Domaines de PABPC1.

PABPC1 possède 4 domaines RRM successifs, une région désordonnée et un domaine MLLE C-terminal. D'après (Joncourt et al. 2014).

Les 4 domaines successifs sur son côté N-terminal sont appelés « motifs de reconnaissance ARN » ou RRM. Ces domaines sont retrouvés chez de nombreuses protéines ayant la capacité de se lier à l'ARN. Chaque RRM est long de 90-100 acides aminés et constitue un domaine globulaire formé de 4 feuillets β antiparallèles flanqués de 2 hélices α (Figure 14A). Les 2 feuillets β centraux présentent deux motifs fortement conservés, RNP-1 et RNP-2, de 8 et 6 acides aminés respectivement. Aucun des domaines RRM ne peut se lier à l'ARN polyA seul. La liaison à l'ARN polyA nécessite au minimum deux RRM adjacents. Les feuillets β des deux RRM forment un sillon dans lequel se placent 8 nucléotides adényliques (Figure 14B). Le 1^{er} RRM interagit avec les adényles 2 à 5, le 2^e avec les adényles 5 à 8, et la courte région qui les relie interagit avec les adényles 5 et 6. Les motifs RNP-1 et RNP-2 de chaque RRM contribuent à la liaison avec les adényles 4 et 8 (Deo et al. 1999). Les deux premiers et les deux derniers RRM (RRM₁₋₂ et RRM₃₋₄) forment deux unités fonctionnelles distinctes. RRM₁₋₂ montre une affinité à l'ARN polyA proche de celle de la protéine entière, tandis que RRM₃₋₄ possède une affinité à l'ARN moins forte mais peut interagir avec des séquences plus hétérogènes (Burd, Matunis, and Dreyfuss 1991; Khanam et al. 2006; Kühn and Pieler 1996).

A l'extrémité C-terminale de la protéine se trouve le domaine MLLE (aussi appelé PABC), composé de 5 hélices α (Figure 14C). Il tire son nom d'un motif très conservé KITGMLLE au niveau de l'hélice 3. Ce domaine est responsable de la majorité des interactions protéine-protéine de PABP, et interagit notamment avec le motif PAM2 retrouvé chez de nombreuses protéines cellulaires. Le domaine MLLE n'est présent que chez les PABP et chez une autre protéine, l'ubiquitin E3 ligase appelée HYD, EDD or Rat100, où il serait aussi impliqué dans des interactions protéine-protéine (Kozlov et al. 2001, 2004, 2010).

Les domaines RRM sont reliés au domaine MLLE par une région désordonnée riche en prolines. Cette région est responsable de l'oligomérisation de PABPC1 en présence d'ARN polyA, ce qui pourrait

favoriser la liaison coopérative de plusieurs PABPC1 successives au niveau d'une même queue polyA. En l'absence de polyA, les RRM₁₋₂ bloquent cette oligomérisation, permettant à PABPC1 de rester monomérique (Kühn and Pieler 1996; Melo et al. 2003).

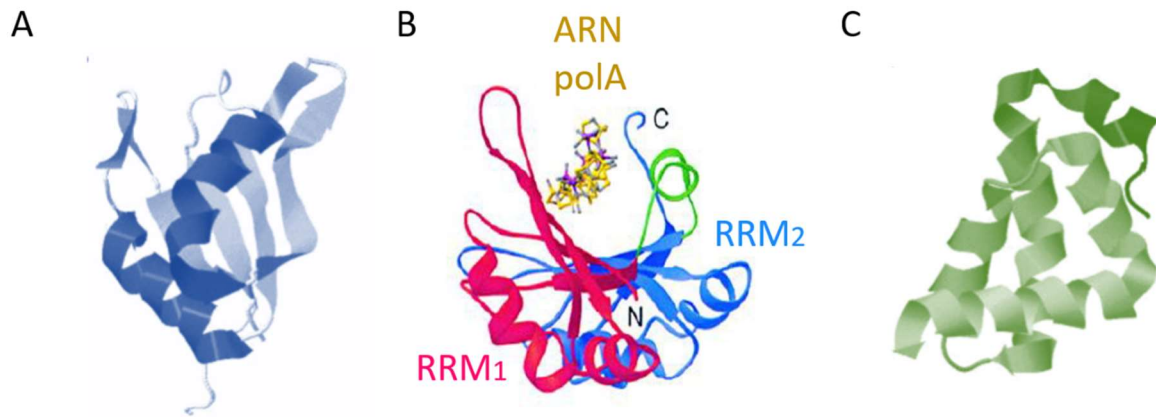


Figure 14 : Structure de PABPC1.

A. Le diagramme en rubans d'un domaine RRM présente 4 feuillets β flanqués par deux hélices α . D'après (Eliseeva, Lyabin, and Ovchinnikov 2013). B. L'ARN polyA se lie à deux RRM adjacents au niveau d'un sillon formé par les feuillets β . D'après (Deo et al. 1999). C. Le diagramme en rubans du domaine MLE présente cinq hélices α . D'après (Eliseeva et al. 2013).

PABPC1 est majoritairement présente dans le cytoplasme des cellules, mais elle est aussi retrouvée dans le noyau et effectue des allers-retours entre ces deux compartiments (Afonina, Stauber, and Pavlakis 1998). Des signaux de localisation nucléaire (NLS) au niveau de RRM₄ et d'export nucléaire (NES) au niveau de RRM₁ ont été identifiés chez Pab1, l'unique PABP de la levure dont la structure est très similaire à celle de PABPC1. Ils interagissent respectivement avec l'importine Sxm1/Kap108 et l'exportine CRM1 (Brune et al. 2005).

Les autres protéines de la famille PABP ont pour la plupart une structure très semblable à celle de PABPC1, avec 4 RRM, une région désordonnée et un domaine MLE. Seules PABPC5 et PABPN1 sont différentes. PABPC5 possède bien 4 RRM mais est dépourvue de la région désordonnée et du domaine MLE. PABPN1 n'a qu'un seul domaine RRM, et ne présente pas non plus de domaine MLE (Figure 15).

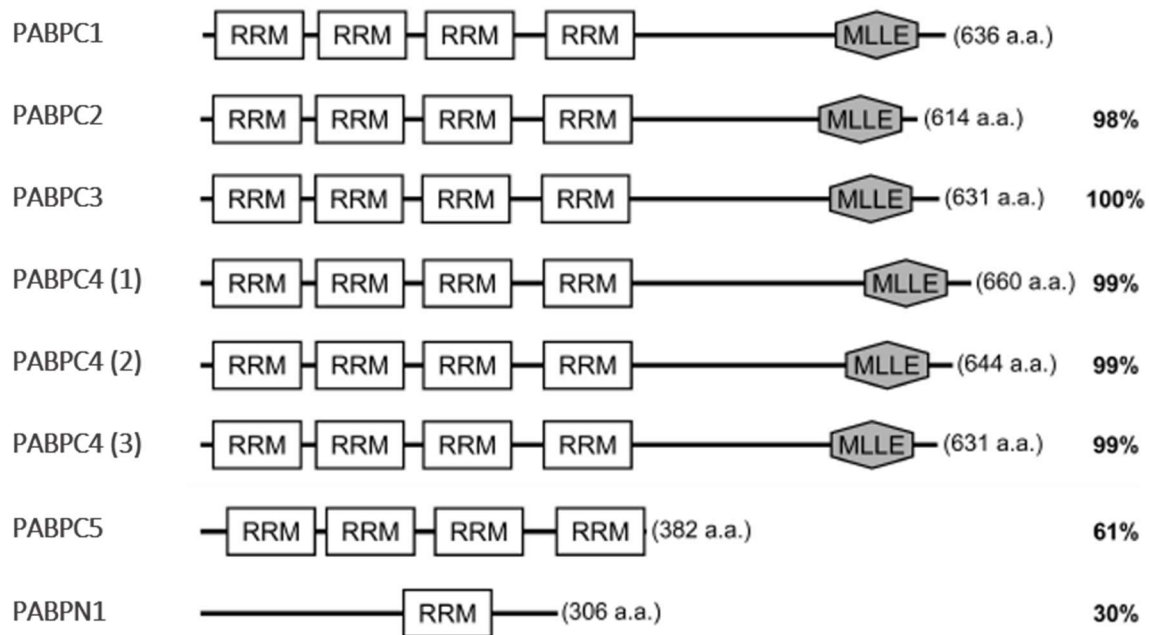


Figure 15 : Domaines des 6 PABP humaines.

Ce schéma présente la structure des 6 protéines de la famille PABP humaine (PABPC1, PABPC2, PABPC3, PABPC4, PABPC5 et PABPN1). Les 3 isoformes de PABPC4 sont représentées. Toutes les PABP cytoplasmiques possèdent 4 domaines RRM de liaison à l'ARN ainsi qu'un domaine MLLE (sauf PABPC5). PABPN1 ne présente qu'un seul RRM. La longueur et le pourcentage d'identité avec PABPC1 de chaque PABP sont précisés. D'après (Eliseeva et al. 2013).

3.5.3 Interacteurs connus de PABPC1

PABPC1 interagit avec de nombreuses protéines cellulaires, le plus souvent impliquées dans le métabolisme des ARNm et la traduction (Figure 16). Le rôle de ces interactions dans la fonction de PABPC1 sera discuté plus loin, dans le paragraphe Rôles de PABPC1. Tout d'abord, PABPC1 se lie à deux membres du complexe d'initiation de la traduction : eIF4G, via la région RRM₁₋₂ (Imataka, Gradi, and Sonenberg 1998), et eIF4B, via la région C-terminale de PABPC1 (Bushell et al. 2001).

La protéine Msi1 interagit avec PABPC1 au niveau du même domaine que eIF4G, et c'est cette compétition qui lui confère son activité inhibitrice de la traduction de certains ARNm (Kawahara et al. 2008).

PABPC1 se lie aussi à Paip1, un activateur de traduction, et Paip2A et Paip2B, des inhibiteurs de traduction. Ces protéines contiennent deux mêmes motifs d'interaction à PABPC1 : PAM1, qui interagit avec le RRM₁₋₂ de PABPC1, et PAM2, qui interagit avec le domaine MLLE (Berlanga, Baass, and Sonenberg 2006; Khaleghpour et al. 2001; Roy et al. 2002).

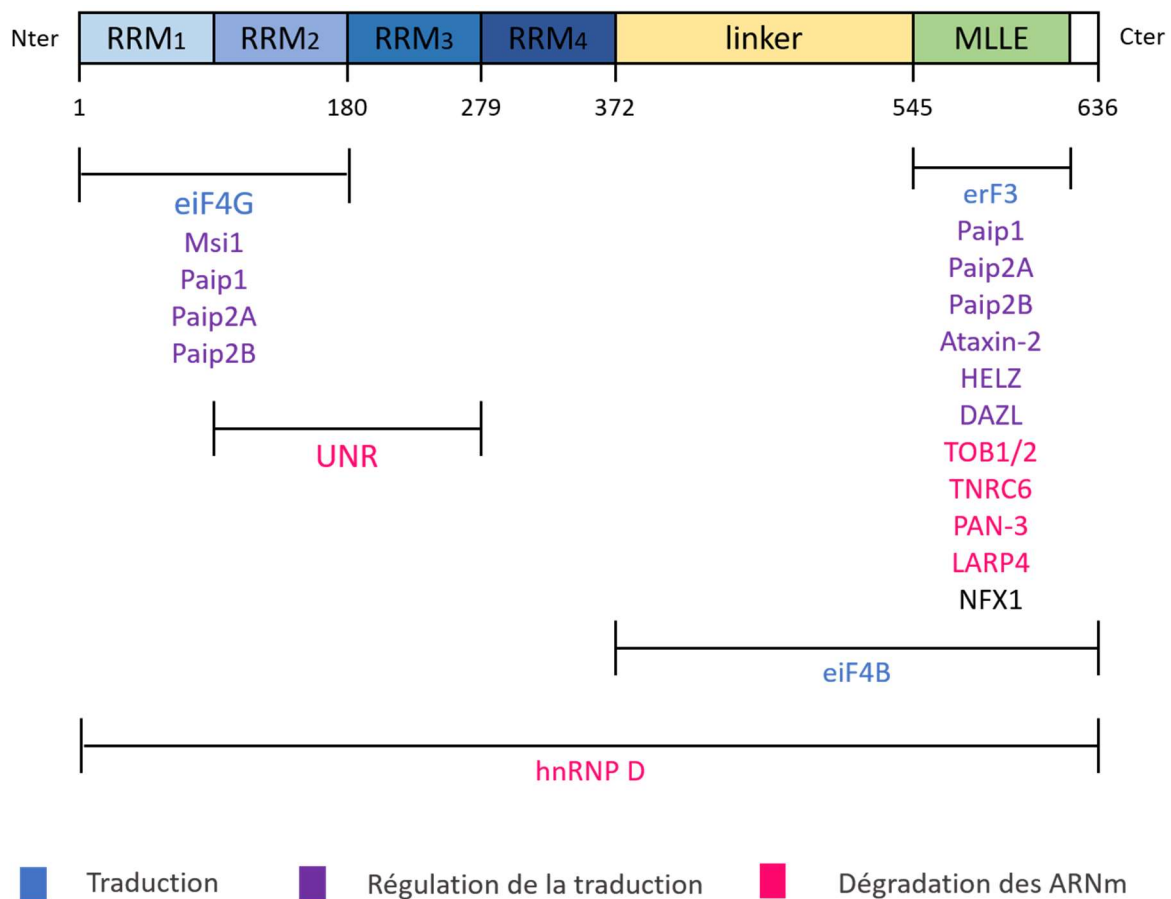


Figure 16 : Sites de liaison de PABPC1 à ses interacteurs cellulaires.

PABPC1 interagit avec de multiples protéines cellulaires, pour la plupart impliquées dans le fonctionnement de la traduction (nommées en bleu), la régulation de la traduction (nommées en violet) et la dégradation des ARNm (nommées en rose). Les crochets indiquent les sites de liaison de PABPC1 à ces protéines : la majorité de ces interactions se font au niveau de son domaine MLLE, mais quelques-unes impliquent plutôt les domaines RRM.

PABPC1 interagit aussi via son domaine MLLE avec de nombreuses autres protéines présentant un motif PAM2 :

- eRF3, un facteur de terminaison de la traduction (Hoshino et al. 1999; Kozlov and Gehring 2010)
- NFX1, un inhibiteur transcriptionnel des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (Katzenellenbogen et al. 2007),
- Ataxin-2, HELZ et DAZL, des protéines impliquées dans la régulation de la traduction (Ciosk, DePalma, and Priess 2004; Collier et al. 2005; Hasgall et al. 2011)
- TOB1/2, TNRC6, PAN-3 et LARP4, des protéines impliquées dans la dégradation des ARNm (Ezzeddine et al. 2007; Fabian et al. 2009; Siddiqui et al. 2007; Yang et al. 2011).

La compétition de ces protéines pour la liaison au domaine MLLE pourrait jouer un rôle dans la régulation de ses différentes fonctions. En particulier, le motif PAM2 est essentiellement retrouvé dans des régions désordonnées à proximité de sites phosphorylables, et ces phosphorylations modifient l'affinité des motifs PAM2 à MLLE, influant sur la liaison de PABPC1 à ses divers interacteurs (Huang et al. 2013).

PABPC1 interagit aussi avec deux autres protéines intervenant dans la dégradation des ARNm : UNR, par un site situé au niveau du RRM₂₋₃, et hnRNP D (ou AUF1), par des sites de liaison encore non-identifiés (Chang et al. 2004; Lu et al. 2006).

3.5.4 Rôles de PABPC1

3.5.4.1 *Polyadénylation et export des ARNm*

PABPN1 est la principale PABP impliquée dans la mise en place de la queue polyA des ARNm. En effet, elle stimule l'action de la polyA polymérase, l'enzyme responsable de l'élongation de la queue polyA, et contrôle la longueur de cette élongation (Kühn et al. 2009). Elle reste ensuite liée à la queue polyA jusqu'à l'export des ARNm dans le cytoplasme.

Cependant, il est probable que PABPC1 intervienne aussi dans cette étape. Ainsi, PABPC1 est observée dans le noyau liée aux ARNm polyadénylés, et est co-immunoprécipitée avec la polyA polymérase (Hosoda, Lejeune, and Maquat 2006). Ces données suggèrent que PABPC1 se lie aux ARNm au moment de leur polyadénylation dans le noyau, côte-à-côte avec PABPN1.

De plus, chez la levure, les queues des ARNm, à l'origine d'une taille d'environ 200 nucléotides, sont raccourcies jusqu'à 50-70 nucléotides par le complexe PAN2/PAN3, dont le fonctionnement dépend de PABPC1. La réalisation de ce processus est nécessaire à l'export des ARNm (Brown and Sachs 1998; Dunn et al. 2005). Cependant, ces résultats ne sont pas forcément transposables chez l'homme. En effet, les queues polyA des ARNm matures humain sont plus longs que ceux de la levure (entre 150 et 250 nucléotides), et le complexe PAN2/PAN3 humain a une localisation strictement cytoplasmique.

3.5.4.2 *Initiation et régulation de la traduction*

3.5.4.2.1 *Traduction préliminaire*

A leur arrivée dans le cytoplasme, les ARNm subissent une phase de traduction préliminaire afin de vérifier l'absence d'un codon de terminaison prématurée. A ce moment, leur queue polyA est toujours liée à plusieurs PABPC1 et PABPN1, et leur coiffe est liée au complexe CBC, qui s'associe aux ARNm uniquement au moment de cette traduction préliminaire (Chiu et al. 2004). L'ARNm est aussi associé à une partie du complexe d'initiation de la traduction : eIF4A, une hélicase ARN ATP-dépendante, eIF4B, qui stimule l'activité de eIF4A, et eIF4G, une protéine maintenant la cohésion du complexe qui

interagit avec PABPC1. La sous-unité 40S du ribosome, liée aux facteurs d'initiation eIF3, eIF2, eIF1, eIF1A et eIF5, sont alors recrutés sur l'ARNm par une interaction entre eIF4G et eIF3 (Maquat, Tarn, and Isken 2010). Ce complexe initie alors la traduction préliminaire en recrutant la sous-unité ribosomale 60S. Lors de cette traduction préliminaire, PABPN1 se dissocie de l'ARNm et est complètement remplacé par PABPC1 sur la queue polyA (Sato and Maquat 2009). Après cela, le complexe CBC est remplacé par eIF4E au niveau de la coiffe de l'ARNm, permettant l'initiation de la traduction proprement dite.

3.5.4.2.2 Traduction canonique

Le complexe d'initiation de la traduction canonique est similaire à celui de la traduction préliminaire, si ce n'est que CBC est remplacée par eIF4E, qui interagit avec la coiffe et avec eIF4G (Figure 17). PABPC1 joue un rôle important dans ce complexe. Ainsi, l'interaction entre eIF4E et PABPC1 par l'intermédiaire de eIF4G augmente l'affinité de eIF4E pour la coiffe (von Der Haar, Ball, and McCarthy 2000; Wei et al. 1998) et permet le rapprochement des extrémités 5' et 3' de l'ARNm, formant une structure en circuit fermé/boucle, qui stimule l'initiation de la traduction (Gallie 1991; Preiss and Hentze 1998; Wells et al. 1998). De plus, PABPC1, en se liant à eIF4B, stimule l'activité ATPase et hélicase de eIF4A et eIF4B chez la levure (Bi and Goss 2000; von Der Haar et al. 2000; Wei et al. 1998).

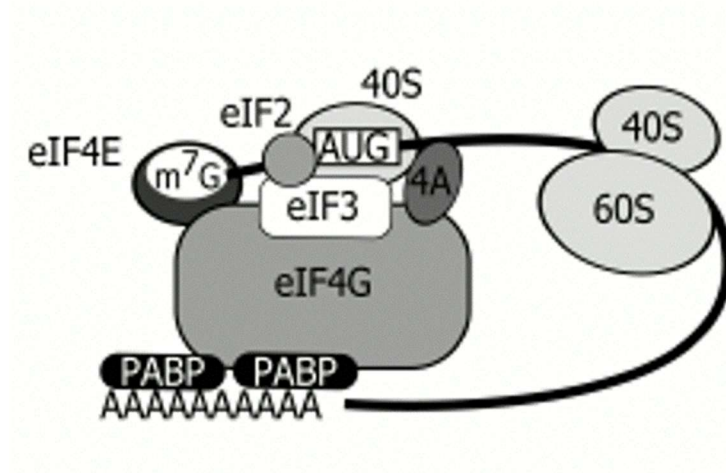


Figure 17 : Schéma du complexe d'initiation de la traduction.

Le complexe d'initiation de la traduction est formé de eIF4G, une protéine d'échafaudage, qui se lie à eIF4E au niveau de la coiffe de l'ARNm, PABPC1 au niveau de la queue polyA, eIF3 et eIF4A. eIF3 recrute la sous-unité ribosomale 40S au niveau du codon d'initiation. Ce complexe permet à l'ARNm de former une structure en boucle. D'après (Eliseeva et al. 2013).

PABPC1 stimule aussi le recyclage des ribosomes en fin de traduction en interagissant avec eRF3, un facteur de terminaison de la traduction (Hoshino et al. 1999). Cette interaction pourrait aussi participer

à la pseudo-circularisation de l'ARNm en rapprochant le codon stop de la queue polyA, et donc, grâce au complexe PABPC1-eIF4G-eIF4E, de l'extrémité 5' de l'ARNm (Uchida et al. 2002).

En outre, quelques études indiquent que PABPC1 pourrait stimuler la traduction par un autre mécanisme, indépendant de son appartenance au complexe d'initiation de la traduction et de sa liaison à la queue polyA. Deux observations étayaient cette hypothèse. Premièrement, PABPC1 peut stimuler la traduction d'ARNm non-polyadénylés, et ce processus implique des résidus différents de ceux impliqués dans la traduction des ARNm polyadénylés et dans la liaison à eIF4G (Otero, Ashe, and Sachs 1999). Deuxièmement, le domaine RRM₃₋₄ seul, qui présente une faible affinité spécifique aux ARNm polyA et ne possède aucune interaction connue avec un autre facteur de traduction, stimule malgré tout la traduction de façon importante (Gray et al. 2000).

3.5.4.2.3 Régulation de la traduction

PABPC1 joue aussi un rôle dans la modulation de la traduction. Tout d'abord, plusieurs protéines cellulaires s'associent avec PABPC1 afin d'activer ou d'inhiber la traduction, d'une manière indépendante de l'ARNm traduit. Ainsi, l'interaction de PABPC1 avec Paip1 active la traduction, tandis que son interaction avec Paip2A et Paip2B inhibe la traduction. En complexe avec Paip1, PABPC1 perd sa capacité de se lier à eIF4G, mais peut par l'intermédiaire de Paip1 interagir avec eIF4A, stimulant la traduction (Craig et al. 1998; Roy et al. 2002). Au contraire, l'interaction de PABPC1 avec Paip2A et Paip2B bloque la liaison de PABPC1 à l'ARN, à eIF4G et à Paip1, et de ce fait inhibe la traduction (Khaleghpour et al. 2001).

D'autre part, PABPC1 peut aussi moduler la traduction de certains ARNm qui présentent des motifs spécifiques. Premièrement, elle peut se lier directement à des séquences fortement adénylées dans les régions régulatrices de ces ARNm. Notamment, PABPC1 réprime sa propre traduction de cette manière, en se liant à la séquence ARS située dans le 5' UTR de son ARNm. Deuxièmement, elle peut agir indirectement, via sa liaison à d'autres protéines qui interagissent avec des motifs présents chez certains ARNm. Ainsi, PABPC1 interagit avec DAZL et Msi1, deux protéines régulant la traduction de multiples ARNm (Collier et al. 2005; Kawahara et al. 2008).

3.5.4.3 Turnover des ARNm

3.5.4.3.1 Augmentation de la stabilité des ARNm

La longueur de la queue polyA est étroitement corrélée à la stabilité d'un ARNm. La liaison de multiples PABPC1 le long d'une queue polyA protège celle-ci des RNAses, et promeut donc la stabilité de l'ARNm (Bernstein, Peltz, and Ross 1989).

Au cours de traductions successives d'un même ARNm, sa queue polyA subit un raccourcissement progressif, qui finit par entraîner sa dégradation. Une hypothèse est que l'interaction de PABPC1 avec eRF3 lors de la traduction perturbe l'oligomérisation de PABPC1, ce qui pourrait découvrir partiellement la queue polyA et permettre sa dégradation progressive au fur et à mesure des tours de traduction (Hoshino et al. 1999).

3.5.4.3.2 Déadénylation des ARNm

Chez les mammifères, la dégradation des ARNm débute dans la grande majorité des cas par leur déadénylation. Celle-ci a lieu en deux étapes : une première, assez lente, effectuée par le complexe PAN2/PAN3, pendant laquelle le corps de l'ARNm reste intact, suivie d'une deuxième déadénylation plus rapide, menée par le complexe CCR4/CAF1, qui est accompagnée de l'élimination de la coiffe et la digestion du corps de l'ARNm (Yamashita et al. 2005). PABPC1 intervient dans ces deux étapes. D'une part, elle stimule le complexe PAN2/PAN3 en interagissant avec PAN3, et pourrait donc être responsable du recrutement de ce complexe au niveau de la queue polyA (Siddiqui et al. 2007). D'autre part, elle inhibe le complexe CCR4/CAF1 et interagit indirectement avec ce complexe par l'intermédiaire de TOB1/2 (Ezzeddine et al. 2007; Tucker et al. 2002).

3.5.4.3.3 Dégradation des ARNm par les miARN

PABPC1 participe aussi à l'inhibition de la traduction et la dégradation des ARNm par les miARN (Fabian et al. 2009; Moretti et al. 2012). Celle-ci est effectuée par le complexe RISC, composé d'un miARN et des protéines Ago et TNRC6. Le miARN recrute le complexe RISC au niveau de son ARNm complémentaire, et TNRC6 interagit avec les complexes CCR4/CAF1 et PAN2/PAN3 de façon à initier la déadénylation de l'ARNm, selon le mécanisme décrit au paragraphe précédent. PABPC1 interagit aussi avec TNRC6, et agit comme activateur du complexe RISC (Fabian et al. 2009; Zekri et al. 2009). Une première hypothèse est que PABPC1 favorise la liaison du complexe RISC aux ARNm ciblés (Moretti et al. 2012). Une autre étude montre que TNRC6 entre en compétition avec eIF4G pour la liaison avec PABPC1, et propose que ceci déstabilise le complexe eIF4E-eIF4G-PABPC1, provoquant la déadénylation et l'élimination de la coiffe (Zekri et al. 2009). Cependant, des études récentes suggèrent que PABPC1 n'est pas indispensable au fonctionnement du complexe RISC (Fukaya and Tomari 2011; Mishima et al. 2012).

3.5.4.3.4 Dégradation des ARNm non-sens

Lors de la traduction préliminaire, la présence sur un ARNm d'un codon de terminaison prématuré déclenche au moment de la terminaison de la traduction une déadénylation accélérée de cet ARNm. Les protéines clés de ce mécanisme sont UPF1 et le complexe de jonction d'exons EJC. UPF1 se lie au facteur de terminaison eRF3, en compétition avec PABPC1. De plus, PABPC1, lorsqu'il est situé

suffisamment près du codon stop, inhibe cette dégradation des ARNm contenant un codon stop prématuré (Ivanov et al. 2008; Singh, Rebbapragada, and Lykke-Andersen 2008). Il est donc possible que l'interaction entre PABPC1 et eRF3 protège les ARNm de la dégradation causée par UPF1 et EJC.

3.5.5 PABPC1 dans l'infection virale

A cause de son rôle central dans la traduction et le métabolisme des ARNm, de nombreux virus ciblent PABPC1, soit pour réprimer l'expression des protéines cellulaires soit pour stimuler l'expression de leurs propres protéines.

3.5.5.1 *Dégradation ou séquestration de PABPC1 afin de réprimer l'expression des protéines cellulaires*

Une stratégie virale commune consiste à cibler PABPC1 afin d'inhiber la traduction cellulaire. Ainsi, certains virus de la famille *Picornaviridae*, tels que le poliovirus, le coxsackievirus B3 et le virus de l'hépatite A, codent pour des protéases qui clivent PABPC1 au niveau de sa région désordonnée (Kerekatte et al. 1999; N. M. Kuyumcu-Martinez et al. 2004; Kuyumcu-Martinez, Joachims, and Lloyd 2002; Yalamanchili et al. 1997; Zhang et al. 2007). C'est aussi le cas chez les novovirus et vesivirus de la famille *Caliciviridae*, ainsi que chez les rétrovirus HIV-1 et HIV-2 (Alvarez et al. 2006; M. Kuyumcu-Martinez et al. 2004). Ce clivage entraîne la perte du domaine MLE, nécessaire pour la liaison de eRF3, eIF4B ainsi que de nombreux autres facteurs de traduction, amenant à une inhibition de la traduction.

Le rotavirus, lui, inhibe la traduction cellulaire en expulsant PABPC1 du complexe d'initiation de la traduction, grâce à l'interaction de sa protéine virale NSP3 avec eIF4G (Piron et al. 1998). De plus, PABPC1 est relocalisée au noyau lors de l'infection par le rotavirus, par un mécanisme dépendant de NSP3, ce qui contribue encore à l'écarter des sites de traduction (Harb et al. 2008; Montero et al. 2008). De même, la protéine de capsid du virus de la rubéole interagit avec PABPC1 au niveau de sa région C-terminale et la relocalise dans la région péri-nucléaire, et cette séquestration est responsable de l'inhibition de la traduction cellulaire (Ilkow et al. 2008). L'herpèsvirus humain type 8 cause lui aussi une relocalisation de PABPC1 au noyau par l'action de la protéine SOX, ce qui pourrait contribuer à l'inhibition virale de la traduction cellulaire (Lee and Glaunsinger 2009).

3.5.5.2 *Détournement de PABPC1 afin de favoriser l'expression des protéines virales*

Certains virus peuvent aussi détourner PABPC1 afin de stimuler l'expression de leurs propres protéines. Les virus dont les ARNm sont coiffés et polyadénylés sont la plupart du temps traduits par le complexe d'initiation de la traduction cellulaire canonique, et certains ont développés des stratégies afin de stimuler la traduction de leurs protéines qui impliquent PABPC1. Ainsi, la protéine NS1 du virus de la grippe interagit avec la région désordonnée de PABPC1, sans déstabiliser l'interaction

PABPC1/eIF4G. NS1 lie aussi spécifiquement les ARNm viraux, ce qui lui permet de recruter le complexe d'initiation de la traduction sur les ARNm viraux, favorisant ainsi la traduction virale par rapport à la traduction cellulaire (Aragón et al. 2000; Burgui et al. 2003).

La plupart des virus dont les ARNm comportent des sites internes d'entrée des ribosomes (IRES) ont une traduction indépendante de PABPC1, mais il existe quelques exceptions pour lesquels PABPC1 stimule la traduction, tel que le coxsackievirus B3 et le cytomegalovirus (Bradrick et al. 2007; McKinney, Perez, and Mohr 2012). L'infection par le cytomegalovirus induit d'ailleurs une augmentation de l'expression de PABPC1, mais le mécanisme impliqué n'est pas encore connu (Walsh et al. 2005). Pour le coxsackievirus B3, cette stimulation de la traduction virale par PABPC1 peut paraître étonnante, car ce virus code aussi pour une protéase qui clive PABPC1 (Kerekatte et al. 1999). Cependant, les résultats de Bradrick et al. suggèrent que PABPC1 stimule mais n'est pas indispensable à la traduction du coxsackievirus B3 : le clivage de PABPC1 pourrait ainsi permettre une régulation de sa propre traduction en plus d'inhiber la traduction cellulaire. Alternativement, même si le clivage de PABPC1 diminue sa capacité à stimuler la traduction cellulaire (Kerekatte et al. 1999), il peut ne pas avoir d'effet sur la capacité de PABPC1 à stimuler la traduction de ce virus.

De plus, un virus dont l'ARN génomique de polarité positive n'est pas polyadénylé, le virus de la dengue, utilise PABPC1 pour sa traduction. La région 3' UTR de cet ARN viral interagit avec de nombreux facteurs cellulaires intervenant dans la traduction, dont PABPC1 (grâce à deux sites fortement adénylés de cet UTR). Une étude suggère que PABPC1 contribue à la pseudo-circularisation de cet ARN génomique viral, de la même façon que lors de la traduction cellulaire (Polacek, Friebe, and Harris 2009).

Enfin, certains virus, comme le poxvirus et le RSV, relocalisent PABPC1 au niveau de structures de type « usines virales » dans lesquelles se déroulent l'expression des protéines virales (Rincheval et al. 2017; Walsh et al. 2008). Leur accumulation dans ces structures pourrait favoriser l'accès aux autres composants du complexe d'initiation de la traduction et/ou aux ARNm viraux, favorisant ainsi l'expression des protéines virales.

4 OBJECTIFS

Le RSV représente un problème de santé publique majeur. Malgré cela, après 50 ans de recherche, aucun vaccin ni traitement antiviral curatif contre ce pathogène n'a encore pu être développé. Les interactions entre les protéines du RSV et les protéines cellulaires représentent des cibles d'intérêt majeur pour la conception de molécules antivirales. De plus, de nombreux aspects du cycle viral du RSV restent obscurs, et l'identification de partenaires cellulaires des protéines virales pourrait participer à leur clarification. Cependant, l'interactome cellulaire des protéines du RSV a été jusqu'ici très peu exploré.

C'est dans ce contexte que mon projet de thèse a été élaboré. Il s'inscrit au sein du projet ANR RESPISYNCYCELL, qui regroupe des équipes françaises de l'INRA, de l'Université Versailles Saint Quentin, du CNRS et de l'Institut Pasteur et des laboratoires brésiliens des Universités de São Paulo et Campinas. Son objectif est d'identifier des interactions entre protéines virales et protéines cellulaires et d'obtenir des données structurales et fonctionnelles pour ces complexes *in vitro* et *in cellula*. Nous avons choisi de nous concentrer sur l'interactome de deux protéines du virus respiratoire syncytial, la polymérase L et le facteur de transcription M2-1. En effet, ces deux protéines sont essentielles à la réplication du virus. De plus, aucun antiviral actuellement en développement ne cible M2-1, et seul l'antiviral ALS-008176 cible L. Pour identifier des partenaires potentiels de ces deux protéines, nous avons mis au point un crible discriminant à la fois sur des critères d'interactomique et fonctionnels. Pour l'étape de criblage des interactions à proprement parler, une approche de co-immunoprécipitation couplée à une analyse protéomique quantitative, déjà utilisée dans plusieurs études, a été choisie. L'originalité de notre méthode repose sur l'utilisation de virus recombinants afin de réaliser les co-immunoprécipitations en condition d'infection et non d'expression provisoire des protéines virales. Ceci devrait permettre l'identification d'interactions plus pertinentes. La 2^e étape de notre approche, le crible fonctionnel, repose sur l'utilisation de siRNA pour inhiber l'expression des différents candidats et mesurer l'impact de cette inhibition sur la multiplication virale. A l'issue de ce crible, l'objectif était d'obtenir un ou plusieurs candidats interagissant avec L ou M2-1 et ayant de l'importance pour la réplication virale. Une étude approfondie de ce ou ces candidats permettrait ensuite l'obtention de données structurales et fonctionnelles supplémentaires.

5 MATERIEL ET METHODES

5.1 Matériel

5.1.1 Cellules

Les cellules HEp-2 sont des cellules épithéliales humaines dérivées d'un carcinome du col utérin. Les cellules BSR-T7 sont dérivées de la lignée BHK-21, des cellules épithéliales de rein de hamster, et ont été modifiées génétiquement afin d'exprimer de manière constitutive l'ARN polymérase du bactériophage T7. Les cellules A549 sont des cellules épithéliales alvéolaires humaines dérivées d'un carcinome pulmonaire. Les cellules HEK-293T sont dérivées de la lignée HEK-293, des cellules de rein embryonnaire humain, et ont été modifiées génétiquement afin d'exprimer de manière constitutive l'allèle tsA1609 de l'antigène T du SV40.

Ces lignées sont cultivées en milieu de culture Minimum Essential Media (MEM, Gibco)(pour les HEp-2) ou Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco)(pour les BSR-T7, A549 et HEK-293T) contenant 2 mM de L-alanyl-L-glutamine, et supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 100 U/mL de pénicilline et 0,1 mg/mL de streptomycine à 37°C, dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Les cellules sont entretenues par passage régulier 2 fois par semaine. Après rinçage au Phosphate Buffered Saline (PBS, Gibco), les cellules sont incubées en trypsine - Éthylène Diamine Tétracétique (EDTA) 0,05% (Gibco) à 37°C pendant 5 min, reprises dans du milieu et comptées sur une lame de Malassez. Les cellules sont ensuite mises en culture sur les supports appropriés et incubées à 37°C, 5% de CO₂.

5.1.2 Virus

Les virus recombinants RSV GFP, RSV M2-1-GFP, RSV L-GFP et RSV P-BFP ont été produits dans notre équipe par génétique inverse. Les virus sont amplifiés à multiplicité d'infection (MOI) d'environ 0,05 PFU/cellule sur cellules HEp-2 à 37°C et récoltés à 72 ou 96 h p.i. Les stocks de virus recombinants utilisés pour les expériences ont été passés 2 à 4 fois (un passage consiste en une infection sur cellules HEp-2 à 37°C pendant 72 h suivie d'une récolte de la suspension virale).

5.1.3 Anticorps

Les anticorps primaires anti-N, anti-P, anti-M et anti-M2-1 utilisés sont polyclonaux et ont été produits par l'INRA de Jouy-en-Josas par immunisation d'un lapin avec de la protéine N, P, M ou M2-1 recombinante. L'anticorps anti-N a été utilisé au 1/2000^e lors des marquages par immunofluorescence. Pour les Western blot, l'anticorps anti-N a été dilué au 1/50000^e, l'anticorps anti-M au 1/5000^e, l'anticorps anti-M2-1 au 1/4000^e et l'anticorps anti-P au 1/1000^e. Les anticorps commerciaux

monoclonaux de souris anti-PABP (clone 10E10), anti-eIF4E (clone P-2), anti-eIF4AII (clone H-5), anti-eIF3 η (clone C-5) et anti-eIF4G (clone A-10) (Santa Cruz technology) ont été utilisés au 1/500^e en Western blot. L'anticorps commercial de souris anti-GFP (Chromotek) a été utilisé au 1/2000^e en Western blot. Des anticorps commerciaux monoclonaux de souris anti-M2-1 (clone RSV5H5) (Abcam) et de lapin anti-PABP (Abcam) ont été utilisés au 1/500^e dans le Proximity Ligation Assay.

Les anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence sont des anticorps commerciaux (Molecular probes[®], Life Technologies) produits chez la chèvre dirigés contre les immunoglobulines (H+L) de souris ou de lapin et couplés à des fluorochromes Alexa Fluor[®] 488 ou 594. Ils ont été utilisés au 1/1000^e. Les anticorps secondaires utilisés en Western blot sont des anticorps commerciaux (Promega) dirigés contre les immunoglobulines (H+L) de souris ou de lapin et conjugués à de la peroxydase de raifort. Ils ont été utilisés au 1/10000^e.

5.2 Méthodes

5.2.1 Production de virus recombinants par génétique inverse

Cette méthode est décrite dans l'article de Bouillier et al. « Generation, amplification and titration of recombinant respiratory syncytial viruses to monitor viral multiplication and viral factories dynamics », actuellement en cours de publication dans le journal JoVE, qui est présenté en annexe de ce document.

5.2.2 Infection de cellules par le RSV

L'infection est réalisée sur des cellules HEp-2 ou A549 ensemencées la veille à une densité contrôlée pour obtenir des tapis confluent à 90%. L'adsorption du virus est réalisée pendant 2 h à 37°C sous agitation régulière en déposant un faible volume (par exemple 1 mL dans une boîte de 10cm de diamètre) de suspension virale diluée en MEM 0% SVF sur des cellules HEp-2 ensemencées la veille (cf paragraphe 2.1). L'addition de milieu MEM-2% SVF-Antibiotiques (par exemple 10 mL pour une boîte de 10cm de diamètre) après retrait de l'inoculum définit l'instant 0 de l'infection.

5.2.3 Récolte des virus

Les cellules infectées sont récoltées avec leur milieu de culture par grattage mécanique, puis homogénéisées en vortexant vigoureusement 2 min. Afin d'obtenir des conditions favorables à la conservation du virus, de l'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) et du MgSO₄ à pH 7,5 sont ajoutées au surnageant (aux concentrations finales respectives de 50 mM et 0,1 M). La solution virale, clarifiée par centrifugation, est aliquotée et conservée à -80°C.

5.2.4 Titrage par la technique des plages de lyse

Cette méthode est décrite dans l'article de Bouillier et al. « Generation, amplification and titration of recombinant respiratory syncytial viruses to monitor viral multiplication and viral factories dynamics », actuellement en cours de publication dans le journal JoVE, qui est présenté dans l'annexe de ce document.

5.2.5 Extraction d'ARN viral et cellulaire

L'extraction de l'ARN viral et cellulaire est réalisée grâce au kit QIAamp Viral RNA (Qiagen®) selon les recommandations du fabricant. Les cellules sont lysées dans un tampon contenant de la guanidine thiocyanate afin d'inactiver les RNAses. L'ARN est ensuite purifié sur colonne de silice après ajout d'éthanol, lavé et élué dans 60 µL de tampon contenant 0,04% d'azide de sodium afin d'éviter de futures contaminations.

5.2.6 Co-immunoprécipitation

Des cellules HEp-2 ou BSR-T7 ensemencées la veille sont infectées par RSV GFP ou RSV M2-1-GFP à une MOI de 0,5. Après 10, 14 ou 18 h d'infection, les cellules sont rincées au PBS froid, détachées par grattage mécanique et culotées par centrifugation. Elles sont ensuite re-suspendues pendant 1-2 h à 4°C avec le tampon de lyse (Tris 10 mM à pH 7,5 – NaCl 150 mM, IGEPAL® CA-630 0,5% (Sigma-Aldrich), antiprotéase (Roche), +/- Pierce Universal Nuclease 0,25U/µL (Thermo Scientific)). Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation. Le surnageant est récupéré et une petite fraction est aliquotée et diluée dans du tampon Laemmli afin d'obtenir les échantillons « Pré-IP ». Le reste de la suspension est ensuite incubée pendant une nuit à 4°C avec les billes du kit GFP-Trap® (Chromotek), préalablement lavées 3 fois et équilibrées au tampon de dilution (Tris 10 mM à pH 7,5 – NaCl 150 mM). Après l'incubation, les billes sont récupérées par centrifugation. Le surnageant est conservé et dilué dans du tampon Laemmli avant analyse : il donne les échantillons « Fraction non-liée ». Les billes sont rincées 3 fois dans 500 µL de tampon de dilution. L'élution est réalisée dans 60 µL de tampon Laemmli (Tris pH6,8 à 125 mM, SDS 4%, Glycérol 20%, Bleu de Bromophénol 0,02%, βmercaptoethanol 0,6 M) chauffé 5 min à 95°C. Les échantillons « Fraction liée » sont ainsi obtenus.

5.2.7 Transfection de siRNA

Cette méthode est décrite dans l'article de Bouillier et al. « Generation, amplification and titration of recombinant respiratory syncytial viruses to monitor viral multiplication and viral factories dynamics », actuellement en cours de publication dans le journal JoVE, qui est présenté dans l'annexe de ce document.

Pour le crible fonctionnel (paragraphe 6.3, page 63), les siRNA ont été transfectés à une concentration finale de 25 nM. Pour les expériences d'inhibition de PABPC1 (paragraphe 6.4.1, page 64), les siRNA ont été transfectés à une concentration finale de 50 nM.

5.2.8 Transfection d'ADN plasmidique

La transfection est réalisée sur des cellules HEp-2, BSR-T7 ou HEK-293T ensemencées la veille à une densité contrôlée pour obtenir des tapis confluent à 90%. Pour un puits de plaque 96 puits, 0,4 µg d'ADN plasmidique sont transfectés dans 0,56 µL de Polyéthylèneimine (PEI) à 1 mg/mL. L'ADN plasmidique est dilué dans 12 µL d'OptiMEM (*Invitrogen*®). En parallèle, le PEI est lui aussi mélangé à 8 µL d'OptiMEM. L'ADN plasmidique et le PEI sont ensuite mis en présence et incubés 20 min à température ambiante. Le mélange est ensuite déposé goutte à goutte sur les cellules. Les cellules sont incubées à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 24 h.

5.2.9 Test de viabilité cellulaire

Le test de viabilité cellulaire est réalisé grâce au kit Cell Titer Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) selon les recommandations du fabricant. Les cellules sont lysées dans un tampon contenant la Ultra-Glo™ rLuciférase et son substrat, la luciférine, en excès. Un signal luminescent proportionnel à l'ATP présent dans le milieu, et donc au nombre de cellules vivantes avant la lyse, est émis. La luminescence est mesurée sur un lecteur de plaques Infinite® 200 (Tecan).

5.2.10 Marquage métabolique des protéines

Le marquage métabolique des protéines est réalisé grâce au kit Click-IT™ L-Azidohomoalanine (AHA) (*Invitrogen*™) selon les recommandations du fabricant. Des cellules HEp-2 infectées 14 h auparavant par du RSV WT sont rincées 2 à 3 fois au PBS et incubées dans du milieu sans méthionine pendant 15 min à 37°C. La solution de marquage Click-It AHA est ensuite ajoutée à une concentration de 50 µM. Une incubation de 4 h à 37°C sous 5% de CO₂ permet le marquage des protéines synthétisées pendant cet intervalle de temps par substitution de la molécule AHA à la méthionine lors de la traduction. Les cellules sont ensuite lysées dans le tampon de lyse (TrisHCl 50 mM à pH 8,0 – SDS 1% - benzonase nucléase 0,25U/mL (Sigma-Aldrich) – antiprotéase (Roche)). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation.

Le marquage de la L-Azidohomoalanine est ensuite réalisé grâce au kit Click-IT™ Tetramethylrhodamine (TAMRA) Protein Analysis Detection Kit (*Invitrogen*™), selon les recommandations du fabricant. Après une incubation de 20 min à température ambiante à l'obscurité, les protéines sont extraites par une précipitation en méthanol/chloroforme. Les protéines sont ensuite

séparées par SDS-PAGE et le marquage TAMRA peut être visualisé par observation de la fluorescence à 545 nm.

5.2.11 Clonages par enzymes de restriction

5.2.11.1 Préparation de bactéries chimiocompétentes

La veille, une colonie de bactéries DH10 β ou DH5 α est repiquée et mise en culture à 37°C dans 10 mL de milieu LB (Luria-Broth, Sigma®) sans antibiotique. Deux millilitres de cette culture sont ajoutés à 100 mL de milieu LB sans antibiotique et incubés à 37°C sous agitation. La croissance des bactéries est contrôlée par spectrophotométrie (Ultrospec2100 pro, Amersham®) jusqu'à atteindre une densité optique de 0,3 à 560 nm. Les bactéries sont alors incubées à 4°C pendant 20 min et culotées par centrifugation puis resuspendues en tampon TFB1 (30 mM d'acétate de potassium, 10 mM de CaCl₂, 50 mM de MnCl₂, 100 mM de RbCl et 15% de glycérol). Après 20 min à 4°C, les bactéries sont de nouveau culotées par centrifugation, resuspendues en tampon TFB2 (10 mM d'acide 3-(N-morpholino)-propanesulfonique, 75 mM de CaCl₂, 10 mM de RbCl, 15% de glycerol) et aliquotées puis congelées par immersion dans l'azote liquide. La compétence des bactéries est testée par transformation de 10pg d'un vecteur vide (PUC19). Elle doit être de 10⁶ colonies par microgramme d'ADN pour 100 μ L de bactéries.

5.2.11.2 Amplification en Chaîne par Polymérase (PCR)

L'amplification est réalisée avec 1,4 unités (U) de Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) dans le cadre des clonages, ou 1,5U de Dreamtaq DNA Polymerase (Thermo Scientific) dans le cadre de l'analyse des clones bactériens, dans le tampon fourni par le fabricant, en présence de dNTP à 0,2 mM, de MgCl₂ à 2 mM, de 50 ng de matrice et d'amorces spécifiques à 0,4 μ M dans un volume final de 25 ou 50 μ L. Les amplifications sont réalisées dans un thermocycleur (DNA Engine PTC-200 Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad)) selon le programme suivant : une première étape de 2 min à 94°C puis 35 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 55-60°C (selon les amorces) et 30 s à 5 min (selon la taille des amplicons) à 72°C et enfin une dernière étape de 10 min à 72°C. Le fragment amplifié est visualisé après électrophorèse en gel d'agarose 1% coloré avec un agent intercalant (SybrSafe, Invitrogen®).

5.2.11.3 Digestion et purification de l'ADN

L'insert est préparé par PCR et purifié sur colonne de silice (PCR purification kit, Qiagen®) conformément aux recommandations du fabricant, et élué dans 50 μ L d'eau. Le vecteur (4 μ g) et l'insert sont digérés par 2 μ L des enzymes de restriction FastDigest (Thermo Scientific) dans le tampon FastDigest (Thermo Scientific) dans 80 μ L final pendant 1 h à 37°C. Le vecteur est ensuite déphosphorylé par 2 unités de Shrimp alkaline phosphatase (Roche®) 15 min à 37°C. Les fragments digérés sont séparés sur un gel d'agarose 1% coloré avec un agent intercalant (SybrSafe, Invitrogen®)

en tampon TAE (Tris-HCl 40 mM pH=7,2 ; Na-Acétate 20 mM ; EDTA 1 mM). La zone du gel comportant la bande d'intérêt est découpée et le fragment est purifié sur une colonne de silice (Gel purification kit, Qiagen®) conformément aux recommandations du fabricant. L'ADN est élué dans 50 µL d'eau. La taille et la concentration des fragments sont vérifiées par électrophorèse d'une fraction de l'éluat en gel d'agarose 1% coloré avec un agent intercalant (SybrSafe, Invitrogen®).

5.2.11.4 Ligation

La ligation de l'insert dans le vecteur est réalisée en utilisant le kit Rapid DNA ligation de Fermentas®. L'insert et le vecteur sont mis en présence en respectant un rapport molaire insert/vecteur de 3 dans le tampon recommandé par le fabricant en présence de 5 unités de ligase du phage T4 dans 20 µL final. Le mélange est incubé 10 à 20 min à température ambiante. Un contrôle de ligation en l'absence d'insert est réalisé.

5.2.11.5 Transformation

Dix microlitres de ligation sont utilisés pour transformer 50 µL de bactéries E. Coli chimiquement compétentes. Après incubation à 4°C pendant 30 min, les bactéries sont soumises à un choc thermique de 1 min à 42°C. Elles sont ensuite incubées avec 200 µL de LB sans antibiotique à 37°C pendant 1 h avant d'être étalées sur milieu LB-Ampicilline (à 100 µg/mL) ou LB-gentamycine (à 10 µg/mL) gélosé et incubées à 37°C.

5.2.11.6 Analyse des clones bactériens et purification préparative du plasmide

A l'issue d'une transformation, 4 à 8 colonies bactériennes sont amplifiées dans 5 mL de milieu LB-Ampicilline (à 100 µg/mL) ou LB-gentamycine (à 10 µg/mL) liquide pendant 24 h. L'ADN est extrait par lyse alcaline et purification sur colonne de silice à l'aide du kit GeneJET Pasmid Miniprep (Thermo Scientific). Le profil de restriction après digestion et électrophorèse en gel d'agarose 1% est vérifié, et les plasmides sont séquencés selon la méthode Sanger à l'aide de primers spécifiques. Le séquençage n'est pas réalisé au laboratoire.

Le plasmide utilisé pour les expériences est préparé à partir de 200 mL de culture bactérienne en milieu LB-ampicilline (100 µg/mL) ensemencée par une colonie positive ré-isolée sur gélose sélective. L'ADN est extrait par lyse alcaline, purification sur colonne de silice et précipitation en isopropanol à l'aide du kit Nucleobond® Xtra Maxi (Macherey-Nagel). La pureté de l'ADN et sa concentration sont vérifiées par la mesure de l'absorbance (Nanodrop 1000, Thermo) à 260 et 280 nm.

5.2.12 Marquage par immunofluorescence

Les cellules sont rincées une fois en PBS puis fixées dans du PBS – formaldéhyde 3,7% au minimum 15 min à 4°C. Les cellules sont rincées 2 fois en PBS puis perméabilisées et saturées par incubation de 15

min à température ambiante dans du PBS contenant de l'albumine de sérum bovin ou BSA (Sigma) 1% et du Triton X-100 (Sigma) 0,2%. Après un rinçage au PBS, les cellules sont incubées avec les anticorps primaires dilués dans du PBS – BSA 1% pendant 1 h à l'obscurité et à température ambiante, rincées 2 fois en PBS, puis incubées avec les anticorps secondaires dilués dans du PBS – BSA 1% pendant ½ h à l'obscurité et à température ambiante. Un marquage des noyaux au Hoechst 33342 (Sigma) peut être réalisé à cette étape par addition de Hoechst dilué au 1/500^e. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois en PBS, puis les lamelles sont montées sur lames en Prolong Diamond (Invitrogen).

5.2.13 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) et Western blot

Les extraits protéiques en tampon Laemmli sont chauffés 5 min à 95°C. Les protéines présentes dans les différents échantillons sont séparées par électrophorèse sur gel Mini-PROTEAN TGX Stain-Free avec 10% de polyacrylamide (Biorad) en tampon Tris - Glycine - SDS 0.1%, à 150 volts pendant 1 h. La totalité des protéines présentes sur le gel est ensuite visualisée par fluorescence UV grâce à des composés présents dans les gels Stain-Free qui réagissent avec les résidus tryptophanes des protéines après excitation aux UV. Les protéines sont transférées sur membrane de PVDF (Biorad) par le système de transfert Turbo Trans-Blot (Biorad). La totalité des protéines présentes sur la membrane est de nouveau visualisée par fluorescence UV grâce à la technologie Stain-Free pour vérifier l'efficacité du transfert. Après saturation des sites de fixation non-spécifiques en PBS – Tween 0,25% - Régilait® 5%, la membrane est incubée une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt en solution PBS – Tween 0,25% – albumine de sérum bovin (ou BSA) 1%. Après trois lavages de 10 min en PSB - Tween 0,25%, la membrane est incubée 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire en tampon PBS – Tween 0,25% - BSA 1%. La membrane est rincée trois fois en PSB - Tween 0,25%. La présence de peroxydase de raifort (HRP) est ensuite détectée par incubation pendant 2 min avec du WesternBright Sirius HRP substrate (Advansta) puis révélation par caméra à haute sensibilité (Chemidoc 1000, Biorad®).

5.2.14 Transcription inverse

La transcription inverse est réalisée à l'aide du kit SuperScript® IV VILO Mastermix (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. L'extrait obtenu par extraction d'ARN (paragraphe 5.2.5) est incubé 2 min à 37°C en présence de DNase (ezDNase, Invitrogen). Il est ensuite incubé à 25°C pendant 10 min en présence d'oligonucléotides hexamériques aléatoires dans un tampon d'hybridation, puis l'ADN complémentaire est synthétisé par incubation à 50°C pendant 50 min avec la transcriptase inverse. Celle-ci est ensuite inactivée à 85°C pendant 5 min. L'ADN complémentaire produit est ensuite amplifié par PCR selon le protocole décrit dans le paragraphe 5.2.11.2.

5.2.15 Quantification relative des ARNm par qPCR en temps réel

La qPCR est réalisée à l'aide du kit DyNAmo ColorFlash SYBR Green qPCR Kit (Thermo Scientific) selon les recommandations du fabricant. Les ADN amplifiés à partir d'ARN par transcription inverse sont ajoutés à un tampon de réaction contenant une ADN polymérase de *T. brockianus* modifiée, de l'intercalant ADN fluorescent SYBR Green, 5 mM de MgCl₂ et un mélange de dNTP. Les amorces *forward* et *reverse* appropriées (Tableau 3) sont ajoutées au mélange à 0,6 µM.

Tableau 3 : Amorces utilisées en qPCR

Amorces	Sens	Séquence	Efficacité*
GAPD	Forward	GGAGTCAACGGATTTGGTCG	1,91
	Reverse	CGGTGCCATGGAATTTGCCA	
PABPC1	Forward	GAGGCGATGCTCTACGAGAA	1,96
	Reverse	GCTGGAAGTTCACATACGCG	
RSV N	Forward	GGTGAAGCAGGATTCTACCATA	1,92
	Reverse	GTGTACCTCTGTACTCTCCC	
RSV L	Forward	TATCGTGAGTTTCGGTTGCCTA	1,88
	Reverse	TCTTCTTGATTTATCACTCTCGGA	
UBC	Forward	TGTGGATCGCTGTGATCGTC	1,94
	Reverse	GGAGGGATGCCTTCCTTATC	
PPIA	Forward	CTGCACTGCCAAGACTGAGT	1,88
	Reverse	GTCCACAGTCAGCAATGGTG	
ACT B	Forward	CATGGGTCAGAAGGATTCCTA	1,94
	Reverse	TAGAAGGTGTGGTGCCAGATT	

*L'efficacité d'un couple d'amorce est égale à $\exp(1/a)$, a étant le coefficient directeur de la droite réalisée en mesurant le CT du couple d'amorces pour différentes concentrations d'ADNc.

Les amplifications sont réalisées dans un thermocycleur (CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)) selon le programme suivant :

- 7 min à 95°C
 - 10 s à 95°C
 - 15 s à 60°C
 - Mesure de fluorescence
 - 15 s à 65°C
 - 5 s à 65°C+0,5°C par cycle
 - Mesure de fluorescence
-

Les mesures de fluorescence sont ensuite extraites de la machine et analysées grâce au logiciel CFX Manager (Biorad), et une valeur appelée CT (nombres de cycles après lequel la fluorescence dépasse une valeur seuil) est déterminée pour chaque condition (correspondant à un couple ARNm amplifié +

siRNA utilisé). Les courbes de fusion sont aussi déterminées afin de vérifier la spécificité du signal mesuré.

La quantification relative est calculée par la méthode des $2^{-\Delta\Delta CT}$, en utilisant 3 ARNm de référence dont le niveau ne varie pas selon les différentes conditions : l'ubiquitine C, l'actine β et la phosphatase PPIA. Pour chacun de ces ARNm de référence, un ratio est calculé grâce à la formule suivante :

$$Ratio (\%) = \frac{Efficacité(cible)_{CT(cible,témoin)-CT(cible,test)}}{Efficacité(référence)_{CT(référence,témoin)-CT(référence,test)}} \times 100.$$

Ce ratio donne le pourcentage de la quantité de l'ARNm cible dans l'échantillon traité par le siRNA test par rapport à la quantité de l'ARNm cible dans l'échantillon traité par le siRNA témoin. On obtient donc 3 ratios calculés avec les 3 ARNm de référence. Le pourcentage final donné est la médiane de ces 3 ratios.

Ce calcul nécessite de connaître l'efficacité des couples d'amorces ciblant les ARNm cibles et de référence. Pour déterminer l'efficacité d'un couple d'amorces, un même mélange d'ADNc (obtenu par transcription inverse à partir des ARNm d'un extrait cellulaire) est dilué à 1/4 en série 10 fois. Des qPCR en triplicat sont effectuées avec le couple d'amorces étudié sur les différentes dilutions. Ceci permet la réalisation d'une régression linéaire des CT obtenus en fonction de la quantité initiale d'ADN dans la matrice. L'efficacité du couple d'amorces est alors donnée, par la formule $\exp(1/a)$, a étant le coefficient directeur de la régression linéaire.

5.2.16 Nanoluc Double Hybride

Le test de complémentation protéique utilisé, le Nanoluc Double Hybride (N2H), est décrit dans un article de Nature Methods en voie de publication. Des cellules HEK-293T sont transfectées la veille avec deux plasmides, exprimant chacun une protéine fusionnée à un domaine de complémentation différent de la NanoLuc luciférase. Les cellules sont lysées dans le tampon de lyse (acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique à 100 mM pH 6,0 ; KCl à 150mM ; DTT à 1 mM ; EDTA à 1 mM ; Tergitol (Sigma) à 0,5% ; Antifoam 204 (Sigma) à 0,05% ; Thiourea à 35 mM) en présence de RNase A (Thermo Scientific) à 100 μ g/mL et incubées à température ambiante pendant 1 h. Un volume équivalent de tampon de lyse contenant le substrat Nano-Glo et de la RNase A à 100 μ g/mL est ensuite ajouté aux lysats. Avec l'ajout du substrat, la NanoLuc luciférase fonctionnelle reconstituée grâce à l'interaction des deux protéines chimériques peut alors être détectée par émission de luminescence. La luminescence est mesurée sur un lecteur de plaques Infinite® 200 (Tecan).

5.2.17 Proximity Ligation Assay

Des cellules HEp-2 ensemencées la veille sont infectées par RSV P-BFP à une MOI de 1. Les cellules sont rincées au PBS puis fixées dans du PBS – formaldéhyde 3,7% pendant 15 min à température ambiante. Elles sont perméabilisées par incubation de 15 min à température ambiante dans du PBS contenant de l'albumine de sérum bovin (Sigma) 1% et du Triton X-100 (Sigma) 0,2%. Le Proximity Ligation Assay est réalisé à l'aide du kit Duolink (Sigma) selon les recommandations du fabricant. La saturation des échantillons est effectuée dans une solution de blocage 1 h à 37°C en chambre humide. Les cellules sont incubées avec les anticorps primaires pendant 1 h à l'obscurité et à 37°C en chambre humide. Après un rinçage en PBS, les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires fournis couplés à des sondes pendant 1 h à 37°C en chambre humide. Une étape de ligation des sondes est réalisée pendant 30 min à 37°C en chambre humide suivi par un rinçage et d'une étape d'amplification pendant 1h40 à 37°C en chambre humide. Les cellules sont fixées entre lame et lamelle avec du Prolong Diamond (Invitrogen).

5.2.18 Analyses de spectrométrie de masse

Les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées sur la Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest et sur la Plateforme Protéomique structurale et fonctionnelle/Spectrométrie de masse de l'Institut Jacques-Monod.

Les extraits « fractions liées » obtenus à l'issue de co-immunoprécipitations (voir paragraphe 5.2.6) sont incubés sur la nuit à 37°C avec 20 µL de NH_4HCO_3 à 25 mM contenant de la trypsine de qualité de séquençage à 25 µg/mL (Promega). Les peptides sont dessalés avec des cônes de pipette ZipTip µ-C18 (Millipore). Les extraits peptidiques sont ensuite analysés par Q-Exactive Plus couplé à un Nano-LC Proxeon 1000 (Thermo Scientific). Les peptides sont séparés par chromatographie avec les paramètres suivants : pré-colonne Acclaim PepMap100 C18 (2 cm, 75 µm i.d., 3 µm, 100 Å), colonne Pepmap-RSLC Proxeon C18 (50 cm, 75 µm i.d., 2 µm, 100 Å), flux de 300 nL/min, 98 min gradient de 95 % solvant A (eau, 0.1 % acide formique) à 35 % solvant B (100 % acétonitrile, 0.1% acide formique). Les peptides sont analysés dans la cellule Orbitrap, à une résolution de 70000, avec une gamme de masse de m/z 375-1500. Des fragments sont obtenus par dissociation de collision haute-énergie (HCD) avec une énergie de collision de 28%. Les données MS/MS sont acquises dans la cellule Orbitrap en mode Top20, à une résolution de 17500.

La quantification relative label-free est réalisée en utilisant le logiciel Progenesis-Qi 4.1 (Nonlinear Dynamics Ltd, Newcastle, UK). Pour l'étape d'identification, toutes les données de MS et MS/MS sont analysées avec le logiciel Proteome Discoverer (Thermo Scientific, version 2.2) couplé au moteur de recherche Mascot (Matrix Science, version 2.5.1). La tolérance de masse est fixée à 7 ppm pour les ions

précurseurs et 0,5 Da pour les fragments. Le nombre maximal de clivages manqués est limité à 2 pour la trypsine. Les modifications variables suivantes sont autorisées : l'oxydation (Met), la phosphorylation (Ser, Thr, Tyr), l'acétylation (extrémité N-terminale de la protéine). La base de données SwissProt (02/2017) avec la taxonomie Homo sapiens est utilisée pour l'étape d'identification MS/MS. Les identifications de peptides sont validées en fixant un seuil de 1% False Discovery Rate (FDR) calculé avec l'algorithme Percolator. Un test de Limma, effectué sur 6 (pour M2-1) ou 4 (pour L) expériences indépendantes grâce au logiciel R, permet l'estimation du ratio d'abondance moyen (fold change) de chaque protéine identifiée et teste l'écart entre ce fold change et 1. La p-value associée à ce test est précisée. Les protéines sont considérées comme interacteurs potentiels si leur fold change moyen est supérieur à 2 et leur p-value est inférieure à 0,05.

6 RESULTATS

6.1 Construction et caractérisation de virus recombinants

Plusieurs virus recombinants exprimant des protéines virales fluorescentes ont été obtenus par génétique inverse. Nous avons décrit le protocole utilisé dans l'article de Bouillier et al. « Generation, amplification and titration of recombinant respiratory syncytial viruses to monitor viral multiplication and viral factories dynamics », actuellement en cours de publication dans le journal JoVE. Le génome de ces virus est présenté dans la Figure 18 :

- Le RSV GFP présente un gène surnuméraire inséré entre P et M exprimant le fluorochrome GFP. Il est flanqué des séquences promotrices et terminatrices virales GS et GE nécessaires à sa transcription par la L. Sa construction est semblable à celle des virus recombinants RSV Cherry et RSV Luc décrits par l'équipe dans un article antérieur (Rameix-Welti et al. 2014).
- Le RSV M2-1-GFP possède, en plus du gène M2 sauvage codant pour M2-1 et M2-2, un gène surnuméraire codant pour M2-1 fusionnée à GFP à son extrémité C-terminale. Ce gène est lui aussi flanqué par les séquences GS et GE. Nous avons fait le choix de dupliquer M2-1 plutôt que d'accoler GFP à la M2-1 d'origine, afin de ne pas perturber l'expression de la protéine M2-2. De plus, M2-1-GFP est introduite entre SH et G. Ainsi, si une recombinaison homologue survient entre M2-1-GFP et M2-1, éliminant la GFP, les gènes G et F seront aussi supprimés. Dans ces conditions, le virus résultant ne sera pas capable de produire des virions, empêchant sa propagation.
- Le RSV L-GFP présente une séquence GFP insérée à l'intérieur du gène codant pour L, au niveau de la région variable 2 de L, appelée « hinge 2 ». Cette région est déjà décrite comme pouvant accueillir l'insertion d'une protéine fluorescente sans abolir le fonctionnement de la polymérase virale (Fix et al. 2011).

RSV GFP :



RSV M2-1-GFP :



RSV L-GFP :



Figure 18 : Virus recombinants produits par génétique inverse.

Le RSV GFP présente un gène surnuméraire codant pour le fluorochrome GFP, introduit dans le génome viral entre P et M. Le RSV M2-1-GFP exprime, en plus de la M2-1 sauvage, une M2-1 chimérique fusionnée à de la GFP, introduite entre SH et G. Le RSV L-GFP présente une L dans laquelle a été insérée une séquence de GFP, au niveau d'une de ses régions variables.

La cinétique d'expression des protéines virales des RSV GFP et RSV M2-1-GFP a été comparée à celle du RSV sauvage (WT). Des extraits protéiques ont été réalisés à différents temps post-infection sur des cellules HEp-2 infectées par du RSV WT, du RSV GFP ou du RSV M2-1-GFP. L'infection a été réalisée à forte multiplicité d'infection (MOI) afin de se placer en conditions de cycle unique. Les protéines virales ont ensuite été visualisées par Western Blot, de même qu'une protéine cellulaire, PCNA, pour vérifier la quantité de lysat cellulaire déposée (Figure 19A). Les 3 virus ont un profil d'expression similaire. Un léger retard d'expression aux temps précoces de l'infection est observé pour les protéines P et M2-1 du RSV M2-1-GFP, mais cette différence s'estompe après 24 h p.i. Pour le RSV M2-1-GFP, l'expression de la protéine chimérique M2-1-GFP est visible à partir de 24 h p.i.

Nous avons ensuite vérifié le pouvoir infectieux du RSV M2-1-GFP. Des cellules HEp-2 ont été infectées par du RSV WT ou du RSV M2-1-GFP à forte MOI. Les virus ont été récoltés à 0, 8, 12, 16, 24 et 48 h p.i, et leur titre a ensuite été déterminé par la méthode des plages de lyse (Figure 19B). Les deux virus présentent des cinétiques identiques : la production de virions s'amorce entre 8 et 12 h p.i, s'intensifie entre 12 et 16 h p.i et atteint ensuite un plafond. Le titre du RSV M2-1-GFP est toujours légèrement plus faible que celui du RSV sauvage, mais cette différence n'est pas significative. La cinétique des titres du RSV L-GFP n'a pas été examinée, mais ce virus atteint dès le 2^e passage un titre de 10⁶ PFU/mL.

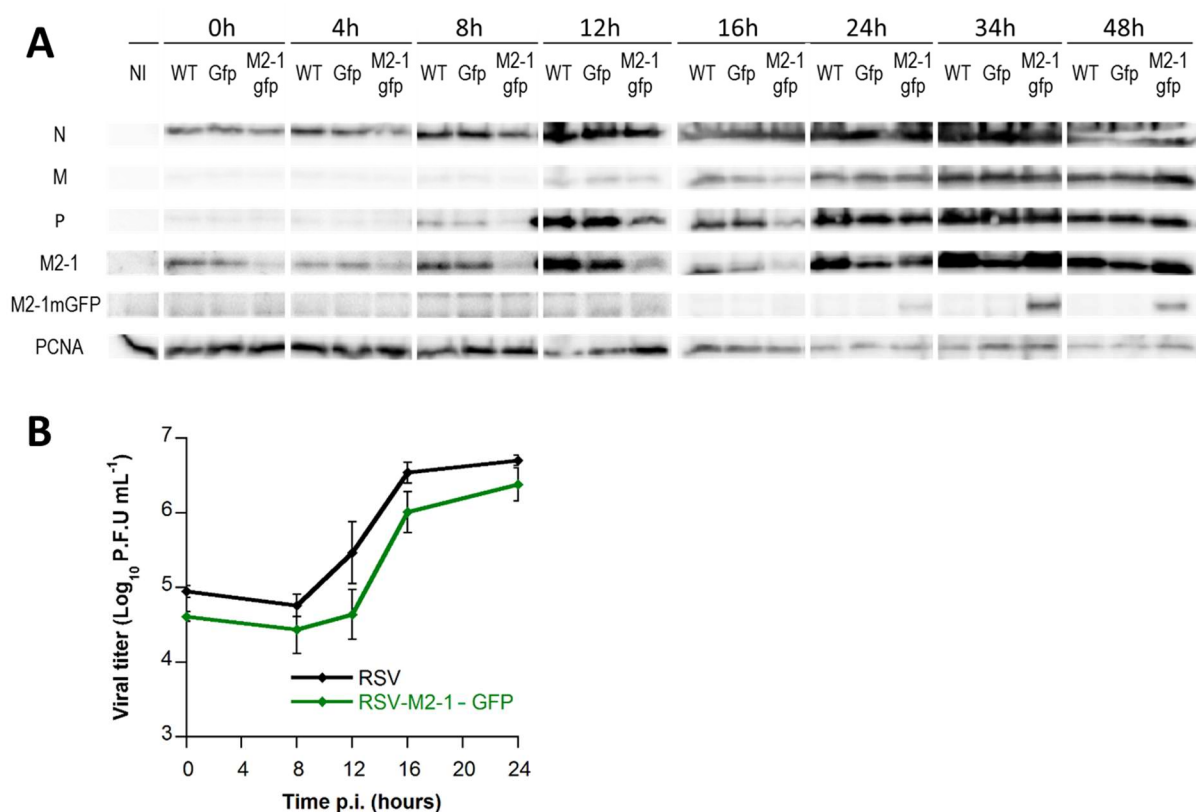


Figure 19 : Caractérisation des virus recombinants RSV GFP et RSV M2-1-GFP

A. Des cellules HEp-2 ont été infectées par du RSV sauvage, du RSV GFP ou du RSV M2-1-GFP, et des extraits protéiques ont été récoltés à 0, 4, 8, 12, 16, 24, 34 et 48 h p.i. Après SDS-PAGE, les membranes ont été incubées avec des anticorps dirigés contre les protéines virales N, M, P, M2-1 et la protéine cellulaire PCNA. B. Des cellules HEp-2 ont été infectées par du RSV sauvage ou du RSV M2-1-GFP à forte MOI, et les virus ont été récoltés à 0, 8, 12, 16, 24 et 48 h p.i. Leur titre a ensuite été déterminé par la méthode des plages de lyse. Les données ont été récoltées sur 3 répétitions faites en triplicat. Un test de Student a été réalisé sur les titres du RSV WT et du RSV M2-1-GFP à chaque temps post-infection. Une différence statistiquement significative n'est observée que pour le temps 0 h p.i.

6.2 Identification de partenaires potentiels cellulaires de M2-1 et L par un crible de leur interactome

Afin de mieux comprendre les interactions des protéines virales M2-1 et L au sein des cellules infectées, des co-immunoprécipitations de M2-1 ou L par une étiquette GFP ont été réalisées sur des cellules infectées. Une approche de protéomique quantitative a ensuite permis d'identifier les protéines précipitées spécifiquement avec M2-1 et L. Les virus RSV GFP, RSV M2-1-GFP et RSV L-GFP décrits plus haut ont été utilisés pour infecter des cellules HEp-2 à forte MOI. A 14 h p.i, les cellules ont été lysées en présence de RNase A et les protéines des lysats ont été co-immunoprécipitées avec des billes GFP-Trap à forte affinité pour la GFP. Les protéines co-purifiées avec M2-1 ou L ont ensuite été identifiées par une analyse LC-MS/MS. Pour obtenir un jeu de données statistiquement robuste, M2-1-GFP et L-

GFP ont été co-immunoprécipitées lors de 6 et 4 expériences indépendantes respectivement. Les données de spectrométrie de masse ont été analysées par le logiciel Mascot, en ne prenant en compte que les peptides ayant un False Discovery Rate (pourcentage de risque qu'un spectre MS/MS ait été associé à un mauvais peptide) inférieur à 1%. Un score Mascot a été attribué à chaque protéine, reflétant la qualité de son identification. De plus, une quantification label-free a été réalisée sur les protéines avec au moins deux peptides uniques, afin d'exclure les protéines précipitées à cause d'une liaison à la GFP ou aux billes. En effet, cette quantification a permis l'estimation de la spécificité de l'interaction avec M2-1 ou L par le calcul du ratio d'abondance moyen (fold change), c'est-à-dire le ratio de l'abondance de la protéine dans l'échantillon M2-1-GFP ou L-GFP comparé à son abondance dans l'échantillon GFP contrôle. Les protéines précipitées non-spécifiquement avec les billes ou la GFP ont un fold change aux alentours de 1, et un fold change supérieur indique une meilleure spécificité de la liaison à M2-1 ou L. Un test statistique Limma sur les 6 (pour M2-1) ou 4 (pour L) répétitions a permis l'estimation du fold change moyen pour chaque protéine et le calcul d'une p-value associée, reflétant la distance de ce fold change à 1 (Figure 20).

A l'issue des co-immunoprécipitations de L-GFP, 45 protéines ont été associées à un fold change supérieur à 2 et une p-value inférieure à 0,05, et sont donc considérées comme des partenaires potentiels de L. L est bien retrouvée dans cette sélection, ainsi que N et P.

En ce qui concerne les protéines co-purifiées avec M2-1, 137 protéines sont associées à un fold change supérieur à 2 et une p-value inférieure à 0,05, et sont donc considérées comme des partenaires potentiels de M2-1. M2-1 est inclus dans cette sélection et présente un fold change très élevé (158), reflétant vraisemblablement sa capacité d'oligomérisation. Cinq autres protéines virales ont été retrouvées dans cette liste : P, un interacteur connu de M2-1, mais aussi N, G, SH et NS2.

Une fraction de ces protéines a ensuite été sélectionnée afin d'être étudiée ultérieurement. Pour chaque protéine, le ratio d'enrichissement dans l'échantillon M2-1-GFP par rapport à l'échantillon GFP a été calculé pour chacune des 6 expériences. Une protéine a été considérée comme capturée dans une expérience donnée si son ratio d'enrichissement pour cette expérience était supérieur à 2, et le nombre d'expériences dans laquelle chaque protéine était capturée a été déterminé. Sur les 137 partenaires potentiels de M2-1, 32 sont capturés dans au moins 5 des 6 expériences : M2-1, N et 30 protéines cellulaires, dont 13 protéines ribosomales. Nous avons choisi d'exclure les 13 protéines ribosomales, hnRNPH3 et FAM120A. Les 15 protéines cellulaires restantes ont été choisies pour un crible ultérieur (Tableau 4).

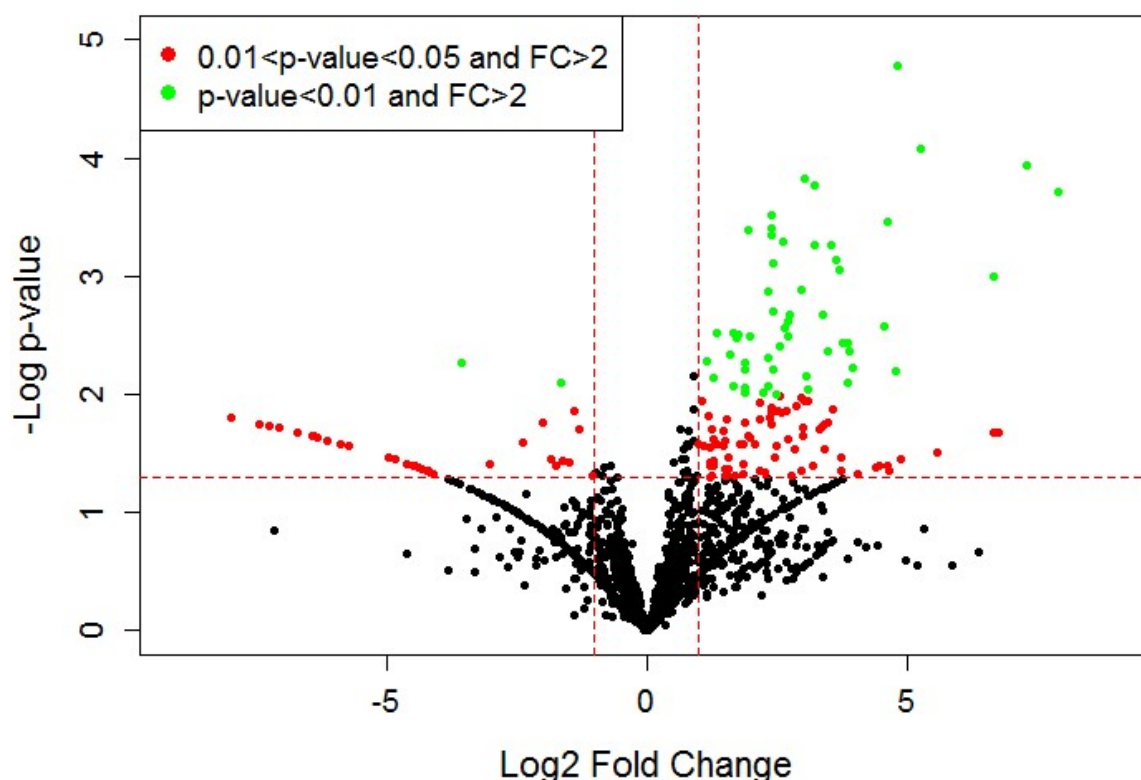


Figure 20 : Analyse par spectrométrie de masse des protéines associées avec M2-1 lors de l'infection par le RSV.

Les échantillons test (M2-1-GFP) et contrôle (GFP) ont été analysés par LC-MS/MS et l'abondance de chaque protéine dans les différents échantillons a été mesurée par label-free quantification. Un test statistique Limma a permis d'identifier des protéines d'intérêt, représentées ici sur un volcano plot avec en abscisse leur fold change exprimé en logarithme de base 2, et en ordonnées leur p-value exprimée en logarithme décimal. Les données proviennent de 6 expériences indépendantes. Les pointillés rouges indiquent les seuils choisis : fold change=2 (c'est-à-dire $\text{Log}_2(\text{Fold change})=1$) et p-value=0,05 (correspondant à $-\text{Log}(p\text{-value})=1,3$). Les protéines associées à un fold change supérieur à 2 et une p-value entre 0,05 et 0,01 sont représentées en rouge. Les protéines associées à un fold change supérieur à 2 et une p-value inférieure à 0,01 sont représentées en vert.

Tableau 4 : 15 partenaires potentiels de M2-1 choisis pour être étudiés ultérieurement

Accession	Protein name	Gene name	MASCOT score	Unique peptides	Fold change	P-value	Number of captures
Q99729	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	HNRNPAB	457,2	12	38,3	8,37E-05	6
Q1KMD3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	HNRNPUL2	1931,6	38	11,7	5,51E-04	6
O60506	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	SYNCRIP	950,7	25	28,2	1,66E-05	5
O43390	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	HNRNPR	1422,9	39	24,7	3,43E-04	5
Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRNPD	301,0	6	6,1	5,09E-04	5
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1	617,3	15	5,4	7,78E-04	5
O14979	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	HNRNPDL	322,9	6	7,8	1,29E-03	5
Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	HNRNPU	1665,9	37	3,7	6,16E-03	5
Q12905	Interleukin enhancer-binding factor 2	ILF2	962,1	16	8,2	1,49E-04	5
Q12906	Interleukin enhancer-binding factor 3	ILF3	955,3	29	13,5	3,70E-03	5
P11940	Polyadenylate-binding protein 1	PABPC1	328,8	7	7,8	4,38E-02	5
Q86U42	Polyadenylate-binding protein 2	PABPN1	323,8	12	239,2	1,94E-04	5
Q96KR1	Zinc finger RNA-binding protein	ZFR	800,9	22	12,6	7,24E-04	5
Q08211	ATP-dependent RNA helicase A	DHX9	1309,9	39	6,6	3,19E-03	5
P42285	Superkiller viralicidic activity 2-like 2	SKIV2L2	611,5	21	5,0	4,96E-03	5

6.3 Etude de l'importance des partenaires potentiels de M2-1 pour la multiplication du RSV

Les 15 protéines sélectionnées plus haut ont été criblés en inhibant leur expression par interférence ARN afin d'étudier leur impact sur la multiplication virale. Un mélange de siRNA ciblant chacune de ces protéines a été transfecté en cellules A549. Des siRNA sans cible ont été utilisés comme contrôle négatif et des siRNA ciblant N, connus pour inhiber la multiplication du RSV (Alvarez et al. 2009), ont été utilisés comme contrôle positif. L'efficacité de l'inhibition a été contrôlée en quantifiant par RT-qPCR la diminution d'ARNm GAPD en présence de siRNA ciblant GAPD. Une inhibition de plus de 70% a été obtenue sur l'ensemble des répétitions (Figure 21A). La toxicité des siRNA a été évaluée en dosant par luminescence l'ATP, qui est proportionnel au nombre de cellules vivantes, selon le protocole décrit dans la section Matériel et méthodes. Des siRNA dirigés contre RAN, une protéine dont l'inhibition provoque la mort des cellules, ont été inclus comme témoin positif de cytotoxicité. Aucune réduction significative du signal de viabilité des cellules n'a été observé par rapport aux cellules traitées par le siRNA contrôle (Figure 21B).

24 h après la transfection des siRNA, les cellules ont été infectées par un virus recombinant exprimant la protéine fluorescente Cherry (RSV Cherry) à faible MOI. La fluorescence Cherry a ensuite été mesurée à 48 h p.i, permettant d'évaluer l'efficacité de la réplication virale (Rameix-Welti et al. 2014) (Figure 21C). La fluorescence a été normalisée par le signal de viabilité cellulaire afin d'éliminer les variations de fluorescence provoquées par les variations du nombre de cellules, et exprimée en pourcentage du siRNA contrôle (Figure 21D). En dehors du contrôle positif N, les seules protéines dont l'inhibition diminuent significativement la multiplication virale sont PABPC1 et ILF2, avec une réduction du signal fluorescent de 30 et 40% respectivement. Au contraire, l'inhibition de PABPN1 provoque une augmentation du signal fluorescent de 180%, suggérant une régulation positive de la réplication du RSV dans les cellules dépourvues de PABPN1.

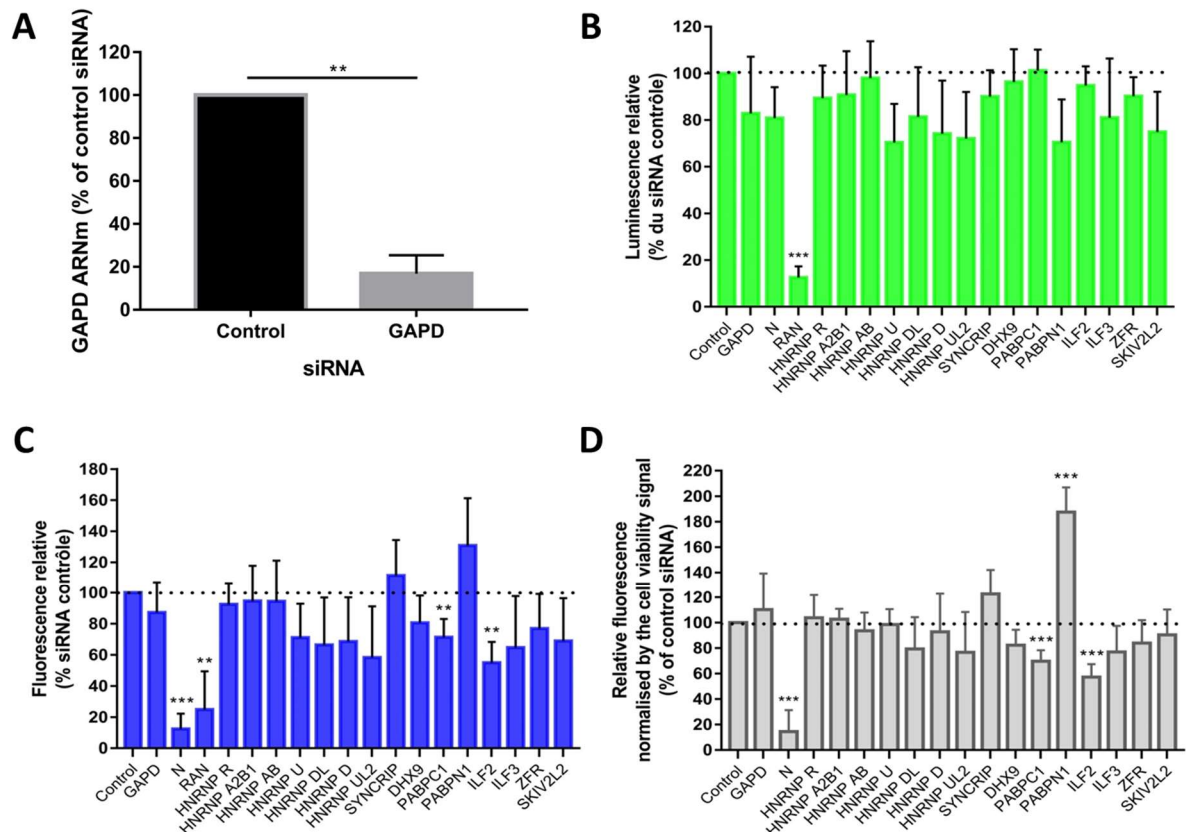


Figure 21 : Crible d'interférence ARN des partenaires potentiels de M2-1 afin de déterminer leur importance pour la multiplication du RSV.

A. L'efficacité de l'inhibition a été mesurée en quantifiant la diminution de l'ARNm GAPD extrait à 48 h p.i de cellules A549 traitées par des siRNA GAPD par rapport à des cellules traitées par les siRNA contrôle. B-C-D. Des cellules A549 traitées par des siRNA dirigés contre 15 partenaires potentiels de M2-1 ont été infectés après 24 h par du RSV Cherry à faible MOI. A 48 h p.i, la fluorescence Cherry (C) et le signal de viabilité cellulaire (B) ont été mesurés, et exprimés en pourcentage du siRNA contrôle. La fluorescence a été normalisée par le signal de viabilité cellulaire pour éliminer les variations de fluorescence dues à une variation du nombre de cellules (D). Un test de Student (A) et des test de Student multiples avec correction de Holm-Sidak (B-C-D) ont été réalisés grâce au logiciel GraphPad Prism (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Les données représentées correspondent à 4-5 expériences indépendantes réalisées en triplicat.

6.4 Importance de PABPC1 dans le cycle viral

6.4.1 Impact sur la multiplication virale

Par la suite, nous avons décidé de nous concentrer sur PABPC1. De nouvelles expériences d'inactivation de PABPC1 ont été réalisées afin de déterminer plus précisément l'impact de l'inhibition de PABPC1 sur la multiplication virale. Des cellules A549 ont été traitées avec des siRNA dirigés contre PABPC1 et des siRNA sans cible (contrôle), dans des conditions optimisées afin d'obtenir une efficacité

d'inhibition de l'ARNm PABPC1 supérieure à 80% (Figure 22A). La cytotoxicité des siRNA dirigés contre PABPC1 dans ces conditions a été contrôlée et est comparable à celle du siRNA contrôle (Figure 22B). Les cellules ont ensuite été infectées après 48 h par du RSV Cherry à faible MOI, et la fluorescence Cherry a été mesurée à 0, 24 et 48 h p.i afin de suivre l'évolution de la multiplication virale au cours du temps (Figure 22C). Le signal fluorescent en présence de siRNA PABPC1 est significativement plus faible que celui du siRNA contrôle à 24 et 48 h, descendant à 48 h jusqu'à 45% du siRNA contrôle.

Pour vérifier que cette diminution de la fluorescence Cherry correspond bien à une diminution de l'expression des protéines virales induite par le siRNA PABPC1, des extraits protéiques ont été récoltés à 0, 24 et 48 h p.i et analysés par Western blot avec des anticorps dirigés contre PABPC1 et les protéines virales N et M. La totalité des protéines a aussi été visualisée par fluorescence grâce à la technologie Stain Free (voir paragraphe 5.2.13). Pour tous les temps, l'expression de PABPC1 est très fortement inhibée en présence de siRNA PABPC1, ce qui confirme l'efficacité de ces siRNA. A 24 et 48 h p.i, on observe une diminution du niveau de N en présence de siRNA PABPC1 par rapport au siRNA contrôle, visible aussi pour M à 48 h p.i. Le niveau des protéines cellulaires autre que PABPC1 reste inchangé, en accord avec les résultats de viabilité cellulaire (Figure 22E).

Afin de tester si cette réduction de l'efficacité de l'infection est associée à une diminution de la production de virions, des virus ont été récoltés en présence de siRNA PABPC1 ou de siRNA contrôle à 48 h p.i et leur titre a été mesuré par la méthode des plages de lyse. Le nombre d'unités infectieuses diminue de 50% en présence de siRNA PABPC1 (Figure 22D). Ceci montre que PABPC1 est important pour obtenir une multiplication virale optimale dans les cellules infectées par le RSV.

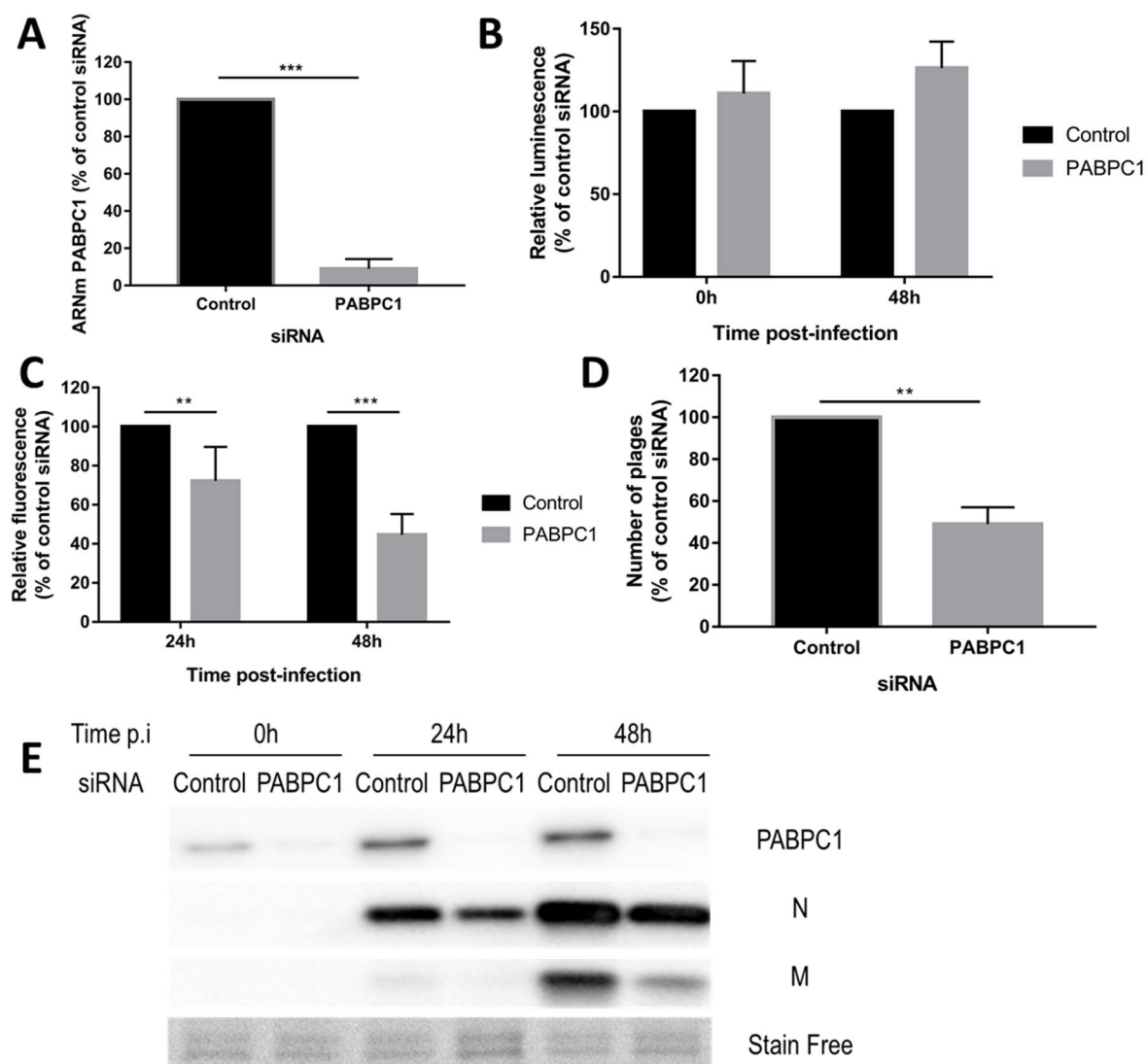


Figure 22 : Importance de PABPC1 pour la multiplication du RSV.

A. L'efficacité de l'inhibition de PABPC1 a été mesurée en quantifiant la diminution de l'ARNm PABPC1 extrait à 0 h p.i de cellules A549 traitées par des siRNA PABPC1 par rapport à des cellules traitées par les siRNA contrôle. B-C-D. Des cellules A549 traitées par des siRNA dirigés contre PABPC1 ou par le siRNA contrôle ont été infectées après 48 h par du RSV Cherry à faible MOI. B. Le signal de viabilité cellulaire a été mesuré à 0 et 48 h p.i. C. La fluorescence Cherry a été mesurée à 24 et 48 h p.i. D. Les virus ont été récoltés à 48 h p.i et leur titre a été déterminé par la méthode des plaques de lyse. E. Des extraits protéiques ont été récoltés à 0, 24 et 48 h, séparés par SDS-PAGE et les protéines PABPC1, N et M ont été visualisées par Western blot. Les protéines totales ont été révélées par fluorescence grâce à la technologie Stain Free. A-B-C-D. Les données représentées ont été récoltées lors de 5 (A-B), 4 (C) et 3 (D) expériences indépendantes réalisées en duplicat (D) ou triplicat (B-C). Les tests de Student ont été réalisés grâce au logiciel GraphPad Prism (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

6.4.2 Impact sur la transcription virale

Etant donné que M2-1 est principalement impliquée dans la transcription virale et que PABPC1 joue un rôle central dans la traduction, nous avons cherché à déterminer si l'impact de PABPC1 sur

l'infection par le RSV avait pour origine une intervention dans l'étape de transcription ou de traduction du cycle viral. Pour étudier l'effet de PABPC1 sur la transcription virale, des cellules A549 ont été traitées avec des siRNA PABPC1 ou des siRNA contrôle et infectées par le RSV Cherry, comme décrit dans le paragraphe précédent. A 0, 24, 48 et 72 h p.i, une extraction des ARNm cellulaires et viraux a été réalisée. Les ARNm des protéines virales N et L ont été analysés par RT-qPCR et une quantification relative a été effectuée par la méthode des $2^{-\Delta\Delta CT}$, décrite dans le chapitre Matériel et méthodes. La Figure 23 présente la quantité de ces deux ARNm dans les échantillons traités par le siRNA PABPC1, en pourcentage de leur niveau dans les échantillons contrôle. Aucune des valeurs n'est significativement différente de 100 : aucune différence ne ressort entre les cellules traitées par les siRNA PABPC1 et les siRNA contrôle, quel que soit l'ARNm viral observé et le temps après infection.

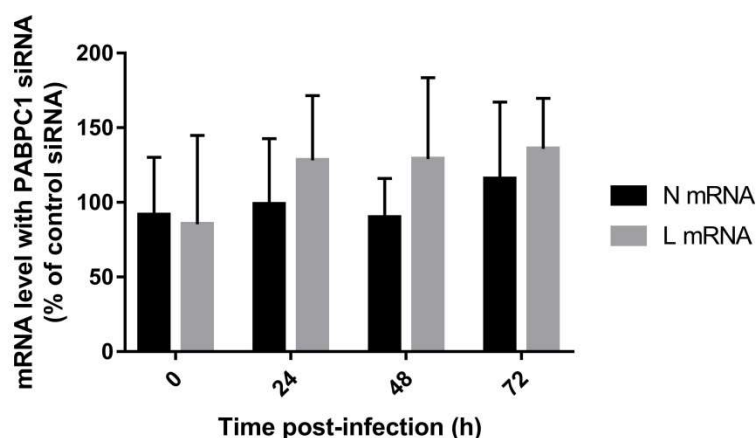


Figure 23 : Effet de l'inhibition de PABPC1 sur la transcription virale.

Des cellules A549 traitées par des siRNA dirigés contre PABPC1 ou des siRNA sans cible (contrôle) ont été infectées après 48 h par du RSV Cherry à faible MOI. Les ARNm viraux et cellulaires ont été extraits à 0, 24, 48 et 72 h, et la quantité relative des ARNm de L et N a été mesurée par RT-qPCR. La quantité d'ARNm dans les cellules traitées par le siRNA PABPC1 est exprimée en pourcentage de la quantité d'ARNm avec le siRNA contrôle. Cette expérience a été réalisée deux fois, et chaque qPCR a été effectuée en triplicat.

6.4.3 Impact sur la traduction virale

L'effet de PABPC1 sur la traduction a ensuite été analysé. Des cellules A549 ont été traitées par des siRNA dirigés contre PABPC1 ou des siRNA contrôle et ont été infectées ou non après 48 h par du RSV sauvage à forte MOI. Un marquage métabolique des protéines synthétisées *de novo* a ensuite été réalisé entre 14 et 18 h p.i par l'incorporation d'un homologue de la méthionine, la L-azidohomoalanine (AHA), qui contient un groupe azide, dans les protéines néo-synthétisées à la place de la méthionine. Après récolte à 18 h p.i, les extraits protéiques ont été incubés avec le fluorochrome TAMRA, qui se lie avec AHA par une réaction alkyle-azide. Les protéines ainsi marquées ont ensuite

été séparées par SDS-PAGE puis visualisées grâce à la fluorescence du TAMRA. Ce protocole a donc permis d'observer l'ensemble des protéines synthétisées pendant une période de 4 h, pour des cellules infectées ou non et traitées avec des siRNA contre PABPC1 ou des siRNA contrôle (Figure 24A). On observe trois bandes (indiquées sur la figure par des flèches) présentes dans les échantillons infectés mais absentes pour les échantillons non-infectés (N.I), qui correspondent sans doute à des protéines virales. Leur poids moléculaire indique qu'il s'agit probablement de N, P et M.

Une analyse quantitative de l'image a ensuite été réalisée avec le logiciel Image Lab (Biorad). La Figure 24B présente l'intensité relative des 4 pistes, ce qui représente la quantité totale de protéines synthétisées en 4 h pour les quatre conditions. Cette intensité est légèrement plus faible pour les conditions « RSV » que pour les conditions « N.I », pour un même traitement siRNA, ce qui pourrait révéler un léger effet d'inhibition de la traduction cellulaire par le RSV. De plus, pour les cellules non-infectées, le traitement par le siRNA PABPC1 induit une diminution de l'intensité de 24% par rapport au siRNA contrôle, indiquant un effet certain d'inhibition de la traduction. Enfin, pour les cellules infectées, l'impact du siRNA PABPC1 est encore plus marqué, avec une inhibition de 53% par rapport au siRNA contrôle. Ceci pourrait être dû à un effet cumulatif de l'infection et de l'inhibition de PABPC1, possiblement par un effet de compétition entre la traduction des ARNm virales et cellulaires.

Pour étudier de plus près cet impact de PABPC1 sur la traduction, nous avons quantifié dans les échantillons infectés l'intensité des 3 bandes correspondant aux protéines N, P et M, ainsi que de 3 bandes A, B et C choisies au hasard et attribuables à des protéines cellulaires (Figure 24C). Pour toutes les protéines, qu'elles soient d'origine virale ou cellulaire, le signal correspondant au siRNA PABPC1 est entre 40 et 60% du signal du siRNA contrôle. Ceci montre que l'inhibition de PABPC1 diminue également l'expression des protéines cellulaires et des protéines virales. Ces résultats suggèrent que PABPC1 n'a pas d'effet spécifique sur la traduction virale. Il est à noter que cette expérience n'a pas pu être refaite en raison de contraintes techniques majeures, et donc ne peut être utilisée pour tirer des conclusions définitives.

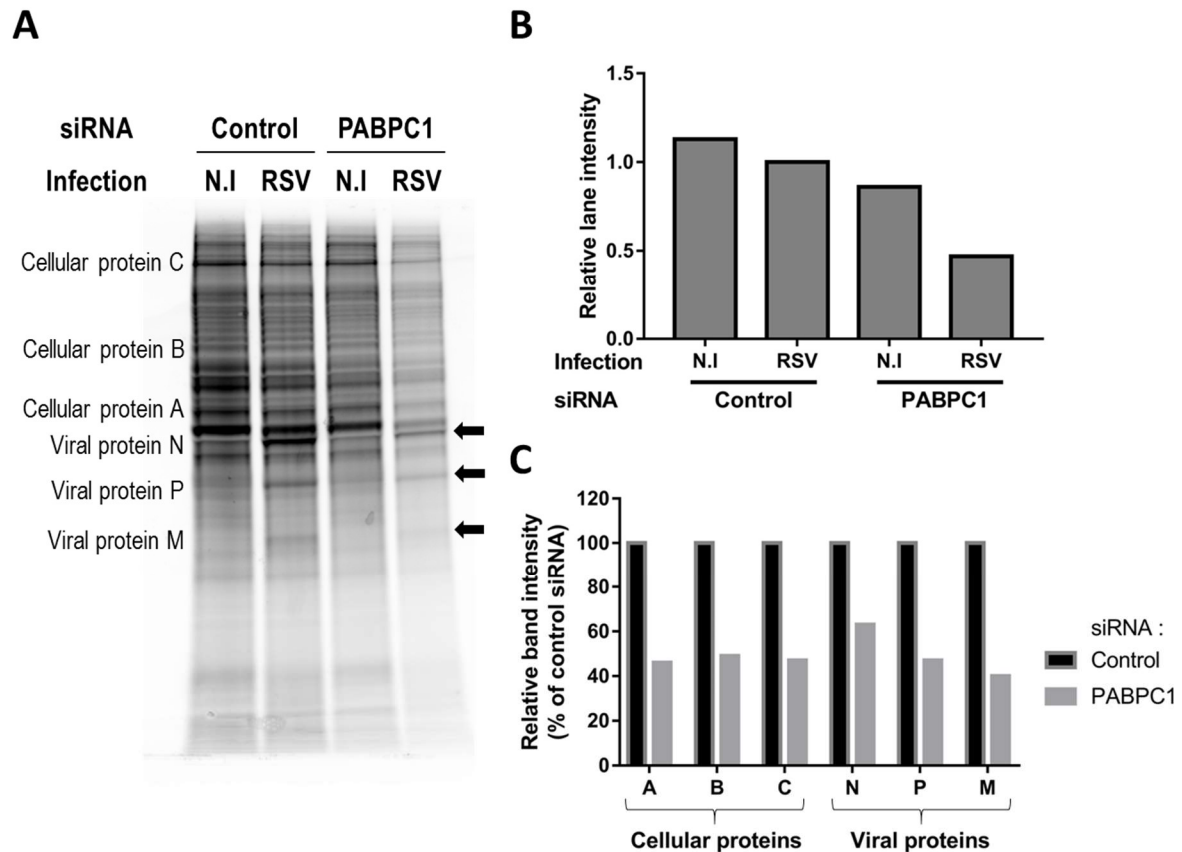


Figure 24 : Effet de l'inhibition de PABPC1 sur la traduction virale et cellulaire.

A-B-C. Des cellules A549 ont été traitées par des siRNA dirigés contre PABPC1 ou des siRNA sans cible (contrôle) et ont été infectées ou non (non-infectées : N.I) après 48 h par du RSV sauvage à forte MOI. Un marquage métabolique des protéines synthétisées de novo a été réalisé entre 14 et 18 h p.i par l'incorporation d'un acide aminé modifié AHA. Après récolte à 18 h p.i, les protéines ont été incubées avec le fluorochrome TAMRA qui réagit avec AHA. A. Les protéines marquées ont été séparées par SDS-PAGE et visualisées par observation de la fluorescence. Trois protéines virales ont été détectées, aux poids moléculaires indiqués par des flèches noires. B. Une quantification relative de l'intensité totale de chaque piste a été réalisée, avec la condition « siRNA contrôle + RSV » comme référence. C. L'intensité relative de 5 bandes correspondant à 3 protéines cellulaires et aux protéines virales N, P et M a été quantifiée pour les 2 conditions « siRNA contrôle + RSV » et « siRNA PABPC1 + RSV », avec l'intensité de chaque bande dans la condition « siRNA contrôle + RSV » comme référence.

6.5 Etude de l'interaction entre M2-1 et PABPC1

6.5.1 Vérification de l'interaction entre M2-1 et PABPC1

Les approches de protéomique quantitative visant à identifier des interactions protéine-protéine a tendance à produire de nombreux faux-positifs, rendant nécessaire la vérification des interactions trouvées par d'autres méthodes. Nous avons confirmé l'interaction entre M2-1 et PABPC1 en analysant

des co-immunoprécipitations de M2-1 ou PABPC1 par Western blot avec des anticorps dirigés contre ces deux protéines.

Des cellules HEp-2 ont été infectées avec du RSV M2-1-GFP ou RSV GFP (contrôle), lysées à 14 h p.i et co-immunoprécipitées avec un anticorps GFP. M2-1 étant connue pour se lier à l'ARN (Blondot et al. 2012; Tran et al. 2009), de la RNase A a été ajoutée ou non lors de l'étape de lyse afin de déterminer si l'ARN joue un rôle dans cette interaction. L'efficacité du traitement RNase a été vérifiée en mesurant par RT-qPCR les niveaux de 3 ARNm cellulaires avec ou sans RNase A : dans presque tous les cas, le signal spécifique à l'ARNm mesuré a été complètement éliminé par l'ajout de RNase (Tableau 5).

Tableau 5 : Efficacité du traitement par la RNase A en IP

Buffer	mRNA	- RNase	+ RNase
Lysis IP GFP	Ubiquitin C	17,4	n.d
	Actin B	21,2	36,3
	PABPC1	20,3	n.d
Lysis IP PABPC1	Ubiquitin C	17,1	n.d
	Actin B	20,8	n.d
	PABPC1	20,1	n.d

Des cellules HEp-2 ont été lysées dans les conditions de lyse (tampon, temps, température) utilisées lors des IP, avec ou sans RNase A. Les niveaux de 3 ARNm, ceux de l'ubiquitine C, l'actine β et PABPC1, ont été mesurés par RT-qPCR en triplicat, et le CT moyen obtenu pour chaque ARNm est reporté dans ce tableau. N.d : aucun signal spécifique à l'ARNm mesuré n'a été détecté.

PABPC1 est retrouvée dans la fraction liée de l'échantillon M2-1-GFP mais pas dans le contrôle (ou en quantité infime), validant les résultats du crible interactomique. Le signal de PABPC1 dans la fraction liée de l'échantillon M2-1-GFP est bien visible en présence de RNase, mais est d'intensité plus forte en absence de RNase. Ceci suggère que l'interaction entre M2-1 et PABPC1 ne nécessite pas l'ARN comme intermédiaire, mais que la liaison des deux protéines à l'ARN consolide cette interaction, ou induit la co-immunoprécipitation de PABPC1 avec M2-1-GFP à la fois par des interactions protéine-protéine et des interactions ARN-protéine. M2-1 sauvage est aussi co-immunoprécipitée spécifiquement avec M2-1-GFP, avec et sans RNase, en accord avec la capacité de M2-1 de s'oligomériser avec M2-1-GFP (Figure 25A).

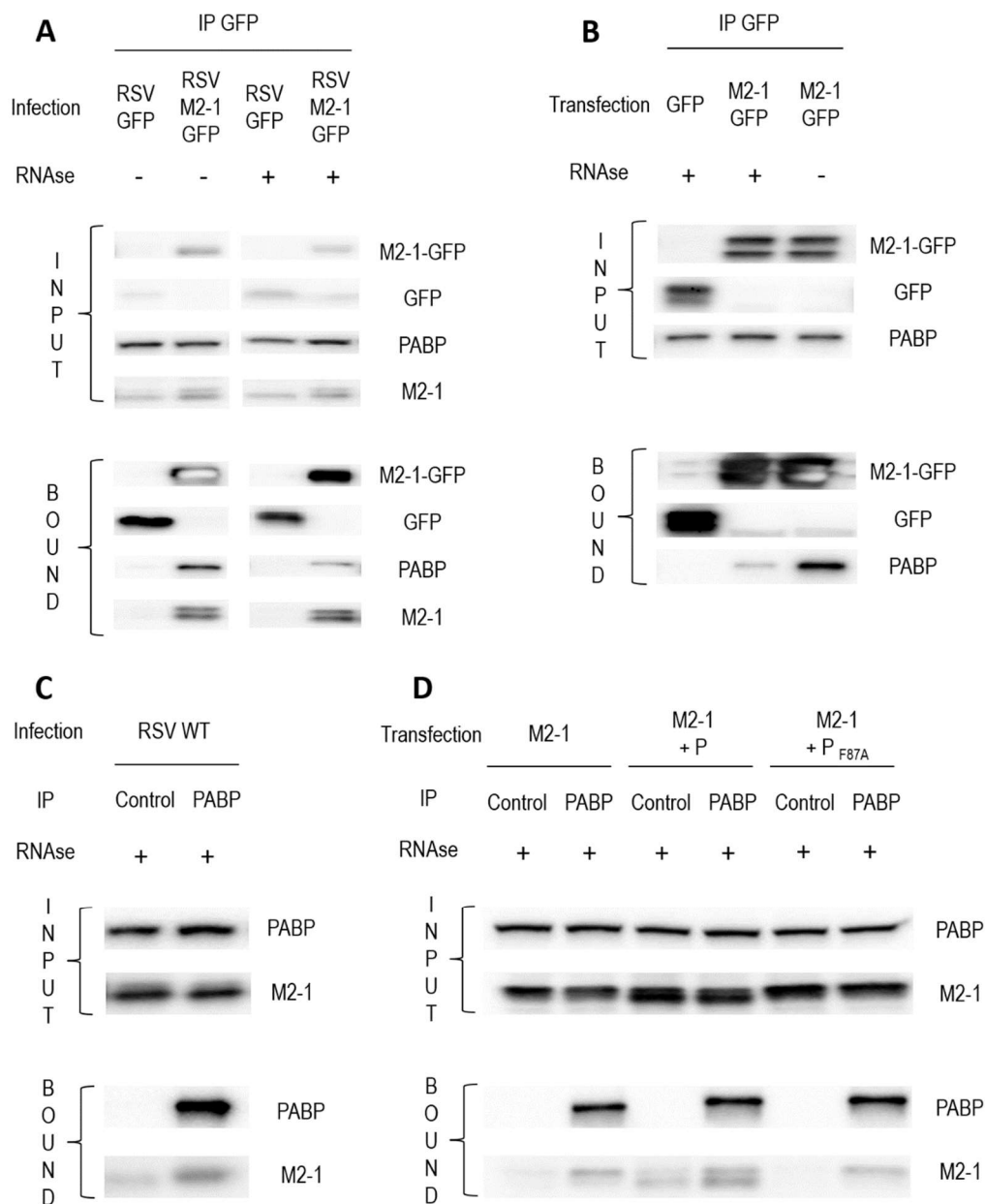


Figure 25 : Interaction de PABPC1 avec M2-1, exprimée en condition d'infection ou seule.

A. Des cellules HEp-2 ont été infectées avec RSV M2-1-GFP ou RSV GFP (contrôle) pendant 14 h, puis les protéines ont été co-immunoprécipitées avec un anticorps dirigé contre GFP, en présence ou en absence de RNase A. Les échantillons ont ensuite été analysés par Western blot avec des anticorps dirigés contre M2-1, GFP et PABPC1. B. Des cellules HEp-2 ont été transfectées avec M2-1-GFP ou GFP (contrôle) pendant 24 h, puis les protéines ont été co-immunoprécipitées avec un anticorps GFP, avec ou sans RNase A. Les échantillons ont ensuite été analysés par Western blot avec des anticorps dirigés contre M2-1, GFP et PABPC1. C. Des cellules HEp-2 ont été infectés avec du RSV sauvage pendant 14 h, puis les protéines ont été co-immunoprécipitées avec un anticorps dirigé contre PABPC1 ou une protéine non-impliquée (contrôle), en présence de RNase A. Les échantillons ont ensuite été analysés par Western blot avec des anticorps dirigés contre M2-1 et PABPC1. D. Des cellules BSR-T7 ont été transfectées avec M2-1 seule, M2-1 et P ou M2-1 et P_{F87A}, puis les protéines ont été co-immunoprécipitées avec un anticorps dirigé contre PABPC1 ou une protéine non-impliquée (contrôle), en présence de RNase A. Les échantillons ont ensuite été analysés par Western blot avec des anticorps dirigés contre M2-1 et PABPC1.

Des expériences de co-immunoprécipitation similaires ont été réalisées sur des cellules exprimant transitoirement M2-1-GFP ou GFP (contrôle), et les protéines capturées ont été révélées par immunoblot. De nouveau, PABPC1 est capturée avec M2-1-GFP mais pas GFP. En présence de RNase, elle est précipitée avec M2-1 en quantité modeste, et plus fortement en absence de RNase (Figure 25B). Ceci confirme les résultats précédents et révèle que l'interaction entre PABPC1 et M2-1 ne nécessite pas la présence d'autres protéines virales et peut se former hors d'un contexte d'infection.

La co-immunoprécipitation inverse a aussi été réalisée : des cellules HEp-2 ont été infectées par du RSV sauvage pendant 14 h, lysées puis co-immunoprécipitées avec un anticorps dirigé contre PABPC1 ou une protéine cellulaire n'interagissant ni avec PABPC1 ni avec M2-1 (contrôle). De la RNase A a été ajoutée lors de la lyse. Comme on peut le voir dans la Figure 25C, M2-1 est précipitée en plus grande quantité avec l'anticorps qu'avec le contrôle. Ceci valide de nouveau l'interaction, dans des conditions où aucun des partenaires n'est modifié par une étiquette protéique.

Enfin, M2-1 étant présente dans les cellules infectées sous deux formes, phosphorylées ou non-phosphorylées, nous avons voulu déterminer si son état de phosphorylation influait sur sa liaison à PABPC1. Seule, M2-1 est présente seulement sous forme phosphorylée. La présence de P permet sa déphosphorylation par la phosphatase PP1a, et conduit à la présence des deux formes de M2-1 dans les cellules. Cette capacité d'induire la déphosphorylation de M2-1 est inactivée chez le mutant P_{F87A} (Richard et al. 2018). Une co-immunoprécipitation avec un anticorps PABPC1 ou contrôle a donc été réalisée sur des cellules BSR-T7 exprimant M2-1 seule, M2-1 et P ou M2-1 et P_{F87A}. Pour toutes les conditions, M2-1 est retrouvée en plus grande quantité dans la fraction liée avec l'anticorps PABPC1 qu'avec le contrôle. Lorsque M2-1 est exprimée seule ou avec P_{F87A}, seule la forme phosphorylée de M2-1 est observée, à la fois dans le lysat cellulaire et dans la fraction liée. Lorsque M2-1 est transfectée avec la P sauvage, les deux états de phosphorylation sont visibles dans le lysat cellulaire, et les deux formes peuvent être retrouvées en quantité à peu près égales dans la fraction liée (Figure 25D). Ceci suggère que la liaison de M2-1 à PABPC1 ne dépend pas de son état de phosphorylation.

6.5.2 Absence d'interaction de M2-1 avec les autres protéines du complexe d'initiation de la traduction

L'interaction entre M2-1 et PABPC1 ne nécessite pas la présence d'autres protéines virales ou de l'ARN, mais d'autres protéines cellulaires pourraient cependant intervenir. En particulier, PABPC1 appartient au complexe d'initiation de la traduction, et de nombreuses protéines impliquées dans la traduction ont été identifiées comme partenaires potentiels de M2-1 par notre analyse de protéomique quantitative. Nous avons donc cherché à déterminer si M2-1 se lie à PABPC1 par l'intermédiaire d'autres protéines du complexe d'initiation de la traduction. Une IP avec un anticorps GFP a donc été

réalisée sur des cellules HEp-2 infectées par le RSV M2-1-GFP ou le RSV GFP, avec ou sans RNase. Les extraits protéiques ont été séparés par SDS-PAGE et un Western blot a été effectué avec des anticorps dirigés contre quelques protéines du complexe d'initiation de la traduction : eIF4G, eIF4E, eIF4A et eIF3. En présence de RNase, aucune de ces protéines n'est capturée spécifiquement avec M2-1-GFP. En revanche, en absence de RNase, eIF4E est précipitée en plus grande quantité avec M2-1-GFP qu'avec GFP seul (Figure 26). Ces observations suggèrent que la liaison de PABPC1 à M2-1 n'est pas associée à la précipitation de l'entière du complexe d'initiation de la traduction avec M2-1.

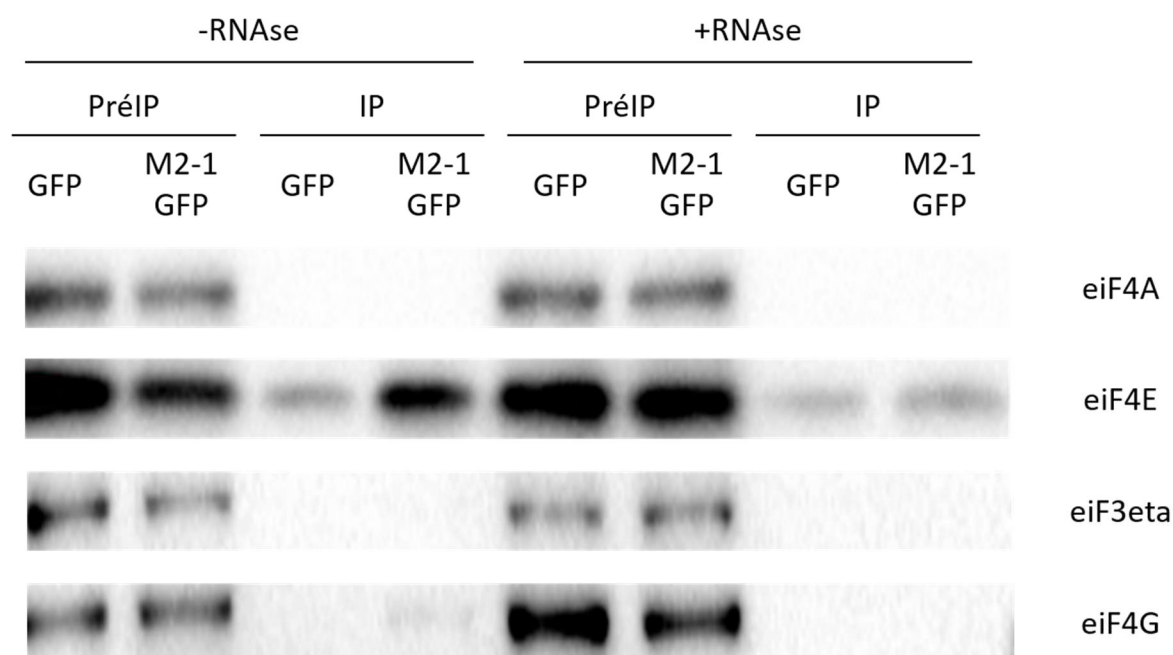


Figure 26 : Pas d'interaction entre M2-1 et les autres protéines du complexe d'initiation de la traduction.

Des cellules HEp-2 ont été infectées avec du RSV M2-1-GFP ou RSV GFP pendant 14 h, puis les protéines ont été co-immunoprécipitées avec un anticorps GFP. De la RNase A a été ajoutée ou non pendant la lyse. Les extraits protéiques ont ensuite été analysés en Western blot afin de visualiser eIF4A, eIF4E, eIF3 et eIF4G.

6.5.3 Domaines de PABPC1 impliqués dans sa liaison à M2-1

Nous avons ensuite cherché à déterminer le domaine de PABCP1 impliqué dans son interaction avec M2-1. A ces fins, nous avons utilisé le test de complémentation protéique Nanoluc Double Hybride (N2H) utilisant la nanoluciférase NanoLuc, décrit dans un article de Nature Methods en voie de publication. Ce test consiste à exprimer transitoirement en cellules HEK-293T une première protéine (la protéine A) fusionnée au 1^e domaine de complémentation de la NanoLuc (N1) et une deuxième protéine (la protéine B) fusionnée au 2^e domaine de complémentation de la NanoLuc (N2). S'il y a interaction entre A et B, les deux domaines de complémentation de la nanoluciférase sont mis en contact et l'enzyme fonctionnelle est reconstituée (Figure 27A). L'occurrence ou non de cette

reconstitution est détectée par mesure de luminescence. Le bruit de fond est estimé en testant (1) A-N1 et N2 seul, et (2) B-N2 et N1 seul, puis en choisissant la mesure la plus élevée. Le Normalized Luminescence Ratio (NLR) est ensuite calculé en normalisant la luminescence de A-N1 + B-N2 par le bruit de fond (Figure 27B). Ce test a été utilisé pour évaluer l'interaction entre M2-1 et la PABPC1 entière ou 4 fragments de PABPC1, présentés dans la Figure 27C. Les extraits cellulaires ont été traités avec de la RNase A pendant 1 h avant la mesure de luminescence, pour éviter la détection d'interactions formées par liaison mutuelle à l'ARN. L'ajout de RNase A n'a pas complètement dégradé l'ARN, mais a permis la réduction des quantités d'ARNm d'un facteur 1000 (Tableau 6).

Tableau 6 : Efficacité du traitement par la RNase A en Nanoluc Double Hybride

Buffer	mRNA	- RNase	+ RNase
Lysis SNPCA	Ubiquitin C	21,1	32,4
	Actin B	23,3	32,1
	PABPC1	23,3	34,1

Des cellules HEK 293T ont été lysées dans les conditions de lyse (tampon, temps, température) utilisées lors des tests de complémentation protéique, avec ou sans RNase A. Les niveaux de 3 ARNm, ceux de l'ubiquitine C, l'actine β et PABPC1, ont été mesurés par RT-qPCR en triplicat, et le CT moyen obtenu pour chaque ARNm est reporté dans ce tableau.

Les résultats de ces tests sont présentés dans la Figure 27D. Le NLR diminue drastiquement (de 90% environ) lorsqu'on remplace la PABPC1 entière par sa région N-terminale, qui contient les 4 domaines RRM, ou par le fragment Linker, composé de la région non-structurée de PABPC1 située entre les domaines RRM et le domaine MLLE. En comparaison, pour les deux fragments contenant le domaine MLLE, 50 à 60% du signal d'interaction de la PABPC1 entière avec M2-1 est conservé. Ceci indique que le site de liaison à M2-1 est situé dans le domaine MLLE de PABPC1.

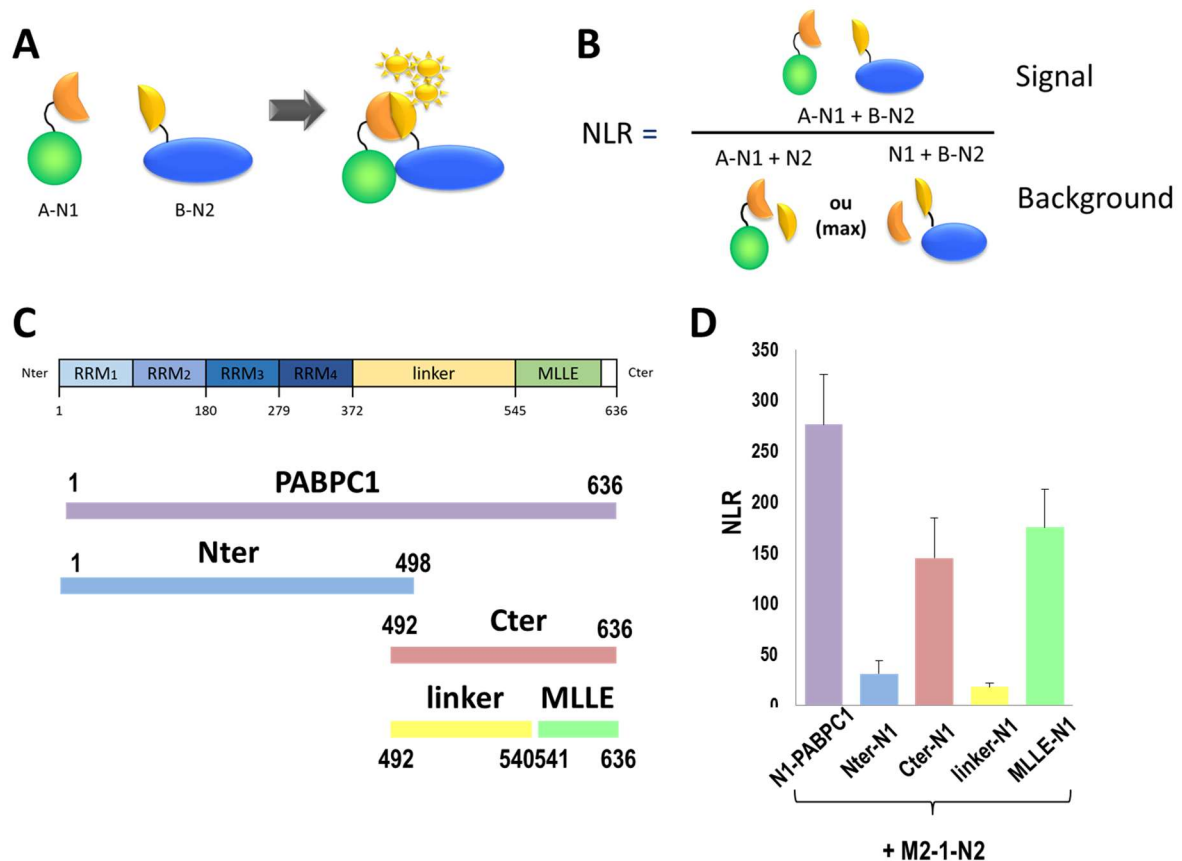


Figure 27 : Interaction de M2-1 avec différentes régions de PABPC1.

A. L'interaction est détectée grâce à un test de complémentation protéique, le Nanoluc Double Hybride (N2H), qui consiste à exprimer transitoirement une protéine A fusionnée au 1^e domaine de complémentation de la nanoluciférase (A-N1) et une protéine B fusionnée au 2^e domaine de complémentation de la nanoluciférase (B-N2). S'il y a interaction entre A et B, les deux domaines de complémentation de la nanoluciférase sont mis en contact et l'enzyme fonctionnelle est reconstituée.

B. Le bruit de fond est estimé en mesurant la luminescence de (1) A-N1 et N2 seul, et (2) B-N2 et N1 seul, puis en choisissant la valeur la plus élevée. Le Normalized Luminescence Ratio (NLR) est ensuite calculé en normalisant la luminescence de A-N1 + B-N2 par le bruit de fond.

C. Les fragments de PABPC1 testés pour leur interaction avec M2-1 en N2H sont présentés ici. Le nombre du premier et du dernier acide aminé de chaque fragment est précisé, ainsi que la correspondance avec les différents domaines de la protéine PABPC1.

D. Le test N2H décrit plus haut a été utilisé pour détecter l'interaction de M2-1 avec la PABPC1 entière et 4 fragments de PABPC1 décrits en C. Les résultats sont présentés sous la forme de NLR, dont le calcul est décrit en B.

6.5.4 Localisation de l'interaction entre M2-1 et PABPC1

Nous nous sommes ensuite intéressés à la localisation cellulaire de l'interaction entre M2-1 et PABPC1. Dans des cellules HEp-2 infectées, M2-1 est observée de façon diffuse dans le cytoplasme mais s'accumule dans les IBs viraux, et plus précisément au sein des IBAGs, des sous-structures présentes à l'intérieur des IBs (Rincheval et al. 2017). Le marquage de PABPC1 par immunofluorescence révèle que PABPC1 est aussi retrouvée de façon diffuse dans le cytoplasme et est co-localisée avec M2-1 dans les

IBAGs (Figure 28A). Des expériences de vidéo-microscopie réalisées sur des cellules infectées par RSV M2-1-GFP et exprimant PABPC1-Cherry révèlent une co-localisation de M2-1 et PABPC1 dans les IBAGs en mouvement. Les IBAGs sont en effet des structures dynamiques qui grossissent, fusionnent et régulièrement disparaissent en libérant leur contenu dans le cytosol (Rincheval et al. 2017). Les dynamiques de M2-1 et PABPC1 sont strictement superposées, suggérant une association des deux protéines dans les IBAGs et une libération concomitante des ARNm viraux, de M2-1 et de PABPC1 dans le cytoplasme (Figure 28B).

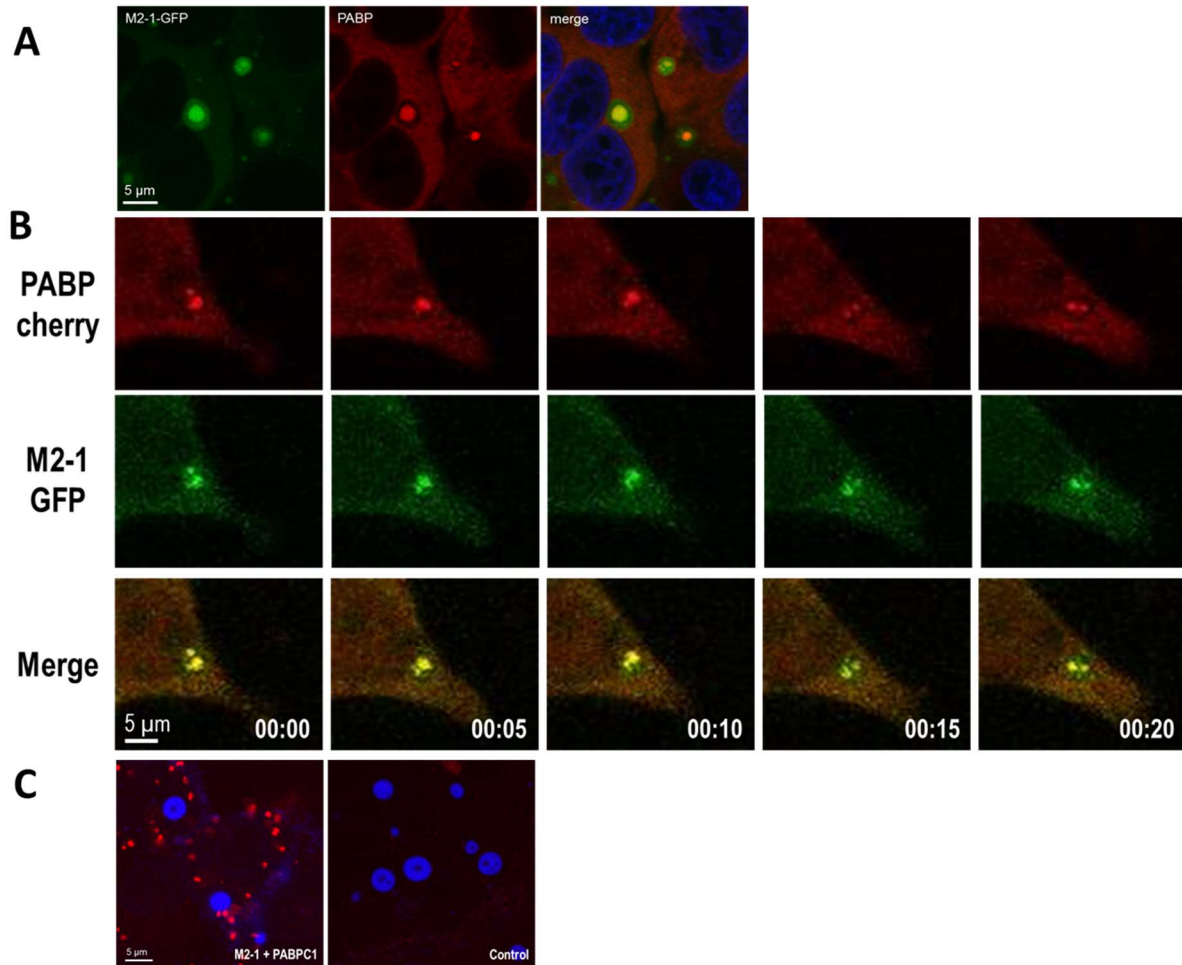


Figure 28 : Localisation de l'interaction entre PABPC1 et M2-1.

A. Des cellules HEp-2 ont été infectées par un RSV exprimant M2-1-GFP (vert) et PABPC1 a été visualisé par immunofluorescence (rouge). L'ADN a été marqué par du Hoechst (bleu). B. Des cellules HEp-2 exprimant transitoirement PABPC1-Cherry ont été infectées par du RSV M2-1-GFP. De l'imagerie en cellules vivantes a été réalisée 24 h après l'infection. C. Des cellules HEp-2 ont été infectées par du RSV P-BFP (bleu) et fixées à 24 h p.i. Les protéines M2-1 et PABPC1 en étroite proximité ont été visualisées par un test PLA (rouge). Dans le contrôle, la PLA a été réalisée sans ajout d'anticorps primaire.

Pour mieux visualiser l'interaction entre PABPC1 et M2-1, nous avons effectué un Proximity Ligation Assay (PLA). Des cellules HEp-2 ont été infectées par un RSV exprimant P-BFP produit par notre

laboratoire (données non publiées) et fixées à 24 h p.i. Les cellules ont ensuite été incubées avec des anticorps dirigés contre PABPC1 et M2-1. Des sondes PLA portant un oligonucléotide ont été ajoutées et se sont liées à leurs anticorps primaires respectifs. Lorsque deux sondes PLA différentes sont à une faible distance l'une de l'autre, leurs oligonucléotides s'hybrident, formant une matrice d'ADN circulaire qui subit ensuite une amplification en cercle roulant grâce à l'addition d'une ADN polymérase. L'ajout d'oligonucléotides complémentaires fluorescents, qui s'hybrident avec la séquence amplifiée, permet la production d'un signal fluorescent ancré au niveau des sondes PLA. Ce signal apparaît comme des points distincts à l'intérieur des cellules. Comme contrôle, ce test PLA a été effectué en l'absence d'anticorps primaires. Des points rouges marquant les complexes de PABPC1 et M2-1 sont observés dans le cytoplasme, ce qui prouve que les deux protéines sont aussi associées à l'extérieur des IBs (Figure 28C). Étonnamment, aucun signal PLA n'a été détecté à l'intérieur des IBs (délimités en bleu par P-BFP). Ceci est probablement dû à une impossibilité pour les anticorps de pénétrer à l'intérieur de ces structures virales, un phénomène qui a souvent été observé dans les expériences de marquage anticorps des IBs du RSV.

6.5.5 Recrutement de PABPC1 aux IBs

PABPC1 et M2-1 étant co-localisés à la fois dans le cytoplasme et dans les IBAGs, nous avons fait l'hypothèse que l'interaction entre ces deux protéines serait impliquée dans le recrutement de PABPC1 aux IBs. Pour explorer cette piste, les protéines N, P, L, M2-1 et un ARN pseudo-viral ont été exprimés transitoirement dans des cellules BSR-T7. Cet ARN pseudo-viral comprend 2 ORF codant pour NS1 et une luciférase et contient les signaux viraux nécessaires à sa transcription et réplication. Dans ces conditions, des corps d'inclusions semblables à ceux présents lors de l'infection se forment, contenant N, P, L et l'ARN pseudo-viral ainsi que des IBAGs renfermant M2-1 (Rincheval et al. 2017). À l'intérieur de ces structures, l'ARN pseudo-viral est pris en charge par les protéines du complexe polymérase viral, et est transcrit et répliqué. Cette activité de transcription et de réplication peut ensuite être mesurée grâce à la luminescence de la luciférase produite. Ici, la protéine P a été fusionnée à BFP afin de visualiser les IBs. La protéine PABPC1-Cherry a aussi été exprimée transitoirement, afin de suivre la localisation de PABPC1 (Figure 29A). En accord avec les observations faites sur cellules infectées, PABPC1 est retrouvée dans le cytoplasme de façon diffuse, et des points de plus forte intensité sont observés à l'intérieur des IBs, dans des zones dépourvues de P qui doivent correspondre aux IBAGs.

En l'absence de M2-1, la transcription virale est presque complètement inhibée, et il n'y a pas de formation d'IBAGs dans les IBs (Rincheval et al. 2017). Dans ces conditions, PABPC1 ne s'accumule pas à l'intérieur des IBs (Figure 29B). Ce changement de localisation de PABPC1 est imputable soit à l'absence de M2-1 soit à l'absence de transcription virale.

En l'absence de l'ARN pseudo-viral, il y n'a pas de transcription virale et pas de formation d'IBAGs (Rincheval et al. 2017). De nouveau, PABPC1 n'est pas concentrée à l'intérieur des IBs (Figure 29C). Ceci suggère que la synthèse d'ARNm viraux est nécessaire à l'accumulation de PABPC1 dans les IBs, et que M2-1 seule n'est pas responsable de ce phénomène.

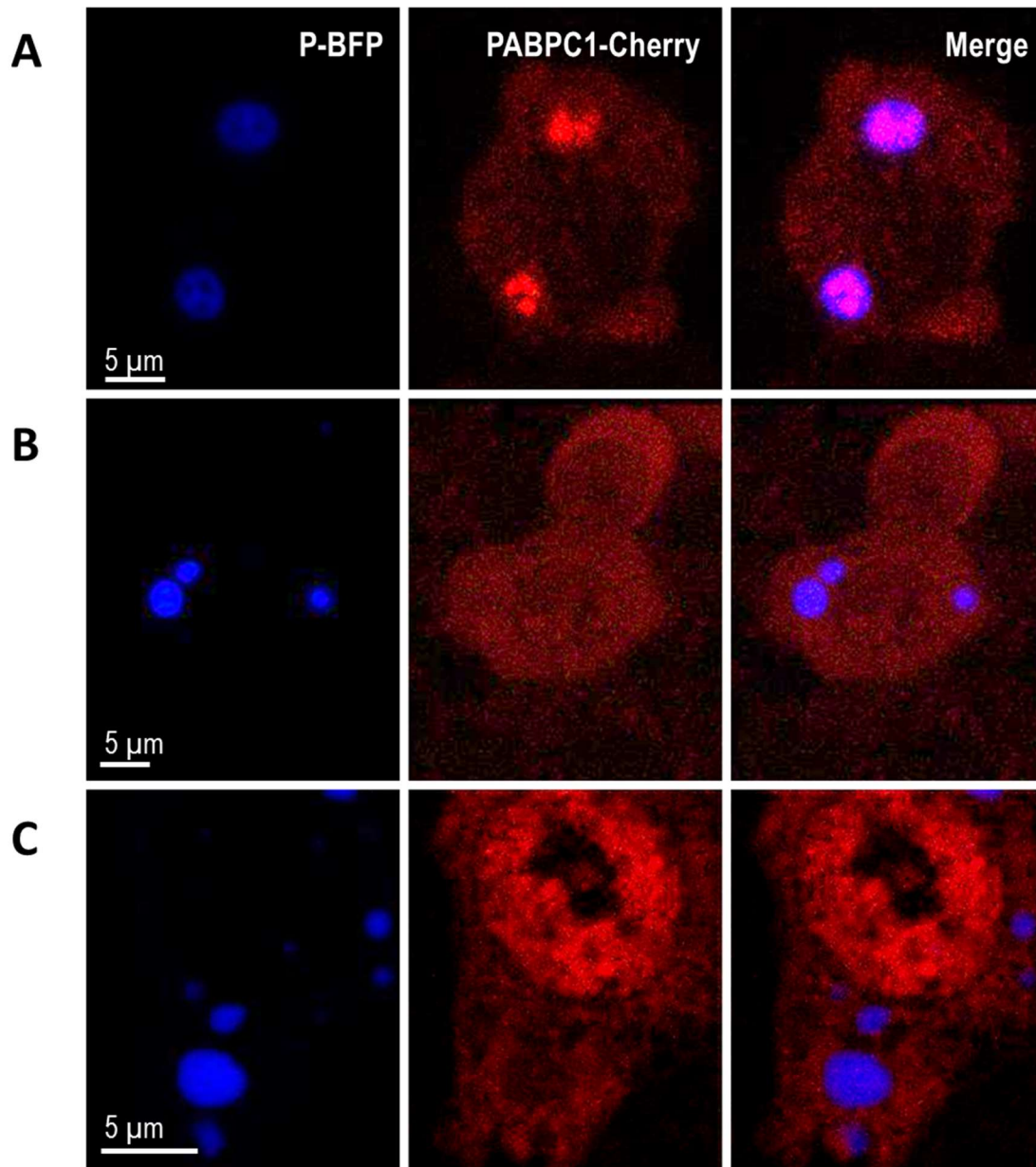


Figure 29 : Recrutement de PABPC1 aux IBAGs.

A. Les protéines N, P-BFP, L, M2-1, PABPC1-Cherry et un ARN minigénome luciférase ont été exprimés transitoirement en BSR-T7 afin de reconstituer les étapes de transcription et traduction virales. La fluorescence de PABPC1-Cherry (rouge) et de P-BFP (bleu) a été observée au microscope confocal. B. L'expérience décrite en A a été effectuée presque à l'identique mais sans expression transitoire de M2-1. C. L'expression décrite en A a été effectuée en présence de M2-1 mais en l'absence de l'ARN minigénome luciférase.

7 DISCUSSION ET PERSPECTIVES

7.1 Recherche de partenaires cellulaires de L et de M2-1

Pour approfondir notre connaissance de l'interactome de L et de M2-1, nous avons choisi de coupler des co-immunoprécipitations de ces deux protéines à une analyse de spectrométrie de masse quantitative. Les interacteurs potentiels trouvés par cette méthode ont ensuite été criblés en fonction de l'impact de leur inhibition sur la multiplication virale, afin d'associer un critère fonctionnel à cette étude d'interactomique. Cette approche avait pour but d'identifier des protéines qui non seulement interagissent avec L ou M2-1, mais aussi dont l'identification pourrait apporter de nouvelles informations sur le cycle viral du RSV.

7.1.1 Partenaires potentiels trouvés grâce à notre crible interactomique

Le crible de l'interactome de L a permis l'identification de 45 partenaires potentiels. Parmi ceux-ci, en plus de L, on retrouve les protéines virales N et P, ce qui indique que la RNP virale entière est sans doute co-immunoprécipitée. Dans les protéines cellulaires, plusieurs protéines chaperonnes sont identifiées, en concordance avec l'étude de l'interactome de L réalisée par Munday et al (Munday et al. 2015). En particulier, la protéine chaperonne DNAJA2 est identifiée comme partenaire potentiel de L dans les deux cribles. Cependant, les protéines Hsp70, Hsp90 et STIP1, dont la co-immunoprécipitation avec L a été trouvée par le crible de Munday et al. et confirmée par immunoblot, ne sont pas sélectionnées par notre crible. Une explication possible est que notre crible étant réalisé en condition d'infection, L est exprimée en très faible quantité par rapport aux conditions d'expression transitoire dans lesquelles ces interactions ont été observées précédemment. Il est donc possible que notre crible n'ait pas la sensibilité nécessaire pour détecter ces 3 interactions.

En ce qui concerne M2-1, notre crible interactomique a identifié 137 partenaires potentiels. Outre M2-1, on retrouve 5 protéines virales : P, dont l'interaction avec M2-1 est déjà connue (Blondot et al. 2012; Mason et al. 2003; Tran et al. 2009), mais aussi N, G, SH et NS2. La capture de N indique que la RNP virale entière pourrait être co-immunoprécipitée avec M2-1. On s'attendrait alors à ce que L soit aussi retrouvée dans notre sélection, mais aucune trace de L n'est détectée dans aucune des IP réalisées. Ce résultat est peut-être dû à une très faible abondance de L dans la RNP virale, comme c'est le cas pour le VSV (Thomas et al. 1985). Il est aussi possible que la RNP virale n'est pas capturée, mais que N est précipitée avec M2-1 par l'intermédiaire de P. La capture de G, SH et NS2 est plus surprenante. A l'heure actuelle, aucune information n'existe sur des interactions éventuelles de ces 3 protéines virales avec M2-1, ou même avec le reste de la RNP virale. On peut faire l'hypothèse qu'ils ont été co-précipités avec M2-1 en raison d'une association au niveau des sites de bourgeonnement. Cependant,

M n'est pas retrouvée parmi notre sélection d'interacteurs potentiels. Ceci est d'autant plus étonnant que M est un interacteur connu de M2-1 : identifiée d'abord par un test dans un système acellulaire, où des protéines M2-1 venant de lysat cellulaire ont été capturées sur de la M immobilisée, cette interaction a été de nouveau observée par co-immunoprécipitation de M *in cellula* (Kipper et al. 2015; Li et al. 2008). Li et al. ayant remarqué que l'association de M2-1 avec M croît au cours de l'infection, on peut supposer que nos co-immunoprécipitations sont réalisés à un temps trop précoce (14 h p.i) pour qu'elle soit visible.

Parmi les protéines cellulaires, on retrouve un très grand nombre de protéines ribosomales (56), indiquant la capture probable de ribosomes entiers. On peut se demander si ce résultat n'est pas un artefact, lié à la très forte abondance des ribosomes dans la cellule. Cependant, cette capture massive de protéine ribosomales n'est pas observée pour notre crible de L, pourtant réalisé dans des conditions presque identiques. De même, le crible de P réalisé par Munday et al. montre la capture de presque 50% de protéines ribosomales, mais pas leur crible de L (Munday et al. 2015). Ceci semble indiquer qu'il ne s'agirait pas d'un artefact, mais que M2-1 et P pourraient être à un moment du cycle viral associées aux ribosomes. En outre, parmi les protéines ribosomales présentes dans notre sélection, on retrouve de nombreuses protéines ribosomales mitochondriales. Aucune information n'existe à ce jour sur une éventuelle localisation mitochondriale de M2-1 au cours du cycle viral, mais ces données indiquent qu'il pourrait être intéressant d'étudier cette question.

Une 2^e portion importante des protéines sélectionnées est associée au métabolisme des ARNm : à leur maturation, stabilité et/ou dégradation. M2-1 étant capable de se lier à l'ARN, il est possible que ce résultat soit dû à des interactions ARN-protéine plutôt que protéine-protéine. Cependant, la présence de RNase A, dont l'efficacité a été testée et qui semble induire une dégradation totale des ARNm, rend cette hypothèse peu probable. Dans ce groupe de protéines liées au métabolisme des ARNm, on retrouve en particulier un certain nombre de ribonucléoprotéines hétérogènes nucléaires (hnRNPs), une famille de protéines impliquées dans la maturation des ARNm, leur export du noyau, leur traduction et leur stabilité (Han, Tang, and Smith 2010). Ce résultat est intéressant, car les hnRNPs sont détournées par de nombreux virus lors des étapes de synthèse, de maturation et de traduction des ARNm viraux, et plusieurs interactions entre hnRNPs et protéines virales ont été identifiées (Castilla and Scolaro 2012). Huit hnRNPs étaient incluses dans les 15 protéines étudiées ultérieurement.

A l'heure actuelle, la seule fonction connue de M2-1 est celle de facteur de transcription viral. Cependant, l'association de M2-1 avec des protéines ribosomales et des protéines du métabolisme des ARNm suggère que M2-1 reste liée aux ARNm viraux à la sortie des IBs, et pourrait jouer un rôle

en aval de la transcription : dans une éventuelle maturation des ARNm viraux, dans leur traduction et/ou dans leur stabilité.

Aucun partenaire cellulaire de M2-1 n'ayant été identifié avant cette thèse, il n'est pas possible de comparer les résultats de cette étude à ceux obtenus par d'autres approches. Un certain nombre de protéines virales étant co-immunoprécipitées avec M2-1, nous nous sommes demandé si nous retrouvions par interactions indirectes des interacteurs connus d'autres protéines virales (voir le chapitre 3.4, page 31), mais aucun n'est identifié dans notre sélection.

La méthode que nous avons choisie pour ce crible, consistant à coupler des co-immunoprécipitations de ces deux protéines à une analyse de spectrométrie de masse quantitative, présente certaines limitations inhérentes. Tout d'abord, certaines protéines (les protéines membranaires par exemple) sont moins facilement capturées dans les expériences de co-immunoprécipitation. D'autres sont difficiles à identifier par analyse de spectrométrie de masse. A cause de ces biais, les résultats obtenus grâce à ce crible ne constituent qu'une image partielle de l'interactome de M2-1 et L.

De plus, d'autres biais peuvent affecter la pertinence des candidats trouvés. Tout d'abord, les approches de protéomique quantitative ont inévitablement tendance à produire des faux-positifs. De plus, les interactions détectées peuvent ne pas refléter les interactions ayant lieu lors de l'infection humaine par le RSV, pour plusieurs raisons. Premièrement, les cellules utilisées proviennent d'une lignée cellulaire immortalisée et non-polarisée, assez éloignée des cellules cibles du RSV, les cellules ciliées de l'épithélium respiratoire (Villenave et al. 2012; Zhang et al. 2002). Toutefois, ce biais ne devrait pas affecter la capture des protéines impliquées dans les étapes de transcription et réplication virale, qui sont à priori bien conservées sur les différents types cellulaires. Deuxièmement, afin de pouvoir réaliser nos IP avec le système hautement spécifique GFP-Trap, nous avons eu recours à des virus recombinants exprimant L-GFP ou M2-1-GFP. La présence d'une étiquette pourrait perturber le fonctionnement de la protéine. Mais L-GFP et M2-1-GFP sont toutes deux fonctionnelles dans les étapes de transcription et de réplication virales, M2-1-GFP avec une efficacité similaire à la protéine sauvage et L-GFP avec une efficacité un peu atténuée (Rincheval et al. 2017). Une modification de l'expression de la protéine chimérique pourrait aussi être observée. Ceci est particulièrement vrai pour le RSV M2-1-GFP, qui possède à la fois un gène codant pour M2-1 et un gène codant pour M2-1-GFP, et pourrait donc montrer des niveaux de M2-1 (étiquetée ou non) deux fois supérieurs au RSV WT. Cependant, ce virus présente une expression de M2-1-GFP faible et un retard d'expression de M2-1 par rapport au RSV WT, ce qui suggère la mise en place d'une régulation limitant l'expression de M2-1. Un autre risque est que ces virus recombinants aient un cycle viral altéré. Dans notre cas, le RSV M2-1-GFP présente une cinétique de titre et d'expression protéique proche du RSV WT, et le RSV L-GFP,

bien que pas encore caractérisé, s'amplifie aisément et peut atteindre des titres similaires à ceux du RSV WT. Enfin, la présence d'une étiquette GFP sur M2-1 ou L peut bloquer certaines interactions, empêchant certains partenaires d'être retrouvés dans notre crible. Ce problème se pose surtout pour L-GFP. En effet, le M2-1-GFP a la capacité de former des hétérotétramères avec la M2-1 sauvage, et donc peut se complexer indirectement avec tous les interacteurs de la M2-1 non-modifiée.

Malgré ces limites, notre approche présente aussi un avantage conséquent sur les autres cribles d'interactome réalisés jusqu'ici sur le RSV, qui devrait améliorer considérablement la pertinence des interactions détectées : il est réalisé sur des cellules infectées, et non *in vitro* ou par expression transitoire d'une ou de quelques protéines virales. Cette particularité permet d'éviter une surexpression de la protéine virale étudiée, qui mène à la formation d'interactions artéfactuelles. De plus, elle permet une cinétique d'expression et de localisation normale, pour toutes les protéines virales. Ceci garantit que la protéine étudiée, M2-1 ou L, se trouve au moment de sa co-immunoprécipitation dans un contexte assez proche de celui de l'infection clinique, et devrait aboutir à une meilleure identification de partenaires pertinents pour l'étude du RSV.

7.1.2 Candidats sélectionnés à l'issue de notre double crible

Parmi tous les partenaires potentiels de M2-1 identifiés, 15 ont été criblés une deuxième fois : leur expression a été inhibée par des siRNA, et l'impact de cette inhibition sur la multiplication virale a été mesuré. Les siRNA dirigés contre 3 d'entre eux ont induit une diminution ou une augmentation significative de la multiplication du RSV. Ce pourcentage peut paraître faible, mais est cohérent avec les autres études d'interactomique du RSV, qui identifient un nombre très variable de partenaires potentiels (entre 19 et 221) mais aboutissent sur des données fonctionnelles pour 0 à 3 des interactions étudiées (Kipper et al. 2015; Munday et al. 2015; Oliveira et al. 2013; Wu et al. 2012). Par exemple, l'étude de l'interactome de M de Kipper et al. identifie 93 interacteurs potentiels de M par un crible *in vitro*, teste 7 de ces candidats par co-immunoprécipitation de M *in cellula* et valide 5 de ces 7 interactions, mais ne parvient à des données fonctionnelles que pour 3 d'entre eux.

L'absence d'effet sur le RSV observée pour 12 des interacteurs potentiels criblés peut avoir plusieurs explications :

- Il peut s'agir de faux-positifs, n'interagissant pas vraiment avec M2-1.
- Leur inhibition peut avoir échoué, l'efficacité de chaque siRNA n'ayant pas été vérifiée individuellement.
- Leur inhibition peut être trop faible pour qu'un effet sur la multiplication virale soit bien visible.

- Les protéines cellulaires détournées par le virus peuvent présenter une certaine redondance, et l'inhibition d'une seule protéine peut donc être compensée par d'autres, et ne pas avoir d'effet visible sur la réplication du virus.

Malgré tous ces écueils, un impact sur l'infection par le RSV a bien été observé pour 3 candidats : ILF2, aussi appelée NF45, PABPN1 et PABPC1.

ILF2 est une protéine cellulaire impliquée dans la régulation de la transcription, la réparation de l'ADN et la maturation des ribosomes et des miRNA (Sakamoto et al. 2009; Ting et al. 1998; Wandrey et al. 2015). Elle forme un complexe avec ILF3 (aussi appelée NF90 ou NFAR) et est responsable de la localisation essentiellement nucléaire de ILF3 : en son absence, ILF3 est cytoplasmique (Harashima, Guettouche, and Barber 2010). De façon intéressante, ILF2 et ILF3 sont impliqués dans un mécanisme de défense antivirale observé lors de l'infection par différents virus (influenza A, VSV, polyomavirus...). Activée par l'infection virale, la kinase PKR phosphoryle ILF3, ce qui induit son détachement de ILF2. ILF3 s'accumule alors dans le cytoplasme, où elle inhibe la traduction (Harashima et al. 2010; Pfeifer et al. 2008). Nous avons observé par des expériences d'immunofluorescence que l'infection par le RSV ne déclenche pas cette relocalisation de ILF3 dans le cytoplasme (données non-montrées). Or une étude montre que la N du RSV interagit avec PKR et l'empêche de phosphoryler eIF2 α (Groskreutz et al. 2010). Ceci suggère que la phosphorylation de ILF3 par PKR est de même empêchée par N, évitant le déclenchement de ce mécanisme antiviral. On peut faire l'hypothèse que l'inhibition de ILF2 par des siRNA rétablit artificiellement ce mécanisme en induisant la relocalisation de ILF3 dans le cytoplasme, ce qui peut expliquer l'inhibition de la multiplication du RSV observée lors de notre crible fonctionnel.

PABPN1, déjà brièvement décrite dans le paragraphe 3.5.1, est impliquée dans la maturation post-transcriptionnelle des ARNm. Elle joue un rôle important en particulier dans la polyadénylation des ARNm au noyau et leur export dans le cytoplasme (Kühn et al. 2009). Elle reste liée à la queue polyA des ARNm jusqu'au début de leur traduction (Sato and Maquat 2009). Il est donc possible qu'elle interagisse avec M2-1 après sa sortie du noyau. En présence de siRNA PABPN1, la multiplication du RSV est fortement stimulée. On peut faire l'hypothèse que l'inhibition de PABPN1 perturbe la maturation et l'export des ARNm cellulaires mais n'a pas d'impact sur la synthèse des ARNm viraux, dont la polyadénylation est assurée par la polymérase L. La compétition entre les ARNm viraux et cellulaires pour la machinerie cellulaire de traduction basculerait alors en faveur des ARNm viraux. On peut aussi supposer que cette perturbation de la maturation et l'export des ARNm cellulaires en l'absence de PABPN1 inhibe l'expression de facteurs antiviraux. Ces deux possibilités pourraient expliquer l'augmentation forte de la multiplication virale observée lorsque PABPN1 est inhibée dans notre crible fonctionnel.

PABPC1 est une protéine impliquée dans la traduction et le métabolisme des ARNm. Elle est détaillée dans le chapitre 3.5. On peut noter que ses deux rôles principaux correspondent aux deux fonctions retrouvées le plus souvent chez les partenaires potentiels de M2-1 identifiés dans notre crible interactomique. De plus, elle est ciblée par de nombreux virus au cours de l'infection. Certains virus, dont la traduction ne dépend pas de PABPC1, la dégrade ou la séquestre afin de provoquer une inhibition de l'expression des protéines cellulaires. Ce ne semble pas être le cas ici, car l'inhibition de PABPC1 diminue la multiplication virale. Certains virus utilisent PABPC1 dans de mécanismes de traduction différents de la traduction cellulaire. Mais les ARNm du RSV présentant les mêmes caractéristiques que les ARNm cellulaires (coiffe, queue polyA et absence d'IRES), ils utilisent sans doute le mécanisme canonique de la traduction cellulaire. Enfin, quelques virus, tels que l'influenza A, interagissent avec PABPC1 afin de recruter préférentiellement la machinerie de traduction au niveau des ARNm viraux. Cette piste nous a paru intéressante, et nous avons donc décidé d'étudier de façon plus approfondie l'interaction potentielle entre PABPC1 et M2-1.

7.2 Etude de l'interaction entre M2-1 et PABPC1

7.2.1 Caractéristiques de cette interaction

L'interaction entre M2-1 et PABPC1 a d'abord été identifiée par un crible interactomique, une méthode qui a tendance à produire de nombreux faux positifs. Elle a donc été vérifiée par deux méthodes différentes. La co-immunoprécipitation de PABPC1 avec M2-1, ainsi que, inversement, la co-immunoprécipitation de M2-1 avec PABPC1, ont été observées par Western blot, à la fois en condition d'infection ou d'expression de M2-1 seule. Un test de complémentation protéique, sur des cellules exprimant transitoirement une M2-1 et une PABPC1 étiquetées, a aussi permis de détecter cette interaction.

Grâce à ce test de complémentation protéique, le domaine MLLE de PABPC1 a été identifié comme le site de la liaison à M2-1. De nombreuses autres protéines interagissent avec PABPC1 au niveau de ce domaine, et chez la plupart un motif d'interaction particulier, appelé PAM2, a été identifié. Une première recherche n'a pas permis de détecter ce motif dans la séquence de M2-1, mais le motif PAM2 présentant une forte variabilité, un examen plus approfondi pourrait être nécessaire. Nous pourrions aussi utiliser notre test de complémentation protéique pour déterminer le site de liaison à PABPC1 sur M2-1 et pour détecter sur les deux protéines les résidus impliqués dans l'interaction.

De plus, toutes nos expériences ayant été effectuées *in cellula*, la question du caractère direct ou indirect de l'interaction reste en suspens. Pour y répondre, des expériences de co-

immunoprécipitation *in vitro* sont en cours de mise au point. En attendant, plusieurs observations nous apportent des éléments de réponse.

Premièrement, M2-1 et PABPC1 étant toutes deux des protéines avec une affinité pour l'ARN, on peut se demander si leur interaction résulte d'une liaison mutuelle à l'ARN. Un argument fort réfute cette hypothèse : le domaine responsable de l'interaction avec M2-1 sur PABPC1 est le domaine MLLE, impliqué dans de nombreuses interactions protéine-protéine, et non pas les domaines RRM, responsables de la liaison à l'ARN. Un deuxième argument est que PABPC1 et M2-1 sont capturées ensemble lors des expériences de co-immunoprécipitation même en présence de RNase. Or l'ajout de RNase devrait suffire à éliminer les interactions ARN-protéines :

- Le test d'efficacité de la RNase en IP suggère que la RNase dégrade complètement les ARNm,
- eIF4E, une autre protéine se liant aux ARNm qui est précipitée avec M2-1 en absence de RNase, n'est pas capturée avec M2-1 en présence de RNase.

Cependant, PABPC1 étant connue pour protéger des RNases une petite portion de la queue polyA à laquelle elle est liée, il est difficile de conclure avec certitude (Bernstein et al. 1989). On observe aussi que la quantité de PABPC1 co-immunoprécipitée avec M2-1 est plus élevée en absence de RNase. Ce résultat suggère qu'en l'absence de RNase, des interactions entre PABPC1 et M2-1 par liaison mutuelle à l'ARN sont observées en plus des interactions protéine-protéine. Il est possible aussi que l'interaction avec l'ARN stabilise l'interaction protéine-protéine.

L'interaction entre M2-1 et PABPC1 peut aussi être formée par l'intermédiaire d'une autre protéine. Il ne peut pas s'agir d'une autre protéine du RSV, cette interaction étant observée même lorsque M2-1 est la seule protéine virale exprimée dans les cellules. En ce qui concerne les protéines cellulaires, PABPC1 a de nombreux interacteurs connus (Figure 16, page 39), mais un seul d'entre eux est repéré dans cette étude comme un partenaire potentiel de M2-1 : hnRNP D, qui est impliquée dans le turnover des ARNm. Il fait d'ailleurs partie de la sélection de candidats testées lors du crible fonctionnel, qui ne montre pas d'effet de son inhibition sur la multiplication du RSV. Ce résultat pourrait suggérer que c'est hnRNP D qui est précipitée avec M2-1 par l'intermédiaire de PABPC1, et non l'inverse. Il est possible aussi que cette absence d'effet observée soit liée aux limitations de notre crible fonctionnel, détaillées dans le paragraphe 7.1.2. En tout cas, le rôle de hnRNP D dans l'interaction PABPC1/M2-1 pourrait mériter un examen plus poussé.

7.2.2 Fonction possible de cette interaction

Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle possible de l'interaction entre PABPC1 et M2-1 dans l'infection par le RSV. L'inhibition de PABPC1 réduit le titre du RSV de 50% à 48 p.i, indiquant que

PABPC1 est bien nécessaire à un déroulement efficace du cycle viral. Il s'agit d'une diminution assez faible de la multiplication virale, qui peut peut-être être expliquée par le fait que les siRNA n'induisent qu'une inhibition partielle de PABPC1 (entre 80 et 90%). L'établissement d'une lignée cellulaire stable dépourvue de PABPC1 a été tenté plusieurs fois, mais a systématiquement échoué, suggérant que l'inhibition totale de PABPC1 est létale pour les cellules.

Aucun effet de PABPC1 sur la transcription virale n'a été observé. Par contre, l'expression des protéines virales M, N et P est inhibée en présence de siRNA dirigés contre PABPC1. Ceci indique que PABPC1 est impliquée dans l'expression des protéines virales. Cependant, l'expression de protéines cellulaires est elle aussi réprimée par les siRNA PABPC1 – un résultat attendu, puisque PABPC1 joue un rôle important dans la traduction des protéines cellulaires – avec une diminution similaire à celle des protéines virales. Cette observation infirme notre hypothèse que l'interaction de PABPC1 avec M2-1, comme l'interaction entre PABPC1 et NS1 chez le virus Influenza A, permettrait le recrutement préférentiel du complexe d'initiation de la traduction au niveau des ARNm viraux. A noter que cette expérience n'ayant été réalisée qu'une fois, il faudrait confirmer ce résultat avant de pouvoir conclure définitivement.

L'étude de la localisation cellulaire de PABPC1 et de M2-1 nous a amené à formuler l'hypothèse que M2-1, en interagissant avec PABPC1, permet le recrutement de celle-ci dans les corps d'inclusion viraux. En effet, M2-1 et PABPC1 co-localisent à la fois au sein des IBAGs et dans le cytoplasme. Cependant, nos travaux semblent indiquer que M2-1 n'est pas capable d'induire l'accumulation de PABPC1 aux IBAGs en l'absence de transcription virale. Ceci signifie probablement que M2-1 n'est pas responsable du recrutement de PABPC1. Il est aussi possible que M2-1 recrute bien PABPC1, mais que ce soit la présence d'ARNm viraux dans les IBAGs qui permet la rétention de PABPC1 dans ces structures.

L'hypothèse que M2-1 joue un rôle dans la stabilité des ARNm viraux peut aussi être envisagée. Plusieurs arguments étayent cette théorie. Premièrement, la capture de nombreuses protéines ribosomales avec M2-1 lors de notre crible interactomique laisse penser que M2-1 reste liée aux ARNm viraux à leur sortie des IBs et lors de leur traduction (Figure 30). Ceci suggère un rôle de M2-1 en aval de la transcription virale. De plus, M2-1 interagit avec PABPC1, qui joue un rôle majeur dans la régulation de la stabilité des ARNm, et compte parmi ses partenaires potentiels un certain nombre de protéines impliquées dans le métabolisme des ARNm. Il serait intéressant de tester cette hypothèse en examinant la demi-vie des ARNm viraux et cellulaires en présence et en absence de PABPC1 par des expériences de pulse-chase. On pourrait ainsi supposer que, de la même façon que la queue polyA des ARNm cellulaires est protégée tout au long de leur vie, d'abord au noyau par PABPN1 puis par PABPC1,

PABPC1 se fixe à la queue polyA des ARNm viraux dès leur synthèse et leur stockage aux IBAGs et les accompagne à leur sortie des IBs, les protégeant de la dégradation. M2-1 pourrait éventuellement renforcer cette interaction, grâce à sa liaison mutuelle avec PABPC1 et avec l'ARN, et promouvoir ainsi la stabilité des ARNm viraux. Alternativement, M2-1 pourrait bloquer la liaison de PABPC1 aux complexes responsables de la dégradation des ARNm.

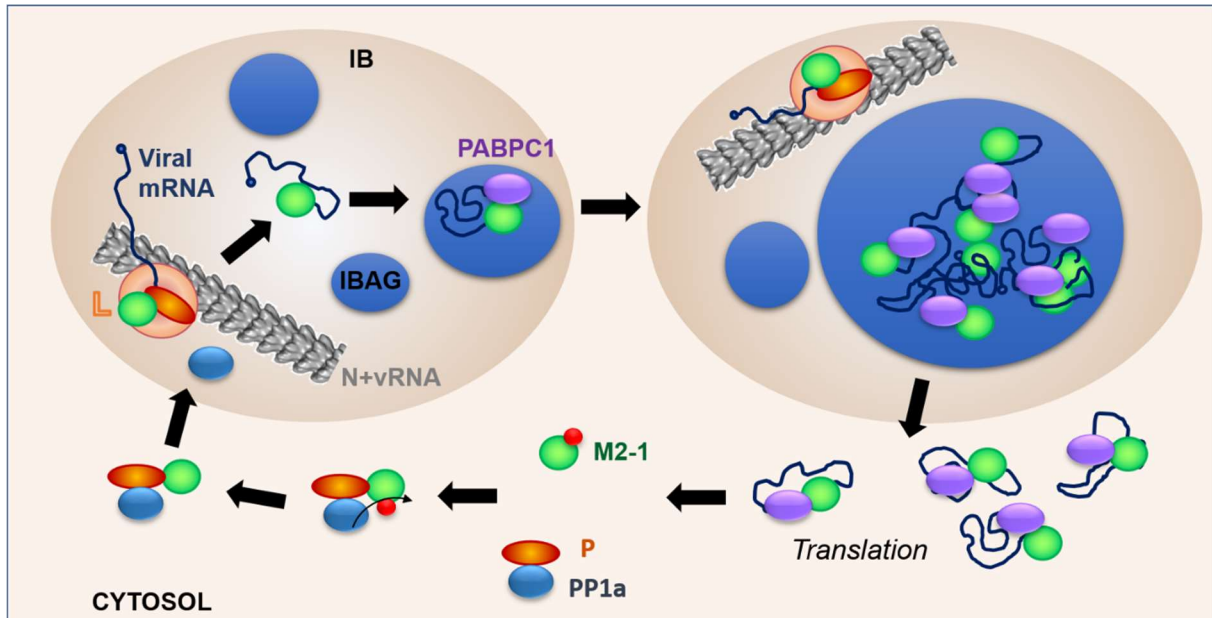


Figure 30 : Modèle de l'évolution de la localisation de M2-1 et de PABPC1 durant l'infection par le RSV. P recrute M2-1 et PP1a aux IBs, et PP1a déphosphoryle M2-1. Ceci permet l'association de M2-1 avec les ARNm viraux synthétisés par le complexe polymérase. L'ARN viral lié à M2-1 est ensuite stocké dans les IBAGs, où PABPC1 s'associe au complexe M2-1/ARN. Les IBAGs grossissent au fur et à mesure de la synthèse de nouveaux ARNm viraux, puis ces ARNm, toujours complexés à M2-1 et PABPC1, sont libérés dans le cytoplasme, où ils sont traduits.

En conclusion, nous n'avons malheureusement pas pu déterminer la fonction de l'interaction entre PABPC1 et M2-1. En effet, cette question était difficile à élucider en raison de l'imperfection des outils à notre disposition. Empêcher l'expression de M2-1 abolit presque complètement la transcription virale et rend le virus non-viable. Inhiber l'expression de PABPC1 perturbe la traduction virale et cellulaire et, dans le cas d'une inhibition totale, provoque la mort des cellules. Il est donc impératif de développer de nouveaux outils, tels que des mutants de M2-1 incapables d'interagir avec PABPC1, ou des peptides bloquant l'interaction entre M2-1 et PABPC1 en entrant en compétition avec l'un de ces deux protéines. Pour pouvoir concevoir ces outils, une étude plus approfondie de l'interaction M2-1/PABPC1 est requise.

8 CONCLUSION

Au cours de cette étude, nous avons choisi d'explorer l'interactome de M2-1 et L par une technique assez classique : la co-immunoprécipitation de ces deux protéines suivie par une analyse de spectrométrie de masse quantitative.

Un des inconvénients de notre approche est la capture de protéines par des interactions indirectes. Les cribles effectués *in vitro*, par exemple grâce à la fixation d'une protéine virale purifiée aux protéines présentes sur un microarray, permettent de n'identifier que des partenaires directs. Ceci aurait pu être intéressant en particulier pour M2-1, afin d'écarter des résultats les interactions indirectes ayant l'ARN comme intermédiaire. Cependant, il est possible que de nombreuses interactions du virus nécessitent un certain contexte cellulaire pour se former, par exemple des phosphorylations ou autres interventions de facteurs protéiques tiers, et donc n'auraient pas été détectées dans ce type de crible *in vitro*.

Nous avons donc préféré travailler sur des cellules. Deux grands types d'approche sont utilisés pour identifier des interactions *in cellula*. La première approche consiste à détecter les interactions de protéines deux-à-deux. Elle comprend des techniques telles que le double-hybride ou les tests de complémentation protéique. Ces méthodes ont pour principe la mise en présence de deux protéines, chacune fusionnée à une étiquette, qui induit en cas d'interaction la reconstitution d'une molécule ou d'un mécanisme permettant l'expression d'un rapporteur. Elles présentent un risque fort de faux-négatifs en raison de la modification des deux protéines impliquées dans l'interaction. Cependant, l'absence d'étape de lyse les rend très appropriées pour la détection d'interactions faibles et transitoires, une caractéristique intéressante pour l'étude d'un interactome viral. En effet les protéines virales sont impliquées dans des interactions transitoires avec de multiples partenaires aux différentes étapes du cycle viral. Malheureusement, à l'exception du double-hybride, ces techniques sont pour l'instant difficiles à mettre en œuvre à grande échelle. Le double-hybride, lui, est peu adapté à l'étude de protéines fonctionnant en oligomères ou en complexes comme M2-1, ainsi que de grosses protéines demandant pour se replier l'intervention de chaperonnes comme L.

Une deuxième approche consiste à identifier le réseau des interacteurs d'une protéine donnée. Ces méthodes comprennent deux étapes majeures : la purification de la protéine d'intérêt avec ses interacteurs, et l'identification de ces interacteurs par spectrométrie de masse. Elles sont en général plus physiologiquement pertinentes, car les protéines proies sont exprimées au niveau endogène et sans étiquette qui bloquerait l'interaction, changerait leur conformation ou altérerait leur fonction. Elles produisent cependant de nombreux faux-négatifs, en raison de l'étape de lyse qui peut détruire

les interactions faibles, ainsi que de nombreux faux-positifs, dus à la mise en présence de protéines de localisations cellulaires différentes lors de la lyse, à l'affinité de certaines protéines pour les billes ou les étiquettes utilisées, ou encore à l'abondance élevée de certaines protéines dans la cellule. Il existe une technique appelée TAP-TAG qui réduit le risque de faux-positifs en enchaînant deux purifications par affinité différentes, mais elle demande l'utilisation d'étiquettes volumineuses qui auraient probablement été mal tolérées par nos protéines virales. Nous nous en sommes donc tenus à une co-immunoprécipitation classique, et l'interaction choisie à l'issue de nos cribles a été validée par d'autres méthodes pour écarter le risque qu'il s'agisse d'un faux-positif.

Il faut noter que de multiples techniques d'étude des interactions protéine-protéine ont été développées ces dernières années, avec des avantages et des limitations variées. Ces autres approches pourront être utilisées à l'avenir, pour examiner le réseau d'interactions entre les protéines du RSV et les protéines cellulaires.

Notre approche a permis l'identification de 45 et 137 partenaires potentiels de L et M2-1 respectivement. L'étude des partenaires potentiels de M2-1 nous a permis de tirer plusieurs conclusions intéressantes. Tout d'abord, l'identification de nombreuses protéines ribosomales et du métabolisme des ARNm suggère une association de M2-1 avec les ARNm viraux après la transcription, renforcée par l'observation de M2-1 dans les IBAGs, avec PABPC1 et les ARNm néo-synthétisés, et par l'association de M2-1 avec PABPC1 dans le cytoplasme. De plus, l'examen des partenaires potentiels de M2-1 fait ressortir un groupe de protéines impliquées dans la maturation et la stabilité des ARNm, suggérant l'intervention de M2-1 non seulement dans la transcription des ARNm viraux mais aussi dans la régulation de leur stabilité et/ou de leur traduction. Cette étude nous a donc permis de formuler de nouvelles hypothèses et d'envisager de nouvelles pistes de recherche pour approfondir notre connaissance du virus respiratoire syncytial et de ses protéines.

9 BIBLIOGRAPHIE

- Ackermann. 2014. "Lamb Model of Respiratory Syncytial Virus-Associated Lung Disease: Insights to Pathogenesis and Novel Treatments." *ILAR Journal* 55(1):4–15.
- Afonina, Stauber, and Pavlakis. 1998. "The Human Poly(A)-Binding Protein 1 Shuttles between the Nucleus and the Cytoplasm." *The Journal of Biological Chemistry* 273(21):13015–21.
- Agoti, Mwihuri, Sande, Onyango, Medley, Cane, and Nokes. 2012. "Genetic Relatedness of Infecting and Reinfesting Respiratory Syncytial Virus Strains Identified in a Birth Cohort from Rural Kenya." *The Journal of Infectious Diseases* 206(10):1532–41.
- Agoti, Otieno, Gitahi, Cane, and Nokes. 2014. "Rapid Spread and Diversification of Respiratory Syncytial Virus Genotype ON1, Kenya." *Emerging Infectious Diseases* 20(6):950–59.
- Ahmadian, Randhawa, and Easton. 2000. "Expression of the ORF-2 Protein of the Human Respiratory Syncytial Virus M2 Gene Is Initiated by a Ribosomal Termination-Dependent Reinitiation Mechanism." *The EMBO Journal* 19(11):2681–89.
- Alvarez, Castelló, Menéndez-Arias, and Carrasco. 2006. "HIV Protease Cleaves Poly(A)-Binding Protein." *The Biochemical Journal* 396(2):219–26.
- Alvarez, Elbashir, Borland, Toudjarska, Hadwiger, John, Roehl, Morskaya, Martinello, Kahn, Van Ranst, Tripp, DeVincenzo, Pandey, et al. 2009. "RNA Interference-Mediated Silencing of the Respiratory Syncytial Virus Nucleocapsid Defines a Potent Antiviral Strategy." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(9):3952–62.
- Andabaka, Nickerson, Rojas-Reyes, Rueda, Bacic Vrca, and Barsic. 2013. "Monoclonal Antibody for Reducing the Risk of Respiratory Syncytial Virus Infection in Children." *Cochrane Database of Systematic Reviews* (4):CD006602.
- Aragón, de la Luna, Novoa, Carrasco, Ortín, and Nieto. 2000. "Eukaryotic Translation Initiation Factor 4GI Is a Cellular Target for NS1 Protein, a Translational Activator of Influenza Virus." *Molecular and Cellular Biology* 20(17):6259–68.
- Asenjo, Calvo, and Villanueva. 2006. "Phosphorylation of Human Respiratory Syncytial Virus P Protein at Threonine 108 Controls Its Interaction with the M2-1 Protein in the Viral RNA Polymerase Complex." *The Journal of General Virology* 87(Pt 12):3637–42.
- Asenjo, González-Armas, and Villanueva. 2008. "Phosphorylation of Human Respiratory Syncytial Virus P Protein at Serine 54 Regulates Viral Uncoating." *Virology* 380(1):26–33.
- Asenjo, Rodríguez, and Villanueva. 2005. "Determination of Phosphorylated Residues from Human Respiratory Syncytial Virus P Protein That Are Dynamically Dephosphorylated by Cellular Phosphatases: A Possible Role for Serine 54." *Journal of General Virology* 86(4):1109–20.
- Asenjo and Villanueva. 2015. "Phosphorylation of the Human Respiratory Syncytial Virus P Protein Mediates M2-2 Regulation of Viral RNA Synthesis, a Process That Involves Two P Proteins." *Virus Research* 211:117–25.
- Atreya, Peeples, and Collins. 1998. "The NS1 Protein of Human Respiratory Syncytial Virus Is a Potent Inhibitor of Minigenome Transcription and RNA Replication." *Journal of Virology* 72(2):1452–61.
- Bakker, Duquerroy, Galloux, Loney, Conner, Eléouët, Rey, and Bhella. 2013. "The Respiratory Syncytial Virus Nucleoprotein-RNA Complex Forms a Left-Handed Helical Nucleocapsid." *The Journal of General Virology* 94(Pt 8):1734–38.
- Batonick and Wertz. 2011. "Requirements for Human Respiratory Syncytial Virus Glycoproteins in Assembly and Egress from Infected Cells." *Advances in Virology* 2011.
- Baviskar, Hotard, Moore, and Oomens. 2013. "The Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Targets to the Perimeter of Inclusion Bodies and Facilitates Filament Formation by a Cytoplasmic Tail-Dependent Mechanism." *Journal of Virology* 87(19):10730–41.
- Behera, Matsuse, Kumar, Kong, Lockey, and Mohapatra. 2001. "Blocking Intercellular Adhesion Molecule-1 on Human Epithelial Cells Decreases Respiratory Syncytial Virus Infection." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280(1):188–95.
- Bennett, Garofalo, Cron, Hosakote, Atmar, Macias, and Piedra. 2007. "Immunopathogenesis of

- Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis." *The Journal of Infectious Diseases* 195(10):1532–40.
- Berlanga, Baass, and Sonenberg. 2006. "Regulation of Poly(A) Binding Protein Function in Translation: Characterization of the Paip2 Homolog, Paip2B." *RNA (New York, N.Y.)* 12(8):1556–68.
- Bermingham and Collins. 1999. "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* 96(20):11259–64.
- Bernstein, Peltz, and Ross. 1989. "The Poly(A)-Poly(A)-Binding Protein Complex Is a Major Determinant of mRNA Stability in Vitro." *Molecular and Cellular Biology* 9(2):659–70.
- Bhattacharjee and Bag. 2012. "Depletion of Nuclear Poly(A) Binding Protein PABPN1 Produces a Compensatory Response by Cytoplasmic PABP4 and PABP5 in Cultured Human Cells." *PloS One* 7(12):e53036.
- Bi and Goss. 2000. "Wheat Germ Poly(A)-Binding Protein Increases the ATPase and the RNA Helicase Activity of Translation Initiation Factors EIF4A, EIF4B, and EIF-Iso4F." *The Journal of Biological Chemistry* 275(23):17740–46.
- Bitko, Shulyayeva, Mazumder, Musiyenko, Ramaswamy, Look, and Barik. 2007. "Nonstructural Proteins of Respiratory Syncytial Virus Suppress Premature Apoptosis by an NF-KappaB-Dependent, Interferon-Independent Mechanism and Facilitate Virus Growth." *Journal of Virology* 81(4):1786–95.
- Blanco, Sargent, Boucher, Howell, Ross, and Affara. 2001. "A Novel Poly(A)-Binding Protein Gene (PABPC5) Maps to an X-Specific Subinterval in the Xq21.3/Yp11.2 Homology Block of the Human Sex Chromosomes." *Genomics* 74(1):1–11.
- Blondot, Dubosclard, Fix, Lassoued, Aumont-Nicaise, Bontems, Eléouët, and Sizun. 2012. "Structure and Functional Analysis of the RNA- and Viral Phosphoprotein-Binding Domain of Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein." *PLoS Pathogens* 8(5):e1002734.
- Bloom-Feshbach, Alonso, Charu, Tamerius, Simonsen, Miller, and Viboud. 2013. "Latitudinal Variations in Seasonal Activity of Influenza and Respiratory Syncytial Virus (RSV): A Global Comparative Review" edited by B. J. Cowling. *PLoS ONE* 8(2):e54445.
- Bolt, Pedersen, and Birkeslund. 2000. "Cleavage of the Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Is Required for Its Surface Expression: Role of Furin." *Virus Research* 68(1):25–33.
- Bradrick, Dobrikova, Kaiser, Shveygert, and Gromeier. 2007. "Poly(A)-Binding Protein Is Differentially Required for Translation Mediated by Viral Internal Ribosome Entry Sites." *RNA (New York, N.Y.)* 13(9):1582–93.
- Brock, Goldenring, Crowe, and Jr. 2003. "Apical Recycling Systems Regulate Directional Budding of Respiratory Syncytial Virus from Polarized Epithelial Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(25):15143–48.
- Brown, Rixon, Steel, McDonald, Pitt, Graham, and Sugrue. 2005. "Evidence for an Association between Heat Shock Protein 70 and the Respiratory Syncytial Virus Polymerase Complex within Lipid-Raft Membranes during Virus Infection." *Virology* 338(1):69–80.
- Brown and Sachs. 1998. "Poly(A) Tail Length Control in *Saccharomyces Cerevisiae* Occurs by Message-Specific Deadenylation." *Molecular and Cellular Biology* 18(11):6548–59.
- Brune, Munchel, Fischer, Podtelejnikov, and Weis. 2005. "Yeast Poly(A)-Binding Protein Pab1 Shuttles between the Nucleus and the Cytoplasm and Functions in mRNA Export." *RNA (New York, N.Y.)* 11(4):517–31.
- Buckingham, Bush, and Devincenzo. 2000. "Nasal Quantity of Respiratory Syncytial Virus Correlates with Disease Severity in Hospitalized Infants." *The Pediatric Infectious Disease Journal* 19(2):113–17.
- Bukreyev, Yang, and Collins. 2012. "The Secreted G Protein of Human Respiratory Syncytial Virus Antagonizes Antibody-Mediated Restriction of Replication Involving Macrophages and Complement." *Journal of Virology* 86(19):10880–84.
- Bukreyev, Yang, Fricke, Cheng, Ward, Murphy, and Collins. 2008. "The Secreted Form of Respiratory Syncytial Virus G Glycoprotein Helps the Virus Evade Antibody-Mediated Restriction of Replication by Acting as an Antigen Decoy and through Effects on Fc Receptor-Bearing

- Leukocytes." *Journal of Virology* 82(24):12191–204.
- Burd, Matunis, and Dreyfuss. 1991. "The Multiple RNA-Binding Domains of the mRNA Poly(A)-Binding Protein Have Different RNA-Binding Activities." *Molecular and Cellular Biology* 11(7):3419–24.
- Burgui, Aragón, Ortín, and Nieto. 2003. "PABP1 and EIF4GI Associate with Influenza Virus NS1 Protein in Viral mRNA Translation Initiation Complexes." *Journal of General Virology* 84(12):3263–74.
- Bushell, Wood, Carpenter, Pain, Morley, and Clemens. 2001. "Disruption of the Interaction of Mammalian Protein Synthesis Eukaryotic Initiation Factor 4B with the Poly(A)-Binding Protein by Caspase- and Viral Protease-Mediated Cleavages." *The Journal of Biological Chemistry* 276(26):23922–28.
- Cane, Matthews, and Pringle. 1994. "Analysis of Respiratory Syncytial Virus Strain Variation in Successive Epidemics in One City." *Journal of Clinical Microbiology* 32(1):1–4.
- Carromeu, Simabuco, Tamura, Farinha Arcieri, and Ventura. 2007. "Intracellular Localization of Human Respiratory Syncytial Virus L Protein." *Archives of Virology* 152(12):2259–63.
- Cartee, Megaw, Oomens, and Wertz. 2003. "Identification of a Single Amino Acid Change in the Human Respiratory Syncytial Virus L Protein That Affects Transcriptional Termination." *Journal of Virology* 77(13):7352–60.
- Carter, Dent, Atkins, Foster, Verow, Gorny, Harris, Hiscox, Ranson, Griffin, and Barr. 2010. "Direct Visualization of the Small Hydrophobic Protein of Human Respiratory Syncytial Virus Reveals the Structural Basis for Membrane Permeability." *FEBS Letters* 584(13):2786–90.
- Castagné, Barbier, Bernard, Rezaei, Huet, Henry, Da Costa, and Eléouët. 2004. "Biochemical Characterization of the Respiratory Syncytial Virus P-P and P-N Protein Complexes and Localization of the P Protein Oligomerization Domain." *The Journal of General Virology* 85(Pt 6):1643–53.
- Castilla and Scolaro. 2012. "Involvement of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins in Viral Multiplication." *Future Virology* 7(6):575–91.
- Chang, Yamashita, Chen, Yamashita, Zhu, Durdan, Kahvejian, Sonenberg, and Shyu. 2004. "UNR, a New Partner of Poly(A)-Binding Protein, Plays a Key Role in Translationally Coupled mRNA Turnover Mediated by the c-Fos Major Coding-Region Determinant." *Genes & Development* 18(16):2010–23.
- Chanock and Finberg. 1957. "Recovery from Infants with Respiratory Illness of a Virus Related to Chimpanzee Coryza Agent (CCA). II. Epidemiologic Aspects of Infection in Infants and Young Children." *American Journal of Hygiene* 66(3):291–300.
- Chatterjee, Luthra, Esaulova, Agapov, Yen, Borek, Edwards, Mittal, Jordan, Ramanan, Moore, Pappu, Holtzman, Artyomov, et al. 2017. "Structural Basis for Human Respiratory Syncytial Virus NS1-Mediated Modulation of Host Responses." *Nature Microbiology* 2:17101.
- Chi, Chang, Tsai, Huang, Shao, Chiu, Chang, and Huang. 2011. "Epidemiological Study of Hospitalization Associated with Respiratory Syncytial Virus Infection in Taiwanese Children between 2004 and 2007." *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi* 110(6):388–96.
- Chirkova, Lin, Oomens, Gaston, Boyoglu-Barnum, Meng, Stobart, Cotton, Hartert, Moore, Ziady, and Anderson. 2015. "CX3CR1 Is an Important Surface Molecule for Respiratory Syncytial Virus Infection in Human Airway Epithelial Cells." *The Journal of General Virology* 96(9):2543–56.
- Chiu, Lejeune, Ranganathan, and Maquat. 2004. "The Pioneer Translation Initiation Complex Is Functionally Distinct from but Structurally Overlaps with the Steady-State Translation Initiation Complex." *Genes & Development* 18(7):745–54.
- Ciosk, DePalma, and Priess. 2004. "ATX-2, the C. Elegans Ortholog of Ataxin 2, Functions in Translational Regulation in the Germline." *Development (Cambridge, England)* 131(19):4831–41.
- Coler, Baldwin, Shaverdian, Bertholet, Reed, Raman, Lu, DeVos, Hancock, Katz, Vedvick, Duthie, Clegg, Van Hoeven, et al. 2010. "A Synthetic Adjuvant to Enhance and Expand Immune Responses to Influenza Vaccines" edited by R. E. Means. *PLoS ONE* 5(10):e13677.
- Collier, Gorgoni, Loveridge, Cooke, and Gray. 2005. "The DAZL Family Proteins Are PABP-Binding Proteins That Regulate Translation in Germ Cells." *The EMBO Journal* 24(14):2656–66.
- Collins, Fearn, and Graham. 2013. "Respiratory Syncytial Virus: Virology, Reverse Genetics, and

- Pathogenesis of Disease." *Current Topics in Microbiology and Immunology* 372:3–38.
- Collins and Melero. 2011. "Progress in Understanding and Controlling Respiratory Syncytial Virus: Still Crazy after All These Years." *Virus Research* 162(1–2):80–99.
- Collins, Mink, and Stec. 1991. "Rescue of Synthetic Analogs of Respiratory Syncytial Virus Genomic RNA and Effect of Truncations and Mutations on the Expression of a Foreign Reporter Gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(21):9663–67.
- Cowton and Fearn. 2005. "Evidence That the Respiratory Syncytial Virus Polymerase Is Recruited to Nucleotides 1 to 11 at the 3' End of the Nucleocapsid and Can Scan to Access Internal Signals." *Journal of Virology* 79(17):11311–22.
- Craig, Haghighat, Yu, and Sonenberg. 1998. "Interaction of Polyadenylate-Binding Protein with the EIF4G Homologue PAIP Enhances Translation." *Nature* 392(6675):520–23.
- Cui, Zhu, Qian, Deng, Zhao, Sun, and Wang. 2013. "Genetic Variation in Attachment Glycoprotein Genes of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroups A and B in Children in Recent Five Consecutive Years" edited by S. J. Turner. *PLoS ONE* 8(9):e75020.
- Day, Branigan, Liu, Gutshall, Luo, Melero, Sarisky, and Del Vecchio. 2006. "Contribution of Cysteine Residues in the Extracellular Domain of the F Protein of Human Respiratory Syncytial Virus to Its Function." *Virology Journal* 3:34.
- Deo, Bonanno, Sonenberg, and Burley. 1999. "Recognition of Polyadenylate RNA by the Poly(A)-Binding Protein." *Cell* 98(6):835–45.
- Detalle, Stohr, Palomo, Piedra, Gilbert, Mas, Millar, Power, Stortelers, Allosery, Melero, and Depla. 2016. "Generation and Characterization of ALX-0171, a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60(1):6–13.
- Deval, Hong, Wang, Taylor, Smith, Fung, Stevens, Liu, Jin, Dyatkina, Prhavc, Stoycheva, Serebryany, Liu, et al. 2015. "Molecular Basis for the Selective Inhibition of Respiratory Syncytial Virus RNA Polymerase by 2'-Fluoro-4'-Chloromethyl-Cytidine Triphosphate" edited by S. Whelan. *PLOS Pathogens* 11(6):e1004995.
- DeVincenzo, El Saleeby, and Bush. 2005. "Respiratory Syncytial Virus Load Predicts Disease Severity in Previously Healthy Infants." *The Journal of Infectious Diseases* 191(11):1861–68.
- DeVincenzo, Lambkin-Williams, Wilkinson, Cehelsky, Nochur, Walsh, Meyers, Gollob, and Vaishnav. 2010. "A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of an RNAi-Based Therapy Directed against Respiratory Syncytial Virus." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(19):8800–8805.
- DeVincenzo, McClure, Symons, Fathi, Westland, Chanda, Lambkin-Williams, Smith, Zhang, Beigelman, Blatt, and Fry. 2015. "Activity of Oral ALS-008176 in a Respiratory Syncytial Virus Challenge Study." *New England Journal of Medicine* 373(21):2048–58.
- DeVincenzo, Whitley, Mackman, Scaglioni-Weinlich, Harrison, Farrell, McBride, Lambkin-Williams, Jordan, Xin, Ramanathan, O'Riordan, Lewis, Li, et al. 2014. "Oral GS-5806 Activity in a Respiratory Syncytial Virus Challenge Study." *New England Journal of Medicine* 371(8):711–22.
- Douglas, Panis, Ho, Lin, Krawczyk, Grant, Cai, Swaminathan, Chen, and Cihlar. 2005. "Small Molecules VP-14637 and JNJ-2408068 Inhibit Respiratory Syncytial Virus Fusion by Similar Mechanisms." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(6):2460–66.
- Dunn, Hammell, Hodge, and Cole. 2005. "Yeast Poly(A)-Binding Protein, Pab1, and PAN, a Poly(A) Nuclease Complex Recruited by Pab1, Connect mRNA Biogenesis to Export." *Genes & Development* 19(1):90–103.
- Duvvuri, Granados, Rosenfeld, Bahl, Eshaghi, and Gubbay. 2015. "Genetic Diversity and Evolutionary Insights of Respiratory Syncytial Virus A ON1 Genotype: Global and Local Transmission Dynamics." *Scientific Reports* 5(1):14268.
- Eliseeva, Lyabin, and Ovchinnikov. 2013. "Poly(A)-Binding Proteins: Structure, Domain Organization, and Activity Regulation." *Biochemistry (Moscow)* 78(13):1377–91.
- Elliott, Lynch, Suessmuth, Qian, Boyd, Burrows, Buick, Stevenson, Touzelet, Gadina, Power, and

- Johnston. 2007. "Respiratory Syncytial Virus NS1 Protein Degrades STAT2 by Using the Elongin-Cullin E3 Ligase." *Journal of Virology* 81(7):3428–36.
- Ezzeddine, Chang, Zhu, Yamashita, Chen, Zhong, Yamashita, Zheng, and Shyu. 2007. "Human TOB, an Antiproliferative Transcription Factor, Is a Poly(A)-Binding Protein-Dependent Positive Regulator of Cytoplasmic mRNA Deadenylation." *Molecular and Cellular Biology* 27(22):7791–7801.
- Fabian, Mathonnet, Sundermeier, Mathys, Zipprich, Svitkin, Rivas, Jinek, Wohlschlegel, Doudna, Chen, Shyu, Yates, Hannon, et al. 2009. "Mammalian MiRNA RISC Recruits CAF1 and PABP to Affect PABP-Dependent Deadenylation." *Molecular Cell* 35(6):868–80.
- Falsey, Hennessey, Formica, Cox, and Walsh. 2005. "Respiratory Syncytial Virus Infection in Elderly and High-Risk Adults." *New England Journal of Medicine* 352(17):1749–59.
- Fearns and Collins. 1999. "Role of the M2-1 Transcription Antitermination Protein of Respiratory Syncytial Virus in Sequential Transcription." *Journal of Virology* 73:5852–64.
- Feldman, Audet, and Beeler. 2000. "The Fusion Glycoprotein of Human Respiratory Syncytial Virus Facilitates Virus Attachment and Infectivity via an Interaction with Cellular Heparan Sulfate." *Journal of Virology* 74(14):6442–47.
- Feldman, Hendry, and Beeler. 1999. "Identification of a Linear Heparin Binding Domain for Human Respiratory Syncytial Virus Attachment Glycoprotein G." *Journal of Virology* 73(8):6610–17.
- Fix, Galloux, Blondot, and Eléouët. 2011. "The Insertion of Fluorescent Proteins in a Variable Region of Respiratory Syncytial Virus L Polymerase Results in Fluorescent and Functional Enzymes but with Reduced Activities." *The Open Virology Journal* 5:103–8.
- Flynn, Durr, Swoyer, Cejas, Horton, Galli, Cosmi, Espeseth, Bett, and Zhang. 2016. "Stability Characterization of a Vaccine Antigen Based on the Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein" edited by N. J. Mantis. *PLOS ONE* 11(10):e0164789.
- Fricke, Koo, Brown, and Collins. 2013. "P38 and OGT Sequestration into Viral Inclusion Bodies in Cells Infected with Human Respiratory Syncytial Virus Suppresses MK2 Activities and Stress Granule Assembly." *Journal of Virology* 87(3):1333–47.
- Fukaya and Tomari. 2011. "PABP Is Not Essential for MicroRNA-Mediated Translational Repression and Deadenylation *in Vitro*." *The EMBO Journal* 30(24):4998–5009.
- Gallie. 1991. "The Cap and Poly(A) Tail Function Synergistically to Regulate mRNA Translational Efficiency." *Genes & Development* 5(11):2108–16.
- Galloux, Gabiane, Sourimant, Richard, England, Moudjou, Aumont-Nicaise, Fix, Rameix-Welti, and Eléouët. 2015. "Identification and Characterization of the Binding Site of the Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein to RNA-Free Nucleoprotein." *Journal of Virology* 89(7):3484–96.
- Galloux, Tarus, Blazeovic, Fix, Duquerroy, and Eléouët. 2012. "Characterization of a Viral Phosphoprotein Binding Site on the Surface of the Respiratory Syncytial Nucleoprotein." *Journal of Virology* 86(16):8375–87.
- Gan, Tan, Lin, Yu, Wang, Tan, Vararattanavech, Yeo, Soon, Soong, Pervushin, and Torres. 2012. "The Small Hydrophobic Protein of the Human Respiratory Syncytial Virus Forms Pentameric Ion Channels." *The Journal of Biological Chemistry* 287(29):24671–89.
- Garcia, Garcia-Barreno, Vivo, and Melero. 1993. "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* 195(1):243–47.
- García, Martín, Dopazo, Arbiza, Frabasil, Russi, Hortal, Perez-Breña, Martínez, and García-Barreno. 1994. "Evolutionary Pattern of Human Respiratory Syncytial Virus (Subgroup A): Cocirculating Lineages and Correlation of Genetic and Antigenic Changes in the G Glycoprotein." *Journal of Virology* 68(9):5448–59.
- Geller, Andino, and Frydman. 2013. "Hsp90 Inhibitors Exhibit Resistance-Free Antiviral Activity against Respiratory Syncytial Virus." *PloS One* 8(2):e56762.
- Ghildyal, Baulch-Brown, Mills, and Meanger. 2003. "The Matrix Protein of Human Respiratory Syncytial Virus Localises to the Nucleus of Infected Cells and Inhibits Transcription." *Archives of Virology* 148(7):1419–29.
- Ghildyal, Ho, Dias, Soegiyono, Bardin, Tran, Teng, and Jans. 2009. "The Respiratory Syncytial Virus

- Matrix Protein Possesses a Crm1-Mediated Nuclear Export Mechanism." *Journal of Virology* 83(11):5353–62.
- Ghildyal, Reena, Ho, Wagstaff, Dias, Barton, Jans, Bardin, and Jans. 2005. "Nuclear Import of the Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Is Mediated By Importin B1 Independent of Importin α ⁺." *Biochemistry* 44(38):12887–95.
- Ghildyal, R., Li, Peroulis, Shields, Bardin, Teng, Collins, Meanger, and Mills. 2005. "Interaction between the Respiratory Syncytial Virus G Glycoprotein Cytoplasmic Domain and the Matrix Protein." *Journal of General Virology* 86(7):1879–84.
- Ghildyal, Mills, Murray, Vardaxis, and Meanger. 2002. "Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Associates with Nucleocapsids in Infected Cells." *J Gen Virol* 83(Pt 4):753–57.
- Gilca, De Serres, Tremblay, Vachon, Leblanc, Bergeron, Dery, and Boivin. 2006. "Distribution and Clinical Impact of Human Respiratory Syncytial Virus Genotypes in Hospitalized Children over 2 Winter Seasons." *The Journal of Infectious Diseases* 193(1):54–58.
- Glenn, Fries, Thomas, Smith, Kpamegan, Lu, Flyer, Jani, Hickman, and Piedra. 2016. "A Randomized, Blinded, Controlled, Dose-Ranging Study of a Respiratory Syncytial Virus Recombinant Fusion (F) Nanoparticle Vaccine in Healthy Women of Childbearing Age." *The Journal of Infectious Diseases* 213(3):411–22.
- Glezen, Taber, Frank, and Kasel. 1986. "Risk of Primary Infection and Reinfection with Respiratory Syncytial Virus." *American Journal of Diseases of Children (1960)* 140(6):543–46.
- Gonzalez-Reyes, Ruiz-Arguello, Garcia-Barreno, Calder, Lopez, Albar, Skehel, Wiley, and Melero. 2001. "Cleavage of the Human Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein at Two Distinct Sites Is Required for Activation of Membrane Fusion." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(17):9859–64.
- Gottlieb, Zamora, Hodges, Musk, Sommerwerk, Dilling, Arcasoy, DeVincenzo, Karsten, Shah, Bettencourt, Cehelsky, Nochur, Gollob, et al. 2016. "ALN-RSV01 for Prevention of Bronchiolitis Obliterans Syndrome after Respiratory Syncytial Virus Infection in Lung Transplant Recipients." *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 35(2):213–21.
- Gould and Easton. 2005. "Coupled Translation of the Respiratory Syncytial Virus M2 Open Reading Frames Requires Upstream Sequences." *The Journal of Biological Chemistry* 280(23):21972–80.
- Gower, Pastey, Peebles, Collins, McCurdy, Hart, Guth, Johnson, and Graham. 2005. "RhoA Signaling Is Required for Respiratory Syncytial Virus-Induced Syncytium Formation and Filamentous Virion Morphology." *Journal of Virology* 79(9):5326–36.
- Graham, Henderson, Tang, Lu, Neuzil, and Colley. 1993. "Priming Immunization Determines T Helper Cytokine mRNA Expression Patterns in Lungs of Mice Challenged with Respiratory Syncytial Virus." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 151(4):2032–40.
- Gray, Collier, Dickson, and Wickens. 2000. "Multiple Portions of Poly(A)-Binding Protein Stimulate Translation in Vivo." *The EMBO Journal* 19(17):4723–33.
- Groskreutz, Babor, Monick, Varga, and Hunninghake. 2010. "Respiratory Syncytial Virus Limits Alpha Subunit of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 (EIF2alpha) Phosphorylation to Maintain Translation and Viral Replication." *The Journal of Biological Chemistry* 285(31):24023–31.
- Gruber and Levine. 1983. "Respiratory Syncytial Virus Polypeptides. III. The Envelope-Associated Proteins." *Journal of General Virology* 64(4):825–32.
- Gubbay, Curran, and Kolakofsky. 2001. "Sendai Virus Genome Synthesis and Assembly Are Coupled: A Possible Mechanism to Promote Viral RNA Polymerase Processivity." *The Journal of General Virology* 82(Pt 12):2895–2903.
- von Der Haar, Ball, and McCarthy. 2000. "Stabilization of Eukaryotic Initiation Factor 4E Binding to the mRNA 5'-Cap by Domains of EIF4G." *The Journal of Biological Chemistry* 275(39):30551–55.
- Hall and Douglas. 1981. "Modes of Transmission of Respiratory Syncytial Virus." *The Journal of Pediatrics* 99(1):100–103.
- Hall, Long, and Schnabel. 2001. "Respiratory Syncytial Virus Infections in Previously Healthy Working Adults." *Clinical Infectious Diseases* 33(6):792–96.
- Hall, Walsh, Schnabel, Long, McConnochie, Hildreth, and Anderson. 1990. "Occurrence of Groups A

- and B of Respiratory Syncytial Virus over 15 Years: Associated Epidemiologic and Clinical Characteristics in Hospitalized and Ambulatory Children." *The Journal of Infectious Diseases* 162(6):1283–90.
- Hall, Weinberg, Blumkin, Edwards, Staat, Schultz, Poehling, Szilagyi, Griffin, Williams, Zhu, Grijalva, Prill, and Iwane. 2013. "Respiratory Syncytial Virus-Associated Hospitalizations Among Children Less Than 24 Months of Age." *PEDIATRICS* 132(2):e341–48.
- Han, Tang, and Smith. 2010. "Functional Diversity of the HnRNPs: Past, Present and Perspectives." *The Biochemical Journal* 430(3):379–92.
- Harashima, Guettouche, and Barber. 2010. "Phosphorylation of the NFAR Proteins by the DsRNA-Dependent Protein Kinase PKR Constitutes a Novel Mechanism of Translational Regulation and Cellular Defense." *Genes & Development* 24(23):2640–53.
- Harb, Becker, Vitour, Baron, Vende, Brown, Bolte, Arold, and Poncet. 2008. "Nuclear Localization of Cytoplasmic Poly(A)-Binding Protein upon Rotavirus Infection Involves the Interaction of NSP3 with EIF4G and RoXaN." *Journal of Virology* 82(22):11283–93.
- Hasgall, Hoogewijs, Faza, Panse, Wenger, and Camenisch. 2011. "The Putative RNA Helicase HELZ Promotes Cell Proliferation, Translation Initiation and Ribosomal Protein S6 Phosphorylation." *PloS One* 6(7):e22107.
- Henderson, Collier, Clyde Jr., and Denny. 1979. "Respiratory-Syncytial-Virus Infections, Reinfections and Immunity. A Prospective, Longitudinal Study in Young Children." *N Engl J Med* 300(10):530–34.
- Henderson, Murray, and Yeo. 2002. "Sorting of the Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein into Detergent-Resistant Structures Is Dependent on Cell-Surface Expression of the Glycoproteins." *Virology* 300(2):244–54.
- Hoshino, Imai, Kobayashi, Uchida, and Katada. 1999. "The Eukaryotic Polypeptide Chain Releasing Factor (ERF3/GSPT) Carrying the Translation Termination Signal to the 3'-Poly(A) Tail of MRNA. Direct Association of Erf3/GSPT with Polyadenylate-Binding Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 274(24):16677–80.
- Hosoda, Lejeune, and Maquat. 2006. "Evidence That Poly(A) Binding Protein C1 Binds Nuclear Pre-MRNA Poly(A) Tails." *Molecular and Cellular Biology* 26(8):3085–97.
- Houng, Maggini, Clement, and Reed. 1997. "Identification and Structure of Activated-Platelet Protein-1, a Protein with RNA-Binding Domain Motifs That Is Expressed by Activated Platelets." *European Journal of Biochemistry* 243(1–2):209–18.
- Huang, Chadee, Chen, Zhang, and Shyu. 2013. "Phosphorylation at Intrinsically Disordered Regions of PAM2 Motif-Containing Proteins Modulates Their Interactions with PABPC1 and Influences MRNA Fate." *RNA (New York, N.Y.)* 19(3):295–305.
- Ilkow, Mancinelli, Beatch, and Hobman. 2008. "Rubella Virus Capsid Protein Interacts with Poly(a)-Binding Protein and Inhibits Translation." *Journal of Virology* 82(9):4284–94.
- Imataka, Gradi, and Sonenberg. 1998. "A Newly Identified N-Terminal Amino Acid Sequence of Human EIF4G Binds Poly(A)-Binding Protein and Functions in Poly(A)-Dependent Translation." *The EMBO Journal* 17(24):7480–89.
- Ispas, Koul, Verbeeck, Sheehan, Sanders-Beer, Roymans, Andries, Rouan, De Jonghe, Bonfanti, Vanstockem, Simmen, and Verloes. 2015. "Antiviral Activity of TMC353121, a Respiratory Syncytial Virus (RSV) Fusion Inhibitor, in a Non-Human Primate Model" edited by R. Tripp. *PLOS ONE* 10(5):e0126959.
- Ivanov, Gehring, Kunz, Hentze, and Kulozik. 2008. "Interactions between UPF1, ERFs, PABP and the Exon Junction Complex Suggest an Integrated Model for Mammalian NMD Pathways." *The EMBO Journal* 27(5):736–47.
- Iverson and Rose. 1981. "Localized Attenuation and Discontinuous Synthesis during Vesicular Stomatitis Virus Transcription." *Cell* 23(2):477–84.
- Jeong, Piepenhagen, Kishko, DiNapoli, Groppo, Zhang, Almond, Kleanthous, Delagrave, and Parrington. 2015. "CX3CR1 Is Expressed in Differentiated Human Ciliated Airway Cells and Co-Localizes with Respiratory Syncytial Virus on Cilia in a G Protein-Dependent Manner." *PloS One* 10(6):e0130517.

- Johnson, Gonzales, Olson, Wright, and Graham. 2007. "The Histopathology of Fatal Untreated Human Respiratory Syncytial Virus Infection." *Modern Pathology* 20(1):108–19.
- Johnson, McNally, Ioannidis, Flano, Teng, Oomens, Walsh, and Peeples. 2015. "Respiratory Syncytial Virus Uses CX3CR1 as a Receptor on Primary Human Airway Epithelial Cultures." *PLoS Pathogens* 11(12):e1005318.
- Joncourt, Eberle, Rufener, and Mühlemann. 2014. "Eukaryotic Initiation Factor 4G Suppresses Nonsense-Mediated mRNA Decay by Two Genetically Separable Mechanisms." *PloS One* 9(8):e104391.
- Kafetzis, Astra, Tsolia, Liapi, Mathioudakis, and Kallergi. 2003. "Otitis and Respiratory Distress Episodes Following a Respiratory Syncytial Virus Infection." *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 9(10):1006–10.
- Kallewaard, Bowen, and Crowe. 2005. "Cooperativity of Actin and Microtubule Elements during Replication of Respiratory Syncytial Virus." *Virology* 331(1):73–81.
- Karron, Buonagurio, Georgiu, Whitehead, Adamus, Clements-Mann, Harris, Randolph, Udem, Murphy, and Sidhu. 1997. "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* 94(25):13961–66.
- Karron, Wright, Belshe, Thumar, Casey, Newman, Polack, Randolph, Deatly, Hackell, Gruber, Murphy, and Collins. 2005. "Identification of a Recombinant Live Attenuated Respiratory Syncytial Virus Vaccine Candidate That Is Highly Attenuated in Infants." *The Journal of Infectious Diseases* 191(7):1093–1104.
- Katzenellenbogen, Egelkrout, Vliet-Gregg, Gewin, Gafken, and Galloway. 2007. "NFX1-123 and Poly(A) Binding Proteins Synergistically Augment Activation of Telomerase in Human Papillomavirus Type 16 E6-Expressing Cells." *Journal of Virology* 81(8):3786–96.
- Kawahara, Imai, Imataka, Tsujimoto, Matsumoto, and Okano. 2008. "Neural RNA-Binding Protein Musashi1 Inhibits Translation Initiation by Competing with EIF4G for PABP." *The Journal of Cell Biology* 181(4):639–53.
- Kerekatte, Keiper, Badorff, Cai, Knowlton, and Rhoads. 1999. "Cleavage of Poly(A)-Binding Protein by Coxsackievirus 2A Protease In Vitro and In Vivo: Another Mechanism for Host Protein Synthesis Shutoff?" *Journal of Virology* 73(1).
- Khaleghpour, Kahvejian, De Crescenzo, Roy, Svitkin, Imataka, O'Connor-McCourt, and Sonenberg. 2001. "Dual Interactions of the Translational Repressor Paip2 with Poly(A) Binding Protein." *Molecular and Cellular Biology* 21(15):5200–5213.
- Khanam, Muddashetty, Kahvejian, Sonenberg, and Brosius. 2006. "Poly(A)-Binding Protein Binds to A-Rich Sequences via RNA-Binding Domains 1+2 and 3+4." *RNA Biology* 3(4):170–77.
- Kim, Canchola, Brandt, Pyles, Chanock, Jensen, and Parrott. 1969. "Respiratory Syncytial Virus Disease in Infants despite Prior Administration of Antigenic Inactivated Vaccine." *American Journal of Epidemiology* 89(4):422–34.
- Kim, Murphy, Majumdar, Harrison, Aitken, and De Vincenzo. 2015. "Relating Plaque Morphology to Respiratory Syncytial Virus Subgroup, Viral Load, and Disease Severity in Children." *Pediatric Research* 78(4):380–88.
- Kipper, Hamad, Caly, Avrahami, Bacharach, Jans, Gerber, and Bajorek. 2015. "New Host Factors Important for Respiratory Syncytial Virus (RSV) Replication Revealed by a Novel Microfluidics Screen for Interactors of Matrix (M) Protein." *Molecular & Cellular Proteomics* 14(3):532–43.
- Kiss, Holl, Williams, Alonas, Vanover, Lifland, Gudheti, Guerrero-Ferreira, Nair, Yi, Graham, Santangelo, and Wright. 2014. "Structural Analysis of Respiratory Syncytial Virus Reveals the Position of M2-1 between the Matrix Protein and the Ribonucleoprotein Complex." *Journal of Virology* 88(13):7602–17.
- Kolokoltsov, Deniger, Fleming, Roberts Jr., Karpilow, and Davey. 2007. "Small Interfering RNA Profiling Reveals Key Role of Clathrin-Mediated Endocytosis and Early Endosome Formation for Infection by Respiratory Syncytial Virus." *J Virol* 81(14):7786–7800.

- Kozlov, De Crescenzo, Lim, Siddiqui, Fantus, Kahvejian, Trempe, Elias, Ekiel, Sonenberg, O'Connor-McCourt, and Gehring. 2004. "Structural Basis of Ligand Recognition by PABC, a Highly Specific Peptide-Binding Domain Found in Poly(A)-Binding Protein and a HECT Ubiquitin Ligase." *The EMBO Journal* 23(2):272–81.
- Kozlov and Gehring. 2010. "Molecular Basis of ERF3 Recognition by the MLLE Domain of Poly(A)-Binding Protein." *PLoS One* 5(4):e10169.
- Kozlov, Ménade, Rosenauer, Nguyen, and Gehring. 2010. "Molecular Determinants of PAM2 Recognition by the MLLE Domain of Poly(A)-Binding Protein." *Journal of Molecular Biology* 397(2):397–407.
- Kozlov, Trempe, Khaleghpour, Kahvejian, Ekiel, and Gehring. 2001. "Structure and Function of the C-Terminal PABC Domain of Human Poly(A)-Binding Protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(8):4409–13.
- Krzyzaniak, Zumstein, Gerez, Picotti, and Helenius. 2013. "Host Cell Entry of Respiratory Syncytial Virus Involves Macropinocytosis Followed by Proteolytic Activation of the F Protein." *PLoS Pathogens* 9(4):e1003309.
- Kühn, Gündel, Knoth, Kerwitz, Rüdel, and Wahle. 2009. "Poly(A) Tail Length Is Controlled by the Nuclear Poly(A)-Binding Protein Regulating the Interaction between Poly(A) Polymerase and the Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor." *The Journal of Biological Chemistry* 284(34):22803–14.
- Kühn and Pieler. 1996. "Xenopus Poly(A) Binding Protein: Functional Domains in RNA Binding and Protein-Protein Interaction." *Journal of Molecular Biology* 256(1):20–30.
- Kumaria, Iyer, Hibberd, Simoes, and Sugrue. 2011. "Whole Genome Characterization of Non-Tissue Culture Adapted HRSV Strains in Severely Infected Children." *Virology* 418:372.
- Kuo, Fearn, and Collins. 1996. "The Structurally Diverse Intergenic Regions of Respiratory Syncytial Virus Do Not Modulate Sequential Transcription by a Dicistronic Minigenome." *Journal of Virology* 70(9):6143–50.
- Kurt-Jones, Popova, Kwinn, Haynes, Jones, Tripp, Walsh, Freeman, Golenbock, Anderson, and Finberg. 2000. "Pattern Recognition Receptors TLR4 and CD14 Mediate Response to Respiratory Syncytial Virus." *Nature Immunology* 1(5):398–401.
- Kuyumcu-Martinez, Muge, Belliot, Sosnovtsev, Chang, Green, and Lloyd. 2004. "Calicivirus 3C-like Proteinase Inhibits Cellular Translation by Cleavage of Poly(A)-Binding Protein." *Journal of Virology* 78(15):8172–82.
- Kuyumcu-Martinez, N. Muge, Van Eden, Younan, and Lloyd. 2004. "Cleavage of Poly(A)-Binding Protein by Poliovirus 3C Protease Inhibits Host Cell Translation: A Novel Mechanism for Host Translation Shutoff." *Molecular and Cellular Biology* 24(4):1779–90.
- Kuyumcu-Martinez, Joachims, and Lloyd. 2002. "Efficient Cleavage of Ribosome-Associated Poly(A)-Binding Protein by Enterovirus 3C Protease." *Journal of Virology* 76(5):2062–74.
- Lee and Glaunsinger. 2009. "Aberrant Herpesvirus-Induced Polyadenylation Correlates With Cellular Messenger RNA Destruction" edited by B. Sugden. *PLoS Biology* 7(5):e1000107.
- Lee, Lui, Wong, Li, Tse, Chan, Yu, Wong, Choi, Wong, Ngai, Hui, and Chan. 2013. "High Morbidity and Mortality in Adults Hospitalized for Respiratory Syncytial Virus Infections." *Clinical Infectious Diseases* 57(8):1069–77.
- Levine, Klaiber-Franco, and Paradiso. 1987. "Demonstration That Glycoprotein G Is the Attachment Protein of Respiratory Syncytial Virus." *Journal of General Virology* 68(9):2521–24.
- Li, Jans, Bardin, Meanger, Mills, and Ghildyal. 2008. "Association of Respiratory Syncytial Virus M Protein with Viral Nucleocapsids Is Mediated by the M2-1 Protein." *Journal of Virology* 82(17):8863–70.
- Liang, Li, Jenni, Rahmeh, Morin, Grant, Grigorieff, Harrison, and Whelan. 2015. "Structure of the L Protein of Vesicular Stomatitis Virus from Electron Cryomicroscopy." *Cell* 162(2):314–27.
- Lifland, Jung, Alonas, Zurla, Crowe, and Santangelo. 2012. "Human Respiratory Syncytial Virus Nucleoprotein and Inclusion Bodies Antagonize the Innate Immune Response Mediated by MDA5 and MAVS." *Journal of Virology* 86(15):8245–58.
- Liljeroos, Krzyzaniak, Helenius, and Butcher. 2013. "Architecture of Respiratory Syncytial Virus

- Revealed by Electron Cryotomography." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(27):11133–38.
- Ling, Tran, and Teng. 2009. "Human Respiratory Syncytial Virus Nonstructural Protein NS2 Antagonizes the Activation of Beta Interferon Transcription by Interacting with RIG-I." *Journal of Virology* 83(8):3734–42.
- Liuzzi, Mason, Cartier, Lawetz, McCollum, Dansereau, Bolger, Lapeyre, Gaudette, Lagacé, Massariol, Dô, Whitehead, Lamarre, et al. 2005. "Inhibitors of Respiratory Syncytial Virus Replication Target Cotranscriptional MRNA Guanylation by Viral RNA-Dependent RNA Polymerase." *Journal of Virology* 79(20):13105–15.
- Llorente, García-Barreno, Calero, Camafeita, López, Longhi, Ferrón, Varela, and Melero. 2006. "Structural Analysis of the Human Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein: Characterization of an -Helical Domain Involved in Oligomerization." *Journal of General Virology* 87(1):159–69.
- Lo, Brazas, and Holtzman. 2005. "Respiratory Syncytial Virus Nonstructural Proteins NS1 and NS2 Mediate Inhibition of Stat2 Expression and Alpha/Beta Interferon Responsiveness." *Journal of Virology* 79(14):9315–19.
- Lu, Bergman, Sadri, and Schneider. 2006. "Assembly of AUF1 with EIF4G-Poly(A) Binding Protein Complex Suggests a Translation Function in AU-Rich MRNA Decay." *RNA (New York, N.Y.)* 12(5):883–93.
- Luongo, Winter, Collins, and Buchholz. 2013. "Respiratory Syncytial Virus Modified by Deletions of the NS2 Gene and Amino Acid S1313 of the L Polymerase Protein Is a Temperature-Sensitive, Live-Attenuated Vaccine Candidate That Is Phenotypically Stable at Physiological Temperature." *Journal of Virology* 87(4):1985–96.
- Magro, Mas, Chappell, Vázquez, Cano, Luque, Terrón, Melero, and Palomo. 2012. "Neutralizing Antibodies against the Preactive Form of Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Offer Unique Possibilities for Clinical Intervention." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(8):3089–94.
- Malkin, Yogev, Abughali, Sliman, Wang, Zuo, Yang, Eickhoff, Esser, Tang, and Dubovsky. 2013. "Safety and Immunogenicity of a Live Attenuated RSV Vaccine in Healthy RSV-Seronegative Children 5 to 24 Months of Age" edited by D. J. Diemert. *PLoS ONE* 8(10):e77104.
- Maquat, Tarn, and Isken. 2010. "The Pioneer Round of Translation: Features and Functions." *Cell* 142(3):368–74.
- Martinello, Chen, Weibel, and Kahn. 2002. "Correlation between Respiratory Syncytial Virus Genotype and Severity of Illness." *The Journal of Infectious Diseases* 186(6):839–42.
- Mason, Aberg, Lawetz, DeLong, Whitehead, and Liuzzi. 2003. "Interaction between Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) M2-1 and P Proteins Is Required for Reconstitution of M2-1-Dependent RSV Minigenome Activity." *Journal of Virology* 77(19):10670–76.
- McCurdy and Graham. 2003. "Role of Plasma Membrane Lipid Microdomains in Respiratory Syncytial Virus Filament Formation." *Journal of Virology* 77(3):1747–56.
- McDonald, Pitt, Brown, Rixon, and Sugrue. 2004. "Evidence That the Respiratory Syncytial Virus Polymerase Complex Associates with Lipid Rafts in Virus-Infected Cells: A Proteomic Analysis." *Virology* 330(1):147–57.
- McKinney, Perez, and Mohr. 2012. "Poly(A) Binding Protein Abundance Regulates Eukaryotic Translation Initiation Factor 4F Assembly in Human Cytomegalovirus-Infected Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(15):5627–32.
- McLellan, Chen, Leung, Graepel, Du, Yang, Zhou, Baxa, Yasuda, Beaumont, Kumar, Modjarrad, Zheng, Zhao, et al. 2013. "Structure of RSV Fusion Glycoprotein Trimer Bound to a Prefusion-Specific Neutralizing Antibody." *Science (New York, N.Y.)* 340(6136):1113–17.
- McLellan, Yang, Graham, and Kwong. 2011. "Structure of Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein in the Postfusion Conformation Reveals Preservation of Neutralizing Epitopes." *Journal of Virology* 85(15):7788–96.
- McPhee, Carlisle, Beeby, Money, Watson, Yeo, and Sanderson. 2011. "Influence of Lipids on the Interfacial Disposition of Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein." *Langmuir : The ACS Journal*

- of Surfaces and Colloids* 27(1):304–11.
- Melo, Dhalia, Martins de Sa, Standart, and de Melo Neto. 2003. "Identification of a C-Terminal Poly(A)-Binding Protein (PABP)-PABP Interaction Domain: Role in Cooperative Binding to Poly (A) and Efficient Cap Distal Translational Repression." *The Journal of Biological Chemistry* 278(47):46357–68.
- Mishima, Fukao, Kishimoto, Sakamoto, Fujiwara, and Inoue. 2012. "Translational Inhibition by Deadenylation-Independent Mechanisms Is Central to MicroRNA-Mediated Silencing in Zebrafish." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(4):1104–9.
- Mitra, Baviskar, Duncan-Decocq, Patel, and Oomens. 2012. "The Human Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Is Required for Maturation of Viral Filaments." *Journal of Virology* 86(8):4432–43.
- Money, McPhee, Mosely, Sanderson, and Yeo. 2009. "Surface Features of a Mononegavirales Matrix Protein Indicate Sites of Membrane Interaction." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(11):4441–46.
- Montero, Rojas, Arias, and López. 2008. "Rotavirus Infection Induces the Phosphorylation of EIF2alpha but Prevents the Formation of Stress Granules." *Journal of Virology* 82(3):1496–1504.
- Moretti, Kaiser, Zdanowicz-Specht, and Hentze. 2012. "PABP and the Poly(A) Tail Augment MicroRNA Repression by Facilitated MiRISC Binding." *Nature Structural & Molecular Biology* 19(6):603–8.
- Morris, Blount, and Savage. 1956. "Recovery of Cytopathogenic Agent from Chimpanzees with Goryza." *Experimental Biology and Medicine* 92(3):544–49.
- Mufson, Orvell, Rafnar, and Norrby. 1985. "Two Distinct Subtypes of Human Respiratory Syncytial Virus." *Journal of General Virology* 66(10):2111–24.
- Munday, Wu, Smith, Fix, Noton, Galloux, Touzelet, Armstrong, Dawson, Aljabr, Easton, Rameix-Welti, de Oliveira, Simabuco, et al. 2015. "Interactome Analysis of the Human Respiratory Syncytial Virus RNA Polymerase Complex Identifies Protein Chaperones as Important Cofactors That Promote L-Protein Stability and RNA Synthesis." *Journal of Virology* 89(2):917–30.
- Nair, Nokes, Gessner, Dherani, Madhi, Singleton, O'Brien, Roca, Wright, Bruce, Chandran, Theodoratou, Sutanto, Sedyaningsih, et al. 2010. "Global Burden of Acute Lower Respiratory Infections Due to Respiratory Syncytial Virus in Young Children: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Lancet (London, England)* 375(9725):1545–55.
- Norrby, Marusyk, and Orvell. 1970. "Morphogenesis of Respiratory Syncytial Virus in a Green Monkey Kidney Cell Line (Vero)." *Journal of Virology* 6(2):237–42.
- Noton and Fearn. 2015. "Initiation and Regulation of Paramyxovirus Transcription and Replication." *Virology* 479–480:545–54.
- Oliveira, Simabuco, Tamura, Guerrero, Ribeiro, Libermann, Zerbini, and Ventura. 2013. "Human Respiratory Syncytial Virus N, P and M Protein Interactions in HEK-293T Cells." *Virus Research* 177(1):108–12.
- Oomens, Bevis, and Wertz. 2006. "The Cytoplasmic Tail of the Human Respiratory Syncytial Virus F Protein Plays Critical Roles in Cellular Localization of the F Protein and Infectious Progeny Production." *Journal of Virology* 80(21):10465–77.
- Östlund, Lindell, Stenler, Riedel, Wirgart, and Grillner. 2008. "Molecular Epidemiology and Genetic Variability of Respiratory Syncytial Virus (RSV) in Stockholm, 2002–2003." *Journal of Medical Virology* 80(1):159–67.
- Otero, Ashe, and Sachs. 1999. "The Yeast Poly(A)-Binding Protein Pab1p Stimulates in Vitro Poly(A)-Dependent and Cap-Dependent Translation by Distinct Mechanisms." *The EMBO Journal* 18(11):3153–63.
- Pereira, Cardone, Lassoued, Galloux, Fix, Assrir, Lescop, Bontems, Eléouët, and Sizun. 2017. "New Insights into Structural Disorder in Human Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein and Implications for Binding of Protein Partners." *The Journal of Biological Chemistry* 292(6):2120–31.
- Peret, Golub, Anderson, Hall, and Schnabel. 1998. "Circulation Patterns of Genetically Distinct Group A and B Strains of Human Respiratory Syncytial Virus in a Community." *Journal of General Virology*

- 79(9):2221–29.
- Pfeifer, Elsby, Fernandez, Faria, Nussenzveig, Lossos, Fontoura, Martin, and Barber. 2008. “NFAR-1 and -2 Modulate Translation and Are Required for Efficient Host Defense.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(11):4173–78.
- Piron, Vende, Cohen, and Poncet. 1998. “Rotavirus RNA-Binding Protein NSP3 Interacts with EIF4GI and Evicts the Poly(A) Binding Protein from EIF4F.” *The EMBO Journal* 17(19):5811–21.
- Pitzer, Viboud, Alonso, Wilcox, Metcalf, Steiner, Haynes, and Grenfell. 2015. “Environmental Drivers of the Spatiotemporal Dynamics of Respiratory Syncytial Virus in the United States” edited by L. Kaderali. *PLoS Pathogens* 11(1):e1004591.
- Polacek, Friebe, and Harris. 2009. “Poly(A)-Binding Protein Binds to the Non-Polyadenylated 3' Untranslated Region of Dengue Virus and Modulates Translation Efficiency.” *Journal of General Virology* 90(3):687–92.
- Preiss and Hentze. 1998. “Dual Function of the Messenger RNA Cap Structure in Poly(A)-Tail-Promoted Translation in Yeast.” *Nature* 392(6675):516–20.
- Radu, Caidi, Miao, Tripp, Anderson, and Haynes. 2010. “Prophylactic Treatment with a G Glycoprotein Monoclonal Antibody Reduces Pulmonary Inflammation in Respiratory Syncytial Virus (RSV)-Challenged Naive and Formalin-Inactivated RSV-Immunized BALB/c Mice.” *Journal of Virology* 84(18):9632–36.
- Raghunandan, Lu, Zhou, Xabier, Massare, Flyer, Fries, Smith, and Glenn. 2014. “An Insect Cell Derived Respiratory Syncytial Virus (RSV) F Nanoparticle Vaccine Induces Antigenic Site II Antibodies and Protects against RSV Challenge in Cotton Rats by Active and Passive Immunization.” *Vaccine* 32(48):6485–92.
- Ramaswamy, Shi, Monick, Hunninghake, and Look. 2004. “Specific Inhibition of Type I Interferon Signal Transduction by Respiratory Syncytial Virus.” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 30(6):893–900.
- Ramaswamy, Shi, Varga, Barik, Behlke, and Look. 2006. “Respiratory Syncytial Virus Nonstructural Protein 2 Specifically Inhibits Type I Interferon Signal Transduction.” *Virology* 344(2):328–39.
- Rameix-Welti, Le Goffic, Hervé, Sourimant, Rémot, Riffault, Yu, Galloux, Gault, and Eléouët. 2014. “Visualizing the Replication of Respiratory Syncytial Virus in Cells and in Living Mice.” *Nature Communications* 5(1):5104.
- Ren, Liu, Pang, Li, Garofalo, Casola, and Bao. 2011. “A Novel Mechanism for the Inhibition of Interferon Regulatory Factor-3-Dependent Gene Expression by Human Respiratory Syncytial Virus NS1 Protein.” *The Journal of General Virology* 92(Pt 9):2153–59.
- Renaud, Xie, Seo, Kuypers, Cent, Corey, Leisenring, Boeckh, and Englund. 2013. “Mortality Rates of Human Metapneumovirus and Respiratory Syncytial Virus Lower Respiratory Tract Infections in Hematopoietic Cell Transplantation Recipients.” *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 19(8):1220–26.
- Renner, Bertinelli, Leyrat, Paesen, Saraiva de Oliveira, Huiskonen, and Grimes. 2016. “Nucleocapsid Assembly in Pneumoviruses Is Regulated by Conformational Switching of the N Protein.” *ELife* 5:e12627.
- Richard, Rincheval, Lassoued, Fix, Cardone, Esneau, Nekhai, Galloux, Rameix-Welti, Sizun, and Eléouët. 2018. “RSV Hijacks Cellular Protein Phosphatase 1 to Regulate M2-1 Phosphorylation and Viral Transcription.” *PLoS Pathogens* 14(3):e1006920.
- Rincheval, Lelek, Gault, Bouillier, Sitterlin, Blouquit-Laye, Galloux, Zimmer, Eleouet, and Rameix-Welti. 2017. “Functional Organization of Cytoplasmic Inclusion Bodies in Cells Infected by Respiratory Syncytial Virus.” *Nature Communications* 8(1):563.
- Rodriguez, Cuesta, Asenjo, and Villanueva. 2004. “Human Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Is an RNA-Binding Protein: Binding Properties, Location and Identity of the RNA Contact Residues.” *Journal of General Virology* 85(3):709–19.
- Roy, De Crescenzo, Khaleghpour, Kahvejian, O'Connor-McCourt, and Sonenberg. 2002. “Paip1 Interacts with Poly(A) Binding Protein through Two Independent Binding Motifs.” *Molecular and Cellular Biology* 22(11):3769–82.

- Sakamoto, Aoki, Higuchi, Todaka, Morisawa, Tamaki, Hatano, Fukushima, Taniguchi, and Agata. 2009. "The NF90-NF45 Complex Functions as a Negative Regulator in the MicroRNA Processing Pathway." *Molecular and Cellular Biology* 29(13):3754–69.
- San-Juan-Vergara, Sampayo-Escobar, Reyes, Cha, Pacheco-Lugo, Wong, Peebles, Collins, Castaño, and Mohapatra. 2012. "Cholesterol-Rich Microdomains as Docking Platforms for Respiratory Syncytial Virus in Normal Human Bronchial Epithelial Cells." *Journal of Virology* 86(3):1832–43.
- Sande, Mutunga, Medley, Cane, and Nokes. 2013. "Group- and Genotype-Specific Neutralizing Antibody Responses against Respiratory Syncytial Virus in Infants and Young Children with Severe Pneumonia." *The Journal of Infectious Diseases* 207(3):489–92.
- Sato and Maquat. 2009. "Remodeling of the Pioneer Translation Initiation Complex Involves Translation and the Karyopherin Importin Beta." *Genes & Development* 23(21):2537–50.
- Shah and Chemaly. 2011. "Management of RSV Infections in Adult Recipients of Hematopoietic Stem Cell Transplantation." *Blood* 117(10):2755–63.
- Shahriari, Wei, and Ghildyal. 2018. "Respiratory Syncytial Virus Matrix (M) Protein Interacts with Actin In Vitro and in Cell Culture." *Viruses* 10(10).
- Shaikh, Cox, Lifland, Hotard, Williams, Moore, Santangelo, Crowe, and Jr. 2012. "A Critical Phenylalanine Residue in the Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Cytoplasmic Tail Mediates Assembly of Internal Viral Proteins into Viral Filaments and Particles." *MBio* 3(1).
- Shi, McAllister, O'Brien, Simoes, Madhi, Gessner, Polack, Balsells, Acacio, Aguayo, Alassani, Ali, Antonio, Awasthi, et al. 2017. "Global, Regional, and National Disease Burden Estimates of Acute Lower Respiratory Infections Due to Respiratory Syncytial Virus in Young Children in 2015: A Systematic Review and Modelling Study." *Lancet (London, England)* 390(10098):946–58.
- Siddiqui, Mangus, Chang, Palermino, Shyu, and Gehring. 2007. "Poly(A) Nuclease Interacts with the C-Terminal Domain of Polyadenylate-Binding Protein Domain from Poly(A)-Binding Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 282(34):25067–75.
- Singh, Rebbapragada, and Lykke-Andersen. 2008. "A Competition between Stimulators and Antagonists of Upf Complex Recruitment Governs Human Nonsense-Mediated mRNA Decay" edited by M. Wickens. *PLoS Biology* 6(4):e111.
- Smith, Raghunandan, Wu, Liu, Massare, Nathan, Zhou, Lu, Boddapati, Li, Flyer, and Glenn. 2012. "Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein Expressed in Insect Cells Form Protein Nanoparticles That Induce Protective Immunity in Cotton Rats" edited by S. M. Varga. *PLoS ONE* 7(11):e50852.
- Sourimant, Rameix-Welti, Gaillard, Chevret, Galloux, Gault, and Eléouët. 2015. "Fine Mapping and Characterization of the L-Polymerase-Binding Domain of the Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein." *Journal of Virology* 89(8):4421–33.
- Stockman, Curns, Anderson, and Fischer-Langley. 2012. "Respiratory Syncytial Virus-Associated Hospitalizations Among Infants and Young Children in the United States, 1997–2006." *The Pediatric Infectious Disease Journal* 31(1):5–9.
- Swanson, Settembre, Shaw, Dey, Rappuoli, Mandl, Dormitzer, and Carfi. 2011. "Structural Basis for Immunization with Postfusion Respiratory Syncytial Virus Fusion F Glycoprotein (RSV F) to Elicit High Neutralizing Antibody Titers." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(23):9619–24.
- Swedan, Andrews, Majumdar, Musiyenko, and Barik. 2011. "Multiple Functional Domains and Complexes of the Two Nonstructural Proteins of Human Respiratory Syncytial Virus Contribute to Interferon Suppression and Cellular Location." *Journal of Virology* 85(19):10090–100.
- Swedan, Musiyenko, and Barik. 2009. "Respiratory Syncytial Virus Nonstructural Proteins Decrease Levels of Multiple Members of the Cellular Interferon Pathways." *Journal of Virology* 83(19):9682–93.
- Tan, Coenjaerts, Houspie, Viveen, van Bleek, Wiertz, Martin, and Lemey. 2013. "The Comparative Genomics of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroups A and B: Genetic Variability and Molecular Evolutionary Dynamics." *Journal of Virology* 87(14):8213–26.
- Tanner, Ariza, Richard, Kyle, Dods, Blondot, Wu, Trincão, Trinh, Hiscox, Carroll, Silman, Eléouët,

- Edwards, et al. 2014. "Crystal Structure of the Essential Transcription Antiterminator M2-1 Protein of Human Respiratory Syncytial Virus and Implications of Its Phosphorylation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(4):1580–85.
- Tawar, Duquerroy, Vonnheim, Varela, Damier-Piolle, Castagne, MacLellan, Bedouelle, Bricogne, Bhella, Eleouet, and Rey. 2009. "Crystal Structure of a Nucleocapsid-Like Nucleoprotein-RNA Complex of Respiratory Syncytial Virus." *Science* 326(5957):1279–83.
- Tayyari, Marchant, Moraes, Duan, Mastrangelo, and Hegele. 2011. "Identification of Nucleolin as a Cellular Receptor for Human Respiratory Syncytial Virus." *Nature Medicine* 17(9):1132–35.
- Techaarpornkul, Barretto, and Peeples. 2001. "Functional Analysis of Recombinant Respiratory Syncytial Virus Deletion Mutants Lacking the Small Hydrophobic and/or Attachment Glycoprotein Gene." *Journal of Virology* 75(15):6825–34.
- Teng and Collins. 1998. "Identification of the Respiratory Syncytial Virus Proteins Required for Formation and Passage of Helper-Dependent Infectious Particles." *Journal of Virology* 72(7):5707–16.
- Thomas, Newcomb, Brown, Wall, Hainfeld, Trus, and Steven. 1985. "Mass and Molecular Composition of Vesicular Stomatitis Virus: A Scanning Transmission Electron Microscopy Analysis." *Journal of Virology* 54(2):598–607.
- Ting, Kao, Chan, Lintott, and Lees-Miller. 1998. "DNA-Dependent Protein Kinase Interacts with Antigen Receptor Response Element Binding Proteins NF90 and NF45." *The Journal of Biological Chemistry* 273(4):2136–45.
- Tran, Castagne, Bhella, Varela, Bernard, Chilmonczyk, Berkenkamp, Benhamo, Grznarova, Grosclaude, Nespoulos, Rey, and Eleouet. 2007. "The Nine C-Terminal Amino Acids of the Respiratory Syncytial Virus Protein P Are Necessary and Sufficient for Binding to Ribonucleoprotein Complexes in Which Six Ribonucleotides Are Contacted per N Protein Protomer." *Journal of General Virology* 88(1):196–206.
- Tran, Castagné, Dubosclard, Noinville, Koch, Moudjou, Henry, Bernard, Yeo, and Eléouët. 2009. "The Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Forms Tetramers and Interacts with RNA and P in a Competitive Manner." *Journal of Virology* 83(13):6363–74.
- Tremaglio, Noton, Deflubé, and Fearn. 2013. "Respiratory Syncytial Virus Polymerase Can Initiate Transcription from Position 3 of the Leader Promoter." *Journal of Virology* 87(6):3196–3207.
- Trento, Ábrego, Rodríguez-Fernández, González-Sánchez, González-Martínez, Delfraro, Pascale, Arbiza, and Melero. 2015. "Conservation of G-Protein Epitopes in Respiratory Syncytial Virus (Group A) Despite Broad Genetic Diversity: Is Antibody Selection Involved in Virus Evolution?" *Journal of Virology* 89(15):7776–85.
- Trento, Galiano, Videla, Carballal, García-Barreno, Melero, and Palomo. 2003. "Major Changes in the G Protein of Human Respiratory Syncytial Virus Isolates Introduced by a Duplication of 60 Nucleotides." *Journal of General Virology* 84(11):3115–20.
- Tucker, Staples, Valencia-Sanchez, Muhlrud, and Parker. 2002. "Ccr4p Is the Catalytic Subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA Deadenylation Complex in *Saccharomyces Cerevisiae*." *The EMBO Journal* 21(6):1427–36.
- Uchida, Hoshino, Imataka, Sonenberg, and Katada. 2002. "A Novel Role of the Mammalian GSPT/ERF3 Associating with Poly(A)-Binding Protein in Cap/Poly(A)-Dependent Translation." *The Journal of Biological Chemistry* 277(52):50286–92.
- Utey, Ducharme, Varthakavi, Shepherd, Santangelo, Lindquist, Goldenring, Crowe, and Jr. 2008. "Respiratory Syncytial Virus Uses a Vps4-Independent Budding Mechanism Controlled by Rab11-FIP2." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(29):10209–14.
- Vanover, Smith, Blanchard, Alonas, Kirschman, Lifland, Zurla, and Santangelo. 2017. "RSV Glycoprotein and Genomic RNA Dynamics Reveal Filament Assembly Prior to the Plasma Membrane." *Nature Communications* 8(1):667.
- Venter, van Niekerk, Rakgantis, and Bent. 2011. "Identification of Deletion Mutant Respiratory

- Syncytial Virus Strains Lacking Most of the G Protein in Immunocompromised Children with Pneumonia in South Africa." *Journal of Virology* 85(16):8453–57.
- Villénave, Thavagnanam, Sarlang, Parker, Douglas, Skibinski, Heaney, McKaigue, Coyle, Shields, and Power. 2012. "In Vitro Modeling of Respiratory Syncytial Virus Infection of Pediatric Bronchial Epithelium, the Primary Target of Infection in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(13):5040–45.
- Walsh, Arias, Perez, Halladin, Escandon, Ueda, Watanabe-Fukunaga, Fukunaga, and Mohr. 2008. "Eukaryotic Translation Initiation Factor 4F Architectural Alterations Accompany Translation Initiation Factor Redistribution in Poxvirus-Infected Cells." *Molecular and Cellular Biology* 28(8):2648–58.
- Walsh, Perez, Notary, and Mohr. 2005. "Regulation of the Translation Initiation Factor EIF4F by Multiple Mechanisms in Human Cytomegalovirus-Infected Cells." *Journal of Virology* 79(13):8057–64.
- Wandrey, Montellese, Koos, Badertscher, Bammert, Cook, Zemp, Horvath, and Kutay. 2015. "The NF45/NF90 Heterodimer Contributes to the Biogenesis of 60S Ribosomal Subunits and Influences Nucleolar Morphology." *Molecular and Cellular Biology* 35(20):3491–3503.
- Wang, Cummins, Bayliss, Sandercock, and Burls. 2008. "Immunoprophylaxis against Respiratory Syncytial Virus (RSV) with Palivizumab in Children: A Systematic Review and Economic Evaluation." *Health Technology Assessment (Winchester, England)* 12(36):iii, ix–x, 1–86.
- Wei, Balasta, Ren, and Goss. 1998. "Wheat Germ Poly(A) Binding Protein Enhances the Binding Affinity of Eukaryotic Initiation Factor 4F and (Iso)4F for Cap Analogues." *Biochemistry* 37(7):1910–16.
- Welliver, Garofalo, Hosakote, Hintz, Avendano, Sanchez, Velozo, Jafri, Chavez-Bueno, Ogra, McKinney, Reed, and Welliver, Sr. 2007. "Severe Human Lower Respiratory Tract Illness Caused by Respiratory Syncytial Virus and Influenza Virus Is Characterized by the Absence of Pulmonary Cytotoxic Lymphocyte Responses." *The Journal of Infectious Diseases* 195(8):1126–36.
- Wells, Hillner, Vale, and Sachs. 1998. "Circularization of mRNA by Eukaryotic Translation Initiation Factors." *Molecular Cell* 2(1):135–40.
- Whelan, Barr, and Wertz. 2004. "Transcription and Replication of Nonsegmented Negative-Strand RNA Viruses." *Current Topics in Microbiology and Immunology* 283:61–119.
- White, Delos, Brecher, and Schornberg. 2008. "Structures and Mechanisms of Viral Membrane Fusion Proteins: Multiple Variations on a Common Theme." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 43(3):189–219.
- Widmer, Zhu, Williams, Griffin, Edwards, and Talbot. 2012. "Rates of Hospitalizations for Respiratory Syncytial Virus, Human Metapneumovirus, and Influenza Virus in Older Adults." *The Journal of Infectious Diseases* 206(1):56–62.
- Wright, Gruber, Peters, Reed, Zhu, Robinson, Coleman-Dockery, and Graham. 2002. "Illness Severity, Viral Shedding, and Antibody Responses in Infants Hospitalized with Bronchiolitis Caused by Respiratory Syncytial Virus." *The Journal of Infectious Diseases* 185(8):1011–18.
- Wright, Karron, Belshe, Shi, Randolph, Collins, O'Shea, Gruber, and Murphy. 2007. "The Absence of Enhanced Disease with Wild Type Respiratory Syncytial Virus Infection Occurring after Receipt of Live, Attenuated, Respiratory Syncytial Virus Vaccines." *Vaccine* 25(42):7372–78.
- Wu, Chen, Gu, Su, Song, and Shi. 2014. "Prevalence and Risk of Viral Infection in Patients with Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Meta-Analysis." *Molecular Biology Reports* 41(7):4743–51.
- Wu, Tran, Teng, Heesom, Matthews, Barr, and Hiscox. 2012. "The Interactome of the Human Respiratory Syncytial Virus NS1 Protein Highlights Multiple Effects on Host Cell Biology." *Journal of Virology* 86(15):7777–89.
- Yalamanchili, Datta, Dasgupta, Sullivan, Stone, Almond, and Hershey. 1997. "Inhibition of Host Cell Transcription by Poliovirus: Cleavage of Transcription Factor CREB by Poliovirus-Encoded Protease 3Cpro." *Journal of Virology* 71(2):1220–26.
- Yamashita, Chang, Yamashita, Zhu, Zhong, Chen, and Shyu. 2005. "Concerted Action of Poly(A) Nucleases and Decapping Enzyme in Mammalian mRNA Turnover." *Nature Structural &*

- Molecular Biology* 12(12):1054–63.
- Yang, Duckett, and Lindsten. 1995. "IPABP, an Inducible Poly(A)-Binding Protein Detected in Activated Human T Cells." *Molecular and Cellular Biology* 15(12):6770–76.
- Yang, Gaidamakov, Xie, Lee, Martino, Kozlov, Crawford, Russo, Conte, Gehring, and Maraia. 2011. "La-Related Protein 4 Binds Poly(A), Interacts with the Poly(A)-Binding Protein MLE Domain via a Variant PAM2w Motif, and Can Promote mRNA Stability." *Molecular and Cellular Biology* 31(3):542–56.
- Yeo, Chan, Brown, Ying, Sutejo, Aitken, Tan, Wenk, and Sugrue. 2009. "Evidence That Selective Changes in the Lipid Composition of Raft-Membranes Occur during Respiratory Syncytial Virus Infection." *Virology* 386(1):168–82.
- Zambon, Stockton, Clewley, and Fleming. 2001. "Contribution of Influenza and Respiratory Syncytial Virus to Community Cases of Influenza-like Illness: An Observational Study." *Lancet* 358(9291):1410–16.
- Zamora, Budev, Rolfe, Gottlieb, Humar, DeVincenzo, Vaishnav, Cehelsky, Albert, Nochur, Gollob, and Glanville. 2011. "RNA Interference Therapy in Lung Transplant Patients Infected with Respiratory Syncytial Virus." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 183(4):531–38.
- Zekri, Huntzinger, Heimstädt, and Izaurralde. 2009. "The Silencing Domain of GW182 Interacts with PABPC1 to Promote Translational Repression and Degradation of MicroRNA Targets and Is Required for Target Release." *Molecular and Cellular Biology* 29(23):6220–31.
- Zhang, Morace, Gauss-Müller, and Kusov. 2007. "Poly(A) Binding Protein, C-Terminally Truncated by the Hepatitis A Virus Proteinase 3C, Inhibits Viral Translation." *Nucleic Acids Research* 35(17):5975–84.
- Zhang, Peebles, Boucher, Collins, and Pickles. 2002. "Respiratory Syncytial Virus Infection of Human Airway Epithelial Cells Is Polarized, Specific to Ciliated Cells, and without Obvious Cytopathology." *Journal of Virology* 76(11):5654–66.
- Zhao, Singh, Malashkevich, and Kim. 2000. "Structural Characterization of the Human Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Core." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(26):14172–77.
- Zlateva, Lemey, Moës, Vandamme, and Van Ranst. 2005. "Genetic Variability and Molecular Evolution of the Human Respiratory Syncytial Virus Subgroup B Attachment G Protein." *Journal of Virology* 79(14):9157–67.

10 ANNEXE 1 : INTERACTEURS POTENTIELS DE L

Accession	Protein name	MASCOT score	Unique peptides	Fold change	P-value	Nb of captures
-	hRSV L	3686,24616	78	74,0082804	0,00040371	4
-	hRSV P	1656,672108	13	50,6337378	0,00327564	4
Q9UL15	BAG family molecular chaperone regulator 5	163,5128571	6	100	0,00140528	3
P35637	RNA-binding protein FUS	147,1913303	2	100	0,00140528	3
-	hRSV N	1709,149661	14	40,2205254	0,00632133	4
Q86WA8	Lon protease homolog 2, peroxisomal	473,3848339	19	37,9244701	0,02483227	3
P49792	E3 SUMO-protein ligase RanBP2	492,0538467	24	100	0,01584809	2
Q9UM54	Pre-mRNA-processing factor 19	433,1791379	2	100	0,01584809	2
P49916	DNA ligase 3	94,2	2	100	0,01584809	2
Q99959	Plakophilin-2	95,52085666	8	100	0,01584809	2
Q5JTV8	Torsin-1A-interacting protein 1	180,7677291	10	100	0,01584809	2
Q9NOG5	Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1B	54,38	5	100	0,01584809	2
P49711	Transcriptional repressor CTCF	61,38	2	100	0,01584809	2
O60232	Sjogren syndrome/scleroderma autoantigen 1	160,7208857	2	100	0,01584809	2
P17252	Protein kinase C alpha type	46,89	2	100	0,01584809	2
P14678	Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B'	50,07	4	100	0,01584809	2
Q9Y6M9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9	53,63	4	100	0,01584809	2
Q9NXE4	Sphingomyelin phosphodiesterase 4	83,52469368	2	100	0,01584809	2
Q8NFW8	N-acylneuraminate cytidyltransferase	34,41	4	100	0,01584809	2
O60783	28S ribosomal protein S14, mitochondrial	58,42	2	100	0,01584809	2
Q12888	Tumor suppressor p53-binding protein 1	126,37	2	100	0,01584809	2
Q9NZ45	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1	61,62	2	100	0,01584809	2
Q12873	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3	46,01	2	100	0,01584809	2
Q9Y6A9	Signal peptidase complex subunit 1	33,28	2	100	0,01584809	2
Q99442	Translocation protein SEC62	27,63	2	100	0,01584809	2

Accession	Protein name	MASCOT score	Unique peptides	Fold change	P-value	Nb of captures
Q9Y678	Coatomer subunit gamma-1	52,03	4	100	0,01584809	2
P61964	WD repeat-containing protein 5	39,88	2	100	0,01584809	2
P47929	Galectin-7	66,92	2	100	0,01584809	2
P04156	Major prion protein	74,21945956	2	100	0,01584809	2
Q9UBS4	Dnal homolog subfamily B member 11	54,19	2	100	0,01584809	2
O60884	Dnal homolog subfamily A member 2	43,89	2	100	0,01584809	2
Q6IAA8	Regulator complex protein LAMTOR1	65,86	2	100	0,01584809	2
Q9UNE7	E3 ubiquitin-protein ligase CHIP	53,14	2	100	0,01584809	2
Q99720	Sigma non-opioid intracellular receptor 1	20,21	2	100	0,01584809	2
Q9NX24	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 2	69,15	2	100	0,01584809	2
Q8TAE8	Growth arrest and DNA damage-inducible proteins-interacting protein 1	87,77260541	2	100	0,01584809	2
Q9H9L3	Interferon-stimulated 20 kDa exonuclease-like 2	49,48	2	100	0,01584809	2
Q7Z3B1	Neuronal growth regulator 1	47,12	2	100	0,01584809	2
P20930	Flaggrin	40,74	2	100	0,01584809	2
P09497	Clathrin light chain B	70,04333333	2	100	0,01584809	2
O95163	Elongator complex protein 1	20,92	2	100	0,01584809	2
P18754	Regulator of chromosome condensation	79,05	2	100	0,01584809	2
Q5CZC0	Fibrous sheath-interacting protein 2	23,63	2	100	0,01584809	2
P20839	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 1	35,43437701	2	100	0,01584809	2
Q8N6Y0	Usher syndrome type-1C protein-binding protein 1	10,0	2	100	0,01584809	2

11 ANNEXE 2 : INTERACTEURS POTENTIELS DE M2-1

Accession	Protein name	MASCOT score	Unique peptides	Fold change	P-value	Nb of captures
Q9Y729	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	457,2	12	38,3	8,37E-05	6
-	hRSV M2-1	2225,8	30	158,9	1,14E-04	6
P82673	28S ribosomal protein S35, mitochondrial	193,5	12	3,9	4,11E-04	6
Q1KMD3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	1931,6	38	11,7	5,51E-04	6
O60506	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	950,7	25	28,2	1,66E-05	5
Q12905	Interleukin enhancer-binding factor 2	962,1	16	8,2	1,49E-04	5
Q9BYD3	39S ribosomal protein L4, mitochondrial	101,1	4	9,4	1,70E-04	5
Q86U42	Polyadenylate-binding protein 2	323,8	12	239,2	1,94E-04	5
O43390	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	1422,9	39	24,7	3,43E-04	5
Q9NP92	28S ribosomal protein S30, mitochondrial	151,1	4	5,3	3,89E-04	5
Q9NZB2	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1	325,6	14	5,3	4,42E-04	5
Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	301,0	6	6,1	5,09E-04	5
Q96KR1	Zinc finger RNA-binding protein	800,9	22	12,6	7,24E-04	5
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	617,3	15	5,4	7,78E-04	5
O14979	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	322,9	6	7,8	1,29E-03	5
P31942	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	273,1	11	6,7	2,12E-03	5
Q9Y2Q9	28S ribosomal protein S28, mitochondrial	210,4	6	6,3	2,71E-03	5
Q08211	ATP-dependent RNA helicase A	1309,9	39	6,6	3,19E-03	5
Q9Y2R5	28S ribosomal protein S17, mitochondrial	127,1	2	3,9	3,22E-03	5
P52815	39S ribosomal protein L12, mitochondrial	125,9	4	3,3	3,34E-03	5
Q9Y291	28S ribosomal protein S33, mitochondrial	60,7	6	14,4	3,61E-03	5
Q12906	Interleukin enhancer-binding factor 3	955,3	29	13,5	3,70E-03	5
P42285	Superkiller viralicidic activity 2-like 2	611,5	21	5,0	4,96E-03	5
Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	1665,9	37	3,7	6,16E-03	5
Q8N983	39S ribosomal protein L43, mitochondrial	125,2	6	8,6	9,01E-03	5
Q92665	28S ribosomal protein S31, mitochondrial	297,2	9	5,6	9,90E-03	5
Q5T653	39S ribosomal protein L2, mitochondrial	136,9	3	5,9	1,04E-02	5
Q9Y3D3	28S ribosomal protein S16, mitochondrial	157,0	3	6,4	1,38E-02	5
Q9Y3D9	28S ribosomal protein S23, mitochondrial	175,4	7	6,0	1,44E-02	5
Q9Y2R9	28S ribosomal protein S7, mitochondrial	276,7	9	10,5	2,91E-02	5
P11940	Polyadenylate-binding protein 1	328,8	7	7,8	4,38E-02	5
Q8TAE8	Growth arrest and DNA damage-inducible proteins-interacting protein 1	85,8	2	5,3	3,00E-04	4
Q8IXM3	39S ribosomal protein L41, mitochondrial	63,9	4	9,3	5,42E-04	4
Q13084	39S ribosomal protein L28, mitochondrial	104,2	5	12,9	8,77E-04	4
Q9BZE1	39S ribosomal protein L37, mitochondrial	191,1	4	5,0	1,35E-03	4

Accession	Protein name	MASCOT score	Unique peptides	Fold change	P-value	Nb of captures
P67809	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	191,8	6	5,4	2,01E-03	4
P49406	39S ribosomal protein L19, mitochondrial	75,9	3	10,3	2,15E-03	4
Q13405	39S ribosomal protein L49, mitochondrial	171,8	4	6,5	2,44E-03	4
Q01780	Exosome component 10	412,6	18	3,4	3,09E-03	4
P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	307,6	9	2,5	3,00E-03	4
O95816	BAG family molecular chaperone regulator 2	206,4	6	3,2	2,99E-03	4
P82664	28S ribosomal protein S10, mitochondrial	258,0	7	11,1	4,28E-03	4
P51398	28S ribosomal protein S29, mitochondrial	408,8	12	3,7	5,35E-03	4
Q5BKZ1	DBIRD complex subunit ZNF326	345,6	13	8,4	6,97E-03	4
P82930	28S ribosomal protein S34, mitochondrial	151,2	12	3,7	8,89E-03	4
P82933	28S ribosomal protein S9, mitochondrial	623,5	13	3,7	9,67E-03	4
Q5RKV6	Exosome complex component MTR3	239,4	4	4,7	9,75E-03	4
Q6UXN9	WD repeat-containing protein 82	235,8	5	7,8	1,07E-02	4
Q9UKM9	RNA-binding protein Raly	307,4	10	4,5	1,16E-02	4
Q9BYD1	39S ribosomal protein L13, mitochondrial	112,2	6	7,3	1,27E-02	4
Q9UPT8	Zinc finger CCH domain-containing protein 4	143,0	7	4,5	1,60E-02	4
Q92552	28S ribosomal protein S27, mitochondrial	410,2	14	2,9	1,64E-02	4
Q96DV4	39S ribosomal protein L38, mitochondrial	148,8	6	10,6	1,77E-02	4
Q9NQ14	Exosome complex component RRP46	140,9	2	7,9	1,89E-02	4
Q9P015	39S ribosomal protein L15, mitochondrial	173,6	6	9,9	1,95E-02	4
Q96EV7	Pentatricopeptide repeat domain-containing protein 3, mitochondrial	590,8	15	3,9	2,24E-02	4
Q13868	Exosome complex component RRP4	301,1	8	2,4	2,38E-02	4
Q9NWK5	39S ribosomal protein L39, mitochondrial	159,8	4	2,1	2,71E-02	4
Q9H0U6	39S ribosomal protein L18, mitochondrial	104,9	3	6,5	2,41E-02	4
P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	859,7	23	4,2	2,61E-02	4
Q08945	FACT complex subunit SSRP1	143,9	4	5,7	2,73E-02	4
P82912	28S ribosomal protein S11, mitochondrial	148,6	4	3,6	2,63E-02	4
O60783	28S ribosomal protein S14, mitochondrial	96,1	4	13,3	3,47E-02	4
P32969	60S ribosomal protein L9	267,9	5	4,8	4,54E-02	4
P51114	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	325,6	15	2,8	4,86E-02	4
Q9BNV8	28S ribosomal protein S26, mitochondrial	120,2	8	5,8	3,87E-03	3
P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	384,7	10	3,0	4,66E-03	3
P62701	40S ribosomal protein S4, X isoform	631,5	12	2,2	5,16E-03	3
Q9ULX6	A-kinase anchor protein 8-like	69,5	3	5,4	6,17E-03	3
Q01105	Protein SET	260,3	6	2,4	7,19E-03	3

Accession	Protein name	MASCOT score	Unique peptides	Fold change	P-value	Nb of captures
P38159	RNA-binding motif protein, X chromosome	235,1	9	3,2	8,38E-03	3
Q9H912	39S ribosomal protein L44, mitochondrial	158,0	6	5,0	8,58E-03	3
Q6NZV4	Zinc finger CCHC domain-containing protein 8	227,3	7	8,5	1,14E-02	3
-	hRSV G	127,1	3	8,1	1,13E-02	3
Q8N5N7	39S ribosomal protein L50, mitochondrial	79,4	3	11,8	1,36E-02	3
P82921	28S ribosomal protein S21, mitochondrial	197,3	5	5,2	1,32E-02	3
Q16540	39S ribosomal protein L23, mitochondrial	70,2	1	5,3	1,42E-02	3
Q9BVP2	Guanine nucleotide-binding protein-like 3	624,5	18	2,3	1,51E-02	3
Q96A35	39S ribosomal protein L24, mitochondrial	79,5	2	5,1	1,60E-02	3
P26447	Protein S100-A4	129,3	6	2,4	1,98E-02	3
Q96B26	Exosome complex component RRP43	136,2	5	3,7	1,73E-02	3
O43823	A-kinase anchor protein 8	333,1	9	8,0	2,22E-02	3
Q9Y224	UPF0568 protein C14orf166	143,6	6	4,0	2,33E-02	3
P62244	40S ribosomal protein S15a	412,1	8	2,0	2,61E-02	3
Q96GA3	Protein LTV1 homolog	158,6	7	2,8	2,75E-02	3
P19338	Nucleolin	801,5	26	2,3	2,82E-02	3
P40429	60S ribosomal protein L13a	518,6	13	3,0	3,44E-02	3
P62854	40S ribosomal protein S26	106,4	5	2,4	3,63E-02	3
-	hRSV P	220,9	7	24,7	4,04E-02	3
P39023	60S ribosomal protein L3	845,2	22	2,3	3,99E-02	3
P18124	60S ribosomal protein L7	653,2	18	3,0	4,25E-02	3
Q02878	60S ribosomal protein L6	874,5	17	2,9	4,28E-02	3
Q9BR12	39S ribosomal protein L45, mitochondrial	71,4	2	13,3	4,41E-02	3
P82675	28S ribosomal protein S5, mitochondrial	228,5	10	6,9	4,96E-02	3
P18827	Syndecan-1	183,7	4	3,3	4,82E-02	3
P50750	Cyclin-dependent kinase 9	35,3	1	100,0	1,01E-03	2
Q96S19	Spermatid perinuclear RNA-binding protein	377,9	3	23,7	2,69E-03	2
Q9H000	Probable E3 ubiquitin-protein ligase makorin-2	77,0	2	14,9	4,26E-03	2
Q7ZZW9	39S ribosomal protein L21, mitochondrial	106,5	2	15,5	5,97E-03	2
P38571	Lysosomal acid lipase/cholesterol ester hydrolase	30,3	1	27,2	6,29E-03	2
-	hRSV SH	16,4	1	14,6	7,87E-03	2
Q15024	Exosome complex component RRP42	366,5	4	2,1	1,15E-02	2
Q9UH17	DNA dc->dU-editing enzyme APOBEC-3B	150,0	4	5,7	1,39E-02	2
P62906	60S ribosomal protein L10a	180,0	6	2,8	2,03E-02	2
Q6PJ17	Zinc finger CCCH domain-containing protein 14	87,1	4	10,5	1,83E-02	2

Accession	Protein name	MASCOT score	Unique peptides	Fold change	P-value	Nb of captures
Q9NWX5	39S ribosomal protein L22, mitochondrial	122,4	4	11,2	1,76E-02	2
Q9Y580	RNA-binding protein 7	103,4	4	5,3	1,81E-02	2
P04040	Catalase	188,4	5	3,5	2,61E-02	2
P82932	28S ribosomal protein S6, mitochondrial	67,7	3	2,5	2,65E-02	2
O43148	mRNA cap guanine-N7 methyltransferase	81,6	3	2,8	2,49E-02	2
Q9BYC9	39S ribosomal protein L20, mitochondrial	67,9	2	7,2	2,92E-02	2
Q96C45	Serine/threonine-protein kinase ULK4	30,5	1	47,8	3,10E-02	2
Q9Y3D5	28S ribosomal protein S18c, mitochondrial	69,2	1	5,5	3,44E-02	2
P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	371,8	11	2,3	3,81E-02	2
Q9NRX2	39S ribosomal protein L17, mitochondrial	51,0	2	9,1	4,06E-02	2
O60814	Histone H2B type 1-K	547,6	6	2,4	4,08E-02	2
O43159	Ribosomal RNA-processing protein 8	186,7	12	2,3	3,96E-02	2
Q9Y5S9	RNA-binding protein 8A	15,6	1	3,6	3,95E-02	2
Q9HD33	39S ribosomal protein L47, mitochondrial	68,9	2	4,5	4,49E-02	2
Q8WUY1	Protein THEM6	31,0	1	25,1	4,50E-02	2
P57088	Transmembrane protein 33	146,3	3	3,6	4,66E-02	2
P49207	60S ribosomal protein L34	133,8	5	2,3	4,97E-02	2
Q5JTH9	RRP12-like protein	597,8	15	2,9	4,90E-02	2
Q08170	Serine/arginine-rich splicing factor 4	54,8	2	100,0	2,13E-02	1
-	hRSV NS2	32,0	1	100,0	2,13E-02	1
Q2YD98	UV-stimulated scaffold protein A	10,0	1	100,0	2,13E-02	1
Q14534	Squalene monooxygenase	24,9	1	100,0	2,13E-02	1
Q9UHR4	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1	26,0	1	100,0	2,13E-02	1
P23381	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic	10,0	1	100,0	2,13E-02	1
Q9Y2H6	Fibronectin type-III domain-containing protein 3A	10,0	1	107,9	2,07E-02	1
Q9UHD9	Ubiquitin-2	10,0	1	100,0	2,13E-02	1
P17096	High mobility group protein HMG-I/HMG-Y	18,6	1	29,2	3,52E-02	1
P30536	Translocator protein	24,1	1	22,0	4,06E-02	1
O75152	Zinc finger CCH domain-containing protein 11A	54,2	3	21,3	4,12E-02	1
Q9BQG0	Myb-binding protein 1A	345,4	15	2,4	4,87E-02	1
P17612	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	25,9	1	16,7	4,71E-02	1

12 ANNEXE 3 : ARTICLE

TITRE:

Generation, amplification and titration of recombinant respiratory syncytial viruses to monitor viral multiplication and viral factories dynamics.

AUTEURS ET AFFILIATIONS:

Camille Bouillier, Vincent Rincheval, Delphine Sitterlin, Sabine Blouquit-Laye, Aurore Desquesnes, Jean-François Eléouët, Elyanne Gault, Marie-Anne Rameix-Welti

ACCEPTÉ DANS LE JOURNAL JOVE

TITLE:

Generation, amplification and titration of recombinant respiratory syncytial viruses to monitor viral multiplication and viral factories dynamics.

AUTHORS AND AFFILIATIONS:

Camille Bouillier¹, Vincent Rincheval¹, Delphine Sitterlin¹, Sabine Blouquit-Laye¹, Aurore Desquesnes¹, Jean-François Eléouët², Elyanne Gault^{1,3}, Marie-Anne Rameix-Welti^{1,3}

Camille Bouillier

camille.bouillier@uvsq.fr

Vincent Rincheval

vincent.rincheval@uvsq.fr

Delphine Sitterlin

delphine.sitterlin@uvsq.fr

Sabine Blouquit-Laye

sabine.blouquit-laye@uvsq.fr

Aurore Desquesnes

aurore.desquesnes@inserm.fr

Jean-François Eléouët

jean-francois.eleouet@inra.fr

Elyanne Gault

elyanne.gault@aphp.fr

¹ UMR1173 INSERM, Université de Versailles St. Quentin, Montigny-le-Bretonneux, France

² UR892 INRA, Unité de virologie et immunologie moléculaires, Jouy-en-Josas, France

3 AP-HP, Hôpital Ambroise Paré, Laboratoire de Microbiologie, Boulogne-Billancourt, France

Corresponding Author:

Marie-Anne Rameix-Welti

marie-anne.rameix-welti@uvsq.fr

Tel: (33)170429365

KEYWORDS: Reverse genetics; respiratory syncytial virus; infection; recombinant virus; amplification; titration; tag; fluorescence; quantification, videomicroscopy

SUMMARY:

We describe a method for generating and amplifying genetically modified respiratory syncytial viruses (RSV) and an optimized plaque assay for RSV. We illustrate our protocol by creating two recombinant viruses that respectively allow quantification of RSV replication and live analysis of RSV inclusion bodies and inclusion bodies associated granules dynamics.

ABSTRACT:

The use of recombinant viruses has become crucial in basic or applied virology. Reverse genetics has been proven to be an extremely powerful technology both to decipher the viral replication mechanisms as to study antivirals or provide development platform for vaccines. The construction and manipulation of a reverse genetic system for a negative strand RNA virus such as RSV, however, remains delicate and requires special know-how. The respiratory syncytial virus (RSV) genome is a single strand, negative sense RNA of about 15 kb that serves as a template for both viral RNA replication and transcription. Our reverse genetics system uses a cDNA copy of the human RSV long strain genome (HRSV).. This cDNA, as well as cDNAs encoding viral proteins of the polymerase complex (L, P, N and M2-1) are placed in individual expression vectors under T7 polymerase control sequences. Transfection of these elements in BSR-T7/5 cells, which stably express T7 polymerase, allows cytoplasmic replication and transcription of the recombinant RSV (RSV), giving rise to genetically modified virions. New RSV, which is present at the cell surface and in culture supernatant of BSRT7/5, is gathered to infect human HEp2 cells for viral amplification. Two or three rounds of amplification are needed to obtain viral stocks containing 1.10^6 to 1.10^7 plaque forming units (PFU)/mL. Methods for optimal harvesting, freezing and titration of viral stocks are described here in detail. We illustrate our protocol by creating two recombinant viruses respectively expressing free GFP (RSV-GFP) or

viral M2-1 fused to GFP (RSV-M2-1-GFP). We show how to use the RSV-GFP virus to quantify RSV replication and the RSV-M2-1-GFP to visualize viral structures as well as viral protein dynamics in live cells, by using videomicroscopy techniques.

INTRODUCTION:

Human respiratory syncytial virus (RSV) is the leading cause of hospitalization for acute respiratory tract infection in infants worldwide¹. In addition, RSV is associated with a substantial disease burden in adults comparable to influenza, with most of the hospitalization and mortality burden in the elderly². There are no vaccines or specific antivirals against RSV yet available, but promising new drugs are in development^{3,4}. The complexity and the heaviness of the techniques of quantification of RSV multiplication impede the search for antivirals or vaccines despite current considerable efforts. Quantification of RSV multiplication *in vitro* is generally based on laborious, time-consuming and expensive methods, which consist mostly in the analysis of cytopathic effect by microscopy, immunostaining, plaque reduction assays, quantitative reverse transcriptase (qRT)-PCR, enzyme-linked immunosorbent assay tests. Viruses with modified genomes and expressing reporter genes, such as those coding for the green fluorescent protein (GFP), are more suitable for such screenings. Coupled to the use of automated plate readers, reporter gene-carrying recombinant viruses can make these assays more suitable for standardization and high-throughput purposes.

RSV is an enveloped, non-segmented, negative-sense RNA virus that belongs to the *Orthopneumovirus* genus of the *Pneumoviridae* family, order *Mononegavirales*⁵. The RSV genome is a single strand, negative sense RNA of about 15 kb, which contains non coding region at the 3' and 5' extremities called Leader and Trailer and 10 transcriptional units encoding 11 proteins. The genes are ordered as follows 3'-NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2 (encoding for M2-1 and M2-2 proteins) and L-5'. The genomic RNA is tightly packaged by the nucleoprotein (N). Using the encapsidated genomic RNA as a template, viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) will ensure transcription and replication of the viral RNA. Viral RdRp is composed of the large protein L which carries the nucleotide polymerase activity per se, its mandatory cofactor the phosphoprotein P and the M2-1 protein which function as a viral transcription factor.⁶ In infected cells, RSV induces the formation of cytoplasmic inclusions called inclusion bodies (IBs). Morphologically similar cytoplasmic inclusions have been observed for several *Mononegavirales*⁷⁻¹⁰. Recent studies on rabies virus, vesicular stomatitis virus (VSV), Ebola virus and RSV showed that viral RNA synthesis occurs in IBs, which can thus be regarded as viral factories^{8, 9, 11, 12}. The virus factories concentrate the RNA and viral proteins required for viral RNA synthesis and also contain cellular proteins¹³⁻¹⁷. IBs exhibit a functional sub-compartment called IB associated granules (IBAGs) which concentrate the newly synthesized nascent viral mRNA together with the M2-1 protein. The genomic RNA and the L, P and N are not detected in IBAGs. IBAGs are small dynamic spherical structures inside IBs that exhibit the properties of liquid organelles¹². Despite the central role of IBs in viral multiplication, very little is known about the nature, internal structure, formation and operation of these viral factories.

The expression of the genome of a poliovirus from a cDNA enabled the production of the first infectious viral clone in 1981¹⁸. For single-stranded negative RNA viruses, it was not until 1994

for the production of a first rabies virus following transfection of plasmids into cells¹⁹. The first plasmid based reverse genetic system for RSV was published in 1995²⁰. Reverse genetics have led to major advances in the field of virology. The possibility of introducing specific modifications into the viral genome has provided critical insights into the replication and pathogenesis of RNA viruses. This technology has also greatly facilitated the development of vaccines by allowing specific attenuation through targeted series of modifications. Genome modifications allowing a rapid quantification of viral multiplication greatly improved antiviral screening and study of their mode of action.

Although previously described, obtaining genetically modified RSVs remains delicate. Here, we detail a protocol that we employed to create two types of recombinant HRSV, respectively expressing free GFP (RSV-GFP) or viral M2-1 fused to GFP (RSV-M2-1-GFP). In this protocol, we describe the transfection conditions needed to rescue the new recombinant viruses, as well as their amplification to obtain viral stocks with high titer, suitable for reproducible experimentations. The construction of the reverse genetics vectors *per se* is not described here. We also describe methods for optimal harvesting and freezing of viral stocks. The most accurate method to quantify viral infectious particles remains plaque assay. Cells are infected with serial dilutions of the analyzed suspension and incubated with an overlay that prohibits the diffusion of free viral particles in the supernatant. In such conditions, the virus will only infect contiguous cells forming a “plaque” for each initial infectious particle. In the conventional RSV titration assay, plaques are revealed by immunostaining and counted under microscopic observation. This method is expensive and time consuming. Here we described a very simple protocol for RSV plaque assay using microcrystalline cellulose overlay that enables the formation of plaques visible to naked eyes. We show how RSV-GFP can be used to measure RSV replication and thus to quantify the impact of antivirals. Combining reverse genetics and live imaging technology we demonstrate how RSV-M2-1-GFP allows to visualize M2-1 in live cells and to follow the dynamics of intracellular viral structures such as inclusion bodies.

PROTOCOL:

1. Material preparation

1.1) Purchase cell media (Reduced serum media, MEM, 10X MEM and DMEM), transfection reagent and microcrystalline cellulose (see table of materials).

1.2) Obtain following vectors for reverse genetics: the genomic vector containing the full cDNA genome of RSV-GFP (p-RSV-GFP), of RSV-M2-1GFP (p-RSV-M2-1GFP) downstream from the bacteriophage T7 RNA polymerase (T7 pol) promoter and the expression vectors encoding the N protein and the polymerase complex proteins: p-N, p-P, p-L and p-M2-1 downstream the T7 pol or a cellular RNA polymerase II promoter (see reference^{12, 21} for details regarding the plasmid constructs).

1.3) Prepare media (with L-glutamine) for cell culture in sterile environment, transfection and infection: DMEM supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS) 1000 units/mL penicillin, and 1 mg/mL streptomycin (or without antibiotics)) and MEM supplemented with 0%, 2% or 10% FCS,

140 1000 units/mL penicillin, and 1 mg/mL streptomycin designated as “complete medium” in the
141 following protocol.

142 1.4) Obtain BSRT7/5²² cells and make stocks in complete medium supplemented with 10%
143 DMSO at 1 to 2.10⁶ cells / mL. Conserve cell stocks in liquid nitrogen. Obtain HEp-2 cells. Culture
144 BSRT7/5 cells in complete DMEM and HEp-2 cells in complete MEM in a sterile environment.

145 1.5) Prepare a 10xRSV conservation solution (0.5 M Hepes, 1 M MgSO₄, pH 7.5 in water) in
146 sterile environment.

147 1.6) Obtain an inverted fluorescent microscope compatible with GFP fluorescence
148 measurement to monitor reverse genetics and infection and compatible with live live imaging if
149 needed. Obtain a microplate reader compatible with GFP fluorescence measurement for
150 quantitation of RSV-GFP replication.

151 **2. Rescue and first passage of recombinant virus.**

152 Perform all the following steps in a sterile environment using a class II safety cabinet.

153 2.1) The day before transfection, make a suspension of BSRT7/5 cell line at 5.10⁵ cells / mL in
154 complete medium. Distribute 2 mL of cell suspension per well in a 6 well plate. Prepare 1 well
155 per reverse genetic and 1 additional well for negative control. Incubate at 37 °C 5% CO₂. Check
156 that the cells are at a confluence of 80-90% the next day.

157 2.2) Unfreeze working dilutions of reverse genetics vectors (0,1 to 1 µg/mL in H₂O): p-RSV-GFP,
158 p-RSV-M2-1-GFP as well as p-N, p-P, p-L and p-M2-1 for all reverse genetics. Mix, for each
159 reverse genetics, in a tube: 1 µg of p-N and p-P, 0,5 µg of p-L, 0,25 µg of p-M2-1 and 1,25 µg of
160 p-RSV (GFP or M2-1 GFP). Note that different expression vector for N, P, L and M2-1 may be
161 used, however the ratio between the proteins has to be maintained. Perform the negative
162 control by replacing the p-RSV vector with empty vector.

163 2.3) Proceed to transfection accordingly to the transfection reagent manufacturer protocol (see
164 table of materials).

165 2.3.1) Add 250 µl OptiMEM to the mixed vectors. Dilute in another tube 10 µl of the
166 transfection reagent in 250 µl OptiMEM. Vortex gently both tubes and wait for 5 min. Mix
167 contents of both tubes and wait for 20 min at room temperature.

168 2.3.2) Rinse BSRT7/5 cells with 1 mL reduce serum medium and distribute 1.5 mL MEM 10% FCS
169 without antibiotics per well. If necessary, incubate at 37°C 5% CO₂ until the 2.3.1 incubation is
170 completed.

171 2.3.4) Add 500 µL of the transfection mix prepared in 2.3.1 to a well when the 20 min
172 incubation time is over. Place cells in the incubator at 37 °C 5% CO₂ for 3 days. Do not change
173 the culture medium of cells during the transfection.

2.4) Observe GFP fluorescence under a microscope once a day and estimate the percentage of transfected, fluorescent cells.

2.5) On the 2^d day after transfection, prepare a suspension of HEp-2 cells at $5 \cdot 10^5$ cells / mL in complete medium. Distribute 2 mL of cell suspension per well in a 6 well plate (1 well per reverse genetic and negative control).

2.6) On the 3rd day of transfection, prepare a scraper and a tube per reverse genetic and negative control. Take the BSRT7/5 6 well plate, scratch cells in each well with a different scraper and transfer each well content (cells and supernatant) in a tube. Vortex each tube vigorously during at least 30 s to release rescued virus from cell membranes. This corresponds to passage 0 (P0) of the rescued virus (Figure 1).

2.7) Use the fresh viral P0 suspension to perform the first amplification of the rescued viruses.

2.7.1) Remove the culture medium from HEp-2 6 wells plate seeded the day before and add quickly 500 µl of the P0 suspension per well. Place the HEp2 plate at 37 °C on a see saw rocker for soft agitation during 2 h.

2.7.2) Remove the 500 µl inoculum and add 2 mL of MEM FCS 2%. Incubate the plate at 37 °C 5% CO₂ for 3 days. This will produce the first passage (P1) of the rescued viruses.

2.8) Add 1/10 volume of 10x RSV conservation solution (0.5 M Hepes, 1 M MgSO₄, pH 7.5) into the remaining P0 suspension. Vortex microtubes vigorously for 5 s and aliquot in cryotubes labelled with alcohol resistant tags. Immerse the cryotubes in precooled -80°C alcohol for at least 1 h, and store them at -80 °C.

2.9) Titrate the P0 stock of each reverse genetics (see below the microcrystalline cellulose titration protocol).

2.10) Observe GFP fluorescence of the HEp-2 cells infected with the P0 suspension under a microscope once a day and roughly estimate the proportion of infected cells. Observe under brightfield the appearance of small syncytia and cell detachment which reflects the RSV cytopathogenic effect (CPE) (See Figure 2).

2.11) Note the rescue has failed if neither fluorescence nor CPE is visible after 2-3 days.

2.12) Collect the first passage (P1) at day 3 or 4 as described in 2.6 and 2.8 (in brief: Scrape the cells, collect cells and supernatant together, vortex, add the conservation solution, aliquot and froze).

2.13) Titrate (see titration assay in section 4) and amplify the first passage (see amplification section 3).

3) Amplification of the rescued viruses

The following protocol describes the amplification of the rescued viruses in 75 cm² flask. Adapt

208 the flask size to the volume needed and the required MOI. Table 1 indicates volumes for the
209 different flasks. Perform all the following steps in a sterile environment in a class II safety
210 cabinet

211 3.1) Prepare a suspension of HEp2 cells at $5 \cdot 10^5$ cells / mL in complete medium, the day prior to
212 the amplification. Distribute 15 mL of cell suspension in 75 cm² flasks and incubate at 37 °C CO₂
213 5%.

214 3.2) Check that cells are 80-100% confluent, the day after.

215 3.3) Dilute the viral suspension in MEM without FCS to obtain a 3 mL suspension at 50 000
216 PFU/mL (corresponding to a MOI of 0.01 PFU/cell).

217 3.4) Remove the medium and add quickly the 3 mL viral suspension. Place the flask at 37 °C on
218 a see saw rocker for soft agitation during 2h.

219 3.5) Remove the inoculum and add 15 mL of MEM FCS 2%. Incubate at 37 °C CO₂ 5% for 2-4
220 days.

221 3.6) Check cell morphology and fluorescence in order to estimate the right time to harvest
222 viruses. Note that this is usually when 50% - 80% HEp-2 cell layer is detached due to RSV CPE
223 that happens between 48 and 72 h post infection (p.i.) (See Figure 3).

224 3.7) Scrape all the cells using a cell scraper. Collect together both the cells and the supernatant
225 and transfer in a centrifuge tube.

226 3.8) Add 1/10 volume of 10x RSV conservation solution (0.5 M Hepes, 1 M MgSO₄, pH 7.5).
227 Vortex microtubes vigorously for 5 s and clarify the suspension by a 5 min centrifugation at 200
228 g.

229 3.9) Vortex briefly and aliquot the suspension in cryotubes labelled with alcohol resistant tags.
230 Immerse the cryotubes in precooled -80 °C alcohol for at least 1 h and store them at -80 °C.

231 3.10) Unfroze one of the aliquot to titrate the viral suspension (see below).

232 **4. Plaque titration assay**

233 4.1) Prepare 12 well plates for titration the day before (6 wells will be required to titrate one
234 tube of virus). Seed the wells with 1 mL of HEp2 cells at $5 \cdot 10^5$ cells / mL in complete medium.

235 4.2) Next day, prepare a sterile microcrystalline cellulose suspension (2.4% (w/v) in water) (see
236 table of materials). Disperse 2.4 g of microcrystalline cellulose powder in 100 mL distilled water
237 using standard magnetic stirrer until complete dissolution (usually 4 to 12 hours). Autoclave the
238 suspension at 121 °C for 20 min and store at room temperature before use. In such conditions
239 the suspension is stable for one year. After opening the solution in sterile environment, store it
240 at 4 °C for 6 months. Always mix the suspension before use (by hand shaking or vortex) to make

241 sure it is homogeneous.

242 4.3) Prepare the 2X MEM in sterile environment. Dilute commercial MEM 10x with sterile
243 water, add L-Glutamine and penicillin 1000 units/mL, streptomycin 1 mg/mL. Shake vigorously
244 and store at 4 °C.

245 4.4) Perform the steps 4.4 to 4.10 in a sterile environment using a class II safety cabinet.
246 Prepare 6 tubes containing 900 µL of MEM without FCS (titration tubes) per virus to be titrated.

247 4.5) Thaw the virus aliquots, vortex vigorously for 5 seconds and transfer 100.µL in the first
248 titration tube.

249 4.6) Perform a tenfold dilution six times, as follow: Add 100 µl virus to 900 µL medium in the
250 first tube, put the cap on and mix by vortexing a few seconds. Change the tip on the pipette,
251 add 100 µL of the first dilution in the 900 µL medium in the second tube, put the cap on and
252 vortex. Repeat the procedure until the sixth tube). Note that it is very important to change the
253 tip for each dilution.

254 4.7) Write the virus name and the fold dilutions on the HEp-2 12 wells plates. Add a mark to
255 match the plate and its cover because they may be separated during revelation. Remove
256 medium of the plates and distribute 400 µl of one dilution per well (change pipet tip between
257 each inoculum or proceed from lowest to highest concentration with the same tip). Note:
258 inoculate limited series of plates (1 to 2) simultaneously to avoid cells drying. Incubate plates at
259 37 °C, 2 h for virus adsorption.

260 4.8) Prepare the microcrystalline cellulose overlay during the virus adsorption (extemporaneous
261 preparation). To obtain 100 mL overlay, mix 10 mL of 2.4% microcrystalline cellulose
262 suspension, 10 mL of 2x MEM and 80 mL of 2 % FCS MEM. Adjust the pH of the MEM2X to
263 around 7.2 with a sterile sodium bicarbonate solution at 7,5 % following the color indicator.
264 Add the microcrystalline cellulose suspension and the MEM and mix vigorously.

265 4.9) At the end of the 2 h incubation, add 2 to 3 mL of overlay in each well for 12 wells plates
266 without removing the inoculum. Be careful to avoid well contamination high viral titer
267 inoculums. Incubate the plate at 37 °C CO₂ 5% during 6 days. Do not move the plate and do not
268 move the incubator during incubation.

269 4.10) Proceed to cells staining using crystal violet solution (8 % crystal violet (v/v), 2%
270 formaldehyde (v/v), 20% ethanol (v/v) in water).

271 4.10.1) Protect the work surface of biosafety cabinet with a sheet (the crystal violet strongly
272 colours the surfaces).

273 4.10.2) Gently shake plates to take off the microcrystalline cellulose overlay. Remove
274 supernatants and wash two times with 1x PBS. Handle the plates one by one to avoid cells
275 drying. Add 1-2 mL of the crystal violet solution and wait 10-15 min. Remove the solution,

276 which can be re-used for subsequent plate staining).

277 4.10.3) Immerse the plates and lids in fresh bleach for a few seconds and then wash thoroughly
278 with tap water. Note that the plates and covers are decontaminated by the bleach.

279 4.10.4) Put the plates and lids on paper towels and let dry. Dry the plates at ambient
280 temperature after water rinsing and store them at room temperature. For long storage periods
281 (months) keep the plates protected from light to protect the color. Note that if the cells lose
282 their coloration, they can be stained again with crystal violet.

283 4.11) Count plaques and calculate passage titers. Check that the number of plaques of the
284 different dilutions is coherent (factor 10 between each dilution). Choose the well on which the
285 plaques are the easiest to count. Report the number of plaques to inoculum volume and
286 dilution. On the example provided on figure 4, 21 plaques are counted at the 10^{-5} dilution.
287 These correspond to a titer of

$$Titre = \frac{\text{plaque number}}{\text{dilution} * \text{inoculum volume}}$$

288 $Titre = \frac{21}{0.00001 * 0.4} = 5250000 \text{ PFU/mL}$

289

290 **5. Using HRSV-GFP recombinant virus to monitor viral replication in cells treated with SiRNA**
291 **or antivirals**

292 Perform all steps except for the 5.1.X and 5.2.5 in sterile environment using class II a safety
293 cabinet

294 5.1) Monitoring the impact on RSV multiplication of silencing cellular or viral genes by RNA
295 interference. Note that the transfection protocol depends on the reagent (See table of
296 materials).

297 5.1.1) Prepare 96 wells plates for GFP measurement. Two days before the assay, for a given
298 siRNA, prepare a solution of reduced serum media containing siRNA at a concentration of 100
299 nM and a SiRNA transfection reagent diluted at 1/500e. Incubate 30 min at room temperature.

300 5.1.2) Add 25 μL of the solution to the wells (in triplicates). Seed the wells with 75 μL of a
301 suspension of A549 cells at $4 \cdot 10^5$ cells / mL in complete medium without antibiotics to obtain a
302 final cell concentration of $3 \cdot 10^5$ cells / mL. Note that the final siRNA concentration is 25 nM and
303 the final transfection reagent volume is 0,5 μL /well). Incubate 48h at 37 °C 5% CO_2 .

304 5.1.3) Infect the cells. Remove the medium from the wells. Add 100 μL of RSV-GFP suspension
305 at 50 000 PFU/mL and incubate for 2h at 37 °C 5% CO_2 . Remove the viral suspension and add
306 100 μL of DMEM with 2% SVF and without phenol red. Incubate the plate at 37 °C 5% CO_2 .

307 5.1.4) At 24 h and 48 h post-infection, measure the fluorescence using a spectrofluorometer set
308 on excitation and emission wavelengths of 488 and 520 nm respectively (fluorescence is
309 expressed in relative fluorescence units). Use non-infected A549 cells as standards for
310 fluorescence and background levels. Note that the cells need to be fixed with 4% PFA before
311 measurement without the cover.

312 5.2) Assessing drug inhibition using RSV-GFP

313 5.2.1) Prepare 96 wells plates for GFP measurement. The day before the assay seed the wells
314 with 100 μ L of a suspension of HEp2 cells at $5 \cdot 10^5$ cells / mL in complete medium without
315 phenol red.

316 5.2.2) Prepare serial dilution of the tested drugs in MEM complemented with FCS 2% and
317 antibiotics (50 μ L per well). Prepare viral suspension at 10000 PFU/mL in MEM without SVF and
318 without phenol red (50 μ L per well).

319 5.2.3) Remove the medium from the 96 wells HEp-2 plate and add 50 μ L of the drug suspension
320 and 50 μ L of the viral suspension (in triplicate). Perform mock infection in parallel as a control.
321 Note that drug dilution and viral suspension may be mixed before addition on the cells or
322 added sequentially.

323 5.2.4) Incubate the plate for 48 h at 37 °C 5% CO₂.

324 5.2.5) Measure the fluorescence using a spectrofluorometer as described above. Use mock-
325 infected HEp-2 cells as standards for fluorescence background levels.

326 **6. Characterization of M2-1 localization *in vivo* with the RSV-M2-1-GFP recombinant virus**

327 Perform steps 6.1 and 6.2 in sterile environment using class II a safety cabinet

328 6.1) Prepare a suspension of HEp-2 cells at $5 \cdot 10^5$ cells / mL in complete medium. Seed 1.5 mL of
329 cell suspension in a 35 mm Petri dish permeant to CO₂ adapted for live imaging. 6.2) Perform
330 infection the day after seeding with the RSV-M2-1-GFP virus at MOI 1 as described in paragraph
331 3 (remove the medium, add 500 μ L to 1 mL inoculum volume and incubate at 37 °C under
332 gentle shaking for 2 h, remove the inoculum and add 1.5 mL of MEM 2% FCS). Incubate the cells
333 at 37 °C CO₂ 5% the desired time (Inclusion bodies will start to appear from 10 h p.i.).

334 6.3) Preheat the incubation chamber of an inverted microscope equipped with 40 x to 100 x
335 objectives at 37 °C prior placing the Petri dish containing infected cells on the stage. Open the
336 CO₂ supply and wait for focus stabilization.

337 6.4) Perform imaging with GFP compatible filters, under low excitation intensity and image
338 frequency (from 1 to 0.1 image per minute) to minimize phototoxicity.

339 **REPRESENTATIVE RESULTS:**

340 In this work, we describe a detailed protocol to produce recombinant RSV viruses expressing a

fluorescent protein (Figure 2). In pRSV-GFP the GFP gene has been introduced between the P and M genes as described for the Cherry gene in previously published work²¹. In the pRSV-M2-1-GFP the M2 gene was left untouched and an additional gene coding for M2-1-GFP has been inserted between SH and G genes¹². The first step, corresponding to the rescue of the virus in BSRT7/5 cells is shown on figure 2A. Small clusters of green fluorescent cells are visible 72 h post-transfection in wells corresponding to RSV-GFP and RSV-M2-1-GFP rescue. The fluorescent signal was observed in both cytoplasmic and nuclei in RSV-GFP infected cells, corresponding to the expression of the free GFP. In contrast, in the RSV-M2-1-GFP rescue, small fluorescent cytoplasmic dots are observed, corresponding to M2-1-GFP accumulation in inclusion bodies. Usually no CPE (Syncytia, detached cells) is observed at this step. Conversely, during the second step corresponding to virus amplification (first passage) on HEp-2 cells, CPE are visible in infected cells at 72 h p.i (Figure 2B). Figure 3A 72 h and B show the strong CPE of the RSV infection, characterized by large syncytia, detached or not, and many floating cells. Syncytia and cells both exhibit bright green fluorescence. Figure 3A shows the evolution of the cytopathic effect between 24 and 72 h post infection in cells infected with the RSV-M2-1-GFP virus. A few scattered fluorescent cells are visible at 24 h p.i. without detectable CPE. Small syncytia, (cluster of fluorescent cells) and few detached cells/syncytia start to appear at 48 h p.i.. Large fluorescent syncytia and floating cells are clearly visible at 72 h p.i.

Pictures of plaque titration assay and viral titers corresponding to the whole process of RSV production are shown on figure 5. Plaque assay on the negative control, transfected with only the expression plasmids of N, P, L and M2-1, reveal no plaque at the lowest dilution. The titers obtained from the transfected cells are expected to be above 100 PFU/mL if the rescue was efficient, as shown in figure 5. Then the titers increase over the passages to reach 10^6 to 10^7 PFU/mL at passage 1 or 2. Note that the viral titers are similar between the two recombinant viruses.

Cells were transfected with SiRNA targeting mRNA of a viral protein (N), or of 2 cellular proteins (Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) and Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)). Cells were also transfected with non targeting SiRNA. Figure 6 shows the monitoring of RSV multiplication using RSV-GFP virus on SiRNA treated cells. A strong GFP signal is observed (6A) and measured (6B) on control cells transfected with non targeting SiRNA or cells transfected with SiRNA against GAPDH mRNA. In contrast GFP expression is decreased in infected cells expressing SiRNA targeting N or IMPDH. Note that we verified that GFP fluorescent signal in RSV-GFP infected cells at 48h p.i. was correlated with the viral dose as previously demonstrated for a similar recombinant RSV expressing Cherry (RSV-Cherry)²¹. To assess drug efficiency on RSV multiplication, HEp-2 cells have been infected with RSV-GFP for 48 h in the presence of various drug concentrations. We observed a strong decrease of the GFP signal, which reaches the background noise (signal observed on uninfected cells), in the presence of increased drug concentration as shown in figure 7. The observed IC₅₀ for AZD4316 is about 4 nM similar to the published EC₅₀ of about 2–40 nM against different HRSV strains²³. Analysis of IBs and IBAGs dynamics in living cells thanks to RSV-M2-1-GFP are shown on Figures 8 and 9 (and movies 1 and 2). IBs appear as mobile spherical structures able to fuse forming a larger spherical inclusion. IBAGs are very dynamic. They undergo continuous

assembly-disassembly cycles with formation of small IBAGs that grow, fuse into large IBAGs then disappear.

DISCUSSION:

We present here the method of rescue of recombinant RSVs from 5 plasmids and their amplification. The ability to manipulate the genome of viruses has revolutionized virology research to test mutations, express an additional gene or a tagged viral protein. For the RSV we have described and used as an example in this article a virus expressing a reporter gene, the RSV-GFP (unpublished) and a RSV expressing a M2-1 protein fused to a GFP tag¹². RSV rescue is challenging and requires practice. The transfection efficiency is critical implying a wise selection of the transfection reagent and a prior optimization of the transfection protocol. The use of cells expressing the bacteriophage T7 RNA polymerase (T7 pol) is mandatory because the viral cDNA is placed downstream the T7 pol promoter in most of the reverse genetic vector. An alternative is to express the T7 pol from a vaccinia helper virus. However the use of cells stably expressing the T7 pol avoids the necessity of separating the two viruses and prevents possible interference of vaccinia with the rescue. From our experience it is important to perform the first passage of the reverse genetic (P0 to P1) without freezing the inoculum to ensure maximal rescue efficiency. This implies that the MOI is not controlled. However, at this step the titers remain very low resulting in low MOI for the first passage. To obtain RSV stocks with high infectious titers (10^6 - 10^7 PFU/mL), it is important to wait for a strong CPE and to scrape the cells to gather the viral particles attached to the cells. In our hands, titers do not increase after 96 h p.i. The fast cooling of the viral suspension is important to maintain high titers. Instead of immersion in precooled -80 °C alcohol, this may also be achieved by immersion in dry ice-ethanol mix or in liquid nitrogen. The addition of the conservation solution will ensure longer stability of the virus suspension at -80°C. The storage at -80°C is critical, the virus will quickly loss infectivity when stored at -20°C or in liquid nitrogen. We describe RSV amplification on HEp-2 cells which is the most popular cell line to grow RSV but it is able to grow efficiently on numerous cell line *in vitro*. Note however that growth on Vero cells may result in alteration in G expression²⁴.

We describe a very simple protocol of plaque titration of RSV using microcrystalline cellulose overlay. As for all titration assays, it is sensitive to contamination with high titer suspensions requiring careful manipulation. Conventional RSV titration assays use agarose or carboxymethyl cellulose (CMC) overlays and require immunostaining and microscopic observations for titer determination. A protocol using agarose ICN immunodiffusion grade agarose has been described enabling direct visualization of plaques without immunostaining²⁵. However HEp-2 are very sensitive to heated agar overlay which makes this protocol difficult to use for multiple virus titrations, e.g. a too hot overlay destroys the cell layer, on the other hand when it is not hot enough it solidifies after the first plate distribution. The Use of microcrystalline cellulose for plaque assay has been first described by Matrosovich, *et al* for influenza A virus titration assay²⁶. Thanks to its low viscosity the microcrystalline cellulose overlay is easy to dispense and to remove from plates wells making it compatible with 96 wells plates. It is thus particularly adapted for serological studies and drug sensitivity analysis. Note that since microcrystalline

cellulose does not need to be heated, the drugs may be easily incorporated in the overlay. It is however important that the plates remain perfectly still during incubation otherwise large comet-shaped foci will form instead of round plaques. Plaque revelation using crystal violet is cheap and simple, but this solution is toxic and has to be properly disposed of. The recycling of the solution limits waste production. Moreover, this method is sensitive to cell monolayer damage that would appear as false white spots that are not viral plaques. One example is shown on figure 4 (green star). To prevent this bias, 1) cells have to be handled with caution to avoid scratching or flushing the cell monolayer, 2) aspiration and dispensing have to be made always at the same spot to circumscribe the damage in one known area, 3) false white spot may be identified thanks to their shape (not spherical), their sharp edges and their position. We first used Avicel RC581, as previously published^{21, 26}. However the RC581 is no more available and we successfully replaced it by RC591. To adapt this assay to other cell/virus couples, the concentration of microcrystalline cellulose has to be determined depending on the virus and the cells. Too much microcrystalline cellulose may be toxic for cells and lead to small plaques, too little will lead to diffusion of the virus in the medium.

We describe 2 examples of use of the RSV-GFP virus to monitor RSV multiplication: in the presence of an antiviral drug or when silencing a cellular protein. We demonstrated that the GFP signal is correlated with viral multiplication. Our method allows effortless evaluation of viral multiplication, in "real time". It enables to easily determine the IC50 of an antiviral drug as shown on figure 7. Importantly, this measurement is adaptable for use in medium or broadband, especially for the screening of chemical libraries. This reporter expressing virus may also be useful to assess the effect on virus multiplication of a modulation of cellular protein expression. RNA interference is a biological process whereby a specific mRNA is degraded following its specific recognition by a small interfering RNA (siRNA), thus reducing or ideally abolishing the expression of the corresponding protein²⁷. In our example, by monitoring GFP signal intensity in RSV-GFP infected cells we assess the impact on RSV multiplication of the silencing of the viral nucleocapsid (N) mRNA or the host Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) mRNA. IMPDH2 is a purine biosynthetic enzyme that catalyzes a rate limiting step towards the *de novo* biosynthesis of guanine nucleotides from IMP²⁸. It is thus a regulator of the intracellular guanine nucleotide pool. IMPDH inhibitors such as ribavirin exert inhibitory effects on RNA viruses including RSV infection²⁹⁻³¹. As shown on figure 6, inhibition of IMPDH expression impairs viral multiplication as indicated by the reduction of the GFP signal, mimicking the effects of ribavirin on RSV growth. Likewise, the viral multiplication is almost abolished in the presence of siRNA targeting the viral N protein. This result was expected since siRNA targeting the N protein were expected to prevent viral nucleocapsid assembly and have proven to strongly impair viral replication³². Administration of these siRNA by nebulization inhibited the subsequent infection by RSV in healthy adults³³. Effect of N or IMPDH siRNA are specific since inhibition of the GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) expression, chosen as a control gene, does not impair viral multiplication as compared to the non-targeting siRNA. Note that no cell toxicity was detected in any conditions. Taken together these results validate our strategy which could be up scaled to high throughput screening using siRNA libraries or other knock out methods such as CRISPRcas9 technology³⁴.

Recombinant viruses expressing a fusion fluorescent protein represent powerful tools to study viral proteins and viral structures dynamics. RSV expressing a fluorescent M2-1 protein enables the observation of IBs and IBAGs dynamics. IBs, which may be considered as RSV viral factories, appear as spherical dynamic structures. They are able to fuse to form larger spherical structures (Figure 8 and movie 1). These data suggest that RSV IBs are liquid organelles, similar to what has been described for rabies virus³⁵. IBAGs represent a subcompartment inside IBs, in which viral mRNA and M2-1 protein concentrate whereas the genomic RNA, the nucleocapsid and the polymerase are only present in the rest of the IBs¹². Video microscopy experiments reveal that IBAGs are very dynamic structures exhibiting liquid properties (Figure 8 and movie 2). They may be considered as liquid compartment resulting from liquid-liquid phase transition.

The possibility of genetically manipulating viruses remains a tool of choice to study both the mechanisms of their multiplication and their sensitivity to drugs. Reverse genetics might be considered now as part of the "classical" techniques of virology. However, it remains arduous for some viruses like RSV. This is why this protocol describes in details the steps to successfully rescue and amplify recombinant RSVs.

ACKNOWLEDGMENTS:

We thank Dr Qin Yu from AstraZeneca R&D Boston - USA, for providing the AZD4316 drug. We are grateful to the Cymages platform for access to ScanR Olympus microscope, which was supported by grants from the region Ile-de-France (DIM ONE HEALTH). We acknowledge support from the INSERM and the Versailles Saint-Quentin University.

DISCLOSURES:

The authors have nothing to disclose.

489 **FIGURE AND TABLE**

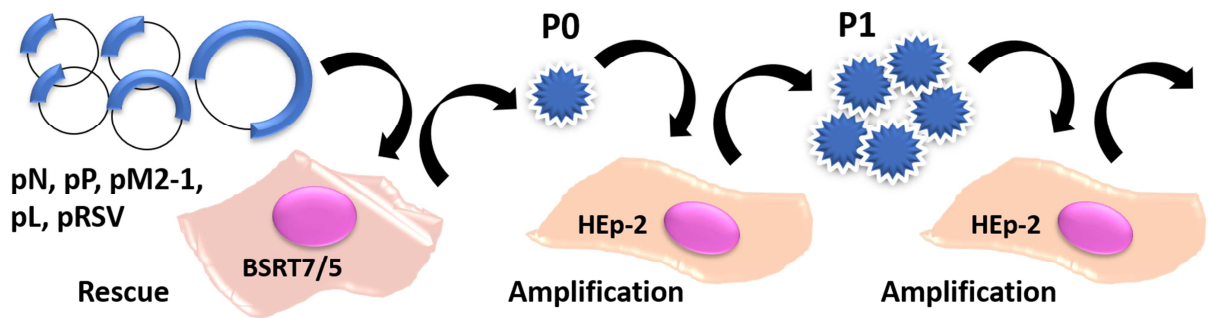
490 **Table 1: Cell number and inoculum volume to use in different flasks**

Plate or flask	HEp-2 cells to be seeded the day before	Medium volume (mL)	Virus Inoculum volume (mL)
150 cm ² flask	1.5 x 10 ⁶	30	5
75 cm ² flask	7.5 x 10 ⁶	15	3
25 cm ² flask	2.5 x 10 ⁶	5	1
6 wells plate	1 x 10 ⁶	2	0.5

491

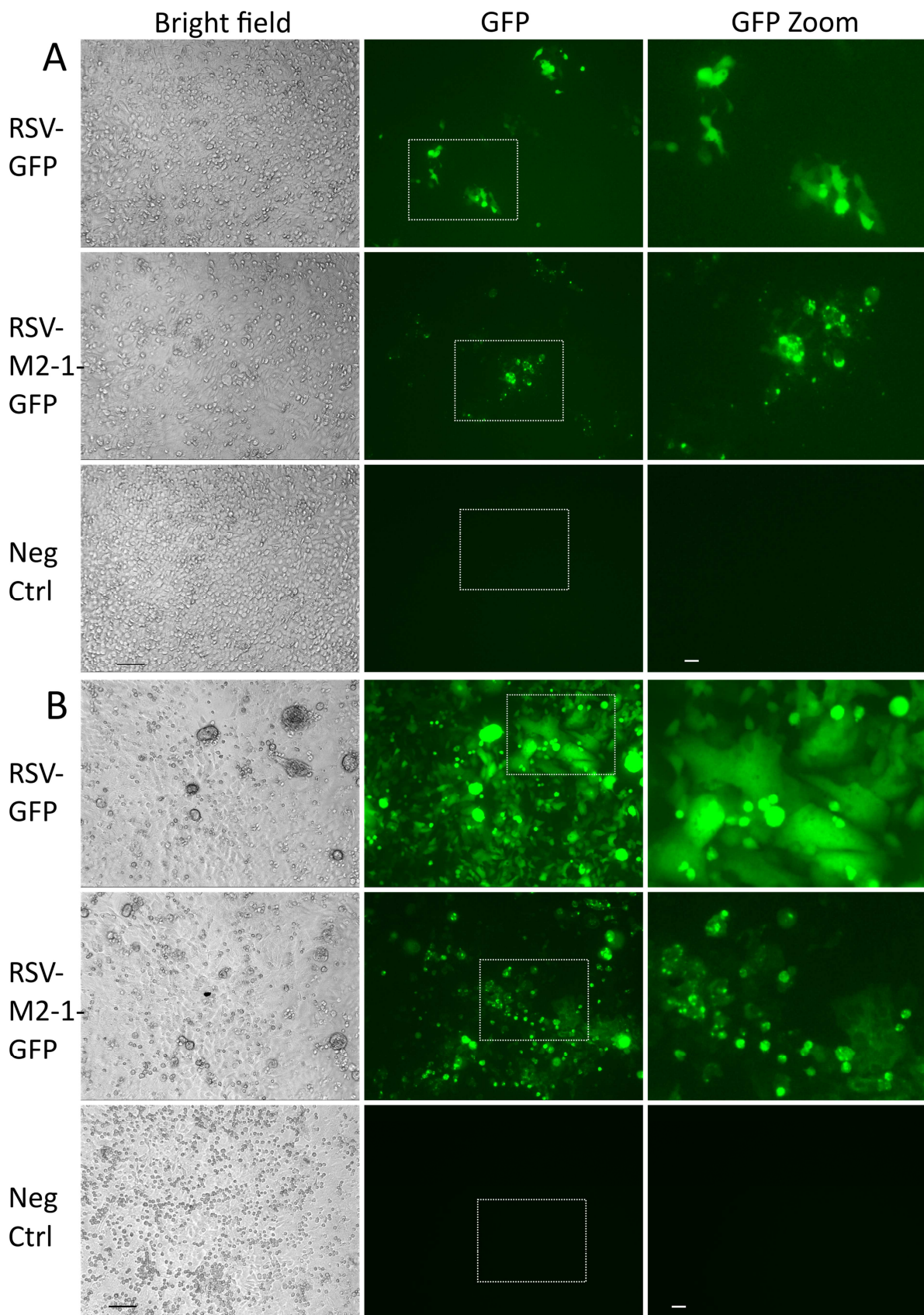
492

493



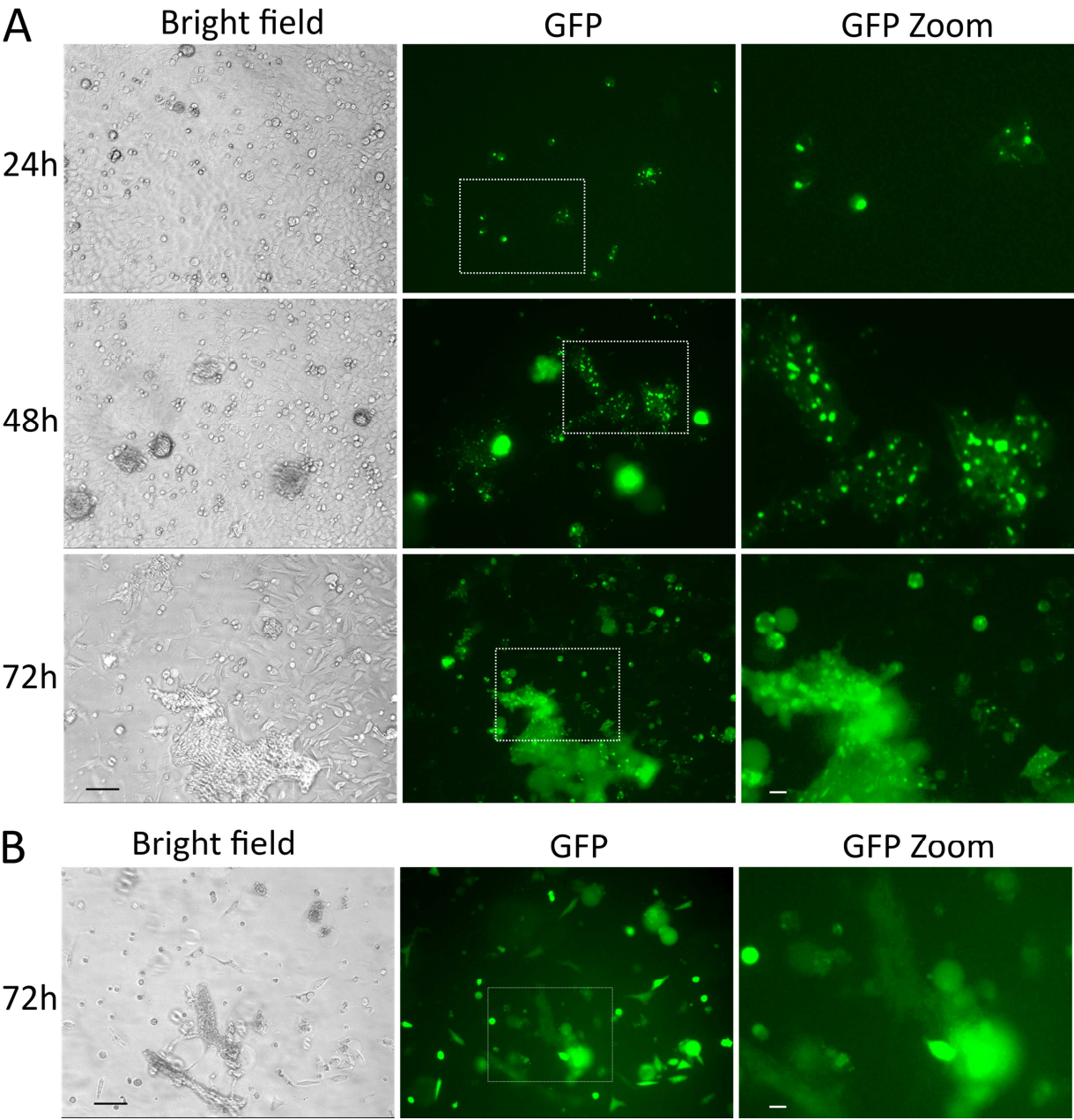
494

495 **Figure 1: Schematic representation of the rescue and amplification steps.**
496 **(Rescue)** Transfection of expression vector of N, P, L, M2-1 and RSV antigenomic RNA into
497 BSRT5/7 cells. Expression of the antigenomic RSV RNA and of the mRNA of N, P, L and M2-1 by
498 the T7 RNA polymerase. The N, P, L and M2-1 proteins replicate and transcribe the genomic
499 RNA initiating a viral multiplication cycle. New viral particles are produced and multiply giving
500 rise to the P0. **(Amplification)** The virus harvested from the rescue (P0) is then amplified on
501 HEp-2 cells to produce a higher titer viral suspension (P1). This one is then amplified to obtain
502 viral stocks.



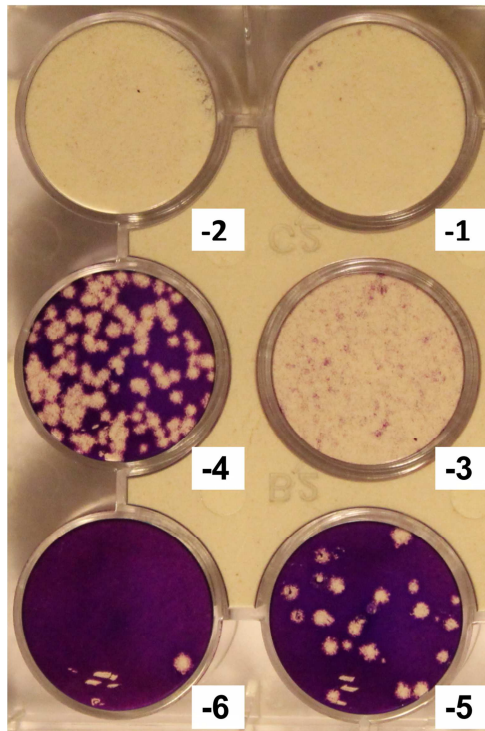
503

Figure 2: CPE and pattern of fluorescence observed during rescue of RSV-GFP and RSV-M2-1-GFP. A) BSRT5/7 cells were transfected with the reverse genetics' vectors as indicated and phase-contrast and fluorescence images were taken at 72 h post transfection. The negative control (Neg Ctrl) corresponds to cells transfected with the expression vectors of N, P, L and M2-1 without the reverse genetic vector. B) HEp-2 cells were infected with the virus harvested from the transfected BSRT5/7 cells (the zero passage, 72 h post-transfection) and images were taken 72 h post infection. The images shown are of representative fields. Scale bar 100 μ m. The boxed area enclosed cells shown in magnification. Scale bar 20 μ m.



515 **Figure 3:** Evolution of the CPE and the fluorescence observed during amplification of
516 recombinant RSV. HEp-2 cells were infected at a MOI of 0.01 PFU/cells for 72 h with the first
517 passage of RSV-M2-1-GFP (A) or RSV-GFP (B). Phase-contrast and fluorescence images were
518 taken at 24 h (A), 48 h (A) and 72 h (A and B) post infection. The images shown are of a
519 representative field. Scale bar 100 μ m. The boxed area enclosed cells shown in magnification.
520 Scale bar 20 μ m.

A P1 RSV-GFP



B

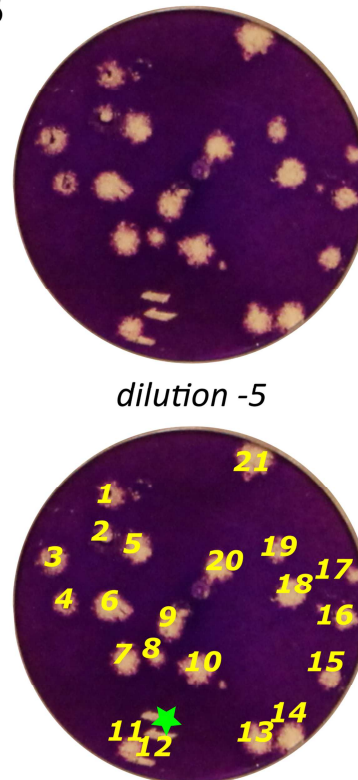


Figure 4: Determination of RSV titer using plaque assay. A) Results of a plaque titration assay (see protocol). Dilutions of the viral stocks are indicated in base-10 logarithm. Cells infected with the 3 first dilution are all detached. The plaque numbers observed with the 10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6} dilution are consistent. B) Illustration of the plaque enumeration (yellow numbers). The green star indicates scratches on the cell layer.

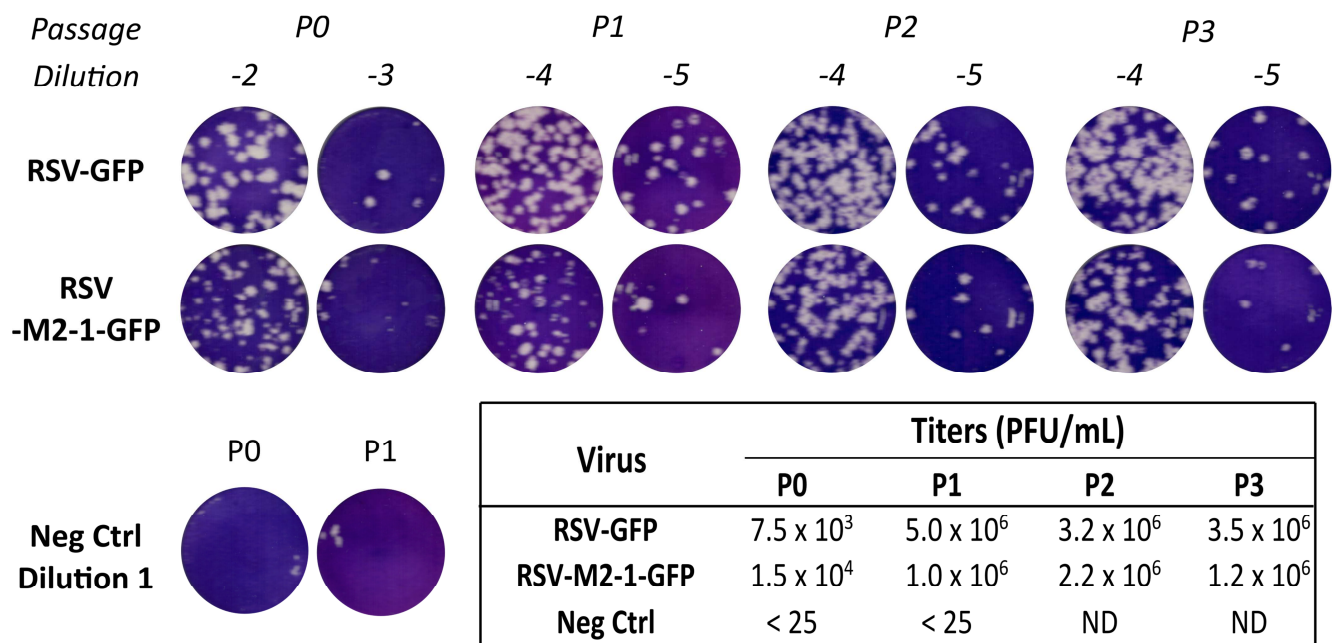
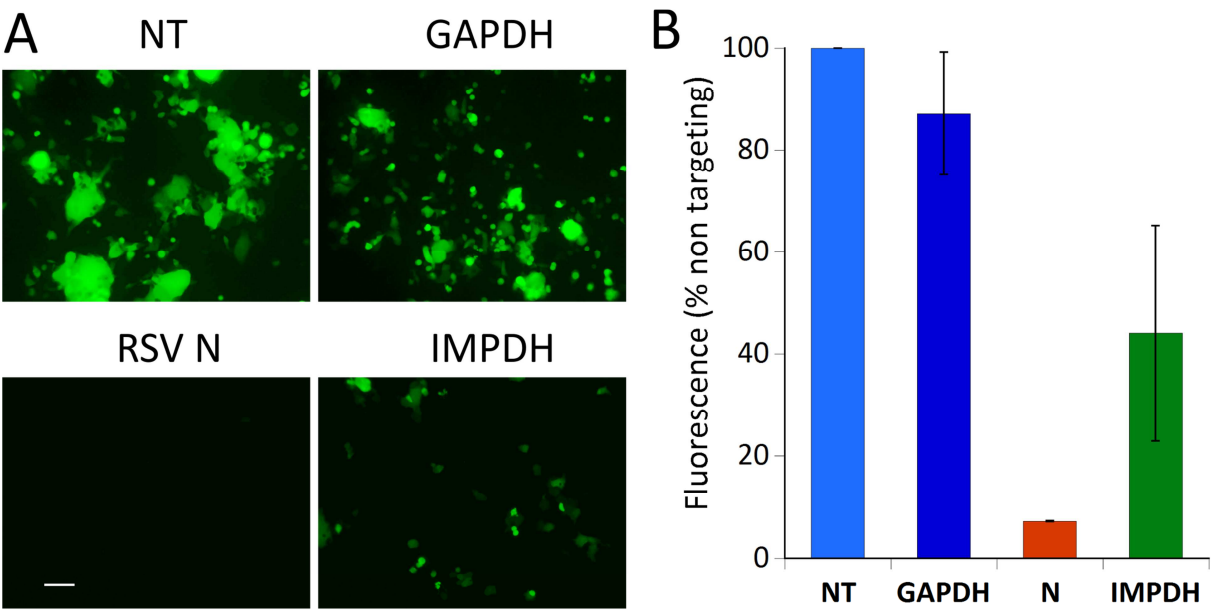


Figure 5: Titration of rescued and amplified virus. Plaque phenotypes of the RSV-GFP and RSV-M2-1-GFP at the different passages assayed on HEp-2 cells. The titers of the subsequent passages are shown in the table. Representative data are shown. Dilutions of the viral stocks are indicated in base-10 logarithm.

535



536

537 **Figure 6:** Inhibition of RSV-GFP expression by SiRNA targeting RSV N or IMPDH. A549 cells were
538 treated with control non-targeting SiRNA (NT) (light blue bar), or SiRNA targeting GAPDH (blue
539 bar), IMPDH (orange bar) or RSV N (green bar) for 48 h then infected with RSV-GFP at MOI of
540 0.05 PFU/cell. The green fluorescence was read at 48 h post infection (p.i.). A) Representative
541 images of the RSV-GFP infected cells at 48h p.i. treated with SiRNA as indicated on the pictures.
542 Scale bar 100 μ m. B) Data are the mean $\pm$ S.D of two independent experiments performed in
543 triplicate.

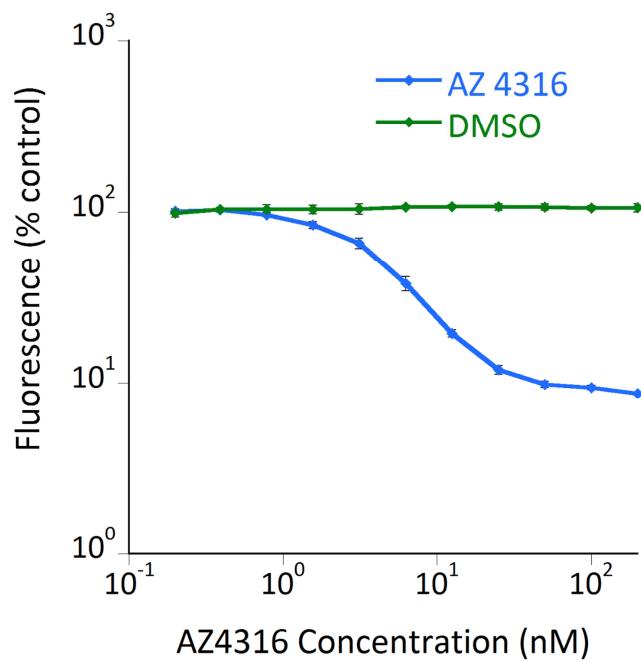


Figure 7: Inhibition of RSV-GFP multiplication by AZD4136 compound. HEp-2 cells in 96-well plates were infected with RSV-GFP at MOI of 0.05 PFU/cell in the presence of serial dilutions of AZD4316 compound or control DMSO. The green fluorescence was read at 48 h p.i.. Data are the mean $\pm$ S.D of two independent experiments performed in triplicate.

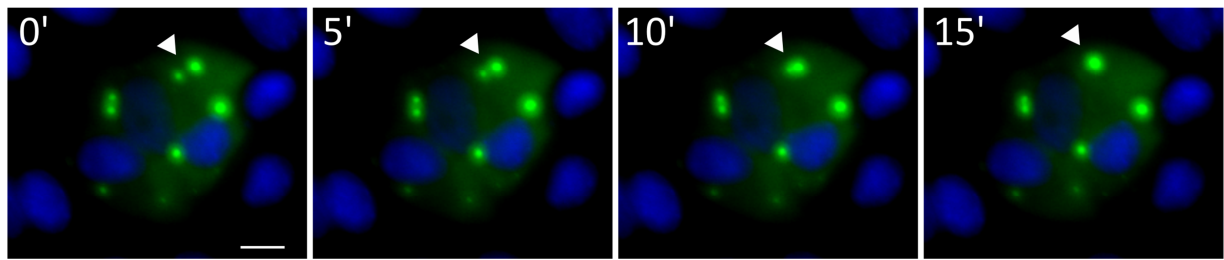


Figure 8: Analysis of IBs dynamics by tracking the fluorescent protein M2-1-GFP in HEp-2 infected cells by time lapse microscopy. At 18 h p.i., cells were imaged every five minutes with ScanR Olympus microscope for 5h in a chamber heated at 37 °C. The IBs are fluorescent (green) because they host M2-1-GFP, and nuclei are stained with Hoechst (blue). White arrows indicate IBs undergoing fusion. Scale bar 10 μ m

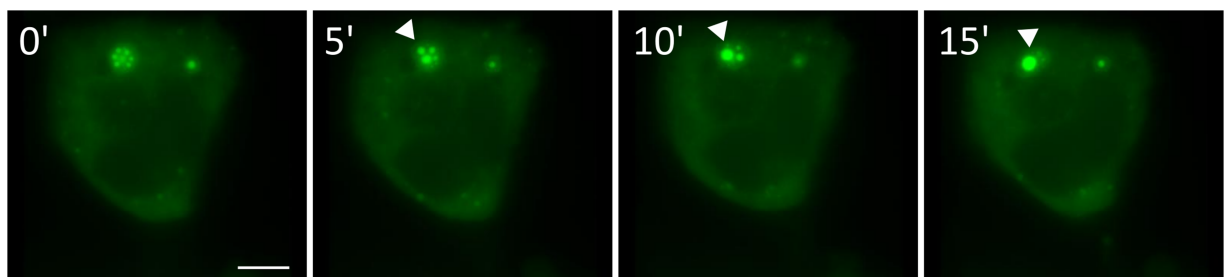


Figure 9: Analysis of IBAGs dynamics by time lapse microscopy in RSV-M2-1-GFP infected cells. At 18 h p.i., cells were imaged in a chamber heated at 37 °C, with ScanR Olympus microscope. The M2-1-GFP protein was visualized by green fluorescence. White arrows indicate IBs undergoing fusion of IBAGs. Scale bar 5 μ m

Movie 1: *In vivo* analysis of IBs dynamics in RSV-M2-1-GFP in HEp-2 infected cells. At 18 h p.i., cells were imaged every five minutes for 5h in a chamber heated at 37 °C, with ScanR Olympus microscope. Scale Bar 10 μ m. The resulting movie shows 7 frames per second (fps).

Movie 2: *In vivo* analysis of IBAGs dynamics in RSV-M2-1-GFP infected cells. At 18 h p.i., cells were imaged every five minutes for 3 h 40 min in a chamber heated at 37 °C, with ScanR Olympus microscope. Scale bar 2 μ m. The resulting movie shows 4 fps.

REFERENCES:

1. Shi, T. *et al.* Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet (London, England)*. **390** (10098), 946–958, doi: 10.1016/S0140-6736(17)30938-8 (2017).
2. Falsey, A.R., Hennessey, P.A., Formica, M.A., Cox, C., Walsh, E.E. Respiratory Syncytial Virus Infection in Elderly and High-Risk Adults. *New England Journal of Medicine*. **352** (17), 1749–59, doi: 10.1056/NEJMoa043951 (2005).
3. DeVincenzo, J.P. *et al.* Activity of Oral ALS-008176 in a Respiratory Syncytial Virus Challenge Study. *The New England journal of medicine*. **373** (21), 2048–58, doi: 10.1056/NEJMoa1413275 (2015).
4. DeVincenzo, J.P. *et al.* Oral GS-5806 Activity in a Respiratory Syncytial Virus Challenge Study. *New England Journal of Medicine*. **371** (8), 711–722, doi: 10.1056/NEJMoa1401184 (2014).
5. Afonso, C.L. *et al.* Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Archives of virology*. **161** (8), 2351–2360, doi: 10.1007/s00705-016-2880-1 (2016).
6. Collins, P.L., Hill, M.G., Cristina, J., Grosfeld, H. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93** (1), 81–5 (1996).
7. Hoenen, T. *et al.* Inclusion bodies are a site of ebolavirus replication. *Journal of virology*. **86** (21), 11779–88, doi: 10.1128/JVI.01525-12 (2012).
8. Heinrich, B.S., Cureton, D.K., Rahmeh, A.A., Whelan, S.P. Protein expression redirects vesicular stomatitis virus RNA synthesis to cytoplasmic inclusions. *PLoS Pathog*. **6** (6), e1000958, doi: 10.1371/journal.ppat.1000958 (2010).
9. Lahaye, X. *et al.* Functional Characterization of Negri Bodies (NBs) in Rabies Virus-Infected Cells : Evidence that NBs Are Sites of Viral Transcription and Replication. *Journal of virology*. **83** (16), 7948–58, doi: 10.1128/JVI.00554-09 (2009).
10. Kolesnikova, L., Mühlberger, E., Ryabchikova, E., Becker, S. Ultrastructural organization of recombinant Marburg virus nucleoprotein: comparison with Marburg virus inclusions. *Journal of virology*. **74** (8), 3899–3904 (2000).
11. Dolnik, O., Stevermann, L., Kolesnikova, L., Becker, S. Marburg virus inclusions: A virus-induced microcompartment and interface to multivesicular bodies and the late endosomal compartment. *European Journal of Cell Biology*. **94** (7–9), 323–331, doi: 10.1016/j.ejcb.2015.05.006 (2015).

12. Rincheval, V. *et al.* Functional organization of cytoplasmic inclusion bodies in cells infected by respiratory syncytial virus. *Nature communications*. **8** (1), 563, doi: 10.1038/s41467-017-00655-9 (2017).
13. Santangelo, P.J., Bao, G. Dynamics of filamentous viral RNPs prior to egress. *Nucleic acids research*. **35** (11), 3602–11, doi: 10.1093/nar/gkm246 (2007).
14. Lifland, A.W., Jung, J., Alonas, E., Zurla, C., Crowe, J.J.E., Santangelo, P.J. Human Respiratory Syncytial Virus Nucleoprotein and Inclusion Bodies Antagonize the Innate Immune Response Mediated by MDA5 and MAVS. *Journal of virology*. **86** (15), 8245–58, doi: 10.1128/JVI.00215-12 (2012).
15. Garcia, J., Garcia-Barreno, B., Vivo, A., Melero, J.A. 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*. **Jul;195(1)** (1), 243–247, doi: 10.1006/viro.1993.1366 (1993).
16. Brown, G. *et al.* Evidence for an association between heat shock protein 70 and the respiratory syncytial virus polymerase complex within lipid-raft membranes during virus infection. *Virology*. **338** (1), 69–80, doi: 10.1016/j.virol.2005.05.004 (2005).
17. Radhakrishnan, A. *et al.* Protein analysis of purified respiratory syncytial virus particles reveals an important role for heat shock protein 90 in virus particle assembly. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. **9** (9), 1829–48, doi: 10.1074/mcp.M110.001651 (2010).
18. Racaniello, V.R., Baltimore, D. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science (New York, N.Y.)*. **214** (4523), 916–919 (1981).
19. Schnell, M.J., Mebatsion, T., Conzelmann, K.K. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *The EMBO journal*. **13** (18), 4195–4203 (1994).
20. Collins, P.L., Hill, M.G., Camargo, E., Grosfeld, H., Chanock, R.M., Murphy, B.R. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **92** (25), 11563–11567 (1995).
21. Rameix-Welti, M.-A. *et al.* Visualizing the replication of respiratory syncytial virus in cells and in living mice. *Nature communications*. **5**, 5104, doi: 10.1038/ncomms6104 (2014).
22. Buchholz, U.J., Finke, S., Conzelmann, K.K. 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*. **73** (1), 251–9 (1999).

23. Cianci, C., Meanwell, N., Krystal, M. Antiviral activity and molecular mechanism of an orally active respiratory syncytial virus fusion inhibitor. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **55** (3), 289–292, doi: 10.1093/jac/dkh558 (2005).
24. Derscheid, R.J. *et al.* Human respiratory syncytial virus memphis 37 grown in HEp-2 cells causes more severe disease in lambs than virus grown in vero cells. *Viruses*. **5** (11), 2881–2897, doi: 10.3390/v5112881 (2013).
25. Mckimm-breschkin, J.L. Short communication A simplified plaque assay for respiratory syncytial virus — direct visualization of plaques without immunostaining. **120**, 113–117, doi: 10.1016/j.jviromet.2004.02.020 (2004).
26. Matrosovich, M., Matrosovich, T., Garten, W., Klenk, D. New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. **7**, 1–7, doi: 10.1186/1743-422X-3-63 (2006).
27. Novina, C.D., Sharp, P.A. The RNAi revolution. *Nature*. **430** (6996), 161–164, doi: 10.1038/430161a (2004).
28. Sintchak, M.D., Nimmesgern, E. The structure of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors. *Immunopharmacology*. **47** (2–3), 163–184, doi: 10.1016/S0162-3109(00)00193-4 (2000).
29. Beaucourt, S., Vignuzzi, M. Ribavirin: A drug active against many viruses with multiple effects on virus replication and propagation. Molecular basis of ribavirin resistance. *Current Opinion in Virology*. **8**, 10–15, doi: 10.1016/j.coviro.2014.04.011 (2014).
30. Hruska, J.F., Bernstein, J.M., Douglas, R.G., Hall, C.B. Effects of Ribavirin on Respiratory Syncytial Virus in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **17** (5), 770–775, doi: 10.1128/AAC.17.5.770.Updated (1980).
31. Simões, E.A.F. *et al.* Past, Present and Future Approaches to the Prevention and Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection in Children. *Infectious Diseases and Therapy*. **7** (1), 87–120, doi: 10.1007/s40121-018-0188-z (2018).
32. Alvarez, R. *et al.* RNA interference-mediated silencing of the respiratory syncytial virus nucleocapsid defines a potent antiviral strategy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **53** (9), 3952–3962, doi: 10.1128/AAC.00014-09 (2009).
33. DeVincenzo, J. *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **107** (19), 8800–8805, doi: 10.1073/pnas.0912186107/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0912186107 (2010).
34. Zhou, Y. *et al.* High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature*. **509** (7501), 487–491, doi: 10.1038/nature13166 (2014).

676 35. Nikolic, J. *et al.* Negri bodies are viral factories with properties of liquid organelles.
677 *Nature communications*. **8** (1), 58, doi: 10.1038/s41467-017-00102-9 (2017).

678

679

680

Name of Material/ Equipment	Company	Catalog Number	Comments/Description
35mm μ dish for live cell imaging	Ibidi	81156	
A549	ATCC	ATCC CCL-185	
Avicel RC-591	FMC BioPolymer	Avicel RC-591	Technical and other information on Avicels is available at http://www.fmcbiopolymer.com . Store at room temperature. Protocol in step 4 is optimized for this reagent.
BSRT7/5		not commercially available	See ref 22. Buchholz et al, 1999
Crystal violet solution	Sigma	HT90132	
Fluorescence microscope for observations	Olympus	IX73 Olympus microscope	
Fluorescence microscope for videomicroscopy	Olympus	ScanR Olympus microscope	
HEp-2	ATCC	ATCC CCL-23	
HEPES $\geq 99.5\%$	Sigma	H3375	
L-Glutamine (200 mM)	ThermoFisher Scientific	25030024	
LIPOFECTAMINE 2000 REAGENT	ThermoFisher Scientific	11668019	Protocol in step 2.3. is optimized for this reagent.
MEM (10X), no glutamine	ThermoFisher Scientific	11430030	
MEM, GlutaMAX Supplement	ThermoFisher Scientific	41090-028	
MgSO4 ReagentPlus, $\geq 99.5\%$	Sigma	M7506	

Opti-MEM I Reduced Serum Medium	ThermoFisher Scientific	51985-026	
Paraformaldehyde Aqueous Solution, 32%, EM Grade	Electron Microscopy Sciences	15714	
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	ThermoFisher Scientific	15140122	
Plasmids		not commercially available	see ref 21. Rameix-Welti <i>et al</i> , 2014
See Saw Rocker	VWR	444-0341	
Si RNA GAPDH	Dharmacon	ON-TARGETplus siRNA D-001810-10-05	SMARTpool and 3 of 4 individual siRNAs designed by Dharmacon.
Si RNA IMPDH2	Dharmacon	ON-TARGETplus siRNA IMPDH2 Pool- Human L-004330-00-0005	SMARTpool of 4 individual siRNAs designed by Dharmacon. Individual references and sequences J-004330-06: GGAAAGUUGCCCAUUGUAA; J-004330-07: GCACGGCGCUUUGGUGUUC; J-004330-08: AAGGGUCAAUCCACAAAUU; J-004330-09: GGUAUGGGUUCUCUGAUG;
Si RNA RSV N	Dharmacon	ON-TARGETplus custom siRNA	UUCAGAAGAACUAGAGGCUAU and UUUCAUAAAUUCACUGGGUUA
SiRNA NT	Dharmacon	ON-TARGETplus Non-targeting Pool	
SiRNA transfection reagent	Dharmacon	DharmaFECT 1 Ref: T-2001-03	Protocol in steps 5.1.and 5.1.2 are optimized for this reagent.
Sodium Bicarbonate 7.5% solution	ThermoFisher Scientific	25080094	
Spectrofluorometer	Tecan	Tecan infinite M200PRO	

Titre : L'analyse de l'interactome du facteur de transcription M2-1 du Virus Respiratoire Syncytial révèle une interaction avec PABPC1 (polyA-binding protein cytoplasmic 1).

Mots clés : virus respiratoire syncytial, interactions, virus-hôte, interactomique, ribonucléoprotéine virale, PABP, traduction, métabolisme des ARNm

Résumé : Bien que le Virus Respiratoire Syncytial, responsable de la bronchiolite du nourrisson, soit aujourd'hui un problème de santé publique majeur, il n'existe encore aucun vaccin ou antiviral curatif contre ce pathogène. Le manque de données sur les étapes clés du cycle viral et sur les interactions virus-cellule freine le développement de nouvelles molécules antivirales.

Nous avons étudié l'interactome de deux protéines virales : la polymérase L et le facteur de transcription M2-1. Dans ce but, nous avons mis au point un crible s'appuyant à la fois sur des critères d'interactomique et sur des critères fonctionnels.

La première étape consistait à identifier des partenaires potentiels de M2-1 et L par des co-immunoprécipitations couplées à une approche de protéomique quantitative. Pour plus de pertinence, ce crible a été réalisé sur cellules infectées, grâce des virus recombinants produits par génétique inverse. Ceci nous a permis d'identifier 45 et 137 partenaires potentiels de

L et M2-1 respectivement. Une étude systématique de l'impact de l'inhibition de 15 partenaires potentiels de M2-1 sur la multiplication virale a mis en avant trois candidats : ILF2, PABPN1 et PABPC1.

Nous nous sommes par la suite concentrés sur PABPC1. L'inhibition de l'expression de PABPC1 altère la multiplication virale, mais nous n'avons pas pu mettre en évidence un effet spécifique sur la transcription ou la traduction virale. Son interaction avec M2-1 a été confirmée, et le domaine MLLE de PABPC1 a été identifié comme le site de liaison à M2-1. L'interaction entre M2-1 et PABPC1 a été observée à la fois dans le cytoplasme et dans les IBAGs, des sous-structures concentrant les ARNm viraux au sein des corps d'inclusion viraux. Nous avons formulé l'hypothèse que M2-1, liée à PABPC1, accompagne les ARNm viraux après leur sortie des corps d'inclusion. Ceci suggère un rôle de M2-1 dans le devenir des ARNm viraux en aval de leur transcription.

Title : The interactome analysis of the Respiratory Syncytial Virus transcription factor M2-1 reveals an interaction with the polyA-binding protein PABPC1.

Keywords : respiratory syncytial virus, virus-host interactions, interactomics, viral ribonucleoprotein, PABP, traduction, ARNm metabolism

Abstract : Although the Respiratory Syncytial Virus, responsible of bronchiolitis in infants, represents a major public health problem, there are currently no vaccine or curative antiviral directed against it. The lack of information on key steps of its viral cycle and on virus-cell interactions hinders the development of new antiviral molecules.

We chose to study the interactome of two viral proteins: the polymerase L and the transcription factor M2-1. To do so, we developed a screen based on interactomic and functional criteria.

The first step consisted in identifying potential binding partners of M2-1 and L by co-immunoprecipitations coupled to quantitative proteomics. For better relevance, this screen was realised on infected cells, thanks to recombinant viruses produced by reverse genetics. 45 and 137 potential binding partners of M2-1 and L respectively were thus

identified. A systematic study of the inhibition of 15 potential partners of M2-1 and its impact on viral multiplication enabled the selection of three candidates: ILF2, PABPN1 and PABPC1.

We chose to concentrate on PABPC1. The inhibition of PABPC1's expression reduces viral multiplication, but no specific effect on viral transcription or translation was brought to light. Its interaction with M2-1 was confirmed, and the MLLE domain of PABPC1 was identified as the M2-1 binding site. The interaction between M2-1 and PABPC1 was observed both in the cytoplasm and in IBAGs, substructures of viral inclusion bodies where viral mRNA accumulate. We formulated the hypothesis that M2-1, with PABPC1, stays with viral mRNA after leaving inclusion bodies and during their translation. This suggests a role for M2-1 in the fate of viral mRNA downstream of transcription.